

В.Т. ЧЕЩЕВИК, канд. биол. наук, доцент¹

Д.В. ЖЕРНОСЕКОВ, канд. биол. наук, доцент¹

Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 10 октября 2017г.

ТРОМБОЦИТАРНАЯ АГРЕГАЦИЯ. МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ АДГЕЗИВНЫХ МОЛЕКУЛ И МИТОХОНДРИЙ

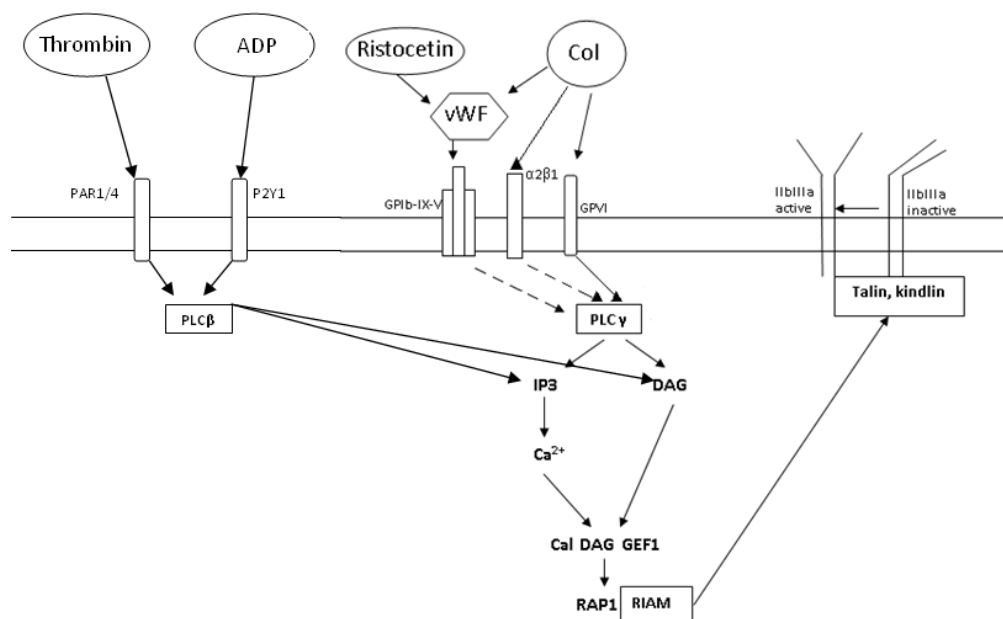
***Аннотация.** В статье представлены основные механизмы агрегации тромбоцитов с участием адгезивных молекул, раскрыта регулирующая роль митохондрий при агрегации тромбоцитов и в тромбообразовании. Выявлены основные молекулярные и клеточные мишени терапевтического воздействия при патологическом тромбообразовании.*

***Ключевые слова:** тромбоциты, митохондрии, адгезивные молекулы, интегрин, факторы свертывания крови, плазминоген, поры высокой проницаемости*

Сердечно–сосудистые заболевания тромботического генезиса занимают лидирующее место в мировом рейтинге смертности населения, поэтому исследование клеточных и молекулярных механизмов тромбообразования является актуальной медико–биологической проблемой. В процессе формирования тромба присутствуют две составляющие клеточного контакта – взаимодействие тромбоцитов с поврежденным участком сосудистой стенки и межтромбоцитарное взаимодействие или агрегация. Агрегация тромбоцитов – физиологический процесс, препятствующий кровопотере при повреждении сосуда, однако при патологических изменениях в сердечно–сосудистой системе повышенная агрегационная способность тромбоцитов повышает риск развития тромбозов. Способность тромбоцитов к агрегации определяется наличием на их поверхности мембранных гликопротеиновых рецепторов, которые при переходе в активированное состояние связывают бивалентные адгезивные лиганды, обеспечивая тем самым межклеточный контакт. Однако выполнение тромбоцитами своей физиологической функции возможно лишь при условии обеспечения клеток достаточным количеством энергии, за выработку которой отвечают митохондрии. В настоящее время появились данные, которые утверждают, что роль митохондрий в процессе агрегации не ограничивается энергообеспечением тромбоцита. В работе рассмотрен молекулярный механизм агрегации тромбоцитов, ингибирование этого процесса Лиз–плазминогеном и обсуждаются механизмы, благодаря которым процессы, происходящие в митохондриях, стимулируют тромбоцитарную активацию и агрегацию.

Классическая схема тромбоцитарной агрегации включает несколько этапов. На первом этапе происходит связывание агониста, в роли которого могут выступать тромбин, коллаген, ристоцетин, АДФ и другие молекулы, с интегральными мембранными рецепторами на поверхности тромбоцита. Далее сигнал передается внутрь клетки, где, благодаря участию фосфолипаз С, образуются молекулы инозитол–3–фосфата и диацилглицерола, которые способствуют высвобождению ионов кальция из плотных гранул тромбоцита (рисунок).

В свою очередь, повышение уровня внутриклеточного кальция через ряд внутриклеточных посредников приводит к активации цитоскелетного компонента талина, который, связываясь с цитоплазматическим доменом интегрин α IIb β 3, меняет конформацию этого белка и переводит его в состояние высокой аффинности [1,2]. Находясь в таком состоянии, интегрин α IIb β 3 способен связывать фибриноген, который образует бивалентную сшивку между двумя активированными тромбоцитами. Однако было показано, что фибриноген – далеко не единственный адгезивный лиганд, который необходим для эффективной агрегации тромбоцитов. Среди адгезивных лигандов интегрин α IIb β 3 были обнаружены фибронектин, витронектин и тромбоспондин [3–5].



