

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
ФАРМАКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

**О Б Ы Д Е Н Н Ы Й
Сергей Иванович**

**ДИНАМИКА И МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ
ПРОКОАГУЛЯНТНОЙ СУБПОПУЛЯЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

Специальность 03.01.02 – биофизика

**Д и с с е р т а ц и я
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
М.А. Пантелеев**

Москва – 2019

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ТРОМБОЦИТЫ – Обзор литературы.....	11
1.1. Роль тромбоцитов в свёртывании крови	11
1.2 Морфология тромбоцитов.....	14
1.3 Активация тромбоцита: рецепторы.....	17
1.4 Внутриклеточная сигнализация и цитоплазматическая концентрация ионов кальция	20
1.5 Субпопуляции тромбоцитов	24
1.6 Гипотезы формирования субпопуляций тромбоцитов.	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	31
2.1 Материалы	31
2.2 Буферные растворы.....	33
2.3 Флуоресцентные зонды, регистрация и обработка сигнала	35
2.4 Приготовление клеток	37
2.5 Подготовка к электронной микроскопии	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	40
3.1 Динамика внутриклеточного кальция и выход фосфатидилсерина в тромбоцитах.....	40
3.2 Митохондрии в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов	52
3.3 Цитоплазматический кальций в неактивированном тромбоците влияет на выбор субпопуляции.....	64
3.4 Локализация альфа-гранулярных белков и трансглутаминаз на поверхности прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов	72
3.5 Ультраструктура прокоагулянтных тромбоцитов	78
Обсуждение.....	86

Выводы	89
Список сокращений и условных обозначений	90
Список литературы	91
Приложение А – Сигнальные пути I	102
Приложение Б – Сигнальные пути II	103
Приложение В – Кальций-зависимые белки	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Система гемостаза человека, состоящая из плазменного и тромбоцитарно-сосудистого звена, играет ключевую роль в поддержании целостности сосудистой системы, репарации тканей, ангиогенезе и иммунитете. Нарушения в её работе могут привести к кровотечениям или тромбозам; в совокупности, они являются ведущей причиной смертности и инвалидности в современном мире. Тромбоциты – безъядерные клетки крови, циркулирующие в крови в неактивном состоянии, в ответ на действие физиологических активаторов, таких как тромбин и коллаген, переходят в активное состояние и разделяются на две субпопуляции[1], отличающиеся по составу белков на поверхности, морфологии и свойствам: одна из субпопуляций значительно ускоряет свертывание крови – обладает прокоагулянтной активностью. То есть можно говорить о трех состояниях: неактивированные и два активных состояния/субпопуляции, означающие «выбор» клетками специализации. Различают следующие субпопуляции:

1) активированные, но не-прокоагулянтные тромбоциты – не обладают свойством ускорять процессы свёртывания, но содержат активированные интегрины (трансмембранные белки взаимодействия клетки с межклеточным матриксом), за счёт которых они способны к агрегации;

2) прокоагулянтные тромбоциты – обладают свойством ускорять процессы свертывания крови до пяти порядков [2] посредством отрицательно заряженных фосфолипидов, выступающих в роли площадок на поверхности клеток «собирающих» комплексы из факторов свертывания: внутреннюю теназу и протромбиназу. Такие клетки не агрегируют сами по себе, но имеют на своей поверхности белки из альфа-гранул и их цитоскелет деградирован.

В клинических исследованиях показано, что количество прокоагулянтных тромбоцитов коррелирует с некоторыми патологиями [3-11]. Это значит, что они

могут играть роль причин или следствий в патологических процессах и в связи с этим имеют перспективы использоваться как факторы лечения или диагностики [12]. Именно с этим связан практический интерес к феномену субпопуляций тромбоцитов. Понимание механизмов образования субпопуляций тромбоцитов позволит в конечном счете либо найти новые способы лечения заболеваний, связанных с опасными для жизни кровотечениями или тромбозами или усовершенствовать способы диагностики.

Субпопуляции тромбоцитов не являются predetermined, а зависят от степени активации: разное число тромбоцитов может стать прокоагулянтными [13, 14]. Имеются противоречивые гипотезы, что на распределение тромбоцитов по субпопуляциям при активации влияют динамика цитоплазматического кальция (стабильно высокий уровень кальция после стимуляции) в активированных тромбоцитах и состояние митохондрий (формирование митохондриальной поры), но взаимосвязь этих процессов в клетке при формировании субпопуляций практически не изучена. Для разрешения этих противоречий требуется одновременно изучить динамику цитоплазматического кальция и состояние митохондрий отдельных тромбоцитов в процессе активации и формирования прокоагулянтной субпопуляции.

Цель и задачи исследования

Целью исследования было выявление механизмов формирования прокоагулянтной субпопуляции активированных тромбоцитов и анализ распределения альфа-гранулярных белков по их поверхности.

В данной работе поставлен ряд научных задач:

1. Разработать методику для одновременного измерения концентрации цитоплазматического кальция, кальция в митохондриях, потенциала

митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина в субпопуляциях тромбоцитов.

2. Исследовать динамику и связь этих показателей при активации тромбоцитов тромбином и пептидом, стимулирующим тромбиновый рецептор PAR1.

3. Выявить свойства индивидуальных тромбоцитов, предрасполагающие к переходу в прокоагулянтное состояние.

4. Охарактеризовать распределение альфа-гранулярных белков на поверхности прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

Научная новизна

Впервые были получены одновременные динамики концентрации цитоплазматического кальция, потенциала митохондриальной мембраны и выхода фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны для индивидуальных тромбоцитов при активации. Все три процесса были тесно связаны друг с другом по времени и занимали десятки секунд. Был установлен предрасполагающий к переходу в прокоагулянтное состояние фактор – уровень цитоплазматического кальция в тромбоците до активации: тромбоциты с более высоким кальцием чаще становятся прокоагулянтными в ответ на активацию. Обнаружено, что альфа-гранулярные белки распределены не по всей поверхности тромбоцита, как считалось ранее, а сосредоточены в небольшой выпуклой структуре, названной "шапкой", в которой присутствуют фибриноген, тканевая трансглутаминаза, фактор XIIIa, тромбоспондин. Показано, что именно эта структура отвечает за адгезионные свойства прокоагулянтных тромбоцитов.

Научно-практическое значение

Пациенты с синдромом Скотта, редким генетическим заболеванием, не имеющие прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, подвержены длительным кровотечениям при повреждении сосудов [15]. Доля прокоагулянтной субпопуляции имеет корреляцию с риском различных сердечно-сосудистых заболеваний [3-11]. Все эти данные свидетельствуют о значимости прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов в тромбообразовании и свёртывании крови. Понимание процессов, ведущих к образованию прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, в перспективе позволит найти точки фармакологического воздействия для увеличения или уменьшения доли этой субпопуляции тромбоцитов, с целью снижения рисков возникновения патологических ситуаций в работе сердечно-сосудистой системы.

Методология и методы исследования

Для наблюдения за динамиками внутриклеточных процессов использовался конфокальный микроскоп Zeiss Cell Observer Z1 с диском Нипкова и флуоресцентные зонды на внутриклеточный кальций (Fura Red, Fluo-3), митохондриальный потенциал и кальций (TMRM, Rhod-2) и индикатор выхода фосфатидилсерина (аннексин V).

Для исследования локализации альфа-гранулярных белков на поверхности тромбоцитов использовались меченные флуоресцентными белками антитела к конкретным белкам: фибрин(оген)у, фактору XIIIa, тромбоспондину, тканевой трансглутаминазе и т. д. с последующей визуализацией при помощи конфокальной микроскопии.

Для анализа полученных данных применялось программное обеспечение ImageJ и AxioVision (Zeiss).

Морфология «шапки» прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов исследовалась методами электронной просвечивающей микроскопии.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика по одновременному измерению внутриклеточного кальция, потенциала митохондриальной мембраны, митохондриального кальция и выхода фосфатидилсерина в активированных тромбоцитах.

2. Выявлена последовательность внутриклеточных процессов, ведущих тромбоцит к смерти: активация тромбоцита запускает в нем кальциевые осцилляции, способствующие накоплению кальция в митохондриях, затем происходит коллапс митохондрий, повышается уровень внутриклеточного кальция, и следом происходит экспонирование фосфатидилсерина. Стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция не является первичной причиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

3. Тромбоциты с меньшим числом митохондрий и большей концентрацией цитоплазматического кальция в покое имеют большую вероятность стать прокоагулянтными в ответ на активацию в рамках настоящей экспериментальной модели.

4. Показано существование мембранной субклеточной структуры прокоагулянтных тромбоцитов, названной «шапкой» и представляющей из себя небольшую выпуклую область, содержащую остатки органелл и богатую прокоагулянтными белками, через которую опосредована агрегация прокоагулянтных клеток с другими тромбоцитами.

Личный вклад автора

Все представленные в работе результаты и их анализ получены лично автором диссертации. Автор принимал непосредственное участие в написании статей, их публикации и представлении работ на российских и международных конференциях.

Достоверность и обоснованность результатов

В работе использовалось высокоточное современное оборудование и методы. Для проверки достоверности и обоснованности микроскопических экспериментов производились контроли, подтверждающие наблюдаемый эффект. Для сравнения числовых данных использовались методы статистической обработки: критерий Стьюдента, непараметрический критерий Манна-Уитни.

Апробация работы

Результаты диссертации были представлены на следующих конференциях:

- 1) IV Съезд биофизиков России. 20-26 августа 2012 г. Нижний Новгород, Россия;
- 2) 1st EUPLAN Platelet Conference, Maastricht, September 2012. - Maastricht;
- 3) VI Всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» 2013 Москва, Россия;
- 4) The XXIV congress of the ISTH 2013, Amsterdam, Netherlands;
- 5) 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013;
- 6) 47th Nordic Coagulation Meeting, Visby, Sweden 10-12 September 2014;
- 7) The XXV congress of the ISTH 2015, Toronto, Canada;
- 8) V Съезд биофизиков России 2015, Ростов-на-Дону;
- 9) The ISTH's Scientific and Standardization Committee 2016, Montpellier, France;
- 10) III Конгресса гематологов России. Гематология и трансфузиология. 2016;
- 11) V съезд физиологов СНГ. V съезд биохимиков России, 2016, Сочи, Россия 4–8 октября;
- 12) Реабилитация и профилактика–2016, Москва, Россия;
- 13) The XXVI congress of the ISTH 2017, Berlin, Germany;
- 14) VI съезд физиологов СНГ, 2017, Воронеж, Россия.

По результатам работы опубликовано 29 публикаций. Статей в рецензируемых журналах – 10; тезисов конференций – 19.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из 105 страниц, содержит разделы: введение, обзор литературы, методы и материалы, результаты, обсуждение, заключение, выводы,

список сокращений, список цитированных источников (93 библиографические ссылки). Количество рисунков 41.

ГЛАВА 1. ТРОМБОЦИТЫ – Обзор литературы

1.1. Роль тромбоцитов в свёртывании крови

Гемостаз – система, предназначенная поддерживать кровь в организме в жидком состоянии и ликвидировать повреждения стенок сосудов - подразделяется на 2 звена: первичный гемостаз и вторичный, так же называемые тромбоцитарно-сосудистый и плазменный, соответственно [16]. Тромбоцитарно-сосудистое звено отвечает за вазоконстрикцию (сужение сосудов) и формирование тромбоцитарного агрегата, плазменное - за полимеризацию фибриногена (фибрин – полимеризованный фибриноген). В зависимости от скорости потока и от размера сосуда, эти звенья дают разный вклад в тромбообразование. В сосудах с малыми скоростями тока крови, основную роль играет плазменная система свёртывания [17], а тромбоцитарные тромбы наоборот - лучше формируются при быстрых потоках [18]. В нормальных условиях активация свёртывания и тромбообразования должна происходить только в месте повреждения сосуда. Плазменное звено представляет собой каскад активирующих друг друга сериновых протеиназ, насчитывающий десятки биохимических реакций, результатом которых является полимеризация фибриногена, то есть образование фибринового сгустка, непроницаемого для жидкости. Участников каскада называют факторами свёртывания и им даны определённые номера, факторы могут находиться в активном и неактивном состоянии. Работу плазменного звена запускает трансмембранный гликопротеин, так называемый, тканевый фактор [19], который находится на всех клетках организма, за исключением клеток крови и эндотелия сосудов, за счёт чего исключается запуск свёртывания крови в неповреждённом сосуде. Если же произошел контакт крови и тканевого фактора, то активный фактор VIIa связывается со своим кофактором - тканевым фактором, образуя комплекс внешней теназы (в плазме всегда 1-2% фактора VII находится в активном состоянии, но этого недостаточно для запуска механизма

тромбообразования и сам он не способен производить активацию IX или X факторов). Другим кофактором фактора VIIa является отрицательно-заряженная поверхность из фосфолипидов [20], которую может предоставлять одна из субпопуляций сильно активированных тромбоцитов, называемая прокоагулянтной. Комплекс внешней теназы активирует факторы IX и X. Далее фактор Xa медленно активирует протромбин II до тромбина IIa, который в свою очередь запускает целый ряд положительных обратных связей, активируя факторы V, VII, VIII, XI, тромбоциты, а так же ингибирующий путь через протеин C. На отрицательно-заряженных фосфолипидных поверхностях формируются комплексы протромбиназы, состоящие из кофактора Va и фактора Xa и активирующие протромбин на 3-5 порядков быстрее, чем это происходит при активации одиночным фактором Xa [2]. Помимо прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов, отрицательно-заряженные фосфолипидные поверхности есть у микровезикул и липопротеинов плазмы [21-23]. Схожим образом на отрицательно-заряженных фосфолипидных поверхностях формируются и комплексы внутренней теназы из факторов IXa и VIIIa, ускоряющие активацию фактора X [24]. В результате работы теназ образуется достаточное количество тромбина для расщепления фибриногена и последующего формирования сгустка - трёхмерной сети из олигомеров фибрина, способной удерживать попавшие в неё клетки и жидкость. Для предотвращения свёртывания крови во всем объёме, каскад регулируется целым рядом ингибиторов, которые для краткости не рассматриваются. Схема взаимодействия факторов представлена на рисунке 1.1. Для изучения сложных биологических систем, подобных плазменному звену свертывания и росту тромба в потоке, активно используются методы математического моделирования [25].

1.2 Морфология тромбоцитов

Тромбоциты – самые маленькие клетки, циркулирующие в крови и не имеющие ядра. Они обладают дисковидной формой с диаметром 2-4 микрометра (мкм) и толщиной около 1 мкм. Тромбоциты образуются путём отшнуровывания от мегакариоцитов, созревающих в красном костном мозге, за что их часто классифицируют не клетками, а клеточными фрагментами. Каждый тромбоцит обладает комплектом специализированных органелл, называемых альфа-гранулами, плотными гранулами и лизосомами (α -гранулы, σ -гранулы и λ -гранулы соответственно), содержащих модуляторы и активные вещества, секретируемые во внеклеточное пространство при активации и помогающие плазменному звену свёртывания и стимуляции соседних тромбоцитов. Иллюстрация органелл тромбоцита приведена на рисунке 1.2. При секреции гранул часть содержимого растворяется во внеклеточной среде, а часть встраивается в плазматическую мембрану тромбоцита. Средний размер плотных гранул составляет 150 нм, они формируются в зреющих мегакариоцитах и постепенно наполняются нуклеотидами и серотонином [27]. Их содержимое – низкомолекулярные небелковые соединения: АТФ, АДФ, ГТФ, ГДФ, серотонин, гистамин, ионы кальция и магния, а так же некоторые мембранные молекулы, такие как П-селектин и другие. Альфа-гранулы и лизосомы тоже созревают в период взросления мегакариоцита. Средний размер альфа-гранул составляет 200-400 нм и 175-250 нм для лизосом. В альфа-гранулах содержатся крупные белки, играющие важную роль в плазменном звене свёртывания (фибриноген, факторы V, VII, XI, XIII), в воспалительных процессах, в восстановлении тканей и взаимодействиях между клетками и матриксом [28]. Секрецию плотных и альфа-гранул можно отследить по появлению П-селектина на поверхности активированных тромбоцитов [29, 30]. В тромбоцитах имеется две трансглутаминазы: тканевая и фактор XIII. Это класс ферментов, формирующих устойчивые к протеолизу ковалентные связи между глутамином и лизином в белковых молекулах. Лизосомы содержат гликозидазы, протеазы и белки с

бактерицидным действием. Секрция содержимого гранул является одним из ответов тромбоцита на активацию.

Остальное содержимое тромбоцита - это несколько митохондрий, компоненты цитоскелета (микротрубочки и актиновые филаменты), распределённые и ассоциированные с гранулами, большое количество гликогена в качестве энергетического запаса клетки и сложная мембранная система. Последняя состоит из двух структур: открытой канальцевой системы (ОКС), которая является посредником между цитозолем и внешней средой, и плотной трубчатой системы, содержащей важные метаболические ферменты. Митохондрии и плотная трубчатая системы (ПТС) вовлечены в метаболические процессы. Наличие разности потенциалов на мембране митохондрий является показателем их работоспособности. В стрессовой ситуации в митохондриальной мембране может формироваться проницаемая пора, через которую могут выходить вещества, индуцирующие клеточную смерть [31]. Образование митохондриальной поры регулируется кальций-чувствительным белком циклофилином D [32]. ПТС представляет собой эндомембранную систему, в которой хранится кальций и ряд важных для регуляции активации тромбоцита ферментов. Эта органелла сформирована из шероховатого эндоплазматического ретикулума мегакариоцита, представляет собой продолговатую нерегулярную структуру с утолщённым центром. В отличие от гранул, находится на периферии клетки в окрестностях микротрубочек. ПТС на электронных микрофотографиях имеет специфическое окрашивание, сходное с цитоплазмой, в то время как каналы ОКС выглядят пустыми. ПТС в отличие от ОКС не имеет коммуникации с плазмой или мембранами гранул. В ПТС содержится аденилатциклаза и около 30% всего запаса ионов кальция – два важных регулятора активации тромбоцита.

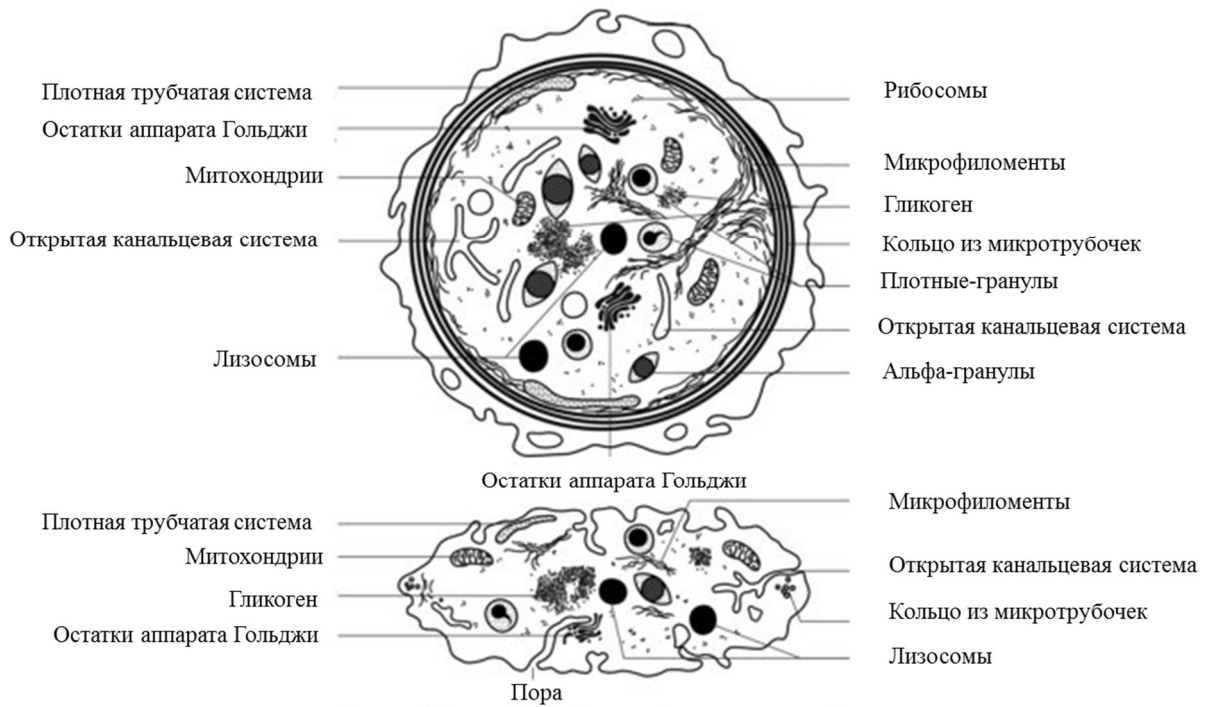


Рисунок 1.2. Схематичная иллюстрация органелл тромбоцита. Плотные гранулы самые маленькие, с непрозрачным плотным ядром, окружённым чистым пространством. Альфа-гранулы самые крупные, имеют нерегулярное тёмное ядро и серый матрикс. Лизосомы средние по размеру, содержимое заполняет весь объем органеллы. Адаптировано из [33].

1.3 Активация тромбоцита: рецепторы

Передача сигнала начинается со стимулирования клетки внешними факторами, которые называются первичными мессенджерами (или эффекторами). Клеткам приходит сигнал посредством первичного посредника - какого-нибудь гормона, цитокина, фактора роста или другого агониста, способного активировать рецептор, находящийся на поверхности конкретной клетки. Активация рецептора запускает в клетке каскад биохимических реакций, способный многократно усилить пришедший извне сигнал, и результатом которого является функциональный ответ всей клетки.

Тромбоцит обладает набором различных рецепторов, среди них есть интегрины ($\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$), рецепторы, ассоциированные с G-белками (PAR-1, PAR-4, P2Y₁ и P2Y₁₂ АДФ рецепторы, TR α и TR β ТхА₂ рецепторы), белки из семейства иммуноглобулинов (GPVI) и другие [34]. На рисунке 1.3 представлены рецепторы, которые вызывают активацию тромбоцитов.

Сильными активаторами тромбоцита являются тромбин и коллаген – белок межклеточного матрикса. Считают, что остальные эффекторы сильной активации не вызывают.

Передача сигнала внутри клеток осуществляется с участием небольших молекул, называемых вторичными посредниками или мессенджерами. Основными вторичными посредниками являются цАМФ, цГМФ, диацилглицерол DAG, инозитол 1,4,5-трисфосфат IP₃, а так же ионы кальция. Каскад биохимических реакций, протекающий в клетке при активации представлен для тромбоцитов на схемах в приложении 1 и 2.

В ответ на стимуляцию агонистами тромбоциты активируются в разной степени, в зависимости от типа и концентрации активаторов [35]. В первую очередь тромбоциты приобретают способность агрегировать друг с другом через интегрины на своей поверхности, и это происходит даже при самых малых концентрациях агониста [36, 37].

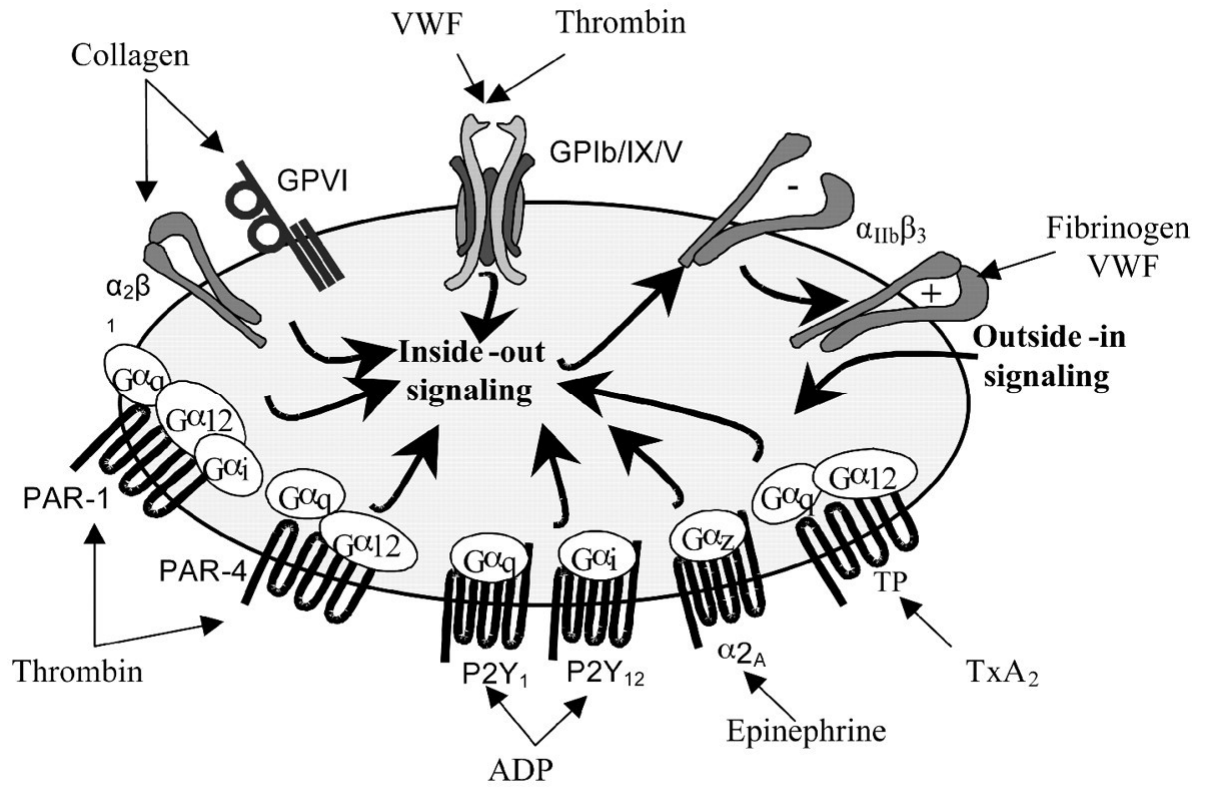


Рисунок 1.3. Рецепторы тромбоцита [34].

При более сильной активации тромбоциты претерпевают морфологические изменения – формируются псевдоподии, происходит реструктуризация цитоскелета, а так же запускается секреция содержимого внутриклеточных гранул, содержащих белки свёртывания [38]. От активированных тромбоцитов отшнуровываются микровезикулы [39, 40]. Перестройка цитоскелета и реализация гранул происходит в результате повышения концентрации цитоплазматического кальция [41]. Стимуляция высокими концентрациями тромбина и коллагена ведут к экспозиции/выходу фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны у некоторых тромбоцитов [42]. Так формируется прокоагулянтная субпопуляция тромбоцитов.

Существуют различные противоречащие друг другу гипотезы о механизме формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов [43, 44], во всех ключевым звеном является ион кальция, являющийся вторичным мессенджером во внутриклеточной сигнализации [45]. Прокоагулянтные тромбоциты имеют стабильно высокий кальций, в то время как в непрокоагулянтных тромбоцитах происходят кальциевые осцилляции [46].

1.4 Внутриклеточная сигнализация и цитоплазматическая концентрация ионов кальция

Первые сведения о роли ионов кальция в жизнедеятельности клетки были получены в 40-х годах XX века, в экспериментах с введением кальция в мышцу, приводившего к её сокращению, в то время как введение других ионов (натрий, калий, магний) такого эффекта не вызывало [47]. С тех пор некоторые исследователи поставили себе цель измерить концентрацию кальция внутри клеток, и первые удачные измерения произошли в конце 60-х годов с использованием инъекции в мышечные клетки кальций-чувствительного флуоропротеина экворина [48]. В 80-е годы Тьен с коллегами синтезировали целый ряд веществ, флуоресцентно-чувствительных к связыванию с кальцием [49-51]. Эти флуоресцентные молекулы оказались хорошим инструментом для измерения концентрации и динамики кальция. Благодаря указанным исследованиям удалось установить, что в клетках имеют место кальциевые осцилляции в ответ на стимуляцию первичными мессенджерами; а в крупных клетках, таких как ооциты, могут наблюдаться кальциевые волны.

Первые исследования по измерению концентрации кальция в тромбоцитах в ответ на активацию начали проводиться в конце 80-х, начале 90-х годов. Стимуляция тромбоцитов с помощью тромбина, коллагена, АДФ или тромбоксана А₂ приводила к изменению концентрации цитоплазматического кальция. Причиной является активация фосфолипазы С, которая генерирует инозитол-3-фосфат [52], который в свою очередь активирует депо-управляемые кальциевые каналы в плазматической мембране [53] и опустошение кальциевых депо. При активации АДФ, тромбином в тромбоцитах наблюдали колебания концентрации цитоплазматического кальция (рисунок 1.4).

