

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

На правах рукописи

МАРТЬЯНОВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВАЦИИ
ТРОМБОЦИТОВ ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОРЫ СЛЕС-2 И GPVI**

Специальность: 1.5.2. Биофизика

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор физико-математических наук
Свешникова Анастасия Никитична

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Роль тромбоцитов в организме человека	12
1.2. Ключевые динамические особенности внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах.....	16
1.3. Начальные стадии CLEC-2/GPVI-индуцированной активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах.....	19
1.4. Механизмы распространения внутриклеточного сигнала в тромбоцитах от тирозинкиназ	23
1.5. Регуляция ключевых функциональных ответов тромбоцитов	26
1.6. Теоретические подходы к описанию активации тромбоцитов.....	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1. Экспериментальные методы исследования	36
2.2. Теоретические методы исследования	44
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК CLEC-2-ИНДУЦИРОВАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ	46
3.1. Помодульное построение модели CLEC-2 индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах	46
3.2. Экспериментальное исследование значимости кластеризации рецепторов CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах	59
3.3. Исследование способности рецептора CLEC-2 инициировать кальциевую сигнализацию в тромбоцитах.....	69
3.4. Переход от рецептора CLEC-2 к рецептору GPVI.....	75

ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ GPVI- И CLEC2-ИНДУЦИРОВАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ТРОМБОЦИТАХ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ	79
4.1. Экспериментальное исследование GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров	79
4.2. Исследование CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	97
БЛАГОДАРНОСТИ.....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ А (обязательное) описание модели рецептора CLEC-2	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Тромбоциты – безъядерные клетки крови размером 2-4 мкм, производящиеся в костном мозге и циркулирующие в кровотоке в течение 7-10 дней до момента утилизации в селезёнке или печени [1]. Основная задача тромбоцитов – предотвращение кровопотери при нарушении замкнутости кровеносной системы [1]. Для выполнения данной задачи тромбоциты способны переходить в так называемое активированное состояние при контакте с повреждением. Активированный тромбоцит может адгезировать к стенкам сосуда и агрегировать с другими клетками за счет активных интегринов, секретировать гранулы и молекулы-активаторы тромбоцитов, стимулировать свертывание плазмы крови.

При повреждении кровеносных сосудов происходит активация и гибель клеток сосудистого эндотелия, приводящая к появлению растворимых активаторов тромбоцитов – АДФ и тромбина, а также обнажение белков межклеточного матрикса, одним из которых является коллаген [1]. Тромбоциты адгезируют к коллагену не напрямую, а через молекулы фактора фон Виллебранда (ФВ) – мультимерного белка плазмы крови, который также секретируется эндотелиоцитами при их активации – одним концом связывающиеся с коллагеном, а другим – с тромбоцитами [1]. Находясь в непосредственной близости от коллагена, тромбоциты активируются от него через рецептор-гликопротеин VI (GPVI) [2]. Активация тромбоцитов коллагеном значительно замедлена по сравнению с другими известными агонистами, такими как аденозиндифосфат (АДФ) и тромбин [3].

Помимо гемостаза тромбоциты играют значимую роль для нормального эмбрионального развития организма и формирования новых сосудов (ангиогенеза) [4]. Показано, что при разделении кровеносной и лимфатической систем у эмбрионов млекопитающих ключевым является взаимодействие тромбоцитарного лектин-подобного рецептора С-типа 2го рода (CLEC-2) и

подопланина – гликопротеина, экспрессируемого клетками лимфатического эндотелия [5], при этом CLEC-2-индуцированная активация тромбоцитов медленнее GPVI-индуцированной [6]. При капошиформной гемангиоэндотелиоме (КГЭ) – редкой сосудистой опухоли, экспрессирующей подопланин – наблюдается тромбоцитопения и развитие диссеминированного внутрисосудистого свёртывания [7]. Совместно CLEC-2 и GPVI принципиально важны для поддержания структуры тромбов и задействованы в ряде других патологий [4].

Связывание рецепторов GPVI с коллагеном или рецепторов CLEC-2 с подопланином инициирует кластеризацию этих рецепторов на поверхности тромбоцитов [2; 8]. Показано, что в тромбоцитах присутствует сразу несколько механизмов кластеризации мембранных рецепторов: кластеризация непосредственно лигандом, кластеризация за счёт перестроения актинового цитоскелета или кластеризация в результате изменения микродоменной структуры мембраны тромбоцитов [8]. Роль динамики и паттерна кластеризации рецепторов на поверхности тромбоцитов для дальнейшей сигнализации в тромбоцитах неясна.

При кластеризации рецепторов GPVI происходит фосфорилирование их цитоплазматических доменов тирозинкиназами семейства Src (SFK) [9]. Кластеризованные и активированные рецепторы CLEC-2 фосфорилируются тирозинкиназами Syk [9]. С фосфорилированными GPVI и CLEC-2 связываются неактивные Syk, что приводит к их активации [4]. Для активации одной Syk-киназы достаточно одной молекулы GPVI. CLEC-2, с другой стороны, активирует Syk только будучи димеризованным [9]. Активные Syk запускают формирование сигналосомы, в основе которой лежит линкерный адаптерный T-клеточный белок (LAT) [9]. В составе LAT-сигналосомы происходит активация фосфолипазы C γ 2 (ФЛС γ 2). ФЛС γ 2 гидролизует фосфоинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ $_2$), находящийся в мембране тромбоцитов, производя инозитол-3,4,5-трифосфат (ИФ $_3$) – вторичный мессенджер активации тромбоцитов, который активирует

рецептор к ИФ₃ (ИФ₃Р) на поверхности эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [9]. Активация ИФ₃Р инициирует выход из ЭПР свободных ионов кальция – основного регулятора функциональных ответов тромбоцитов [10]. Кальциевая сигнализация определяет все функциональные ответы тромбоцитов на активацию: изменение формы, необходимое для увеличения площади поверхности закрытия повреждения; активацию мембранных интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$, необходимых для формирования тромбоцитарных агрегатов; секрецию тромбоцитарных α - и плотных гранул, необходимых для активации близлежащих клеток; прокоагулянтный ответ – митохондриально-зависимый некроз тромбоцитов, при котором происходит выставление фосфатидилсерина, основы для активации плазменного каскада свёртывания крови [1]. Определение ключевых механизмов инициации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах является ключом для тонкой регуляции активации тромбоцитов через данный путь.

Несмотря на большой объём ранее опубликованных данных о последовательности событий при активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, а также о физиологической значимости рецепторов CLEC-2 и GPVI, кинетические и динамические характеристики данных путей мало изучены. Определение конкретных стадий активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, лимитирующих скорость, позволит идентифицировать новые мишени для терапевтического воздействия при тромбозах, возникающих в результате дисфункции данных сигнальных путей.

Степень разработанности темы исследования

Теоретические исследования GPVI-индуцированной активации тромбоцитов ограничиваются одной работой, в которой, однако, не рассматриваются ни кластеризация рецепторов, ни формирование LAT-сигнаლოსомы, ни кальциевая сигнализация в целом. Методики теоретического описания кластеризации мембранных рецепторов весьма громоздки и редко позволяют описывать одновременно и кластеризацию, и более сложные процессы, происходящие при распространении внутриклеточного сигнала.

Таким образом, существует значительная неопределённость с точки зрения кинетических и динамических характеристик распространения внутриклеточного CLEC-2- или GPVI-индуцированного сигнала. В то время как патофизиологическая значимость данных путей сигнализации была многократно продемонстрирована, значимость динамических характеристик активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI не изучалась.

Цель настоящего исследования – определение механизмов и скорость-лимитирующих реакций активации тромбоцитов через рецепторы, ассоциированные с тирозинкиназами.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Построение схемы внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах, индуцируемой рецепторами CLEC-2 и GPVI на основе литературных данных;
2. Определение механизма активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2 и скорость-лимитирующих стадий данного процесса путем системно-биологического подхода;
3. Разработка экспериментальной методики анализа CLEC-2- или GPVI-индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с гематологическими заболеваниями;
4. Исследование механизма нарушения CLEC-2-индуцированной внутриклеточной кальциевой сигнализации у пациентов с КГЭ.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются тромбоциты человека. **Предмет исследования** – внутриклеточная сигнализация, индуцируемая рецепторами CLEC-2 и GPVI в тромбоцитах человека.

Научная новизна работы

Составлена полная схема внутриклеточной тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах при их активации через рецепторы CLEC-2 и GPVI. На основании данной схемы разработана первая математическая модель внутриклеточной

тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Для корректного учёта кластеризации рецепторов при их активации был разработан новый теоретический подход. Было показано, что кластеризация рецепторов является одной из скорость-лимитирующих реакций для активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Также с помощью модели было предсказано, что динамика кластеризации рецепторов может значительно влиять на активацию тромбоцитов. Данные результаты были подтверждены на основе литературных и экспериментальных данных.

Для исследования тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах был создан метод анализа динамики кальциевого ответа тромбоцитов на активацию с помощью проточной цитометрии. Данным методом впервые было показано, что CLEC-2 индуцирует кальциевый ответ в тромбоцитах. Также было получено, что температура и насыщение мембраны холестерином значительно влияют на скорость активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Это может свидетельствовать о значимости кластеризации рецепторов для тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Было получено, что ответы тромбоцитов здоровых доноров на GPVI-индуцированную активацию значительно различаются. Модель предсказала, что вариабельность ответов объясняется разными количествами рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов здоровых доноров, что сходится с данными из литературы.

Было получено, что у пациентов с КГЭ значительно нарушена активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2. Можно предположить, что в опухолях этих пациентов происходит фильтрация тромбоцитов: тромбоциты с высокой экспрессией CLEC-2 остаются в опухоли, тромбоциты с низкой экспрессией CLEC-2 циркулируют в кровотоке. Модель также подтверждает такую возможность.

Теоретическая значимость работы

Полученные в рамках настоящей работы результаты подчёркивают значимость понимания механизмов и динамики процессов кластеризации для нормальной внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах. Разработанный

теоретико-экспериментальный подход может быть использован для исследования широкого спектра биологических сигнальных систем как в тромбоцитах, так и в других клетках.

Практическая значимость работы

Разработанная экспериментальная методика может быть использована для исследования внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов, что позволит идентифицировать механизмы развития нарушений функции тромбоцитов. Разработанная модель может быть использована для исследования механизмов развития гематологических заболеваний и исследования эффектов различных вариантов терапии на функцию тромбоцитов пациентов.

Методология и методы исследования

Экспериментальные данные по динамике фосфорилирования тирозинов в ответ на стимуляцию тромбоцитов активатором рецепторов CLEC-2 были получены методом вестерн-блоттинга. Анализ кальциевой сигнализации в суспензии тромбоцитов проводился с помощью проточной цитометрии тромбоцитов, загруженных кальций-чувствительными флуорофорами. Анализ динамики формирования LAT-сигналом при активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2 при различных условиях осуществлялся с помощью флуоресцентной микроскопии.

Разработка компьютерной модели проводилась следующим образом: на основе литературных данных строилась схема процесса, которая ложилась в основу теоретической модели. Модель представляла собой систему дифференциальных уравнений, которая интегрировалась численным методом для интегрирования жёстких и нежёстких систем обыкновенных дифференциальных уравнений (LSODA) в среде разработки COPASI или же на языке программирования Python 3.8. Уравнения модели, в основном, полагались на закон действующих масс и уравнение Михаэлиса-Ментен. Параметры модели были либо взяты из литературных источников, либо подобраны на основании доступных из литературы данных или же данных, полученных экспериментально

в рамках диссертационной работы. Полученные с помощью модели предсказания проверяются экспериментально или на основе литературных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана экспериментальная методика наблюдения первичного кальциевого ответа тромбоцитов здоровых доноров и пациентов, в том числе с тромбоцитопенией, на стимуляцию растворимыми активаторами;
2. В рамках системно-биологического подхода показано, что ключевыми этапами активации тромбоцитов через ассоциированные с тирозинкиназами рецепторы являются кластеризация рецепторов и сборка LAT-сигнасомы;
3. Температура и насыщение мембраны тромбоцитов холестерином оказывают значительное влияние на CLEC-2-индуцированную сборку LAT-сигнасомы и внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах в целом;

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, вестерн-блоттинг, статистическая обработка результатов, а также использованием распространенных методов математического моделирования и статистической обработки данных, реализованных в общедоступных программных пакетах. Достоверность полученных результатов также подтверждается их согласованностью с известными литературными источниками.

Личный вклад автора заключается в анализе научной литературы, разработке математических моделей CLEC-2- и GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, планировании и проведении экспериментов по проточной цитометрии, постановке экспериментов по вестерн-блоттингу, дизайну и пробоподготовке экспериментов по флуоресцентной микроскопии, подготовке иллюстраций, написания научных статей и тезисов по материалам работы. Материалы диссертации доложены автором в устных докладах на международных конференциях.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на European Congress on Thrombosis and Hemostasis 2016 (28-30 сентября 2016, г. Гаага, Нидерланды); XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 (8-13 июля 2017, г. Берлин, Германия); XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова (18-22 сентября 2017, Воронеж, Россия); Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем (28-30 июня 2018, Минск, Беларусь); 65th Annual Meeting of the Scientific Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis 2018 (18-21 июля 2018, г. Дублин, Ирландия); XXVI международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (28 января — 2 февраля 2019, Пущино, Россия); XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Hemostasis 2019 (6-10 Июля 2019, Мельбурн, Австралия); European Congress on Thrombosis and Hemostasis 2019 (2-4 октября 2019, Глазго, Великобритания).

Публикации: по материалам диссертации было опубликовано 17 работ, в том числе 7 статей в международных и российских рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 10 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста и включает содержание, введение, обзор литературы (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), исследование динамических характеристик тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах (глава 3), сравнение GPVI- и CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах (глава 4), заключение, выводы, список цитированной литературы (203 библиографических источника), список сокращений и обозначений, благодарности. Работа содержит 40 рисунков, 4 таблицы и 1 приложение.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль тромбоцитов в организме человека

Тромбоциты – безъядерные дисковидные клетки крови размером 2-4 мкм в диаметре, производящиеся из мегакариоцитов в костном мозге [11]. Молодые тромбоциты увеличены в размере по сравнению с более зрелыми клетками, а также обладают более богатым набором рибонуклеиновых кислот (РНК) [12]. В течение первых 2-3 дней после производства молодые тромбоциты созревают, что выражается в уменьшении их размера. Также показано, что более зрелые тромбоциты менее активно секретируют содержимое своих гранул [11; 12]. Тромбоциты суммарно циркулируют в кровотоке человека в течение 7–10 дней, а затем утилизируются в печени или селезёнке [13]. При циркуляции тромбоциты постепенно выпускают содержимое своих гранул: при дегрануляции происходит выход нейраминидазы – фермента, который ответственен за десИАлирование гликанов внешней мембраны тромбоцитов [14]. ДесИАлирование является одним из сигналов к выводу тромбоцитов из кровотока за счёт активности Купферовских клеток в печени [14; 15].

Основной задачей тромбоцитов в организме человека является предотвращение кровопотери при нарушении целостности кровеносных сосудов – гемостаз. При повреждении кровеносных сосудов происходит активация клеток сосудистого эндотелия и секреция ими фактора фон Виллебранда (ФВ) [1; 16; 17]. Значительные концентрации ФВ есть и в плазме крови [16]. Одновременно происходит обнажение субэндотелиального матрикса, состоящего из коллагена, ламинина и фибронектина [1; 16]. ФВ и субэндотелиальный коллаген являются ключевыми факторами для инициации формирования тромбоцитарного агрегата в области повреждения [16]. Клетки эндотелия также играют важную роль для остановки свёртывания и последующем его разрушении – фибринолизе [18].

Гликопротеин Ib (GPIb) – основной рецептор тромбоцитов к ФВ [19]. ФВ при контакте с коллагеном в области повреждения под действием пристеночных сдвиговых скоростей разворачивается, обнажая А1 домен, комплементарный

тромбоцитарному GPIb [20]. Таким образом, развёрнутые молекулы ФВ могут «ловить» тромбоциты за рецептор GPIb [20]. Однако, взаимодействие GPIb-ФВ недостаточно сильное, чтобы мгновенно остановить летящий в потоке тромбоцит. Поэтому сначала тромбоцит «катится» по поверхности с иммобилизированным ФВ [16; 21], постепенно активируясь за счёт механочувствительности GPIb [20]. «Катящиеся» тромбоциты взаимодействуют с коллагеном, который активирует их через рецептор GPVI и интегрины $\alpha_2\beta_1$ [22]. Активация тромбоцитов приводит к их стабильной адгезии и последующему росту тромбоцитарного агрегата [1; 16].

Активированные тромбоциты секретируют содержимое своих α - и плотных (δ -) гранул, что приводит к активации и привлечению тромбоцитов из кровеносного русла [16]. Помимо секреции α - и δ - гранул, в активированных тромбоцитах также инициируется синтез тромбоксана A_2 (TxA_2), который является важным вторичным медиатором активации тромбоцитов в тромбе [1]. Одним из ключевых событий, происходящих при активации тромбоцитов является переход в активное состояние интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ – высокоаффинных мембранных рецепторов тромбоцитов к фибриногену. Взаимодействие тромбоцитов через «мостики» фибриноген- $\alpha_{IIb}\beta_3$ -фибриноген лежит в основе структуры тромбов [16; 23; 24]. Структура тромба является гетерогенной: в основании тромба находятся наиболее сильно активированные тромбоциты, в то время как во внешних слоях тромбоциты активируются слабо и обратимо [23; 24]. Считается, что в основании тромбов происходит сильная активация тромбоцитов, которая может запустить их некроз и выставление на поверхность фосфатидилсерина – отрицательно заряженного фосфолипида, эффективно способствующего активации плазменного звена свёртывания крови [25; 26]. Функцией внешних слоев тромба является «защита» плазменного каскада свёртывания в ядре тромба от потока, который не позволял бы активным факторам свёртывания наработаться в достаточном количестве, чтобы произошло полноценное формирование сгустка плазмы крови [26]. Схема организации тромба приведена на Рисунке 1.1.

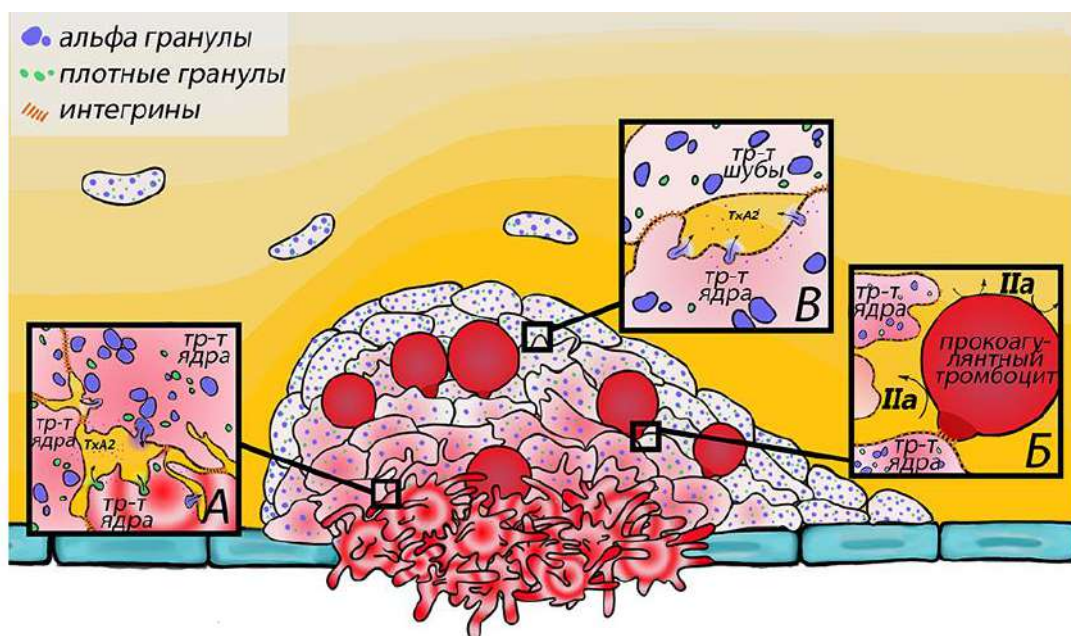


Рисунок 1.1 – Схема строения тромба. В основании тромба (ядре) сосредоточены сильно активированные тромбоциты, значительно изменившие форму, секретировавшие гранулы и ТхА₂. Также в ядре происходит переход тромбоцитов в прокоагулянтное состояние, которые теряют свою адгезионную способность и «выдавливаются» из ядра тромба. Прокоагулянтные тромбоциты приводят к формированию фибриновой сети и плотного агрегата в области повреждения. Рисунок адаптирован из [27]

Помимо их непосредственных гемостатических задач тромбоциты участвуют в ангиогенезе [28], разделении кровеносной и лимфатической систем [29], ремоделировании тканей [30], а также активно взаимодействуют с клетками иммунной системы: лейкоцитами и моноцитами [31; 32]. Для выполнения вышеуказанных задач на поверхности тромбоцитов есть рецептор CLEC-2, который аналогично рецептору GPVI запускает активацию тромбоцитов [29]. Показано, что при нокауте гена CLEC-2 на тромбоцитах мышей нарушается нормальное разделение кровеносной и лимфатической систем при эмбриональном развитии, что приводит к последующей гибели плода [5]. Во взрослых организмах при нарушении функциональности тромбоцитарного рецептора CLEC-2 может наблюдаться попадание крови в лимфатическую систему через вены с высоким эндотелием [29]. Клетки лимфатического эндотелия выставляют на своей поверхности гликопротеин подоплатин – один из эндогенных активаторов

тромбоцитарного CLEC-2 [29]. Тромбоциты активируются при связывании тромбоцитарного CLEC-2 и подопланина эндотелиоцитов, адгезируют и секретируют содержимое своих гранул, содержащих большое количество факторов роста [33]. При этом CLEC-2 и подопланин также имеют и патологическую значимость. Так, при бактериальном поражении печени, тканевые макрофаги выставляют подопланин и активируют тромбоциты через CLEC-2, что приводит к тромботическим осложнениям [32]. Помимо подопланина, к лигандам CLEC-2 также относят гемин, выделяемый эритроцитами при их разрушении [34], и S100A13, который секретируется гладкомышечными клетками кровеносных сосудов при гипоксии [35]. Активация тромбоцитов геминном, предположительно, важна для поддержания стабильности тромбоцитарного агрегата [34]. S100A13 играет скорее патологическую роль, так как он может усиливать активацию тромбоцитов и усугублять тромбозы глубоких вен, при которых наблюдается локальная гипоксия прилежащих тканей [35]. Для выполнения некоторых функций тромбоцитов необходимы одновременно и CLEC-2, и GPVI [29]. Например, показано, что ингибирование CLEC-2 и/или GPVI может привести к локальным кровотечениям, возникающим из-за неспособности тромбоцитов восстановить целостность кровеносного сосуда, нарушенную выходящими из кровотока в ткани иммунными клетками [36].

Тромбоцитам необходима сложная система внутриклеточной сигнализации для выполнения широкого спектра их физиологических функций. Более того, так как тромбоциты являются короткоживущими безъядерными клетками, их способности к быстрой адаптации для выполнения конкретных задач весьма ограничены. Сложная и разветвлённая система внутриклеточной сигнализации тромбоцитов позволяет им выполнять все задачи и своевременно реагировать на повреждения кровеносных сосудов как в условиях низких скоростей тока крови (например, в крупных венах), так и в сосудах с высокими скоростями кровотока (артериях и артериолах) [1; 37].

1.2. Ключевые динамические особенности внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах

Система внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах состоит из двух взаимосвязанных ветвей: G-белковой и тирозинкиназной [19]. Тирозинкиназную сигнализацию в тромбоцитах достоверно могут инициировать всего три рецептора: GPVI, CLEC-2, а также рецептор к иммуноглобулинам G – Fc-рецептор γ типа IIА (Fc γ RIIA) [19]. Последний отсутствует на тромбоцитах мышей, что может быть причиной несколько различающейся между видами конфигурации сетей передачи сигнала [38]. Также показано, что тирозинкиназы в тромбоцитах могут активироваться в результате активации рецепторов GPIb [39] и при кластеризации тромбоцитарных интегринов α _{IIb} β ₃ [40]. GPCR-сигнализация в тромбоцитах запускается значительно большим количеством рецепторов: к G-белковым рецепторам (рецепторам, запускающим активацию G-белков и последующую GPCR-сигнализацию) относят рецепторы к АДФ (P2Y₁, P2Y₁₂), тромбину (протеаза-активируемые рецепторы (PAR) 1 и 4), ТхА₂ (TP-рецептор). Интересно, что некоторые GPCR рецепторы могут инициировать и ингибиторную сигнализацию в тромбоцитах (рецепторы к простагландину I₂ (ПГИ₂) и оксиду азота (II)) [19].

G-белки состоят из 3х субъединиц (G α , G β и G γ). При активации соответствующего рецептора происходит диссоциация G α G β γ комплекса на G α и G β γ [41]. В тромбоцитах присутствует сразу несколько различных типов G α , которые определяют разные типы активационных/ингибиторных сигналов. G α _q (ассоциированы с рецепторами P2Y₁, PAR1, PAR4, TP), инициируя активацию фосфолипаз C β (ФЛС β), запускают кальциевую сигнализацию в тромбоцитах [19]. G α _i субъединицы (ассоциированы с рецептором P2Y₁₂) могут деактивировать аденилат-циклазы и, таким образом, понижать концентрацию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), являющегося негативным регулятором активации тромбоцитов. G α _s (ассоциированы с рецепторами к

ПГИ₂), напротив, активирует аденилат-циклазы, что увеличивает количество цАМФ в цитозоле тромбоцита и приводит к ингибированию тромбоцитов [41]. Gα_{12/13} (могут быть ассоциированы с рецепторами PAR₄) регулируют перестроения актинового цитоскелета, происходящие при изменении формы тромбоцитов в ответ на активацию [41]. Активационный сигнал также может передаваться Gβγ субъединицами, которые инициируют активацию фосфоинозитид-3-киназ типа γ (PI3Kγ), регулирующих активацию фосфоинозитидной ветви сигнализации в тромбоцитах [42].

Ключевыми компонентами тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах являются тирозинкиназы SFK (Fyn, Lyn, Src) и тирозинкиназы Syk [9]. При активации рецепторов GPVI, CLEC-2 и FcγRIIA Syk или SFK фосфорилируют аминокислотные остатки тирозина в их цитоплазматических доменах или ассоциированных с ними белковых цепочек [29]. К фосфорилированным тирозинам своими Src-гомологичными доменами 2го типа (SH-2) присоединяются Syk, становясь активными [43]. Активные Syk запускают кальциевую и фосфоинозитидную ветви сигнализации в тромбоцитах через цепь вторичных передатчиков сигнала [44].

При тромбообразовании тромбоциты подвергаются одновременному воздействию сразу нескольких сигналов, которые могут индуцировать и тирозинкиназную, и GPCR-сигнализацию [23; 26; 29], которые могут синергически усиливать друг друга [19; 41]. При тирозинкиназной сигнализации кальциевые ответы тромбоцитов оказываются значительно замедлены по сравнению с GPCR-сигнализацией [45; 46]. Например, кальциевый ответ тромбоцитов на стимуляцию их коллагеном (активация рецептора GPVI) достигает максимума более чем через 60 секунд [45], в то время как максимум концентрации кальция при стимуляции тромбоцитов АДФ или тромбином (P2Y₁/P2Y₁₂ и PAR₁/PAR₄ рецепторы, соответственно) происходит уже на 5–10 секундах [46; 47] (Рисунок 1.2). С другой стороны, GPCR-индуцированный кальциевый ответ спадает после быстрого достижения максимума, в то время как

при тирозинкиназной сигнализации кальциевый сигнал оказывается более устойчивым [45; 46]. Причины подобных различий могут скрываться как в начальных стадия активации разных ветвей сигнализации.

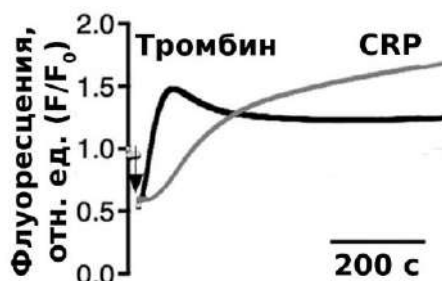


Рисунок 1.2 – Динамика относительной флуоресценции кальций-чувствительного флуорофора Calcium-6, загруженного в тромбоциты здоровых доноров. Тромбоциты были активированы 4 нМ тромбина (чёрная кривая) или 10 мкг/мл коллаген-подобного пептида (CRP; серая кривая). Рисунок адаптирован из [48]

Динамические характеристики GPCR- и тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах позволяют более точно определить роль этих ветвей сигнализации для разных этапов тромбообразования. Начальные фазы тромбообразования, в большинстве случаев, происходят через рецепторы, инициирующие тирозинкиназную сигнализацию – GPIb, GPIIb/IIIa, CLEC-2 [9; 26]. Вторичная активация тромбоцитов (содержимым их α - и δ -гранул, а также TxA₂) индуцирует GPCR-сигнализацию [19]. GPCR-сигнализацию вызывает и тромбин, который нарабатывается ближе к ядру тромба в результате работы плазменного звена свёртывания крови [26]. Исходя из этого можно предположить, что GPCR-сигнализация является усилителем более медленной тирозинкиназной сигнализации, происходящей на начальных фазах тромбообразования. С другой стороны, будучи более медленной, тирозинкиназная сигнализация приведёт к активации тромбоцита только если он провёл достаточное время рядом с областью повреждения, что позволяет избегать «ложной» активации тромбоцита. GPCR-сигнализация также определяет формирование внешних слоёв тромбоцитарного агрегата и играет доминирующую роль для «вертикальной» организации архитектуры тромба [26]. Динамические характеристики G-белковой

сигнализации в тромбоцитах были подробно описаны в литературе ранее [10; 46; 47], в то время как анализ динамики активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах не проводился.

1.3. Начальные стадии CLEC-2/GPVI-индуцированной активации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах

Рецепторы CLEC-2 и GPVI формируют кластеры после связывания с соответствующими лигандами [9; 33]. Динамика формирования кластеров GPVI зависит от типа лиганда: мультимерные лиганды (такие как коллаген-подобный пептид CRP) более эффективно кластеризуют GPVI, нежели мономерные [2]. Аналогичные результаты были получены и для CLEC-2: тетрамерный лиганд CLEC-2 родоцитин (экстракт яда малайской гадюки *Calloselasma rhodostoma*) кластеризует CLEC-2 эффективнее [49; 50], чем мономерный подоплантин [8]. Наиболее крупные кластеры CLEC-2 и GPVI оказываются локализованы в липидных рафтах (микродоменах мембраны тромбоцита, обогащённых холестерином и сфинголипидами) [33; 51]. За счёт холестерина в липидных рафтах значительно снижена скорость диффузии молекул и, таким образом, можно считать, что липидный рафт дополнительно «скрепляет» кластер рецепторов. В липидных рафтах сосредоточено большое количество различных белков-передатчиков сигналов, среди которых, например, LAT-адаптеры [52], фосфатазы CD148 [53], тирозинкиназы Fyn и Lyn (представители SFK). Разрушение липидных рафтов путём пре-инкубации тромбоцитов с холестерино-связывающим агентом метил- β -циклодекстрином ($m\beta CD$) приводило к полному ингибированию CLEC-2 [51] и сильному ослаблению GPVI индуцированной сигнализации в тромбоцитах [54].

Кластеризация рецепторов CLEC-2 также зависит от полимеризации актина и активности тирозинкиназ SFK и Syk [8; 51]. Однако, в отличие от CLEC-2, кластеризация GPVI не зависит от полимеризации актина [51]. Различия в механизмах кластеризации могут объясняться тем, что рецепторы GPVI

ассоциированы с Fc γ R-цепями, которые снижают их «подвижность» в мембранах [29]. Таким образом, различающиеся механизмы кластеризации CLEC-2 и GPVI могут объяснять отличающуюся динамику активации тромбоцитов через данные рецепторы [2; 51]. Одним из соединений, которое может ингибировать как кластеризацию CLEC-2, так и кластеризацию GPVI, является лозартан. Это позволяет предположить наличие некоторых схожих элементов в механизмах кластеризации данных рецепторов [55].

После кластеризации рецепторов CLEC-2/GPVI происходит активация тирозинкиназ Syk и SFK. Механизмы их активации и регуляции определяются их доменной структурой, делающей каждую из киназ уникальной [43]. Среди регуляторных доменов тирозинкиназ встречаются: кальций связывающие домены (C2-домен, EF-«ручки»); домены, узнающие определённые аминокислотные последовательности (SH2, SH3, иммуноглобулин-подобные домены); мембрана-связывающие домены (плекстрин-гомологичный домен (PH), SH4, C1); актин-связывающие домены [43; 56]. Доменная структура тирозинкиназ Syk и SFK приведена на Рисунке 1.3.A. Эти тирозинкиназы представляют собой переключатели разного типа: SFK являются градуированными переключателями (активация их доменов ведёт к поступательному усилению их активности); Syk являются переключателями типа «ИЛИ» (их активация может происходить разными путями, каждый из которых приводит к максимальной степени активности киназы) [43].

SFK – семейство тирозинкиназ, из которого в тромбоцитах ключевую роль играют Src, Fyn и Lyn [57]. Данные киназы состоят из 4х основных доменов: каталитического домена, проводящего фосфорилирование, а также 3х регуляторных SH2, SH3, SH4 [43; 57] (Рисунок. 1.3.A). SH2-домен SFK киназ позволяет им связываться с фосфорилированными остатками тирозина в аминокислотных последовательностях различных белков (например, с последовательностью YxxL в составе иммунных тирозин-активируемых мотивов ITAM) [58]. SH3 домен необходим SFK для связывания с полипролиновыми

регионами (хРРхР) в белках [59]: благодаря доменам SH3 SFK киназы могут ассоциироваться с В-клеточными (BCR) и GPVI рецепторами [60]. SH4-домен SFK киназ необходим для их локализации в примембранных регионах: к данному региону присоединяются остатки пальмитиновой или меристиновой кислот, которые являются гидрофобными и, потому, позволяют SFK оказаться «заякоренной» в мембране [57]. Тирозинкиназы Fyn и Lyn ассоциированы с остатками пальмитиновой кислоты, что определяет их локализацию в упорядоченных мембранных регионах, к которым относят липидные рафты [57]. Таким образом, связываясь с GPVI своими SH3 доменами, Fyn и Lyn могут способствовать локализации GPVI в липидных рафтах [57]. Тирозинкиназы Src, напротив, из-за ассоциации с меристиновой кислотой, оказываются локализованы за пределами упорядоченных мембранных микродоменов [57].

Активация тирозинкиназ SFK протекает по следующей схеме: изначально SFK находятся в ингибированном состоянии. Фосфатаза CD148 проводит их дефосфорилирование, что переводит их в активное состояние на $\frac{1}{4}$ [43; 57]. Затем SFK могут присоединиться освободившимися SH3 и SH2 доменами к белкам-мишеням, что последовательно переведёт их в на $\frac{3}{4}$ активное состояние. После этого развёрнутые SFK могут перейти в максимально активное состояние путём аутофосфорилирования [43]. Фосфатаза CD148 помимо первичного дефосфорилирования SFK также может дефосфорилировать и SFK в максимально активном состоянии, делая эти киназы на $\frac{3}{4}$ активными (Рисунок 1.3.Б) [43].

Syk состоят из трех доменов: одного каталитического и двух SH2-доменов [61] (Рисунок 1.3.А). Показано, что к активации Syk приводит одновременное связывание двух их SH2-доменов с фосфорилированными остатками тирозина в последовательностях YxxL [43; 61]. С другой стороны, Syk могут быть активированы и путём фосфорилирования их линкерного домена между киназным и первым из SH2-доменов [61] (Рисунок 1.3.В). Данная реакция может быть проведена как SFK, так и активными Syk [5].