Col – коллаген, vWF – фактор фон Виллебранда PLC – фосфолипаза C, IP3 – инозитол 3 фосфат, DAG – диацилглицерол, Cal DAG GEF1 – регулируемый кальцием и диацилглицеролом GEF1 (фактор обмена гуаниловых нуклеотидов, ускоряющий обмен ГДФ на ГТФ), RAP1 – Ras-связанный протеин 1, RIAM – Rap-ГТФ-зависимая адапторная молекула.

Рисунок – Механизм проведения сигнала на тромбоцитарный интегринальный рецептор α IIb β 3 [6]

Все указанные адгезивные лиганды имеют в своем составе последовательность Арг–Гли–Асп, которая является сайтом для узнавания вышеуказанного тромбоцитарного интегрин. Такая же последовательность имеется в структуре фибриногена. Исходя из этого, можно предположить, что молекулы фибронектина, витронектина и тромбоспондина способны препятствовать эффективному связыванию фибриногена благодаря конкуренции за связывающий сайт в интегрине α IIb β 3. Однако на самом деле все эти адгезивные лиганды способствуют тромбоцитарной агрегации. Так, в случае тромбоспондина, авторами работы была предложена модель, согласно которой объясняется участие этого лиганда в формировании межтромбоцитарных контактов [3]. Экспонирование интегрин α IIb β 3 на поверхности активированных тромбоцитов обеспечивает его связывание с молекулой фибриногена. В свою очередь, фибриноген способен образовывать связь с тромбоспондином. Формирование такой триады на мембранах соседних тромбоцитов может способствовать тому, что между молекулами тромбоспондинов, находящихся на мембранах соседних клеток, устанавливается контакт.

Фибронектин представляет собой димер с молекулярной массой 250 кДа. Он обнаруживается в значительном количестве в плазме крови (230–650 мкг/мл), но его присутствие также показано в составе экстрацеллюлярного матрикса и в альфа–гранулах тромбоцитов [7,8]. Каждая из субъединиц димера состоит из трех типов повторяющихся модулей, которые получили название фибронектиновых повторов (FN1, FN2 и FN3). Фибронектиновые модули входят в состав многих белков животного происхождения. Так, белок клеточной адгезии N–CAM (neural cell adhesion molecule), который может участвовать в образовании гомофильных и гетерофильных адгезивных контактов, содержит фибронектиновые повторы третьего типа FN3. Наличие таких фибронектиновых повторов позволяет молекуле N–CAM формировать адгезивный контакт с фактором роста фибробластов [9]. Следует также отметить, что адгезивный контакт фибронектина с тромбоцитарными интегринными осуществляется благодаря наличию в составе FN3 специфической триады Арг–Гли–Асп. Особая роль фибронектина в осуществлении межтромбоцитарных контактов во время агрегации была определена после того, как было установлено, что у мутантных мышей сохраняется способность к агрегации даже при отсутствии фибриногена, или фактора фон Виллебранда, или их обоих [10]. На основе проведенных экспериментов было показано, что именно фибронектин отвечает за формирование адгезивных связей между тромбоцитами и поврежденным эпителием в условиях гипофибриногенемии [11]. Вместе с тем было обнаружено, что истощение пула фиброн-

ектина плазмы при отсутствии фибрина усиливает тромбоцитарную агрегацию. Механизм, благодаря которому осуществляется такое переключение функциональной роли фибронектина, остается невыясненным [11].

Если роль фибриногена, тромбоспондина и фибронектина в обеспечении эффективной агрегации тромбоцитов является в достаточной степени установленной, то функциональная роль витронектина в этом процессе является предметом дискуссий. Витронектин – это один из адгезивных белков в циркулирующей плазме, и в то же время – компонент экстрацеллюлярного матрикса и составная часть содержимого альфа–гранул тромбоцитов. Было показано, что витронектин ингибирует АДФ– и тромбин–индуцируемую агрегацию тромбоцитов. На основании этого было сделано предположение, что витронектин препятствует установлению адгезивных связей между фибриногеном и интегрином α IIb β 3 [12]. Однако позже было установлено, что АДФ– и тромбин–индуцируемая агрегация тромбоцитов блокируется антителами к витронектину [4]. Такого противоречия можно избежать, если принять во внимание, что в экспериментах были задействованы две разные формы этого адгезивного белка. Витронектин плазмы существует в виде малоактивной мономерной формы, а из альфа–гранул тромбоцитов во время активации секретируется активная мультимерная форма этого белка, которая обеспечивает эффективную агрегацию.

Таким образом, для установления и поддержания адгезивного контакта между тромбоцитами во время агрегации необходимо взаимодействие нескольких адгезивных белков с интегриновым рецептором α IIb β 3.