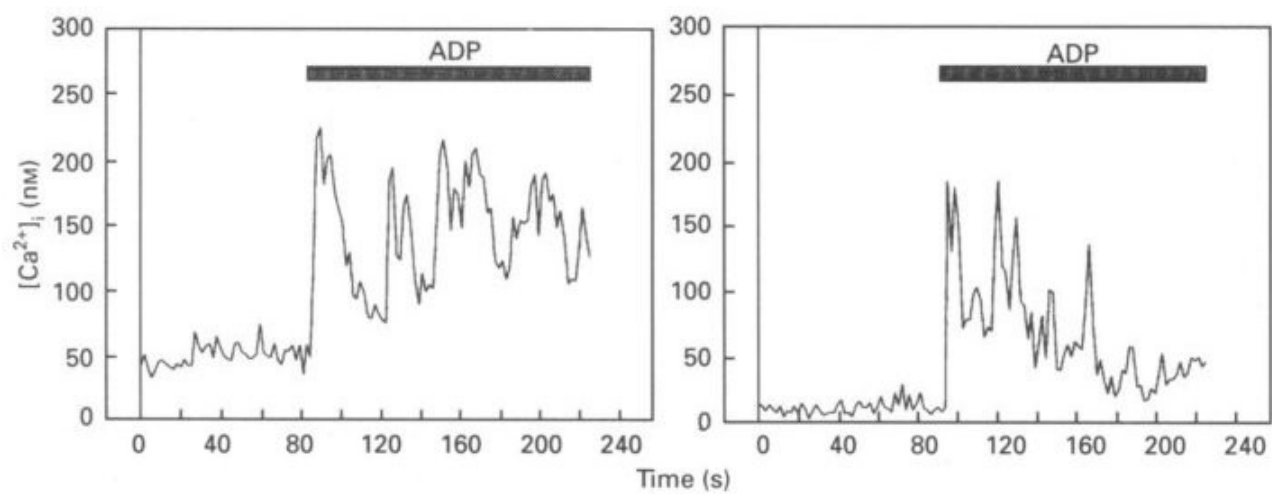


Рисунок 1.4. Динамика осцилляций в активированных АДФ тромбоцитах [54].

Осцилляции модулируются за счёт системы кальциевых каналов и обменников между отделами клетки (цитоплазмой, эндоплазматическим ретикулумом, митохондриями) и внешней средой (рисунок 1.5), работающими с разными скоростями при различных концентрациях ионов кальция или молекул-регуляторов [55].

Мобилизация кальция состоит из его высвобождения в цитоплазму, где он активирует ряд кальций-зависимых ферментов - фосфолипазу А₂, протеазы, включая кальпаин. Выброс кальция контролируется АТФазными насосами: SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) и PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPases). Кальциевые АТФазы контролируются уровнем циклического АМФ, накапливаемого аденилатциклазой, то есть активированное состояние тромбоцита зависит от равновесия между концентрацией цитоплазматического кальция и цАМФ: цАМФ удерживает кальций в хранилище, но любое уменьшение концентрации цАМФ приведёт к высвобождению кальция из ПТС и поддержит процесс активации тромбоцита. Такая регуляция может возникать даже в случае отсутствия рецептор-индуцированной активации [56].

Биофизический смысл кальциевых колебаний заключается в том, что при определённой частоте, амплитуде и длительности колебаний активируются разные кальций-зависимые ферменты (Приложение 3), то есть кальциевые осцилляции кодируют информацию, каким процессам в клетке следует запускаться [57]. Как правило, это ферменты, имеющие множество центров связывания с ионами кальция.

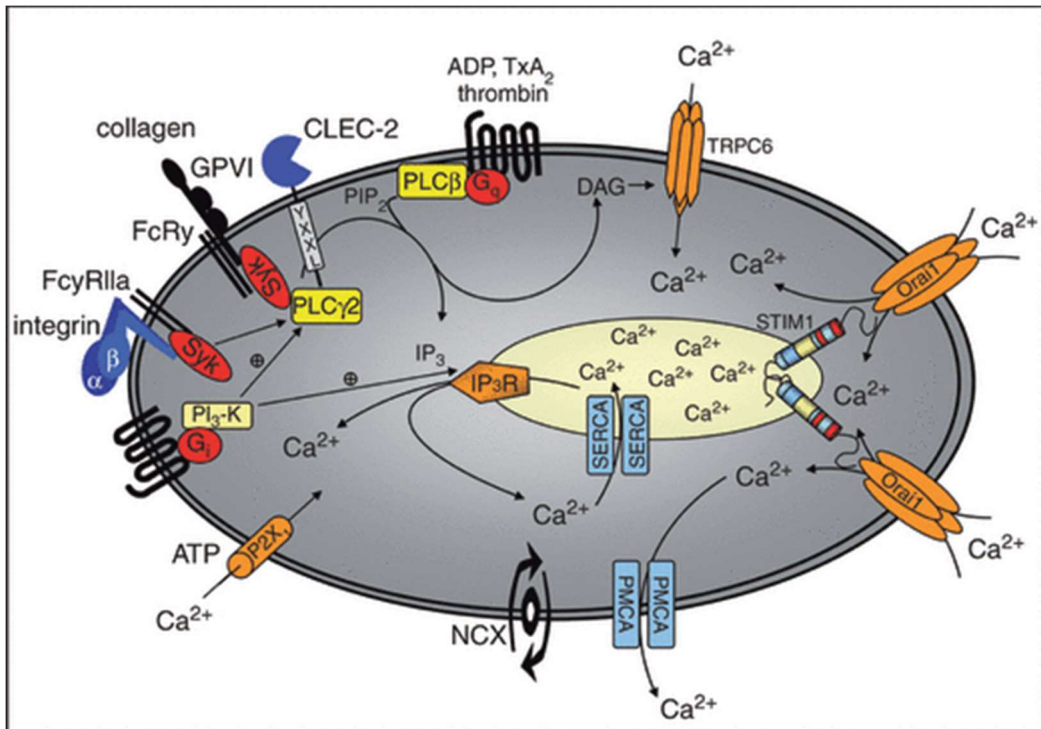


Рисунок 1.5. Схема кальциевых каналов в тромбоците. NCX – натрий-кальцевый обменник, P2X1, TRPC6, Orai1-STIM1, PMCA, SERCA, IP3R [58]. Не показаны митохондрии и их каналы.

1.5 Субпопуляции тромбоцитов

В процессе активации тромбоцитов может произойти формирование двух субпопуляций [1, 59] с разными свойствами и функциями [42]. Одна субпопуляция представляет собой живые амёбоподобные клетки, способные к агрегации. Такие клетки не имеют фосфатидилсерина (ФС) на внешней стороне мембраны. Другая субпопуляция (называемая «укутаные», «прокоагулянтные» или «некротические» тромбоциты [60] представляет собой шароподобные мёртвые клетки (рисунок 1.6) с фосфатидилсерином на внешнем слое мембраны и способностями связывания факторов свёртывания [61-63], но без возможности агрегировать [13]. Цитоскелет прокоагулянтной субпопуляции разрушен и не имеет связи с адгезионными рецепторами [64]. Прокоагулянтные тромбоциты охарактеризованы как клетки, покрытые «шубой» из белков¹, способствующих процессам свёртывания крови: фактора Va, Ха, фибриногена, трансглутаминаз XIIIa и тканевой (рисунок 1.7, 1.8) [65]. Было показано, что в тромбах, выращенных в мышинных сосудах присутствуют обе субпопуляции [66]. Подавляющее большинство работ, в которых изучали прокоагулянтные тромбоциты были сделаны при помощи проточной цитометрии [14, 61, 62, 67-71], в связи с чем в литературе наблюдается полное отсутствие данных о структуре или локализации фибриновой шубы. Одной из задач данной диссертационной работы была ликвидация этого пробела при помощи методов конфокальной и электронной микроскопии.

В таблице 1 представлено сравнение субпопуляций активированных тромбоцитов.

¹ эволюция наименования этой субпопуляции такова: первоначально считалось, что она образуется только при активации Коллагеном и Тромбином (COllagen And Thrombin = COAT), таким образом, появился акроним COAT. Позже выяснилось, что и другие комбинации агонистов способны приводить к образованию этой субпопуляции, и её стали называть формально так же – **coated platelets**, но не из-за сокращения COAT, а уже за их свойства – наличие прокоагулянтных белков на поверхности.

Таблица 1 – Сравнительные субпопуляций активированных тромбоцитов		
	Прокоагулянтные тромбоциты	Непрокоагулянтные тромбоциты
Прокоагулянтные свойства	высокие, отрицательно-заряженные фосфолипиды распределены на обеих сторонах цитоплазматической мембраны	отсутствуют
Концентрация цитоплазматический кальций	нефизиологическая, стабильно высокая	физиологическая, возможны осцилляции
Прокоагулянтные белки на поверхности	фибриноген, тканевая трансглутаминаза, фактор 13, фактор V, тромбоспондин	перечисленные белки в низких количествах или отсутствуют
Способность к агрегации	отсутствует, интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ инактивирован	присутствует, интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ активен
Состояние митохондрий	деполяризованы	функционалируют
Обозначения	Прокоагулянтные, укутанные (coated) [68], некритические, СОАТ [67], тромбоциты со стабильно высоким кальцием (SCIP) [72], супертромбоциты [73], сверхактивированные тромбоциты [74]	непрокоагулянтные, некутаные

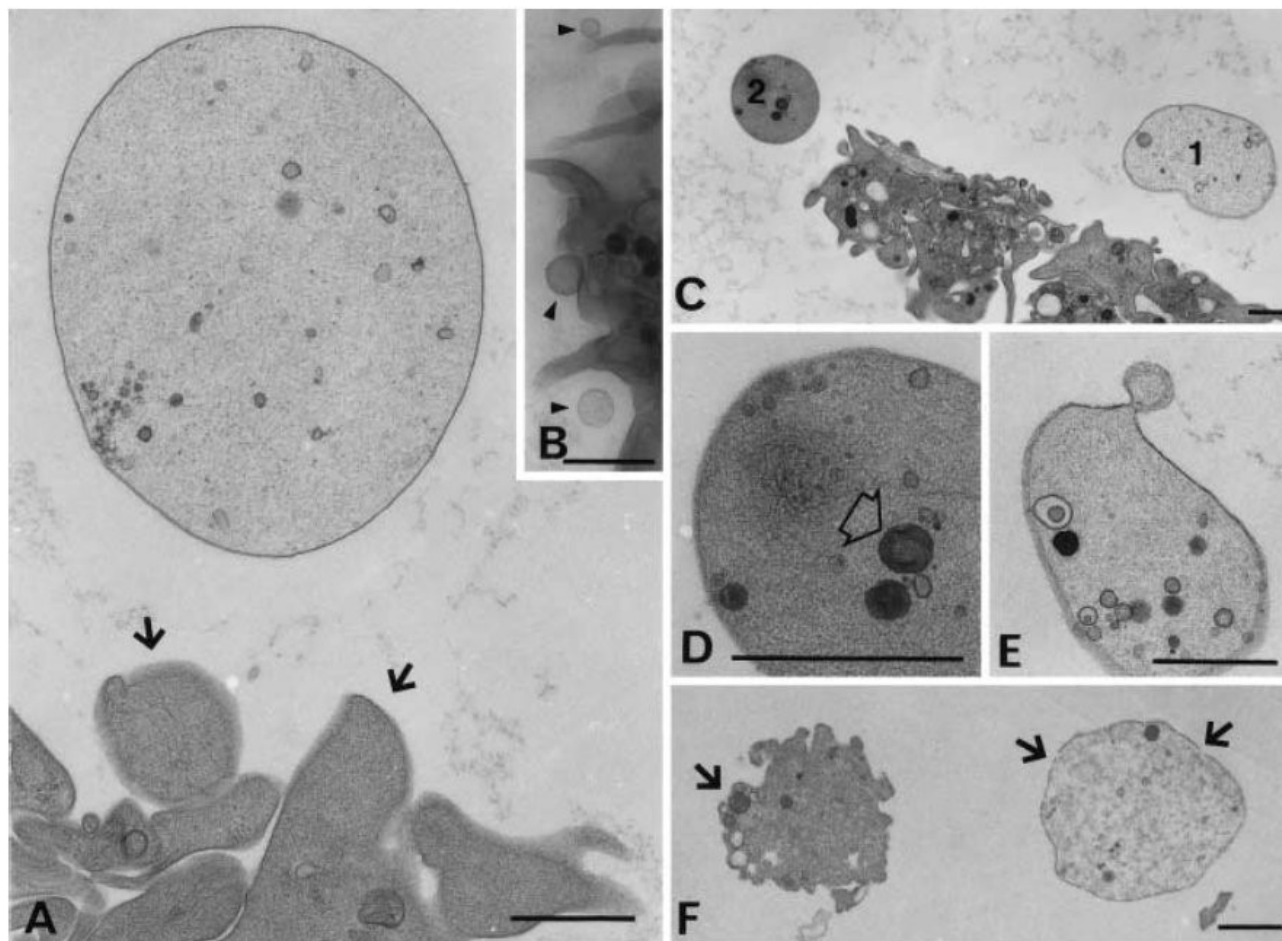


Рисунок 1.6. Морфология субпопуляций. Проконгулянтные тромбоциты представляют собой круглый баллон с цитоплазмой и разрушенным цитоскелетом. [75]

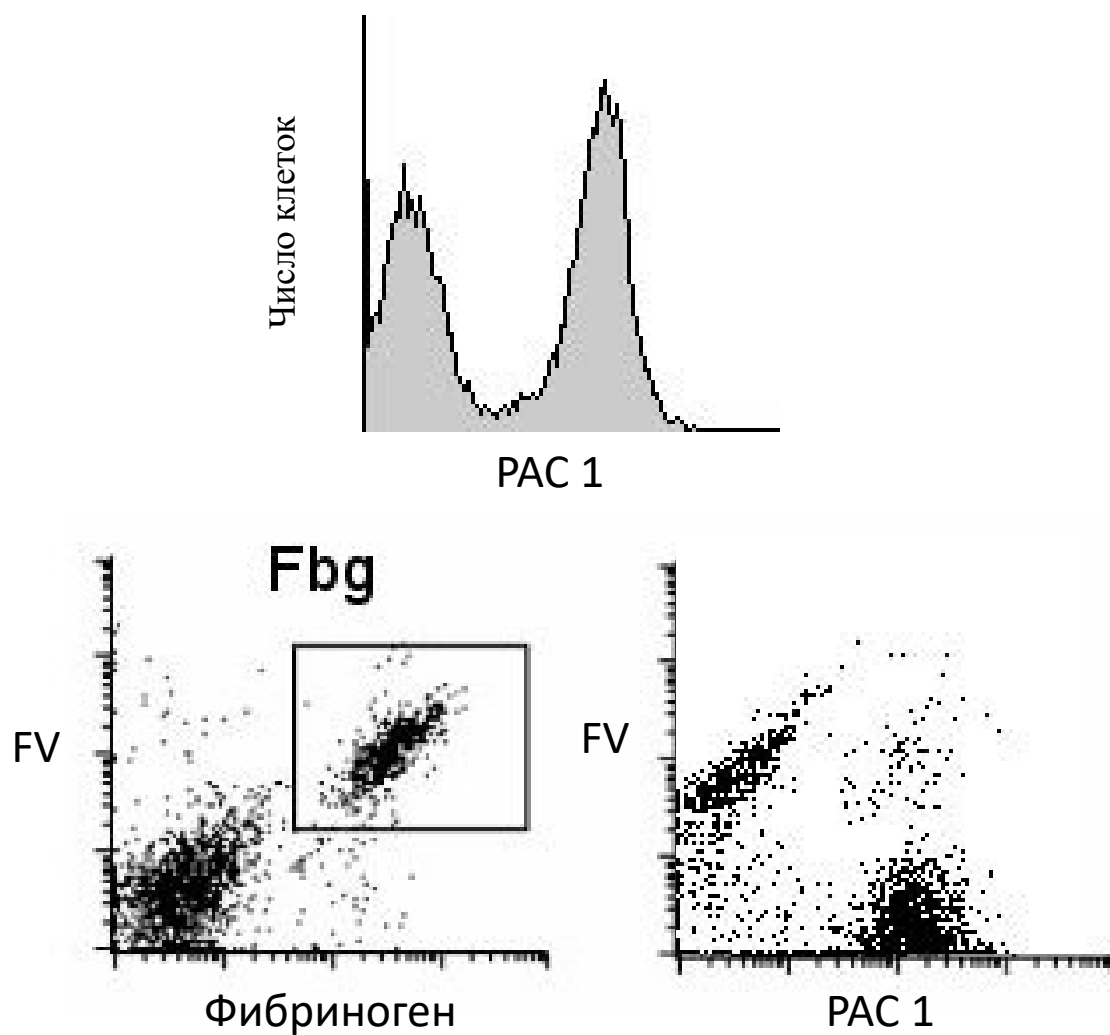


Рисунок 1.7. Разделение тромбоцитов на субпопуляции после активации тромбином и коллагеном по маркерам на FV, РАС1 (антитело к активному интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$) и фибриногену [68]. Проточная цитометрия.

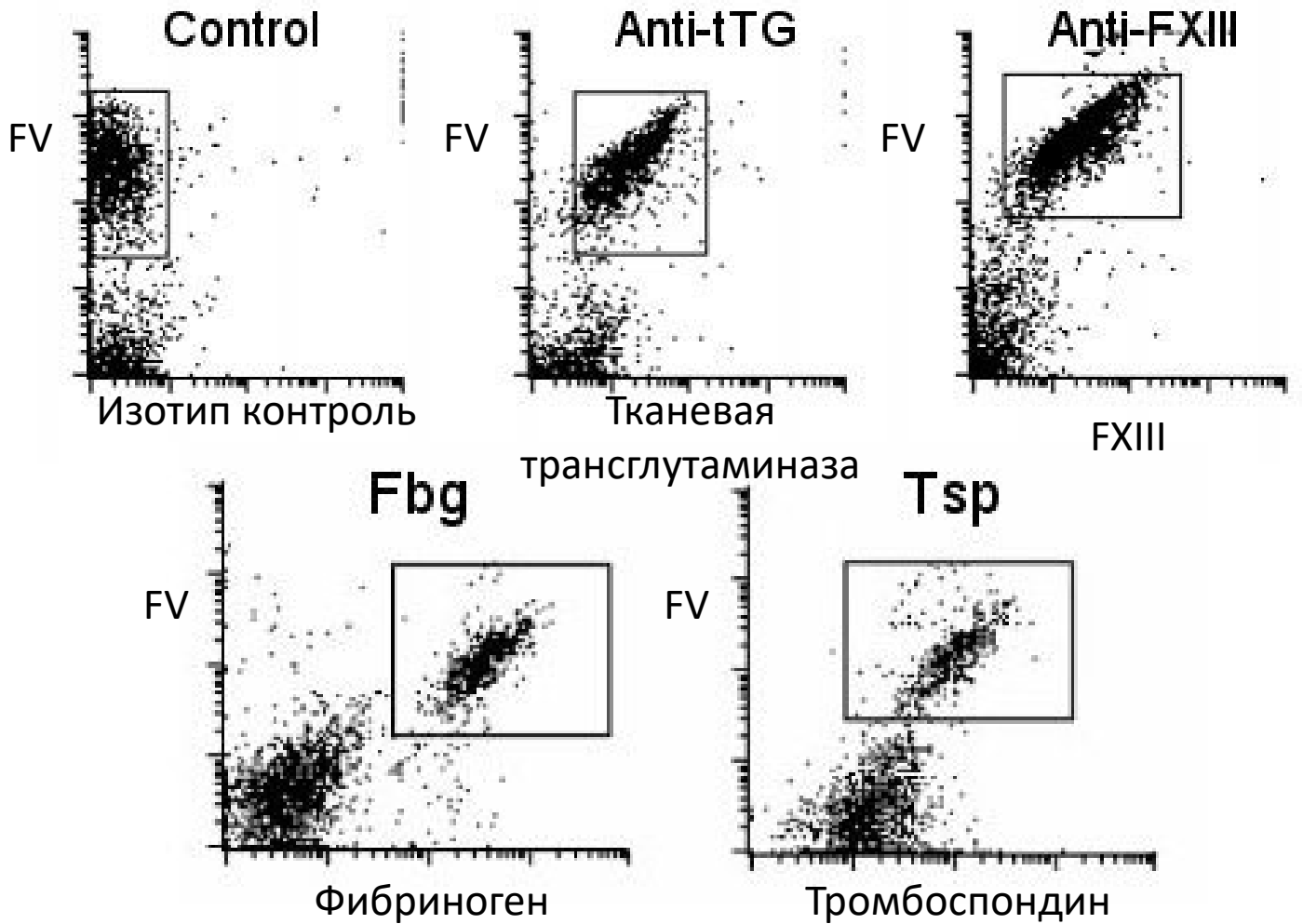


Рисунок 1.8. Разделение тромбоцитов на субпопуляции после активации тромбином и коллагеном по маркерам на FV, антителам к тканевой трансглутаминазе (tTG), FXIII, фибриногену и тромбоспондину [68]. Проточная цитометрия.

1.6 Гипотезы формирования субпопуляций тромбоцитов.

Факторы, определяющие превращения тромбоцитов в ту или иную субпопуляцию после активации, на данный момент не ясны. Известно, что тромбоциты не разделены на субпопуляции заранее [13, 14, 62]: доля прокоагулянтных тромбоцитов повышается в зависимости от степени активации и может меняться между 0 и 90%. Эксперименты с различными ингибиторами, агонистами и у пациентов с дефектами функций тромбоцитов позволили определить главные рецепторы и ведущие от них сигнальные пути [14, 71, 76], но не смогли определить, что именно отвечает за выбор тромбоцитом субпопуляции. Есть некоторые данные, что триггером являются цитоплазматические и митохондриальные кальциевые сигналы. Непрокоагулянтные тромбоциты имеют низкий цитоплазматический кальций, в то время как прокоагулянтные тромбоциты обладают повышенной концентрацией кальция [71, 77], но является ли кальций причиной или следствием? Кальциевая сигнализация в одиночных тромбоцитах во время активации исследовалась, но нет данных о кальциевой динамике в процессе деления активированных тромбоцитов на субпопуляции. Известно, что низкие концентрации тромбина вызывают в тромбоцитах кальциевые осцилляции без образования значительного количества прокоагулянтных тромбоцитов, а поверхности с иммобилизованным коллагеном запускают стабильный подъем цитоплазматического кальция и выход фосфатидилсерина [78]. Формирование митохондриальной поры является важным для запуска клеточной смерти и процессов, ведущих к экспозиции фосфатидилсерина в прокоагулянтных тромбоцитах [79]. Формирование митохондриальной поры регулируется белком-сенсором Циклофилином Д, чувствительным к митохондриальному кальцию. Перегрузка митохондрии кальцием может вызывать формирование поры [80]. В опубликованных исследованиях существуют две противоречивые гипотезы: решающая роль в преобразовании тромбоцитов принадлежит не цитоплазматическому кальцию, а митохондриям [44]; и альтернативная – цитоплазматический кальций, а не

митохондрии, индуцирует образование прокоагулянтных тромбоцитов [43]. Взаимодействие между динамикой кальциевых колебаний, коллапсом митохондрий и выхода фосфатидилсерина в одиночных тромбоцитах при активации экспериментально не было исследовано. Изучение этих взаимодействий и определение причинно-следственных связей между ними и являлось целью нашей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Использовались следующие реагенты:

Fura Red AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) – флуоресцентный зонд на цитоплазматический кальций;

Fluo-3 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) – флуоресцентный зонд на цитоплазматический кальций;

TMRM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) – тетраметилродамин метиловый эфир (TMPM, тетраметилродамин), флуоресцентный зонд на митохондриальный потенциал;

Rhod-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) – флуоресцентный зонд на митохондриальный кальций;

NAO (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) – 10-N-нонил-акридин оранжевый (NAO), флуоресцентный зонд на кардиолипид;

Calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) – флуоресцентный зонд для проверки целостности клетки;

Annexin V – Alexa-647 (Biolegend, San Diego, CA, USA) – флуоресцентно-меченный индикатор выхода фосфатидилсерина;

FITC-антитело к фибрин(оген)у (Labvision, Fremont, CA) - флуоресцентно-меченный индикатор на фибрин(оген);

PE-антитело к CD62P (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) - флуоресцентно-меченный индикатор на P-селектин;

мышинные антитела к фактору XIII anti-FXIII IgG (clone AC-1A1) (ThermoScientific, Rockford, IL);

антитела к тромбоспондину-1 (Abcam, Cambridge, UK);

мышинные антитела к тканевой трансглутаминазе anti-tTG IgG (clone CUB7402) (ThermoScientific, Rockford, IL);

вторичное козьиное анти-мышинное антитело к IgG-PE F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, PA, USA);

PGE1 (MP Biochemicals, Irvine, CA, USA) – простогландин E1;
апираза (San Diego, CA, USA);
CsA (Tocris Biosciences, Bristol, UK) – ингибитор формирования митохондриальной поры;
СССР (Tocris Biosciences, Bristol, UK) – протонофор для снятия потенциала с митохондриальной мембраны;
тромбин (Hematologic Technologies, Essex Junction, VT, USA) – активатор тромбоцитов;
PAR-1 активирующий пептид SFLLRN – активатор тромбоцитов;
ионофор A23187 (Tocris Biosciences, Bristol, UK);
монафрам – ингибитор интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$;
OsO4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) – тетраоксид осмия, контрастирующее вещество для электронной микроскопии;
уранил ацетат (SPI-Chem, West Chester, PA, USA) - контрастирующее вещество для электронной микроскопии;
нитрат свинца (SPI-Chem, West Chester, PA, USA) - контрастирующее вещество для электронной микроскопии;
ацетон (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) – для дегидратации образцов;
набор эпоксидных смол для заключения образца в смолу (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
Все остальные реагенты были приобретены в Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.

2.2 Буферные растворы

Для работы с живыми клетками использовался буфер Тирода с рН 7.4 и добавлением глюкозы и бычьего сывороточного альбумина (см. таблицу 2).

Таблица 2 – Состав буфера для работы с живыми тромбоцитами [62].

NaCl	150 мМ
KCl	2.7 мМ
MgCl ₂	1 мМ
NaH ₂ PO ₄	0.4 мМ
HEPES	20 мМ
C ₆ H ₁₂ O ₆	5 мМ
бычий сывороточный альбумин (BSA)	0.5%
рН	7.4

Для фиксации клеток использовался натрий-фосфатный буфер (см. таблицу 3)

Таблица 3 – Состав буфера для работы с фиксированными тромбоцитами

NaCl	137 мМ
KCl	2,7 мМ
Na ₂ HPO ₄	10 мМ
KH ₂ PO ₄	1,76 мМ
pH	7.4

2.3 Флуоресцентные зонды, регистрация и обработка сигнала

Для визуализации расположения определённых молекул в образце применялся метод окрашивания флуоресцентными метками. Флуоресцентные молекулы способны поглощать кванты света определенного спектра, переходя при этом в возбужденное состояние, с последующим излучением кванта света с меньшей энергией, то есть с большей длиной волны. В работе использовались различные конъюгаты антител с флуоресцентными молекулами и низкомолекулярные зонды для измерения некоторых внутриклеточных процессов. Для использования одновременно нескольких флуорофоров необходим тщательный подбор флуоресцентных меток, оптических фильтров и источников возбуждающего излучения, чтобы избежать или минимизировать эффект влияния флуоресценции одной метки в канал другой.

В данной работе использовались следующие красители:

Fura Red AM – инвертированная краска на цитоплазматический кальций (чем больше флуоресценция, тем ниже концентрация кальция и наоборот);

Fluo-3 AM – прямая краска на цитоплазматический кальций;

TMRM – тетраметилродамин метиловый эфир, индикатор митохондриального потенциала;

Rhod-2 AM – прямой индикатор на концентрацию митохондриального кальция;

NAO – 10-N-нонил-акридин оранжевый (NAO), краска на кардиолипид, содержащийся в тромбоцитах только в митохондриальной мембране.

Антитела, меченные FITC, PE, Alexa-647 и т. д.

Для детекции флуоресценции был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Zeiss Cell Observer Z1 с конфокальным модулем на

основе диска Нипкова. Этот метод является самым быстрым по сравнению с другими способами конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и позволяет снимать биологические процессы с высокой частотой. Микроскоп оснащён лазерами с длинами волн 405, 488, 561 и 639 нм и оптическими фильтрами марки Semrock 450/50, 520/35, 587/35, 629/62, 647+ нм.

Съёмка производилась при помощи камеры на основе CCD матрицы с усилением сигнала QuantEM 512sc с частотой 0.5 Гц (за 2 секунды производилась съёмка каждого флуорофора).

В полученных видеофайлах одиночные клетки обводились по контуру и измерялась величина сигнала для каждой временной точки в программе ImageJ. Для этого из суммарного сигнала клетки вычитался уровень фона области такой же площади без клетки. Полученная разница являлась величиной флуоресценции индикатора и использовалась для построения динамики флуоресценции от времени в программах Excel или Origin.

Для получения сигнала от отдельных митохондрий, выделялись области с митохондриями, а фон вычитался из той части клетки, где митохондрии отсутствовали.

2.4 Приготовление клеток

Тромбоциты выделялись из цельной крови здоровых доноров, за основу была взята методика [62] с некоторыми модификациями: в частности, отсутствие гель-фильтрации и иммобилизация тромбоцитов для экспериментов с измерением динамических процессов при помощи внутриклеточных флуоресцентных зондов.

Кровь набиралась в вакуумные пробирки Vacuett 9мл с 3.2% цитратом натрия для связывания кальция и предотвращения свертывания препарата. В цельную кровь добавлялись простагландин E1 (1 мкМ) и апираза (0.1 ед/мл) для ингибирования агрегации, расщепления АДФ и предотвращения активации клеток в процессе выделения. Затем кровь центрифугировалась 8 минут при 100g для осаждения эритроцитов. После центрифугирования в нижней части пробирки скапливались эритроциты, а сверху – богатая тромбоцитами плазма. Плазма отбиралась и в неё добавлялось 3,8% цитрата натрия в соотношении 3 части плазмы к 1 части цитрата, после чего снова центрифугировалась 5 минут при 400 g для осаждения тромбоцитов на дно пробирки с последующим удалением плазмы и ресуспендированием клеток в буфере Тирода. Для экспериментов с измерением кальция, тромбоциты инкубировались с флуоресцентными кальций-чувствительными зондами Fura Red (10 мкМ) или Fluo-3 (10 мкМ) в течение 45 минут в объёме 300 мкл. Далее клетки разбавлялись буфером и цитратом натрия в соотношении 3 к 1 до 2 мл буфера и их повторно осаждали при 400 g, осаждённые клетки вновь ресуспендировались и разводились буфером до концентрации порядка 100-200 тыс/мкл.