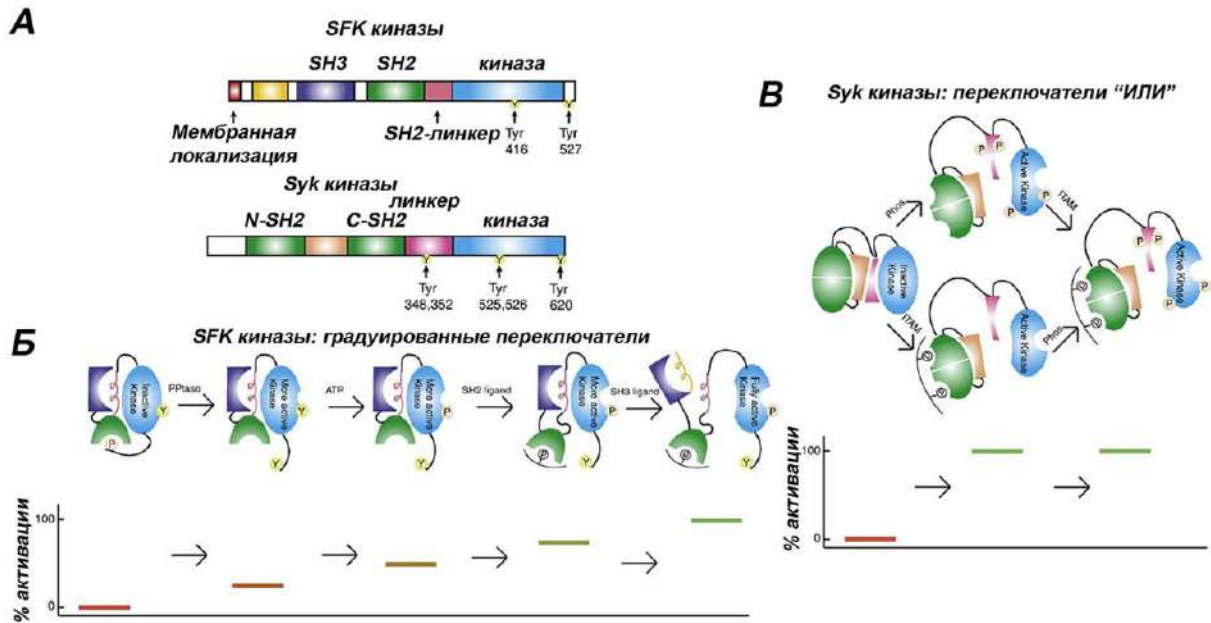


Рисунок 1.3 – Механизмы активации ключевых для сигнализации в тромбоцитах тирозинкиназ. А – доменная структура тирозинкиназ SFK и Syk. Б, В – Схемы активации молекулярных переключателей разных типов: тирозинкиназ SFK – градуированных переключателей (Б); Syk – переключателей «ИЛИ» (В). Рисунок адаптирован из [43]

В покоящихся тромбоцитах содержатся значительные количества активных тирозинкиназ SFK [57], а также небольшое количество активных Syk [5]. При связывании с лигандом и кластеризации SFK фосфорилируют аминокислотные остатки тирозина в ассоциированных с GPVI FcγR-цепях, несущих на себе ITAM [60]. ITAM-мотив содержит в себе две аминокислотные YxxL последовательности, разделённые 6–12ю аминокислотами [62]. К фосфорилированным ITAM двумя SH-2 доменами присоединяются и становятся активными Syk киназы [43]. Благодаря способности активных Syk активировать покоящиеся Syk, возникает положительная обратная связь (Рисунок 1.4).

В отличие от GPVI в цитоплазматическом домене CLEC-2 присутствует только одна аминокислотная последовательность YxxL (hemITAM мотив). Также у CLEC-2 отсутствует полипролин-обогащённый регион, что не позволяет тирозинкиназам SFK связываться с ним [5; 8]. Предположительно, из-за этого CLEC-2 индуцированная активация тромбоцитов в большей степени зависит от кластеризации рецепторов, нежели активация тромбоцитов через рецептор GPVI.

Также увеличивается значимость локализации CLEC-2 в липидных рафтах, так как в них присутствует большое количество других сигнальных молекул [8]. После активации и кластеризации CLEC-2 фосфорилируется Syk киназами [5]. Затем к фосфорилированным CLEC-2, становясь активными, присоединяются неактивные Syk в соотношении 2 рецептора на одну киназу (Рисунок 1.4) [63; 64].

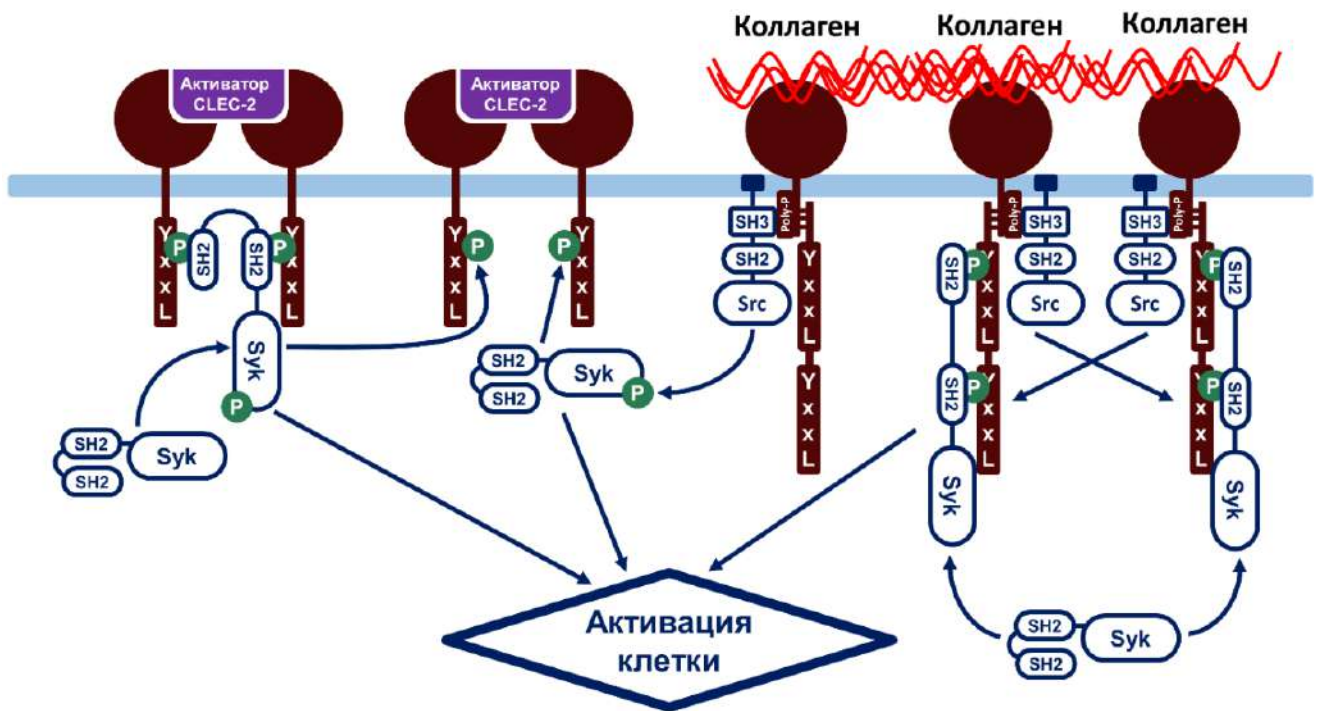


Рисунок 1.4 – Схема внутриклеточной сигнализации при инициации тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Рецепторы CLEC-2 и GPVI передают сигнал через одну и ту же сеть тирозинкиназ, однако внутриклеточные домены CLEC-2 фосфорилируются тирозинкиназами Syk, а внутриклеточные домены GPVI тирозинкиназами SFK. Кроме того, фосфорилирование CLEC-2 замедленно по сравнению с фосфорилированием GPVI из-за отсутствия ассоциации между Syk и CLEC-2 в покоящихся тромбоцитах. Активация Syk запускает дальнейшую кальциевую сигнализацию в тромбоцитах при активации обоих сигнальных путей. Рисунок разработан автором

1.4. Механизмы распространения внутриклеточного сигнала в тромбоцитах от тирозинкиназ

Активные Syk являются одним из ключевых звеньев цепи распространения активационного сигнала в тромбоцитах [65; 66]. Syk киназы фосфорилируют мембранный адаптерный белок LAT, вокруг которого начинает формироваться

комплекс сигнальных ферментов, которые образуют LAT-сигнаლოსому [65]. Ключевыми компонентами LAT-сигнаლოსомы являются ФЛС γ 2 и P13K β , присоединяющиеся к фосфорилированным LAT своими SH-2 доменами [44]. P13K β состоит из двух субъединиц – регуляторной p85 (содержащей SH-2 домен) и каталитической p110 β субъединиц [40]. Присоединившись к LAT, P13K β активируются и начинают фосфорилировать ФИФ $_2$, производя фосфоинозитол-3,4,5-трифосфат (ФИФ $_3$). К находящемуся на мембране ФИФ $_3$ своим PH-доменом присоединяется тирозинкиназа Брутона (Vtk) [43], а также серин/треонин киназы Akt, отвечающие за изменение формы и дегрануляцию тромбоцитов [44]. Помимо PH, в составе Vtk есть SH3, SH2 и киназный домены [43]. После связывания PH домена с ФИФ $_3$ Vtk связываются с фосфорилированными LAT SH2 доменами [40; 44]. Роль SH3 домена Vtk киназ в настоящий момент малоизучена. Предполагается, что SH3 может быть необходим для притягивания к сигнаლოსомам рецепторных комплексов или же тирозинкиназ SFK, в последовательности которых также присутствуют полипролин-обогащённые регионы [67]. Таким образом, вероятно, SH3 домен позволяет киназам Vtk играть роль адаптерных белков. Связывание SH2 и PH доменов активирует Vtk. Активные Vtk фосфорилируют ФЛС γ 2, находящиеся в составе LAT-сигнаლოსомы. ФЛС γ 2 одновременно связаны с дополнительными адаптерами, такими как гуанодинотрифосфат обменный фактор семейства vav и SH-2 содержащий лимфоцитарный белок-76 (SLP-76) [44; 62]. Фосфорилирование ФЛС γ 2 делает их активными. Для активации ФЛС γ 2 также необходимы малые гуанодинтрифосфат гидролазы (ГТФазы) Ras, ингибирование которых нарушает как CLEC-2, так и GPVI индуцированную сигнализацию в тромбоцитах [51].

В настоящее время для терапии лейкозов активно применяется сразу несколько фармакологических ингибиторов Vtk киназ [68]. Согласно некоторым литературным данным, значимость Vtk для CLEC-2 индуцированной сигнализации несколько выше, нежели для GPVI [69; 70]. С другой стороны, различия могут быть обоснованы большей зависимостью CLEC-2

индуцированной сигнализации в тромбоцитах от вторичной сигнализации, частично регулируемой Vtk [51].

Активные $ФЛС\gamma 2$ (также как и активные $ФЛС\beta$) гидролизуют $ФИФ_2$, производя $ИФ_3$ и диацилглицерин (ДАГ) [46; 71]. $ИФ_3$ связывается с $ИФ_3R$ на поверхности эндоплазматического ретикулула тромбоцитов (ЭПР), активируя их. Через $ИФ_3R$ из ЭПР в цитозоль тромбоцитов выходят свободные ионы кальция [10]. Свободные ионы кальция при этом могут связываться с $ИФ_3R$ и приводить к его закрытию. Обратно из цитозоля в ЭПР кальций закачивается за счёт активности саркоплазматической/эндоплазматической АТФазы (SERCA) на поверхности ЭПР [10; 46]. Таким образом, повышение кальция в цитозоле тромбоцитов в ответ на активацию происходит не равномерно, а осцилляторным образом [10]. Свободные ионы кальция также участвуют и в активации $ФЛС\gamma 2$, так как у этого фермента есть кальций-чувствительные EF-домены. Таким образом, выход свободных ионов кальция из ЭПР также является положительной обратной связью для реакции активации $ФЛС\gamma 2$ [72].

ДАГ остаётся в мембране и становится важным посадочным сайтом для всех ферментов, содержащих $C1$ домен [73]. Наиболее подробно охарактеризованными ферментами, активируемыми ДАГ, являются серин/треонин киназы протеин-киназы C (PKC): при связывании с ДАГ PKC активируются и регулируют изменение формы и дегрануляцию тромбоцитов [73]. Человеческие тромбоциты также экспрессируют несколько диацилглицерин киназ (DGK), ответственных за остановку сигнализации от ДАГ. Ингибирование DGK ослабляет кальциевые ответы тромбоцитов на активацию, что подчёркивает значимость ДАГ для внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах [74].

Тромбоциты также экспрессируют липидные фосфатазы (фосфатаза с двойной субстратной специфичностью (PTEN), SH-домен содержащие инозитолфосфат фосфатазы (SHIP) 1,2), которые, снижая уровень $ФИФ_3$, подавляют $PI3K$ -зависимую активацию тромбоцитов [75; 76]. Исследования тромбоцитов мышей показывают, что SHIP1 играет значимую роль в контроле

концентрации ФИФ₃ при активации тромбоцитов тромбином или коллагеном [77]. SHIP1 также является важным регулятором активации тромбоцитарных интегринов [78], однако есть и обратные сведения [76]. Также показано, что дефицит SHIP1 приводит к сильному увеличению уровней ФИФ₃ и сопутствующему снижению ФИФ₂, что нарушает кальциевую сигнализацию [40].

1.5. Регуляция ключевых функциональных ответов тромбоцитов

Покоящиеся тромбоциты являются дисковидными клетками, которые при активации последовательно изменяют форму на шарообразную, выпускают филоподии, ламеллиоподии и, наконец, распластываются [1; 24]. Изменение формы с дисковидной на шарообразную происходит в результате сжатия и деполимеризации микротрубочек, свёрнутых в катушки, идущих по периметру покоящихся тромбоцитов [79; 80]. В покоящихся тромбоцитах клубок микротрубочек находится под влиянием моторных белков кинезина и динеина, которые действуют антагонистически и не приводят к скольжению микротрубочек между собой [81; 82]. После активации высокая концентрация внутриклеточного кальция усиливает активность динеина и снижает активность кинезина, позволяя динеину работать и запуская скольжение микротрубочек вдоль друг друга, что вызывает расширение спирали микротрубочек [81; 82]. Из-за ограниченного пространства внутри тромбоцита расширяющиеся микротрубочки сворачиваются и свертываются в центр активированного тромбоцита, изменяя морфологию тромбоцитов в сторону сферической формы [81]. Перестроение актинового цитоскелета при изменении формы также является кальций-управляемым процессом [41]. Свободные ионы кальция и активные РКС запускают активацию малых ГТФаз Rho, Rac и Cdc42 через активацию соответствующих гуанидиновых обменников (GEF'ов) [83; 84].

Одновременно с изменением формы происходит дегрануляция тромбоцитов. Регуляция выхода тромбоцитарных гранул осуществляется, в основном, SNARE-белками, которые обеспечивают слияние липидных бислоев гранул и внешней мембраны тромбоцитов [85]. Активность SNARE-белков, в

свою очередь, контролируется набором белков-шаперонов, которые связываются с комплексом SNARE и направляют его. Ключевым для секреции гранул является повышение концентрации свободных ионов кальция: большинство белков, участвующих в процессе секреции гранул, обладают либо C2-доменом, либо EF-ручками [86]. Одним из кальциевых сенсоров при секреции гранул является Munc13-4, обладающий двумя кальций-связывающими доменами: C2A и C2B. C2A через кальций связывает Munc 13-4 со SNARE-белками, обеспечивающими взаимодействие гранул с плазматической мембраной. С другой стороны, C2B кальций-зависимым образом связывает Munc13-4 с липидными мембранами [87]. Синаптотагмин-подобные белки (Slp) представляют собой другое семейство Ca^{2+} /фосфолипид-связывающих белков, которые содержат кальций-чувствительные C2-домены и домен гомологии синаптотагмин-подобных белков, активирующий Rab27 [88]. Rab27 связывается с Munc13-4: в связанном с Rab27 состоянии Munc13-4 может присоединяться к липидным мембранам и соединять их между собой [89]. В секреции гранул также участвуют кальций-чувствительные белки кальмодулин и кальциклин [90]. Кальмодулин связывается с α -гранулами тромбоцитов, и кальций-кальмодулин-зависимое фосфорилирование легкой цепи миозина способствует секреции гранул тромбоцитов за счёт сокращения актомиозина [91].

Ключевой функциональный ответ тромбоцитов – агрегация, реализуется благодаря тромбоцитарным интегринам $\alpha_{IIb}\beta_3$ [26]. При активации тромбоцитов происходит активация $\alpha_{IIb}\beta_3$, которые связывают фибриноген, с которым могут связываться и другие тромбоциты. Таким образом, между тромбоцитами образуются «мостики» $\alpha_{IIb}\beta_3$ -фибриноген- $\alpha_{IIb}\beta_3$. Как и другие представители семейства интегринов, $\alpha_{IIb}\beta_3$ интегрин представляет собой две подвижные субъединицы, каждая из которых состоит из внеклеточного домена, трансмембранного региона и короткой цитоплазматической аминокислотной последовательности [92]. Внешний регион интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ состоит из β -пропеллера и нижележащих бедра и доменов calf1 и calf2. Изменение положения

$\alpha_{IIb}\beta_3$ относительно β_3 при активации интегринов возможно благодаря гибкой гидрофобной последовательности между бедром и *calfl* доменом [93]. Трансмембранный регион $\alpha_{IIb}\beta_3$ состоит из двух скрещенных спиралей, которые скрывают аминокислотную последовательность GFFKR в покоем состоянии. При активации происходит высвобождение GFFKR, и она становится доступной для посадки ряда белков эффекторов [94].

Активированные интегрины $\alpha_{IIb}\beta_3$ способны связывать ряд лигандов: фибриноген, фибрин, ФВ. Показано, что сайты связывания фибриногена и ФВ на интегрингах отличаются [95]. Повышение концентрации свободных ионов кальция приводит к активации кальций-диацилглицерол зависимого гуанадинового обменного фактора Igo типа (CalDAGGEFI), обладающего двумя кальций-чувствительными EF-ручками [96]. В аминокислотной последовательности CalDAGGEFI также есть C1 домен, однако его специфичность является спорной [97]. Показано, что пациенты с мутациями в C1 домене CalDAGGEFI обладают фенотипом, напоминающим тромбастению Гланцмана – наследственное заболевание, для которого характерен дефицит или полное отсутствие интегринга $\alpha_{IIb}\beta_3$. Мутация в C1 домене CalDAGGEFI у данных пациентов приводит к нарушению локализации этого белка на мембране и неспособности участвовать в нормальной активации интегринов [97].

Активированный CalDAGGEFI катализирует реакцию обмена ГДФ на ГТФ в сайте связывания нуклеотидов малой ГТФазы Rap1b [98]. Rap1b-ГТФ может спонтанно инактивироваться в результате гидролиза ГТФ, однако эта реакция значительно ускоряется в присутствии активаторов ГТФазной активности (GAP) Rap1b – Ras-ГТФаза активирующего белка 3 (RASA3) [98]. RASA3 содержит PH-домен, который может связываться как с ФИФ₂, так и с ФИФ₃, что определяет его локализацию на плазматической мембране тромбоцита [99]. Таким образом, локализация RASA3 может измениться при инициации синтеза ФИФ₃ в результате активности PI3K: показано, что кластеры ФИФ₃ в мембранах тромбоцитов являются менее плотными по причине электростатических

взаимодействий, и из-за этого RASA3 оказывается «оттянутой» от CalDAGGEFI и Rap1b [100]. При этом наработка DAG и ИФ₃ снижает локальную концентрацию доступного для связывания RASA3 ФИФ₂. DAG и ИФ₃ в этих регионах приводят к накоплению активных CalDAGGEFI, в то время как ФИФ₃ «уводит» RASA3 [97]. Подобная система пространственно-временных взаимодействий между сигнальными системами в тромбоцитах приводит к формированию пула долгоживущих активных Rap1b. Активный Rap1b совместно с Rap1-ГТФ-связывающим адаптером (RIAM) и талином-Н приводит к переходу $\alpha_{IIb}\beta_3$ -интегринов в активное состояние [96; 98] (Рисунок 1.5). С другой стороны, фосфорилирование CalDAGGEFI протеин-киназой А (PKA; незначительно активной в покоящихся тромбоцитах) ингибирует CalDAGGEFI и последующую активацию Rap1b. Это позволяет подавлять случайную активацию $\alpha_{IIb}\beta_3$ -интегринов в покоящихся тромбоцитах [96].

После активации и перехода в высокоаффинное к лигандам состояние $\alpha_{IIb}\beta_3$ -интегрины начинают формировать кластеры в результате взаимодействия с фибриногеном и фибрином. Это приводит к дополнительному усилению активации тромбоцитов - передаче сигналов outside-in [40; 101]. Цитоплазматические домены активированных интегринов связаны с актиновым цитоскелетом через комплексы талина и киндлина 3. После активации клетки большая часть сигнальных молекул перемещается за счет диффузии или реконструкции актинового цитоскелета. Таким образом, кластеры интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$ могут образовывать гетерокластеры с другими рецепторами, такими как GPIIb, GPVI, Fc γ RIIa [102; 103], что приводит к накоплению активных SFK киназ вблизи цитоплазматических регионов $\alpha_{IIb}\beta_3$. SFK фосфорилирует тирозиновые остатки в мотивах интегринна NxxY, к которым присоединяются и активируются Syk. Это становится положительной обратной связью при активации тромбоцитов [101]. Неоднократно было продемонстрировано, что дефицит GPVI или Fc γ RIIa снижает $\alpha_{IIb}\beta_3$ -зависимое усиление активации тромбоцитов по outside-in пути и нарушению роста тромба у нокаутных по соответствующим генам мышей.

Кластеризованные и фосфорилированные интегрины $\alpha_{IIb}\beta_3$ могут активировать Syk-киназы независимо от GPVI или Fc γ RIIa [103; 104]. С другой стороны, показано, что фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматическом домене β_3 -цепи не является принципиально необходимым для активации Syk через данный сигнальный путь [105].

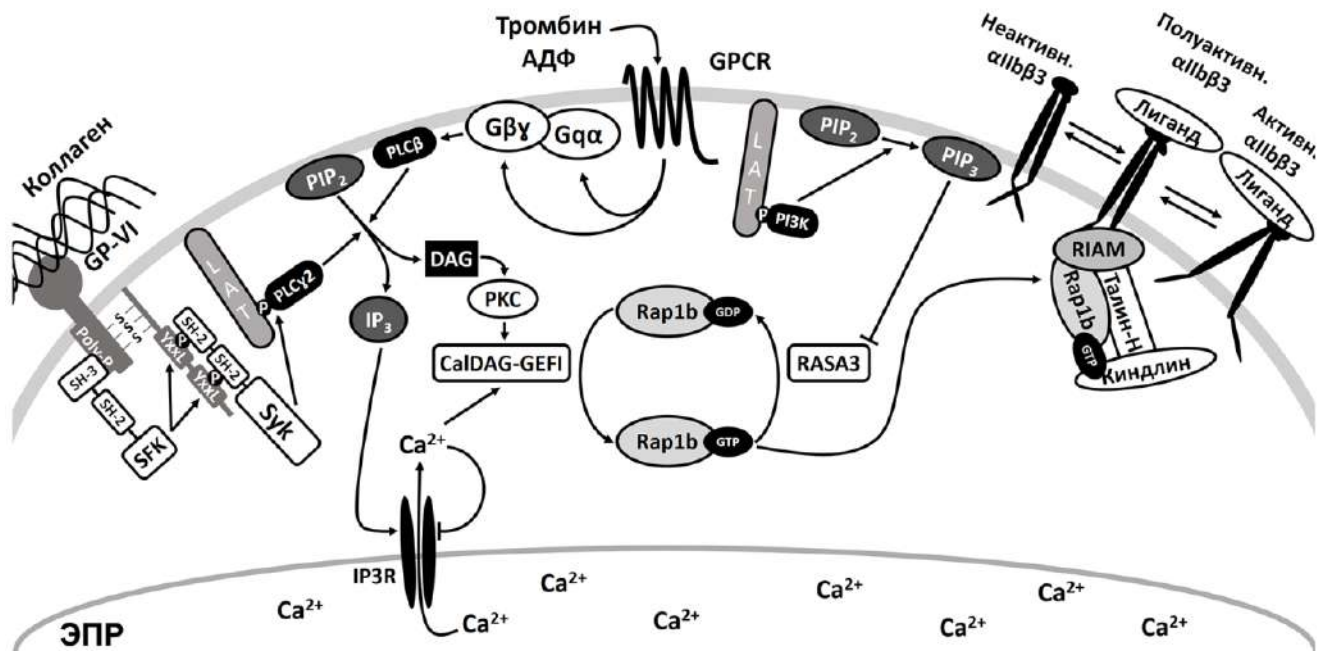


Рисунок 1.5 – Схематическое изображение inside-out пути активации тромбоцитарных интегринов. При инициации кальциевой сигнализации от тирозинкиназной (например, от рецептора GPVI) или GPCR (например, от рецепторов к тромбину/АДФ) ветвей сигнализации происходит активация гуанадинового обменного фактора CalDAGGEFI в результате его связывания с кальцием и локализации на мембране. Активный CalDAGGEFI заменяет ГДФ на ГТФ в каталитическом сайте малой GТФазы Rap1b. Это приводит к её активации. RASA3, GAP Rap1b, проводящий ускорение гидролиза ГТФ в активном сайте Rap1b, при этом ингибируется за счёт активности PI3K, нарабатывающей ФИФ $_3$. ГТФ в ГТФазном сайте Rap1b приводит к её активации и запуску перехода в активное состояние тромбоцитарных интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$. Рисунок разработан автором

1.6. Теоретические подходы к описанию активации тромбоцитов

Методы *in silico* играют все более заметную роль во всех областях биологических наук на разных уровнях исследований и разработок [106]. Биоинформатика, молекулярная динамика и компьютерный дизайн лекарств

стали широко используемыми инструментами. По сравнению с ними разработка полноценных *in silico* моделей физиологических и патологических процессов отстает: эта «конечная» цель теоретической биологии и сейчас остается сложной задачей. Компьютерные модели гемостаза и тромбоза в настоящее время используются как в фундаментальных исследованиях, так и в персонализированной диагностике. В настоящее время существует три основных направления разработки компьютерных моделей в области гемостаза: модели адгезии тромбоцитов, модели передачи сигналов тромбоцитов и модели биохимии свертывания крови [107].

Первые компьютерные модели свёртывания появились ещё в 1989 году [108], в то время как первые модели тромбообразования с достаточно сложными механизмами адгезии тромбоцитов были разработаны десятью годами позже [109].

В первую очередь, с помощью теоретических моделей, был подробно исследован энергетический метаболизм в тромбоцитах [110]. В 1986 году Варфоломеев и др. построили кинетическую схему обмена тромбоксана и родственных липидов, учитывающую активность ферментов фосфолипазы A2 и простагландин H-синтазы [111]. Хотя модель была построена как система дифференциальных уравнений, она анализировалась только в стационарном состоянии, а главный вывод заключался в том, что система может удерживаться в равновесии в широком диапазоне кинетических параметров.

Две дополнительные модели [112; 113] были построены и исследованы с помощью стехиометрического анализа, главный принцип которого состоит в том, что система всегда находится в устойчивом состоянии, а стехиометрия реакций определяет распределение веществ между возможными маршрутами. Tomas и соавт. [112] построили стехиометрическую метаболическую модель общего метаболизма тромбоцитов, включающую тысячу реакций, основанную на геномных, протеомных и биохимических данных. Ограничения в связи с малыми количествами специфических ферментов в тромбоцитах не применялись из-за большого количества реакций. Модель была применена к данным о метаболизме

меченных изотопами энергетических субстратов, полученных в работе [114]. Влияние предполагаемой устойчивости к аспирину на метаболизм тромбоцитов было оценено с учетом того, что должно быть перенаправление потоков реакций метаболизма жирных кислот и нуклеотидов, необходимых чтобы приспособиться к синтезу эйкозаноидов и стрессу активных форм кислорода.

Шепелюк и соавт. [113] исследовали энергетический метаболизм тромбоцитов и учли ограничения на потоки реакций как следствие ограниченных количеств специфических метаболических ферментов, присутствующих в тромбоцитах. Эта модель была применена для описания результатов экспериментальных работ по метаболизму тромбоцитов, опубликованных между 1970 и 1990 годами. Главный вывод заключался в том, что покоящиеся тромбоциты не используют свои митохондрии, поскольку большая часть глюкозы превращается в лактат. Энергетический метаболизм тромбоцитов во время активации не был широко исследован на тот момент из-за некоторых противоречий в экспериментальных результатах, но было сделано предположение, что митохондрии не способны метаболизировать всю накопленную глюкозу. Описанные подходы к стационарному моделированию метаболизма тромбоцитов могут быть полезны после получения необходимых экспериментальных данных.

Первые теоретические работы, описывающее внутриклеточную индуцированную внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах после активации их АДФ была представлена Purvis и соавт. в 2008 году [115]. В модели рассматривалась активация тромбоцитов через рецептор $P2Y_1$, ассоциированный с $G_{\alpha q}$ субъединицами. Как и большинство моделей внутриклеточной сигнализации, модель Purvis была разработана помодульно:

1. активация G-белкового рецептора $P2Y_1$;
2. метаболизм фосфоинозитидов (PI);
3. высвобождения кальция из ЭПР;
4. инактивация ФЛСβ РКС-зависимым образом.

Модуль активации $P2Y_1$ рецептора в данной модели был основан на общем представлении о типичных GPCR-рецепторах, однако для валидации модели использовались экспериментальные данные, соответствующие тромбоцитам. За первой моделью Purvis и соавт. последовал резкий рост числа моделей, которые фокусировались на других элементах внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах.

С точки зрения исследования внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах наибольший интерес вызывает кальциевая сигнализация [116]. Модель Purvis и соавт. описывает выход кальция из ЭПР тромбоцитов через $ИФ_3P$ и его возврат в ЭПР через насосы SERCA. В литературе существует несколько моделей $ИФ_3P$, однако для тромбоцитов данные модели плохо согласуются с экспериментальными данными. Purvis и соавт. использовали модель $ИФ_3P$ из работы Lenosi и соавт. [117]. Возвращение кальция из цитозоля через SERCA, как и во многих других математических моделях, предполагает насыщение при высоких уровнях цитозольного кальция. Модуль метаболизма фосфоинозитидов описывает динамику концентраций $ФИФ$, $ФИФ_2$ и $ФИФ_3$, гидролиз $ФИФ_2$ до $ИФ_3$, а также возврат $ИФ_3$ в плазматическую мембрану. Чтобы устранить расхождение между предсказаниями модели для фосфоинозитидов и экспериментальными данными, описывающими поведение фосфоинозитидов в тромбоцитах, авторами была введена отрицательная обратная связь от протеинкиназы C (активируемой ДАГ) к $ФЛС\beta$ (продуцирующей ДАГ). Большая часть параметров модели была получена авторами на основе доступных литературных данных. С другой стороны, неизвестные параметры, а также неизвестные начальные концентрации белков-участников сигнального каскада были подобраны таким образом, чтобы предсказываемые моделью кальциевые ответы соответствовали экспериментальным. Компьютерная модель могла описывать поведение системы как в покое, так и при активации тромбоцитов АДФ. Также на основе модели была получена первая оценка объема ЭПР тромбоцитов [115].

Следующей значимой моделью внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах стала модель тромбинового рецептора тромбоцитов PAR1,

предложенная Leposi и соавт. [17]. Важной особенностью данной работы стало то, что авторы учитывали не только активацию $G_{\alpha q}$ в тромбоцитах, но и последующие функциональные ответы тромбоцитов: активацию интегринов $\alpha_{IIb}\beta_3$, а также высвобождение плотных гранул [118]. Данная модель, состоящая из 60 ОДУ, хорошо описывает доступные экспериментальные данные.

На основании этих работ Свешникова и соавт. разработали модель инициации кальциевых осцилляций в тромбоцитах при активации PAR1 [119]. Предложенная модель стала первой, описывающей поступление кальция в цитозоль как из ЭПР, так и извне тромбоцита. Анализ чувствительности модели показал, что кальциевые осцилляции в тромбоцитах развиваются из-за нелинейного ответа ИФ₃P при связывании с ИФ₃. Модель Свешниковой и соавт. также стала первой, учитывающей способность тромбоцитов переходить в прокоагулянтное состояние: в модель были включены митохондрии, кальциевый унипортер, натрий-кальциевый обменник и возможность формирования митохондриальной поры при перегрузке митохондрий свободными ионами кальция. Модель предсказала, что при сильных колебаниях кальция в цитозоле тромбоцитов происходит коллапс митохондрий. Это позволяет объяснить экспериментально наблюдаемую синергию между двумя рецепторами тромбоцитов, PAR1 и P2Y₁₂: оба рецептора регулируют активацию ФЛС β - PAR1 посредством G_q, а P2Y₁₂ ингибируя активацию антагониста ФЛС β РКА. Предсказанная моделью роль РКА для митохондриально зависимого некроза тромбоцитов была доказана экспериментально [47].

Годом позже той же группой была разработана ещё одна модель внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах, с помощью которой были проанализированы роли тромбиновых рецепторов тромбоцитов PAR1 и PAR4 [46]. Модель предсказала, что два PAR-рецептора необходимы тромбоцитам для обеспечения чувствительности к широкому диапазону концентраций тромбина от 0,1 нМ до 100 нМ [46]. Теоретические расчёты были подтверждены экспериментально посредством проточной цитометрии.

Dunster и соавт. [120], используя схожий с [121] подход, разработали модель ранних стадий передачи сигнала при активации рецептора GPVI. Для валидации модели авторы использовали собственные данные по количественному фосфорилированию Syk киназ в тромбоцитах в ответ на их активацию CRP. С помощью анализа модели авторы смогли дифференцировать конкурирующие биологические гипотезы касательно регуляции начальных этапов активации GPVI. Авторы показали, что Syk играет основную роль для GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах, однако, на более поздних этапах сигнализации Syk помимо активации может запускать и ингибиторные ответы, регулируя активацию специфической тирозинфосфатазы T-клеточного убиквитин-лиганда 2 (TULA-2). Активация TULA-2 ослабляла итоговый активационный ответ тромбоцита [120].

Важно подчеркнуть, что сигнальные сети тромбоцитов содержат множество петель положительной и отрицательной обратной связи. Хотя некоторые из них были включены в описанные модели, их влияние на результаты моделирования не всегда исследовалось. Работы Балабина и Свешниковой [10] и Данстер и др. [120] являются исключением. Было показано, что два механизма обратной связи могут влиять на форму кальциевых ответов тромбоцитов при стимуляции их через рецептор PAR1 [10].

Таким образом, можно сделать вывод, что теоретическое моделирование внутриклеточной кальциевой сигнализации в тромбоцитах позволяет идентифицировать ключевые регуляторные механизмы, важные для понимания функционирования данной системы в норме и патологии. Однако, в отличие от метаболизма тромбоцита, в настоящий момент понимание внутриклеточной сигнализации значительно ограничено, в то время как предсказания теоретических моделей могут значительно улучшить понимание принципов функционирования тромбоцитов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные методы исследования

2.1.1. Используемые материалы

В работе были использованы следующие материалы: кальций чувствительные мембрано-проницаемые флуорофоры Fura Red, AM (Molecular Probes, Eugene, США); фукоидан из *Fucus vesiculosus*, АДФ, ПГИ₂, этиленгликоль-бис-тетраацетовая кислота (ЭГТА), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), бычий сывороточный альбумин (БСА), апираза степени очистки VII, m β CD, антитела PY20 (Sigma-Aldrich, St Louis, США); NaCl, CaCl₂, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄ (Агат-Мед, Москва, Россия), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, вторичные антитела, конъюгированные с флуоросцеин-изотиоционатом (FITC) (Имтек, Москва, Россия). Родоцитин из *Calloselasma rhodostoma* был предоставлен профессором Йоханнесом Эбле (Университет гор. Мюнстер, Мюнстер, Германия). Цистеин-содержащий вариант CRP был предоставлен профессором Р.В. Фарндейлом (Университет гор. Кембриджа, Кембридж, Великобритания).

2.1.2. Включение в исследование взрослых здоровых доноров

Здоровые доноры, мужчины и женщины от 18 до 35 лет были включены в исследование для анализа тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах. Работа проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией, информированные согласия на участие в исследовании в письменной форме были получены от всех доноров. Исследование было одобрено независимым этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (решение 1_2018-1 от 12.01.2018).

2.1.3. Включение в исследование пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой и педиатрических здоровых доноров

В исследование были включены пациенты, проходившие лечение на базе НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (7 пациентов с КГЭ, возрастом от 3 до 36 месяцев, медиана возраста составила 11 месяцев). Ключевым критерием включения в исследование было присутствие КГЭ. Пациенты, получавшие

переливание тромбоконцентратов в течение 3х недель до включения в исследование, не были включены. Возраст и схемы лечения КГЭ влияли на решение о включении или не включении пациента в исследование. Здоровые педиатрические доноры были включены в исследование в качестве контрольной группы (5 здоровых детей, возрастом от 4 до 43 месяцев, медиана возраста составила 21 месяц). Протокол исследования был одобрен независимым этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (решение 3/1-21 от 05.10.2021). От законных представителей каждого из включённых в исследование детей было получено подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией. Для исследования у каждого из пациентов/доноров забиралось не более 1,6 мл цельной крови из локтевой вены в вакуумные гирудин-содержащие пробирки (525 МЕ/мл).

2.1.4. Удаление холестерина из мембран тромбоцитов

Удаление холестерина из мембраны тромбоцитов проводилось путём инкубации выделенных из цельной крови тромбоцитов с различными концентрациями $m\beta CD$ в течение 15 минут при 37°C [122].