Следует сказать, что моделируемые системы для изучения процесса тромбоцитарной агрегации не являются в полной мере истинными, поскольку в реальных условиях следует учитывать действие природной антисвертывающей системы крови – компонентов плазминоген–плазминовой системы. Эта система обеспечивает растворение фибриновых сгустков и поддерживает гемостатический баланс крови. Плазмин – трипсиноподобный фермент, который образуется из неактивного предшественника плазминогена, циркулирующий в плазме в достаточно высокой концентрации – 2,4 мкМ [13]. В свою очередь, для плазминогена показано существование двух изоформ – Глу–плазминогена и Лиз–плазминогена. Эти изоформы имеют конформационные отличия. Глу–плазминоген характеризуется закрытой конформацией, в его структуре N–концевой фингер–домен взаимодействует с пятым крингловым доменом. При формировании Лиз–плазминогена происходит отщепление фингер–домена, и эта изоформа имеет открытую конформацию. Лиз–плазминоген характеризуется более высоким сродством к фибриногену, чем Глу–плазминоген, а также более эффективно расщепляется активаторами, переходя в плазмин. Образование плазмина на поверхности клеток, в том числе и тромбоцитов, проходит через стадию Лиз–плазминогена [14,15]. В литературе имеются данные о том, что плазминоген может выступать в роли адгезивного лиганда для интегриновых рецепторов, в частности – α M β 2 и α 5 β 1 [16]. Интегрин α M β 2 имеет лейкоцитарное происхождение, хотя для него показано также экспонирование на поверхности активированных тромбоцитов [17]. Нами было изучено влияние двух форм плазминогена на агрегацию тромбоцитов, индуцируемую АДФ, тромбином и коллагеном. Показано, что Лиз–плазминоген ингибировал агрегацию тромбоцитов при действии выше указанных индукторов, в то время как Глу–плазминоген такого эффекта не имел [18]. Описанный эффект имеет место преимущественно на второй необратимой стадии агрегации, которая обусловлена секрецией адгезивных белков (фибриногена, витронектина, фибронектина и тромбоспондина) из альфа–гранул тромбоцитов и формированием адгезивных контактов при участии интегрин α IIb β 3. Следует отметить, что витронектин, фибронектин и тромбоспондин имеют сайты для связывания плазминогена, а непосредственного взаимодействия плазминогена с субъединицами интегрин α IIb β 3 не выявлено [6].

Детальный механизм ингибирующего действия Лиз–плазминогена на агрегацию тромбоцитов еще требует выяснения, однако полученные данные могут представлять интерес в плане практического применения. В этой связи заслуживают внимания работы, в которых было предложено использование Лиз–плазминогена в комплексе со стрептокиназой для лечения пациентов с тромбозом глубоких вен [19]. Кроме того, было показано, что у пациентов с диабетом второго типа тромбоциты характеризуются повышенной адгезивностью к эндотелию по сравнению со здоровыми донорами [20]. Лиз–плазминоген препятствует образованию адгезивных контактов между тромбоцитами и может оказаться перспективным агентом для предотвращения тромбозов у таких пациентов.

Тромбоциты являются безъядерными клетками, которые в то же время содержат небольшое количество (по некоторым данным до 4–х) активно функционирующих митохондрий [21,22]. До недавнего времени считалось, что основная функция митохондрий связана с энергетическим обес-

печением метаболизма тромбоцитов. Так, в неактивных тромбоцитах на долю окислительного фосфорилирования в митохондриях приходится количество синтезируемой АТФ от 40 до 75 %, а на долю гликолиза от 25 до 60 % [23, 24]. В то же время продемонстрировано, что при активации и секреции гранул в тромбоцитах активность гликолиза и окислительного фосфорилирования значительно возрастала, что связано с необходимостью продукции внеметаболического АДФ, играющего важную роль в агрегации тромбоцитов [24, 25]. Применение ингибиторов окислительного фосфорилирования приводило к снижению интенсивности секреции гранул и нарушению агрегации тромбоцитов, так как количество образующегося АТФ путем гликолиза было достаточно лишь для поддержания метаболизма тромбоцитов в состоянии покоя [24, 26]. Важную роль в процессах активации тромбоцитов играет мембранный потенциал митохондрий. При активации тромбоцитов вне зависимости от используемого стимула на ранних этапах наблюдалась гиперполяризация митохондрий (возрастание мембранного потенциала), которое при этом сопровождалось повышением уровня активных форм кислорода в клетке [22, 27]. Хорошо известно, что митохондрии являются основным источником активных форм кислорода в клетке, увеличенная продукция которых наблюдается при гиперполяризации данных органелл [28]. В свою очередь, активные формы кислорода приводят к перестройкам цитоскелета и изменению морфологии тромбоцитов, тем самым подтверждая значение активных форм кислорода как внутриклеточного регулятора процесса активации тромбоцитов [29]. Гиперполяризация митохондрий и генерация активных форм кислорода тромбоцитов характерна для ранних этапов (90 мин) активации тромбоцитов. Кроме того, на данном этапе также происходила активация каспаз 3 и 9 [30]. На более поздних этапах (спустя 24 ч) была продемонстрирована повышенная экспрессия CD47 (рецептор тромбоспондина) адгезивных молекул, агрегация тромбоцитов, деполяризация митохондрий и экстернализация фосфатидилсерина (ранний маркер апоптоза) [27]. Деполяризация митохондрий является ключевым этапом активации апоптоза тромбоцитов [31]. Пероксид водорода, тромбин, коллаген, стрессовые факторы оказывают стимулирующее влияние на процесс апоптоза в тромбоцитах [32]. Многие физиологические стимулы оказывают двоякое воздействие на состояние тромбоцитов, приводя при низких концентрациях к активации, а при более высоких концентрациях к апоптозу тромбоцитов. Это связано с гиперполяризацией митохондрий при низких концентрациях и деполяризацией данных органелл при высоких концентрациях стимула [33]. Такие изменения физиологического состояния митохондрий на ранних и поздних этапах активации тромбоцитов имеют важное значение в регуляции процесса коагуляции. Так, например, наномолярные концентрации тромбина образуются на ранней фазе коагуляции, что необходимо для образования тромба, и значительные концентрации его наблюдаются вблизи тромбов на более поздних стадиях коагуляции, что будет препятствовать дальнейшему тромбообразованию вследствие активации апоптоза тромбоцитов [34]. Следует отметить, что применение скевенджеров активных форм кислорода, а также протонатора приводило к устранению ранних и поздних митохондриальных эффектов тромбоцитов и, как следствие, к ингибированию процесса активации и агрегации тромбоцитов [27,35].