Полученная суспензия использовалась для иммобилизации тромбоцитов на подложке с фибриногеном в течение 15-20 минут, по истечении которых неприкреплённые тромбоциты смывались буфером Тирода с добавлением 1.5 мМ хлорида кальция и производилось исследование процессов внутриклеточной сигнализации в одиночных тромбоцитах в ответ на активацию на конфокальном микроскопе.

В случае экспериментов с зондами на митохондриальный кальций Rhod-2, митохондриальный мембранный потенциал TMRM, на кардиолипид NAO, а также с ингибитором формирования митохондриальной поры CsA, тромбоциты инкубировались с этими красками 15-20 минут в течение иммобилизации на фибриногене, а затем неприкрепленные тромбоциты смывались вместе с краской буфером, содержащим хлорид кальция.

Для экспериментов по исследованию локализации белков на поверхности тромбоцитов, после центрифугирования при 400 g тромбоциты ресуспендировались в 300 мкл буфера и проводилась гель-фильтрация через сефарозу CL-2B (Sigma) для очищения тромбоцитов от белков из плазмы.

Флуоресцентные маркеры для поверхностного окрашивания добавлялись в количестве 0.5% от объема образца.

2.5 Подготовка к электронной микроскопии

Выделенные тромбоциты фиксировались в активированном и неактивированном состояниях 2% раствором глутарового альдегида в натрий-фосфатном буфере в течение 1 часа, затем отмывались от альдегида разведением в буфере примерно в 10 раз и последующим осаждением клеток центрифугированием при 400g [81]. Отмытые клетки постфиксировались в 1% водном растворе тетраоксида осмия 1 час, после чего отмывались и хранились в холодильнике на +4°C до последующих процедур. Далее следовала процедура дегидратации образца в спирте и ацетоне, последовательно выдерживая образец по 15 минут в растворах с концентрацией спирта 30%, 50%, 70%, 95%, 95%. Завершалась дегидратация в 100% ацетоне 2-3 раза, после чего образец пропитывался смолой с ацетоном в соотношениях 1:2 и 2:1 соответственно по 30 минут. Затем образец инкубировался со смолой без добавок ночь, смола заменялась и образец для полимеризации выдерживался 12 часов при 45 градусах и 24 часа при 60 градусах [82].

После полимеризации блоки нарезались на ультрамикротоме (Reichert-Jung, Vienna, Austria). Толщина срезов составляла порядка 100 нм.

Срезы помещались на медные сеточки, покрытые формваровой плёнкой. Контрастирование срезов производилось 2% водным раствором уранил ацетата 30 минут и 5 минут цитратом свинца [83]. Для просмотра образца использовались просвечивающие электронные микроскопы FEI Tecnai и Hitachi.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Динамика внутриклеточного кальция и выход фосфатидилсерина в тромбоцитах

В качестве основного инструмента для наблюдения динамики внутриклеточного кальция использовалась инвертированная флуоресцентная краска Fura Red и прямая краска Fluo-3 в качестве контроля. Была получена динамика изменений цитоплазматического кальция в тромбоцитах, активированных сильным физиологическим агонистом тромбином и в присутствии Аннексина V для определения момента выхода фосфатидилсерина (рисунок 3.1) [84]. Сразу после добавления стимулирующей смеси, цитоплазматический кальций увеличивался (флуоресценция Fura Red в клетках уменьшалась), после чего в клетках запускалась серия кальциевых осцилляций. Все клетки в экспериментах можно было разделить на две субпопуляции:

1) клетки, связавшие Аннексин V (ФС+), кальциевые колебания отсутствуют, флуоресценция Fura Red на минимальном уровне – кальций зашел в цитоплазму;

2) клетки без Аннексина V, наличие кальциевых колебаний.

Тетраметилпродамин метиловый эфир применялся для измерения динамики потенциала митохондриальной мембраны тромбоцитов. В качестве контроля были получены сигналы от клеток, иммобилизованных на фибриногеновой подложке без добавления активирующих тромбоциты веществ (рисунок 3.2). До активации тромбоциты имели редкие скачки внутриклеточного кальция, что соответствует опубликованным данным других экспериментальных работ [85]. Формирования прокоагулянтных тромбоцитов без активации не происходило.

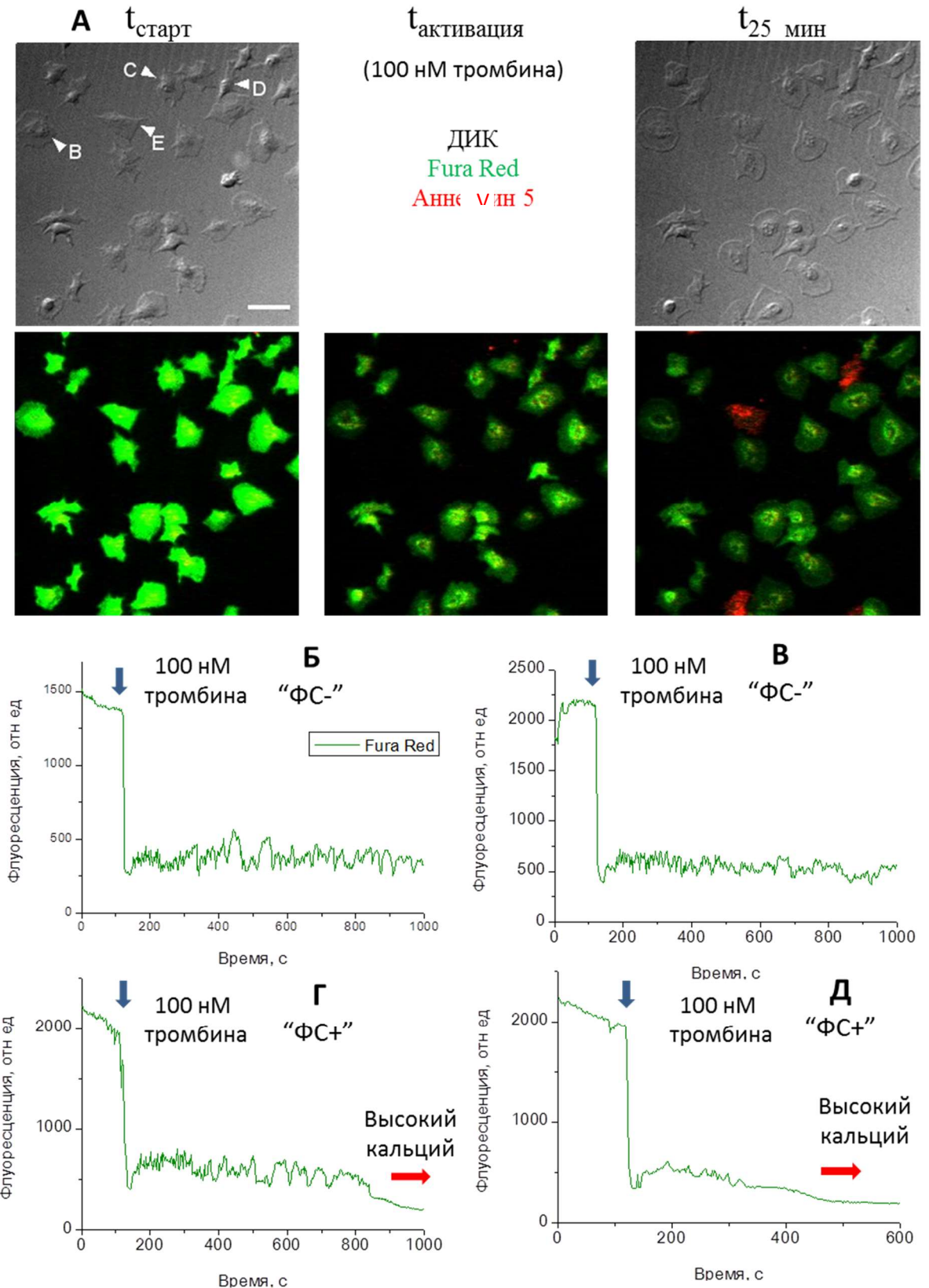


Рисунок 3.1. Активация тромбоцитов, нагруженных кальциевой краской Fura Red. При добавлении активатора к тромбоцитам наблюдался резкий подъем внутриклеточного кальция (понижение флуоресценции Fura Red) и появление колебаний. (Б, В) – непрокоагулянтные клетки, (Г, Д) – прокоагулянтные. Шкала 10 мкм (А). Зеленый – Fura Red, красный – Аннексин V.

Чтобы удостовериться, что падение сигнала от инвертированной краски Fura Red не связано с вытеканием при активации или выставлении тромбоцитом фосфатидилсерина, были проведены опыты с прямой краской Fluo-3 (рисунок 3.3) и эксперимент с кальцеином – флуоресцентной краской, загружаемой в клетки для проверки объекта на целостность (рисунок 3.4).

В качестве положительного контроля были проведены опыты (n=3) с добавлением кальциевого ионофора A23187, не являющимся физиологическим активатором тромбоцитов. В каждом тромбоците моментально повышалась концентрация внутриклеточного кальция с прекращением колебательных процессов, пропадала разность потенциалов на мембране митохондрий, и появлялся фосфатидилсерин (рисунок 3.5).

Далее были получены ответы цитоплазматического кальция в тромбоцитах, активированных разными активаторами в различных концентрациях (рисунок 3.6, 3.7). Ожидаемый результат титровки подтвердился – интенсивность кальциевого ответа зависит от активатора и от его концентрации. В тромбоцитах, активированных тромбином, уровень кальция повышался сильнее, чем в тромбоцитах, активированных SFLLRN и не имел свойства возвращаться в состояние, близкое к исходному. При активации тромбином кальциевые колебания не затухали в течение эксперимента (более 10 минут).

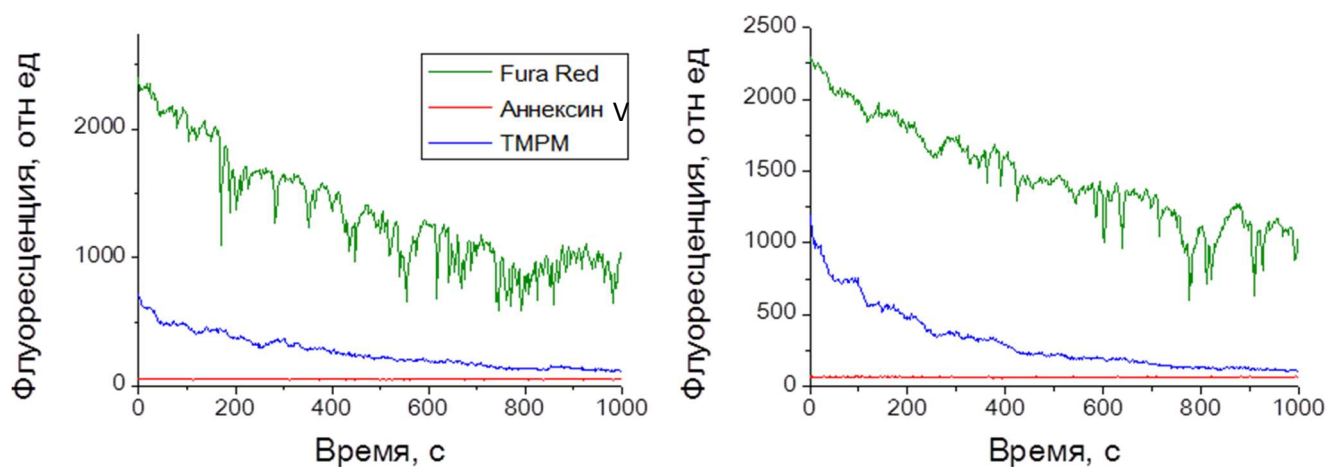


Рисунок 3.2. Динамика флуоресценции Fura Red, тетраметилродамин (TMPM) и Аннексин V в двух одиночных тромбоцитах без добавления активатора. Fura Red – зеленый, инвертированная краска, большая флуоресценция обозначает меньший уровень цитоплазмического кальция; Аннексин V – красный, индикатор выхода фосфатидилсерина; TMPM – синий, индикатор митохондриального потенциала. [84]

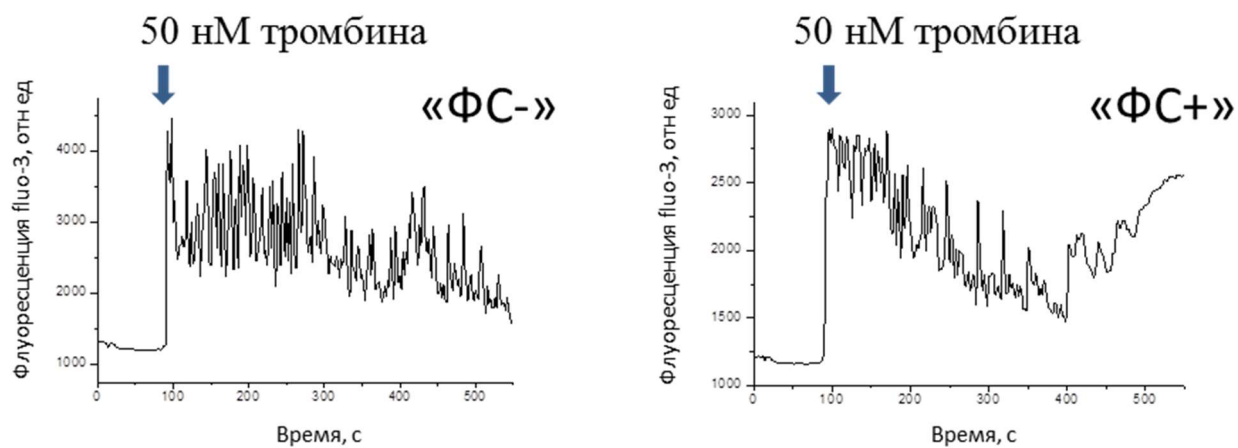


Рисунок 3.3. Контроль динамики кальция в субпопуляциях тромбоцитов при помощи прямой краски Fluo-3. Непрокоагулянтный тромбоцит – слева, прокоагулянтный – справа. [84]

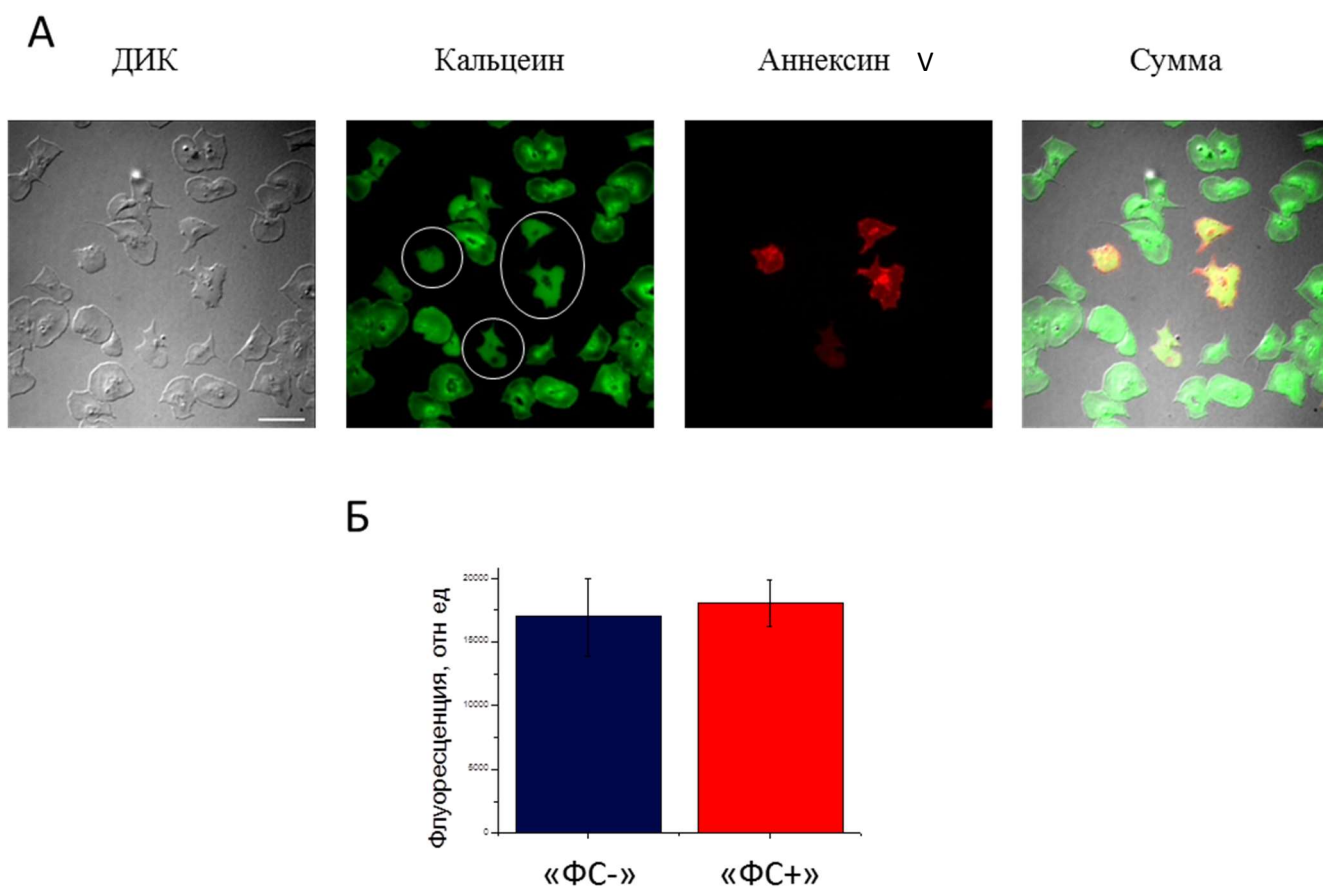


Рисунок 3.4. Прокоагулянтные тромбоциты имеют целую мембрану, Кальцеин внутри всех клеток (А). Кальцеин – зеленый, Аннексин V – красный, масштабный отрезок 10 мкм. Флуоресценция Кальцеина в разных субпопуляциях на одинаковом уровне через 10 минут после активации (Б). [84]

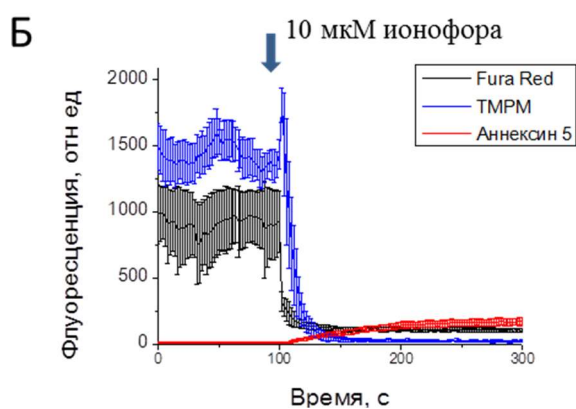
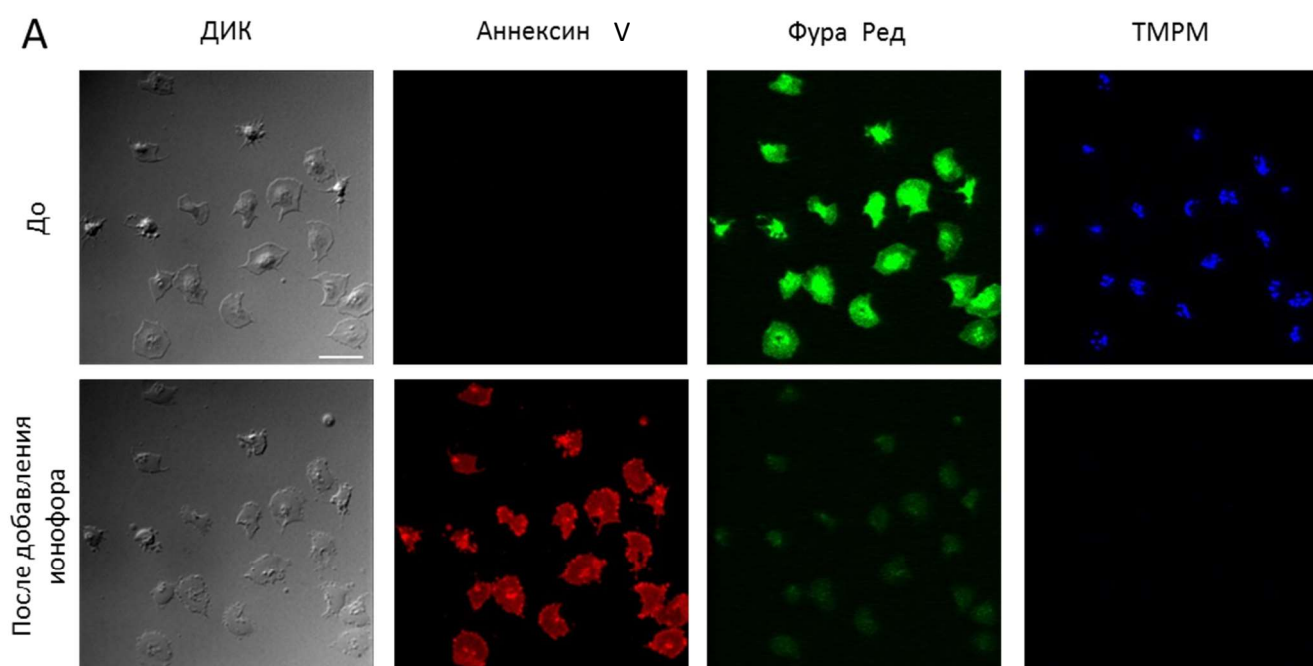


Рисунок 3.5. Ионофор приводит все тромбоциты в прокоагулянтное состояние. Положительный контроль. (А) Конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 10 мкм. Красный – Аннексин V, зеленый – Fura Red, синий – тетраметилродамин (ТМРМ). На графике (Б) построена усреднённая флуоресценция каждого флуорофора для 10 клеток из поля зрения \pm стандартное отклонение. [84]

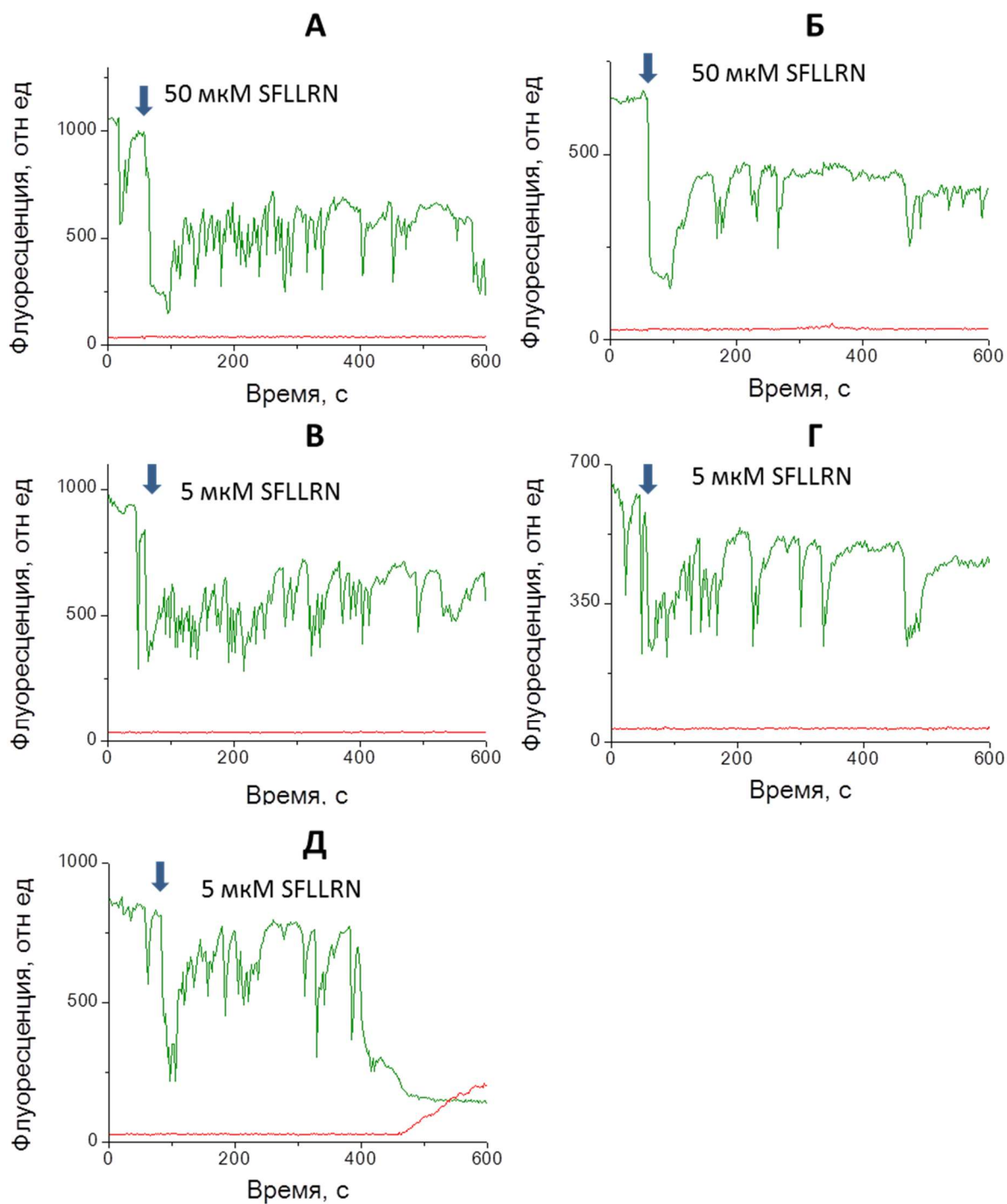


Рисунок 3.6. Зависимость кальциевого ответа от концентрации SFLLRN. Красный – Аннексин V, зеленый – Fura Red. А-Г – непрокоагулянтные тромбоциты. Д – прокоагулянтный тромбоцит. [84]

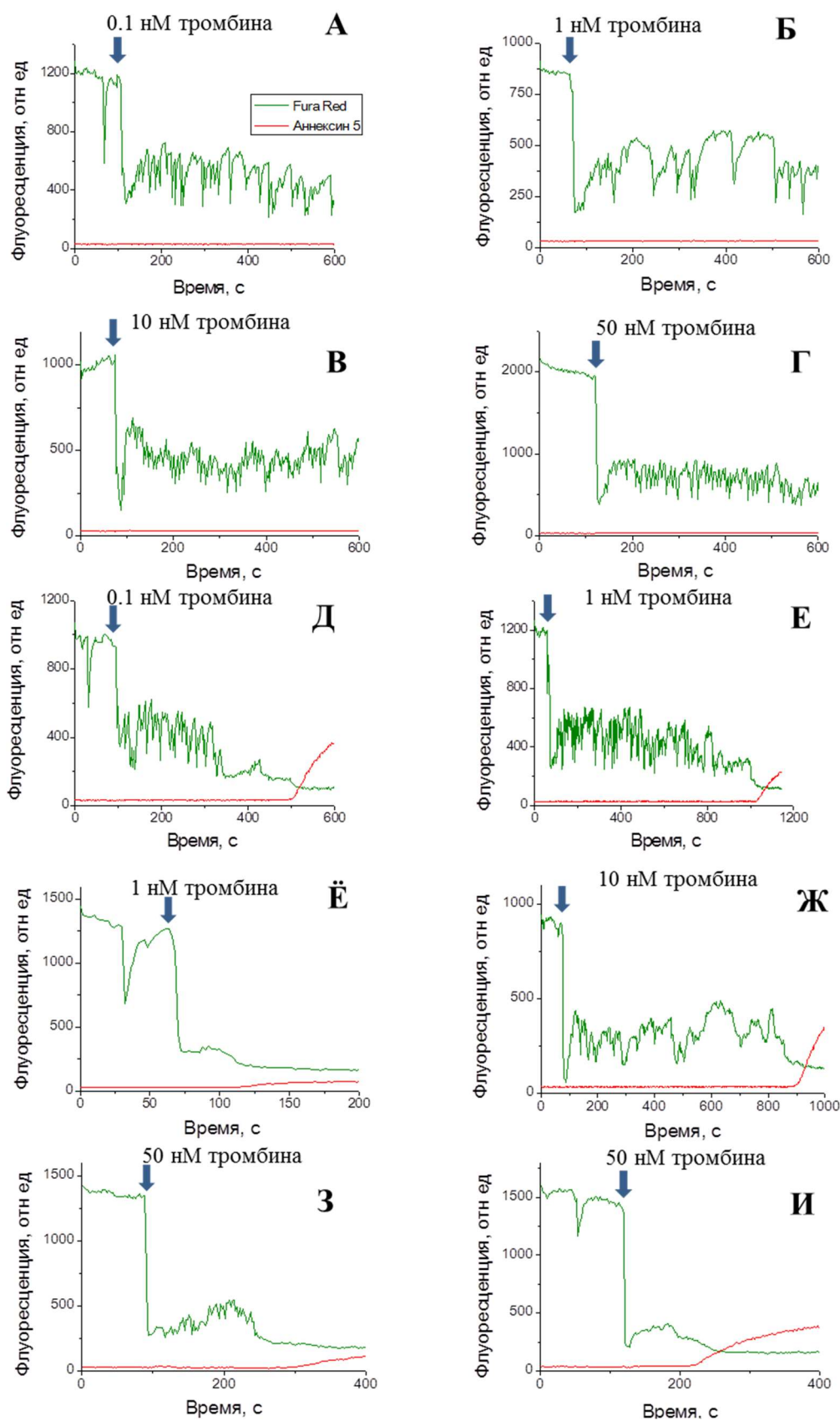


Рисунок 3.7. Зависимость кальциевого ответа от концентрации тромбина. Красный – Аннексин V, зеленый – Fura Red. А-Г – непрокоагулянтные тромбоциты; Д-И – прокоагулянтные тромбоциты. [84]

Экспериментальные данные показывают, что активация тромбином вызывала более существенный кальциевый ответ тромбоцитов, нежели активация PAR1 активирующим пептидом SFLLRN. Оба активатора вызывали подъем внутриклеточного кальция. Активация высокими концентрациями PAR1 активирующего пептида (50 мкМ) была сопоставима с низкими концентрациями тромбина (0.1-1 нМ). При этом динамика кальция в тромбоцитах, активированных PAR1-АП, со временем сглаживалась, резкие пики прекращались. А с тромбином этого не наблюдалось. На рисунках 3.8 и 3.9 приведено сравнение реакции тромбоцитов на разные активаторы.