2.1.5. Вестерн-блот анализ внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах

Для экспериментов по вестерн-блоттингу кровь здоровых доноров забиралась из локтевой вены в цитрат-содержащие (3,8 % по объёму) вакуумные пробирки. К цельной крови добавлялось 1:9 по объёму АСД (85 мМ цитрата натрия; 66,6 мМ лимонной кислоты; 111 мМ Д-глюкозы). Затем проводилось центрифугирование цельной крови при 200 g в течение 8 минут. Полученная богатая тромбоцитами плазма (БТП) была отобрана над осевшими эритроцитами, а затем центрифугирована в течение 10 минут при 1000 g. Супернатант отбирался, а осевшие тромбоциты ресуспендировались в буфере Тирода с гирудином (100 МЕ/мл) и 500 нМ ПГИ₂ до начального объёма. Затем к полученной суспензии было добавлено 1:9 по объёму АСД и проведено центрифугирование в течение 10 минут при 1000 g. Осевшие тромбоциты вновь были разведены в буфере Тирода с

гирудином и ПГИ₂ до начального объёма, а затем проведено финальное центрифугирование при 1000 g в течение 10 минут. Полученные тромбоциты были ресуспендированы в модифицированном буфере Тирода (134 mM NaCl; 0,34 mM Na₂HPO₄; 2,9 mM KCl; 12 mM NaHCO₃; 20 mM HEPES; 5 mM глюкозы; 1 mM MgCl₂; pH 7,3) до концентрации 1,5 x 10⁹ тромбоцитов/мл. Тромбоциты были активированы фукоиданом (1 мкг/мл, 10 мкг/мл и 100 мкг/мл) в течение 0-15-30-60-90-120-150-180-300 секунд при 25°C или при 37°C. Активация тромбоцитов проводилась при их перемешивании с частотой 1000 оборотов в минуту. Реакция была остановлена добавлением буфера для нанесения (200 mM Tris-HCl pH6,8; 400 mM β-меркаптоэтанол; 4 % додецилсульфат натрия (SDS); 0,01 % бромфеноловый синий; 40 % глицерол). Образцы были нагреты до 95°C в течение 10 минут для денатурации белка в пробах и затем центрифугированы при 15000 g в течение 10 минут для удаления клеточных остатков.

Полученные образцы были загружены в 10 % акриламид/бис-акриламидные гели для разделения белков и последующего переноса на поливинилиден дифлуоридные (PVDF)-мембраны. После переноса белков мембраны блокировались 5 % (по массе) раствором БСА в буфере TBST (20 mM Трис; 150 mM NaCl; 0,1 % Твин-20). Первичные (антитела к фосфорилированным остаткам тирозина, клон PY20) и вторичные антитела (конъюгированные с пероксидазой хрена) были разведены в TBST, содержащем 2 % (по массе) БСА (финальные концентрации антител 1 мкг/мл), и затем последовательно инкубированы с мембранами, на которые были нанесены образцы, в течение 1,5 часа при комнатной температуре. Между нанесениями антител мембраны по 4 раза инкубировались с TBST в течение 10 минут для смыва несвязавшихся антител. Для детекции хемилюминисценции мембраны с белками были обработаны реагентом ECL-Prime (General Electric, США). Хемилюминисценция детектировалась с помощью аппарата Gel Doc XR+ (BioRad, США). Перед нанесением контрольных антител мембраны были обработаны буфером для стрипирования 2 раза по 30 минут (250 mM глицин; 0,2% SDS; 0,1% Твин-20; pH

2,2), 2 раза по 10 минут в фосфатном буфере (PBS), 2 раза по 5 минут в TBST, а затем вновь заблокированы в течение 30 минут 2% (по массе) раствором БСА в TBST. Затем на мембрану были нанесены антитела к тубулину (1 мкг/мл) и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена.

2.1.6. Анализ иммунофлуоресценции в тромбоцитах методом конфокальной микроскопии

Для иммунофлуоресцентного микроскопного анализа кровь взрослых здоровых доноров забиралась из локтевой вены в 4,5 мл вакуумные пробирки, содержащие 3,8 % цитрата натрия (1:9 по объёму к цельной крови). К цельной крови затем была добавлена апираза (0,1 МЕ/мл). БТП была получена при центрифугировании цельной крови при 100 g в течение 8 минут [64]. К БТП был добавлен цитрат натрия (27 мМ) и затем было проведено центрифугирование при 400 g в течение 5 минут. Полученный супернатант был отобран, а осевшие тромбоциты ресуспендированы в буфере Тирода (150 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 0,4 мМ NaH₂PO₄; 5 мМ HEPES; 5 мМ глюкозы; 0,2 % БСА; pH 7,4) до концентрации 1×10^8 тромбоцитов/мл.

Отмытые тромбоциты были активированы фукоиданом (100 мкг/мл) при 25°C (с или без mβCD) или при 37°C и фиксированы 4 % параформальдегида (ПФА) через 30, 60, 90, 120, 300 секунд после активации. Тромбоциты, инкубированные с 5 мкг/мл CRP или буфером, были использованы в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Фиксированные тромбоциты были отмыты от ПФА путём трёх последовательных центрифугирований (1000 g, 10 минут), ресуспендированы в PBS-БСА буфере и проинкубированы с поли-L-лизин (0,1 % в MQ, Sigma Aldrich, США) покрытыми покровными стёклами в течение 90 минут при 37°C. Неадгезировавшие тромбоциты были удалены путём аккуратной промывки стёкол с помощью PBS. Зафиксированные на стёклах тромбоциты были затем пермеабелизированы 0,2 % Тритоном-X100 в присутствии 2 % БСА и фетальной сыворотки плазмы козы. После пермеабелизации тромбоциты были проинкубированы с 2,5 мкг/мл антител

к фосфорилированным LAT (Abcam, США) в течение 90 минут при комнатной температуре. После смывания первичных антител тромбоциты были инкубированы со вторичными антителами, конъюгированными с (FITC), в течение 90 минут в тёмной комнате при комнатной температуре. После смывки вторичных антител клетки были пост-фиксированы 4% ПФА в течение 10 минут. Образцы были окончательно фиксированы в среде Dako fluoromount (Agilent, США). Образцы анализировались в конфокальном режиме на микроскопе Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Типичные результаты приводятся на Рисунке 2.1.

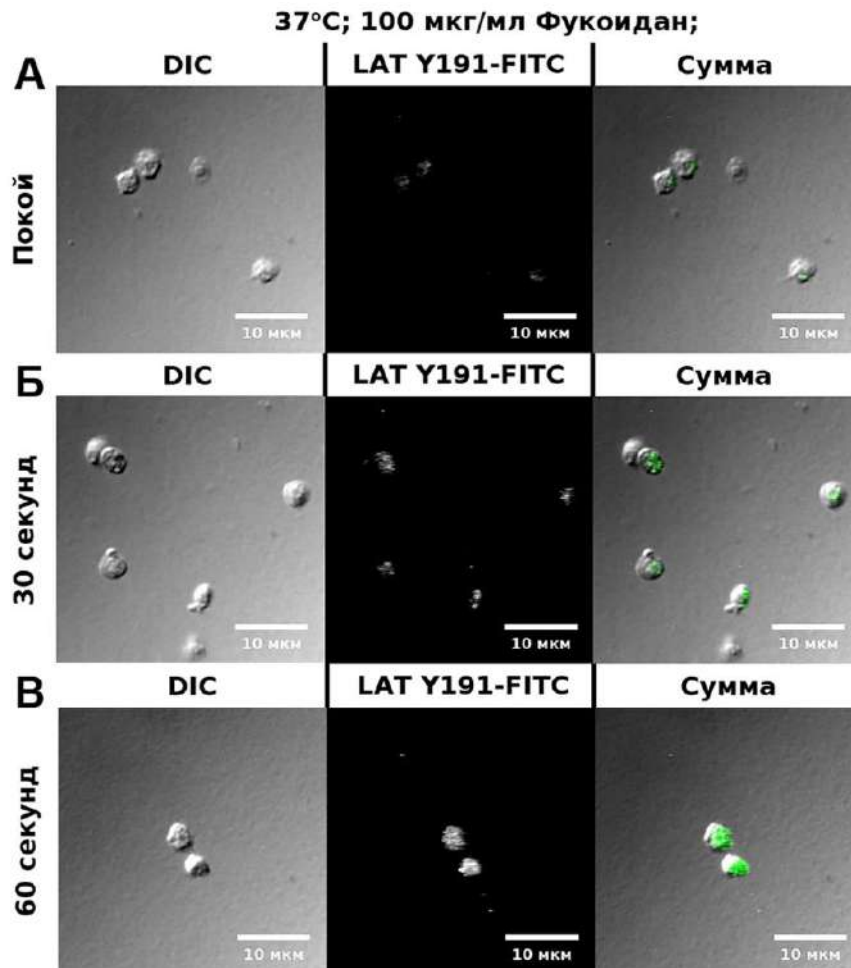


Рисунок 2.1 – Типичные результаты анализа иммунофлуоресценции в тромбоцитах методом конфокальной микроскопии. А – Покоящиеся тромбоциты здорового донора. Б,В – Тромбоциты при 37°C были активированы 100 мкг/мл фукоидана, реакция была остановлена через 30 (Б) или через 60 (В) секунд. Приводятся данные в дифференциально-интерференционном контрасте (DIC),

флуоресценция антител к LAT Y191-FITC, а также объединённое изображение (сумма). Рисунок разработан автором

2.1.7. Исследование кальциевой сигнализации в тромбоцитах методом проточной цитометрии

Экспериментальное исследование CLEC-2 индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах здоровых взрослых доноров проводилось на отмытых тромбоцитах. Тромбоциты были отмыты аналогично тромбоцитам для иммунофлуоресцентного анализа (см. раздел 2.1.6). Отмытые тромбоциты инкубировались с 2 мкМ Fura Red в присутствии апиразы (0,1 МЕ/мл) в течение 30 минут при 37°C. Затем тромбоциты отмывались от краски путём центрифугирования (400 g 5 минут) и ресуспендирования в буфере Тирода с кальцием до концентрации тромбоцитов 1000 тромбоцитов/мкл. Полученные образцы загружались в проточный цитометр BD FACS Canto II или BD FACS Aria (BD Biosciences, Сан Хосе, США) и анализировались в динамическом режиме. Через 60 секунд после начала анализа делалась 20 секундная пауза, во время которой к тромбоцитам добавлялся активатор, а затем образцы вновь загружались в цитометр для анализа.

Кальциевая сигнализация в тромбоцитах педиатрических доноров и пациентов, а также GPVI-индуцированная активация тромбоцитов здоровых взрослых доноров проводилась с помощью оптимизированного протокола по исследованию тромбоцитов в цельной крови [123; 124]. Ключевым преимуществом данного подхода является его возможность значительно снизить объёмы экспериментальных образцов, получаемых от доноров, а также сохранить наиболее «нативные» условия для тромбоцитов. Цельная гирудинированная кровь (не более 500 мкл) инкубировалась с 2 мкМ Fura Red в присутствии 0,5 МЕ/мл апиразы в течение 35 минут при 37°C. За это время происходило осаждение эритроцитов, и богатая лейкоцитами плазма (БЛП) разводилась в 20 раз буфером Тирода с 2 мМ кальция. Полученные образцы разводились до концентрации 1000 тромбоцитов/мкл и анализировались на проточном цитометре BD FACS Canto II в

непрерывном режиме с перерывами в 20 секунд для добавления активаторов. Процесс пробоподготовки описан приведён на Рисунке 2.2.

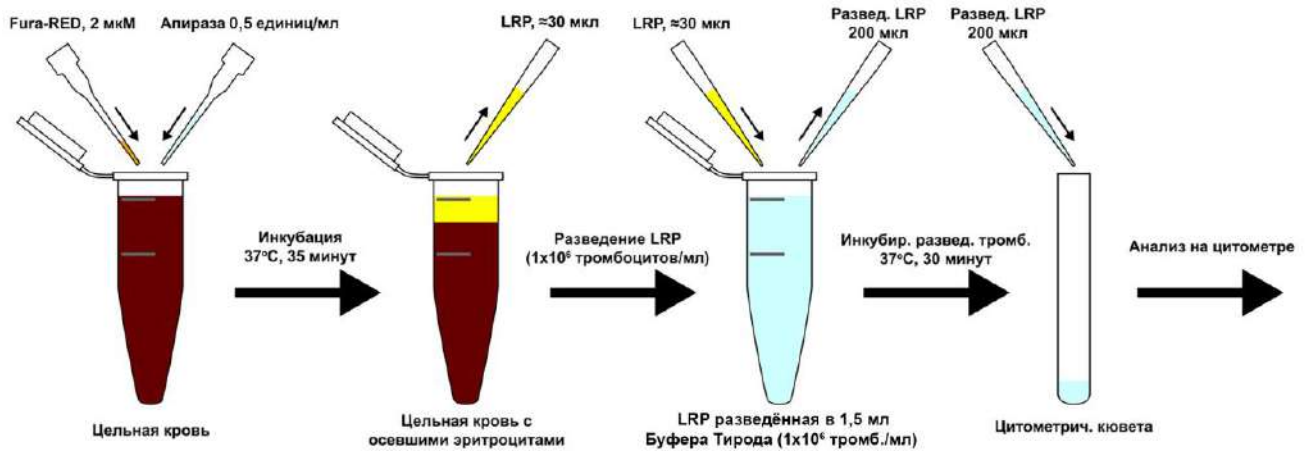


Рисунок 2.2 – Процесс пробоподготовки цельной крови для исследования кальциевой сигнализации в тромбоцитах. Рисунок разработан автором. LRP – богатая лейкоцитами плазма

Fura Red является ратиометрическим флуорофором: при возбуждении лазером длины волны 488 нм, флуоресценция излучается Fura Red, не связанной с кальцием, в то время как при возбуждении лазером длины волны 405 нм, флуоресценция излучается Fura Red, связанной с кальцием [124; 125]. Первичный сигнал флуоресценции усреднялся по одной секунде (Рисунок 2.3 А, усреднение – синие линии). Отношение среднего сигнала флуоресценции связанной с кальцием Fura Red к среднему сигналу флуоресценции не связанной с кальцием Fura Red было пересчитано в среднюю концентрацию кальция в цитозоле тромбоцита по формуле Гринкевича [126]:

$$[Ca_{Free}^{2+}] = K_D^{FuraRed} \times \frac{FI_{Max}}{FI_{Min}} \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}, \quad (2.1)$$

где $K_D^{FuraRed}$ – константа диссоциации Fura Red и свободных ионов кальция; FI_{Max} , FI_{Min} – максимальная и минимальная интенсивность флуоресценции не связанной с кальцием Fura Red, соответственно; R – отношение сигналов связанной и не связанной с кальцием Fura Red; R_{max} , R_{min} – максимальное и

минимальные значения \overline{R} , соответственно. Значения $\overline{FI_{Min}}$ и $\overline{R_{min}}$ были получены после добавления к образцам 1 мкМ иономицина. После инкубации с иономицином в течение 1 минуты к тромбоцитам было добавлено 10 мМ ЭГТА. Так как данная концентрация не может полностью связать свободные ионы кальция в цитозоле тромбоцитов в наших условиях, полученная по формуле Гринкевича концентрация кальция была нормирована на теоретическое значение концентрации кальция, получаемое при 2 мМ кальция и 10 мМ ЭГТА в буфере при заданных температуре, рН и ионной силе буфера [127]. Таким образом, сигнал Fura Red был преобразован в среднюю концентрацию кальция в цитозоле тромбоцитов (Рисунок 2.3 Б).

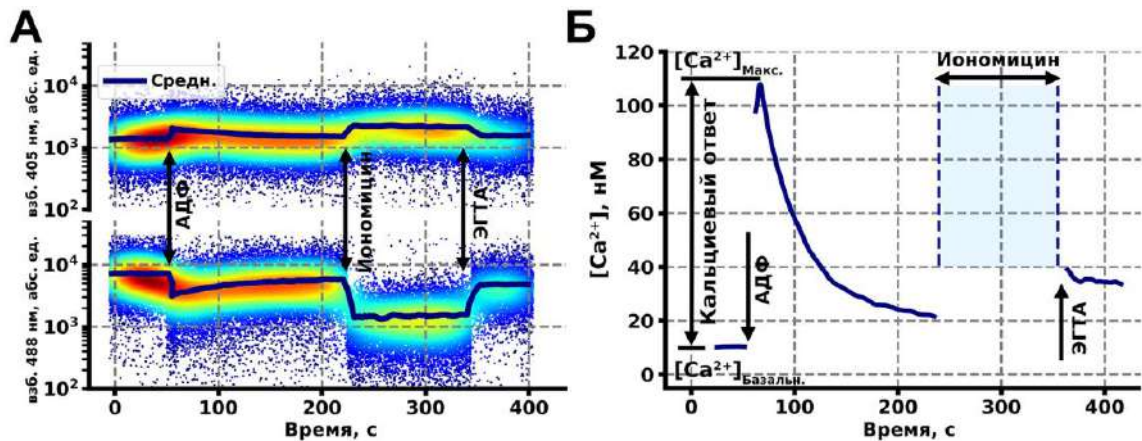


Рисунок 2.3 – Пересчёт флуоресценции Fura Red в среднюю концентрацию кальция в цитозоле. А – Типичная картина флуоресценции не связанной (возбуждаемой лазером длины волны 488 нм) и связанной (возбуждаемой лазером длины волны 405 нм) Fura Red. Тёмно синие линии – усреднённый сигнал флуоресценции. На 60 секунде к образцам было добавлено 2 мкМ АДФ, через 180 секунд был добавлен 1 мкМ иономицина, а затем, через 120 секунд было добавлено 10 мМ ЭГТА. Б – Средняя концентрация кальция в цитозоле тромбоцита, пересчитанная из флуоресценции Fura Red. Рисунок разработан автором

2.1.8. Обработка и анализ данных

Экспериментальные данные по вестерн-блоттингу и флуоресцентной микроскопии обрабатывались с помощью программного обеспечения ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Для обработки данных проточной цитометрии

использовалось программное обеспечение FlowJo (<https://www.flowjo.com/>), а также Python 3.8.

Для оценки размера кластеров CLEC-2 и GPVI были использованы экспериментальные данные из [8] и [2], соответственно. Абсолютный размер кластеров был получен исходя из флуоресценции соответствующих антител: было предположено, что она пропорциональна количеству рецепторов на кластер. Также было предположено, что только мономеры и димеры CLEC-2 и GPVI присутствуют на поверхности покоящихся тромбоцитов.

Статистическая обработка данных проводилась в Python 3.8. Для сравнения между выборками использовался критерий Манна-Уитни. Данные о значимости различий приводятся в описаниях к соответствующим рисункам.

2.2. Теоретические методы исследования

Разрабатываемые модели представляли собой системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ), описывающих кинетику концентраций веществ, участвующих в реакциях в соответствующих компартментах. Каждое из ОДУ описывает скорости изменения концентраций веществ. Для описания реакций ассоциации-диссоциации соединений, а также для описания ферментативных реакций был использован закон действующих масс. Ферментативные реакции описывались с помощью кинетики Михаэлиса-Ментен. В некоторых случаях для описания реакций были использованы эмпирические законы, полученные исходя из механистических представлений о реакциях.

Модели представляли собой набор обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающих динамику концентраций веществ. Разработка и анализ моделей кластеризации рецепторов в мембранах тромбоцитов проводился в Python 3.8, модели интегрировались методом LSODA. После исследования модель кластеризации рецепторов была перенесена в COPASI в качестве одного из подмодулей. Начальные условия для моделей были взяты из доступных данных по протеомному составу тромбоцитов [75]. Каждый из наборов дифференциальных уравнений был проинтегрирован с помощью метода LSODA

[128], встроенного в программное обеспечение COPASI. Параметры модели были получены либо из литературы (Приложение А), либо путём аппроксимации экспериментальных данных следующими методами: метод роя частиц [129], метод Хука и Дживса [130], метод Ловенберга-Маркуарта [131].

Чувствительность модели к неизвестным параметрам была оценена как:

$$Score = \frac{O_a - O_i}{O_a}, \quad (2.2)$$

где O_i и O_a являются выходным оцениваемым параметром модели (например, стационарное состояние концентрации активных Syk киназ) при начальном значении параметров (полученных при подборе параметров) и при смещенном значении параметров, соответственно.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК CLEC-2-ИНДУЦИРОВАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ

3.1. Помодульное построение модели CLEC-2 индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах

3.1.1. Теоретические подходы для описания кластеризации рецепторов

Кластеризация мембранных рецепторов – один из первых этапов инициации внутриклеточных сигнальных каскадов в различных клетках [132; 133; 134]. Регуляция кластеризации рецепторов может осуществляться как на уровне внутриклеточной сигнализации (например, за счёт реорганизации цитоскелета клетки [132]), так и за счёт конформационных изменений в молекуле рецептора, вызванных связыванием рецептора с лигандом [135] и приводящих к изменению аффинности молекул рецепторов друг по отношению к другу [136]. Увеличение концентрации активированных рецепторов приводит к усилению первоначального сигнала [137; 138; 139; 140] за счёт увеличения аффинности рецепторов к лигандам [141; 142; 143], усиления активации внутриклеточных сигнальных ферментов [144] или же за счёт других механизмов [145].

Существуют различные подходы для кинетического описания процесса кластеризации рецепторов [146; 147; 148; 149; 150; 151; 152]. Одним из часто используемых подходов является метод клеточных автоматов [148]: система представляется как сетка из ячеек, каждая из которых может иметь конечное количество «состояний». Каждая из клеток эволюционирует в соответствие с набором законов, описывающих эволюцию системы во времени. Метод клеточных автоматов является одним из наиболее точных способов описания кластеризации рецепторов, однако размерность сетки значительно ограничивает его [153]: при переходе от двумерных систем к трёхмерным, а также при увеличении количества кластеризующихся рецепторов, модель становится избыточно ресурсоёмкой [152]. Исходя из этого, применение метода клеточных автоматов редко рассматривается для описания более сложных систем, учитывающих внутриклеточную сигнализацию [154; 155].

Другим наиболее известным методом описания процессов кластеризации и/или агрегации является подход на основе уравнения коагуляции-фрагментации Смолуховского [146; 147; 150; 151]. Например, Fornari и соавт. [147], на основе уравнения Смолуховского, разработали модель распространения агрегатов некорректно свёрнутых белков в мозге человека, которая помимо агрегации белков учитывала также их транспорт вдоль аксонов. С другой стороны, предложенная авторами модель учитывала присоединение/отсоединение только мономерных белков, что не соответствует экспериментам. Таким образом, предложенная модель не могла быть обобщена для описания широкого ряда процессов агрегации. Аналогичный подход для описания агрегации белков с учётом конформационных изменения в мономерах, процессов коагуляции и обратимости агрегации небольших агрегатов был применён Zidar и соавт [156].

3.1.2. Модель кластеризации рецепторов CLEC-2/GPVI на поверхности тромбоцитов

В первую очередь, для описания динамики кластеризации рецепторов была использована модель на основе уравнения Смолуховского (модель из N-уравнений; Рисунок 3.1). Кластеризация частиц могла быть коротко записана как: $\overline{A_i + A_j} \leftrightarrow \overline{A_{i+j}}$, для $i, j \geq 1$, где $\overline{A_i}$, $\overline{A_j}$, $\overline{A_{i+j}}$ означают агрегаты размеров i , j и $i+j$, соответственно. Параметры образуют матрицы коагуляции ($a_{i,j}$) и фрагментации ($f_{i,j}$) или же «ядра» в терминологии теории Смолуховского. Предполагается, что с точки зрения кинетики реакции $\overline{A_i + A_j} \leftrightarrow \overline{A_{i+j}}$ и $\overline{A_j + A_i} \leftrightarrow \overline{A_{i+j}}$ были одинаковы. Средний размер кластера оценивался как:

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n c_i i}{\sum_{i=1}^n c_i} \quad (3.1)$$

где $\overline{c_i}$ – концентрация кластеров размера i . Способность модели из «N-уравнений» описывать как кластеризацию, так и распределение кластеров рецепторов по размерам на поверхности различных клеток (тромбоцитов, нейтрофилов) была подтверждена в работе [153].

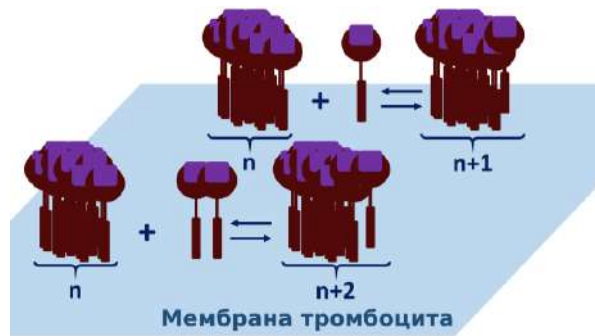


Рисунок 3.1 – Схема модели кластеризации рецепторов тромбоцитов, учитывающая в явном виде динамику концентраций кластеров всех размеров. Рисунок разработан автором

Модель из «N-уравнений» достаточно сложно имплементировать в более масштабные модели биологических процессов из-за большого количества параметров и переменных. В качестве альтернативы модели из «N-уравнений» была использована сокращённая модель из «2х-уравнений», не учитывающая динамику кластеров рецепторов каждого размера в явном виде [153; 157]: в модели учитывается динамика только отдельных рецепторов и их кластеров. Считается, что после активации одиночные рецепторы начинают формировать кластеры, к которым могут присоединяться новые одиночные рецепторы или их кластеры. Кластеры могут распадаться на кластеры меньшего размера или на кластер и мономер. Математически кластеризация рецепторов описывается на основе системы из 2х уравнений, описанных в работе [157] (Рисунок 3.2). В данном подходе описывается динамика концентраций свободных рецепторов CLEC-2, комплексов рецептор-лиганд и кластеров рецепторов CLEC-2 (3 переменных, компартмент - плазматическая мембрана), фукоидана (1 переменная, компартмент - внеклеточное пространство). Модель включает в себя 7 параметров, среди которых 4 описывают динамику кластеризации рецепторов (Таблицы А.1-А.3).

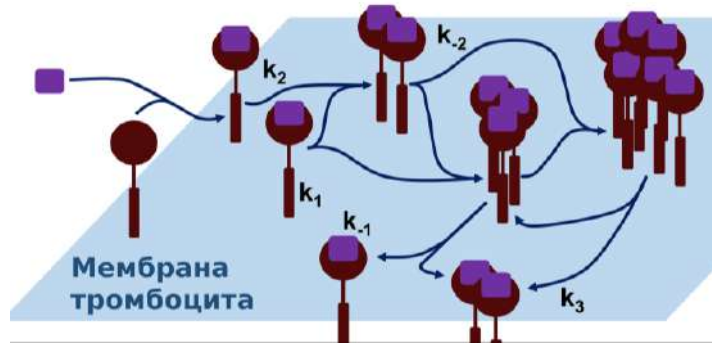


Рисунок 3.2 – Схема модели кластеризации рецепторов тромбоцитов, описывающая динамику концентраций кластеров рецепторов в неявном виде. Рисунок разработан автором

Средний размер кластера в «модели из 2х-уравнений» рассчитывался как:

$$s = \frac{C_0^* - C^*}{C^{Clust}}, \quad (3.2)$$

где C_0^* - начальная концентрация некластеризованных рецепторов CLEC-2, C^* - промежуточная концентрация некластеризованных рецепторов CLEC-2 и C^{Clust} - промежуточная концентрация кластеризованных CLEC-2.

Как модель из «N-уравнений», так и модель из «2х уравнений» хорошо описывали доступные из литературы экспериментальные данные по кластеризации рецепторов CLEC-2 и GPVI в мембране тромбоцитов (Рисунок 3.3 А и Б, соответственно). Значения критерия Акаике для моделей из «N-уравнений» и из «2х уравнений» были одинаковы [153]. Так как модель из «2х уравнений» является менее ресурсоёмкой, чем модель из «N-уравнений», а также более адаптирована для имплементации в полную модель внутриклеточной сигнализации, именно модель из «2х уравнений» была выбрана в качестве одного из подмодулей модели тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах.

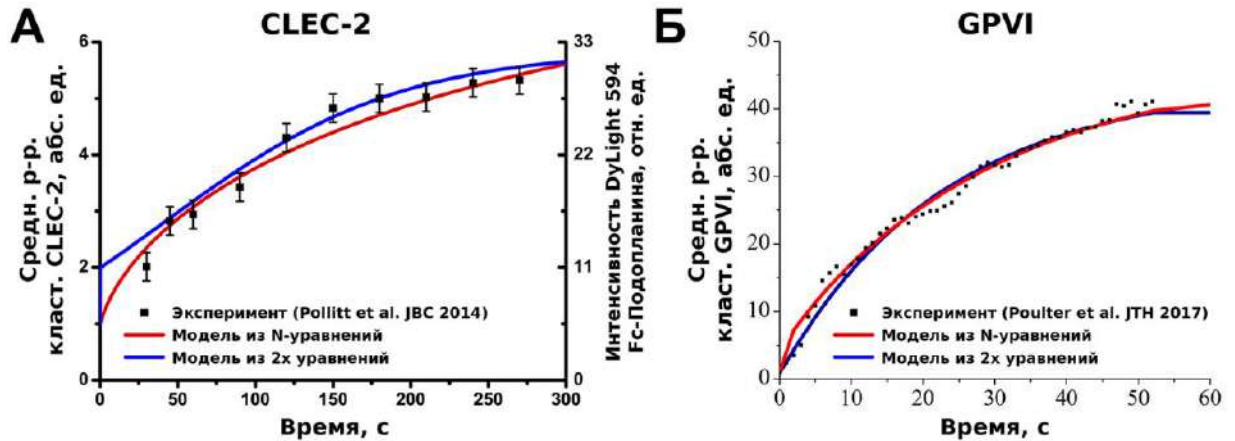


Рисунок 3.3 – Описание экспериментальных данных (чёрные точки) по кластеризации рецепторов CLEC-2 (А) и GPVI (Б) на тромбоцитах при их активации подоплатином и коллагеном, соответственно. Красные кривые – результаты расчёта модели из N-уравнений, синие кривые – результаты расчёта модели из 2х уравнений. Рисунок разработан автором

3.1.3. Оценка влияния режимов кластеризации рецепторов на внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах

При исследовании модели кластеризации рецепторов было получено, что схожей динамике среднего размера кластеров (Рисунок 3.4А) может соответствовать 2 различных режима кластеризации. При режиме кластеризации 1 большая часть мономеров рецепторов быстро переходила в кластеры, в то время как при режиме кластеризации 2, наоборот, большая часть рецепторов оставалась в виде мономеров (Рисунок 3.4Б). Таким образом, можно предположить, что при режиме кластеризации 1 происходит быстрое формирование большого числа кластеров малых размеров, которые затем растут, что обеспечивает увеличение среднего размера кластеров и уменьшение их общего количества [64]. С другой стороны, при режиме кластеризации 2, наоборот, наблюдается медленное формирование небольшого количества кластеров, в то время как большая часть молекул CLEC-2 остаются мономерами (Рисунок 3.4 Б,В). Сравнение параметров двух режимов кластеризации приведено в Таблице А.3.

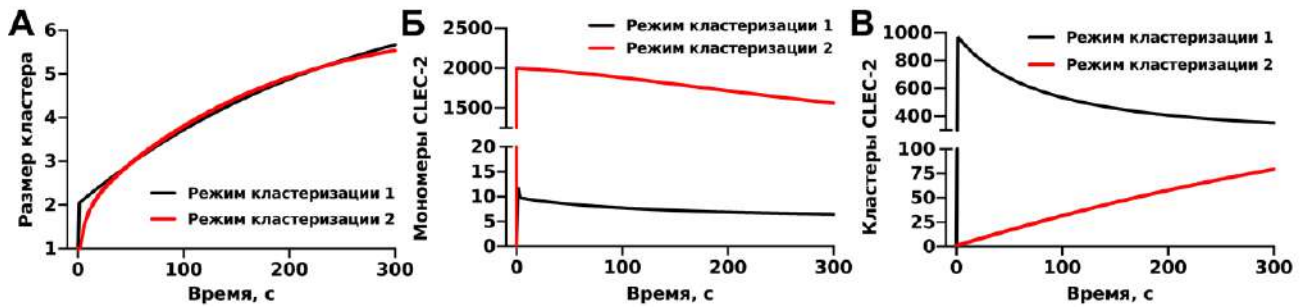


Рисунок 3.4 – Различные режимы кластеризации рецепторов позволяют получить одинаковую динамику среднего размера кластеров (А), при которой значительно различается динамика количества мономеров (Б) и кластеров (В) рецепторов. Рисунок разработан автором

3.1.4. Последовательность биохимических реакций в тромбоцитах, происходящая при активации и кластеризации рецепторов CLEC-2

После кластеризации связавшихся с лигандами рецепторов CLEC-2 запускается каскад реакций внутриклеточной сигнализации. Компьютерная модель описывает поведение концентраций веществ в 3 отдельных компартментах: внеклеточном пространстве, на плазматической мембране тромбоцита, в цитозоле (см. Таблицу 1). Помимо модуля кластеризации рецепторов, описанного в разделах 3.1.2-3.1.3 модель состояла ещё из 3х модулей: модуль «Покоящееся состояние» (см. Таблицы А.4–А.5), описывающий CD148 регулируемую активацию SFK и Syk; модуль «Тирозинкиназы» (см. Таблицы А.4–А.5), описывающий фосфорилирование CLEC-2 и активацию Syk; модуль «LAT-ФЛСγ2» (см. Таблицы А.6–А.7), описывающий формирование LAT-сигнасомы и активацию PI3K и ФЛСγ2 .

Модуль «Покоящееся состояние» описывает взаимодействие компонентов каскада рецептора CLEC-2 в неактивированных тромбоцитах. Схема модуля приведена на Рисунке 3.5. Модуль состоит из переменных для концентраций активной и покоящейся фосфатазы CD148 (2 переменные); активных и покоящихся Csk (2 переменные); SFK в состояниях разной степени активности: неактивные, активные на 1/3 и активные на 2/3 (3 переменные); активные и покоящиеся Syk-киназы (2 переменные); активные и покоящиеся TULA-2 (2 переменные). В модуле содержится 19 параметров, общих с модулем

«Тирозинкиназы». Неизвестные параметры были подобраны так, чтобы в стационарном состоянии цитозоле поющих тромбоцитов присутствовало 5% активных киназ Syk и 10% активных киназ SFK [5; 158]. Начальные условия модуля приведены в Таблице А.4, уравнения и параметры модуля приведены в Таблице А.5.

Таблица 1 – Геометрические параметры модели CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах

название	название параметра	значени е	источник
объём внутриклеточного пространства	V_{EC}	3,3 мкл	[120]
размер плазматической мембраны	S_{PM}	45 мкм ²	[159] Соотношение $\frac{S_{PM}}{V_{Cyt}}$ сохранено
объём цитозоля	V_{Cyt}	4,5 фл	из [160]

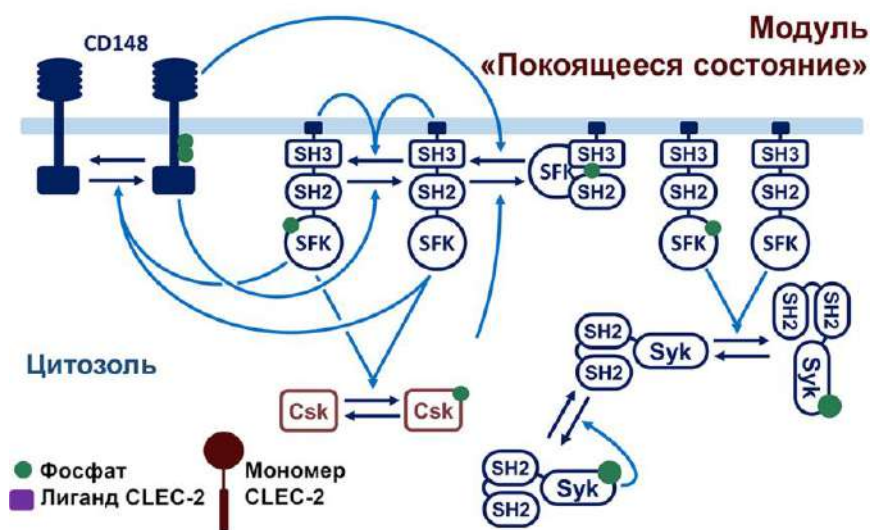


Рисунок 3.5 – Схема модуля «Покоящееся состояние»: постоянно активные фосфатазы CD148 производят 1/3-активные SFK, Csk киназы, напротив, деактивируют 1/3-активные SFK, 1/3-активные SFK аутофосфорилируются и

становятся 2/3 активными, CD148 возвращают SFK в 1/3-активное состояние из 2/3 активного. Все формы активных SFK киназ фосфорилируют Syk-киназы, активируя их. Syk киназы также активируют неактивные Syk. Темно-синие линии обозначают реакции преобразования вещества; голубые линии обозначают катализ. Рисунок разработан автором

После активации и кластеризации рецепторов CLEC-2 происходит их фосфорилирование тирозинкиназами Syk, что является первой реакцией модуля «Тирозинкиназы». Активация Syk и SFK в модели зависит от среднего размера кластеров CLEC-2. Схема модуля «Тирозинкиназы» приведена на Рисунке 3.6. Модуль включает переменные для концентраций активных и неактивных тирозинкиназ Syk (2 переменные); неактивные, 1/3-активные, 2/3-активные и полностью активные SFK (4 переменные); фосфорилированные и нефосфорилированные кластеризованные рецепторы CLEC-2 (2 переменные); активные и неактивные TULA-2 фосфатазы (2 переменные). Неизвестные параметры модуля были подобраны на основе данных о количествах активных Syk [161] и SFK [162] после активации тромбоцитов различными агонистами рецепторов CLEC-2. Начальные условия модуля приведены в Таблице А.4, уравнения и параметры модуля приведены в Таблице А.5.