Деполяризация митохондрий тромбоцитов, наблюдаемая на поздних этапах коагуляции, тесно взаимосвязана с формированием пор высокой проницаемости митохондрий (mPTP). В образовании mPTP в митохондриях участвуют АДФ/АТФ транслокатор внутренней мембраны митохондрий, циклофилин D матрикса митохондрий и VDAC канал внешней мембраны [36]. Ключевым регулятором mPTP является локализованный в митохондриях циклофилин D, в отсутствие которого наблюдается ингибирование образования пор высокой проницаемости в ответ на действие кальция и окислительного стресса [37]. Продемонстрировано, что образование mPTP в тромбоцитах увеличивает активность фермента калпаина, который приводит к инактивации интегрин α IIb β 3. Данный интегральный белок, как говорилось выше, обеспечивает взаимодействие тромбоцитов и образование тромба. Митохондриально опосредованная инактивация интегрин α IIb β 3 ограничивает таким образом агрегацию тромбоцитов и рост тромба, что имеет важное значение на завершающем этапе тромбообразования [38]. Активация калпаина приводит к отщеплению талина, цитоплазматического домена (интегрин β 3) и протеолизу киндлин-связывающего участка интегрин α IIb β 3. Невозможность действия талина и киндлина (активаторов интегрин α IIb β 3) и отщепление цитоплазматического домена интегрин модифицирует эпитоп интегрин α IIb β 3, который необходим для взаимодействия с фибронектином. В результате этого интегрин α IIb β 3 утрачивает способность взаимодействовать с фибронектином, т. е. происходит инактивация процесса тромбообразования [38]. mPTP регулирует образование прокоагулянтных тромбоцитов, основными условиями возникновения которых *in vitro* являются коллаген, комплекс тромбин-коллаген,

фактор фон Вилленбранда, в особенности в присутствии растворимого агониста АДФ или тромбина. В этих прокоагулянтных тромбоцитах наблюдается выше описанный механизм инактивации интегрин α IIb β 3 [33,39].

В тромбоцитах, нокаутных по циклофилину D, агонист-индуцированное образование пор высокой проницаемости, формирование прокоагулянтных тромбоцитов и модуляция эпитопа α IIb β 3 отсутствуют, что способствует протромбозным явлениям [33]. Кроме того, ингибирование кальпаина, а не каспаз также блокировало округление стимулированных тромбоцитов и модуляцию эпитопа интегрин α IIb β 3 [38]. Активация кальпаина в тромбоцитах происходит в результате mPTR-зависимого повышения pH цитоплазмы и опосредовано циклофилином D. При этом кальций, который приводит к образованию пор высокой проницаемости, является ключевым регулятором протеазной активности кальпаина [38]. Показано, что высокие концентрации кальция в присутствии иономицина приводят к стимуляции формирования пор высокой проницаемости и устраняют ингибиторное действие отсутствия циклофилина D на отщепление талина и интегрин β 3. Потенциальными механизмами защелачивания цитозоля тромбоцитов могут являться выравнивание pH матрикса митохондрий и цитозоля при открытии пор высокой проницаемости или активация натрий/водородного транспортера митохондрий, участие которого в прокоагуляционной активации тромбоцитов было продемонстрировано ранее [40, 41].

Кроме инактивации интегрин α IIb β 3 было показано также, что образование mPTR находится в основе ADAM-17 (мембрано-ассоциированная металлопротеиназа) опосредованного отщепления (shedding) эктодомена гликопротеина GPIIb – процесса, тесно связанного с активацией тромбоцитов при действии таких физиологических стимулов или химических агонистов как тромбин, коллаген, форбол, 12-миристан-13-ацетат и N-этилмалеимид [42]. Гликопротеин тромбоцитов GPIIb является субъединицей интегрированного в мембрану гликопротеина GPIIb-IX-V, взаимодействие его с фактором фон Виллебранда, который находится во внеклеточном матриксе, является ключевым событием, необходимым для первоначального прикрепления тромбоцитов на поврежденной стенке сосудов [43]. Открытие mPTR было обусловлено высокими концентрациями кальция и генерацией активных форм кислорода в митохондриях [44]. В результате открытия mPTR вследствие перегрузки митохондрий кальцием происходит снижение экспрессии на поверхности тромбоцитов количества функционально активных гликопротеинов GPIIb, что приводит к серьезным последствиям для гемостаза и протекания тромбоза [11].

Образование mPTR также приводит к экстернализации фосфатидисерина [45]. Поскольку данный процесс не подавлялся при действии ингибиторов активности кальпаина, то это доказывает наличие двух независимых клеточных путей регуляции процессов инактивации интегрин и экстернализации фосфатидисерина, каждый из которых индуцируется образованием mPTR [38]. Митохондрии при попадании во внеклеточное пространство являются мощным провоспалительным сигналом [46,47]. Это обусловлено тем, что митохондрии вследствие своего прокариотического происхождения продуцируют N-формильные пептиды и содержат в составе своих мембран кардиолипиды, которые являются сильными провоспалительными медиаторами, способствующими миграции нейтрофилов в очаг воспаления [48]. Показано, что стимуляция тромбоцитов приводит к перемещению митохондрий внутри тромбоцитов к плазматической мембране с участием цитоскелетного белка актина и их последующей секреции во внеклеточное пространство в форме отдельных способных к дыханию митохондрий или в составе мембранных микрочастиц. Данные митохондрии поглощаются соседствующими лейкоцитами и становятся субстратом для бактерицидной фосфолипазы A₂ (данная липаза расщепляет только бактериальные липиды, в том числе и митохондриальные, и не расщепляет липиды мембран клеток эукариот), что приводит к образованию провоспалительных липидных медиаторов (арахидоновая кислота, лизофосфолипиды) и мтДНК. Так как митохондрии выделяются при повреждении сосудов, то, вероятно, они также задействованы в гемостазе, обусловленном действием тромбоцитов [21]. Наличие антител к кардиолипину при аутоиммунных заболеваниях (системная волчанка, антифосфолипидный синдром) является подтверждением участия митохондрий, выделяемых во внеклеточное пространство, в воспалительных процессах [48]. Важная роль митохондрий в процессах тромбообразования и коагуляции подтверждается нарушением их функциональной активности при ряде заболеваний. Тромбоциты пациентов с диабетом характеризуются повышенной чувствительностью к коллаген-опосредованной активации, что связано с гиперполяризацией митохондрий, снижением количества потребляемого кислорода и активацией генерации активных форм кислорода митохондриями вследствие гипергликемии [22, 49]. При сепсисе и кардиогенном шоке наблюдались сниженный уровень НАДН, пониженная активность дыхательных комплексов митохондрий в тромбоцитах. При этом были