Производя анализ динамики формирования «ФС+» субпопуляции по проведённым экспериментам было выявлено, что процесс выхода фосфатидилсерина происходил после повышения цитоплазматического кальция. У некоторых клеток фосфатидилсерин выходил сразу после активации (3.7Ё,3,И), а у других после длительной серии колебаний (3.6Д; 3.7Д,Е,Ж).

Таким образом в данном разделе работы было получено, что активация тромбоцитов тромбином и PAR1-АП запускает в тромбоцитах кальциевые осцилляции, в результате чего у некоторых тромбоцитов происходит повышение цитоплазматического кальция и выход фосфатидилсерина (клетка переходит в прокоагулянтное состояние), а остальные клетки остаются непрокоагулянтными и с колеблющимся цитоплазматическим кальцием. Порог перехода индивидуален для каждой клетки. Кальциевый ответ тромбоцитов зависит от вида активатора и его концентрации.

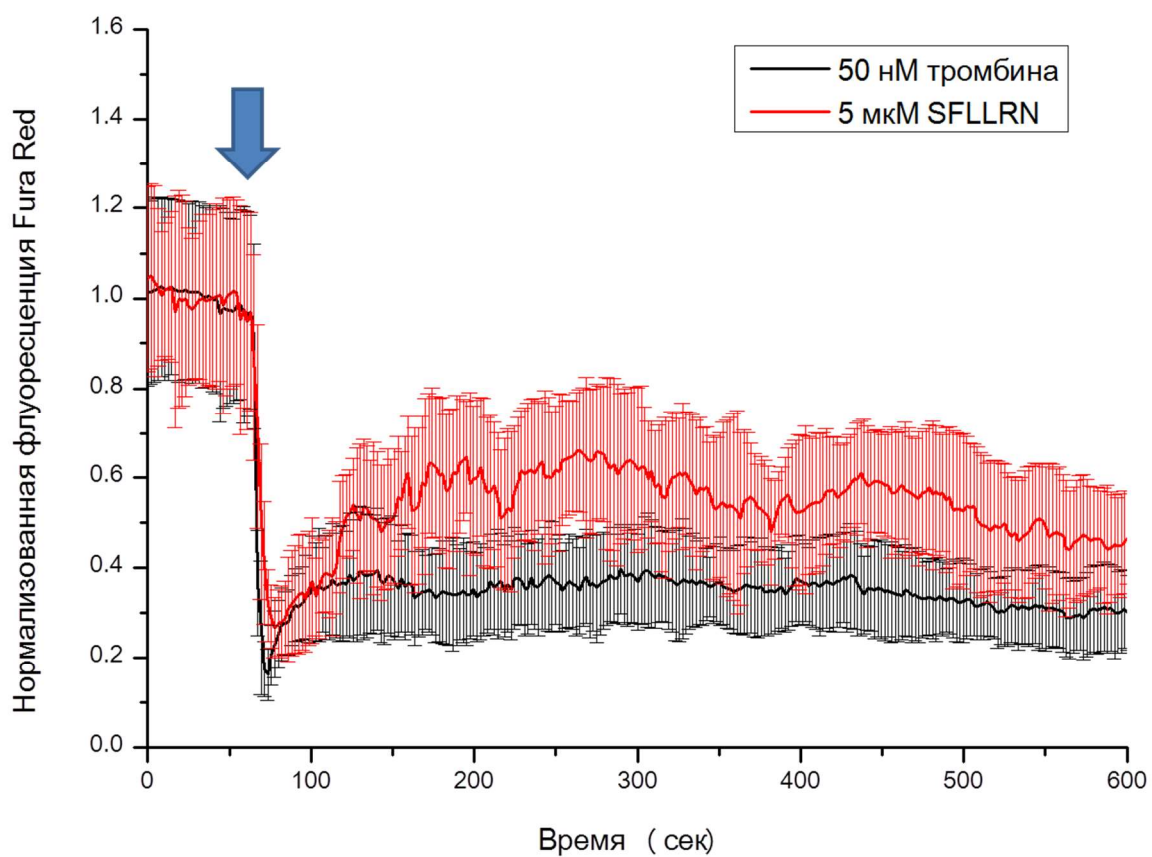


Рисунок 3.8. Сравнение кальциевого ответа тромбоцитов одного донора на активацию разными активаторами: SFLLRN и тромбином. Средняя флуоресценция тромбоцитов до активации принята за $1 \pm$ стандартное отклонение.

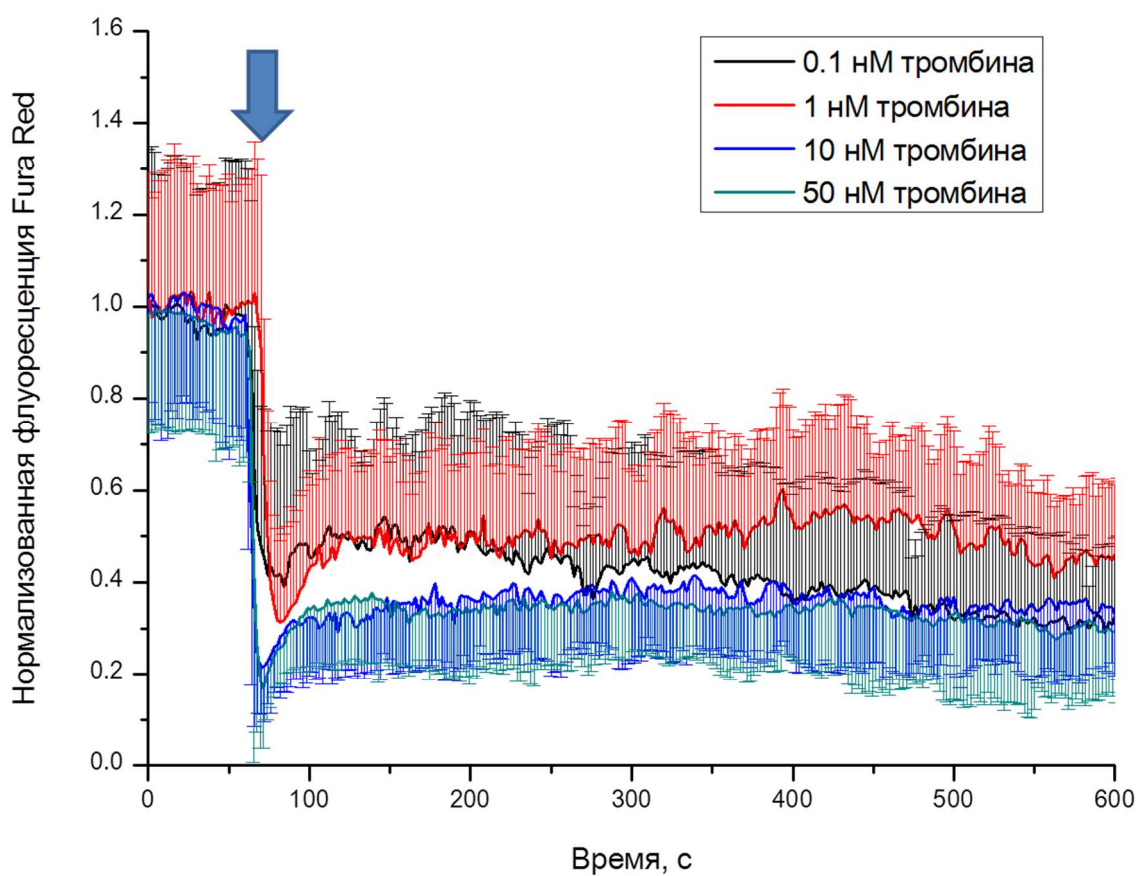


Рисунок 3.9. Сравнение кальциевого ответа тромбоцитов одного донора на активацию разными концентрациями тромбина. Средняя флуоресценция тромбоцитов до активации принята за $1 \pm$ стандартное отклонение. [84]

3.2 Митохондрии в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов

Для изучения роли митохондрий в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов были использованы флуоресцентные индикаторы тетраметилродамин для измерения потенциала митохондриальной мембраны и родамин-2, показывающий уровень митохондриального кальция. При активации тромбоцитов митохондриальный кальций резко возрастал с последующим слабым ростом (рисунок 3.10).

При съёмке в лучшем временном разрешении (0.5 Гц) пики цитоплазматического кальция совпадали по времени с пиками митохондриального кальция. Это означает, что митохондрии набирают кальций при повышении цитоплазматического кальция (рисунок 3.11).

Исследование динамики митохондриального потенциала показали, что у всех прокоагулянтных тромбоцитов митохондрии не имели разности потенциалов на мембране (рисунок 3.12).

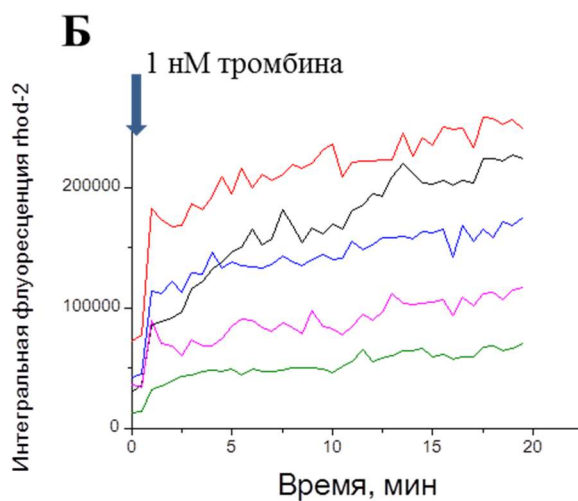
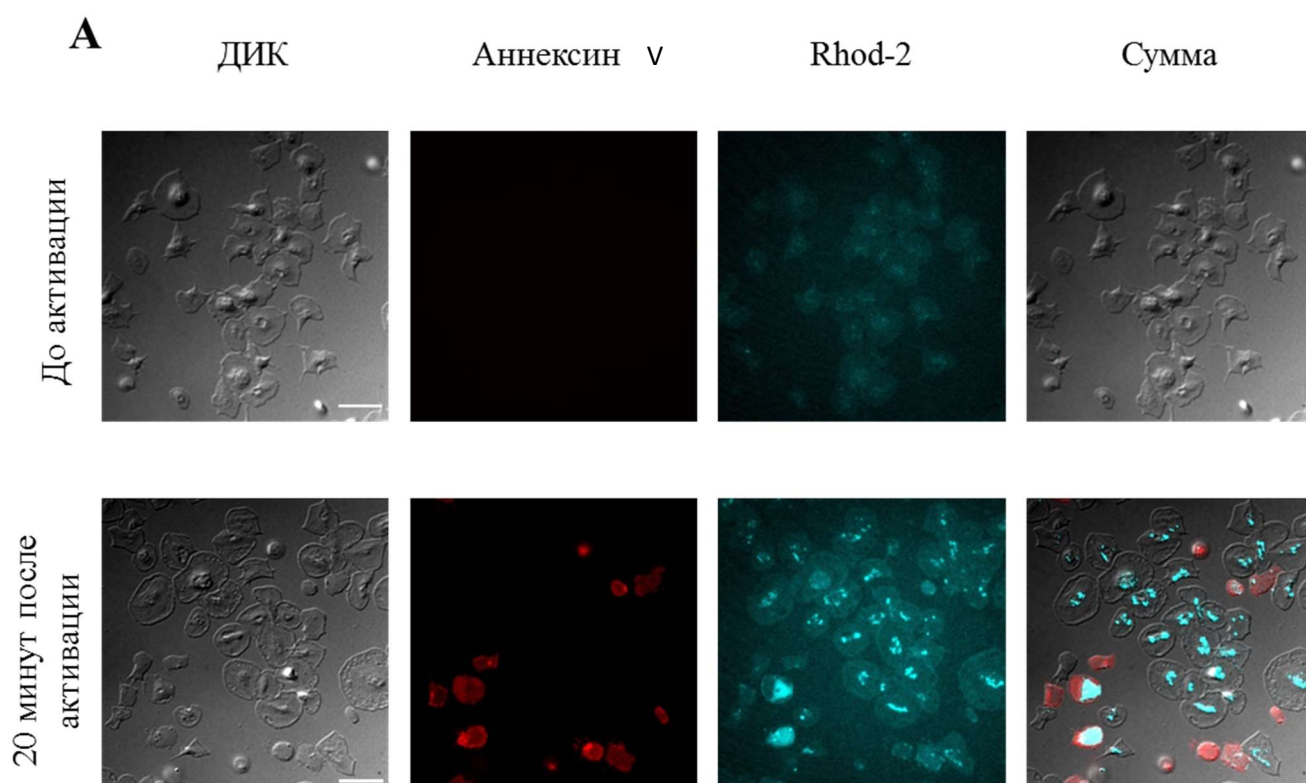


Рисунок 3.10. Активация тромбоцитов приводит к увеличению митохондриального кальция. (А) конфокальная микроскопия до и после активации: ДИК – дифференциально-интерференционный контраст, красный – Аннексин V, бирюзовый – Rhod-2; масштабный отрезок 10 мкм. (Б) Рост митохондриального кальция в 5 разных тромбоцитах в ответ на активацию 1 нМ тромбина. [84]

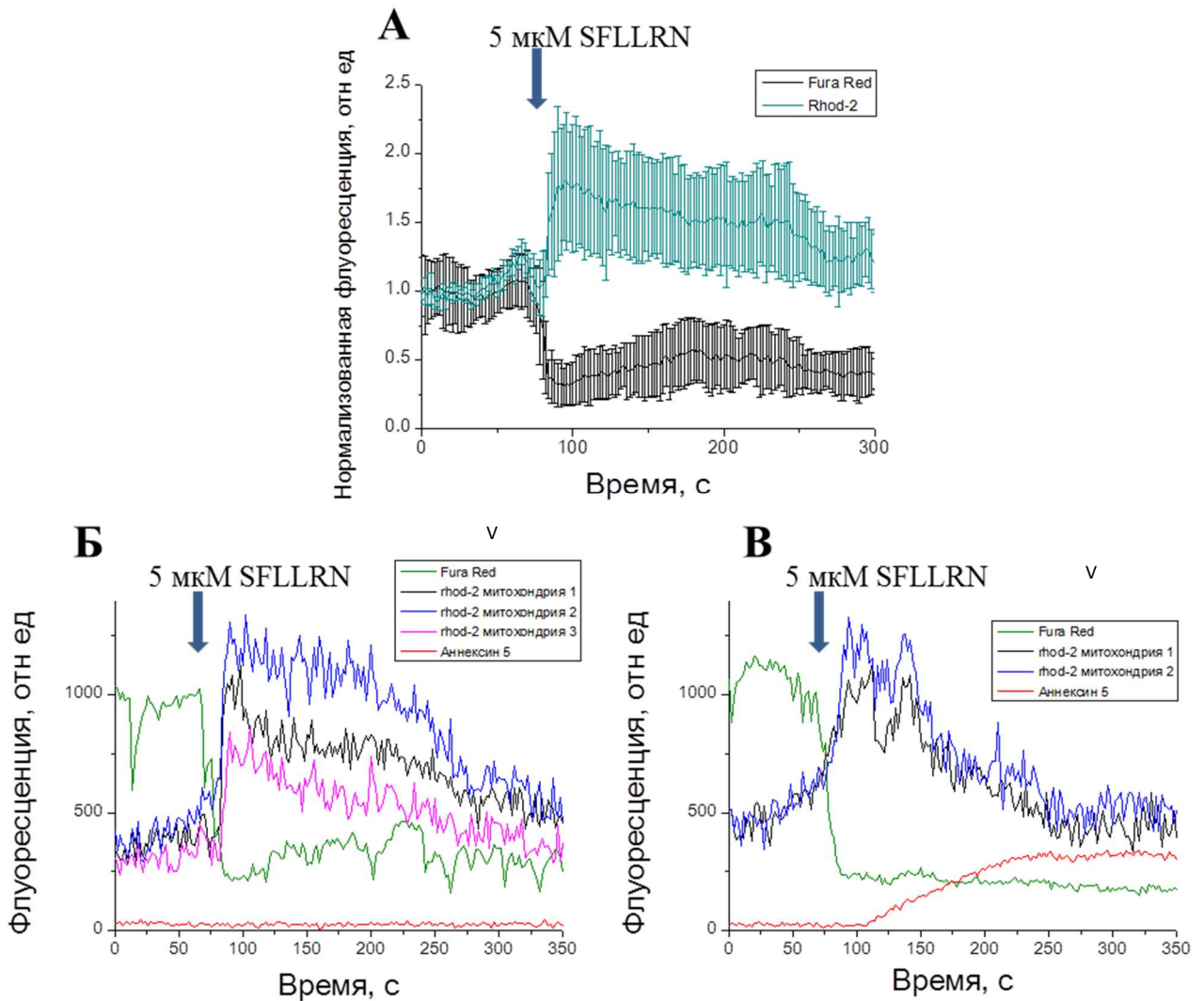


Рисунок 3.11. Корреляция цитоплазматического и митохондриального кальция. (А) усреднённая флуоресценция для 10 клеток \pm стандартное отклонение. (Б, В) Динамика митохондриального кальция в разных митохондриях клетки без прокоагулянтных свойств (Б) и прокоагулянтной клетке (В). Многие скачки цитоплазматического кальция сопряжены с повышением митохондриального кальция (Б). [84]

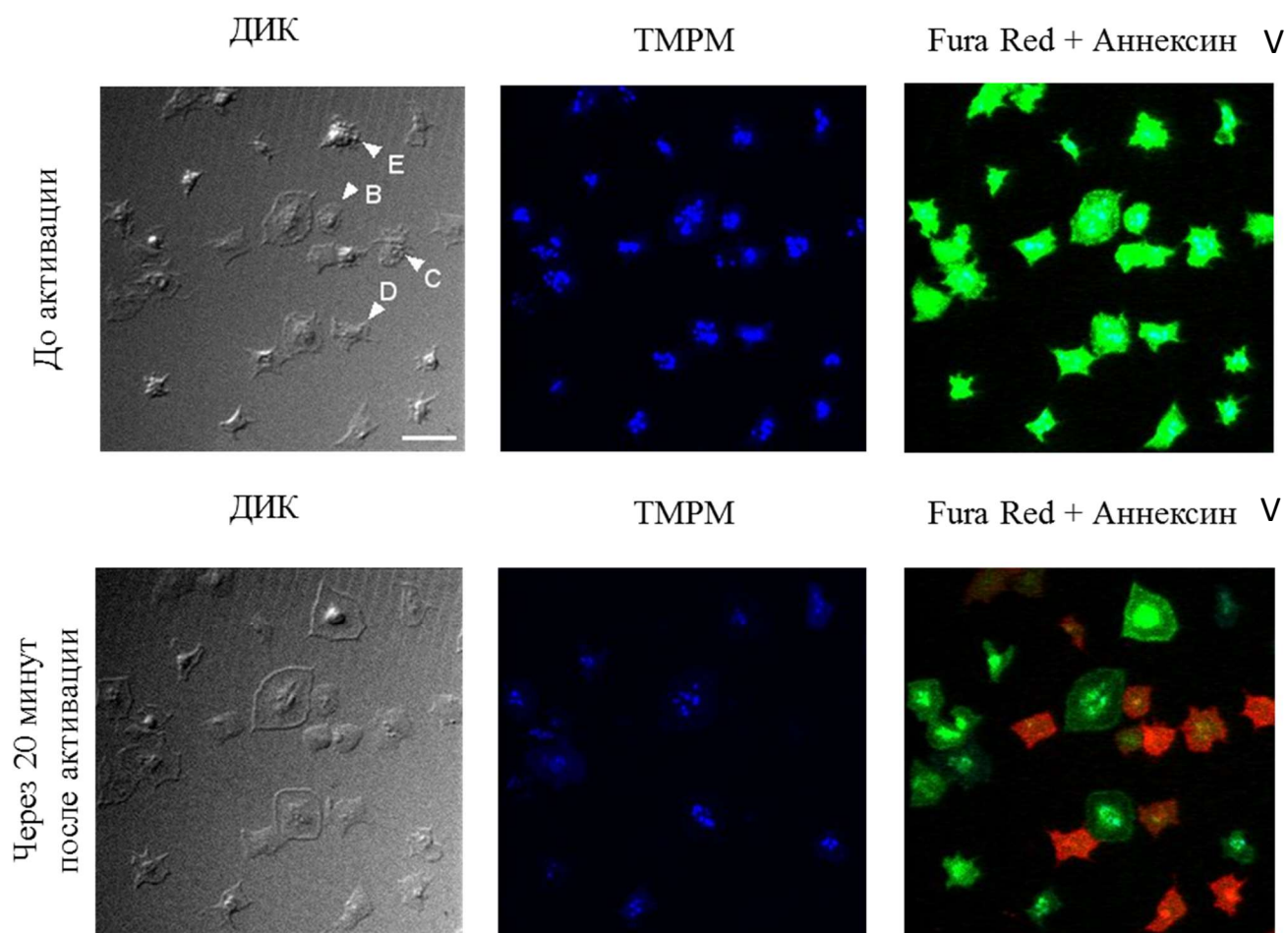


Рисунок 3.12. Динамика потенциала митохондриальной мембраны. Конфокальная микроскопия. ДИК – дифференциально-интерференционный контраст, ТМРМ (тетраметил-родамин) – синий, Fura Red – зеленый, Аннексин V – красный. Все «ФС+» тромбоциты не имеют окрашивания по ТМРМ. Масштабный отрезок 10 мкм. [84]

При формировании этой субпопуляции, в клетках происходило 3 перекрывающихся друг с другом процесса – подъем уровня цитоплазматического кальция, падение митохондриального потенциала и выход фосфатидилсерина (рисунок 3.13). Тетраметилродамин применялся в концентрации 200 нМ, при которой он агрегирует в митохондриях, вызывая гашение флуоресценции. При увеличении проницаемости митохондриальной мембраны, тетраметилродамин способен выходить из митохондрий, тем самым увеличивая флуоресценцию во всем объеме клетки. В некоторых клетках наблюдалось временное увеличение проницаемости мембраны митохондрии (формирование поры), сопровождаемое увеличением флуоресценции ТМРМ и понижением флуоресценции Fura Red (повышением внутриклеточного кальция).

Наблюдение за интегральным сигналом ТМРМ не позволяет определить, какую очерёдность занимает процесс деполяризации митохондрий в формировании прокоагулянтных тромбоцитов. Но если обратить внимание на поведение отдельных митохондрий, то становится понятно, что первым начинается процесс падения потенциала в отдельных митохондриях, который может закончиться гибелью (он не причина) всех остальных (рисунок 3.14 А);(рисунок 3.14 Б, В). Так на рисунке 3.13 видно, что скачки проницаемости митохондриальной мембраны, то есть открытие поры имеет вид сигналов (дельта-функций), одного или нескольких, и предшествует всем остальным этапам перехода в прокоагулянтное состояние. Процесс гибели митохондрий в других клетках в связи с нарушением проницаемости ее мембраны хорошо изучен для случая перегрузки митохондрий кальцием или разрушения АТФ/ADP-антипортера активными формами кислорода. Этот путь к смерти не зависит от каспаз, поэтому имеет некротический характер [32]. В нашем случае проницаемость митохондриальной мембраны вызывается кальцием. Митохондрия не может долго существовать при открытой митохондриальной поре - нарушается осмотический баланс между матриксом и межмембранным пространством митохондрии, исчезает мембранный потенциал, разбавляется матрикс,

происходит разрыв мембран, митохондрия теряет кофакторы NAD^+ и NADP^+ , необходимые для ее работы. Вслед за митохондриями начинал повышаться цитоплазматический кальций, а уже затем экспонировался фосфатидилсерин. Интересно, что митохондрии иногда теряли потенциал на время всего эксперимента, а иногда восстанавливали потенциал через какой-то срок.

Были проведены контроли на предмет гибели митохондрий: клетки загружались тетраметилпродаминол совместно с нонил-акридин-оранжевым (НАО), который избирательно окрашивает кардиолипид, содержащийся в тромбоцитах только в митохондриях. Все митохондрии прокоагулянтных тромбоцитов теряли флуоресценцию от обоих флуорофоров, что должно свидетельствовать о гибели митохондрий (рисунок 3.15 А). Солокализация флуоресценций от ТМРМ и НАО подтверждает, что в используемой концентрации, ТМРМ накапливается именно в митохондриях.

Полученные данные указывают, что в процессе формирования прокоагулянтных тромбоцитов, первым начинается процесс деполяризации митохондрий. Согласно опубликованным работам других авторов, ингибитор формирования митохондриальной поры, циклоспорин А, значительно уменьшает долю прокоагулянтных клеток. Такой же эффект на субпопуляции был получен и в данной работе (рисунок 3.16).

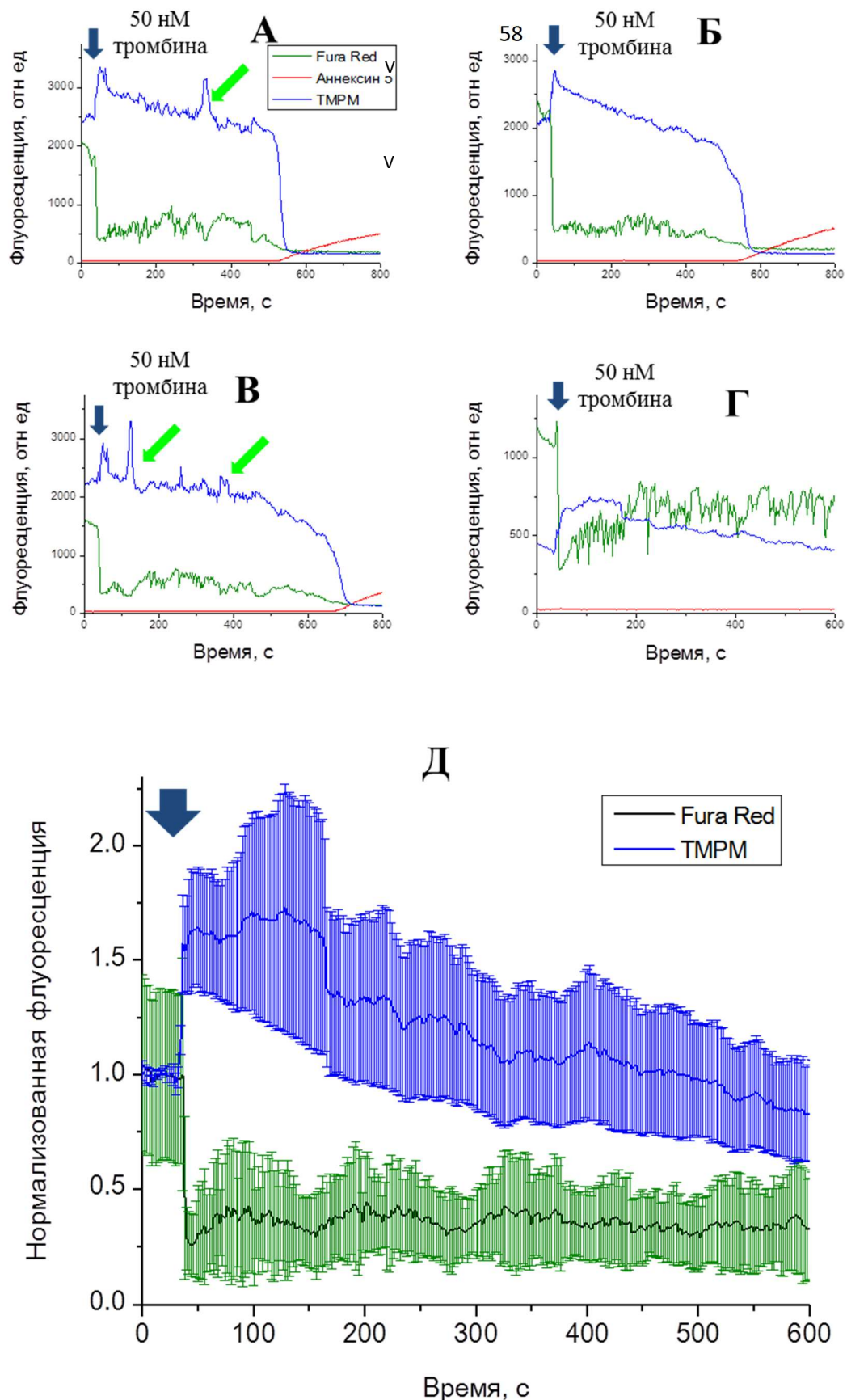


Рисунок 3.13. Динамика потенциала митохондриальной мембраны тромбоцитов в ответ на активацию. А-В «ФС+» тромбоциты, Г «ФС-» тромбоцит. Зелёные стрелки указывают моменты увеличения проницаемости митохондриальной мембраны. Зеленая кривая – динамика флуоресценции Fura Red, синяя кривая – динамика флуоресценции TMPM. Д – усредненная динамика Fura Red и TMPM в «ФС-» клетках данного эксперимента.