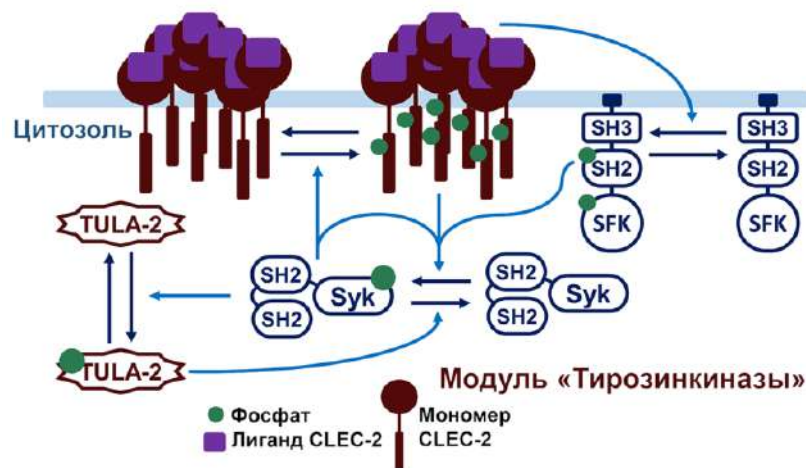


Рисунок 3.6 – Схема модуля «Тирозинкиназы»: после формирования кластера активированных рецепторов CLEC-2 активные Syk фосфорилируют тирозин в hemITAM-домене в CLEC-2, неактивные Syk или 2/3-активные SFK связываются с фосфорилированными hemITAM (Syk связывается с двумя рецепторами, SFK с одним) своими доменами SH2. После этого Syk и SFK

становятся полностью активными, активные Syk активируют фосфатазы TULA-2, ингибирующие Syk. Данная реакция является цепью отрицательной обратной связи. Темно-синие линии обозначают реакции преобразования вещества; голубые линии обозначают катализ. Рисунок разработан автором

Активные Syk фосфорилируют LAT-адаптеры. Эта реакция является первой для модуля «LAT-PLC γ 2». Схема модуля приведена на Рисунке 3.7. Модуль состоит из переменных для концентраций активных Syk (1 переменная); фосфорилированных и нефосфорилированных LAT (2 переменные); комплексов LAT-ФЛС γ 2 (1 переменная), LAT-ФЛС γ 2-PI3K (1 переменная), концентраций фосфоинозитидов (ИФ $_3$, ФИФ $_2$ и ФИФ $_3$, 3 переменные); активных и неактивных Btk (2 переменные). Модуль «LAT-PLC γ 2» содержит 16 параметров. Неизвестные параметры модуля были подобраны на основании доступных из литературы экспериментальных данных о фосфорилировании LAT и количестве активных ФЛС γ 2 [161], полученных при активации тромбоцитов фукоиданом. Начальные условия модуля приведены в Таблице А.6, уравнения и параметры модуля приведены в Таблице А.7.

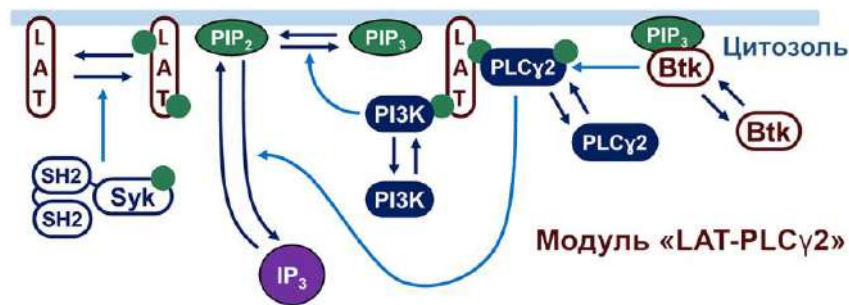


Рисунок 3.7 – Схема модуля «LAT-PLC γ 2»: активные Syk фосфорилируют LAT, к которому последовательно присоединяются ФЛС γ 2 и PI3K, PI3K в комплексе LAT активируются и фосфоилируют ФИФ $_2$, производя ФИФ $_3$. К ФИФ $_3$ присоединяются и активируются Btk, активные Btk фосфорилируют и активируют ФЛС γ 2. Активные ФЛС γ 2 гидролизуют ФИФ $_2$, производя ИФ $_3$. Темно-синие линии обозначают реакции преобразования вещества; голубые линии обозначают катализ. Рисунок разработан автором

3.1.5. Валидация полной модели активации тромбоцитов через рецептор CLEC-2

Полная модель была построена как сумма отдельных моделей, описанных в разделах 3.1.2-3.1.5. Отдельный подбор параметров после объединения модулей не проводился. В качестве основного выходного параметра модели было выбрано количество активных ФЛС γ 2 – единственного фермента в модели, производящего ИФ β , который инициирует дальнейшую кальциевую сигнализацию в тромбоцитах [158]. Полная модель достаточно точно описывала доступные из литературы экспериментальные данные по активации Syk (Рисунок 3.8 А), SFK (Рисунок 3.8 Б) и LAT (Рисунок 3.8 В). Однако предсказанные числа активных ФЛС γ 2 менее точно описывали данные (Рисунок 3.8 Г), что могло быть обусловлено вторичной активацией тромбоцитов при проведении соответствующих экспериментов авторами [161]. Также важно отметить, что только модель, работающая в режиме кластеризации 1 (Рисунок 3.4), была способна описать доступные из литературы экспериментальные данные [64].

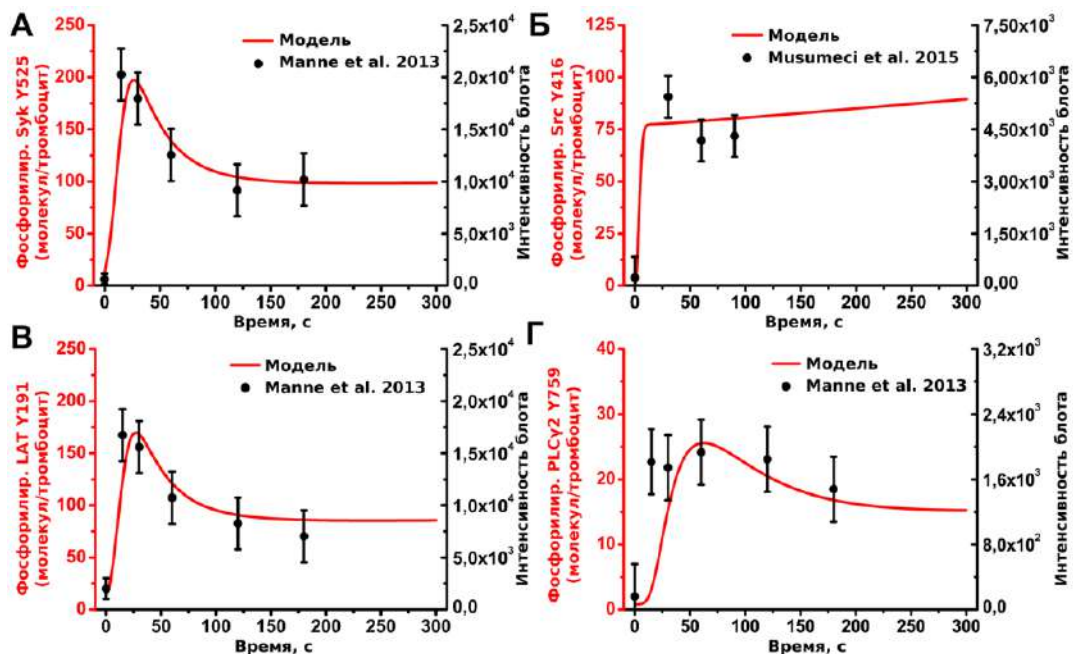


Рисунок 3.8 – Валидация разработанной модели на основании литературных данных. Модель (гладкие красные линии), экспериментальные данные из литературы – чёрные точки. А – Количества активных Syk-киназ [161]. Б –

Количества активных SFK [162]. В – Количества фосфорилированных LAT [161].
Количества активных ФЛСγ2 [161]. Рисунок разработан автором

3.1.6. Анализ чувствительности модели CLEC-2 к неизвестным параметрам

Для оценки влияния неизвестных параметров на результаты работы модели, а также для определения скорость-лимитирующих реакций, был проведён локальный анализ чувствительности (см. раздел 2.2). В качестве анализируемых параметров были выбраны количества активных Syk (S^*), фосфорилированных LAT (L^*), концентрация ИФ₃ (I_3). Нормированная локальная чувствительность каждой из переменных была определена для каждого из неизвестных параметров модели. Результаты анализа чувствительности приведены на Рисунке 3.9. Наиболее влиятельными оказались параметры модуля «Тирозинкиназы». Чувствительность модели к параметрам модуля «LAT-PLCγ2» оказалась ниже, а параметры модуля «CLEC-2 кластеризация» были наименее влиятельными. Начальные количества Syk, её каталитические параметры Syk, а также константа связывания Syk и CLEC-2 ($[Syk]_0$, k_{cat}^{Syk} , Km^{Syk} , k_{S1}^{SH2} , соответственно), влияли на все оцениваемые ответы тромбоцитов. Константа дефосфорилирования CLEC-2 (Kr^{Phosph}) оказалась среди влиятельных параметров только для активных Syk (S^*). Наиболее влиятельными параметрами из модуля «LAT-PLCγ2» оказались скорость дефосфорилирования и начальная концентрация LAT (Kr^{LAT} , $[LAT]_0$), а также каталитические параметры киназы Btk (k_{cat}^{Btk} , Km^{Btk}). Из параметров модуля кластеризации CLEC-2, константы образования кластеров из двух кластеров (k_{-2}), а также константы присоединения и отсоединения мономеров от кластеров (k_{-1} , k_1 , соответственно), наряду с исходной концентрацией CLEC-2, оказывали влияние на все ответы. На основании этих результатов можно сделать вывод, что наиболее влиятельные параметры для всех анализируемых переменных касаются активации киназы Syk (k_{S1}^{SH2} , k_{cat}^{Syk} , Km^{Syk}). С другой стороны, параметры, определяющие обратные

реакции (Kr^{Phosph} , Kr^{LAT}), а также параметры активации TULA-2 (Kf_{Syk}^{TULA2} , Kr_{Syk}^{TULA2} , Kr_{TULA2}^{Syk}) также были среди влиятельных. Это подчеркивает роль негативных регуляторов передачи сигналов для CLEC-2-индуцированной активации тромбоцитов. Анализ локальной чувствительности также позволил идентифицировать три скорость-лимитирующие реакции в модели: активацию тирозинкиназы Syk, фосфорилирование LAT и образование кластера CLEC-2 [64].

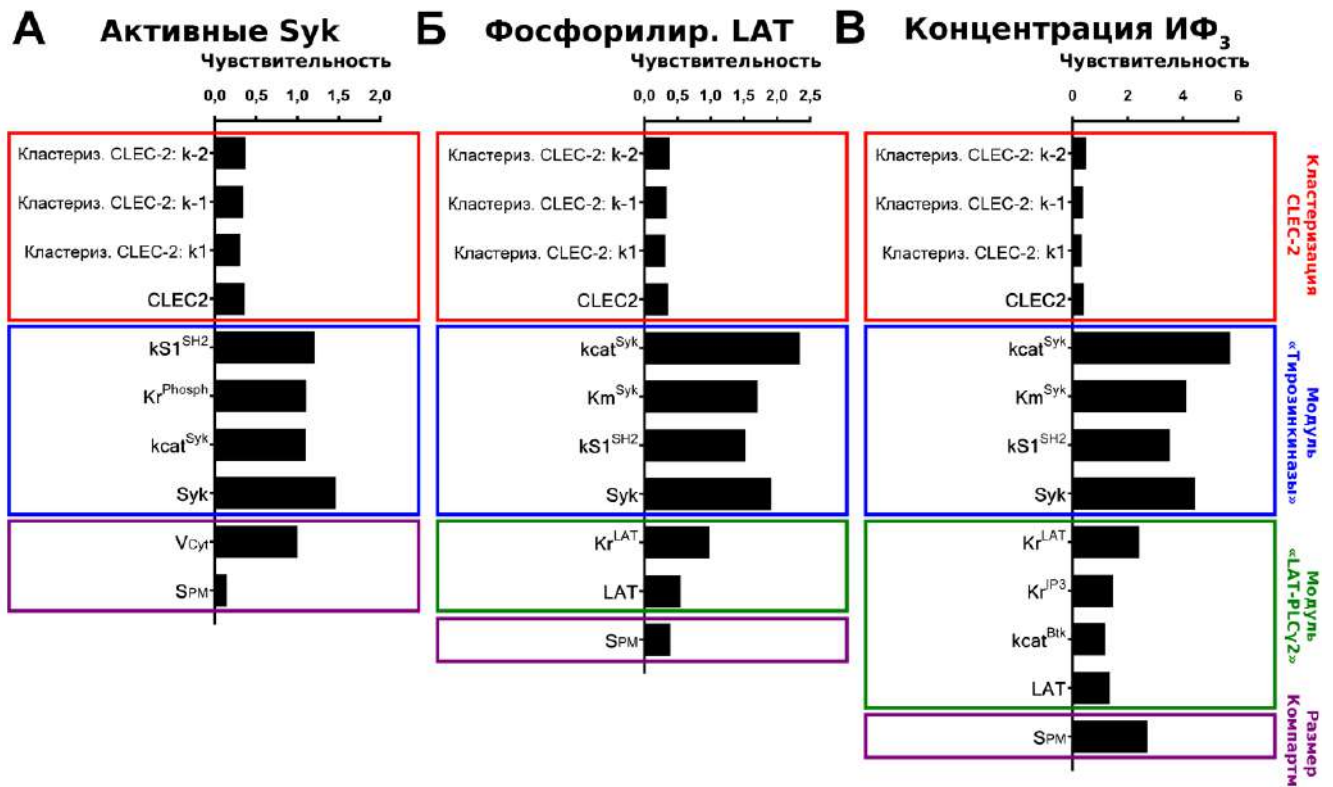


Рисунок 3.9 – Анализ чувствительности модели к неизвестным параметрам. А-В - Оценка чувствительности концентрации активных Syk (А), количества фосфорилированных LAT (Б), концентрации ИФ₃ (В). Параметры кластеризации рецепторов CLEC-2 – красные прямоугольники, к модулю «тирозинкиназы» - синие прямоугольники, к модулю «LAT-PLCγ2» - зелёные прямоугольники, геометрические параметры модели – фиолетовые прямоугольники. Рисунок разработан автором

Данное предсказание модели подтверждается литературными данными: добавление PRT-060318 – низкомолекулярного ингибитора Syk – полностью прекращало активацию тромбоцитов через рецептор CLEC-2 [8]. Аналогичные данные были получены при исследовании тромбоцитов мышей, Syk-киназы

которых не имели регуляторных доменов SH2 и не могли быть активированы при связывании с CLEC-2 [5]. Помимо оценки влияния неизвестных параметров на максимальные количества веществ был также проведён анализ влияния параметров на скорость достижения максимумов. Было получено, что только константы скорости кластеризации рецепторов влияли на время достижения максимальной степени активации тромбоцитов, но не на максимальные количества активных ФЛС γ 2 (Рисунок 3.10 А,Б). Варьирование других параметров приводило к значительному изменению как времени до достижения максимума, так и максимального количества активных ФЛС γ 2 (Рисунок 3.10 В,Г) [64].

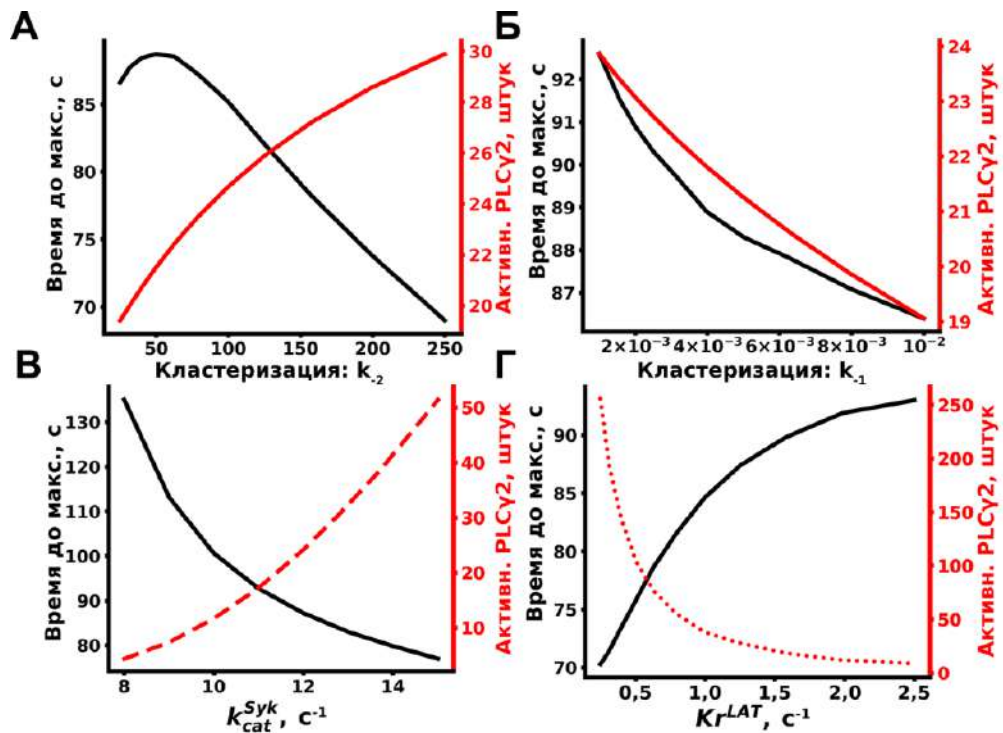


Рисунок 3.10 – Анализ влияния варьирования параметров, относящихся к различным модулям модели, на скорость достижения максимального количества активных ФЛС γ 2 (чёрные кривые) и максимального количества активных ФЛС γ 2 (красные кривые). А,Б – Варьирование параметров модуля кластеризации: k_{-1} (А) и k_{-2} (Б). В – Варьирование каталитической константы тирозинкиназы Syk. Г – Варьирование константы дефосфорилирования LAT-адаптеров. Рисунок разработан автором

3.2. Экспериментальное исследование значимости кластеризации рецепторов CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах

3.2.1. Теоретические основы влияния температуры на внутриклеточную сигнализацию

Подвижность рецепторов в мембранах тромбоцитов определяется широким набором факторов, среди которых как биохимические факторы, такие как, например, перестроения актинового цитоскелета [51] и реорганизация микродоменной структуры мембраны [54], так и физические факторы, такие как диффузионные свойства мембраны [163]. Одним из способов повлиять на скорость диффузии белков в мембранах является изменение температуры окружающей среды [163]. Зависимость скорости диффузии белков в мембранах живых клеток от температуры, на основании уравнения Аррениуса [164; 165] может быть выражена уравнением (3.3):

$$D = D_0 e^{-E_{Arr}/RT}, \quad (3.3)$$

где D – коэффициент диффузии, E_{Arr} – энергия активации реакции, R – универсальная газовая константа, T – температура.

Ранее было продемонстрировано, что изменение температуры на 10–15 градусов может значительно влиять на скорость диффузии белков как в синтетических мембранах, так и в живых клетках [164]. Типичные зависимости коэффициентов диффузии белков в мембранах живых клеток от температуры окружающей среды приведены на Рисунке 3.11. В Таблице 2 приводятся типичные коэффициенты диффузии белков в мембранах этих клеток. Таким образом, можно предположить, что температура, влияя на диффузию белков в мембранах, будет оказывать влияние и на скорость кластеризации мембранных рецепторов.

Важно подчеркнуть, что в отличие от рецепторов GPVI, для которых есть сведения о том, что они и в покоящихся тромбоцитах находятся в ассоциированном с липидными рафтами состоянием [54], в покоящихся

тромбоцитах рецепторы CLEC-2 являются более «свободными» [8; 51], а потому более подверженными влиянию изменения диффузионных характеристик мембраны тромбоцитов.

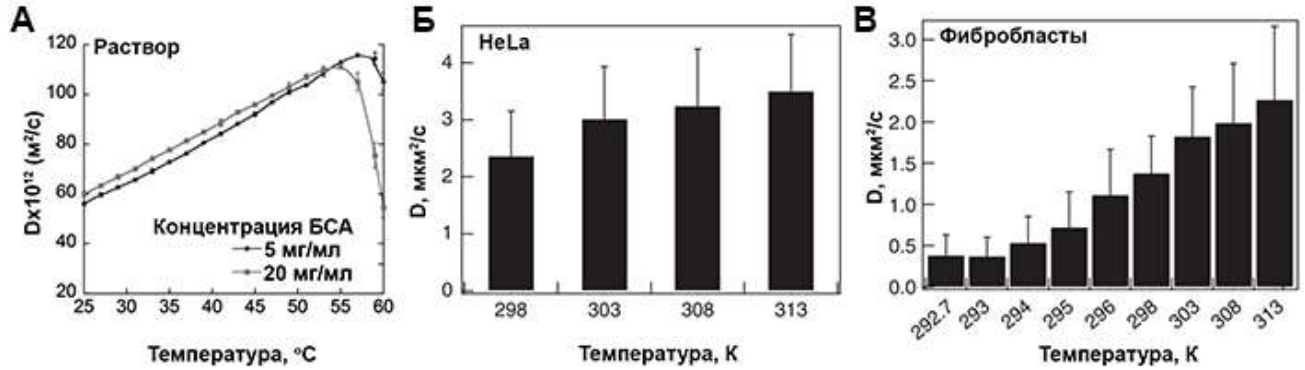


Рисунок 3.11 – Зависимости коэффициентов диффузии белков от температуры. А – зависимость коэффициента диффузии БСА в цитоплазме клетки [163]; Б, В – зависимости коэффициентов диффузии белков в мембранах HeLa (Б) или Фибробластов (В) [164]

Таблица 2 – Параметры уравнения Аррениуса для белков в мембранах клеток при различных температурах среды [164]

линия	D_{298K} [мкм ² /с]	D_{302K} [мкм ² /с]	D_{306K} [мкм ² /с]	D_{310K} [мкм ² /с]
SH-SY5Y	2,21±0,71	2,32±0,51	2,61±0,79	2,88±0,61
HeLa	0,17±0,08	0,23±0,08	0,32±0,11	0,38±0,18
Фибробл.	0,81±0,28	0,96±0,29	1,07±0,26	1,30±0,34

Помимо влияния на диффузию, очевидно, температура оказывает значительное влияние и на каталитическую активность ферментов. Согласно теории Аррениуса и теории активированного комплекса в ферментативной кинетике, выражение для константы скорости реакции может быть выражено:

$$k = \frac{kT}{h} \frac{Z^\ddagger}{Z_1 Z_2 \dots} e^{-E_0^\ddagger/kT}, \quad (3.4)$$

где Z^\ddagger, Z_1, Z_2 – статистические суммы по состояниям для активированного комплекса и реагентов, E_0^\ddagger – разность энергий активированного комплекса и

молекул реагентов, равная энтальпии реакции при абсолютном нуле температуры (для нулевых колебаний реагентов и активированного комплекса) [166]. Каталитическая активность ферментов-активаторов обыкновенно сбалансирована ферментами-ингибиторами [40]. Исходя из этого, можно предположить, что если для пути внутриклеточной сигнализации значимую роль имеет динамика кластеризации рецепторов в мембранах, данный путь сигнализации будет подвержен температурному влиянию.

3.2.2. Оценка влияния температуры тромбоцитов на внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах методом вестерн-блоттинга

Одним из наиболее эффективных способов анализа внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах является вестерн-блоттинг, который позволяет оценить динамику фосфорилирования аминокислотных остатков тирозина в тромбоцитах [120]. Был проведён анализ динамики фосфорилирования компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов тромбоцитов после их активации через рецептор CLEC-2 с помощью антител PY20. Помимо анализа фосфорилирования тирозинов также проводился контроль (антитела к α -тубулину) по количеству белка в каждой из «дорожек» для фореаза, чтобы учесть неравномерное распределение по количеству тромбоцитов между пробами. Для этого интенсивность хемилюминисценции антител к фосфотирозинам нормировалась на интенсивность хемилюминисценции контроля.

Для оценки влияния температуры тромбоциты были активированы при 25°C и при 37°C тремя концентрациями фукоидана: 1; 10; 100 мкг/мл. Было получено, что в то время как 1 мкг/мл фукоидана не вызывает существенной активации тромбоцитов (Рисунок 3.12), 10 (Рисунок 3.13) и 100 (Рисунок 3.14) мкг/мл фукоидана индуцировали фосфорилирование тирозина с пиковыми значениями через 90 и 30 с соответственно. Повышение температуры значительно сократило время задержки фосфорилирования: до 60 с и 15 с соответственно. Таким образом, можно сделать вывод, что температура оказывает влияние на CLEC-2

индуцированную внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах, в частности, на начальные её стадии.

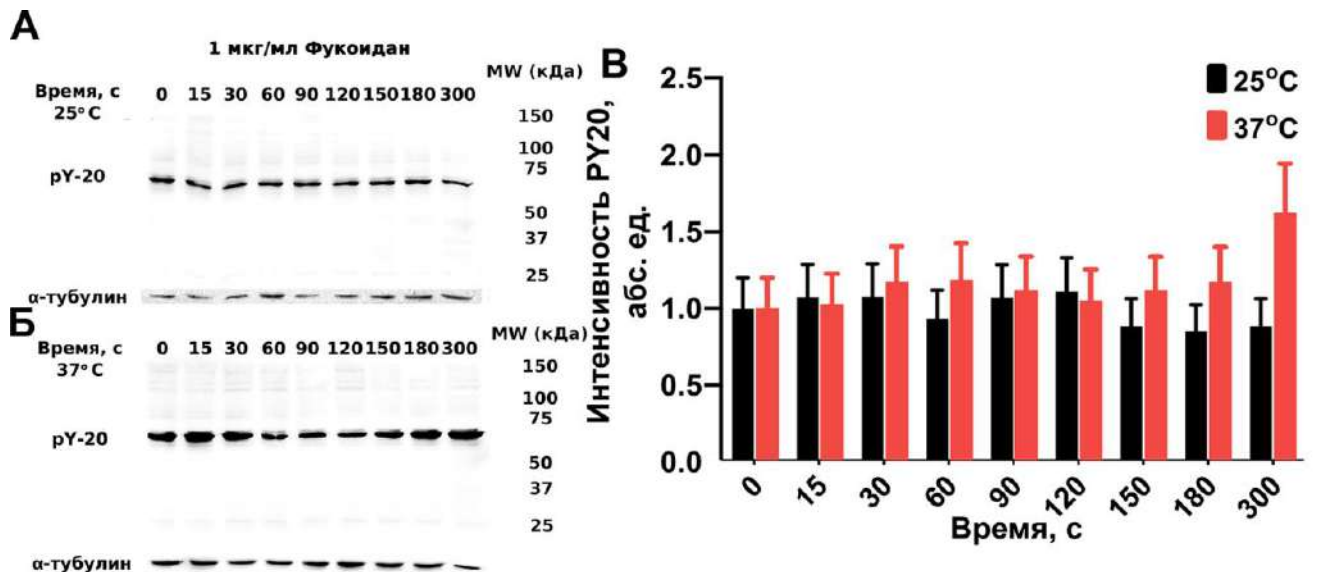


Рисунок 3.12 – Вестерн-блот анализ фосфорилирования аминокислотных остатков тирозина (с помощью антител рУ20) в тромбоцитах, активированных 1 мкг/мл фукоидана. А,Б – Фосфорилирование остатков тирозина при 25°С (А) и при 37°С (Б). Приведены типичные результаты для одного донора из n=3 здоровых доноров. В – Количественное сравнение динамики фосфорилирования тирозинов в тромбоцитах в ответ на активацию фукоиданом при различных температурах для n=3 здоровых доноров. Рисунок разработан автором

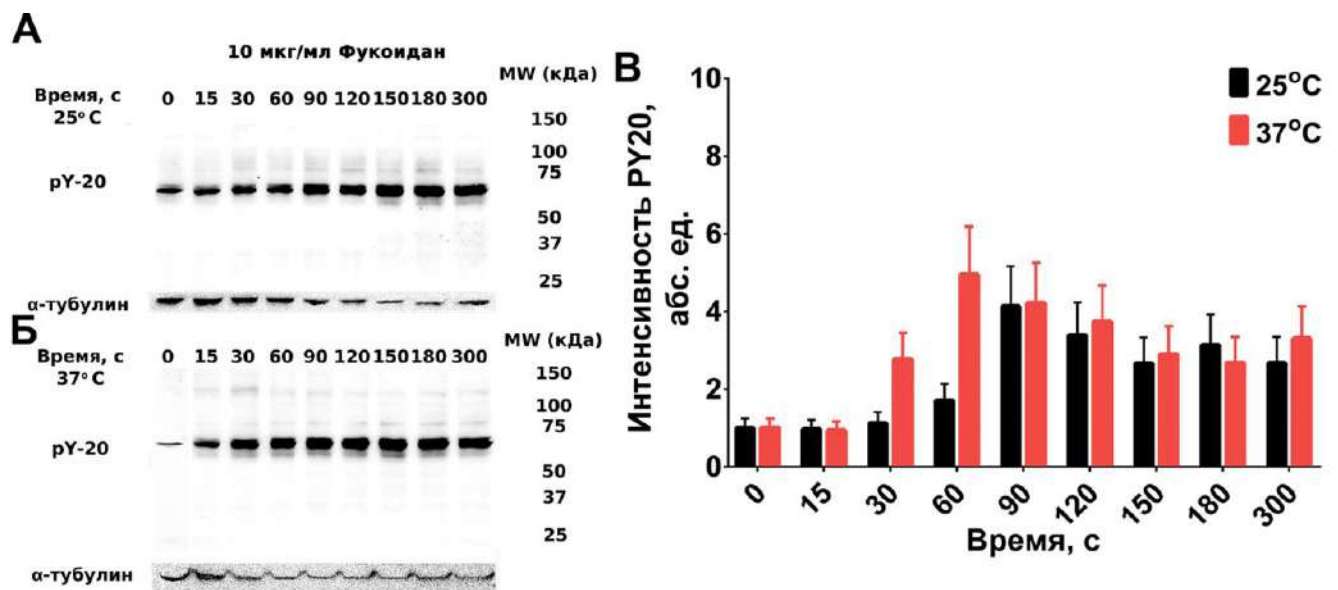


Рисунок 3.13 – Вестерн-блот анализ фосфорилирования аминокислотных остатков тирозина (с помощью антител рУ20) в тромбоцитах, активированных 10 мкг/мл фукоидана. А,Б – Фосфорилирование тирозина при 25°С (А) и при 37°С

(Б). Приведены типичные результаты для одного донора из $n=3$ здоровых доноров. В – Количественное сравнение динамики фосфорилирования тирозинов в тромбоцитах в ответ на активацию фукоиданом при различных температурах для $n=3$ здоровых доноров. Рисунок разработан автором

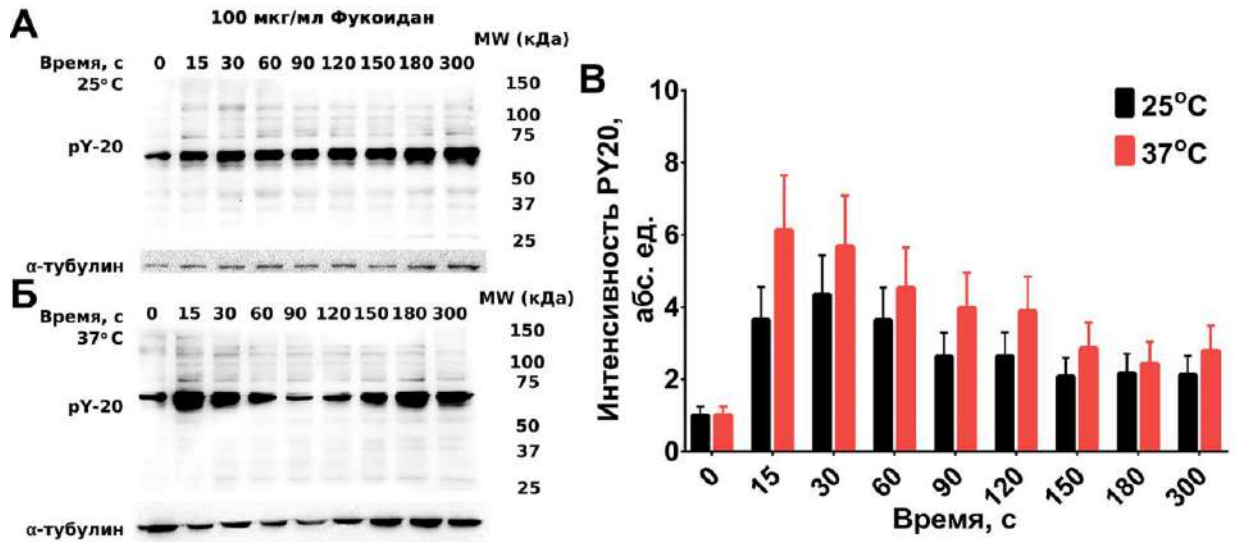


Рисунок 3.14 – Вестерн-блот анализ фосфорилирования аминокислотных остатков тирозина (с помощью антител pY20) в тромбоцитах, активированных 100 мкг/мл фукоидана. А,Б – Фосфорилирование тирозина при 25°C (А) и при 37°C (Б). Приведены типичные результаты для одного донора из $n=3$ здоровых доноров. В – Количественное сравнение динамики фосфорилирования тирозинов в тромбоцитах в ответ на активацию фукоиданом при различных температурах для $n=3$ здоровых доноров. Рисунок разработан автором

Несмотря на то, что вестерн-блоттинг позволяет в деталях изучить динамику фосфорилирования ключевых компонентов сигнальных каскадов в тромбоцитах, важно отметить, что у данного метода есть значительное ограничение. Так как тромбоциты являются сравнительно небольшими клетками, для того чтобы в пробах было достаточное количество белка для детекции, тромбоциты должны быть сконцентрированы до достаточно высоких концентраций (1×10^9 тромбоцитов/мл, что в 5 раз выше их концентрации в крови человека [1; 120]). Из-за этого возникает значительное влияние вторичных медиаторов активации тромбоцитов.

3.2.3 Анализ влияния температуры и насыщения мембраны тромбоцита холестерином на CLEC-2 индуцированную сборку LAT-сигнасомы

В то время как вестерн-блот позволяет оценить количественные характеристики динамики фосфорилирования, но при этом не позволяет непосредственно оценить процессы сборки кластеров и сигналом, иммунофлуоресцентная микроскопия позволяет непосредственно наблюдать за событиями «внутри» клетки (Рисунок 2.1). Для этого тромбоциты выделяются из цельной крови путём нескольких центрифугирований, но, в отличие от вестерн-блоттинга, разводятся до значительно меньших концентраций (1×10^8 тромбоцитов/мл). Это не позволяет полностью исключить фактор влияния вторичных медиаторов активации тромбоцитов, однако его влияние, очевидно, становится менее значимым.

Активация в настоящем исследовании активация тромбоцитов проводилась при 25°C и при 37°C. Дополнительно было проведено исследование влияния холестерин-связывающего агента m β CD на формирование LAT-сигналом при температуре 25°C. При 37°C уже к 30ой секунде наблюдались кластеры фосфорилированных LAT, что является одним из ключевых признаков формирования LAT-сигналом [8]. Количество фосфорилированных LAT достигало максимальных значений к 60 с (Рисунок 3.15). Снижение температуры до 25°C (Рисунок 3.16), а также удаление мембранного холестерина (Рисунок 3.17) значительно замедляли фосфорилирование LAT, а также уменьшали количество кластеров.