нарушены активация, секреция и агрегация тромбоцитов, снижен внутриклеточный уровень АДФ и повышено соотношение АДФ/АТФ, что обуславливало гипочувствительность тромбоцитов к экзогенным стимулам агрегации [26]. Кроме того, при ряде заболеваний (диабет 2 типа, иммунная тромбоцитопения, малярия) наблюдался повышенный уровень апоптоза тромбоцитов [22].

Таким образом, адгезивные молекулы, в первую очередь, интегрин α IIb β 3, и поры высокой проницаемости в митохондриях составляют основу механизма агрегации тромбоцитов. Нарушение данных механизмов приводят к патологическому тромбообразованию, которое часто является сопутствующим явлением при многих заболеваниях. В связи с этим, направленное воздействие на данные молекулярные мишени представляет собой перспективное направление терапии нарушенной коагуляции крови и патологического тромбообразования. В частности, применение Лиз-плазминогена приводит к блокированию образования патологических адгезивных контактов тромбоцитов за счет белка интегрин α IIb β 3, тем самым снижая уровень тромбозов. Кроме того, как видно из приведенного анализа литературы, функциональное состояние митохондрий оказывает значительное регулирующее воздействие на активность интегрин α IIb β 3. Подтверждением того, что митохондрии имеют большое значение в функционировании тромбоцитов, является тот факт, что некоторые антикоагуляционные средства характеризуются выраженным митохондриотропным действием [50]. Использование ингибиторов (например, циклоспорин А) или активаторов процесса формирования пор высокой проницаемости митохондрий тромбоцитов (например, окислителей восстановленной формы глутатиона) позволяет регулировать уровень тромбообразования, целенаправленно способствуя его усилению или ослаблению в зависимости от вида патологии [38, 51].

Список литературы

1. Shattil, S.J. The final steps of integrin activation: the end game / S.J. Shattil, C. Kim, M.H. Ginsberg // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2010. – Vol. 11. – P. 288–300.
2. Tadokoro, S. Talin binding to integrin tails: a final common step in integrin activation / S. Tadokoro // *Science*. – 2003. – Vol. 302. – P. 103–106.
3. Bonnefoy, A. Thrombospondin-1 in Von Willebrand Factor Function / A. Bonnefoy, M.F. Hoylaerts // *Current Drug Targets*. – 2008. – Vol. 9. – P. 822–832.
4. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation / A. Rehemian [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 3, № 5. – P. 875–883.
5. Xu, J. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins / J. Xu, D. Mosher ; *The Extracellular Matrix: an Overview: Springer Berlin Heidelberg*. – Berlin, 2011. – P. 41–75.
6. Novel aspects of platelet aggregation / Y.M. Roka-Moya [et al.] // *Biopolym. cell*. – 2014. – Vol. 30, № 1. – P. 10–15.
7. Cho, J. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation / J. Cho, D.F. Mosher // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4. – P. 1461–1469.
8. Concentration of Fibronectin in Plasma of Tumor-bearing Mice and Synthesis by Ehrlich Ascites Tumor Cells / L. Zardi [et al.] // *Cancer Res.* – 1979. – Vol. 39, № 9. P. 3774–3779.
9. Neural cell adhesion molecule regulates the cellular response to fibroblast growth factor / C. Francavilla [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2007. Vol. 120, № 24. – P. 4388–4394.
10. Fibrinogen and von willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo / H. Yang [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4, № 10. – P. 2230–2237.
11. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis / Y. Wang [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2014. – Vol. 124, № 10. – P. 4281–4293.
12. Vitronectin Inhibits Blood Platelet Aggregation / M. Roger [et al.] // *Platelets*. – 1993. – Vol. 4, № 4. – P. 225–229.
13. Syrovets, T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin / T. Syrovets, T. Simmet // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61, № 7(8). – P. 873–885.
14. Юсова, Е.И. Превращение Glu-плазминогена в Lys-плазминоген на поверхности тромбоцитов / Е.И. Юсова, О.В. Савчук, В.Н. Рыбачук // *Современные проблемы биохимии: сб. науч. ст. / НАН РБ, ГП "Институт биохимии биологически активных соединений"; [редкол.: Л.И. Надольник (отв. ред.) и др.]. – Гродно, 2016. – С. 105–111.*
15. Hajjar, K.A. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface / K.A. Hajjar, R.L. Nachman // *J. Clin. Invest.* – 1988. – Vol. 82, № 5. – P. 1769–1778.

16. Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins Mac-1 and $\alpha 5\beta 1$ / V.K. Lishko [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 104, № 3. – P. 719–726.
17. Activated human platelets express beta2 integrin / M.M. Philippeaux [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 1996. – Vol. 56, № 3. – P. 130–137.
18. Roka-Moya, Y.M. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation / Y.M. Roka-Moya, D.D. Zhernossekov, T.V. Grinenko // *Biopolym. Cell.* – 2012. – Vol. 28, № 5. – P. 352–356.
19. Kakkar, V.V. Intermittent plasminogen–streptokinase treatment of deep vein thrombosis / V.V. Kakkar, M.F. Scully // *Haemostasis*. – 1988. – Vol. 18, № 1. – P. 127–138.
20. Platelet dysfunction in type 2 diabetes / A.I. Vinik [et al.] // *Diabetes Care*. – 2001. – Vol. 24, № 8. – P. 1476–1485.
21. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA–secreted phospholipase A2 to promote inflammation / L.H. Boudreau [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 124, № 14. – P. 2173–2183.
22. Zharikov, S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease / S. Zharikov, S. Shiva // *Biochem. Soc. Trans.* – 2013. – Vol. 41, № 1. – P. 118–123.
23. Fuel choices by human platelets in human plasma / M. Guppy [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – Vol. 244, № 1. – P. 161–167.
24. Willem, J. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca^{2+} secretion / J. Willem, N. Akkerman, H. Holmsen // *Blood*. – 1981. – Vol. 57, № 5. – P. 956–966.
25. Verhoeven, A.J. Quantification of energy consumption in platelets during thrombin–induced aggregation and secretion. Tight coupling between platelet responses and the increment in energy consumption / A.J. Verhoeven, M.E. Mommersteeg, J.W. Akkerman // *Biochem. J.* – 1984. – Vol. 221, № 3. – P. 777–787.
26. Platelet mitochondrial dysfunction in critically ill patients: comparison between sepsis and cardiogenic shock / A. Protti [et al.] // *Crit. Care*. – 2015. – Vol. 19, № 1. – P. 39.
27. Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A – activation and long–term commitment to cell death / P. Matarrese et al. // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276, № 3. – P. 845–856.
28. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health / T.R. Figueira [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, № 16. – P. 2029–2074.
29. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen–induced platelet aggregation—role of arachidonic acid metabolism / D. Caccese [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2000. – Vol. 83, № 3. – P. 485–490.
30. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span / K.D. Mason [et al.] // *Cell*. – 2007. – Vol. 128, № 6. – P. 1173–1186.
31. Vanags, D.M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin–induced process that resembles apoptosis / D.M. Vanags, S. Orrenius, M. Aguilar–Santelises // *Br. J. Haematol.* – 1997. – Vol. 99, № 4. – P. 824–831.
32. Comparison of the relative activities of inducing platelet apoptosis stimulated by various platelet–activating agents / K.H. Lin [et al.] // *Platelets*. – 2009. – Vol. 20, № 8. – P. 575–581.
33. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis / S.M. Jobe [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 111, № 3. – P. 1257–1265.
34. A Model for the Stoichiometric Regulation of Blood Coagulation / M.F. Hockin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 21. – P. 18322–18333.
35. Hydrogen peroxide is involved in collagen–induced platelet activation / P. Pignatelli [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 91, № 2. – P. 484–490.
36. The role of mitochondrial permeability transition pore in regulating the shedding of the platelet GPIIb/IIIa ectodomain / Z. Wang [et al.] // *Platelets*. – 2014. – Vol. 25, № 5. – P. 373–381.
37. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology / V. Giorgio [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2010. – Vol. 1797, № 6(7). – P. 1113–1118.
38. Mitochondrially mediated integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$ protein inactivation limits thrombus growth / F. Liu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 42. – P. 30672–30681.
39. Role of Mitochondrial Permeability Transition Pore in Coated–Platelet Formation / G. Remenyi [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – Vol. 25, № 2. – P. 467–471.
40. Involvement of the Na^+/H^+ exchanger in membrane phosphatidylserine exposure during human platelet activation / R. Bucki [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2006. – Vol. 1761, № 2. – P. 195–204.

41. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins / J. Llopis [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, № 12. – P. 6803–6808.
42. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb–IX–V by ADAM family metalloproteinases / E.E. Gardiner [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, № 7. – P. 1530–1537.
43. Du, X. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib–IX–V complex / X. Du // Curr. Opin. Hematol. – 2007. – Vol. 14, № 3. – P. 262–269.
44. ROS–Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin–induced MCF–7 cells apoptosis / X.H. Cao [et al.] // Chem. Biol. Interact. – 2011. – Vol. 190, № 1. – P. 16–27.
45. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist–initiated platelet phosphatidylserine exposure / H.J. Choo [et al.] // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2012. – Vol. 32, № 12. – P. 2946–2955.
46. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure / T. Oka [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 485, № 7397. – P. 251–255.
47. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang [et al.] // Nature. – 2010. – Vol. 464, № 7285. – P. 104–117.
48. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review / D. Garcia [et al.] // Blood. – 2013. – Vol. 122, № 5. – P. 817–824.
49. Hyperglycemia potentiates collagen–induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction / S.I. Yamagishi [et al.] // Diabetes. – 2001. – Vol. 50, № 6. – P. 1491–1494.
50. Inhibiting platelet–stimulated blood coagulation by inhibition of mitochondrial respiration / C.J. Barile [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2012. – Vol. 109, № 7. – P. 2539–2543.
51. Lopez, E.A. Immunophilins and thrombotic disorders / E.A. Lopez, J.C. Rosado, P. Redondo // Curr. Med. Chem. – 2011. – Vol. 18, № 35. – P. 5414–5423.

CHESHCHEVIK V.T.
ZHERNOSSEKOV D.D.