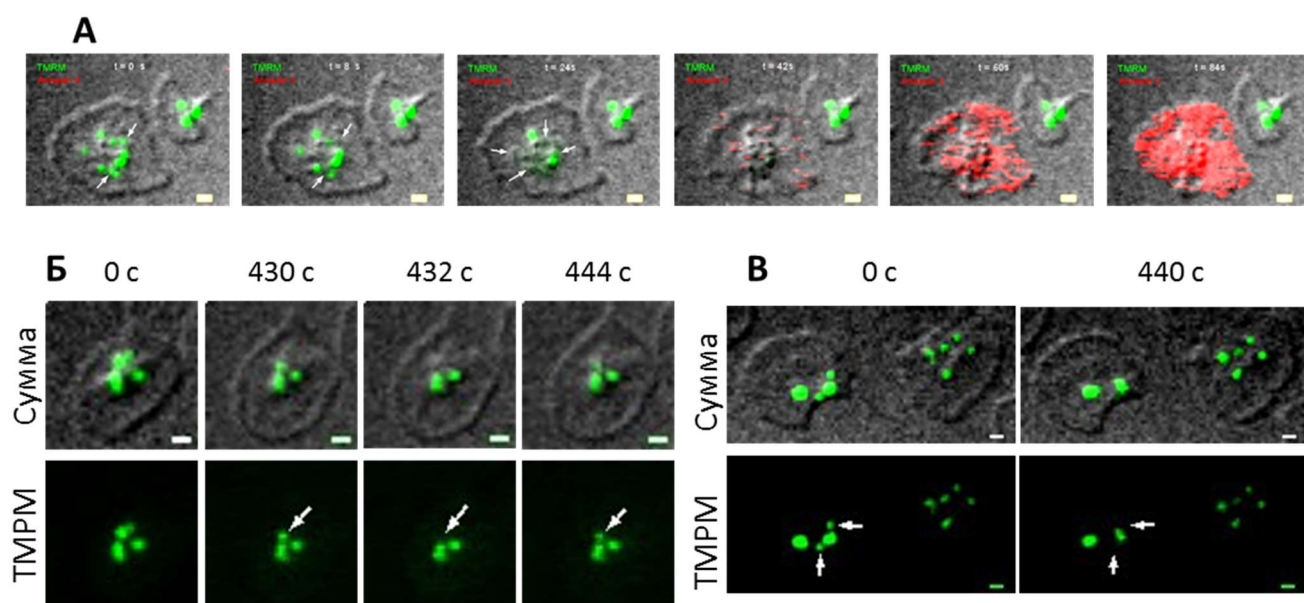


Рисунок 3.14. Деполяризация отдельных митохондрий. А – деполяризация привела к выходу ФС; Б, В – деполяризация не повлияла на субпопуляцию. Зеленый – ТМРМ, красный – Аннексин V; масштабный отрезок 1 мкм. [84]

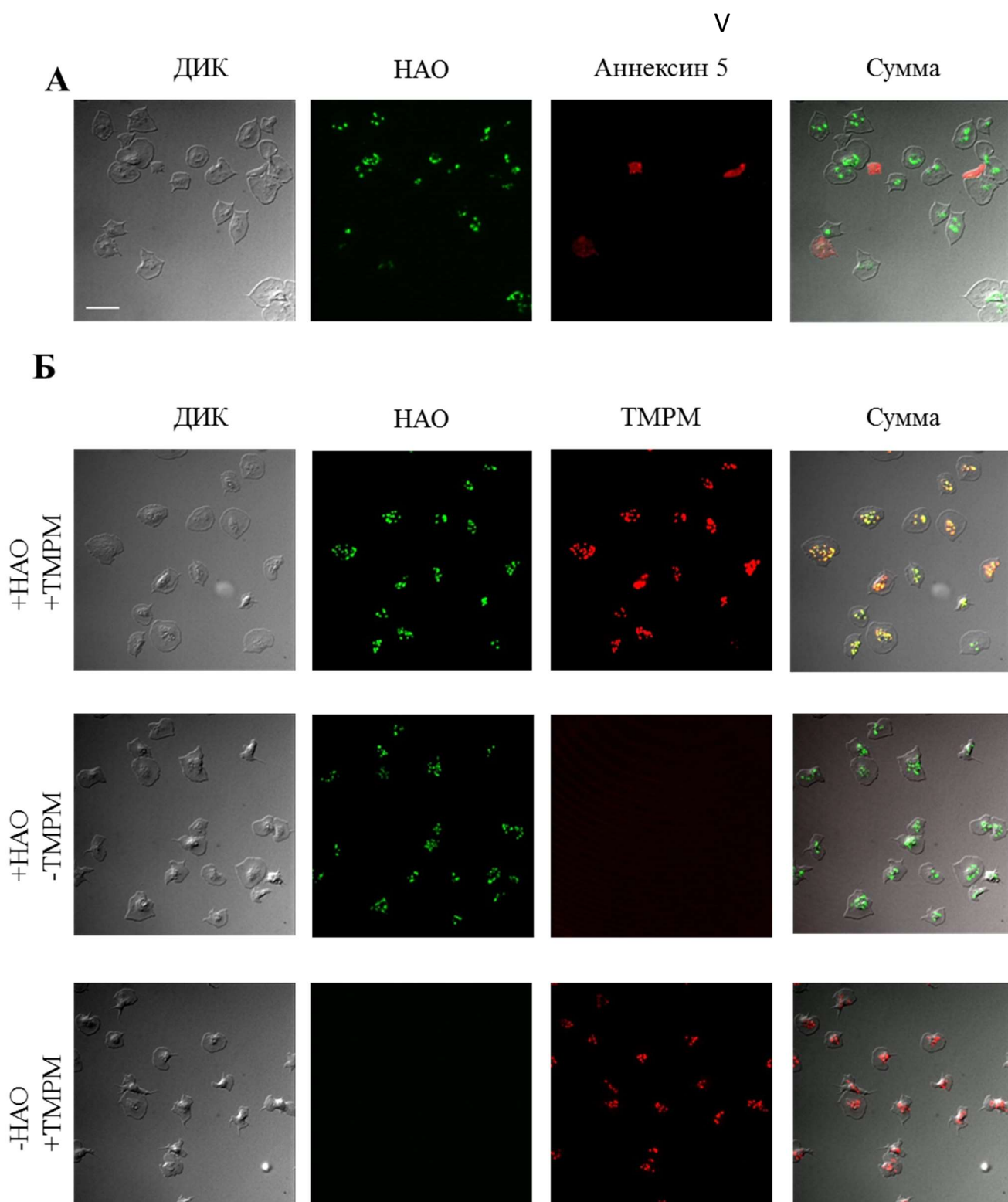


Рисунок 3.15. Состояние митохондрий прокоагулянтных тромбоцитов. Нонил-акридин-оранжевый (НАО) – зелёный, тетраметилродамин (ТМРМ) – красный. Конфокальная микроскопия, масштабный отрезок 10 мкм. (А) Митохондрии прокоагулянтных тромбоцитов не светятся в канале НАО. (Б) Солокализация флуоресценций от НАО и ТМРМ. [84]

Чтобы проверить гипотезу о переполнении митохондрий кальцием с их последующим коллапсом при «перегрузке», были поставлены опыты, в которых образование митохондриальной поры предварительно ингибировали циклоспорином А и произвели активацию клеток, тем самым создав условия увеличения митохондриального кальция без возможности его своевременного сброса за счёт кратковременного приоткрывания поры. Через 10-12 минут после активации к этим тромбоцитам был добавлен протонофор СССР, проникающий в клетки и действующий на митохондрии полной деполяризацией их мембраны (рисунок 3.17). Ингибитор поры CsA сильно снижал количество прокоагулянтных клеток, а в момент добавления протонофора СССР происходил лавинообразный рост числа «ФС+» тромбоцитов. Постановка такого же эксперимента, но без использования CsA к резкому увеличению прокоагулянтных тромбоцитов при добавлении протонофора не приводила. Эти данные подтверждают гипотезу, что именно митохондрии являются регулятором субпопуляций тромбоцитов, и от степени их перегрузки кальцием зависит выбор субпопуляции клетки.

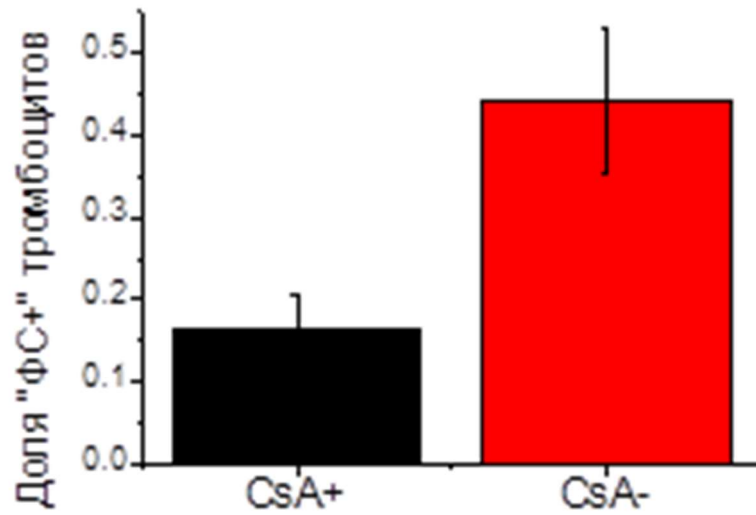


Рисунок 3.16. Ингибитор митохондриальной поры значительно снижает долю «ФС+» тромбоцитов. (n=3, 4500 клеток, p<0.001) [84]

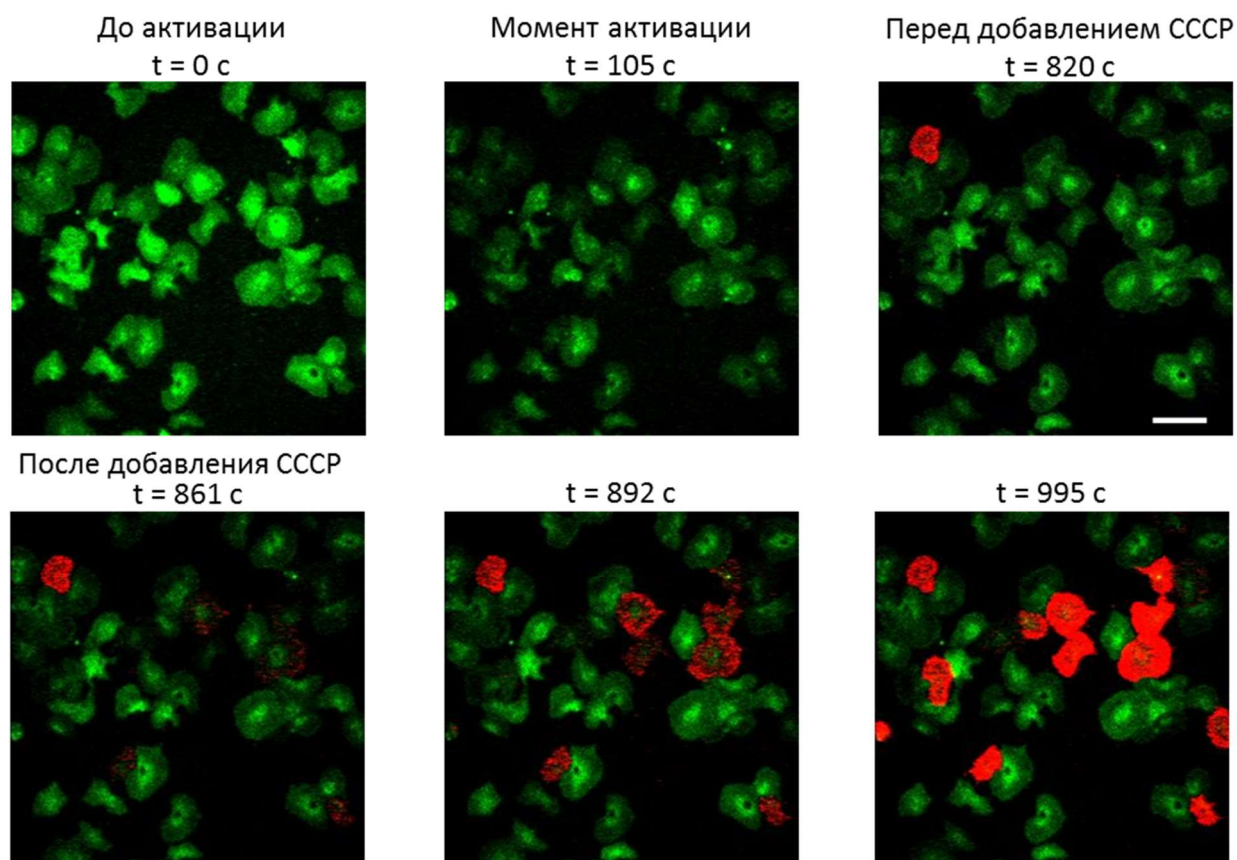


Рисунок 3.17. Роль митохондрий в формировании прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов. Прединкубированные с ингибитором образования митохондриальной поры клетки активировались тромбином. После 820 секунды был добавлен разобщитель митохондрий CCCP, что привело к лавинообразному увеличению числа «ФС+» тромбоцитов. Зеленый – Fura Red, красный – Аннексин V. Масштабный отрезок 10 мкм. [84]

3.3 Цитоплазматический кальций в неактивированном тромбоците влияет на выбор субпопуляции

В качестве возможного предрасполагающего фактора, влияющего на выбор тромбоцитом субпопуляции, был проверен уровень внутриклеточного кальция до активации. Все клетки вместе представляли нормальное распределение по флуоресценции до активации. Для каждой клетки в эксперименте вычислялось среднее значение флуоресценции за период до добавления активатора, а так же каждой клетке присваивалась субпопуляция «ФС+» или «ФС-», в зависимости от того, стала клетка прокоагулянтной или нет к концу эксперимента, через 20 минут после активации. В отдельных экспериментах проявлялось чёткое отличие по изначальному уровню цитоплазматического кальция для тромбоцитов, перешедших в разные субпопуляции (рисунок 3.18 А, Б).

В силу малого количества прокоагулянтных тромбоцитов для построения подробного распределения, тромбоциты из 11 разных экспериментов были нормированы на среднюю флуоресценцию «ФС-» субпопуляции и построено распределения для нескольких сотен клеток. средняя флуоресценция для «ФС-» клеток составила 1, а для «ФС+» 0.86 с высоким показателем достоверности $p < 0.001$ (рисунок 3.18 В). Результат был независим от активатора (рисунок 3.19). Таким образом, клетки с более высоким внутриклеточным кальцием чаще становятся прокоагулянтными.

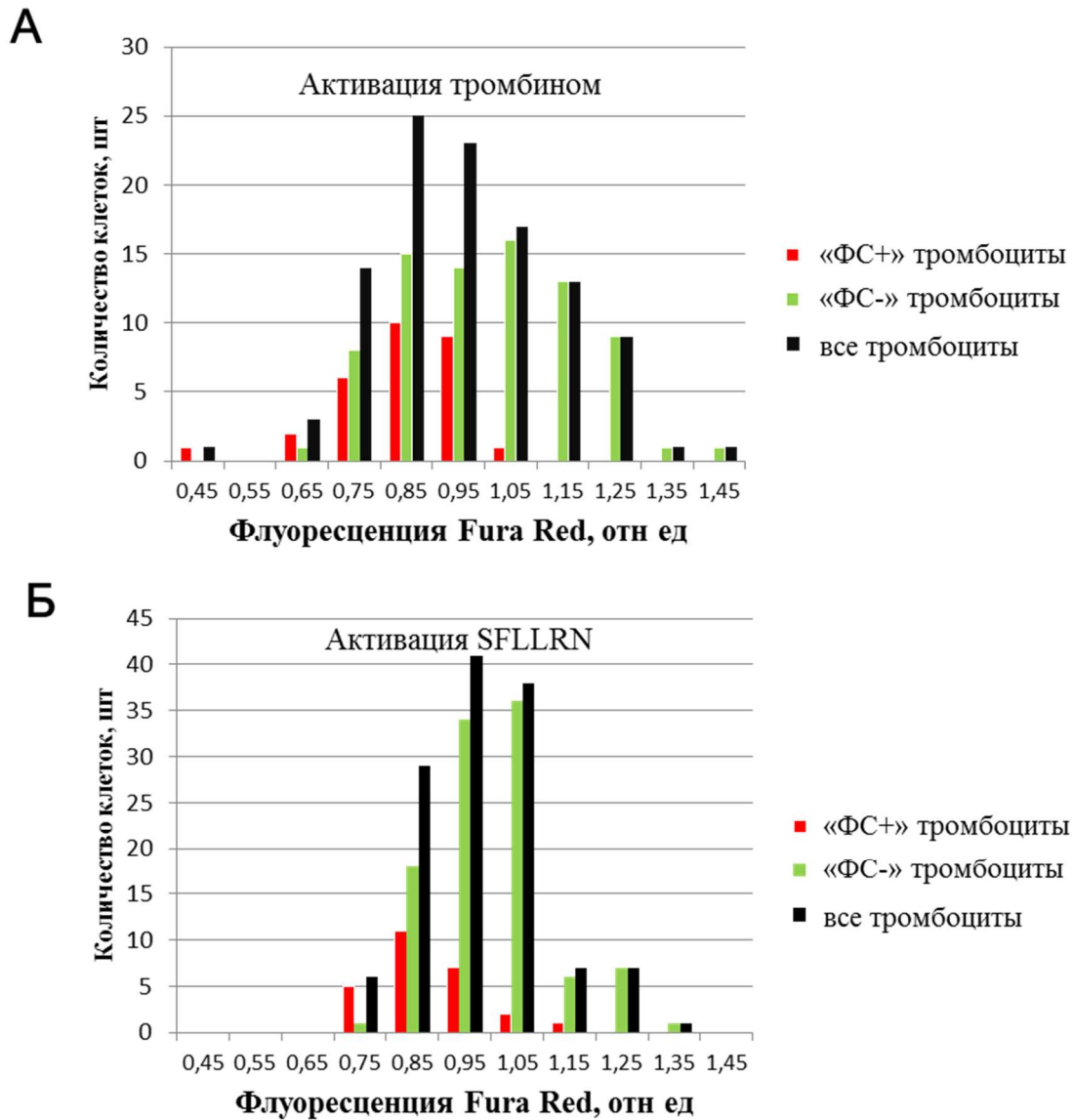


Рисунок 3.19. Клетки с более высоким уровнем цитоплазматического кальция чаще становятся прокоагулянтными, независимо от активатора. (А) распределение для активации тромбином. (Б) распределение для активации SFLLRN. [84]

Для подтверждения выявленной закономерности был проведён ряд контрольных экспериментов. Чтобы исключить эффект преактивации тромбоцитов, проверялась степень выхода П-селектина при посадке на фибриногеновую подложку и во время активации (рисунок 3.20). Этот эксперимент позволил убедиться в том, что среди клеток нет уже активированных тромбоцитов. Так же фибриноген при связывании с интегрином $\alpha_{IIb}\beta_3$ запускает сигнализацию внутри тромбоцита, поэтому была проведена посадка тромбоцитов на подложку из моноклонального антитела монафрама, которое является ингибитором вышеназванного интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$. Съёмка в этом контроле производилась в ратиометрическом режиме (рисунок 3.21), что позволило не производить нормировку для нескольких разных экспериментов (n=2).

Все эти данные вместе подтверждают корректность полученной закономерности – тромбоциты с более высокой концентрацией цитоплазматического кальция в покое имеют большую вероятность стать прокоагулянтными в ответ на активацию.

Было обнаружено, что число митохондрий в тромбоците влияет на шансы перехода в прокоагулянтное состояние. В тромбоцитах, активированных PAR-1 АП, были посчитаны митохондрии в экспериментах с динамикой потенциала митохондриальной мембраны и определена финальная субпопуляция по итогу эксперимента. Таким образом каждая клетка имела два параметра: число митохондрий и конечная субпопуляция. Полученные данные использовались для построения распределения, иллюстрирующего влияние количества митохондрий на субпопуляцию тромбоцита (рисунок 3.22). Среднее число митохондрий для прокоагулянтных тромбоцитов составило $\sim 5,2$, для непрокоагулянтных $\sim 6,5$, для всех вместе 6,3. Так же была построена зависимость доли прокоагулянтных тромбоцитов от числа митохондрий (рисунка 3.23). Тромбоциты с числом митохондрий ниже 5 становились прокоагулянтным в $\sim 30\%$ случаях, а тромбоциты с 5 и более – 10-15%.

Таким образом можно заключить, что количество митохондрий в тромбоците влияет на результат активации, чем меньше митохондрий, тем выше шансы у тромбоцита стать прокоагулянтным.

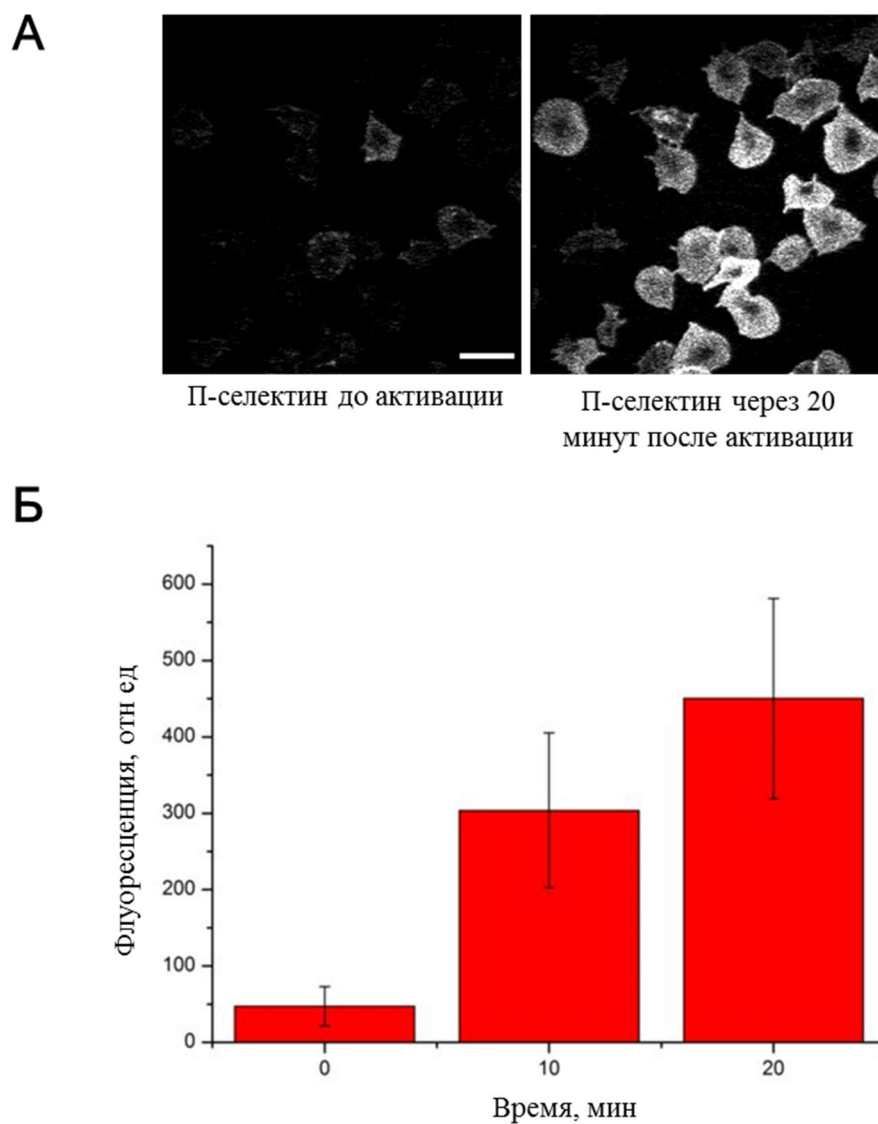


Рисунок 3.20. Экспозиция П-селектина в процессе эксперимента. (А) Конфокальная микроскопия до и после эксперимента, масштабный отрезок 10 мкм. (Б) Усредненной значение удельной флуоресценции для всех клеток эксперимента в моменты времени 0, 10 и 20 минут. [84]

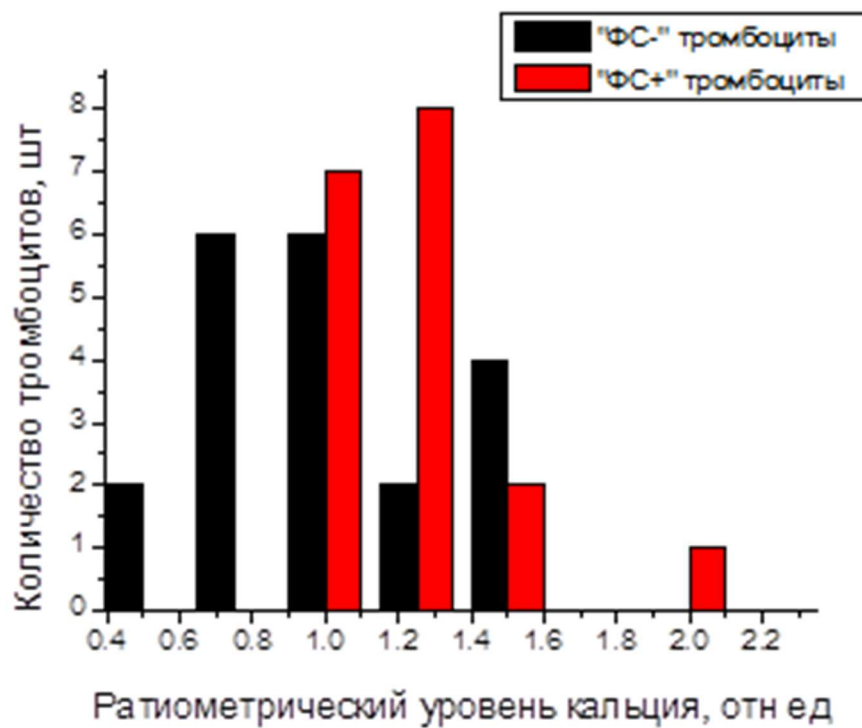


Рисунок 3.21. Ратиометрическое измерение цитоплазматического кальция до активации. Красный – клетки, ставшие «ФС+» в процессе эксперимента; чёрный – «ФС-» клетки. [84]

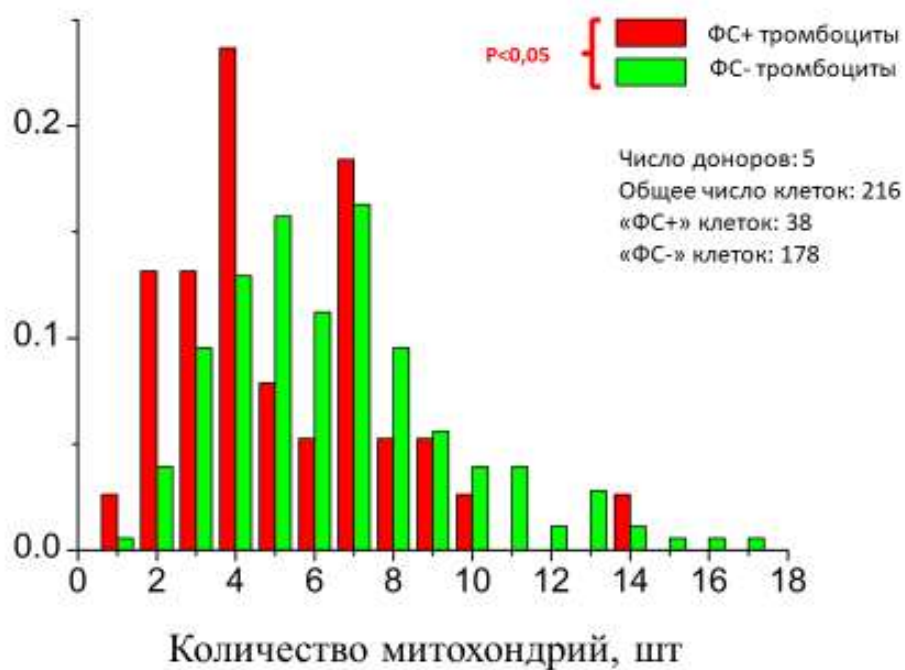


Рисунок 3.22. Распределение тромбоцитов FC+ и FC- субпопуляций при активации через PAR-1 по количеству митохондрий.

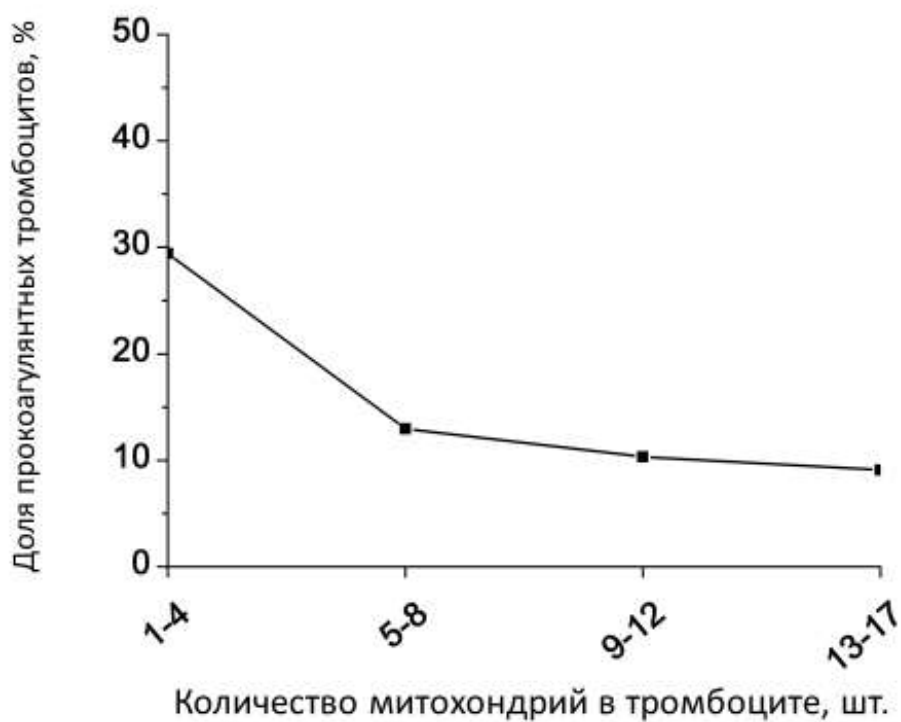


Рисунок 3.23. Зависимость доли прокоагулянтных тромбоцитов от числа митохондрий в тромбоцитах. Тромбоциты с числом митохондрий ниже среднего имели большие шансы перейти в прокоагулянтное состояние в ответ на активацию.