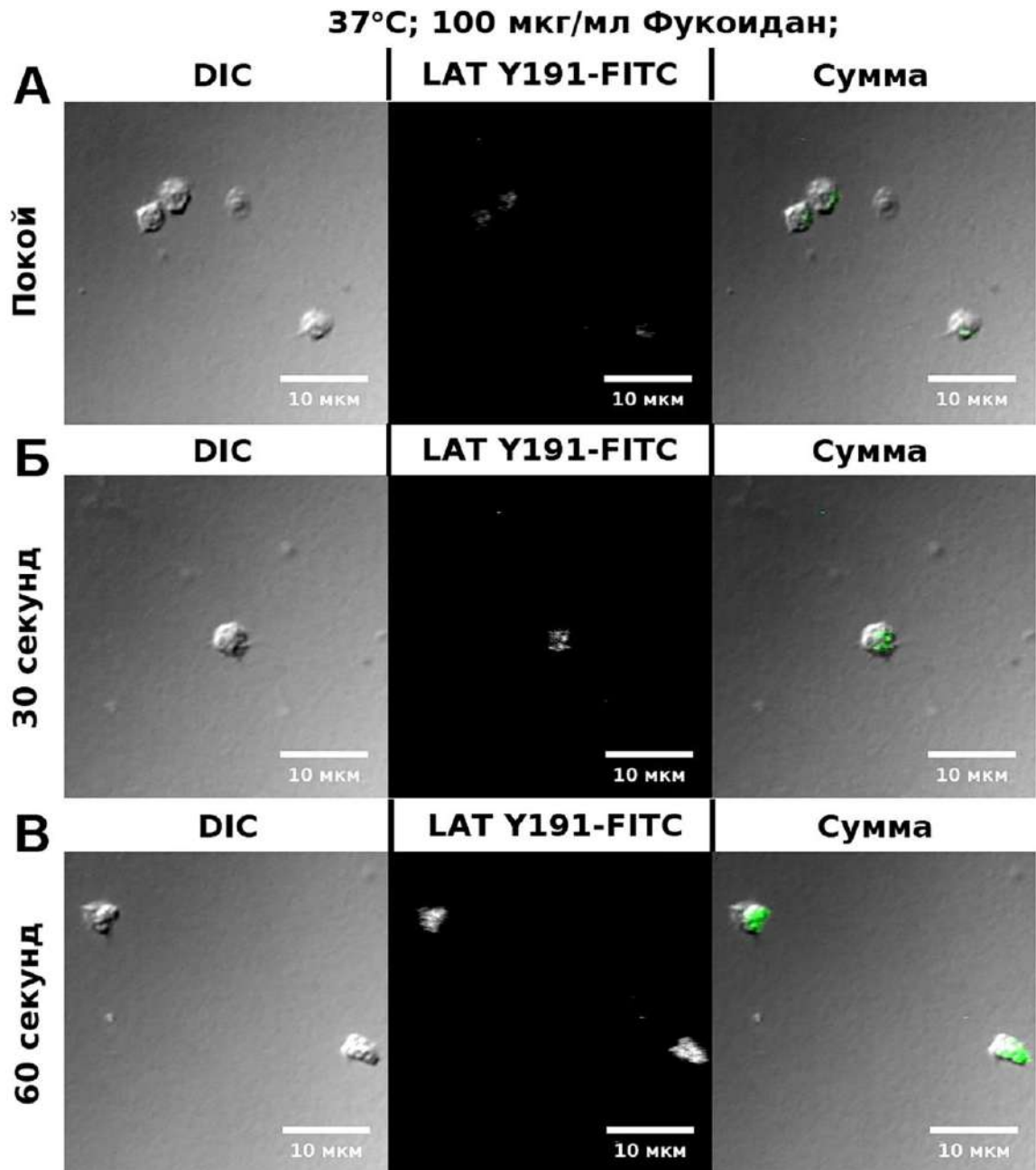


Рисунок 3.15 – Типичные результаты анализа иммунофлуоресценции в тромбоцитах методом конфокальной микроскопии. А – Покоящиеся тромбоциты здорового донора. Б,В – Тромбоциты при 37°C были активированы 100 мкг/мл фукоидана, реакция была остановлена через 30 (Б) или через 60 (В) секунд. Приводятся данные в дифференциально-интерференционном контрасте (DIC), флуоресценция антител к LAT Y191-FITC, а также объединённое изображение. Типичные данные для одного из n=5 здоровых доноров. Рисунок разработан автором

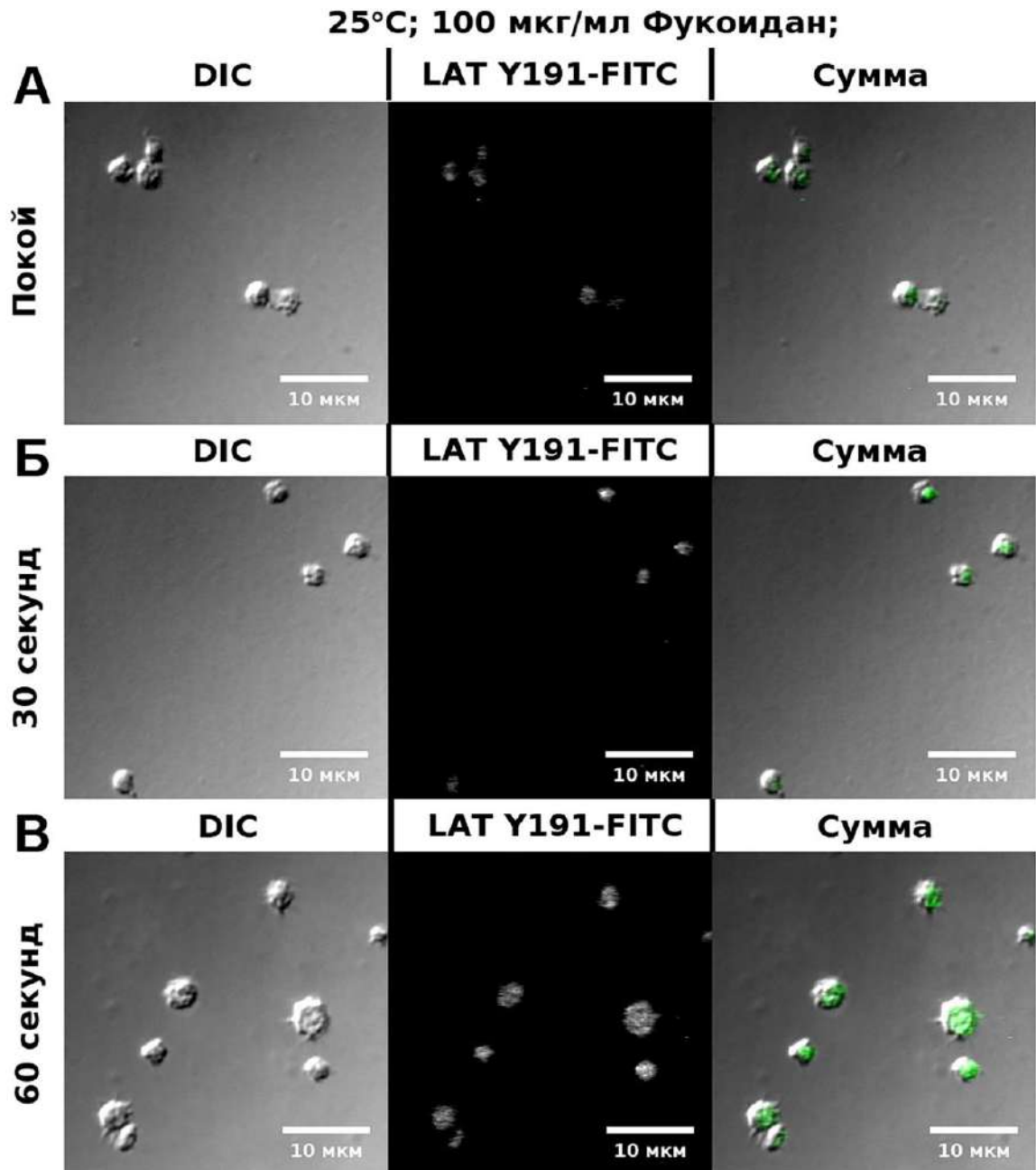


Рисунок 3.16 – Типичные результаты анализа иммунофлуоресценции в тромбоцитах методом конфокальной микроскопии. А – Покоящиеся тромбоциты здорового донора. Б,В – Тромбоциты при 25°C были активированы 100 мкг/мл фукоидана, реакция была остановлена через 30 (Б) или через 60 (В) секунд. Приводятся данные в дифференциально-интерференционном контрасте (DIC), флуоресценция антител к LAT Y191-FITC, а также объединённое изображение. Типичные данные для одного из n=5 здоровых доноров. Рисунок разработан автором

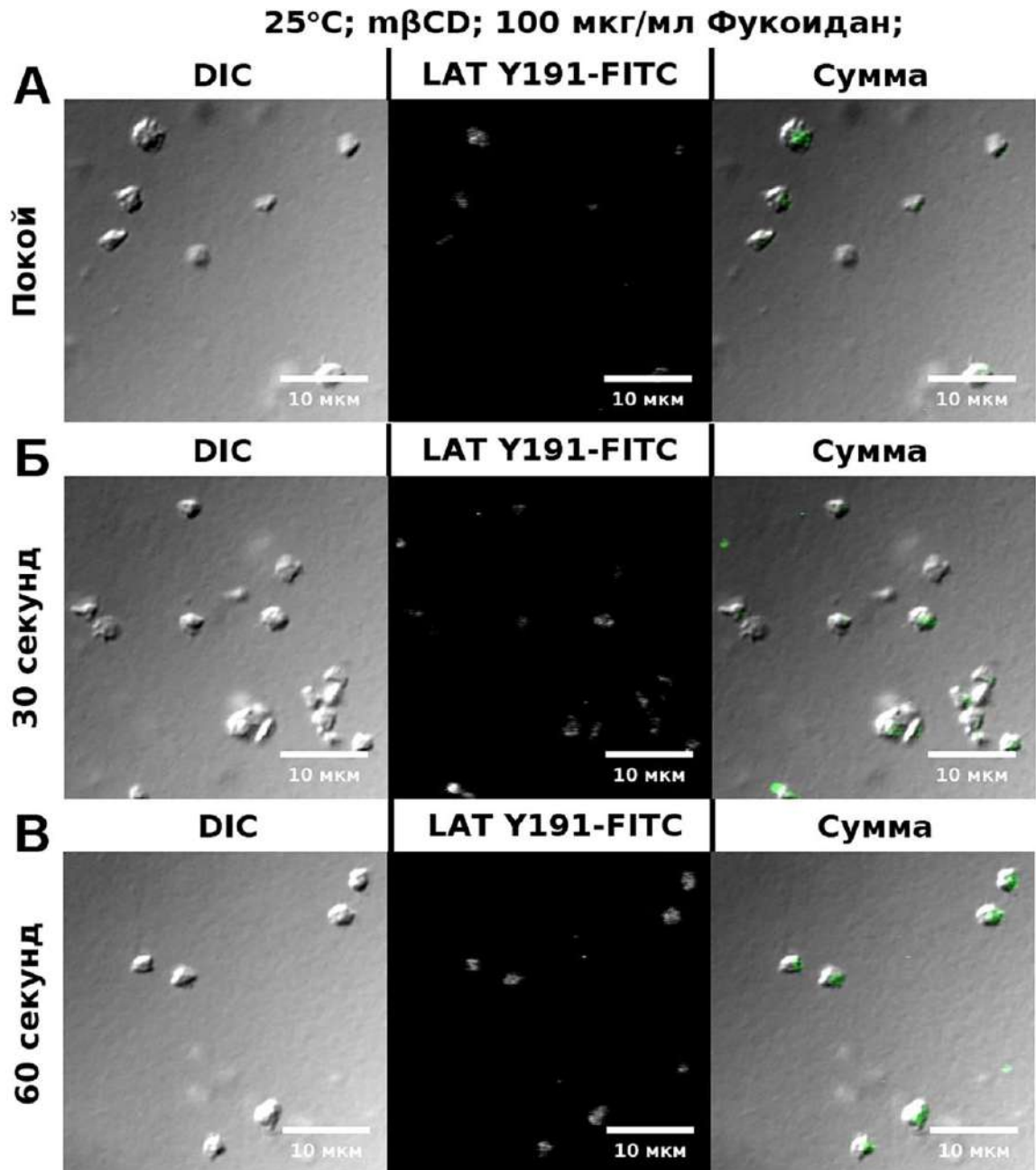


Рисунок 3.17 – Типичные результаты анализа иммунофлуоресценции в тромбоцитах методом конфокальной микроскопии. А – Покоящиеся тромбоциты здорового донора. Б,В – Тромбоциты после инкубации с 1 мМ mβCB при 25°C были активированы 100 мкг/мл фукоидана, реакция была остановлена через 30 (Б) или через 60 (В) секунд. Приводятся данные в дифференциально-интерференционном контрасте (DIC), флуоресценция антител к LAT Y191-FITC, а также объединённое изображение. Типичные данные для одного из n=5 здоровых доноров. Рисунок разработан автором

Количественная оценка изменения интенсивности флуоресценции антител к фосфорилированному LAT в тромбоцитах, активированных фукоиданом в разных условиях, приведена на Рисунке 3.18. Снижение температуры, а также

разрушение липидных рафтов (состоящих, во многом, из холестерина) значительно замедляет скорость активации тромбоцитов через CLEC-2. В активированных CRP тромбоцитах наблюдалось значительное увеличение фосфорилирования LAT на 300ой секунде (Рисунок 3.18).

Для сопоставления экспериментальных результатов и результатов моделирования была проведена оценка возможности модели рецептора CLEC-2 описать результаты анализа иммунофлуоресценции путём изменения только параметров модуля кластеризации рецепторов. Было получено, что уменьшение k_1 и k_3 , а также увеличение k_{-2} позволяет точно описать снижение фосфорилирования LAT при понижении температуры и уменьшении концентрации холестерина в плазматической мембране тромбоцитов (Рисунок 3.18). Полученные параметры модели приведены в Таблице 3. Совместно с результатами экспериментов по вестерн-блоттингу данный результат косвенно подтверждает предсказание модели о том, что кластеризация рецепторов CLEC-2 является скорость-лимитирующей, для внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах при их активации через рецептор CLEC-2 [64].

Таблица 3. Параметры модуля «кластеризация CLEC-2», соответствующие различным активационным условиям на рисунке 4.8

	$k_1; \text{с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	$k_{-2}; \text{с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	$k_3; \text{с}^{-1}$
37°C	13924,4	348,26	$2,7 \times 10^{-6}$
25°C	2249	251,16	$1,8 \times 10^{-6}$
25°C, 1 mM m β CD	164	208,07	1×10^{-6}

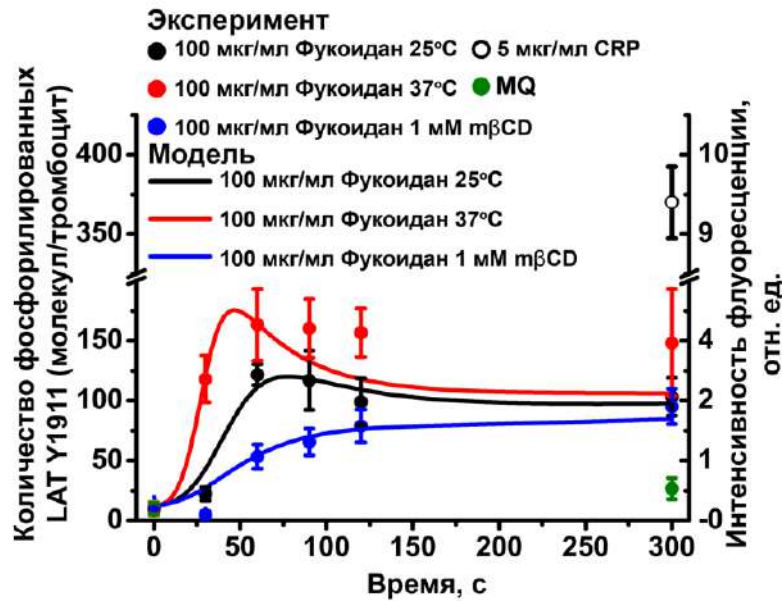


Рисунок 3.18 – Результаты иммунофлуоресцентного анализа фосфорилирования LAT в различных условиях в одиночных тромбоцитах. Приведены данные для $n=5$ здоровых доноров. 5 мкг/мл CRP и деионизированная вода (MQ) были использованы в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. Рисунок разработан автором

3.3. Исследование способности рецептора CLEC-2 инициировать кальциевую сигнализацию в тромбоцитах

3.3.1. Теоретическое исследование способности рецептора CLEC-2 инициировать кальциевую сигнализацию в тромбоцитах

Генерируемый ФЛС γ 2 ИФ $_3$ инициирует кальциевую сигнализацию в тромбоцитах [46]. Для пересчёта получаемой средней концентрации ИФ $_3$ в цитозоле тромбоцита в среднюю концентрацию свободных ионов кальция была использована модель из [46]. Было проведено сопоставление средней концентрации кальция в цитозоле тромбоцитов и средней концентрации ИФ $_3$. На основе данной модели была получена кривая пересчёт ИФ $_3$ в концентрацию ионов кальция (Рисунок 3.19). Концентрация кальция затем может быть использована для сравнения предсказаний модели с экспериментальными результатами, полученными методом проточной цитометрии.

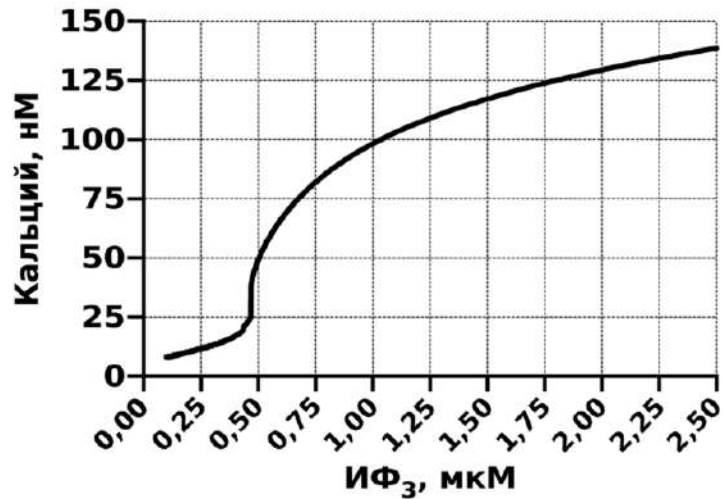


Рисунок 3.19 – Пересчёт средней концентрации ИФ₃ в тромбоцитах в среднюю концентрацию кальция на основе модели Sveshnikova et al. 2016 [46]. Рисунок получен от авторов

Модель предсказала, что достаточное для запуска кальциевой сигнализации количество ФЛСγ₂ (Рисунок 3.20) нарабатывается при любом из рассмотренных режимов кластеризации (Рисунок 3.4). Однако для режима кластеризации 2 параметры модели не могли быть подобраны таким образом, чтобы инициация осцилляций происходила ранее, нежели через 200 секунд от момента активации (Рисунок 3.20), что не соответствует экспериментальным данным [161]. Таким образом, в качестве основного режима для расчётов был выбран режим кластеризации 1. Более того, ранее было показано, что именно быстрая димеризация ITAM-рецепторов управляет скоростью активации для других типов клеток [167].

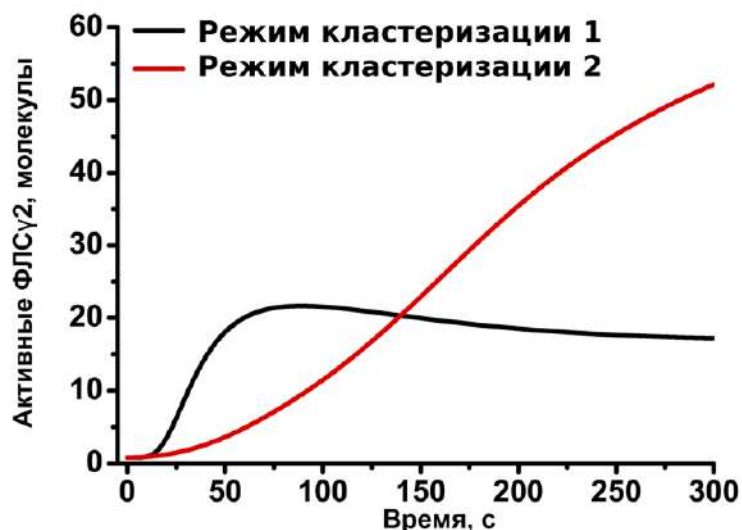


Рисунок 3.20. Сравнение предсказаний модели по влиянию паттернов кластеризации CLEC-2 на активацию ФЛСγ2. Рисунок разработан автором

3.3.2. Экспериментальный анализ способности рецептора CLEC-2 инициировать кальциевую сигнализацию в тромбоцитах

Для проверки гипотезы о способности CLEC-2 индуцировать кальциевую сигнализацию в тромбоцитах, были проведены эксперименты по проточной цитометрии тромбоцитов, загруженных кальций-чувствительным флуорофором Fura Red (Рисунок 3.21) [123]. Было получено, что активатор рецептора тромбоцитов CLEC-2 фукоидан вызывает замедленный кальциевый ответ с выходом на максимум в области 50–70 секунды после добавления активатора (Рисунок 3.21). Важно отметить, что в данном эксперименте была использована насыщающая концентрация фукоидана [161], что позволяет предположить, что наблюдаемая степень активации является максимальной.

Одной из характерных особенностей CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах является её глубокая зависимость от вторичных медиаторов активации, секретируемых тромбоцитами в ответ на первичную стимуляцию – ТхА₂ и АДФ [51; 63]. Показано, что в присутствии апиразы – фермента, гидролизующего АДФ – CLEC-2 индуцированная сигнализация не происходит [51]. На тромбоцитах присутствует два рецептора к АДФ – P2Y₁ и P2Y₁₂, причём P2Y₁, ассоциированный с Gqα-субъединицей, в большей степени

влияет на кальциевую сигнализацию, нежели $P2Y_{12}$, ассоциированный с $G_{i\alpha}$ -субъединицами. Таким образом, для того чтобы исключить эффекты вторичного медиатора активации АДФ, в суспензию был добавлен ингибитор $P2Y_1$ рецептора MRS2179 (Рисунок 3.9, красная кривая). Было получено, что 100 мкМ MRS2179 никак не влияли ни на динамику, ни на степень активации тромбоцитов фукоиданом. Влияние TxA_2 можно исключить, так как суспензия тромбоцитов в настоящей постановке является достаточно сильно разведённой (1×10^3 тромбоцитов/мл), а считается, что для эффекта TxA_2 на активацию тромбоцитов необходим их непосредственный контакт друг с другом [168]. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что CLEC-2 самостоятельно вызывает кальциевую активацию тромбоцитов. Кроме того, получено, что в разработанной постановке возможно наблюдать первичные кальциевые ответы тромбоцитов на стимуляцию, на которые не влияет вторичная активация [124].

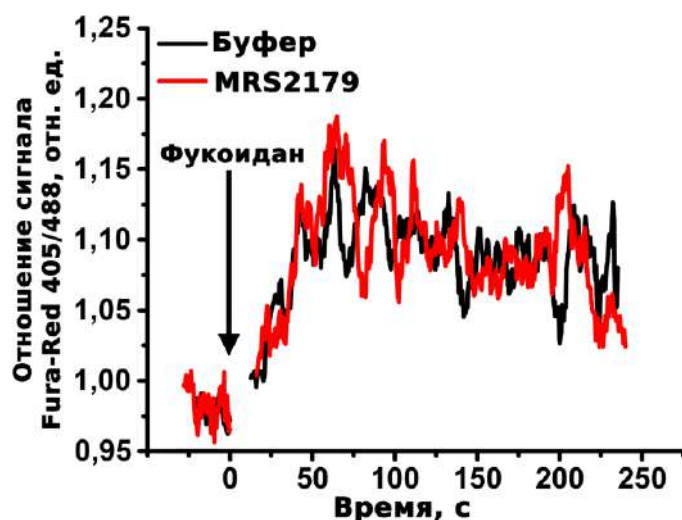


Рисунок 3.21 – Методом проточной цитометрии было получено, что активация тромбоцитов 100 мкг/мл фукоидана (активатора рецептора CLEC-2) вызывает повышение кальциевой концентрации в цитозоле тромбоцитов (чёрная кривая). Пре-инкубация тромбоцитов с MRS2179 – ингибитором вторичной активации тромбоцитов АДФ – не повлияла на кальциевый ответ (красная кривая). Рисунок разработан автором

Для оценки влияния диффузионных характеристик плазматической мембраны тромбоцитов на CLEC-2 индуцированную кальциевую сигнализацию

была проведена оценка влияния одновременно температуры (25°C и 37°C) и насыщения мембраны холестерином (инкубация с 1 мМ m β CD) на активацию тромбоцитов 100 мкг/мл фукоидана. Как при комнатной (25°C) температуре, так и при температуре тела (37°C) человека активация тромбоцитов фукоиданом приводила к увеличению концентрации Ca²⁺ в цитозоле (Рисунок 3.22). Однако при 25°C время достижения максимальной концентрации кальция было значительно замедлено (более 100 секунд) по сравнению с 37°C (60 секунд). Инкубация тромбоцитов с m β CD дополнительно замедляла увеличение концентрации цитозольного кальция как при 25°C (240 с), так и при 37°C (105 с) (Рисунок 3.22).

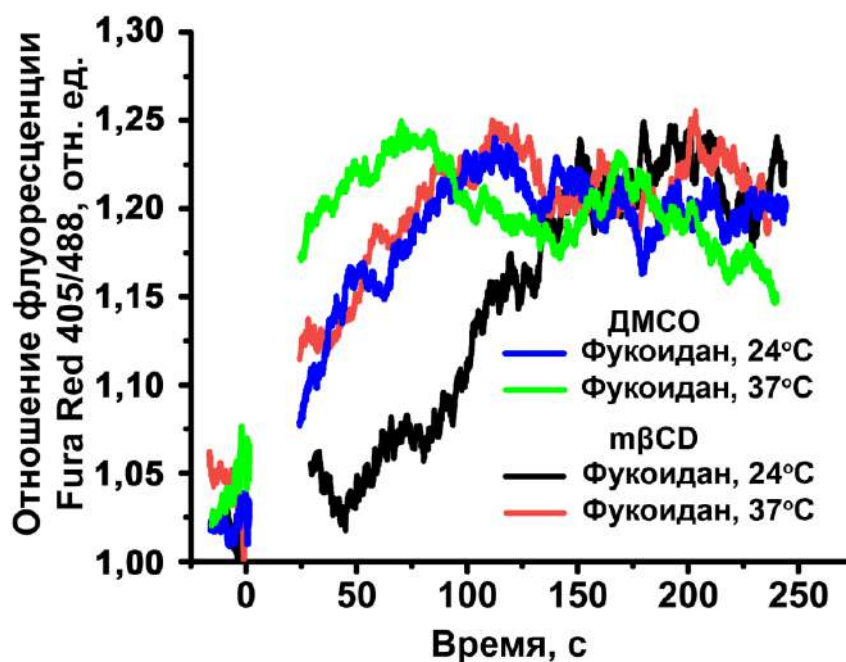


Рисунок 3.22 –Исследование кальциевых ответов тромбоцитов на стимуляцию 100 мкг/мл фукоидана с помощью проточной цитометрии. Тромбоциты были активированы при 24°C (синяя и чёрная кривые) и при 37°C (зелёная и красная кривые) в отсутствие (диметилсульфоскид (ДМСО); синяя и зелёная кривые) или в присутствии 1 мМ m β CD (m β CD; чёрная и красная кривые). Приведены типичные данные одного из для n=3 здоровых доноров. Рисунок разработан автором

Манне и соавт. в работе [169] было сделано предположение, что кластеризация рецепторов CLEC-2, а также их зависимость от насыщения

мембраны тромбоцитов холестерином не является принципиальной для нормальной активации тромбоцитов через данный сигнальный путь. Авторы предполагали, что для нормальной CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах, необходима «поддержка» начального сигнала за счёт секретируемого тромбоцитами АДФ. Для проверки данной гипотезы были поставлены дополнительные эксперименты по анализу влияния температурных факторов на АДФ-индуцированную сигнализацию. Было получено, что температура не влияет на кальциевые ответы тромбоцитов при их активации 2 мкМ АДФ (Рисунок 3.23). Таким образом, можно заключить, что влияние температуры значимо только для CLEC-2 индуцированной сигнализации, которая требует кластеризации мембранных рецепторов. Отсутствие влияния насыщения мембраны холестерином на GPCR-индуцированную сигнализацию в тромбоцитах было ранее продемонстрировано в литературе [51].

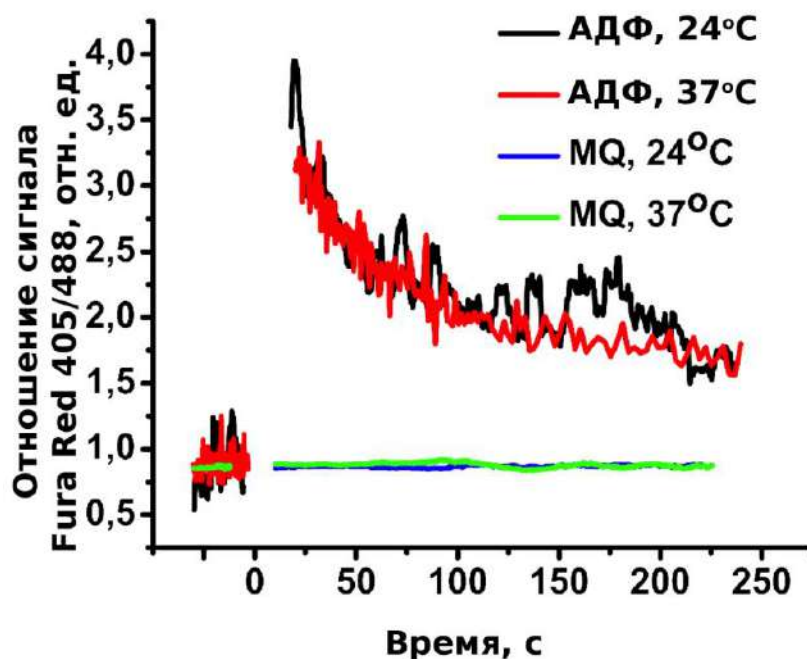


Рисунок 3.23 – Анализ влияния температурных условий на АДФ-индуцированную кальциевую сигнализацию в тромбоцитах методом проточной цитометрии. Тромбоциты были активированы 2 мкМ АДФ при 24°C (чёрная кривая) или при 37°C (красная кривая). В качестве контроля к тромбоцитам была добавлена MQ при 24°C (синяя кривая) и при 37°C (зелёная кривая). Приведены

типичные данные для одного из $n=3$ здоровых доноров. Рисунок разработан автором

Несмотря на то что экспериментальные данные подтверждали предсказания модели, необходимо отметить и некоторые ограничения настоящего исследования. Прежде всего, было показано, что фукоидан помимо CLEC-2 [161] также может активировать тромбоцитарные рецепторы GPVI и тромбоцитарно-эндотелиальный агрегационный рецептор 1 (PEAR-1) [170]. Однако активация тромбоцитов через данные рецепторы была показана методом агрегометрии [170], при котором невозможно исключить влияние на тромбоциты вторичных медиаторов активации. Авторы [70] также утверждают, что фукоидан не вызывает кальциевую сигнализацию в тромбоцитах, однако их результаты основываются на спектрофлуориметрии, которая является нечувствительной к слабым изменениям концентрации внутриклеточного кальция.

Несмотря на то что изменение параметров окружающей среды, а также насыщения мембраны тромбоцитов холестерином однозначно оказывает значительное влияние на параметры кластеризации рецепторов, данные факторы оказывают влияние на большое количество реакций одновременно. Таким образом, для оценки влияния значимости кластеризации рецепторов на динамику активации тромбоцитов помимо экспериментальных подходов необходимо использовать и теоретические.

3.4. Переход от рецептора CLEC-2 к рецептору GPVI

Несмотря на общую схожесть CLEC-2- и GPVI- индуцированной сигнализации в тромбоцитах, на начальных стадиях инициируемой ими сигнализации присутствуют достаточно значимые отличия [171]:

1. количество GPVI на тромбоцитах в среднем составляет 5000 молекул [120], в то время как молекул CLEC-2 только 2000 [29];
2. молекулы рецепторов GPVI через полипролиновый домен ассоциированы с тирозинкиназами SFK [57], что обеспечивает их большую «доступность»

- для более быстрого фосфорилирования, в то время как CLEC-2 в покое не ассоциированы ни с одними из киназ;
3. при активации GPVI фосфорилируется тирозинкиназами SFK (в первую очередь Fyn и Lyn) [9], в то время как CLEC-2 фосфорилируется тирозинкиназами Syk [66], которых в тромбоцитах значительно меньше [75];
 4. кластеризация GPVI в области липидных рафтов может быть дополнительно ускорена благодаря их ассоциации с SFK киназами, которые пальмитоилированы и за счёт этого имеют значительное сродство к мембранным микродоменам, обогащённым холестерином [54; 57];
 5. в ассоциированной с GPVI FcγR-цепью находится ITAM-домен, содержащий две YxxL последовательности, которые могут быть фосфорилированы, в то время как в цитоплазматическом домене CLEC-2 находится hemITAM, содержащий одну YxxL последовательность, доступную для фосфорилирования соответствующими тирозинкиназами; таким образом, одна молекула GPVI может активировать одну тирозинкиназу Syk, в то время как CLEC-2 для этого необходимо сформировать димер.

Некоторые из данных отличий отражены на Рисунке 1.4.

Так как разные лиганды значительным образом могут влиять на динамику и паттерны кластеризации рецепторов GPVI тромбоцитов [2], в качестве основного исследуемого лиганда был выбран CRP. Параметры модуля кластеризации были получены на основе экспериментальных данных из [2]. Проводился подбор таких параметров как аффинность Syk к фосфорилированным рецепторам GPVI, константа реакции дефосфорилирования GPVI, а также константы аффинности тирозинкиназ SFK к рецептору GPVI. Результаты подбора параметров приведены на Рисунке 3.24.

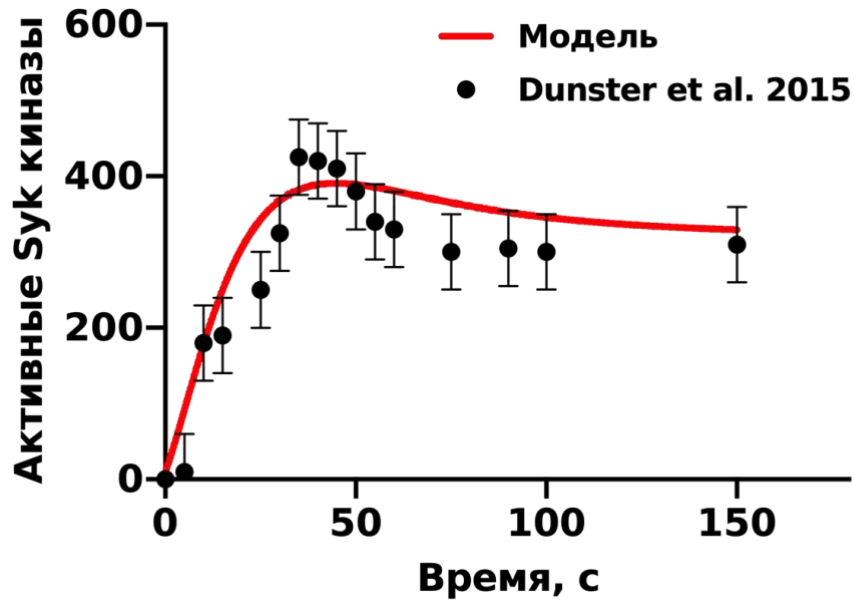


Рисунок 3.24 – Результаты подбора неизвестных параметров модели GPVI (красная кривая) на основании экспериментальных данных (чёрные точки), доступных из [120]. Рисунок разработан автором

Дополнительно для валидации модели были проведены эксперименты по анализу кальциевых ответов тромбоцитов здоровых доноров на стимуляцию их CRP. В результате были получены типичные кальциевые кривые для концентраций 5, 2,5 и 1 мкг/мл CRP. С другой стороны, концентрации ИФ₃, предсказанные моделью, были пересчитаны в концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов согласно ранее полученным пересчётным кривым (Рисунок 3.19). В результате был сделан вывод, что модель может качественно описывать получаемые экспериментальные данные (Рисунок 3.25). При этом помимо изменения вышеозначенных констант, а также количества GPVI и параметров его кластеризации, остальные компоненты моделей GPVI и CLEC-2 являлись общими.

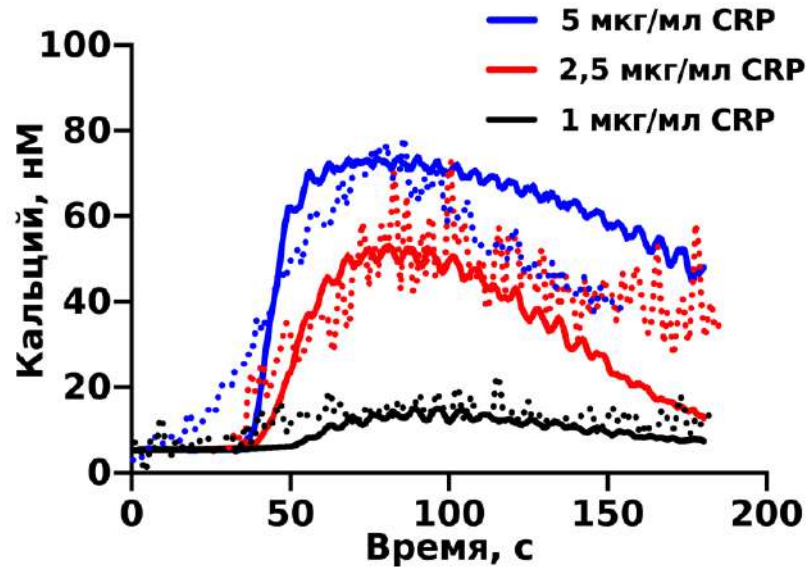


Рисунок 3.25 – Средняя концентрация кальция в тромбоцитах в ответ на активацию их 5 (синие кривые), 2,5 (красные кривые) и 1 (чёрные кривые) мкг/мл CRP: точки – эксперимент, кривые – теоретический расчёт. Приведён результат для типичного взрослого здорового донора из $n=5$ здоровых доноров. Рисунок разработан автором

Анализ чувствительности модели GPVI, аналогично модели CLEC-2 ранее, также продемонстрировал, что наиболее значимыми для сигнализации параметрами являются каталитические параметры Syk киназ (k_{cat}^{Syk} : относительная чувствительность – 1,67, K_M^{Syk} : относительная чувствительность – 0,98), а также константы ассоциации Syk и фосфорилированных рецепторов GPVI. Однако, в отличие от CLEC-2 индуцированной сигнализации, реакции кластеризации (прежде всего константы разделения кластеров рецепторов k_{-2} : относительная чувствительность – 0,058; отсоединения мономеров рецепторов от крупных кластеров k_{-3} : относительная чувствительность – 0,027) в значительно меньшей степени влияют на активацию тромбоцитов. Данный результат может быть объяснён значительно большей эффективностью рецепторов GPVI с точки зрения активации тирозинкиназ Syk, нежели рецепторов CLEC-2.

ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ GPVI- И CLEC2-ИНДУЦИРОВАННОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ТРОМБОЦИТАХ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

4.1. Экспериментальное исследование GPVI-индуцированной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров

4.1.1. Причины возникновения нарушения активации тромбоцитов через рецептор GPVI

Активация тромбоцитов через рецептор GPVI – один из ключевых шагов для нормального функционирования системы гемостаза. При добавлении блокирующих антител к GPVI нарушается вся структура тромбоцитарных агрегатов, что подразумевает значительную роль данного рецептора и для последующих за начальной активацией шагов в тромбообразовании [172]. Предположительно, поддержание стабильности тромбоцитарных агрегатов осуществляется благодаря способности GPVI «помогать» кластеризованным интегринам $\alpha_{IIb}\beta_3$ усиливать первичный активационный сигнал тромбоцитов [29]. Показано, что и GPVI, и $\alpha_{IIb}\beta_3$ интегрин при активации тромбоцитов локализуются в области липидных рафтов [9; 173]. При этом $\alpha_{IIb}\beta_3$ интегрин оказываются ассоциированы с актиновым цитоскелетом тромбоцитов через комплексы с талином и киндлином-3 [173]. Таким образом, происходит укрепление уже сформированных липидных рафтов, в которых благодаря ITAM доменам рецепторов GPVI происходит дополнительная наработка активных тирозинкиназ Syk, что становится важной цепью положительной обратной связи для активации тромбоцитов в тромбах [40]. Таким образом, возникновение дефицита или дисфункции рецептора GPVI может стать причиной возникновения геморрагических осложнений.

Ранее уже было показано, что значительное влияние на скорость и эффективность активации рецепторов GPVI, оказывает скорость и паттерн их кластеризации различными лигандами. Все лиганды GPVI несут в своём составе аминокислотные последовательности глицин-пролин-оксипролин (GPO),

сконфигурированные в различных вариантах [2]. Так, в аминокислотной последовательности фибриллярного коллагена последовательности GPO оказываются значимо разнесены, в то время как в синтетическом пептиде CRP, который наиболее часто используется для исследований GPVI-индуцированной активации тромбоцитов, последовательность GPO отрезки идут «друг-за-другом» [2]. Это позволяет CRP значительно эффективнее кластеризовать GPVI и, соответственно, активировать тромбоциты.

Одной из интересных особенностей GPVI является то, что при активации тромбоцитов также происходит активация металлопротеиназ, которые удаляют GPVI с поверхности тромбоцитов – шеддинг. При активации физиологическими лигандами, при возникновении патофизиологических напряжений сдвига или под действием активирующих антител GPVI гидролизуется белком, содержащим дизентегрин и металлопротеиназный домен (ADAM10) [174]. Это приводит к образованию растворимого эктодомена массой от 50 до 55 кДа (называемого sGPVI). В то время как врожденный и/или приобретенный дефицит GPVI у людей встречается достаточно редко [175], избыточный шеддинг GPVI может приводить к патологиям, вызванным сниженной чувствительностью тромбоцитов к коллагену и, впоследствии, кровотечениями. Высокие уровни sGPVI также могут являться признаками активного тромбообразования [174]. Связь между поверхностной плотностью GPVI и уровнями sGPVI в плазме в здоровых доноров и пациентов с патологиями не линейна [175]. Может ли повышенная экспрессия GPVI на тромбоцитах быть компенсаторным механизмом в протромботических условиях требует дальнейшей оценки.

Нарушения GPVI-индуцированной активации в тромбоцитах могут быть и наследственными. Описан ряд мутаций в гене рецептора GPVI (GP6), которые могут вызывать петехии (небольшие кровоизлияния в области кожи), меноррагии и носовые кровотечения [176; 177; 178]. Наличие петехий может быть связано с ранее показанной значимостью рецепторов GPVI и CLEC-2 для предотвращения кожных кровотечений при экстравазации иммунных клеток из кровотока [36]. Интересно, что при этом у пациентов с мутациями в гене GP6 не было описано

тромбоцитопении [179]. Чаще всего мутации в гене GP6 приводят к ослаблению ответов тромбоцитов в ответ на активацию их CRP или коллагеном [180]. Показано, что нарушения в гене GP6 также влияют на формирование тромбов как в лабораторных животных, так и у людей [103; 179; 180]. Мутации в гене GP6 не оказывают никакого влияния на другие известные пути сигнализации в тромбоцитах [180].

Одним из наиболее распространённых наследственных изменений в гене GP6 является появление пяти связанных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP): SKTQH и PEALN. Аллельные частоты каждого из полиморфизмов 0,85 и 0,13, соответственно [181; 182]. Показано, что аллель PEALN приводит к ослаблению активации тромбоцитов на коллаген и CRP [183]. С точки зрения физиологии показано, что для постинфарктных пациентов аллель PEALN может быть связан со снижением риска возникновения повторных коронарных событий [184]. Одной из основных причин нарушения функциональности рецептора GPVI при аллели PEALN может являться нарушение связывания с рецептором тирозинкиназ Fyn/Lyn, которые являются принципиально важными для фосфорилирования GPVI при его связывании с лигандами и кластеризации [185]. Также, согласно неподтверждённым данным, аллель PEALN может служить причиной снижения уровней экспрессии GPVI на тромбоцитах [183].

4.1.2. Анализ GPVI-индуцированной кальциевой сигнализации в тромбоцитах

Для исследования активации тромбоцитов через рецептор GPVI было рекрутировано 10 здоровых доноров, у которых для анализа бралась цельная кровь в вакуумные гирудин-содержащие пробирки (см. разделы методов 2.1.2 и 2.1.7). Анализ приводился при температуре окружающей среды в 25°C с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II. Никаких дополнительных манипуляций с образцами, кроме описанных в разделе методов 2.1.7, не проводилось. Активация тромбоцитов проводилась тремя различными концентрациями CRP: 0,25; 1; 5 мкг/мл. Считается, что концентрации свыше 1 мкг/мл CRP являются насыщающими и, таким образом, активация тромбоцитов 5 мкг/мл является

максимально возможной [186]. Типичные результаты по динамике концентрации свободных ионов кальция в цитозоле тромбоцитов здоровых доноров в ответ на стимуляцию различными концентрациями CRP приведены на Рисунке 4.1. Интересно, что после достижения максимальной концентрации, наблюдалось снижение концентрации кальция, что могло быть связано с инициацией ингибиторной сигнализации в тромбоцитах, регулируемой фосфатазами SHP1,2 [40].

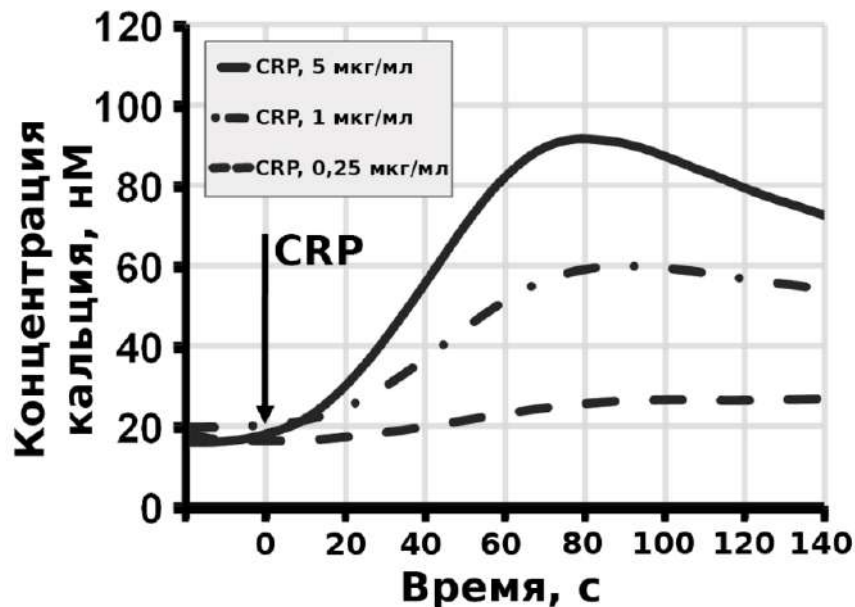


Рисунок 4.1 – Динамика концентрации свободных ионов кальция в тромбоцитах здоровых доноров в ответ на стимуляцию 0,25 (штрихованная линия), 1 (штрихпунктирная линия) и 5 (сплошная линия) мкг/мл CRP. Приведены типичные данные для здорового донора из n=10 здоровых доноров. Рисунок разработан автором

В то время как ответы тромбоцитов здоровых доноров на низкую концентрацию CRP (0,25 мкг/мл) были близки к нулю, активация тромбоцитов 1 мкг/мл CRP приводила к повышению концентрации кальция приблизительно на 50 нМ, причём среди здоровых доноров не наблюдалось значительной вариабельности по степени силы ответа (Рисунок 4.2). С другой стороны, ответы тромбоцитов здоровых доноров значительно варьировались при стимуляции их 5 мкг/мл CRP [171]. На основании данного результата среди здоровых доноров были выделены 2 группы: группа 1 – здоровые доноры с сильным ответом и

группа 2 – здоровые доноры со слабым ответом. Между двумя группами наблюдались статистически значимые различия (Рисунок 4.2). При этом между группами не наблюдалось различий по времени достижения максимального ответа. Важно отметить, что вариабельность не может быть объяснена только наличием полиморфизмов, так как показано, что полиморфизм PEALN встречается только у 13% здоровых доноров.

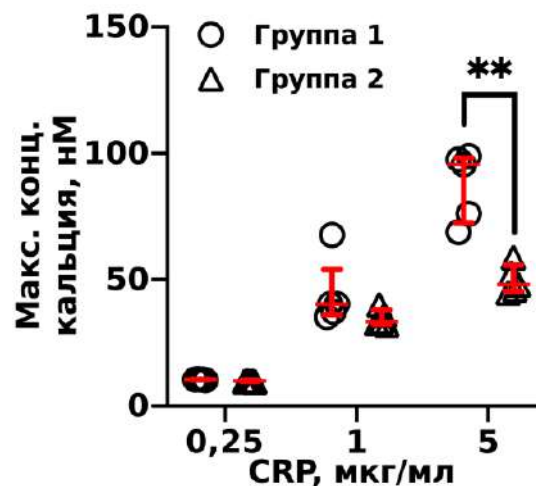


Рисунок 4.2 – Максимально достижимые концентрации кальция в цитозоле тромбоцитов в ответ на стимуляцию их 0,25, 1 и 5 мкг/мл CRP. Доноры были разделены на 2 группы: группа 1 (с сильным ответом на активацию тромбоцитов 5 мкг/мл) и группа 2 (со слабым ответом тромбоцитов на активацию 5 мкг/мл). Значимость оценивалась по непараметрическому критерию Манна-Уитни. ** - соответствует $p < 0,01$. Рисунок разработан автором

Одной из возможных причин подобного разброса может являться значительная вариабельность по экспрессии GPVI на поверхности тромбоцитов среди здоровых доноров. Так, в работе [187] было показано, что экспрессия GPVI у здоровых доноров может различаться более чем в 5 раз. С другой стороны, в той же работе не было обнаружено значительной разницы по агрегации тромбоцитов доноров в ответ на стимуляцию их конвульксином (экзогенный агонист GPVI), не зависимо от количества GPVI на поверхности [187]. Данный результат дополнительно подтверждает значимость вторичных медиаторов активации тромбоцитов, которая может позволить «преодолеть» недостатки первичного ответа. Вариабельность по количествам GPVI среди здоровых доноров была

показана и в другой работе, однако авторами был получен разброс только в полтора раза среди 102 здоровых доноров [183]. Авторы [183] также показали, что у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями, такими как эссенциальная тромбоцитопатия (ЭТП) и истинная полицитемия (ИПМ), наблюдается значительное снижение экспрессии GPVI по сравнению со здоровыми донорами, а также наблюдается более чем двухкратный разброс по экспрессии рецепторов на мембране тромбоцитов (Рисунок 4.3). Причинами столь значительного разброса по количеству рецепторов на тромбоцитах может являться как наследственность, так и потенциальные патологические факторы. Нельзя исключать и «shedding» рецепторов, возникающий из-за взятия крови у доноров [175]. Предполагается, что удалённый с тромбоцитов sGPVI всё равно может участвовать в процессах агрегации тромбоцитов, однако механизм подобного участия неясен [174; 175].

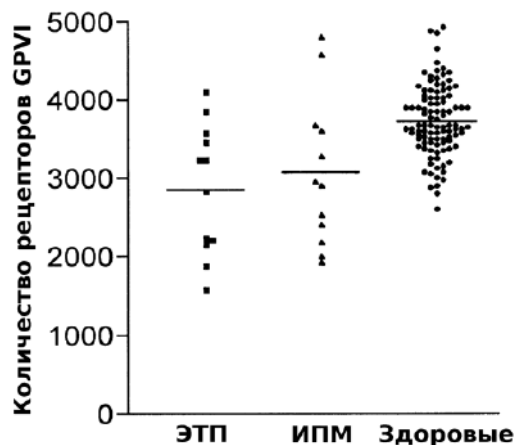


Рисунок 4.3 – Количества рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов пациентов с эссенциальной тромбоцитопенией (ЭТП), истинной полицитемией (ИПМ) или же на тромбоцитах здоровых доноров. Воспроизведено из [183]

Гипотеза о вкладе вариабельности количества рецепторов GPVI на тромбоцитах для кальциевых ответов в тромбоцитах также была исследована посредством разработанной в главе 3 модели. Анализ чувствительности модели показал, что начальное количество рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов является третьим (относительная чувствительность – 1,98) по значимости параметром для модели. С другой стороны, нелинейная зависимость

концентрации кальция от количества ИФ₃ (Рисунок 3.19) могла нивелировать влияние количество копий рецептора на кальциевые ответы. Несмотря на это, было получено, что изменение количества рецепторов GPVI с 5000 до 3000 копий на тромбоцит может привести к двукратному уменьшению максимальной концентрации кальция в ответ на стимуляцию (Рисунок 4.4). Таким образом, можно сделать вывод, что при варьировании количеств рецепторов в физиологических пределах (Рисунок 4.3) можно наблюдать кальциевые ответы, получаемые в экспериментах (Рисунок 4.2). Важно подчеркнуть, что вариабельность по кальциевым ответам наблюдается только при активации насыщающими концентрациям CRP, что подразумевает задействование всех рецепторов GPVI. Это также косвенно подтверждает вывод о том, что одной из причин вариабельности ответов тромбоцитов на активацию их через GPVI является вариабельность количества самих по себе рецепторов.

Важно также отметить, что в работе [120] теоретически была предсказана двукратная вариабельность активации тромбоцитов через GPVI только при уменьшении количества рецепторов более чем в 4 раза. Одной из причин подобных различий между моделью из [120] и разработанной здесь моделью может быть отсутствие в модели из [120] полноценной стадии кластеризации рецепторов.

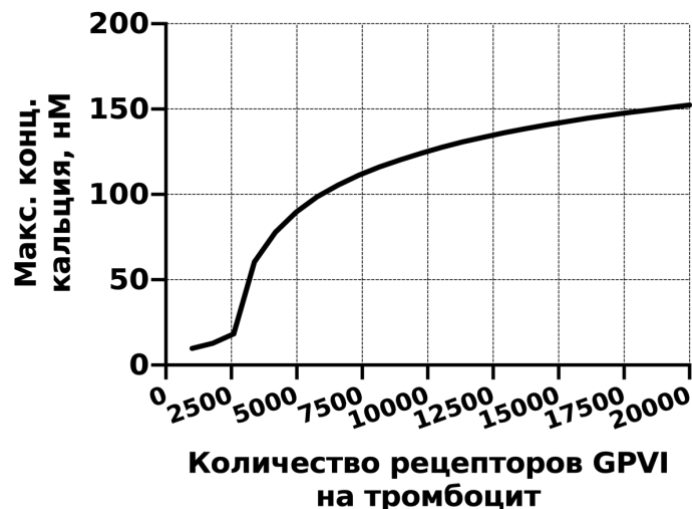


Рисунок 4.4 – Предсказываемая моделью зависимость максимально достижимой концентрации кальция от начального количества рецепторов GPVI на поверхности тромбоцитов. Рисунок разработан автором

4.2. Исследование CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой

4.2.1. Ключевая патология, развивающаяся через рецептор тромбоцитов CLEC-2 - капошиформная гемангиоэндотелиома (КГЭ)

Рецептор CLEC-2 и его функциональная значимость были продемонстрированы сравнительно недавно – первое упоминание в 2006ом году [33; 188], в то время как первые упоминания рецептора GPVI есть начиная с 1989го года [180]. Вероятно, именно из-за этого в настоящее время объём данных о патофизиологической значимости рецептора CLEC-2 значительно меньше, чем для рецептора GPVI. С другой стороны, дефекты CLEC-2-индуцированной сигнализации в тромбоцитах несут значительно более тяжёлые последствия для организма, нежели дефекты GPVI-индуцированной сигнализации [29]. Одним из наиболее изученных заболеваний, развивающихся за счёт рецепторов CLEC-2 тромбоцитов, является КГЭ [7; 33]. Помимо КГЭ экспрессия подопланина также показана и для ряда других опухолей, таких как глиомы и глиобластомы, однако роль тромбоцитов в развитии данных новообразований не была продемонстрирована [7].

КГЭ – редкое (встречаемость 0,07 случаев на 100000 случаев в год [189]) сосудистое новообразование, происходящее из эндотелиоцитов. КГЭ встречается, в основном, у детей до 3х лет и часто осложняется синдромом Казабаха-Мерритт (СКМ). СКМ – потенциально жизнеугрожающее осложнение [190], смертность от которого составляет до 30% [189]. СКМ выражается тромбоцитопенией, коагулопатией потребления, падением количества фибриногена и гемолитической анемией [190]. Клетки КГЭ выставляют на своей поверхности весь спектр эндотелиальных маркеров, среди которых CD31, CD34, а также подоплагин [7]. Считается, что КГЭ может «захватывать» тромбоциты через взаимодействие подоплагин-CLEC-2. Более того, ранее, посредством гистологического анализа,

было показано, что в КГЭ непосредственно присутствует колокализация тромбоцитов и подоплатин-экспрессирующих клеток опухоли [191]. Это приводит к активации тромбоцитов в области опухоли, формированию тромбоцитарных агрегатов и активации плазменного звена свёртывания [191]. Одновременно происходит активация системы разрушения тромбов – фибринолиза, что может становиться причиной кровоизлияний в области опухолей [7; 192].

Несмотря на общее представление о механизмах развития КГЭ, последствия активации тромбоцитов в области опухоли, а также их вклад в её развитие не охарактеризованы до конца. Предполагается, что из-за активации в КГЭ тромбоциты секретируют содержимое своих гранул, в котором присутствует набор факторов роста (сосудисто-эндотелиальный фактор роста и фактор роста тромбоцитарного происхождения). Таким образом, тромбоциты «стимулируют» процесс роста опухоли [33]. Несмотря на это, применение антитромбоцитарных препаратов у пациентов с КГЭ является, по меньшей мере, спорной [21,22]. Более того, применение антитромбоцитарных препаратов и/или антикоагулянтов к пациентам, у которых наблюдается тромбоцитопения и/или коагулопатия потребления, как у пациентов с СКМ, требует чрезвычайной осторожности. Таким образом, анализ CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах пациентов с КГЭ может позволить точно установить механизмы развития данного заболевания, что в перспективе поможет скорректировать его течение.

4.2.2. Исследование CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров и тромбоцитах пациентов с КГЭ

Так как в исследование были включены дети младше 3х лет, то объёмы образцов крови, которые можно было бы забирать для анализа, были значительно ограничены. Таким образом для анализа тромбоцитов был вновь использован метод проточной цитометрии, так как для него необходимо не более 500 мкл цельной крови. В качестве агониста CLEC-2 использовался не фукоидан, а родоцитин, так как показано, что он является более эффективным агонистом тромбоцитарного CLEC-2 [8; 161; 170]. Активация тромбоцитов проводилась 200 нМ родоцитина, что является насыщающей концентрацией [8]. Помимо CLEC-2-

индуцированной сигнализации также были активно проанализированы и другие пути сигнализации – АДФ (2 мкМ), CRP (5 мкг/мл) и ТРАП-6 (активатор тромбинового рецептора PAR1, 5 мкМ) индуцированная активация. Было получено, что ни в поющих тромбocyтах, ни в активированных (Рисунок 4.5 А и Б, соответственно) кальциевая сигнализация не отличалась между здоровыми донорами и пациентами с КГЭ. Тем не менее, можно отметить, что среди пациентов наблюдается значительная гетерогенность по силе ответов тромбocyтов на стимуляцию, что может объясняться различной степенью тяжести заболевания у пациентов с КГЭ.

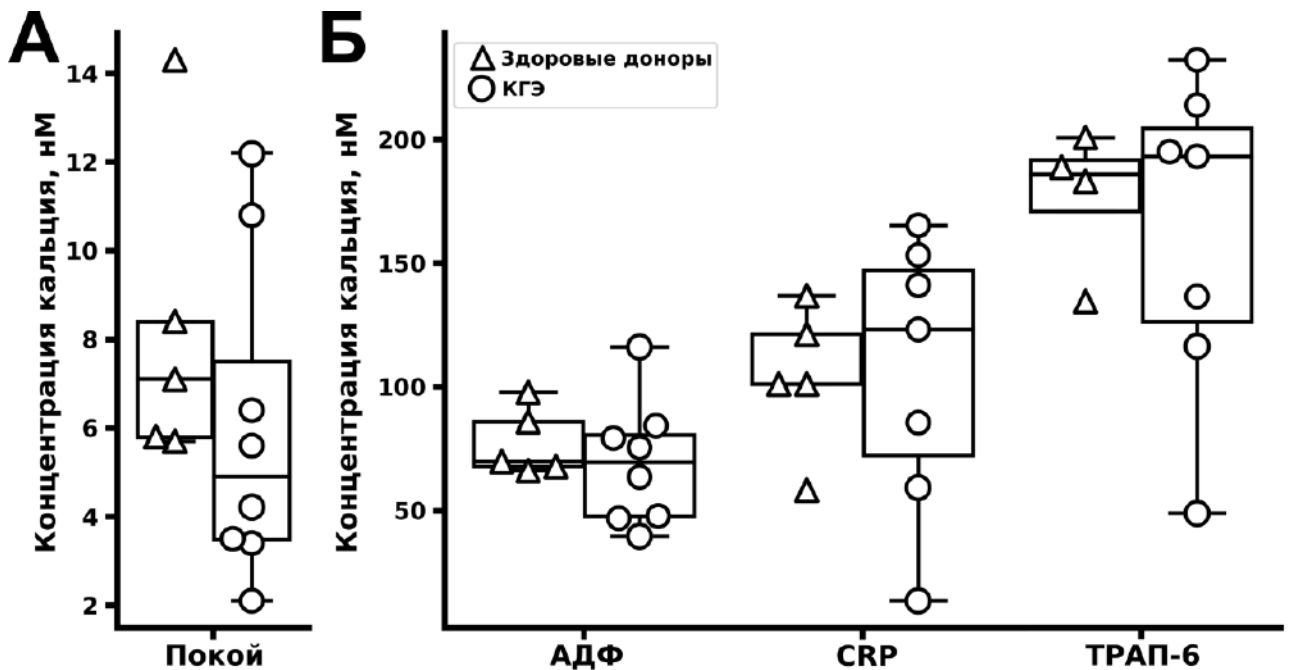


Рисунок 4.5 – Анализ кальциевой сигнализации в тромбоцитах здоровых педиатрических доноров (треугольники) и пациентов с КГЭ (круги). А – В поющих тромбоцитах концентрация кальция не отличалась значимо между тромбоцитами здоровых доноров и тромбоцитами пациентов. Б – При активации тромбоцитов 2 мкМ АДФ, 5 мкг/мл CRP и 5 мкМ ТРАП-6 (активатор рецептора тромбоцитов PAR1) максимальные концентрации кальция также не отличались значимо между тромбоцитами пациентов или тромбоцитами здоровых доноров. Значимость оценивалась по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Рисунок разработан автором

На основе анализа активации тромбоцитов родоцитинном было получено, что у пациентов наблюдается снижение кальциевого ответа при стимуляции их

через рецептор CLEC-2 (Рисунок 4.6). Интересно, что в этот раз определённая вариабельность наблюдалась уже среди здоровых доноров, а не среди пациентов. Важно отметить, что аналогично GPVI-индуцированной сигнализации времена достижения максимальной концентрации кальция в ответ на стимуляцию тромбоцитов через рецептор CLEC-2 не различались среди пациентов и здоровых доноров.

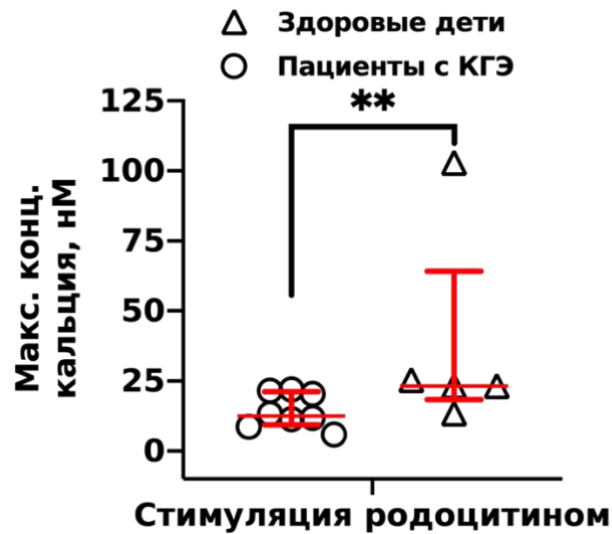


Рисунок 4.6 – Анализ максимально-достижимой концентрации кальция в тромбоцитах в ответ на активацию их 200 нМ родоцитина. Круги – пациенты с КГЭ, треугольники – здоровые дети. Значимость оценивалась по непараметрическому критерию Манна-Уитни. ** - соответствует $p < 0,01$. Рисунок разработан автором

Так как КГЭ может «захватывать» тромбоциты благодаря взаимодействию CLEC-2 тромбоцитов и подоплатина клеток КГЭ, можно предположить, что тромбоциты с нормальной экспрессией CLEC-2 остаются в опухоли, в то время как в кровотоке остаются только тромбоциты с низкой экспрессией CLEC-2. Таким образом, опухоль выступает в роли «фильтра» для тромбоцитов [33]. Для оценки правдоподобности данной гипотезы также была проведена оценка влияния количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов на максимальные кальциевые ответы в них с помощью разработанной в главе 3 модели. Так же, как и для модели рецептора GPVI, было получено, что количество рецепторов CLEC-2 на тромбоцитах является одним из наиболее

значимых параметров (5ый по значимости, после кинетических параметров тирозинкиназ Syk, количества тирозинкиназ Syk и реакции дефосфорилирования LAT). Варьирование количества CLEC-2 на тромбоцитах здоровых доноров в широких пределах показало, что максимально достижимая концентрация кальция в ответ на CLEC-2 индуцированную сигнализацию также в значительной степени зависит от количества рецепторов на тромбоцитах (Рисунок 4.7). Таким образом, на основании предсказаний модели можно сделать вывод, что даже незначительный дефицит количества рецепторов на тромбоцитах может приводить к значительному снижению максимальной концентрации кальция, что наблюдается у пациентов с КГЭ.

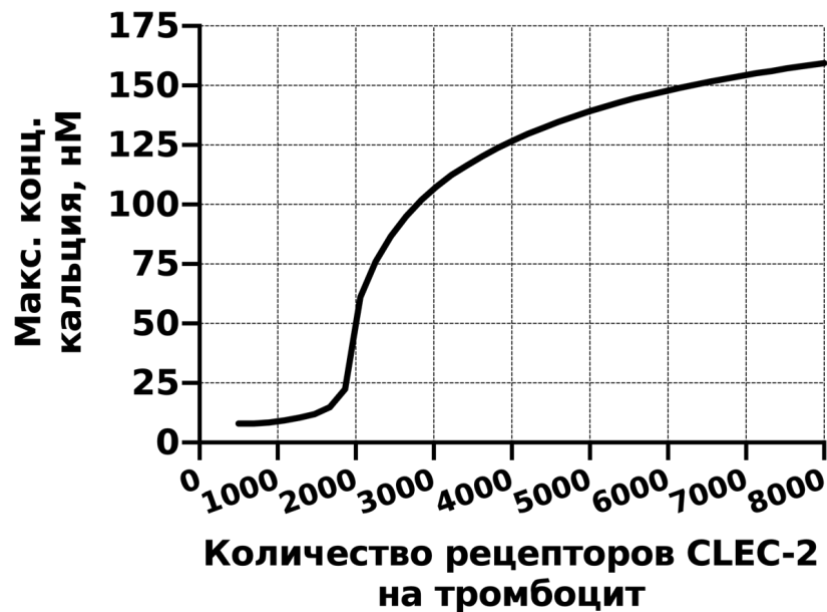


Рисунок 4.7 – Предсказываемая моделью зависимость максимально достижимой концентрации кальция от начального количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов. Рисунок разработан автором

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые было проведено исследование динамических характеристик тирозинкиназной сигнализации в тромбоцитах человека. Для этого была построена кинетическая модель активации тромбоцитов через рецепторы CLEC-2 и GPVI, полноценно учитывающую кластеризацию рецепторов в мембранах тромбоцитов, а также активацию тирозинкиназ, формирование LAT-сигнасомы и запуск кальциевой и фосфоинозитидной сигнализации. Математическая модель предсказала, что кластеризация рецепторов, наравне с активацией тирозинкиназ и формированием LAT-сигнасомы, является одной из скорость-лимитирующих стадий в процессе активации клетки от коллагена и подопланина.

Экспериментальная проверка предсказания теоретической модели о значимости динамики кластеризации рецепторов CLEC-2 для дальнейшей сигнализации была проведена сразу несколькими методами: с помощью вестерн-блоттинга, иммунофлуоресцентной микроскопии, а также посредством проточной цитометрии. Впервые получено, что температура окружающей среды может влиять на отдельные сигнальные пути в тромбоцитах: активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2 замедлялась на 20–30 секунд при снижении температуры на 10 градусов. Также показано, что насыщение мембраны тромбоцитов холестерином также влияет скорее на скорость активации тромбоцитов, а не на её степень, что соотносится с предсказаниями модели.

Другим предсказанием разработанной модели стала способность CLEC-2 инициировать кальциевую сигнализацию в тромбоцитах. Посредством проточной цитометрии данный результат был подтверждён экспериментально. Более того, CLEC-2 индуцированная кальциевая сигнализация в тромбоцитах также зависела от температуры и от насыщения мембраны тромбоцита холестерином. Однако АДФ-индуцированная сигнализация в тромбоцитах не зависела от температурных условий. Вероятно, именно динамика кластеризации рецепторов является

причиной медленной (по сравнению с GPCR-рецепторами) активации тромбоцитов через рецепторы GPVI и, особенно, рецептора CLEC-2.

Разработанный для анализа CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах метод анализа кальциевой сигнализации методом проточной цитометрии был затем использован для анализа GPVI- индуцированной сигнализации в тромбоцитах здоровых доноров. При исследовании 10 здоровых добровольцев было получено, что, в то время как ответы на низкие и средние концентрации активатора GPVI ответы тромбоцитов здоровых доноров были гомогенны, при сильной стимуляции тромбоцитарного GPVI кальциевые ответы различались более чем в 1,5–2 раза. Ранее в литературе было описано, что среди здоровых доноров может присутствовать вариабельность по количеству рецепторов GPVI, что может объяснять подобную вариабельность. С использованием разработанной модели рецепторов GPVI также было получено, что вариабельность ответов может быть связана с вариабельностью количества рецепторов на тромбоцитах. Интересно, что исходя из литературных данных, несмотря на вариабельность количества рецепторов GPVI на тромбоцитах здоровых доноров, агрегация тромбоцитов у этих доноров была достаточно гомогенной. Одним из механизмов компенсации гетерогенности кальциевой сигнализации у здоровых доноров может быть развитие фосфоинозитидной сигнализации, однако в настоящий момент возможности экспериментального анализа данной ветви сигнализации в тромбоцитах весьма ограничены.