ROLE OF ADHESIVE MOLECULES AND MITOCHONDRIA IN PLATELETS AGGREGATION

***Summary.** The role of mitochondria and adhesive molecules in the platelet aggregation and the thrombus formation is presented. The membrane permeability transition and integrin α IIb β 3 were determined as a key target of treatment in cells at various pathological states associated with the thrombus formation.*

***Keywords:** platelets, mitochondria, adhesive molecules, integrin, coagulation factors, plasminogen, membrane permeability transition pores*

References

1. Shattil S.J., Kim C., Ginsberg M.H. The final steps of integrin activation: the end game. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, Vol. 11, pp. 288–300.
2. Tadokoro S. Talin binding to integrin tails: a final common step in integrin activation. Science, 2003, Vol. 302, pp. 103–106.
3. Bonnefoy A., Hoylaerts M.F. Thrombospondin–1 in Von Willebrand Factor Function. Current Drug Targets, 2008, Vol., pp. 822–832.
4. Reheman A., Gross P., Yang H., Chen P., Allen D., Leytin V., Freedman J., Ni H. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005, Vol. 3, no. 5, pp. 875–883.
5. Xu J., Mosher D. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. The Extracellular Matrix: an Overview. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, 2011, pp. 41–75.
6. Roka–Moya Y.M., Bilous V.L., Zhernossekov D.D., Grinenko T.V. Novel aspects of platelet aggregation. Biopolymers and cell, 2014, Vol. 30, no. 1, pp. 10–15.

7. Cho J., Mosher D.F. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2006, Vol. 4, pp. 1461–1469.
8. Zardi L., Cecconi C., Barbieri O., Carnemolla B., Picca M., Santi L. Concentration of Fibronectin in Plasma of Tumor-bearing Mice and Synthesis by Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Cancer Res*, 1979, Vol. 39, no. 9, pp. 3774–3779.
9. Francavilla C., Loeffler S., Piccini D., Kren A., Christofori G., Cavallaro U. Neural cell adhesion molecule regulates the cellular response to fibroblast growth factor. *Journal of Cell Science*, 2007, vol. 120, no. 24, pp. 4388–4394.
10. Yang H., Reheman A., Chen P., Zhu G., Hynes R.O., Freedman J., Wagner D.D., Ni H. Fibrinogen and von willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2006, Vol. 4, no. 10, pp. 2230–2237.
11. Wang Y., Reheman A., Spring C.M., Kalantari J., Marshall A.H., Wolberg A.S., Gross P.L., Weitz J.I., Rand M.L., Mosher D.F., Freedman J., Ni H. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *Journal of Clinical Investigation*, 2014, Vol.124, no. 10, pp. 4281–4293.
12. Roger M., Hogasen K., Solum N.O., Mollnes T.E., Hovig T. Vitronectin Inhibits Blood Platelet Aggregation. *Platelets*, 1993, Vol. 4, no. 4, pp. 225–229.
13. Syrovets T., Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, Vol. 61, no. 7(8), pp. 873–885.
14. Iusova E.I., Savchuk O.V., Rybachuk V.N. *Prevrashchenie Glu-plazminogena v Lys-plazminogena na poverkhnosti trombocytov*. [Conversion of Glu-plasminogen into Lys-plasminogen on the surface of thrombocytes]. *Sovremennye problemy biokhimii* [Modern problems of biochemistry]. Eds. L.I. Nadol'nik et al. Grodno, 2016, pp.105–111.
15. Hajjar K.A., Nachman R.L. Endothelial cell-mediated conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen. Further evidence for assembly of the fibrinolytic system on the endothelial cell surface. *Journal of Clinical Investigation*, 1988, Vol. 82, no. 5, pp. 1769–1778.
16. Lishko V.K., Novokhatny V.V., Yakubenko V.P., Skomorovska-Prokvolit H.V. Ugarova T.P. Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins Mac-1 and $\alpha 5\beta 1$. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 3, pp. 719–726.
17. Philippeaux M.M, Vesin C., Tacchini-Cottier F., Piguet P.F. Activated human platelets express beta2 integrin. *European Journal of Haematology*, 1996, Vol. 56, no. 3, pp. 130–137.
18. Roka-Moya Y.M., Zhernossekov D.D., Grinenko T.V. Plasminogen/plasmin influence on platelet aggregation. *Biopolymers and Cell*, 2012, Vol. 28, no. 5, pp. 352–356.
19. Kakkar V.V., Scully M.F. Intermittent plasminogen-streptokinase treatment of deep vein thrombosis. *Haemostasis*, 1988, Vol. 18, no. 1, pp. 127–138.
20. Vinik A.I, Erbas T., Park T.S, Nolan R., Pittenger G.L. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2001, Vol. 24, no. 8, pp. 1476–1485.
21. Boudreau L.H., Duchez A.C., Cloutier N., Soulet D., Martin N., Bollinger J., Paré A., Rousseau M., Naika G.S., Lévesque T., Laflamme C., Marcoux G., Lambeau G., Farndale R.W., Pouliot M., Hamzeh-Cognasse H., Cognasse F., Garraud O., Nigrovic P.A. Guderley H., Lacroix S., Thibault L., Semple J.W., Gelb M.H., Boilard E. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 14, pp. 2173–2183.
22. Zharikov S., Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society Transactions*, 2013, Vol. 41, no. 1, pp. 118–123.
23. Guppy M., Abas L., Neylon C., Whisson M.E., Whitham S., Pethick D.W., Niu X. Fuel choices by human platelets in human plasma. *European Journal of Biochemistry*, 1997, Vol. 244, no. 1, pp. 161–167.
24. Willem J., Akkerman N., Holmsen H. Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca²⁺ secretion. *Blood*, 1981, Vol. 57, no. 5, pp. 956–966.
25. Verhoeven A.J., Mommersteeg M.E., Akkerman J.W. Quantification of energy consumption in platelets during thrombin-induced aggregation and secretion. Tight coupling between platelet responses and the increment in energy consumption. *Biochemical Journal*, 1984, Vol. 221, no. 3, pp.777–787.
26. Protti A., Fortunato F., Artoni A., Lecchi A., Motta G., Mistraretti G, Novembrino C., Comi G.P., Gattinoni L. Platelet mitochondrial dysfunction in critically ill patients: comparison between sepsis and cardiogenic shock. *Critical Care*, 2015, Vol. 19, no. 1, pp. 39.
27. Matarrese P., Straface E., Palumbo G., Anselmi M., Gambardella L., Ascione B., Del Principe D., Malorni W. Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A – activation and long-term commitment to cell death. *FEBS Journal*, 2009, Vol. 276, no. 3, pp. 845–856.