3.4 Локализация альфа-гранулярных белков и трансглутаминаз на поверхности прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов

Следующей решалась задача об исследовании распределения альфа-гранулярных белков по поверхности прокоагулянтных тромбоцитов. Очищенные на гель-хроматографической колонке от плазматических белков тромбоциты крови человека активировались при помощи тромбина в течение 15 минут и затем окрашивались антителами к фибрин(оген)у и Аннексином V для определения прокоагулянтных тромбоцитов. Затем на микроскопе производился поиск клеток, окрашенных обоими флуорофорами. Было установлено, что фибрин(оген) распределён не по всей поверхности прокоагулянтных тромбоцитов, а локализован в небольшой области на клетке (рисунок 3.24).

На рисунке 3.24 показана трёхмерная реконструкция типичной прокоагулянтной клетки с фибрин(огеновой) областью. Данную область назвали «шапкой» укутанного тромбоцита, что впоследствии было закреплено в нашей публикации [86] и стало общепринятым. Было замечено, что в области «шапки» интенсивность флуоресценции меченного Аннексина V заметно выше, чем в остальных частях клетки, что свидетельствует о локально более высокой концентрации отрицательно заряженных фосфолипидов в этой области (рисунок 3.24). Эксперименты показали, что фибрин(оген)овая шапка образуется только на прокоагулянтных тромбоцитах и ее нет на неактивированных и активированных тромбоцитах непрокоагулянтной субпопуляции. Различимую шапку имели примерно 85% прокоагулянтных тромбоцитов, и не встречалось тромбоцитов более чем с одной подобной областью, богатой отрицательно заряженными фосфолипидами. В проходящем свете шапка представляла собой неоднородную структуру на поверхности круглой прокоагулянтной клетки.

На непрокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов фибриногена было на порядок меньше, и он был распределён маленькими точками по поверхности клетки, что соответствует наблюдениям других авторов.

Изучение локализации тромбоспондина на тромбоцитах показало, что он так же локализован в небольшой области на прокоагулянтных тромбоцитах и его положение полностью совпадает с локализацией фибриногена (рисунок 3.25, эксп 1). Тромбоспондин имеет участки взаимодействия с фибриногеном, поэтому полученные результаты предполагают их прямое взаимодействие в шапке прокоагулянтных тромбоцитов.

Известно, что в тромбоцитах имеются 2 вида трансглутаминаз: фактор 13 и тканевая трансглутаминаза. Исследование их локализации показало, что обе трансглутаминазы сосредоточены в той же области, что и фибриногеновая шапка тромбоцита (рисунок 3.25, эксп 2, 3).

В этой же зоне наблюдалось повышенное количество П-селектина, который содержится в альфа-гранулах тромбоцитов и проявляется на тромбоците при дегрануляции содержимого гранул под действием активации клеток (рисунок 3.26).

Отдельный интерес для изучения составляли агрегаты активированных тромбоцитов с участием прокоагулянтной субпопуляции. В проведенных экспериментах было показано, что в агрегатах, состоящих только из прокоагулянтных клеток, а так же из обеих субпопуляций, прокоагулянтные клетки были соединены с любыми другими исключительно через альфа-гранулярную шапку, как показано на трёхмерной реконструкции (рисунок 3.27).

Опыт поставлен с использованием красок на фосфатидилсерин, фибрин(оген) и внутриклеточный Ca^{2+} . Данные указывают на локализацию фибрин(оген)а в месте соединения клеток. Это подтверждает выводы, предсказывающие возможность участия укутанных тромбоцитов в формировании тромба [13].

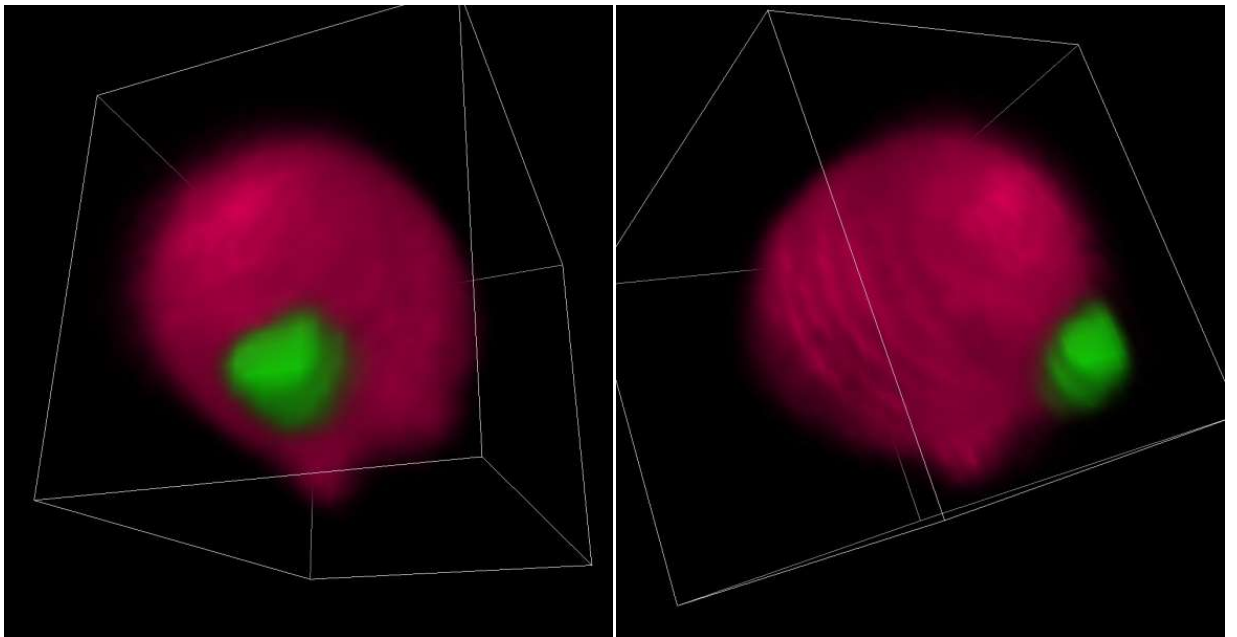
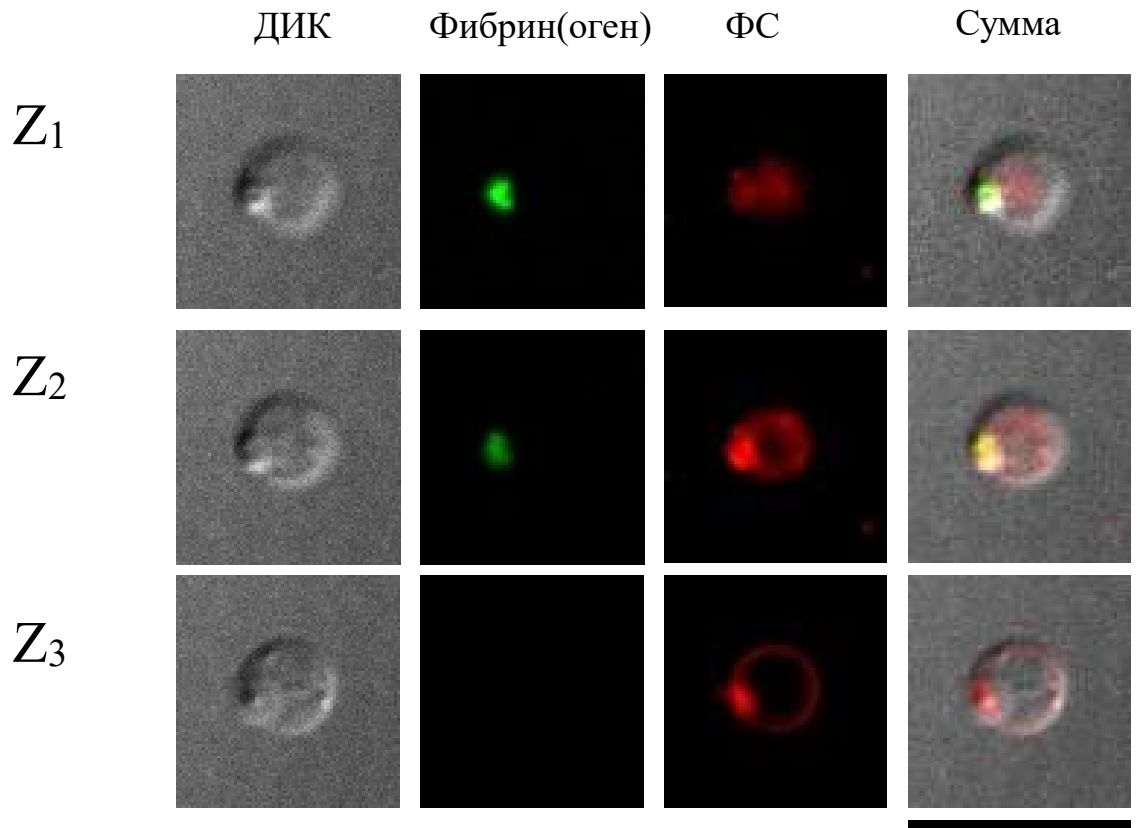


Рисунок 3.24. Локализация фибрина на поверхности укутанного тромбоцита. Конфокальная микроскопия. Z_1 , Z_2 и Z_3 – оптические срезы клетки. Расстояние между срезами Z_1 и Z_2 равно 0,6 мкм, между Z_2 и Z_3 – 1,2 мкм. ФС – фосфатидилсерин, ДИК – дифференциально-интерференционный контраст. Масштабный отрезок 10 мкм. 3d реконструкция этой клетки: фосфатидилсерин – красный, фибрин(оген) – зеленый. [86]

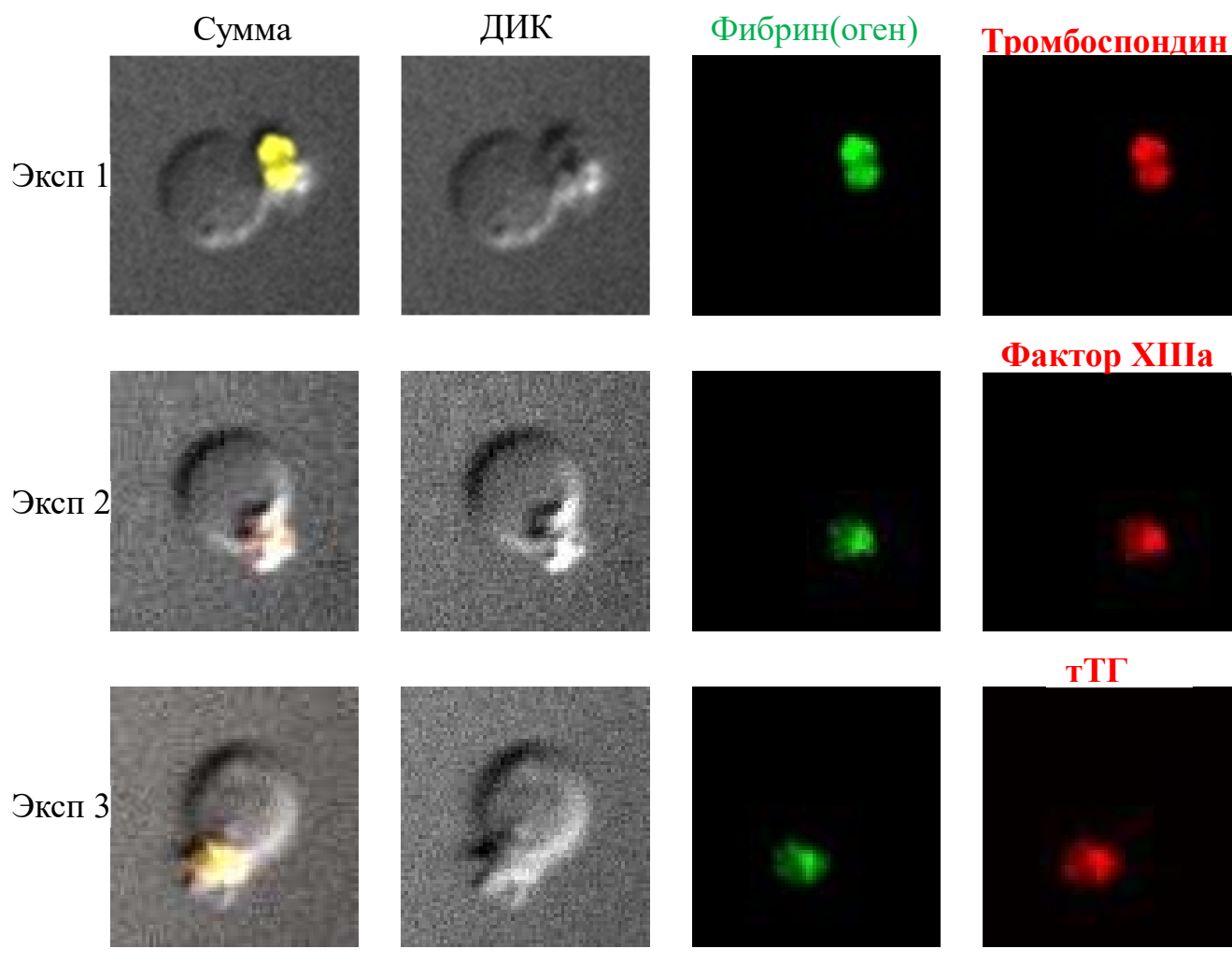


Рисунок 3.25. Эксп 1: локализация фибрин(оген)а с тромбоспондином; Эксп 2: локализация фибрин(оген)а с активной формой фактора XIIIa; Эксп 3: локализация фибрин(оген)а с тканевой трансглутаминазой (tTG). Клетки фиксированы 1% параформальдегидом. Конфокальная микроскопия.

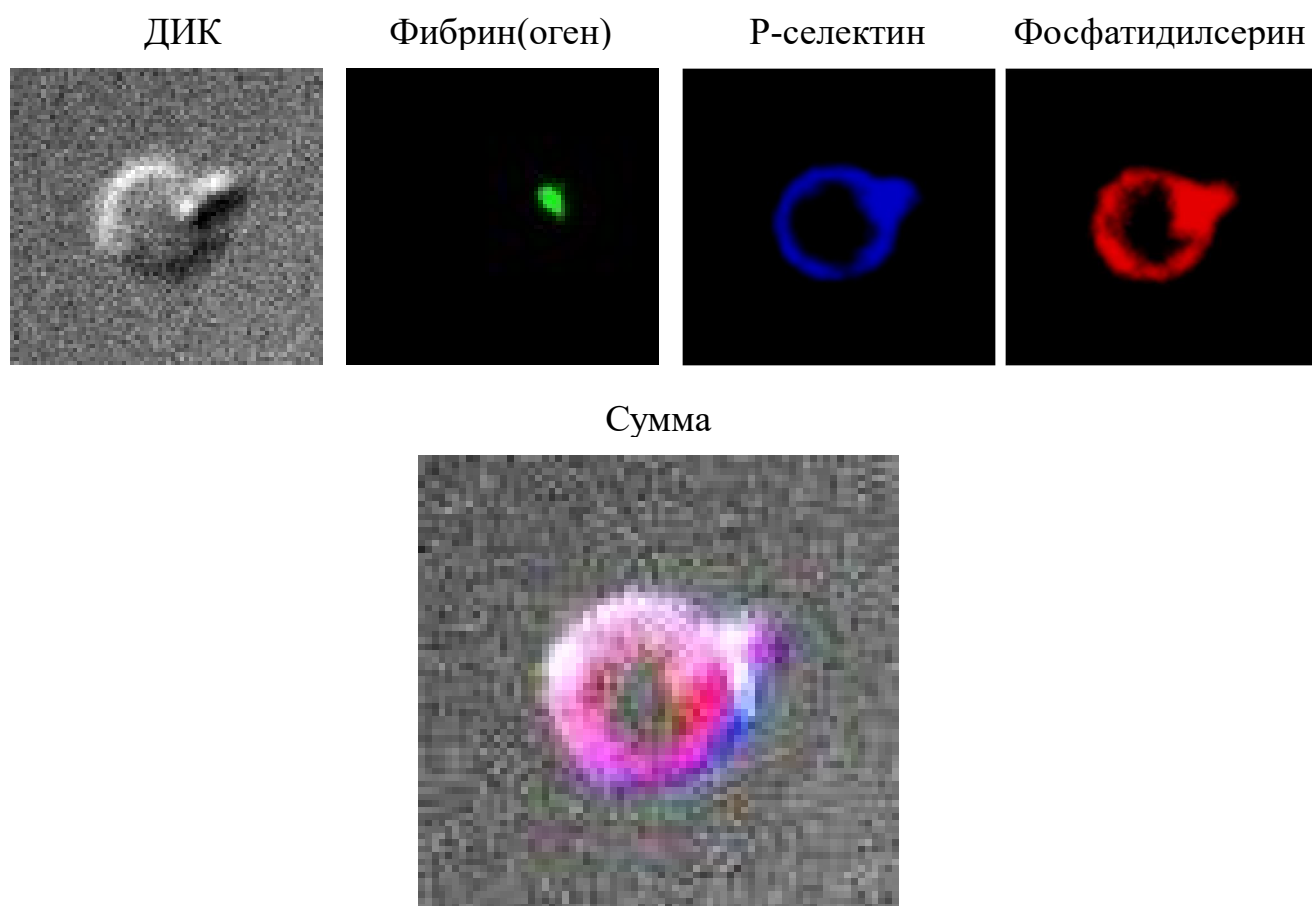


Рисунок 3.26. Распределение Р-селектина и фосфатидилсерина в фибрин(оген)овой шапке укутанного тромбоцита. Диаметр клетки 3.5 мкм. Активация ионофором. Конфокальная микроскопия.

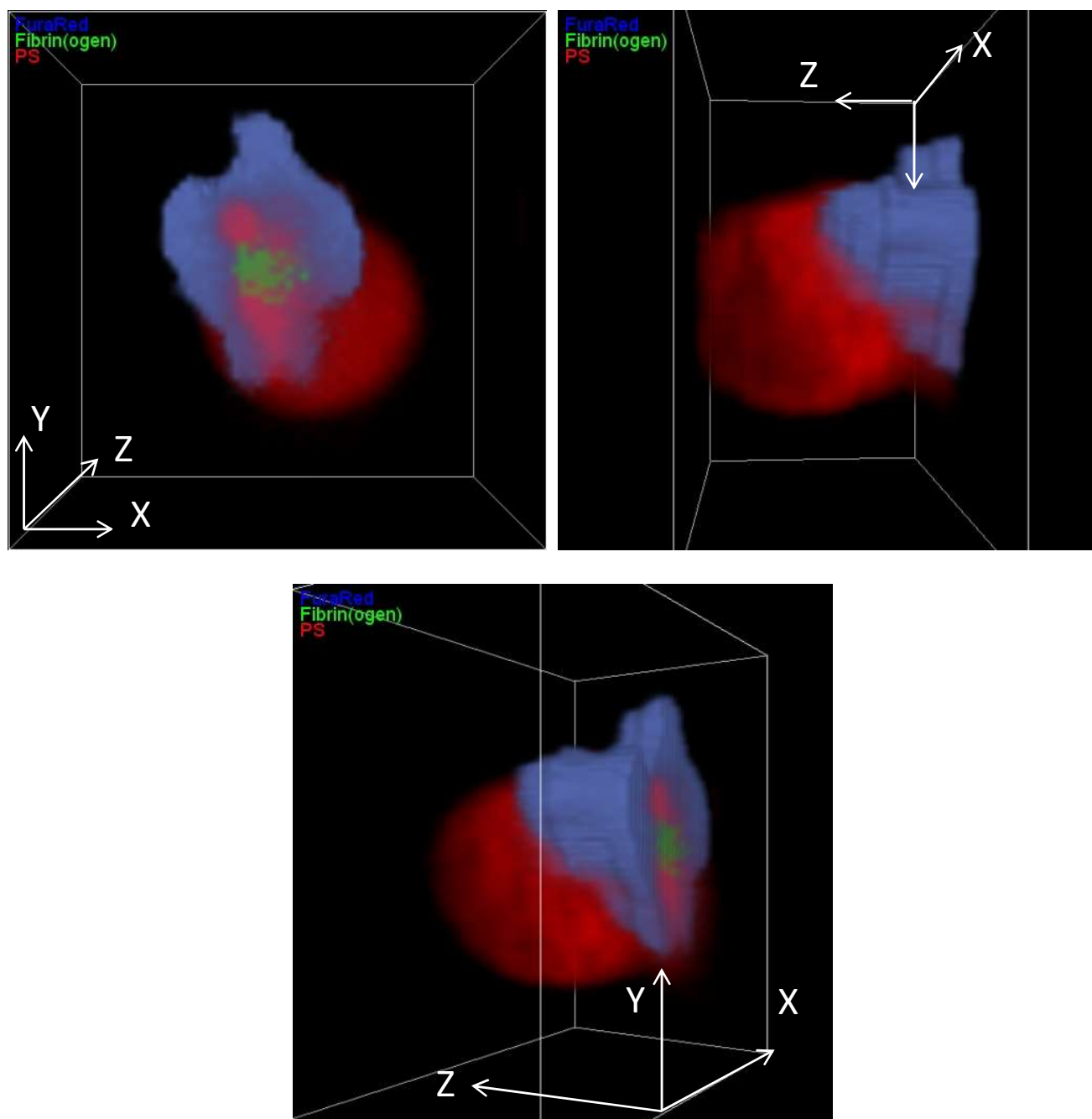


Рисунок 3.27. Трехмерная реконструкция агрегата, состоящего из клеток разных субпопуляций. Красный – фосфатидилсерин, зеленый – фибрин(оген), синий – краска Fura Red на Ca^{2+} . Прокоагулянтный тромбоцит окрашен красным и прикреплен к непрокоагулянтному – синему – через шапку фибрин(оген)а – зелёная. Длина и ширина плоскости XY составляют по 9.1 мкм, полная высота 5.4 мкм по оси Z. [86]

3.5 Ультраструктура прокоагулянтных тромбоцитов

Прокоагулянтные тромбоциты под конфокальным микроскопом представляли собой шарообразные клетки с хорошо различимым контуром концентрической мембраны по периметру с небольшой неоднородностью на поверхности – шапкой, в которой были сосредоточены некоторые белки свёртывания: фибриноген, тромбоспондин, фактор 13а, тканевая трансглутаминаза. В связи с низкой разрешающей способностью световой микроскопии, для изучения структуры «шапки» были применены методы просвечивающей электронной микроскопии. Сильно активированные (100 нМ тромбином и 20 мкг/мл CRP) тромбоциты были фиксированы глутаровым альдегидом, постфиксированы тетраоксидом осмия, дегидратированы и заключены в смолу Epon 812, после чего следовала нарезка полимеризованного блока на ультрамикротоме и исследование образца на просвечивающем электронном микроскопе.

За счёт относительно маленькой толщины срезов, составляющей порядка 100 нм, и небольшого размера «шапок» тромбоцитов, у большинства попавших в поле зрения прокоагулянтных тромбоцитов шапка находилась вне среза. Прокоагулянтные тромбоциты представляли собой шарообразные клетки с редко встречающимися органеллами и содержимым более низкой плотности, относительно непрокоагулянтных тромбоцитов. Неактивированные клетки отличались от активированных (рисунок 3.28).

Плотность шапки была выше, чем содержимое шарообразной части клетки, но менее плотной (рисунок 3.29), чем непрокоагулянтные тромбоциты (рисунок 3.30). Так же шапка имела более сложное строение, нежели круглая часть клетки - в неоднородности не различим внешний контур мембран, а структура имеет губчатое строение со складками мембран и везикул, а так же запутавшимися в этой сети некоторыми органеллами, такими как митохондрии.

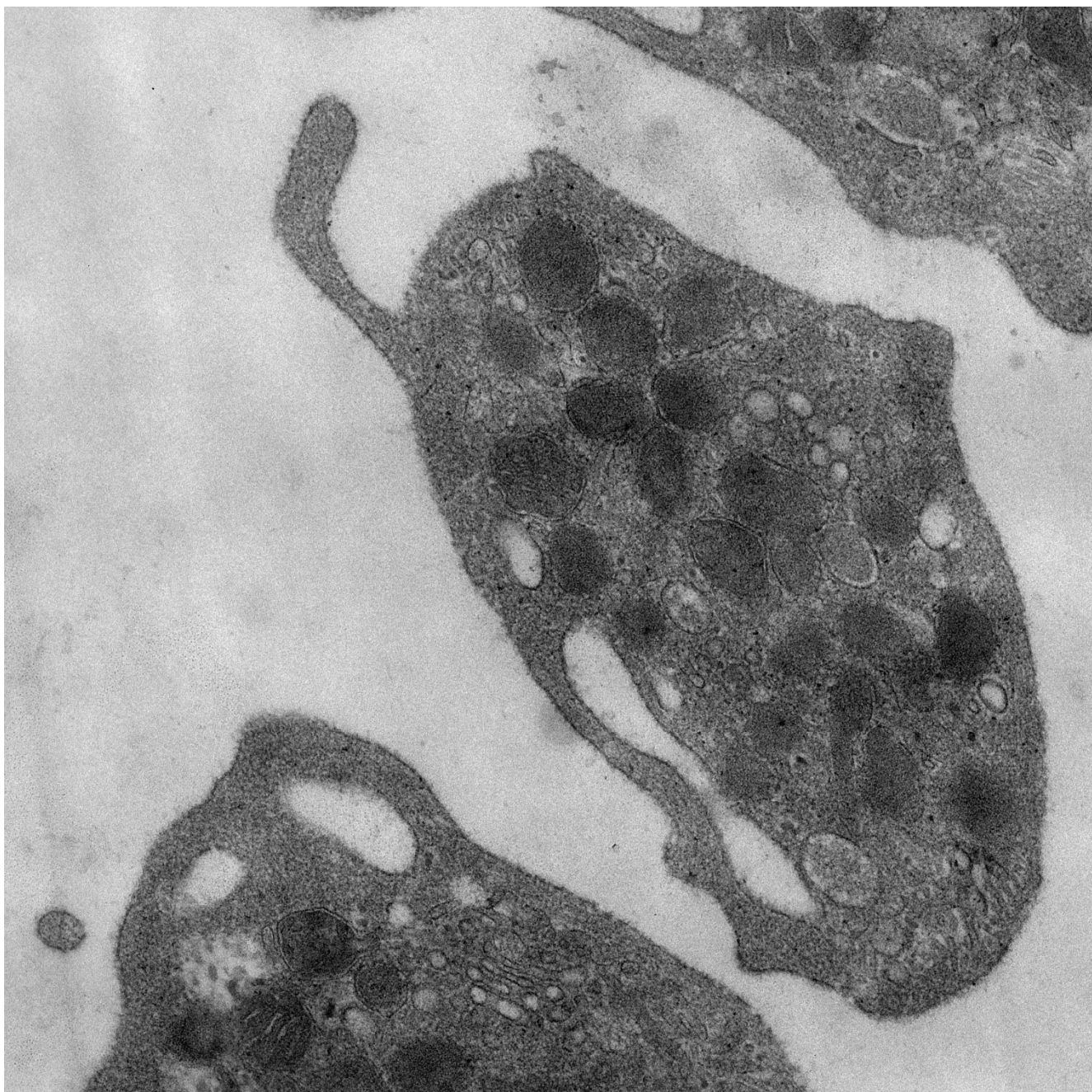


Рисунок 3.28. Неактивированный тромбоцит. Просвечивающая электронная микроскопия. Ширина кадра 4.87 мкм.