Разработанный метод исследования кальциевой сигнализации оказался хорошо применим для исследования тромбоцитов как здоровых доноров, так и педиатрических пациентов. Особенно важно подчеркнуть, что, в отличие от большинства современных методик, разработанный метод позволяет оценивать первичную внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах как доноров с нормальными количествами тромбоцитов, так и для пациентов с тромбоцитопенией. Также важно отметить, что для исследования необходимы малые объёмы крови (не более 500 мкл), что важно при исследовании образцов детей до 2х лет. С помощью разработанного метода анализа была исследована

кальциевая сигнализация в тромбоцитах педиатрических здоровых доноров, а также в тромбоцитах пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой. Исходя из результатов исследования было получено, что активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2 ослаблена, в то время как активация через другие пути (АДФ, CRP, ТРАП-6) была в норме. Было сделано предположение, что на тромбоцитах пациентов снижены количества рецепторов CLEC-2 по причине того, что опухоли этих пациентов «фильтруют» тромбоциты с нормальными уровнями CLEC-2. Компьютерная модель также предсказала, что даже при незначительном снижении количества рецепторов CLEC-2 на поверхности тромбоцитов, происходит двукратное снижение максимально достижимой концентрации кальция в ответ на активацию CLEC-2. Метод анализа кальциевой сигнализации с помощью проточного цитометра в экспериментальном режиме уже используется для анализа сигнализации в тромбоцитах пациентов, проходящих лечение в НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева, и по поводу других заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Теоретически предсказано и подтверждено экспериментально, что кластеризация рецепторов в мембранах тромбоцитов наравне с активацией тирозинкиназ и формированием LAT-сигнасомы является одной из скорость-лимитирующих стадий для CLEC-2 индуцированной сигнализации в тромбоцитах. Нарушение паттерна и скорости кластеризации рецепторов может замедлять активацию тромбоцитов более чем на 200 секунд.
2. Показано, что активация тромбоцитов через рецептор CLEC-2 зависит от температуры и от концентрации холестерина в мембранах тромбоцитов: уменьшение температуры на 10 градусов замедляло активацию тромбоцитов через CLEC-2 на 30 ± 10 секунд, а снижение концентрации холестерина в мембране дополнительно на 40 ± 20 секунд.
3. Установлено, что кальциевые ответы тромбоцитов здоровых доноров на активацию их высокими концентрациями GPVI могут отличаться в 1,5–2 раза, предположительно, по причине вариабельности количества рецепторов GPVI у этих доноров.
4. CLEC-2 индуцированная активация тромбоцитов пациентов с КГЭ ослаблена, предположительно, по причине снижения количества этих рецепторов на поверхности тромбоцитов пациентов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	–	аденозиндифосфат
БЛП	–	богатая лейкоцитами плазма
БСА	–	бычий сывороточный альбумин
БТП	–	богатая тромбоцитами плазма
ГТФаза	–	гуанозинтрифосфат гидролаза
ДАГ	–	диацилглицерол
ИМП	–	истинная полицитемия
ИФ ₃	–	инозитол-3,4,5-трифосфат
КГЭ	–	капошиформная гемангиоэндотелиома
ОДУ	–	обыкновенные дифференциальные уравнения
ПГИ ₂	–	простагландин I ₂
ПФА	–	параформальдегид
РИФ ₃	–	рецептор к ИФ ₃
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
СКМ	–	синдром Казабаха-Меррит
ТРАП	–	активатор тромбинового рецептора PAR1
ТхА ₂	–	тромбоксан А ₂
ФВ	–	фактор фон Виллебранда
ФИФ ₂	–	фосфоинозитол-4,5-бисфосфат
ФИФ ₃	–	фосфоинозитол-3,4,5-трифосфат
ФЛСβ	–	фосфолипаза С β
ФЛСγ ₂	–	фосфолипаза С γ 2
цАМФ	–	циклический аденозинмонофосфат
ЭГТА	–	этиленгликоль-бис-тетраацетовая кислота
ЭПР	–	эндоплазматический ретикулум
ЭТП	–	эссенциальная тромбоцитопения
ADAM10	–	белок с дизентегриновым и металлопротеиназным доменом 10
BCR	–	Б-клеточный рецептор
Btk	–	тирозинкиназа Брутона
CalDAGGEFI	–	кальций-диацилглицерол чувствительный гуанодинотворный обменный фактор I
CLEC-2	–	лектин-подобный рецептор С-типа 2го рода
CRP	–	коллаген-подобный пептид
DGK	–	диацилглицерол киназа

DMSO	–	диметил сульфоксид
FcγRIIA	–	Fc рецептор γ типа IIА
FITC	–	флуоросцеин изотиоционат
GAP	–	ГТФаза активирующие белки
GEF	–	гуанодинотрифосфат обменный фактор
GPCR	–	рецептор, ассоциированный с G-белком
GPIb	–	гликопротеин 1b
GPVI	–	гликопротеин 6
HEPES	–	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
ITAM	–	иммунный тирозин-активируемый мотив
LAT	–	линкерный адаптерный T-клеточный белок
LSODA	–	численный метод интегрирования жёстких и нежёстких систем обыкновенных дифференциальных уравнений
MQ	–	деионизированная вода
mβCD	–	метил-β-циклодекстрин
PAR	–	протеаза активируемый рецепто
PEAR1	–	тромбоцитарно эндотелиальный агрегационный рецептор I
PH	–	плекстрин-гомологичный домен
PI3K	–	фосфоинозитид-3-киназа
PKA	–	протеин киназа А
PKC	–	протеин-киназа С
PTEN	–	фосфатаза с двойной субстратной специфичностью
PTP1b	–	протеин-тирозин-фосфатаза I
PVDF	–	поливинил-дифлуорид
RASA3	–	Ras-ГТФаза активирующий белок 3
RIAM	–	Rap1b-ГТФ связывающий адаптер
SDS	–	додецилсульфат натрия
SFK	–	семейство Src - киназ
SH	–	Src-гомологичный домен
SHIP	–	SH2 домен содержащая инозитолфосфат фосфатаза
SLP76	–	SH2-домен содержащий лимфоцитарный белок 76
SNARE	–	растворимые N-этилмолекул чувствительные факторы связывания
TULA2	–	T-клеточный убиквитин лиганд 2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // Онкогематология. – 2014. – Т. 9 – № 2 – С. 65–73.
2. Poulter, N.S. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets / N.S. Poulter, A.Y. Pollitt, D.M. Owen, E.E. Gardiner, R.K. Andrews, H. Shimizu, D. Ishikawa, D. Bihan, R.W. Farndale, M. Moroi, S.P. Watson, S.M. Jung // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2017. – Vol. 15 – № 3 – P. 549–564.
3. Johnson, E.N. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase / E.N. Johnson, L.F. Brass, C.D. Funk // Proceedings of the National Academy of Sciences. – Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. – Vol. 95 – № 6 – P. 3100–3105.
4. Rayes, J. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2 / J. Rayes, S.P. Watson, B. Nieswandt // The Journal of Clinical Investigation. – 2019. – Vol. 129 – № 1 – P. 12–23.
5. Hughes, C.E. The N-terminal SH2 domain of Syk is required for (hem)ITAM, but not integrin, signaling in mouse platelets / C.E. Hughes, B.A. Finney, F. Koentgen, K.L. Lowe, S.P. Watson // Blood. – 2015. – Vol. 125 – № 1 – P. 144–154.
6. Dhanjal, D.T.S. Minimal regulation of platelet activity by PECAM-1 / D.T.S. Dhanjal, E.A. Ross, J.M. Auger, O.J.T. Mccarty, C.E. Hughes, Y.A. Senis, S.P. Watson // Platelets. – Taylor & Francis, 2007. – Vol. 18 – № 1 – P. 56–67.
7. O’Rafferty, C. Kasabach–Merritt syndrome, kaposiform haemangioendothelioma and platelet blockade / C. O’Rafferty, G.M. O’Regan, A.D. Irvine, O.P. Smith // British Journal of Haematology. – 2015. – Vol. 171 – № 1 – P. 11–11.
8. Pollitt, A.Y. Syk and Src family kinases regulate C-type lectin receptor 2 (CLEC-2)-mediated clustering of podoplanin and platelet adhesion to lymphatic endothelial cells / A.Y. Pollitt, N.S. Poulter, E. Gitz, L. Navarro-Nuñez, Y.-J. Wang, C.E. Hughes, S.G. Thomas, B. Nieswandt, M.R. Douglas, D.M. Owen, D.G. Jackson, M.L. Dustin, S.P. Watson // The Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 289 – № 52 –

P. 35695–35710.

9. Watson, S.P. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity / S.P. Watson, J.M.J. Herbert, A.Y. Pollitt // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2010. – Vol. 8 – № 7 – P. 1456–1467.

10. Balabin, F.A. Computational biology analysis of platelet signaling reveals roles of feedbacks through phospholipase C and inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase in controlling amplitude and duration of calcium oscillations / F.A. Balabin, A.N. Sveshnikova // *Mathematical Biosciences.* – 2016. – Vol. 276 – P. 67–74.

11. Machlus, K.R. 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation / K.R. Machlus, J.E. Italiano // *Platelets (Fourth Edition)* / ed. by A.D. Michelson. – Academic Press, 2019. – P. 25–46.

12. Thon, J.N. Does size matter in platelet production? / J.N. Thon, J.E. Italiano // *Blood.* – 2012. – Vol. 120 – № 8 – P. 1552–1561.

13. Lebois, M. Regulation of platelet lifespan by apoptosis / M. Lebois, E.C. Josefsson // *Platelets.* – 2016. – Vol. 27 – № 6 – P. 497–504.

14. Li, J. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia / J. Li, D.E. van der Wal, G. Zhu, M. Xu, I. Yougbare, L. Ma, B. Vadasz, N. Carrim, R. Grozovsky, M. Ruan, L. Zhu, Q. Zeng, L. Tao, Z. Zhai, J. Peng, M. Hou, V. Leytin, J. Freedman, K.M. Hoffmeister, H. Ni // *Nature Communications.* – 2015. – Vol. 6 – P. 7737.

15. Hoffmeister, K.M. Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance / K.M. Hoffmeister, H. Falet // *Thrombosis Research.* – 2016. – Vol. 141 Suppl 2 – P. S68-72.

16. Versteeg, H.H. New fundamentals in hemostasis / H.H. Versteeg, J.W.M. Heemskerk, M. Levi, P.H. Reitsma // *Physiological Reviews.* – 2013. – Vol. 93 – № 1 – P. 327–358.

17. Deanfield, J.E. Endothelial Function and Dysfunction / J.E. Deanfield, J.P. Halcox, T.J. Rabelink // *Circulation.* – American Heart Association, 2007. – Vol. 115 – № 10 – P. 1285–1295.

18. Kumar, N.G. Fibrinolytic activity of endothelial cells from different venous beds /

- N.G. Kumar, A. Clark, E. Roztocil, X. Caliste, D.L. Gillespie, J.P. Cullen // *The Journal of Surgical Research*. – 2015. – Vol. 194 – № 1 – P. 297–303.
19. Stalker, T.J. Platelet signaling / T.J. Stalker, D.K. Newman, P. Ma, K.M. Wannemacher, L.F. Brass // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2012. – № 210 – P. 59–85.
20. Ju, L. Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Ib α in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics / L. Ju, Y. Chen, F. Zhou, H. Lu, M.A. Cruz, C. Zhu // *Thrombosis Research*. – 2015. – Vol. 136 – № 3 – P. 606–612.
21. Belyaev, A.V. Modeling thrombosis in silico: Frontiers, challenges, unresolved problems and milestones / A.V. Belyaev, J.L. Dunster, J.M. Gibbins, M.A. Panteleev, V. Volpert // *Physics of Life Reviews*. – 2018. – Vol. 26–27 – P. 57–95.
22. Herr, A.B. Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen / A.B. Herr, R.W. Farndale // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284 – № 30 – P. 19781–19785.
23. Brass, L.F. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury / L.F. Brass, K.M. Wannemacher, P. Ma, T.J. Stalker // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2011. – Vol. 9 – № Suppl 1 – P. 66–75.
24. Meijden, P.E.J. van der Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives / P.E.J. van der Meijden, J.W.M. Heemskerk // *Nature Reviews. Cardiology*. – 2019. – Vol. 16 – № 3 – P. 166–179.
25. 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, E.L. Grishchuk, F.I. Ataulakhanov, P.H. Mangin, M.A. Panteleev // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2019. – Vol. 39 – № 1 – P. 37–47.
26. Tomaiuolo, M. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis / M. Tomaiuolo, L.F. Brass, T.J. Stalker // *Interventional Cardiology Clinics*. – 2017. – Vol. 6 – № 1 – P. 1–12.

27. Sveshnikova, A. Platelet functional responses and signalling: the molecular relationship. Part 1: responses. / A. Sveshnikova, M. Stepanyan, M. Pantelev, A. Sveshnikova, M. Stepanyan, M. Pantelev // *Systems Biology and Physiology Reports*. – Globustar Formaat, 2021. – Vol. 1 – № 1 – P. 20.
28. Repsold, L. An overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia / L. Repsold, R. Pool, M. Karodia, G. Tintinger, A.M. Joubert // *Cancer Cell International*. – 2017. – Vol. 17 – P. 89.
29. Rayes, J. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2 / J. Rayes, S.P. Watson, B. Nieswandt // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129 – № 1 – P. 12–23.
30. Gawaz, M. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells / M. Gawaz, S. Vogel // *Blood*. – 2013. – Vol. 122 – № 15 – P. 2550–2554.
31. Ed Rainger, G. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease / G. Ed Rainger, M. Chimen, M.J. Harrison, C.M. Yates, P. Harrison, S.P. Watson, M. Lordkipanidzé, G.B. Nash // *Platelets*. – 2015. – Vol. 26 – № 6 – P. 507–520.
32. Hitchcock, J.R. Inflammation drives thrombosis after Salmonella infection via CLEC-2 on platelets / J.R. Hitchcock, C.N. Cook, S. Bobat, E.A. Ross, A. Flores-Langarica, K.L. Lowe, M. Khan, C.C. Dominguez-Medina, S. Lax, M. Carvalho-Gaspar, S. Hubscher, G.E. Rainger, M. Cobbold, C.D. Buckley, T.J. Mitchell, A. Mitchell, N.D. Jones, N. Van Rooijen, D. Kirchhofer, I.R. Henderson, D.H. Adams, S.P. Watson, A.F. Cunningham // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – Vol. 125 – № 12 – P. 4429–4446.
33. Мартянов, А.А. Физиологические и патофизиологические аспекты активации тромбоцитов крови через рецептор CLEC-2 / А.А. Мартянов, В.Н. Канева, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Онкогематология*. – 2018. – Т. 13 – № 3 – С. 83–90.
34. Bourne, J.H. Heme induces human and mouse platelet activation through C-type-lectin-like receptor-2 / J.H. Bourne, M. Colicchia, Y. Di, E. Martin, A. Slater, L.T.

Roumenina, J.D. Dimitrov, S.P. Watson, J. Rayes // *Haematologica*. – 2021. – Vol. 106 – № 2 – P. 626–629.

35. Payne, H. Mice with a deficiency in CLEC-2 are protected against deep vein thrombosis / H. Payne, T. Ponomaryov, S.P. Watson, A. Brill // *Blood*. – 2017. – Vol. 129 – № 14 – P. 2013–2020.

36. Ho-Tin-Noé, B. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation / B. Ho-Tin-Noé, Y. Boulaftali, E. Camerer // *Blood*. – 2018. – Vol. 131 – № 3 – P. 277–288.

37. Mangin, P.H. In vitro flow based systems to study platelet function and thrombus formation: Recommendations for standardization: Communication from the SSC on Biorheology of the ISTH / P.H. Mangin, E.E. Gardiner, W.S. Nesbitt, S.W. Kerrigan, N. Korin, W.A. Lam, M.A. Pantelev, Subcommittee on Biorheology // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2020. – Vol. 18 – № 3 – P. 748–752.

38. Arman, M. Human platelet IgG Fc receptor Fc γ RIIA in immunity and thrombosis / M. Arman, K. Krauel // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13 – № 6 – P. 893–908.

39. Yin, H. Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway / H. Yin, J. Liu, Z. Li, M.C. Berndt, C.A. Lowell, X. Du // *Blood*. – 2008. – Vol. 112 – № 4 – P. 1139–1146.

40. Lee, R.H. 18 - Platelet Signal Transduction / R.H. Lee, L. Stefanini, W. Bergmeier // *Platelets (Fourth Edition)* / ed. by A.D. Michelson. – Academic Press, 2019. – P. 329–348.

41. 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. – Vol. 30 – № 12 – P. 2341–2349.

42. Vadas, O. Molecular determinants of PI3K γ -mediated activation downstream of G-protein-coupled receptors (GPCRs) / O. Vadas, H.A. Dbouk, A. Shymanets, O. Perisic, J.E. Burke, W.F. Abi Saab, B.D. Khalil, C. Harteneck, A.R. Bresnick, B. Nürnberg, J.M. Backer, R.L. Williams // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110 – № 47 – P. 18862–

18867.

43. Bradshaw, J.M. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches / J.M. Bradshaw // *Cellular Signalling*. – 2010. – Vol. 22 – № 8 – P. 1175–1184.
44. Moroi, A.J. Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: Haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy / A.J. Moroi, S.P. Watson // *Biochemical Pharmacology*. – 2015. – Vol. 94 – № 3 – P. 186–194.
45. Falet, H. Platelet-associated IgAs and impaired GPVI responses in platelets lacking WIP / H. Falet, M. Marchetti, K. Hoffmeister, M. Massaad, R. Geha, J. Hartwig // *Blood*. – 2009. – Vol. 114 – P. 4729–37.
46. Sveshnikova, A.N. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling / A.N. Sveshnikova, A.V. Balatskiy, A.S. Demianova, T.O. Shepelyuk, S.S. Shakhidzhanov, M.N. Balatskaya, A.V. Pichugin, F.I. Ataulakhanov, M.A. Pantelev // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2016. – Vol. 14 – № 10 – P. 2045–2057.
47. Shakhidzhanov, S.S. Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation / S.S. Shakhidzhanov, V.I. Shaturny, M.A. Pantelev, A.N. Sveshnikova // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2015. – Vol. 1850 – № 12 – P. 2518–2529.
48. Fernández, D.I. Ultra-high-throughput Ca²⁺ assay in platelets to distinguish ITAM-linked and G-protein-coupled receptor activation / D.I. Fernández, I. Provenzale, H.Y.F. Cheung, J. van Groningen, B.M.E. Tullemans, A. Veninga, J.L. Dunster, S. Honarnejad, H. van den Hurk, M.J.E. Kuijpers, J.W.M. Heemskerk // *iScience*. – 2022. – Vol. 25 – № 1 – P. 103718.
49. Watson, A.A. The Crystal Structure and Mutational Binding Analysis of the Extracellular Domain of the Platelet-activating Receptor CLEC-2 * / A.A. Watson, J. Brown, K. Harlos, J.A. Eble, T.S. Walter, C.A. O'Callaghan // *Journal of Biological Chemistry*. – Elsevier, 2007. – Vol. 282 – № 5 – P. 3165–3172.
50. Watson, A.A. The platelet receptor CLEC-2 is active as a dimer / A.A. Watson, C.M. Christou, J.R. James, A.E. Fenton-May, G.E. Moncayo, A.R. Mistry, S.J. Davis,

- R.J.C. Gilbert, A. Chakera, C.A. O'Callaghan // *Biochemistry*. – 2009. – Vol. 48 – № 46 – P. 10988–10996.
51. Pollitt, A.Y. Phosphorylation of CLEC-2 is dependent on lipid rafts, actin polymerization, secondary mediators, and Rac / A.Y. Pollitt, B. Grygielska, B. Leblond, L. Désiré, J.A. Eble, S.P. Watson // *Blood*. – 2010. – Vol. 115 – № 14 – P. 2938–2946.
52. Tanimura, N. Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation / N. Tanimura, M. Nagafuku, Y. Minaki, Y. Umeda, F. Hayashi, J. Sakakura, A. Kato, D. Liddicoat, M. Ogata, T. Hamaoka, A. Kosugi // *The Journal of cell biology*. – 2003. – Vol. 160 – P. 125–35.
53. Lin, J. The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling / J. Lin, A. Weiss // *The Journal of Cell Biology*. – 2003. – Vol. 162 – № 4 – P. 673–682.
54. Quinter, P.G. Role of Lipid Rafts in GPVI Agonist-Induced Platelet Signaling. / P.G. Quinter, T.M. Quinton, C.A. Dangelmaier, S.P. Kunapuli, J.L. Daniel // *Blood*. – 2005. – Vol. 106 – № 11 – P. 3576.
55. Onselaer, M.-B. Comparison of the GPVI inhibitors losartan and honokiol / M.-B. Onselaer, M. Nagy, C. Pallini, J.A. Pike, G. Perrella, L.G. Quintanilla, J.A. Eble, N.S. Poulter, J.W.M. Heemskerk, S.P. Watson // *Platelets*. – 2020. – Vol. 31 – № 2 – P. 187–197.
56. Du, Z. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer / Z. Du, C.M. Lovly // *Molecular Cancer*. – 2018. – Vol. 17 – № 1 – P. 58.
57. Senis, Y.A. Src family kinases: at the forefront of platelet activation / Y.A. Senis, A. Mazharian, J. Mori // *Blood*. – 2014. – Vol. 124 – № 13 – P. 2013–2024.
58. Filippakopoulos, P. SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity / P. Filippakopoulos, S. Müller, S. Knapp // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2009. – Vol. 19 – № 6 – P. 643–649.
59. Saksela, K. SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? / K. Saksela, P. Permi // *FEBS letters*. – 2012. – Vol. 586 – № 17 – P. 2609–2614.
60. Schmaier, A.A. Molecular priming of Lyn by GPVI enables an immune receptor

- to adopt a hemostatic role / A.A. Schmaier, Z. Zou, A. Kazlauskas, L. Emert-Sedlak, K.P. Fong, K.B. Neeves, S.F. Maloney, S.L. Diamond, S.P. Kunapuli, J. Ware, L.F. Brass, T.E. Smithgall, K. Saksela, M.L. Kahn // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106 – № 50 – P. 21167–21172.
61. Tsang, E. Molecular mechanism of the Syk activation switch / E. Tsang, A.M. Giannetti, D. Shaw, M. Dinh, J.K.Y. Tse, S. Gandhi, H. Ho, S. Wang, E. Papp, J.M. Bradshaw // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283 – № 47 – P. 32650–32659.
62. Bergmeier, W. Platelet ITAM signaling / W. Bergmeier, L. Stefanini // *Current Opinion in Hematology*. – 2013. – Vol. 20 – № 5 – P. 445–450.
63. Мартьянов, А.А. CLEC-2-индуцированная внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах крови / А.А. Мартьянов, В.Н. Канева, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Биомедицинская химия*. – НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 2018. – Т. 64 – № 5 – С. 387–396.
64. Martyanov, A.A. Control of Platelet CLEC-2-Mediated Activation by Receptor Clustering and Tyrosine Kinase Signaling / A.A. Martyanov, F.A. Balabin, J.L. Dunster, M.A. Panteleev, J.M. Gibbins, A.N. Sveshnikova // *Biophysical Journal*. – 2020. – Vol. 118 – № 11 – P. 2641–2655.
65. Mócsai, A. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions / A. Mócsai, J. Ruland, V.L.J. Tybulewicz // *Nature Reviews Immunology*. – Nature Publishing Group, 2010. – Vol. 10 – № 6 – P. 387–402.
66. Séverin, S. Syk-dependent Phosphorylation of CLEC-2 / S. Séverin, A.Y. Pollitt, L. Navarro-Nuñez, C.A. Nash, D. Mourão-Sá, J.A. Eble, Y.A. Senis, S.P. Watson // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286 – № 6 – P. 4107–4116.
67. Roberts, J.M. Dynamics of the Tec-family tyrosine kinase SH3 domains / J.M. Roberts, S. Tarafdar, R.E. Joseph, A.H. Andreotti, T.E. Smithgall, J.R. Engen, T.E. Wales // *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. – 2016. – Vol. 25 – № 4 – P. 852–864.
68. Shatzel, J.J. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk

reduction strategies / J.J. Shatzel, S.R. Olson, D.L. Tao, O.J.T. McCarty, A.V. Danilov, T.G. DeLoughery // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2017. – Vol. 15 – № 5 – P. 835–847.

69. Manne, B.K. Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets / B.K. Manne, R. Badolia, C. Dangelmaier, J.A. Eble, W. Ellmeier, M. Kahn, S.P. Kunapuli // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2015. – Vol. 290 – № 18 – P. 11557–11568.

70. Nicolson, P.L.R. Low-dose Btk inhibitors selectively block platelet activation by CLEC-2 / P.L.R. Nicolson, S.H. Nock, J. Hinds, L. Garcia-Quintanilla, C.W. Smith, J. Campos, A. Brill, J.A. Pike, A.O. Khan, N.S. Poulter, D.M. Kavanagh, S. Watson, C.N. Watson, H. Clifford, A.P. Huissoon, A.Y. Pollitt, J.A. Eble, G. Pratt, S.P. Watson, C.E. Hughes // *Haematologica.* – 2021. – Vol. 106 – № 1 – P. 208–219.

71. Lian, L. The relative role of PLC β and PI3K γ in platelet activation / L. Lian, Y. Wang, J. Draznin, D. Eslin, J.S. Bennett, M. Poncz, D. Wu, C.S. Abrams // *Blood.* – 2005. – Vol. 106 – № 1 – P. 110–117.

72. Jang, H.-J. Phosphoinositide-Specific Phospholipase C (PI-PLC) / H.-J. Jang, Y.R. Yang, L. Cocco, S.H. Ryu, P.-G. Suh // *Encyclopedia of Signaling Molecules* / ed. by S. Choi. – Cham: Springer International Publishing, 2018. – P. 3973–3988.

73. Kramer, Ij.M. Chapter 9 - Protein Kinase C in Oncogenic Transformation and Cell Polarity / Ij.M. Kramer // *Signal Transduction (Third Edition)* / ed. by Ij.M. Kramer. – Boston: Academic Press, 2016. – P. 529–588.

74. Yada, Y. Purification and characterization of cytosolic diacylglycerol kinases of human platelets. / Y. Yada, T. Ozeki, H. Kanoh, Y. Nozawa // *Journal of Biological Chemistry.* – 1990. – Vol. 265 – № 31 – P. 19237–19243.

75. Burkhart, J.M. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways / J.M. Burkhart, M. Vaudel, S. Gambaryan, S. Radau, U. Walter, L. Martens, J. Geiger, A. Sickmann, R.P. Zahedi // *Blood.* – 2012. – Vol. 120 – № 15 – P. e73-82.

76. Gratacap, M.-P. Different roles of SHIP1 according to the cell context: the example of blood platelets / M.-P. Gratacap, S. Séverin, G. Chicanne, M. Plantavid, B.

Payraastre // *Advances in Enzyme Regulation*. – 2008. – Vol. 48 – P. 240–252.

77. Giuriato, S. SH2-containing inositol 5-phosphatases 1 and 2 in blood platelets: their interactions and roles in the control of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate levels. / S. Giuriato, X. Pesesse, S. Bodin, T. Sasaki, C. Viala, E. Marion, J. Penninger, S. Schurmans, C. Erneux, B. Payraastre // *Biochemical Journal*. – 2003. – Vol. 376 – № Pt 1 – P. 199–207.

78. Maxwell, M.J. SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin α IIb β 3 Signaling in Platelets* / M.J. Maxwell, Y. Yuan, K.E. Anderson, M.L. Hibbs, H.H. Salem, S.P. Jackson // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279 – № 31 – P. 32196–32204.

79. Cuenca-Zamora, E.J. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters / E.J. Cuenca-Zamora, F. Ferrer-Marín, J. Rivera, R. Teruel-Montoya // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20 – № 14.

80. Sadoul, K. New explanations for old observations: marginal band coiling during platelet activation / K. Sadoul // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13 – № 3 – P. 333–346.

81. Patel-Hett, S. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules / S. Patel-Hett, J.L. Richardson, H. Schulze, K. Drabek, N.A. Isaac, K. Hoffmeister, R.A. Shivdasani, J.C. Bulinski, N. Galjart, J.H. Hartwig, J.E. Italiano // *Blood*. – 2008. – Vol. 111 – № 9 – P. 4605–4616.

82. Thomas, S.G. 3 - The Structure of Resting and Activated Platelets / S.G. Thomas // *Platelets (Fourth Edition)* / ed. by A.D. Michelson. – Academic Press, 2019. – P. 47–77.

83. Heasman, S.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies / S.J. Heasman, A.J. Ridley // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2008. – Vol. 9 – № 9 – P. 690–701.

84. Ota, T. Positive regulation of Rho GTPase activity by RhoGDIs as a result of their direct interaction with GAPs / T. Ota, M. Maeda, M. Okamoto, M. Tatsuka // *BMC systems biology*. – 2015. – Vol. 9 – P. 3.

85. D'Agostino, M. A tethering complex drives the terminal stage of SNARE-

- dependent membrane fusion / M. D'Agostino, H.J. Risselada, A. Lürick, C. Ungermann, A. Mayer // *Nature*. – Nature Publishing Group, 2017. – Vol. 551 – № 7682 – P. 634–638.
86. Knight, D.E. Direct evidence for a role for Ca²⁺ in amine storage granule secretion by human platelets / D.E. Knight, M.C. Scrutton // *Thrombosis Research*. – 1980. – Vol. 20 – № 4 – P. 437–446.
87. Boswell, K.L. Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion / K.L. Boswell, D.J. James, J.M. Esquibel, S. Bruinsma, R. Shirakawa, H. Horiuchi, T.F.J. Martin // *Journal of Cell Biology*. – 2012. – Vol. 197 – № 2 – P. 301–312.
88. Neumüller, O. Synaptotagmin-like protein 1 interacts with the GTPase-activating protein Rap1GAP2 and regulates dense granule secretion in platelets / O. Neumüller, M. Hoffmeister, J. Babica, C. Prella, K. Gegenbauer, A.P. Smolenski // *Blood*. – 2009. – Vol. 114 – № 7 – P. 1396–1404.
89. Hampson, A. Synaptotagmin-like protein 4 and Rab8 interact and increase dense granule release in platelets / A. Hampson, A. O'connor, A. Smolenski // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2013. – Vol. 11 – № 1 – P. 161–168.
90. Tomida, Y. Calyculin and calvasculin exist in human platelets / Y. Tomida, M. Terasawa, R. Kobayashi, H. Hidaka // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1992. – Vol. 189 – № 3 – P. 1310–1316.
91. Quetglas, S. Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis / S. Quetglas, C. Iborra, N. Sasakawa, L. De Haro, K. Kumakura, K. Sato, C. Leveque, M. Seagar // *The EMBO Journal*. – 2002. – Vol. 21 – № 15 – P. 3970–3979.
92. Springer, T.A. Predicted and experimental structures of integrins and beta-propellers / T.A. Springer // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2002. – Vol. 12 – № 6 – P. 802–813.
93. Takagi, J. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling / J. Takagi, B.M. Petre, T. Walz, T.A. Springer // *Cell*. – 2002. – Vol. 110 – № 5 – P. 599–511.

94. Aylward, K. A novel functional role for the highly conserved alpha-subunit KVGFFKR motif distinct from integrin α IIb β 3 activation processes / K. Aylward, G. Meade, I. Ahrens, M. Devocelle, N. Moran // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2006. – Vol. 4 – № 8 – P. 1804–1812.
95. Calderwood, D.A. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling / D.A. Calderwood, Y. Fujioka, J.M. de Pereda, B. García-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C.J. McGlade, R.C. Liddington, M.H. Ginsberg // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2003. – Vol. 100 – № 5 – P. 2272–2277.
96. Stefanini, L. CalDAG-GEFI and platelet activation / L. Stefanini, W. Bergmeier // *Platelets.* – 2010. – Vol. 21 – № 4 – P. 239–243.
97. Sarker, M. Subcellular localization of Rap1 GTPase activator CalDAG-GEFI is orchestrated by interaction of its atypical C1 domain with membrane phosphoinositides / M. Sarker, A. Goliaei, F. Golesi, M. Poggi, A.A. Cook, M.A.I. Khan, B.R. Temple, L. Stefanini, M. Canault, W. Bergmeier, S.L. Campbell // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH.* – 2020. – Vol. 18 – № 3 – P. 693–705.
98. Stefanini, L. RAP GTPases and platelet integrin signaling / L. Stefanini, W. Bergmeier // *Platelets.* – 2019. – Vol. 30 – № 1 – P. 41–47.
99. King, P.D. Nonredundant Functions for Ras GTPase-Activating Proteins in Tissue Homeostasis / P.D. King, B.A. Lubeck, P.E. Lapinski // *Science signaling.* – 2013. – Vol. 6 – № 264 – P. re1.
100. Wang, J. Segregation of PIP2 and PIP3 into distinct nanoscale regions within the plasma membrane / J. Wang, D.A. Richards // *Biology Open.* – 2012. – Vol. 1 – № 9 – P. 857–862.
101. Bledzka, K. 12 - Integrin α IIb β 3 / K. Bledzka, J. Qin, E.F. Plow // *Platelets (Fourth Edition)* / ed. by A.D. Michelson. – Academic Press, 2019. – P. 227–241.
102. Shattil, S.J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets / S.J. Shattil, P.J. Newman // *Blood.* – 2004. – Vol. 104 – № 6 – P. 1606–1615.
103. Mangin, P.H. Immobilized fibrinogen activates human platelets through

glycoprotein VI / P.H. Mangin, M.-B. Onselaeer, N. Receveur, N. Le Lay, A.T. Hardy, C. Wilson, X. Sanchez, S. Loyau, A. Dupuis, A.K. Babar, J.L. Miller, H. Philippou, C.E. Hughes, A.B. Herr, R.A. Ariëns, D. Mezzano, M. Jandrot-Perrus, C. Gachet, S.P. Watson // *Haematologica*. – 2018. – Vol. 103 – № 5 – P. 898–907.

104. Boylan, B. Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing receptor mediating αIIbβ3 outside-in integrin signaling in human platelets / B. Boylan, C. Gao, V. Rathore, J.C. Gill, D.K. Newman, P.J. Newman // *Blood*. – 2008. – Vol. 112 – № 7 – P. 2780–2786.

105. Antenucci, L. Phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motifs and integrin cytoplasmic domains activate spleen tyrosine kinase via distinct mechanisms / L. Antenucci, V.P. Hytönen, J. Yläne // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293 – № 13 – P. 4591–4602.

106. Dunster, J.L. Mathematical Techniques for Understanding Platelet Regulation and the Development of New Pharmacological Approaches / J.L. Dunster, M.A. Panteleev, J.M. Gibbins, A.N. Sveshnikova // *Platelets and Megakaryocytes : Volume 4, Advanced Protocols and Perspectives: Methods in Molecular Biology* / ed. by J.M. Gibbins, M. Mahaut-Smith. – New York, NY: Springer, 2018. – P. 255–279.

107. Nechipurenko, D.Y. In Silico Hemostasis Modeling and Prediction / D.Y. Nechipurenko, A.M. Shibeko, A.N. Sveshnikova, M.A. Panteleev // *Hamostaseologie*. – 2020. – Vol. 40 – № 4 – P. 524–535.

108. Khanin, M.A. A mathematical model of the kinetics of blood coagulation / M.A. Khanin, V.V. Semenov // *Journal of Theoretical Biology*. – 1989. – Vol. 136 – № 2 – P. 127–134.

109. Sorensen, E.N. Computational Simulation of Platelet Deposition and Activation: I. Model Development and Properties / E.N. Sorensen, G.W. Burgreen, W.R. Wagner, J.F. Antaki // *Annals of Biomedical Engineering*. – 1999. – Vol. 27 – № 4 – P. 436–448.

110. Holmsen, H. Platelet metabolism and activation / H. Holmsen // *Seminars in Hematology*. – 1985. – Vol. 22 – № 3 – P. 219–240.

111. Varfolomeev, S.D. Kinetic behavior of the multienzyme system of blood prostanoid synthesis / S.D. Varfolomeev, V.P. Gachok, A.T. Mevkh // *Bio Systems*. –

1986. – Vol. 19 – № 1 – P. 45–54.

112. Thomas, A. Network reconstruction of platelet metabolism identifies metabolic signature for aspirin resistance / A. Thomas, S. Rahmanian, A. Bordbar, B.Ø. Palsson, N. Jamshidi // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4 – P. 3925.

113. Shepelyuk, T.O. Computational modeling of Quiescent Platelet Energy Metabolism in the Context of Whole-body Glucose Turnover / T.O. Shepelyuk, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova // *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*. – EDP Sciences, 2016. – Vol. 11 – № 6 – P. 91–101.

114. Guppy, M. Fuel choices by human platelets in human plasma / M. Guppy, L. Abas, C. Neylon, M.E. Whisson, S. Whitham, D.W. Pethick, X. Niu // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – Vol. 244 – № 1 – P. 161–167.

115. Purvis, J.E. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation / J.E. Purvis, M.S. Chatterjee, L.F. Brass, S.L. Diamond // *Blood*. – 2008. – Vol. 112 – № 10 – P. 4069–4079.

116. Thul, R. Translating intracellular calcium signaling into models / R. Thul // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2014. – Vol. 2014 – № 5.

117. Sneyd, J. A dynamic model of the type-2 inositol trisphosphate receptor / J. Sneyd, J.-F. Dufour // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99 – № 4 – P. 2398–2403.

118. Lenoci, L. Mathematical model of PAR1-mediated activation of human platelets / L. Lenoci, M. Duvernay, S. Satchell, E. DiBenedetto, H.E. Hamm // *Molecular bioSystems*. – 2011. – Vol. 7 – № 4 – P. 1129–1137.

119. Sveshnikova, A.N. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1 / A.N. Sveshnikova, F.I. Ataulakhanov, M.A. Panteleev // *Molecular bioSystems*. – 2015. – Vol. 11 – № 4 – P. 1052–1060.

120. Dunster, J.L. Regulation of Early Steps of GPVI Signal Transduction by Phosphatases: A Systems Biology Approach / J.L. Dunster, F. Mazet, M.J. Fry, J.M. Gibbins, M.J. Tindall // *PLoS computational biology*. – 2015. – Vol. 11 – № 11 –

P. e1004589.

121. Mischnik, M. A Boolean view separates platelet activatory and inhibitory signalling as verified by phosphorylation monitoring including threshold behaviour and integrin modulation / M. Mischnik, D. Boyanova, K. Hubertus, J. Geiger, N. Philippi, M. Dittrich, G. Wangorsch, J. Timmer, T. Dandekar // *Molecular bioSystems*. – 2013. – Vol. 9 – № 6 – P. 1326–1339.

122. Mahammad, S. Cholesterol depletion using methyl- β -cyclodextrin / S. Mahammad, I. Parmryd // *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). – 2015. – Vol. 1232 – P. 91–102.

123. Мартьянов, А.А. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича / А.А. Мартьянов, Д.С. Морозова, А.Л. Хорева, М.А. Пантелеев, А.Ю. Щербина, А.Н. Свешникова // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2020. – Т. 19 – № 1 – С. 100-107–107.

124. Martyanov, A.A. Heterogeneity of Integrin α IIb β 3 Function in Pediatric Immune Thrombocytopenia Revealed by Continuous Flow Cytometry Analysis / A.A. Martyanov, D.S. Morozova, M.A. Sorokina, A.A. Filkova, D.V. Fedorova, S.S. Uzueva, E.V. Suntsova, G.A. Novichkova, P.A. Zharkov, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova // *International Journal of Molecular Sciences*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. – Vol. 21 – № 9 – P. 3035.

125. Thomas, D. A comparison of fluorescent Ca^{2+} indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca^{2+} signals / D. Thomas, S.C. Tovey, T.J. Collins, M.D. Bootman, M.J. Berridge, P. Lipp // *Cell Calcium*. – 2000. – Vol. 28 – № 4 – P. 213–223.

126. Grynkiewicz, G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Vol. 260 – № 6 – P. 3440–3450.

127. Schoenmakers, T. CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. / T. Schoenmakers, G.J. Visser, G. Flik, A. Theuvenet // *Biotechniques*. – 1992. – Vol. 12 – № 6 – P. 870–4.