28. Figueira T.R., Barros M.H., Camargo A.A., Castilho R.F., Ferreira J.C., Kowaltowski A.J., Sluse F.E., Souza-Pinto N.C., Vercesi A.E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, Vol. 18, no. 16, pp. 2029–2074.
29. Caccese D., Praticò D., Ghiselli A., Natoli S., Pignatelli P., Sanguigni V., Iuliano L., Violi F. Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation—role of arachidonic acid metabolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2000, Vol. 83, no. 3, pp. 485–490.
30. Mason K.D., Carpinelli M.R., Fletcher J.I., Collinge J.E., Hilton A.A., Ellis S., Kelly P.N., Ekert P.G., Metcalf D., Roberts A.W., Huang D.C., Kile B.T. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, 2007, Vol. 128, no. 6, pp. 1173–1186.
31. Vanags D.M., Orrenius S., Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *British Journal of Haematology*, 1997, Vol. 99, no. 4, pp. 824–831.
32. Lin K.H., Chang H.C., Lu W.J., Jayakumar T., Chou H.C., Fong T.H., Hsiao G., Sheu J.R. Comparison of the relative activities of inducing platelet apoptosis stimulated by various platelet-activating agents. *Platelets*, 2009, Vol. 20, no. 8, pp. 575–581.
33. Jobe S.M., Wilson K.M., Leo L., Raimondi A., Molkenkin J.D., Lentz S.R., Di Paola J. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis. *Blood*, 2007, Vol. 111, no. 3, pp. 1257–1265.
34. Hockin M.F., Jones K.C., Everse S.J., Mann K.G. A Model for the Stoichiometric Regulation of Blood Coagulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, Vol. 277, no. 21, pp. 18322–18333.
35. Pignatelli P., Pulcinelli F.M., Lenti L., Gazzaniga P.P., Violi F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood*, 1998, Vol. 91, no. 2, pp. 484–490.
36. Wang Z., Cai F., Hu L., Lu Y. The role of mitochondrial permeability transition pore in regulating the shedding of the platelet GPIIb/IIIa ectodomain. *Platelets*, 2014, vol. 25, no. 5, pp. 373–381.
37. Giorgio V., Soriano M.E., Basso E., Bisetto E., Lippe G., Forte M.A., Bernardi P. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, Vol. 1797, no. 6(7), pp. 1113–1118.
38. Liu F., Gamez G., Myers D.R., Clemmons W., Lam W.A., Jobe S.M. Mitochondrially mediated integrin α IIb β 3 protein inactivation limits thrombus growth/ *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, Vol. 288, no. 42, pp. 30672–30681.
39. Remenyi G., Szasz R., Friese P., Dale Ge.L. Role of Mitochondrial Permeability Transition Pore in Coated-Platelet Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, Vol. 25, no. 2, pp. 467–471.
40. Bucki R., Pastore J.J., Giraud F., Janmey P.A., Sulpice J.C. Involvement of the Na⁺/H⁺ exchanger in membrane phosphatidylserine exposure during human platelet activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, Vol. 1761, no. 2, pp. 195–204.
41. Llopis J., McCaffery J.M., Miyawaki A., Farquhar M.G., Tsien R.Y. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, Vol. 95, no. 12, pp. 6803–6808.
42. Gardiner E.E., Karunakaran D., Shen Y., Arthur J.F., Andrews R.K., Berndt M.C. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007, Vol. 5, no. 7, pp. 1530–1537.
43. Du X. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Current Opinion in Hematology*, 2007, Vol. 14, no. 3, pp. 262–269.
44. Cao X.H., Zhao S.S., Liu D.Y., Wang Z., Niu L.L., Hou L.H., Wang C.L. ROS-Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 2011, Vol. 190, no. 1, pp. 16–27.
45. Choo H.J., Saafir T.B., Mkumba L., Wagner M.B., Jobe S.M. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012, Vol. 32, no. 12, pp. 2946–2955.
46. Oka T., Hikoso S., Yamaguchi O., Taneike M., Takeda T., Tamai T., Oyabu J., Murakawa T., Nakayama H., Nishida K., Akira S., Yamamoto A., Komuro I., Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*, 2012, Vol. 485, no. 7397, pp. 251–255.
47. Zhang Q., Raouf M., Chen Y., Sumi Y., Sursal T., Junger W., Brohi K., Itagaki K., Hauser C.J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010, Vol. 464, no. 7285, pp. 104–117.

48. Garcia D., Akl E.A., Carr R., Kearon C. Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review. *Blood*, 2013, Vol. 122, no.5. pp. 817–824.
49. Yamagishi S.I., Edelstein D., Du X.L., Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*, 2001, Vol. 50, no. 6, pp. 1491–1494.
50. Barile C.J., Herrmann P.C., Tyvoll D.A., Collman J.P., Decreau R.A., Bull B.S. Inhibiting platelet-stimulated blood coagulation by inhibition of mitochondrial respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, Vol. 109, no. 7, pp. 2539–2543.
51. Lopez E.A., Rosado J.C., Redondo P. Immunophilins and thrombotic disorders. *Current Medicinal Chemistry*, 2011, vol. 18, no. 35, pp. 5414–5423.

Received 10 october 2017