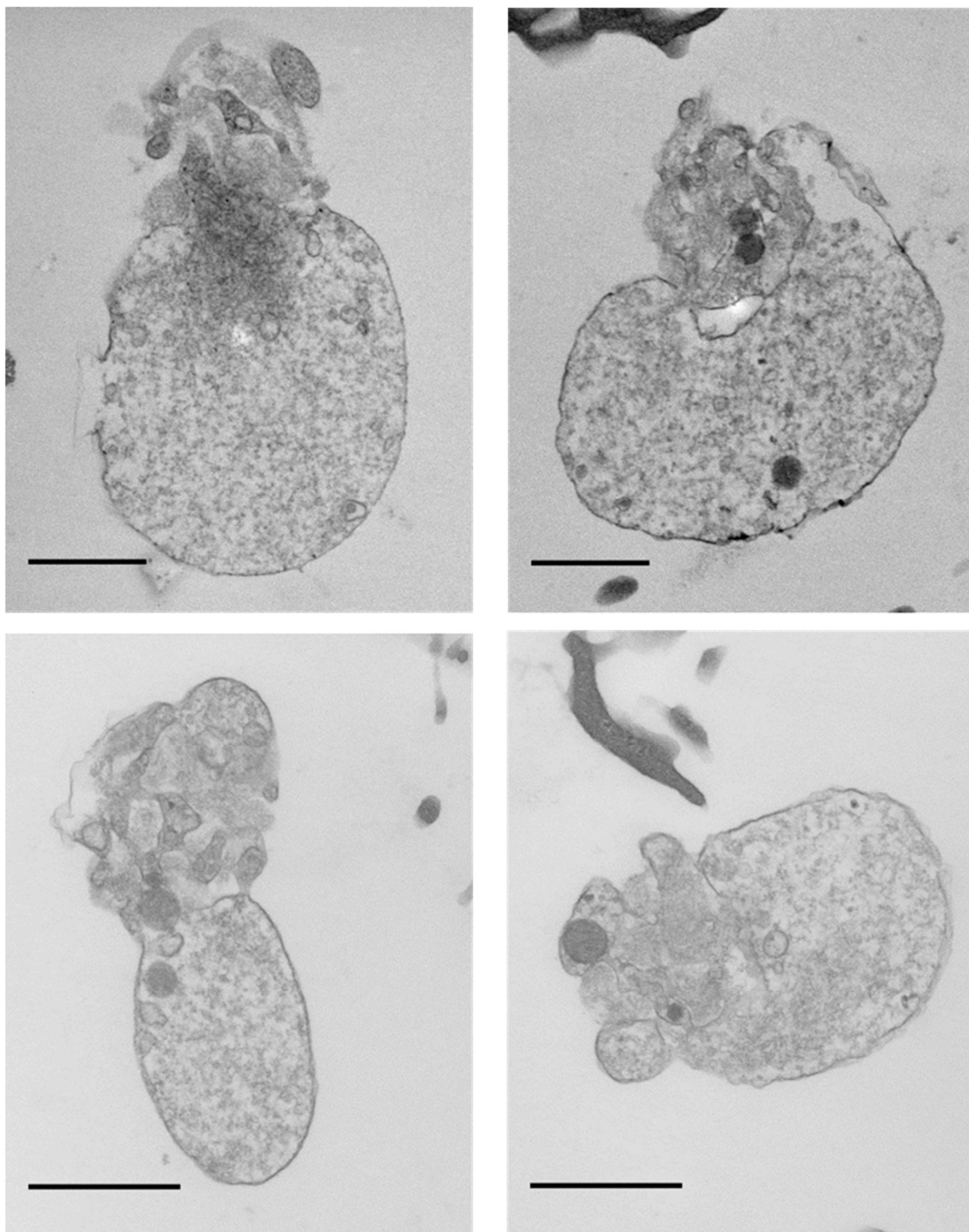


Рисунок 3.29. Прокоагулянтные тромбоциты с шапкой. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Масштабный отрезок 1 мкм. Просвечивающая электронная микроскопия. [81]

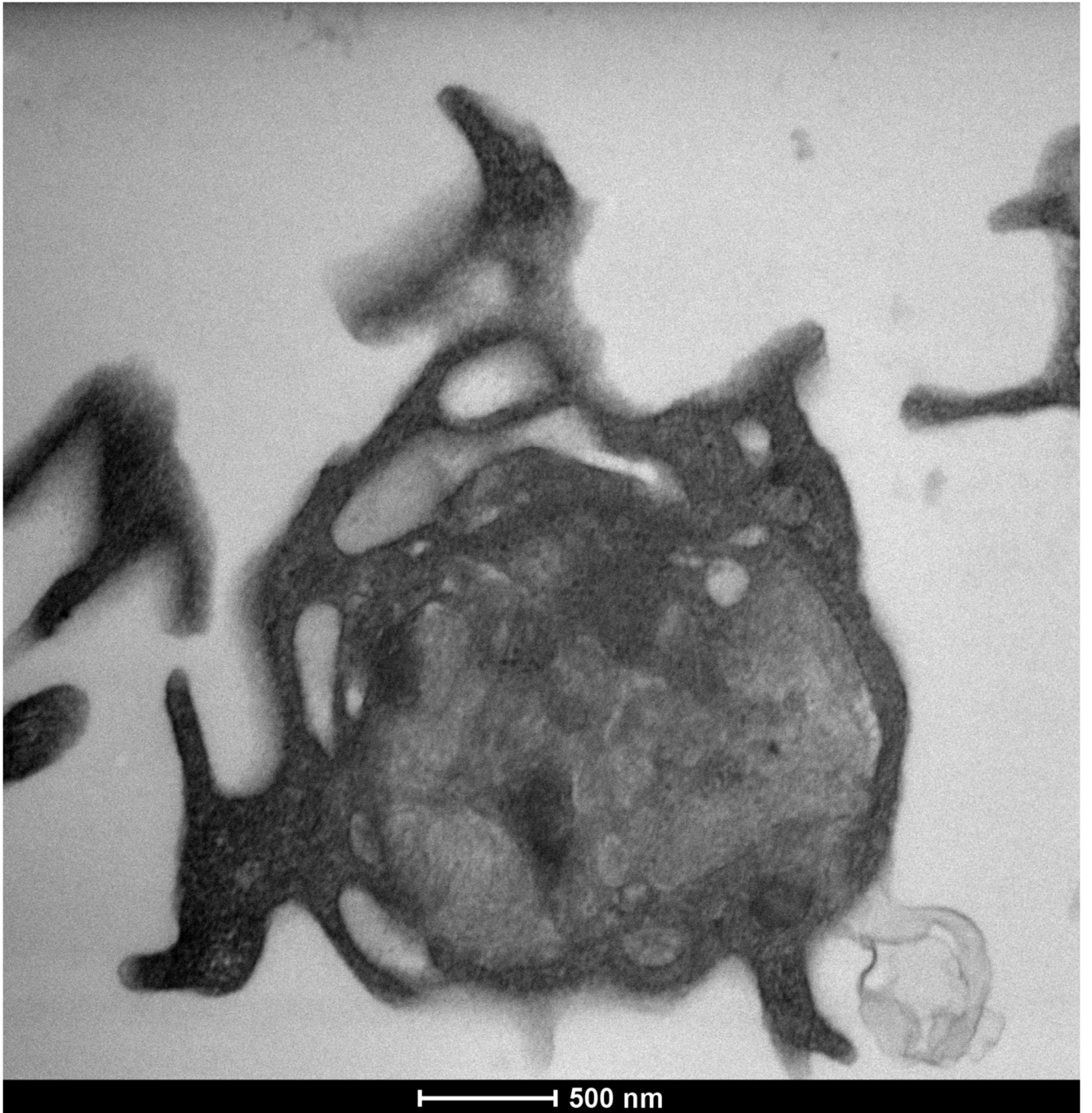


Рисунок 2.30. Непрокоагулянтный тромбоцит. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Просвечивающая электронная микроскопия.

В соответствии с данными конфокальной микроскопии, агрегаты из тромбоцитов обеих субпопуляций были соединены исключительно через шапку (рисунок 3.31, 3.32, 3.33).

Вероятно, каркасом шапки является остов открытой канальцевой системы тромбоцита. Такое строение, очевидно, способно связать большое количество факторов свёртывания и способствовать прохождению мембрано-зависимых реакций, а так же оказать защитное действие против вымывания продуктов этих реакций потоком крови, в котором происходит формирование тромба.

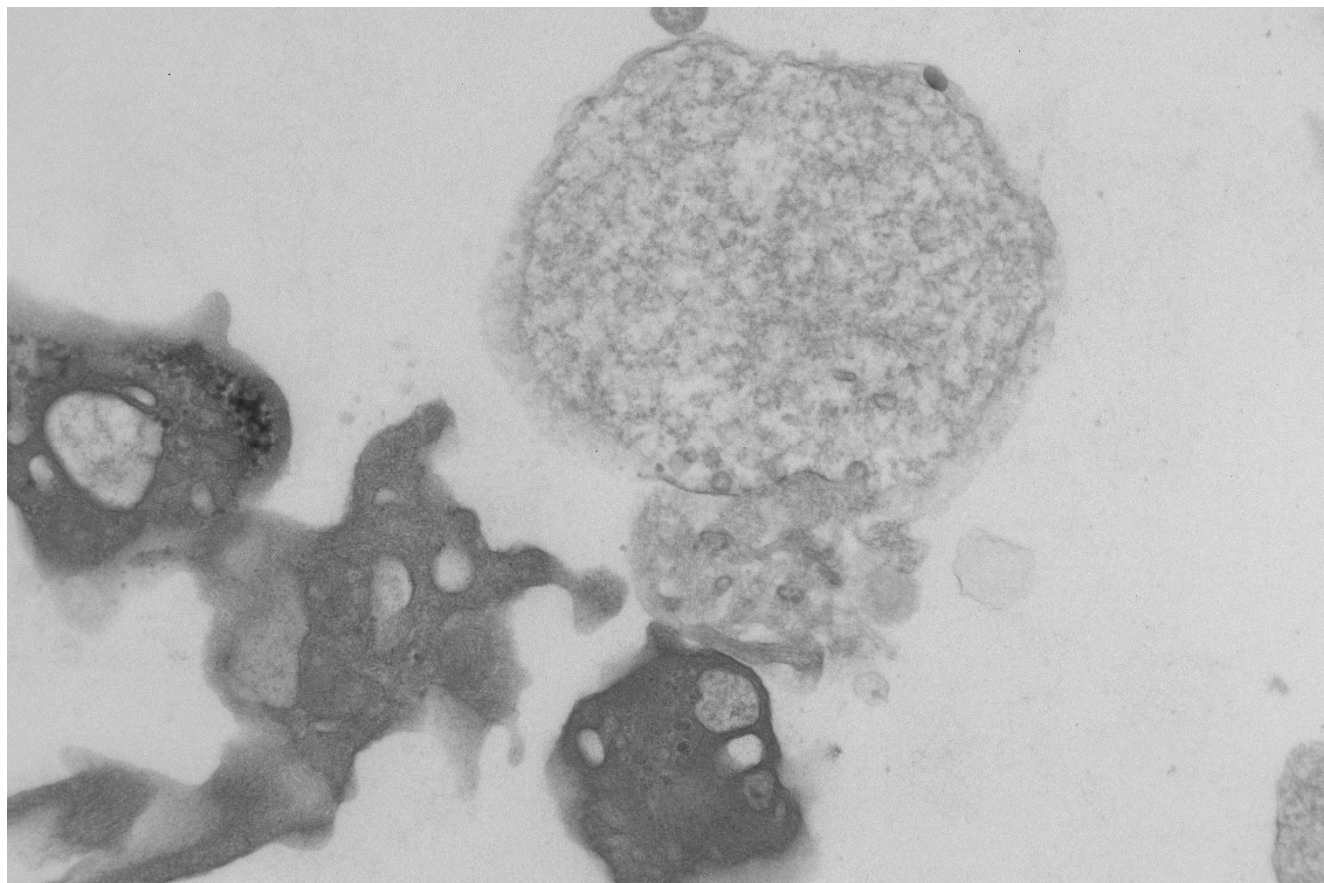


Рисунок 3.31. Агрегат из тромбоцитов «ФС+» и «ФС-» субпопуляций. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Просвечивающая электронная микроскопия. Ширина кадра 8.35 мкм.

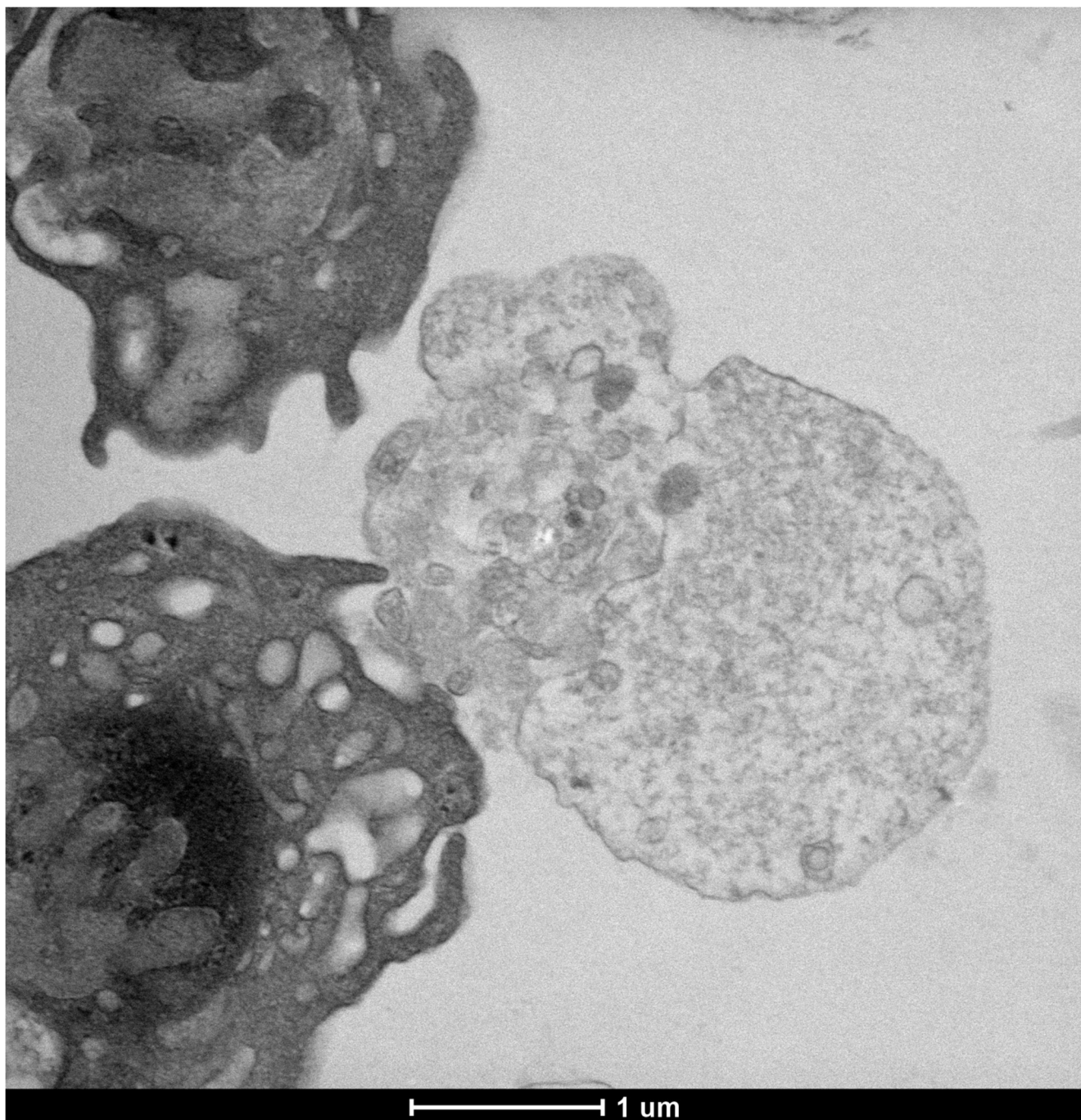


Рисунок 3.32. Агрегат из тромбоцитов «ФС+» и «ФС-» субпопуляций. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Просвечивающая электронная микроскопия.

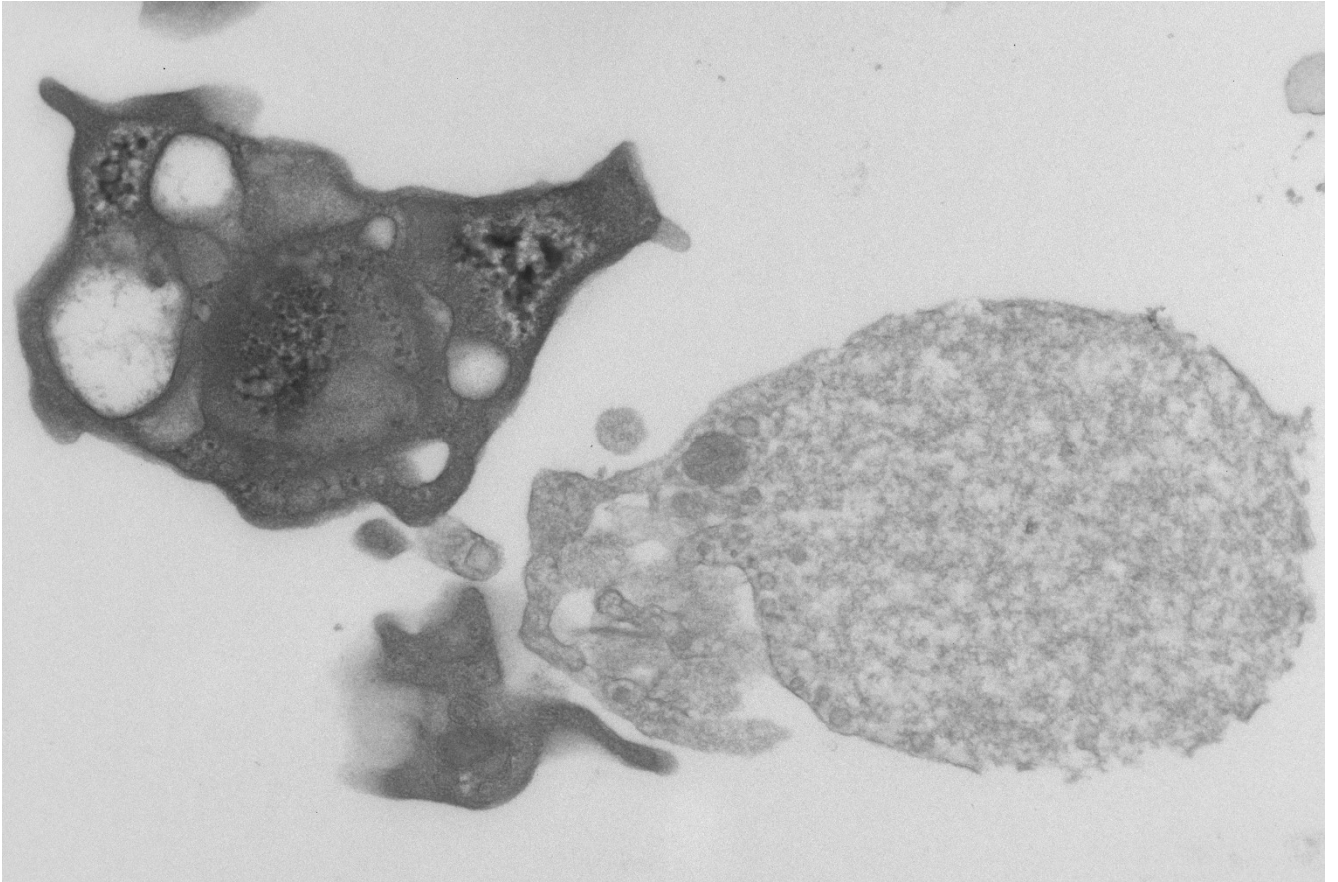


Рисунок 3.33. Агрегат из тромбоцитов «ФС+» и «ФС-» субпопуляций. Активация 100 нМ тромбина и 20 мкг/мл CRP. Просвечивающая электронная микроскопия. Ширина кадра 5.31 мкм.

Обсуждение

Главными результатами выполненной работы является характеристика сигнальных процессов, происходящая в одиночных клетках разных субпопуляций при их физиологической активации тромбином или SFLLRN. Несмотря на то, что различия этих субпопуляций, такие как разный уровень кальция после активации [71, 77], были известны, эти результаты были получены при помощи проточной цитометрии и не представляли информации о временной динамике изменения цитоплазматического кальция в отдельной клетке. Некоторые из существующих микроскопических исследований [44, 78] предполагали, что в ФС- клетках должны быть осцилляции, но это не было показано, и не было представлено данных о ФС+ субпопуляции. Компьютерное моделирование предсказывало, что ФС+ тромбоциты должны появляться после серии кальциевых осцилляций [87, 88], что было показано экспериментально только в данном исследовании.

Существует гипотеза, что за переход тромбоцита в ФС+ состояние, может быть ответственно открытие митохондриальной поры [79, 80] из-за перегрузки митохондрии кальцием через унипортер – ее кальциевый канал [44]. Результаты, полученные нами, подтверждают этот механизм образования прокоагулянтных клеток. В соответствии с теоретическими предсказаниями, открытие митохондриальной поры во многих случаях является обратимым [88]. Иногда пора может открываться в одной митохондрии, в то время как другие сохраняют стабильность. Но в некоторых случаях, другие митохондрии испытывают коллапс относительно скоро после потери потенциала первой. Интересным фактом является то, что в соответствии с теоретическими предсказаниями, уровень кальция в митохондриях тромбоцитов, которые стали прокоагулянтными различается не сильно по сравнению с митохондриями непрокоагулянтных клеток. Это подтверждает предположение, что нелинейность открытия поры критична для формирования ФС+ субпопуляции [87, 88].

Довольно долго оставалось загадкой, есть ли какие-то предрасполагающие факторы, оказывающие влияние на выбор тромбоцитом субпопуляции. В некоторых работах предполагали, что на это может влиять возраст тромбоцита [67] или плотность рецепторов PAR1 на поверхности клеток [89], но там не было анализа для прокоагулянтных клеток. В данной работе показано, что более высокий уровень кальция в тромбоцитах до активации и меньшее количество митохондрий увеличивают вероятность перехода тромбоцита в прокоагулянтное состояние.

Существуют противоречивые работы о роли цитоплазматического кальция и митохондриальной деполяризации в формировании субпопуляций тромбоцитов [43, 44, 79]. В данной работе была установлена причинная и временная последовательность:

- 1) появление осцилляций концентрации кальция в цитоплазме в ответ на активацию;

- 2) повышение этими колебаниями митохондриального уровня кальция и обратимой деполяризацией митохондрий, с открытием митохондриальной поры;

- 3) в некоторых клетках открытие поры происходит необратимо, тем самым запускаются некротические процессы [32];

- 3.1) в таких клетках уровень цитоплазматического кальция повышается;

- 3.1.1) наконец, в клетках с высоким уровнем кальция происходит выход на поверхность фосфатидилсерина – тромбоцит достигает прокоагулянтного состояния.

Последние три процесса занимают до десятков секунд и идут с небольшой задержкой относительно друг друга. Коллапс митохондрий возникает не во всех клетках одновременно, а распространяется по клетке с задержкой, и только после смерти последней митохондрии начинает выходить фосфатидилсерин. В целом, работа подтверждает теоретическое исследование, где в формирование

субпопуляций вовлечены и цитоплазматический кальций, и митохондрии [88]: колебания кальция приводят к увеличению кальция в митохондриях, они в свою очередь, перегружаются, и за счёт этого открывается митохондриальная пора. В соответствии с нашими результатами митохондриям принадлежит роль триггера процесса в целом, а цитоплазматическому кальцию роль благоприятного фона: чем выше концентрация, тем больше вероятность перехода в прокоагулянтное состояние.

Исследования, посвящённые изучению прокоагулянтного покрытия ФС+ тромбоцитов привели к неожиданным результатам: фибрин(оген) на прокоагулянтных тромбоцитах оказался сосредоточен в небольшой области на клетке, а не распределён равномерно по поверхности, как предполагалось. Эта область богата фосфатидилсерином и П-селектином что говорит о наличии в ней мембран. Фибрин(оген) солокализован с тромбоспондином и трансглутаминазами: тканевой и фактором XIIIa. Предыдущие исследования по изучению этих белков выполнялись на проточном цитометре [68]. Хотя и были некоторые предпосылки в микроскопических данных о неравномерности распределения Аннексина V на некоторых тромбоцитах, этот феномен не был изучен [90, 91]. Наши результаты, подтверждают тот факт, что прокоагулянтные тромбоциты могут участвовать в агрегатах, причём именно шапка из фибрин(огена) является местом соединения клеток разных субпопуляций. Это подтверждается и конфокальной, и электронной микроскопией. Роль прокоагулянтных клеток в физиологических процессах до сих пор точно не определена, но с помощью полученных данных можно предложить гипотезу о том, что ФС+ клетки могут быть фактором, останавливающим рост тромба, прикрепившись к нему шапкой, а наружу выставив поверхность, не способную к агрегации.

Выводы

1. Разработана методика, позволяющая проводить одновременное измерение концентрации внутриклеточного кальция, потенциала митохондриальной мембраны, митохондриального кальция и выхода фосфатидилсерина в активированных тромбоцитах.

2. Выявлена последовательность внутриклеточных процессов, ведущих тромбоцит к смерти: активация тромбоцита запускает в нем кальциевые осцилляции, способствующие накоплению кальция в митохондриях, затем происходит коллапс митохондрий, повышается уровень внутриклеточного кальция, и следом происходит экспонирование фосфатидилсерина. Стабильно высокий уровень цитоплазматического кальция не является первичной причиной формирования прокоагулянтной субпопуляции тромбоцитов.

3. Впервые обнаружены индивидуальные характеристики тромбоцитов, влияющие на вероятность перехода в прокоагулянтное состояние: количество митохондрий в тромбоците и концентрация цитоплазматического кальция. Тромбоциты с меньшим числом митохондрий и/или большей концентрацией цитоплазматического кальция в покое имеют большую вероятность стать прокоагулянтными в ответ на активацию в рамках настоящей экспериментальной модели.

4. Установлено существование мембранной субклеточной структуры прокоагулянтных тромбоцитов, названной «шапкой» и представляющей из себя небольшую область, богатую прокоагулянтными белками, через которую опосредована агрегация прокоагулянтных клеток с другими тромбоцитами.

Список сокращений и условных обозначений

Тромбин – фактор свёртывания и основной активатор тромбоцита через рецепторы PAR1 и PAR4

SFLLRN – пептид, активирующий рецептор PAR1 тромбоцита (PAR1 АП)

Митохондриальная пора – неспецифический канал в мембране митохондрии, пропускающий любые низкомолекулярные вещества,

ОКС - открытая канальцевая система (ОКС),

ПТС - плотная трубчатая система (ПТС),

ФС - Фосфатидилсерин (ФС),

Пептид, активирующий рецептор PAR1 (PAR1-АП), он же SFLLRN,

Тетраметилродамин метиловый эфир (ТМРМ, тетраметилродамин),

10-N-нонил-акридин оранжевый (НАО),

Циклоспорин А (CsA).

Список литературы

1. Dale, G. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response / G. Dale // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Т. 3, № 10. – С. 2185-2192.
2. Rosing, J. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex / J. Rosing, G. Tans, J. Govers-Riemslog, R. Zwaal, H. C. Hemker // *Journal of Biological Chemistry*. – 1980. – Т. 255, № 1. – С. 274-283.
3. Prodan, C. I. Higher coated-platelet levels are associated with stroke recurrence following nonlacunar brain infarction / C. I. Prodan, J. A. Stoner, L. D. Cowan, G. L. Dale // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2013. – Т. 33, № 2. – С. 287-292.
4. Prodan, C. I. Coated-platelet levels are elevated in patients with transient ischemic attack / C. I. Prodan, A. S. Vincent, G. L. Dale // *Translational Research*. – 2011. – Т. 158, № 1. – С. 71-75.
5. Prodan, C. Lower coated-platelet levels are associated with early hemorrhagic transformation in patients with non-lacunar brain infarction / C. Prodan, J. Stoner, L. Cowan, G. Dale // *Journal of thrombosis and haemostasis*. – 2010. – Т. 8, № 6. – С. 1185-1190.
6. Prodan, C. I. Coated-platelet levels are persistently elevated in patients with mild traumatic brain injury / C. I. Prodan, A. S. Vincent, G. L. Dale // *The Journal of head trauma rehabilitation*. – 2014. – Т. 29, № 6. – С. 522-526.
7. Prodan, C. I. Higher coated-platelet levels are associated with chronic hypertension in patients with transient ischemic attack / C. I. Prodan, A. S. Vincent, G. L. Dale // *Platelets*. – 2013. – Т. 24, № 4. – С. 316-319.
8. Prodan, C. I. Cerebral Microbleeds in Nonlacunar Brain Infarction Are Associated with Lower Coated-Platelet Levels / C. I. Prodan, J. A. Stoner, D. L. Gordon, G. L. Dale // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2014. – Т. 23, № 5. – С. e325-e330.

9. Prodan, C. Acute hemorrhagic complications are associated with lower coated-platelet levels in non-lacunar brain infarction / C. Prodan, J. Stoner, G. Dale // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Т. 13, № 12. – С. 2233-2239.
10. Prodan, C. I. Coated-platelet levels increase with number of injuries in patients with mild traumatic brain injury / C. I. Prodan, A. S. Vincent, G. L. Dale // *Journal of neurotrauma*. – 2016. – Т. 33, № 9. – С. 818-824.
11. Prodan, C. Lower coated-platelet levels are associated with increased mortality after spontaneous intracerebral hemorrhage / C. Prodan, J. Stoner, G. Dale // *Stroke*. – 2015. – Т. 46, № 7. – С. 1819-1825.
12. Свешникова, А. Современные представления о регуляции тромбоцитарного гемостаза / Свешникова А., Якушева А., Рябых А., Ушакова О., Абаева А., Обыденный С., Нечипуренко Д., Пантелеев М. // *Креативная кардиология*. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 260-274.
13. Yakimenko, A. O. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations / A. O. Yakimenko, F. Y. Verholomova, Y. N. Kotova, F. I. Ataulakhanov, M. A. Pantelev // *Biophysical journal*. – 2012. – Т. 102, № 10. – С. 2261-2269.
14. Kotova, Y. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5' diphosphate acting via the P2Y12 receptor / Y. Kotova, F. Ataulakhanov, M. Pantelev // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2008. – Т. 6, № 9. – С. 1603-1605.
15. Munnix, I. C. Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients / I. C. Munnix, M. Harmsma, J. C. Giddings, P. W. Collins, M. A. Feijge, P. Comfurius, J. W. Heemskerk, E. M. Bevers // *Thrombosis and haemostasis*. – 2003. – Т. 90, № 04. – С. 687-695.
16. Шмидт, Р. Физиология человека (том 2). / Р. Шмидт, Г. Тевс – М: Мир, 1996.
17. Beltrami, E. The role of membrane patch size and flow in regulating a proteolytic feedback threshold on a membrane: possible application in blood coagulation / E. Beltrami, J. Jesty // *Mathematical biosciences*. – 2001. – Т. 172, № 1. – С. 1-13.

18. Falati, S. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse / S. Falati, P. Gross, G. Merrill-Skoloff, B. C. Furie, B. Furie // *Nature medicine*. – 2002. – Т. 8, № 10. – С. 1175-1180.
19. Lawson, J. H. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study / J. H. Lawson, M. Kalafatis, S. Stram, K. G. Mann // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Т. 269, № 37. – С. 23357-23366.
20. Monroe, D. M. The tissue factor–factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking / D. M. Monroe, N. Key // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Т. 5, № 6. – С. 1097-1105.
21. Sims, P. J. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity / P. J. Sims, T. Wiedmer, C. T. Esmon, H. J. Weiss, S. Shattil // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – Т. 264, № 29. – С. 17049-17057.
22. Bajaj, S. Human plasma lipoproteins as accelerators of prothrombin activation / S. Bajaj, J. Harmony, M. Martinez-Carrion, F. Castellino // *Journal of Biological Chemistry*. – 1976. – Т. 251, № 17. – С. 5233-5236.
23. Sinauridze, E. I. Platelet microparticle membranes have 50-to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets / E. I. Sinauridze, D. A. Kireev, N. Y. Popenko, A. V. Pichugin, M. A. Panteleev, O. V. Krymskaya, F. I. Ataullakhanov // *Thrombosis and haemostasis-stuttgart*. – 2007. – Т. 97, № 3. – С. 425.
24. van Dieijen, G. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X / G. van Dieijen, G. Tans, J. Rosing, H. C. Hemker // *Journal of Biological Chemistry*. – 1981. – Т. 256, № 7. – С. 3433-3442.
25. Panteleev, M. Systems biology and systems pharmacology of thrombosis / M. Panteleev, A. Sveshnikova, A. Belyaev, D. Nechipurenko, I. Gudich, S. Obydenny, N. Dovlatova, S. Fox, E. Holmuhamedov // *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*. – 2014. – Т. 9, № 6. – С. 4-16.
26. Пантелеев, М. А. Практическая коагулология. / М. А. Пантелеев, С. Васильев, Е. Синауридзе, А. Воробьев, Ф. Атауллаханов, А. И. Воробьев, 2012.

27. Youssefian, T. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies / T. Youssefian, E. M. Cramer // *Blood*. – 2000. – T. 95, № 12. – C. 4004-4007.
28. Niewiarowski, S. Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins / S. Niewiarowski, J. Holt, J. Cook // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: Lippincott. – 1994.
29. Johnston, G. I. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation / G. I. Johnston, R. G. Cook, R. P. McEver // *Cell*. – 1989. – T. 56, № 6. – C. 1033-1044.
30. Larsen, E. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes / E. Larsen, A. Celi, G. E. Gilbert, B. C. Furie, J. K. Erban, R. Bonfanti, D. D. Wagner, B. Furie // *Cell*. – 1989. – T. 59, № 2. – C. 305-312.
31. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death / M. Crompton // *Biochemical Journal*. – 1999. – T. 341, № 2. – C. 233-249.
32. Nakagawa, T. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death / T. Nakagawa, S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo, Y. Tsujimoto // *Nature*. – 2005. – T. 434, № 7033. – C. 652.
33. Neumüller, J. Transmission Electron Microscopy of Platelets FROM Apheresis and Buffy-Coat-Derived Platelet Concentrates / J. Neumüller, A. Ellinger, T. Wagner // *The Transmission Electron Microscope-Theory and ApplicationsInTech*, 2015.
34. Rivera, J. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation / J. Rivera, M. L. Lozano, L. Navarro-Núñez, V. Vicente // *haematologica*. – 2009. – T. 94, № 5. – C. 700-711.
35. Nieswandt, B. Integrins in platelet activation / B. Nieswandt, D. Varga-Szabo, M. Elvers // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – T. 7, № s1. – C. 206-209.

36. Jonnalagadda, D. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner / D. Jonnalagadda, L. T. Izu, S. W. Whiteheart // *Blood*. – 2012. – Т. 120, № 26. – С. 5209-5216.
37. Э.Ф.Деркачев И. В. М., А.И.Кривченко, А.А.Крашениников. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов // Патент РФ 2108579, Бюл. изобрет., 10 (II), 298 (1998).
38. McCarty, O. J. Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow / O. J. McCarty, M. K. Larson, J. M. Auger, N. Kalia, B. T. Atkinson, A. C. Pearce, S. Ruf, R. B. Henderson, V. L. Tybulewicz, L. M. Machesky // *Journal of biological chemistry*. – 2005. – Т. 280, № 47. – С. 39474-39484.
39. Пантелеев, М. Физиология и патология внеклеточных везикул / М. Пантелеев, А. Абаева, Д. Нечипуренко, С. Обыденный, А. Свешникова, А. Шибeko // *Онкогематология*. – 2017. – Т. 12. – №. 1. – С. 62-70.
40. Пантелеев М., Абаева А., Баландина А., Беляев А., Нечипуренко Д., Обыденный С., Свешникова А., Шибeko А., Атауллаханов Ф. Внеклеточные везикулы плазмы крови: состав, происхождение, свойства // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2017. – Т. 34. – №. 3. – С. 155-161.
41. Dorsam, R. T. Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets / R. T. Dorsam, M. Tuluc, S. Kunapuli // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2004. – Т. 2, № 5. – С. 804-812.
42. Heemskerk, J. Platelet-based coagulation: different populations, different functions / J. Heemskerk, N. Mattheij, J. Cosemans // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2013. – Т. 11, № 1. – С. 2-16.
43. Arachiche, A. Rapid procoagulant phosphatidylserine exposure relies on high cytosolic calcium rather than on mitochondrial depolarization / A. Arachiche, D. Kerbirou-Nabias, I. Garcin, T. Letellier, J. Dachary-Prigent // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2009. – Т. 29, № 11. – С. 1883-1889.
44. Choo, H.-J. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure / H.-J. Choo, T. B. Saafir, L. Mkumba, M.

- B. Wagner, S. M. Jobe // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2012. – T. 32, № 12. – C. 2946-2955.
45. Heemskerk, J. W. Platelet activation and blood coagulation / J. W. Heemskerk, E. M. Bevers, T. Lindhout // *Thrombosis and haemostasis*. – 2002. – T. 88, № 2. – C. 186-194.
46. Li, Y.-X. Equations for InsP₃ receptor-mediated [Ca²⁺] oscillations derived from a detailed kinetic model: a Hodgkin-Huxley like formalism / Y.-X. Li, J. Rinzel // *Journal of theoretical Biology*. – 1994. – T. 166, № 4. – C. 461-473.
47. Heilbrunn, L. The action of various cations on muscle protoplasm / L. Heilbrunn, F. J. Wiercinski // *Journal of cellular physiology*. – 1947. – T. 29, № 1. – C. 15-32.
48. Ridgway, E. B. Calcium transients in single muscle fibers / E. B. Ridgway, C. C. Ashley // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1967. – T. 29, № 2. – C. 229-234.
49. Grynkiewicz, G. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – T. 260, № 6. – C. 3440-3450.
50. Tsien, R. Y. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells / R. Y. Tsien // *Nature*. – 1981. – T. 290, № 5806. – C. 527-528.
51. Minta, A. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores / A. Minta, J. Kao, R. Y. Tsien // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – T. 264, № 14. – C. 8171-8178.
52. Sterb, H. Release of Ca²⁺ from nonmitochondrial store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-triphosphate / H. Sterb, R. Irvine, M. Berridge, I. Schulz // *Nature*. – 1983. – T. 306. – C. 67-69.
53. Putney J. W. A model for receptor-regulated calcium entry / J. W. Putney // *Cell calcium*. – 1986. – T. 7, № 1. – C. 1-12.
54. Heemskerk, J. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets / J. Heemskerk, J. Hoyland, W. Mason, S. Sage // *Biochemical Journal*. – 1992. – T. 283, № 2. – C. 379-383.

55. Шахиджанов, С. Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в “интерпретации” клеткой информации из внешнего мира / С. Шахиджанов, Ф. Балабин, С. Обыденный, Ф. Атауллаханов, А. Свешникова // Успехи физических наук. – 2019. – Т. 189. – №. 9. – С. 703-719.
56. Keularts, I. M. α 2A-adrenergic receptor stimulation potentiates calcium release in platelets by modulating cAMP levels / I. M. Keularts, R. M. van Gorp, M. A. Feijge, W. M. Vuist, J. W. Heemskerk // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Т. 275, № 3. – С. 1763-1772.
57. Parekh, A. B. Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations / A. B. Parekh // Trends in biochemical sciences. – 2011. – Т. 36, № 2. – С. 78-87.
58. VARGA-SZABO, D. Calcium signaling in platelets / D. VARGA-SZABO, A. Braun, B. Nieswandt // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2009. – Т. 7, № 7. – С. 1057-1066.
59. Munnix, I. Platelet response heterogeneity in thrombus formation / I. Munnix, J. Cosemans, J. M. Auger, J. Heemskerk // Thromb Haemost. – 2009. – Т. 102, № 6. – С. 1149-1156.
60. Jackson, S. P. Procoagulant platelets: are they necrotic? / S. P. Jackson, S. M. Schoenwaelder // Blood. – 2010. – Т. 116, № 12. – С. 2011-2018.
61. Kempton, C. L. Platelet Heterogeneity / C. L. Kempton, M. Hoffman, H. R. Roberts, D. M. Monroe // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. – 2005. – Т. 25, № 4. – С. 861-866.
62. Panteleev, M. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex / M. Panteleev, N. Ananyeva, N. Greco, F. Ataulakhanov, E. Saenko // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2005. – Т. 3, № 11. – С. 2545-2553.
63. Podoplelova, N. A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization / N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, J. H. Kurasawa, A. G. Sarafanov, H. Chambost, S. A. Vasil'Ev, I. A. Demina, F. I.

Ataullakhanov, M.-C. Alessi, M. A. Panteleev // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2016. – T. 1858, № 6. – C. 1216-1227.

64. Artemenko, E. O. Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets / E. O. Artemenko, A. O. Yakimenko, A. V. Pichugin, F. I. Ataullakhanov, M. A. Panteleev // *Biochemical Journal*. – 2016. – T. 473, № 4. – C. 435-448.

65. Kotova, Y. N. Binding of Coagulation Factor XIII Zymogen to Activated Platelet Subpopulations: Roles of Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and Fibrinogen / Y. N. Kotova, N. A. Podoplelova, S. I. Obydenny, E. A. Kostanova, A. A. Ryabykh, A. S. Demyanova, M. I. Biriukova, M. A. Rosenfeld, A. V. Sokolov, Chambost H. // *Thrombosis and haemostasis*. – 2019.

66. Nechipurenko, D. Y. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface / D. Y. Nechipurenko, N. Receveur, A. O. Yakimenko, T. O. Shepelyuk, A. A. Yakusheva, R. R. Kerimov, S. I. Obydenny, A. Eckly, C. Léon, C. Gachet // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2019. – T. 39, № 1. – C. 37-47.

67. Alberio, L. Surface expression and functional characterization of α -granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin / L. Alberio, O. Safa, K. J. Clemetson, C. Esmon, G. Dale // *Blood*. – 2000. – T. 95, № 5. – C. 1694-1702.

68. Dale, G. L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface / G. L. Dale, P. Friese, P. Batar, S. F. Hamilton, G. L. Reed, K. W. Jackson, K. J. Clemetson, L. Alberio // *Nature*. – 2002. – T. 415, № 6868. – C. 175-179.

69. Jobe, S. M. Role of FcR γ and factor XIII A in coated platelet formation / S. M. Jobe, L. Leo, J. S. Eastvold, G. Dickneite, T. L. Ratliff, S. R. Lentz, J. Di Paola // *Blood*. – 2005. – T. 106, № 13. – C. 4146-4151.

70. Topalov, N. N. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation / N. N. Topalov, Y. N. Kotova, S.

A. Vasil'ev, M. A. Pantelev // *British journal of haematology*. – 2012. – T. 157, № 1. – C. 105-115.

71. Topalov, N. N. Two Types of Procoagulant Platelets Are Formed Upon Physiological Activation and Are Controlled by Integrin α IIb β 3 / N. N. Topalov, A. O. Yakimenko, M. Canault, E. O. Artemenko, N. V. Zakharova, A. A. Abaeva, M. Loosveld, F. I. Ataulakhanov, A. T. Nurden, M.-C. Alessi // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2012. – T. 32, № 10. – C. 2475-2483.

72. Kulkarni, S. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin α IIb β 3 adhesive function and thrombus growth / S. Kulkarni, S. P. Jackson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279, № 29. – C. 30697-30706.

73. Pecci, A. Desmopressin and super platelets / A. Pecci, C. L. Balduini // *Blood*. – 2014. – T. 123, № 12. – C. 1779-1780.

74. Mazepa, M. Superactivated platelets: thrombus regulators, thrombin generators, and potential clinical targets / M. Mazepa, M. Hoffman, D. Monroe // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2013. – T. 33, № 8. – C. 1747-1752.

75. Hess, M. W. Procoagulant platelet balloons: evidence from cryopreparation and electron microscopy / M. W. Hess, P. Siljander // *Histochemistry and cell biology*. – 2001. – T. 115, № 5. – C. 439-443.

76. Ramstrom, S. Annexin V binding to platelets is agonist, time and temperature dependent / S. Ramstrom, S. O'neill, E. Dunne, D. Kenny // *Platelets*. – 2010. – T. 21, № 4. – C. 289-296.

77. London, F. S. PAR-1-stimulated factor IXa binding to a small platelet subpopulation requires a pronounced and sustained increase of cytoplasmic calcium / F. S. London, M. Marcinkiewicz, P. N. Walsh // *Biochemistry*. – 2006. – T. 45, № 23. – C. 7289-7298.

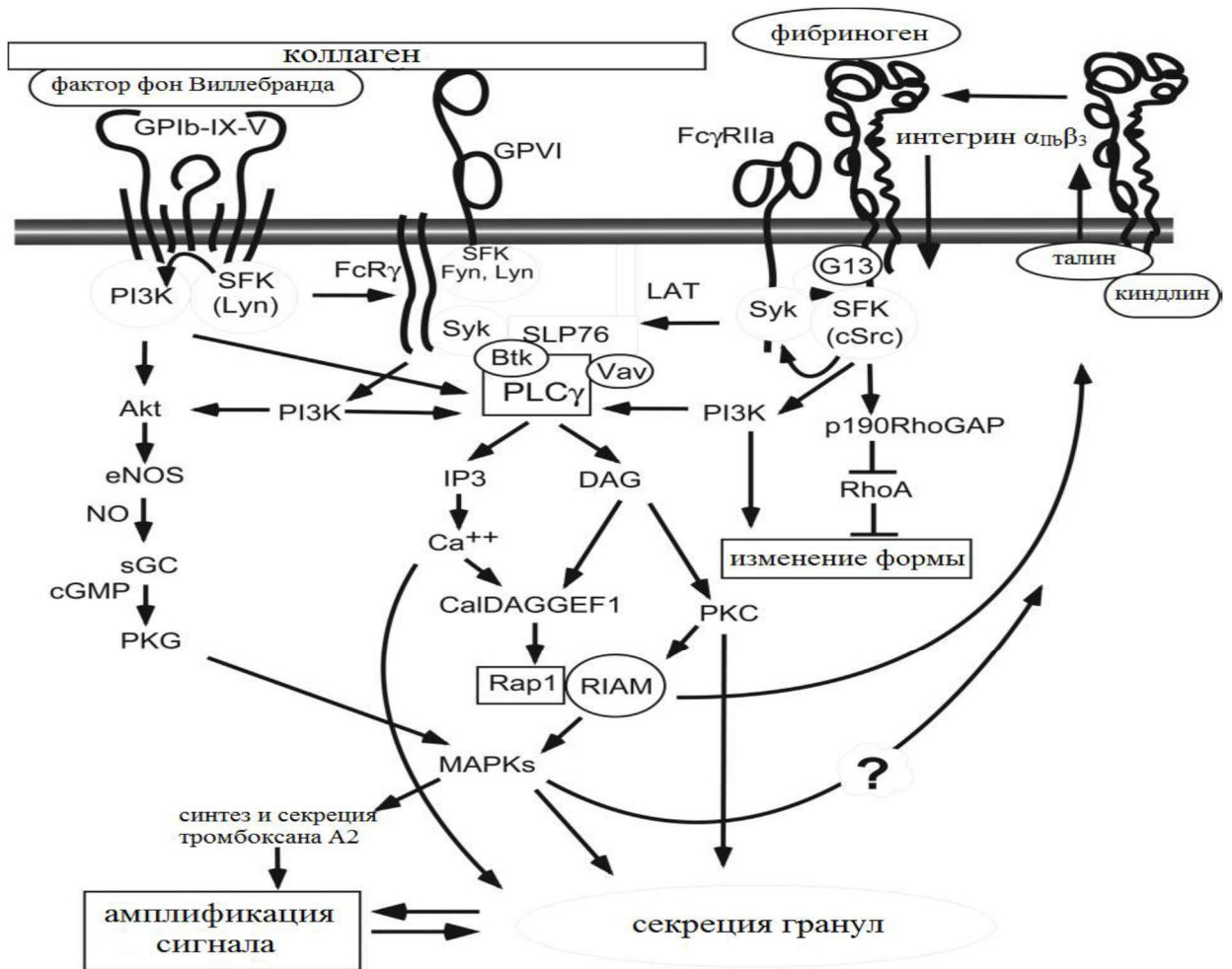
78. Heemskerk, J. W. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca^{2+} responses / J. W. Heemskerk, W. M. Vuist, M. A. Feijge, C. P. Reutelingsperger, T. Lindhout // *Blood*. – 1997. – T. 90, № 7. – C. 2615-2625.

79. Remenyi, G. Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation / G. Remenyi, R. Szasz, P. Friese, G. L. Dale // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2005. – T. 25, № 2. – C. 467-471.
80. Jobe, S. M. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis / S. M. Jobe, K. M. Wilson, L. Leo, A. Raimondi, J. D. Molkenin, S. R. Lentz, J. Di Paola // *Blood*. – 2008. – T. 111, № 3. – C. 1257-1265.
81. Podoplelova, N. A. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting / N. A. Podoplelova, A. N. Sveshnikova, Y. N. Kotova, A. Eckly, N. Receveur, D. Y. Nechipurenko, S. I. Obydennyi, I. I. Kireev, C. Gachet, F. I. Ataulakhanov, P. H. Mangin, M. Panteleev // *Blood*. – 2016. – T. 128, № 13. – C. 1745-1755.
82. Luft, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods / J. H. Luft // *The Journal of Cell Biology*. – 1961. – T. 9, № 2. – C. 409-414.
83. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // *The Journal of cell biology*. – 1963. – T. 17, № 1. – C. 208.
84. Obydenny, S. I. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation / S. I. Obydenny, A. N. Sveshnikova, F. I. Ataulakhanov, M. A. Panteleev // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2016. – T. 14, № 9. – C. 1867-1881.
85. Heemskerk JW et. al. Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets // *Biochemical Journal*. // *Book Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets // Biochemical Journal*. / Editor, 1992.
86. Abaeva, A. A. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered “cap” on their surface that promotes their attachment to aggregates / A. A. Abaeva, M. Canault, Y. N. Kotova, S. I. Obydenny, A. O. Yakimenko, N. A. Podoplelova, V. N. Kolyadko, H. Chambost, A. V. Mazurov, F. I. Ataulakhanov // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – T. 288, № 41. – C. 29621-29632.

87. Shakhidzhanov, S. Modulation and pre-amplification of PAR 1 signaling by ADP acting via the P 2 Y 12 receptor during platelet subpopulation formation / S. Shakhidzhanov, V. Shaturny, M. Pantelev, A. Sveshnikova // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2015. – T. 1850, № 12. – C. 2518-2529.
88. Sveshnikova, A. N. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1 / A. N. Sveshnikova, F. I. Ataullakhanov, M. A. Pantelev // *Molecular BioSystems*. – 2015. – T. 11, № 4. – C. 1052-1060.
89. Ramström, S. Platelet PAR1 receptor density—correlation to platelet activation response and changes in exposure after platelet activation / S. Ramström, K. V. Öberg, F. Åkerström, C. Enström, T. L. Lindahl // *Thrombosis research*. – 2008. – T. 121, № 5. – C. 681-688.
90. Briedë, J. J. Heterogeneity in microparticle formation and exposure of anionic phospholipids at the plasma membrane of single adherent platelets / J. J. Briedë, J. W. Heemskerk, H. C. Hemker, T. Lindhout // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 1999. – T. 1451, № 1. – C. 163-172.
91. Mattheij, N. J. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets / N. J. Mattheij, K. Gilio, R. van Kruchten, S. M. Jobe, A. J. Wieschhaus, A. H. Chishti, P. Collins, J. W. Heemskerk, J. M. Cosemans // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – T. 288, № 19. – C. 13325-13336.
92. Li, Z. Signaling during platelet adhesion and activation / Z. Li, M. K. Delaney, K. A. O'brien, X. Du // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2010. – T. 30, № 12. – C. 2341-2349.
93. Smedler, E. Frequency decoding of calcium oscillations / E. Smedler, P. Uhlén // *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 2014. – T. 1840, № 3. – C. 964-969.

Приложение А (справочное)

Сигнальные пути I.

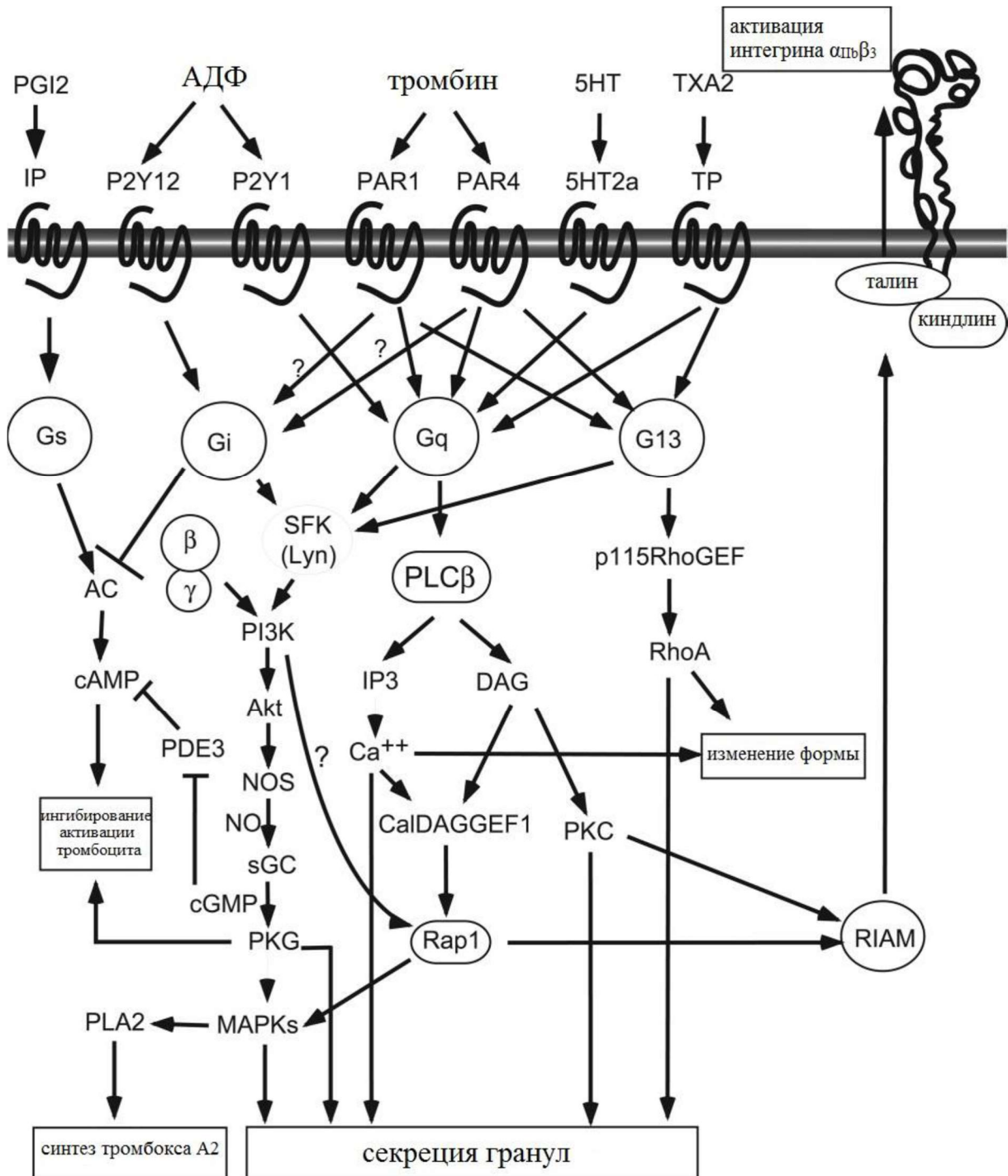


Пути внутриклеточной сигнализации через 3 основных рецептора адгезии: комплекс GPIb-IX-V, GPVI, интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$. Адаптировано из [92].

Приложение Б
(справочное)

Сигнальные пути II.

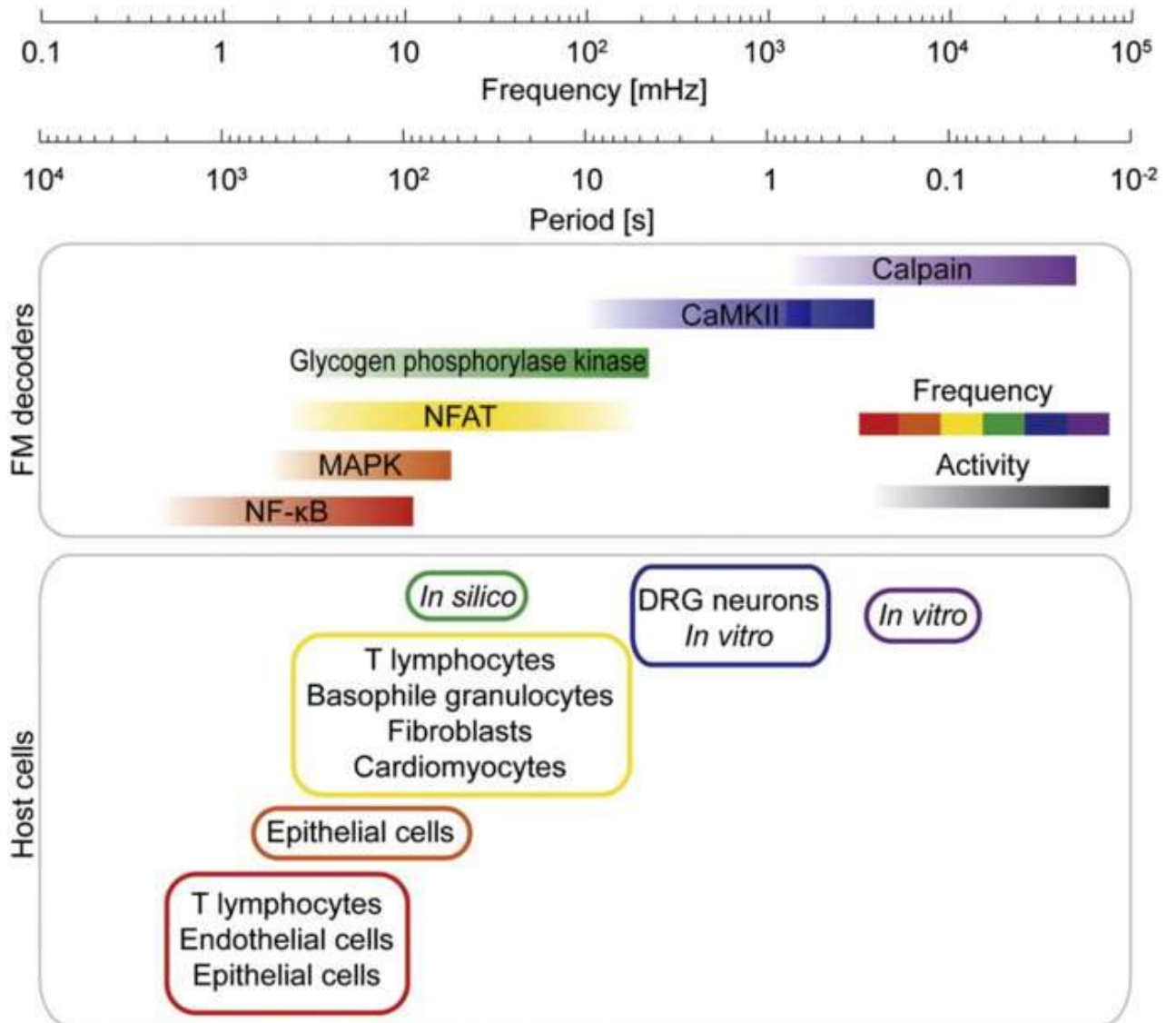
Активация через рецепторы, связанные с G белками.



Адаптировано из [92].

Приложение В (справочное)

Кальций-зависимые белки.



Шкала активации некоторых белков в зависимости от частоты колебаний кальция [93].