128. Petzold, L. Automatic Selection of Methods for Solving Stiff and Nonstiff Systems of Ordinary Differential Equations / L. Petzold // *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*. – Society for Industrial and Applied Mathematics, 1983. – Vol. 4 – № 1 – P. 136–148.
129. Kennedy, J. Particle swarm optimization / J. Kennedy, R. Eberhart // *Proceedings of ICNN'95 - International Conference on Neural Networks: Proceedings of ICNN'95 - International Conference on Neural Networks*. – 1995. – Vol. 4 – P. 1942–1948 vol.4.
130. Hooke, R. Direct Search'' Solution of Numerical and Statistical Problems / R. Hooke, T.A. Jeeves // *Journal of the ACM*. – 1961. – Vol. 8 – № 2 – P. 212–229.
131. Marquardt, D.W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters / D.W. Marquardt // *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*. – Society for Industrial and Applied Mathematics, 1963. – Vol. 11 – № 2 – P. 431–441.
132. Castro, M. Receptor Pre-Clustering and T cell Responses: Insights into Molecular Mechanisms / M. Castro, H.M. van Santen, M. Férez, B. Alarcón, G. Lythe, C. Molina-París // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5.
133. Detmers, P.A. Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand / P.A. Detmers, S.D. Wright, E. Olsen, B. Kimball, Z.A. Cohn // *The Journal of Cell Biology*. – 1987. – Vol. 105 – № 3 – P. 1137–1145.
134. Head, B.P. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling / B.P. Head, H.H. Patel, P.A. Insel // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2014. – Vol. 1838 – № 2 – P. 532–545.
135. Shen, Z. Conformational change within the extracellular domain of B cell receptor in B cell activation upon antigen binding / Z. Shen, S. Liu, X. Li, Z. Wan, Y. Mao, C. Chen, W. Liu // *eLife*. – 2019. – Vol. 8 – P. e42271.
136. Li, L. Lipid rafts enhance the binding constant of membrane-anchored receptors and ligands / L. Li, J. Hu, X. Shi, Y. Shao, F. Song // *Soft Matter*. – 2017. – Vol. 13 – № 23 – P. 4294–4304.
137. Bray, D. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity / D.

- Bray, M.D. Levin, C.J. Morton-Firth // *Nature*. – 1998. – Vol. 393 – № 6680 – P. 85–88.
138. Hartman, N.C. Signaling clusters in the cell membrane / N.C. Hartman, J.T. Groves // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2011. – Vol. 23 – № 4 – P. 370–376.
139. Tian, T. Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction / T. Tian, A. Harding, K. Inder, S. Plowman, R.G. Parton, J.F. Hancock // *Nature Cell Biology*. – 2007. – Vol. 9 – № 8 – P. 905–914.
140. Welf, E.S. A spatial model for integrin clustering as a result of feedback between integrin activation and integrin binding / E.S. Welf, U.P. Naik, B.A. Ogunnaike // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 103 – № 6 – P. 1379–1389.
141. Caré, B.R. Impact of receptor clustering on ligand binding / B.R. Caré, H.A. Soula // *BMC Systems Biology*. – 2011. – Vol. 5 – № 1 – P. 48.
142. Gopalakrishnan, M. Effects of receptor clustering on ligand dissociation kinetics: theory and simulations / M. Gopalakrishnan, K. Forsten-Williams, M.A. Nugent, U.C. Täuber // *Biophysical Journal*. – 2005. – Vol. 89 – № 6 – P. 3686–3700.
143. Mugler, A. Membrane clustering and the role of rebinding in biochemical signaling / A. Mugler, A.G. Bailey, K. Takahashi, P.R. ten Wolde // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 102 – № 5 – P. 1069–1078.
144. Fallahi-Sichani, M. Lipid raft-mediated regulation of G-protein coupled receptor signaling by ligands which influence receptor dimerization: a computational study / M. Fallahi-Sichani, J.J. Linderman // *PloS One*. – 2009. – Vol. 4 – № 8 – P. e6604.
145. Gardina, P.J. Attractant signaling by an aspartate chemoreceptor dimer with a single cytoplasmic domain / P.J. Gardina, M.D. Manson // *Science (New York, N.Y.)*. – 1996. – Vol. 274 – № 5286 – P. 425–426.
146. Arosio, P. Population balance modeling of antibodies aggregation kinetics / P. Arosio, S. Rima, M. Lattuada, M. Morbidelli // *The Journal of Physical Chemistry. B*. – 2012. – Vol. 116 – № 24 – P. 7066–7075.
147. Fornari, S. Spatially-extended nucleation-aggregation-fragmentation models for the dynamics of prion-like neurodegenerative protein-spreading in the brain and its connectome / S. Fornari, A. Schäfer, E. Kuhl, A. Goriely // *Journal of Theoretical*

Biology. – 2020. – Vol. 486 – P. 110102.

148. Kier, L.B. Models of solute aggregation using cellular automata / L.B. Kier, C.-K. Cheng, J.D. Nelson // *Chemistry & Biodiversity*. – 2009. – Vol. 6 – № 3 – P. 396–401.

149. Lahiri, S. Kinetics and thermodynamics of reversible polymerization in closed systems / S. Lahiri, Y. Wang, M. Esposito, D. Lacoste // *New Journal of Physics*. – IOP Publishing, 2015. – Vol. 17 – № 8 – P. 085008.

150. Przybycien, T.M. Aggregation kinetics in salt-induced protein precipitation / T.M. Przybycien, J.E. Bailey // *AIChE Journal*. – 1989. – Vol. 35 – № 11 – P. 1779–1790.

151. Richardson, G. Toward a Mathematical Model of the Assembly and Disassembly of Membrane Microdomains: Comparison with Experimental Models / G. Richardson, L.J. Cummings, H.J. Harris, P. O'Shea // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 92 – № 12 – P. 4145–4156.

152. Zhu, H. Asynchronous adaptive time step in quantitative cellular automata modeling / H. Zhu, P.Y. Pang, Y. Sun, P. Dhar // *BMC Bioinformatics*. – 2004. – Vol. 5 – № 1 – P. 85.

153. Garzon Dasgupta, A.K. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors / A.K. Garzon Dasgupta, A.A. Martyanov, A.A. Filkova, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova // *Life*. – Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. – Vol. 10 – № 6 – P. 97.

154. Stilck, J.F. Lattice models for confined polymers / J.F. Stilck // *Brazilian Journal of Physics*. – Sociedade Brasileira de Física, 1998. – Vol. 28 – P. 369–379.

155. Wang, H. Self-Organized Periodicity of Protein Clusters in Growing Bacteria / H. Wang, N.S. Wingreen, R. Mukhopadhyay // *Physical Review Letters*. – American Physical Society, 2008. – Vol. 101 – № 21 – P. 218101.

156. Zidar, M. Characterisation of protein aggregation with the Smoluchowski coagulation approach for use in biopharmaceuticals / M. Zidar, D. Kuzman, M. Ravnik // *Soft Matter*. – The Royal Society of Chemistry, 2018. – Vol. 14 – № 29 – P. 6001–6012.

157. Filkova, A.A. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation:

mathematical modelling and experiments / A.A. Filkova, A.A. Martyanov, A.K. Garzon Dasgupta, M.A. Panteleev, A.N. Sveshnikova // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9 – № 1 – P. 6217.

158. Мартьянов, А.А. Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом / А.А. Мартьянов, Ф.А. Балабин, А.С. Майоров, Е.В. Шамова, М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Биологические Мембраны*. – 2018. – Т. 35 – № 5.

159. Sveshnikova, A.N. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1 / A.N. Sveshnikova, F.I. Ataulakhanov, M.A. Panteleev // *Mol. BioSyst.* – Royal Society of Chemistry, 2015. – Vol. 11 – № 4 – P. 1052–1060.

160. Eckly, A. Respective contributions of single and compound granule fusion to secretion by activated platelets / A. Eckly, J.Y. Rinckel, F. Proamer, N. Ulas, S. Joshi, S.W. Whiteheart, C. Gachet // *Blood*. – 2016. – Vol. 128 – № 21 – P. 2538–2549.

161. Manne, B.K. Fucoidan is a novel platelet agonist for the C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) / B.K. Manne, T.M. Getz, C.E. Hughes, O. Alshehri, C. Dangelmaier, U.P. Naik, S.P. Watson, S.P. Kunapuli // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288 – № 11 – P. 7717–7726.

162. Musumeci, L. Dual-specificity phosphatase 3 deficiency or inhibition limits platelet activation and arterial thrombosis / L. Musumeci, M.J. Kuijpers, K. Gilio, A. Hego, E. Théâtre, L. Maurissen, M. Vandereyken, C.V. Diogo, C. Lecut, W. Guilmain, E.V. Bobkova, J.A. Eble, R. Dahl, P. Drion, J. Rascon, Y. Mostofi, H. Yuan, E. Sergienko, T.D.Y. Chung, M. Thiry, Y. Senis, M. Moutschen, T. Mustelin, P. Lancellotti, J.W.M. Heemskerk, L. Tautz, C. Oury, S. Rahmouni // *Circulation*. – 2015. – Vol. 131 – № 7 – P. 656–668.

163. Medda, L. The molecular motion of bovine serum albumin under physiological conditions is ion specific / L. Medda, M. Monduzzi, A. Salis // *Chem. Commun.* – Royal Society of Chemistry, 2015. – Vol. 51 – № 30 – P. 6663–6666.

164. Bag, N. Temperature dependence of diffusion in model and live cell membranes characterized by imaging fluorescence correlation spectroscopy / N. Bag, D. Hui, X.

Yap, T. Wohland // *BBA - Biomembranes*. – Elsevier B.V., 2014. – Vol. 1838 – № 3 – P. 802–813.

165. Bag, N. Calibration and Limits of Camera-Based Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Supported Lipid Bilayer Study / N. Bag, J. Sankaran, A. Paul, R.S. Kraut. – 2012. – Vol. 66123 – P. 1–12.

166. Яковенко, Л.В. Основы химической термодинамики для биофизиков / Л.В. Яковенко. – 1st ed. – Москва: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2019.

167. Mukherjee, S. Monovalent and multivalent ligation of the B cell receptor exhibit differential dependence upon Syk and Src family kinases / S. Mukherjee, J. Zhu, J. Zikherman, R. Parameswaran, T.A. Kadlecsek, Q. Wang, B. Au-Yeung, H. Ploegh, J. Kuriyan, J. Das, A. Weiss // *Science Signaling*. – 2013. – Vol. 6 – № 256 – P. ra1.

168. Packham, M.A. Thromboxane A₂ causes feedback amplification involving extensive thromboxane A₂ formation on close contact of human platelets in media with a low concentration of ionized calcium / M.A. Packham, R.L. Kinlough-Rathbone, J.F. Mustard // *Blood*. – 1987. – Vol. 70 – № 3 – P. 647–651.

169. Manne, B.K. C-type lectin like-receptor 2 (CLEC-2) signals independently of lipid raft microdomains in platelets / B.K. Manne, R. Badolia, C.A. Dangelmaier, S.P. Kunapuli // *Biochemical pharmacology*. – 2015. – Vol. 93 – № 2 – P. 163–170.

170. Kardeby, C. Synthetic glycopolymers and natural fucoidans cause human platelet aggregation via PEAR1 and GPIIb/IIIa / C. Kardeby, K. Fälker, E.J. Haining, M. Criel, M. Lindkvist, R. Barroso, P. Pålsson, L.U. Ljungberg, M. Tengdelius, G.E. Rainger, S. Watson, J.A. Eble, M.F. Hoylaerts, J. Emsley, P. Konradsson, S.P. Watson, Y. Sun, M. Grenegård // *Blood Advances*. – 2019. – Vol. 3 – № 3 – P. 275–287.

171. Степанян, М.Г. Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: вариабельность ответа / М.Г. Степанян, А.А. Филькова, Гарсон Дасгупта А.к., А.А. Мартьянов, А.Н. Свешникова // *Биологические Мембраны*. – 2020. – Т. 37 – № 6.

172. Ahmed, M.U. Pharmacological Blockade of Glycoprotein VI Promotes Thrombus Disaggregation in the Absence of Thrombin / M.U. Ahmed, V. Kaneva, S. Loyau, D. Nechipurenko, N. Receveur, M. Le Bris, E. Janus-Bell, M. Didelot, A. Rauch, S. Susen,

- N. Chakfé, F. Lanza, E.E. Gardiner, R.K. Andrews, M. Panteleev, C. Gachet, M. Jandrot-Perrus, P.H. Mangin // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2020. – Vol. 40 – № 9 – P. 2127–2142.
173. Bodin, S. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets / S. Bodin, C. Soulet, H. Tronchère, P. Sié, C. Gachet, M. Plantavid, B. Payrastre // *Journal of Cell Science*. – 2005. – Vol. 118 – № Pt 4 – P. 759–769.
174. Montague, S.J. Mechanisms of receptor shedding in platelets / S.J. Montague, R.K. Andrews, E.E. Gardiner // *Blood*. – 2018. – Vol. 132 – № 24 – P. 2535–2545.
175. Montague, S.J. Soluble GPVI is elevated in injured patients: shedding is mediated by fibrin activation of GPVI / S.J. Montague, C. Delierneux, C. Lecut, N. Layios, R.J. Dinsdale, C.S.-M. Lee, N.S. Poulter, R.K. Andrews, P. Hampson, C.M. Wearn, N. Maes, J. Bishop, A. Bamford, C. Gardiner, W.M. Lee, T. Iqbal, N. Moiemmen, S.P. Watson, C. Oury, P. Harrison, E.E. Gardiner // *Blood Advances*. – 2018. – Vol. 2 – № 3 – P. 240–251.
176. Dumont, B. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations / B. Dumont, D. Lasne, C. Rothschild, M. Bouabdelli, V. Ollivier, C. Oudin, N. Ajzenberg, B. Grandchamp, M. Jandrot-Perrus // *Blood*. – 2009. – Vol. 114 – № 9 – P. 1900–1903.
177. Hermans, C. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder / C. Hermans, C. Wittevrongel, C. Thys, P.A. Smethurst, C. Van Geet, K. Freson // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2009. – Vol. 7 – № 8 – P. 1356–1363.
178. Matus, V. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families / V. Matus, G. Valenzuela, C.G. Sáez, P. Hidalgo, M. Lagos, E. Aranda, O. Panes, J. Pereira, X. Pillois, A.T. Nurden, D. Mezzano // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2013. – Vol. 11 – № 9 – P. 1751–1759.
179. Arthur, J.F. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects / J.F. Arthur, S. Dunkley, R.K. Andrews // *British Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 139 – № 3 –

P. 363–372.

180. Moroi, M. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion / M. Moroi, S.M. Jung, M. Okuma, K. Shinmyozu // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1989. – Vol. 84 – № 5 – P. 1440–1445.

181. Croft, S.A. Novel platelet membrane glycoprotein VI dimorphism is a risk factor for myocardial infarction / S.A. Croft, N.J. Samani, M.D. Teare, K.K. Hampton, R.P. Steeds, K.S. Channer, M.E. Daly // *Circulation*. – 2001. – Vol. 104 – № 13 – P. 1459–1463.

182. Joutsu-Korhonen, L. The low-frequency allele of the platelet collagen signaling receptor glycoprotein VI is associated with reduced functional responses and expression / L. Joutsu-Korhonen, P.A. Smethurst, A. Rankin, E. Gray, M. IJsseldijk, C.M. Onley, N.A. Watkins, L.M. Williamson, A.H. Goodall, P.G. de Groot, R.W. Farndale, W.H. Ouwehand // *Blood*. – 2003. – Vol. 101 – № 11 – P. 4372–4379.

183. Best, D. GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear / D. Best, Y.A. Senis, G.E. Jarvis, H.J. Eagleton, D.J. Roberts, T. Saito, S.M. Jung, M. Moroi, P. Harrison, F.R. Green, S.P. Watson // *Blood*. – 2003. – Vol. 102 – № 8 – P. 2811–2818.

184. Snoep, J.D. The minor allele of GP6 T13254C is associated with decreased platelet activation and a reduced risk of recurrent cardiovascular events and mortality: results from the SMILE-Platelets project / J.D. Snoep, P. Gaussem, J.C.J. Eikenboom, J. Emmerich, J.J. Zwaginga, C.E. Holmes, H.L. Vos, P.G. de Groot, D.M. Herrington, P.F. Bray, F.R. Rosendaal, J.G. van der Bom // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. – 2010. – Vol. 8 – № 11 – P. 2377–2384.

185. Trifiro, E. The low-frequency isoform of platelet glycoprotein VIb attenuates ligand-mediated signal transduction but not receptor expression or ligand binding / E. Trifiro, S.A. Williams, Y. Cheli, K. Furihata, F.M. Pulcinelli, D.J. Nugent, T.J. Kunicki // *Blood*. – 2009. – Vol. 114 – № 9 – P. 1893–1899.

186. Wersäll, A. Mouse Platelet Ral GTPases Control P-Selectin Surface Expression, Regulating Platelet–Leukocyte Interaction / A. Wersäll, C.M. Williams, E. Brown, T.

- Iannitti, N. Williams, A.W. Poole // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – American Heart Association, 2018. – Vol. 38 – № 4 – P. 787–800.
187. Furihata, K. Variation in human platelet glycoprotein VI content modulates glycoprotein VI-specific prothrombinase activity / K. Furihata, K.J. Clemetson, H. Deguchi, T.J. Kunicki // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2001. – Vol. 21 – № 11 – P. 1857–1863.
188. Suzuki-Inoue, K. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2 / K. Suzuki-Inoue, G.L.J. Fuller, A. García, J.A. Eble, S. Pöhlmann, O. Inoue, T.K. Gartner, S.C. Hughan, A.C. Pearce, G.D. Laing, R.D.G. Theakston, E. Schweighoffer, N. Zitzmann, T. Morita, V.L.J. Tybulewicz, Y. Ozaki, S.P. Watson // *Blood*. – 2006. – Vol. 107 – № 2 – P. 542–549.
189. Croteau, S.E. Kaposiform hemangioendothelioma: atypical features and risks of Kasabach-Merritt phenomenon in 107 referrals / S.E. Croteau, M.G. Liang, H.P. Kozakewich, A.I. Alomari, S.J. Fishman, J.B. Mulliken, C.C. Trenor // *The Journal of Pediatrics*. – 2013. – Vol. 162 – № 1 – P. 142–147.
190. Enjolras, O. Infants with Kasabach-Merritt syndrome do not have “true” hemangiomas / O. Enjolras, M. Wassef, E. Mazoyer, I.J. Frieden, P.N. Rieu, L. Drouet, A. Taïeb, J.F. Stalder, J.P. Escande // *The Journal of Pediatrics*. – 1997. – Vol. 130 – № 4 – P. 631–640.
191. Seo, S.K. Kasabach-Merritt syndrome: identification of platelet trapping in a tufted angioma by immunohistochemistry technique using monoclonal antibody to CD61 / S.K. Seo, J.C. Suh, G.Y. Na, I.S. Kim, K.R. Sohn // *Pediatric Dermatology*. – 1999. – Vol. 16 – № 5 – P. 392–394.
192. Yao, W. Standards of care for Kasabach-Merritt phenomenon in China / W. Yao, K.-L. Li, Z.-P. Qin, K. Li, J.-W. Zheng, X.-D. Fan, L. Ma, D.-K. Zhou, X.-J. Liu, L. Wei, L. Li, M.-Z. Tai, J.-H. Wang, Y. Ji, L. Zhou, H.-J. Huang, X.-Y. Gao, Z.-J. Huang, S. Gu, H.-Y. Yang // *World journal of pediatrics: WJP*. – 2021. – Vol. 17 – № 2 – P. 123–130.
193. Manne, B.K. Fucoidan is a novel platelet agonist for the C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) / B.K. Manne, T.M. Getz, C.E. Hughes, O. Alshehri, C.

- Dangelmaier, U.P. Naik, S.P. Watson, S.P. Kunapuli // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288 – № 11 – P. 7717–7726.
194. Gitz, E. CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles / E. Gitz, A.Y. Pollitt, J.J. Gitz-Francois, O. Alshehri, J. Mori, S. Montague, G.B. Nash, M.R. Douglas, E.E. Gardiner, R.K. Andrews, C.D. Buckley, P. Harrison, S.P. Watson // *Blood*. – 2014. – Vol. 124 – № 14 – P. 2262–2270.
195. Burkhart, J.M. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways / J.M. Burkhart, M. Vaudel, S. Gambaryan, S. Radau, U. Walter, L. Martens, J. Geiger, A. Sickmann, R.P. Zahedi // *Blood*. – 2012. – Vol. 120 – № 15.
196. Kemble, D.J. Bacterial expression and characterization of catalytic loop mutants of Src protein tyrosine kinase / D.J. Kemble, Y.H. Wang, G. Sun // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45 – № 49 – P. 14749–14754.
197. Bradshaw, J.M. The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches / J.M. Bradshaw // *Cellular Signalling*. – Elsevier Inc., 2010. – Vol. 22 – № 8 – P. 1175–1184.
198. Ren, L. Substrate Specificity of Protein Tyrosine Phosphatases 1B, RPTP α , SHP-1, and SHP-2 / L. Ren, X. Chen, R. Luechapanichkul, N.G. Selner, T.M. Meyer, A.-S. Wavreille, R. Chan, C. Iorio, X. Zhou, B.G. Neel, D. Pei // *Biochemistry*. – American Chemical Society, 2011. – Vol. 50 – № 12 – P. 2339–2356.
199. Lin, X. Functions of the activation loop in Csk protein-tyrosine kinase. / X. Lin, S. Lee, G. Sun // *The Journal of biological chemistry*. – United States, 2003. – Vol. 278 – № 26 – P. 24072–24077.
200. Park, M.J. SH2 Domains Serve as Lipid-Binding Modules for pTyr-Signaling Proteins / M.J. Park, R. Sheng, A. Silkov, D.J. Jung, Z.G. Wang, Y. Xin, H. Kim, P. Thiagarajan-Rosenkranz, S. Song, Y. Yoon, W. Nam, I. Kim, E. Kim, D.G. Lee, Y. Chen, I. Singaram, L. Wang, M.H. Jang, C.S. Hwang, B. Honig, S. Ryu, J. Lorieau, Y.M. Kim, W. Cho // *Molecular Cell*. – Elsevier Inc., 2016. – Vol. 62 – № 1 – P. 7–20.
201. Tsang, E. Molecular mechanism of the Syk activation switch / E. Tsang, A.M. Giannetti, D. Shaw, M. Dinh, J.K.Y. Tse, S. Gandhi, A. Ho, S. Wang, E. Papp, J.M.

Bradshaw // Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283 – № 47 – P. 32650–32659.

202. Hughes, C.E. Critical role for an acidic amino acid region in platelet signaling by the HemITAM (hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif) containing receptor CLEC-2 (C-type lectin receptor-2) / C.E. Hughes, U. Sinha, A. Pandey, J.A. Eble, C.A. O'Callaghan, S.P. Watson // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 288 – № 7 – P. 5127–5135.

203. Dinh, M. Activation Mechanism and Steady State Kinetics of Bruton's Tyrosine Kinase / M. Dinh, D. Grunberger, H. Ho, S.Y. Tsing, D. Shaw, S. Lee, J. Barnett, R.J. Hill, D.C. Swinney, J.M. Bradshaw // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282 – № 12 – P. 8768–8776.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю Свешниковой Анастасии Никитичне за поддержку при выполнении работы, помощь при подготовке диссертации, написании статей и проведении научных исследований, а также за наставления и безграничные возможности для реализации. Автор также выражает искреннюю благодарность Пантелееву Михаилу Александровичу и Атауллаханову Фазоилу Иноятовичу за конструктивную критику, мотивацию и ценные рекомендации, без которых данная работа не могла быть проведена.

Автор выражает благодарность сотрудникам ЦТП ФХФ РАН Ан Ольге Ильиничне, Степанян Марии Григорьевне, Болдовой Анне Евгеньевне, Коробкиной Юлии Джессике Дмитриевне и Кольцовой Екатерине Михайловне за личную поддержку и конструктивные обсуждения при выполнении работы. Автор признателен Балабину Фёдору Алексеевичу, Фильковой Александре Андреевне, Обыденному Сергею Ивановичу и Гарсон Дасгупта Андрею Кумар за многолетнее сотрудничество, обсуждения и помощь при выполнении экспериментальных и теоретических исследований. Также автор благодарен сотруднику университета Пеннсилвании Майорову Александру Сергеевичу за ценные дискуссии при разработке экспериментальных протоколов.

Автор хотел бы поблагодарить сотрудников и ординаторов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва Хачатрян Лили Альбертовну, Жаркова Павла Александровича, Фёдорову Дарью Викторовну, Щербину Анну Юрьевну, Хореву Анну Леонидовну, Тесакова Ивана Павловича и Морозову Дарью Сергеевну за конструктивные обсуждения, помощь в организации работы с пациентами и предоставлении материалов для проведения исследований со здоровыми донорами и пациентами.

Автор также хотел бы поблагодарить Мартьянову Елену Ивановну, Мартьянова Александра Анатольевича и Каневу Валерию Николаевну за всестороннюю поддержку, терпение и вдохновение.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

описание модели рецептора CLEC-2

Таблица А.1 – Модуль «Кластеризация CLEC-2»: начальные условия (разработана автором)

компартемент	вещество	переменная	значение	источн.
внеклеточное пространство	Лиганд (фукоидан)	Lig	$2 * 10^{14}$	[193]
мембрана	Свободные молекулы CLEC-2	R	2000	[194]
	Молекулы CLEC-2, связанные с активатором	R^*	0	
	Кластеризованные молекулы CLEC-2	R_C^*	1	
	Фосфорилированные молекулы CLEC-2	R_P^*		
	Все виды кластеризованных форм CLEC-2	$R_C = R_P^* + R_C^*$		

Таблица А.2 – Модуль «Кластеризация CLEC-2»: связывание рецепторов с активатором (разработана автором)

название	реакция	уравнение реакции	параметры	источн.
связывание CLEC-2 с лигандом	$M_1 \quad R + Lig \rightleftharpoons R^*$	$S_{PM} \times V_{EC} \times K_f^{Lig} \times Lig \times R - S_{PM} \times K_r^{Lig} \times R^*$	$K_f^{Lig} = 1 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$ $K_r^{Lig} = 0,0302 \text{ с}^{-1}$	*

Таблица А.3 – Модуль «Кластеризация CLEC-2»: кластеризация рецепторов (разработана автором)

название	реакция	уравнения реакции	параметры (режим кластеризации 1)	параметры (режим кластеризации 2)	источн.
некластеризованные CLEC-2	$R^* \rightleftharpoons R_C^*$	$\frac{dR^*}{dt} = -k_1 R_C R^* - 2k_2 R^* R^* + k_{-1} R_C S$	$k_1 = 12324,611 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	$k_1 = 619,65 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	[157]
			$k_{-1} = 0,0116 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	$k_{-1} = 0,00205 \text{ с}^{-1}$	
			$k_2 = 985236 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	$k_2 = 8,496 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	
			s – средний размер кластера		
кластеризованные CLEC-2		$\frac{dR_C^*}{dt} = k_2 R^* R^* - k_{-2} R_C R_C + k_3 R_C$	$k_{-2} = 348,26 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	$k_{-2} = 0,00017 \text{ с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	
			$k_3 = 2,7 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$	$k_3 = 0,0106 \text{ с}^{-1}$	

Таблица А.4 – Модули «Покоящееся состояние» и «Тирозинкиназы»: начальные условия (разработана автором)

компартемент	вещество	переменная	значение	источн.
мембрана	Неактивные SFK	F_P	36800	[195]
	1/3 активные SFK	F		
	2/3 активные SFK	F^P		
	Полностью активные SFK	F_*^P		
	Неактивные CD148	D	3600	
	Активные CD148	D^*		
цитозоль	Неактивные Csk	C_S	11500	
	Активные Csk	C_S^*		
	Неактивные Syk	S	5000	
	Активные Syk	S^*		
	Неактивные TULA-2	T	8000	
	Активные TULA-2	T^*		

Таблица А.5 – Модули «Покоящееся состояние» и «Тирозинкиназы»: уравнения и параметры

название	реакция	уравнение	параметры	источник	
активность CD 148	$\overline{K_1}$	$\overline{D} \rightleftharpoons D^*$	$S_{PM} \times \left(\frac{\left(\frac{F \times S_{PM} \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} / 3 + \frac{F^P \times S_{PM} \times 2 \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} / 3 + \frac{F_*^P \times S_{PM} \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} \right)}{K_m^{Src} + \frac{D \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times D - S_{PM} \times K_r^{CD148} \times D^*$	$k_{cat}^{Src} = 2,1 \text{ c}^{-1}$	[196; 197]
				$K_m^{Src} = 3 \text{ мкМ}$	
				$K_r^{CD148} = 90,8 \text{ c}^{-1}$	*
активность Csk	$\overline{K_2}$	$\overline{C_S} \rightleftharpoons C_S^*$	$S_{PM} \times \left(\frac{\left(\frac{F \times S_{PM} \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} / 3 + \frac{F^P \times S_{PM} \times 2 \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} / 3 + \frac{F_*^P \times S_{PM} \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} \right)}{K_m^{Src} + \frac{C_S \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times C_S - S_{PM} \times K_r^{CD148} \times C_S^*$	$k_{cat}^{Src} = 2,1 \text{ c}^{-1}$	[196; 197]
				$K_m^{Src} = 3 \text{ мкМ}$	
				$K_r^{Csk} = 1,0 \text{ c}^{-1}$	*
активность SFK 1	$\overline{K_3}$	$\overline{F_P} \rightleftharpoons F$	$S_{PM} \times \left(\frac{\frac{D^* \times S_{PM} \times k_{CD148}}{V_{JM}}}{K_m^{CD148} + \frac{F_P \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times F_P - S_{PM} \times \left(\frac{\frac{C_S^* \times S_{PM} \times k_{Csk}}{V_{JM}}}{K_m^{Csk} + \frac{F \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times F$	$k_{cat}^{CD148} = 9,7 \text{ c}^{-1}$	[198]
				$K_m^{CD148} = 9,1 \text{ мМ}$	
				$k_{cat}^{Csk} = 1,9 \text{ c}^{-1}$	[199]
$K_m^{Csk} = 10 \text{ мкМ}$					
активность SFK 2	$\overline{K_4}$	$\overline{F} \rightleftharpoons F^P$	$S_{PM} \times \left(\frac{\left(\frac{F \times S_{PM} \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} / 3 + \frac{F^P \times S_{PM} \times 2 \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} / 3 + \frac{F_*^P \times S_{PM} \times k_{cat}^{Src}}{V_{JM}} \right)}{K_m^{Src} + \frac{F \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times F - S_{PM} \times \left(\frac{\frac{D^* \times S_{PM} \times k_{CD148}}{V_{JM}}}{K_m^{CD148} + \frac{F^P \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times F^P$	$k_{cat}^{Src} = 2,1 \text{ c}^{-1}$	[196; 197]
				$K_m^{Src} = 3 \text{ мкМ}$	
				$k_{cat}^{CD148} = 9,7 \text{ c}^{-1}$	[198]
				$K_m^{CD148} = 9,1 \text{ мМ}$	

Продолжение таблицы А.5 – Модули «Покоящееся состояние» и «Тирозинкиназы»: уравнения и параметры (разработана автором)

активация SFK 3	$\overline{K_5}$	$\overline{F^P \rightleftharpoons F_P^*}$	$S_{PM} \times s \times k_{SF1}^{SH2} \times 2 \times R_p^* \times F^P - S_{PM} \times kD_{SFK}^{SH2} \times k_{SF1}^{SH2} \times F_P^*$	\overline{s} – средний размер кластера	*
				$k_{SF1}^{SH2} = 0,6 \text{ мкм}^2 \times \text{с}^{-1} \times \text{мкмоль}^{-1}$	
				$kD_{SFK}^{SH2} = 10^{-6} \text{ мкмоль} / \text{мкм}^2 \times \text{с}^{-1}$	
активация TULA-2	$\overline{K_6}$	$\overline{T \rightleftharpoons T^*}$	$V_{Cyt} \times Kf_{Syk}^{TULA-2} \times S^* \times T - V_{Cyt} \times Kr_{Syk}^{TULA-2} \times T^*$	$Kf_{Syk}^{TULA2} = 0,1 \text{ мкм}^{-1} \times \text{с}^{-1}$	*
				$Kr_{Syk}^{TULA2} = 0,007 \text{ с}^{-1}$	
фосфорилирование CLEC-2	$\overline{K_7}$	$\overline{R_C^* \rightleftharpoons R_P^*}$	$S_{PM} \times \left(\frac{S^* \times k_{cat}^{Syk}}{Km^{Syk} + \frac{R_C^* \times S_{PM}}{V_M}} \right) \times R_C^* - S_{PM} \times Kr^{Phosph} \times R_P^*$	$k_{cat}^{Syk} = 11,85 \text{ с}^{-1}$	[201]
				$Km^{Syk} = 9,1 \text{ мкм}$	
				$Kr^{Phosph} = 0,21 \text{ с}^{-1}$	

Продолжение таблицы А.5 – Модули «Покоящееся состояние» и «Тирозинкиназы»: уравнения и параметры (разработана автором)

активация Syk	$\overline{K_8}$	$\overline{S \rightleftharpoons S^*}$	$V_{Cyt} \times \frac{s \times k_{S1}^{SH2} \times S_{PM} \times R_p^*}{V_M} \times \left(\frac{S^* \times k_{cat}^{Syk}}{Km^{Syk} + \frac{S \times S_{PM}}{V_M}} \right) \times S - V_{Cyt} \times (kD_{Syk}^{SH2} \times k_{S1}^{SH2} + Kr^{Syk} + Kr_{TULA2}^{Syk} \times T^*) \times S^*$	\overline{s} – средний размер кластера	*	
				$k_{S1}^{SH2} = 0,47 \text{ с}^{-1} \times \text{мкм}^{-1}$		
				$k_{cat}^{Syk} = 11,85 \text{ с}^{-1}$		[201]
				$Km^{Syk} = 9,1 \text{ мкм}$		
				$kD_{Syk}^{SH2} = 0,176 \text{ мкм}$		[202]
$Kr^{Syk} = 10 \text{ с}^{-1}$	*					
				$Kr_{TULA2}^{Syk} = 7,5 \text{ с}^{-1} \times \text{мкм}^{-1}$	*	

Таблица А.6 – Модуль «LAT-PLC γ 2»: начальные условия (разработана автором)

компартемент	вещество	переменная	значение	источн.
мембрана	LAT	L	4900	[195]
	Фосфорилированные LAT	L^*		
	LAT-PLC γ 2 комплексы	Lp		
	LAT-PLC γ 2-PI3K комплексы	LP		
	ФИФ ₂	I_1	200 мкМ	[159]
	ФИФ ₃	I_2		
	Активные Btk	B^*	0	[195]
	Активные PLC γ 2	p^*		
цитозоль	Неактивные PI3K	P	1900	
	Неактивные PLC γ 2	p	2000	
	Неактивные Btk	B	11100	
	ИФ ₃	I_3	0,05 нМ	[159]

Таблица А.7 – Модуль «LAT-PLCγ2»: уравнения и параметры (разработана автором)

название	реакция		уравнение	параметры	источн.
фосфорилирование LAT активными Syk	$\overline{PL_1}$	$L \rightleftharpoons L^*$	$S_{PM} \times \left(\frac{S^* \times k_{cat}^{Syk}}{K_m^{Syk} + \frac{L \times S_{PM}}{V_{JM}}} \right) \times L - S_{PM} \times Kr^{LAT} \times (L^* + Lp + LP + p^*)$	$k_{cat}^{Syk} = 11,85 \text{ c}^{-1}$	[196; 197]
				$K_m^{Syk} = 9,1 \text{ мкМ}$	
				$Kr^{LAT} = 1,41 \text{ c}^{-1}$	*
образование комплексов LAT-PLCγ2	$\overline{PL_2}$	$p \rightleftharpoons Lp$	$S_{PM} \times k_1^{Lp} \times L^* \times p - S_{PM} \times k_{D_{Lp}} \times k_1^{Lp} \times (Lp + LP + p^*)$	$k_1^{Lp} = 0,9 \text{ мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	*
				$k_{D_{Lp}} = 0,15 \text{ мкМ}$	[200]
образование комплексов LAT-PLCγ2-PI3K	$\overline{PL_3}$	$P \rightleftharpoons LP$	$S_{PM} \times k_1^{LP} \times Lp \times P - S_{PM} \times k_{D_{LP}} \times k_1^{LP} \times LP$	$k_1^{LP} = 4,2 \text{ мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	*
				$k_{D_{LP}} = 0,22 \text{ мкМ}$	[200]
производство ФИФ ₃	$\overline{PL_4}$	$I_1 \rightleftharpoons I_2$	$S_{PM} \times \left(\frac{LP \times S_{PM} \times k_{cat}^{PI3K}}{V_{JM}} \right) \times I_1 - S_{PM} \times Kr^{PIP_3} \times (I_2 + B^*)$	$k_{cat}^{PI3K} = 2,82 \text{ c}^{-1}$	*
				$K_m^{PI3K} = 11 \text{ мкМ}$	[159]
				$Kr^{PIP_3} = 0,44 \text{ c}^{-1}$	*
активация Btk	$\overline{PL_5}$	$B \rightleftharpoons B^*$	$S_{PM} \times k_1^{B^I} \times I_2 \times B - S_{PM} \times k_{D_{B^I}} \times k_1^{B^I} \times B^*$	$k_1^{B^I} = 0,51 \text{ мкМ}^{-1} \times \text{c}^{-1}$	*
				$k_{D_{B^I}} = 0,64 \text{ мкМ}$	[200]
активация PLCγ2	$\overline{PL_6}$	$Lp \rightleftharpoons p^*$	$S_{PM} \times \left(\frac{B^* \times S_{PM} \times k_{cat}^{Btk}}{V_{JM}} \right) \times Lp - S_{PM} \times Kr^{PLC} \times p^*$	$k_{cat}^{Btk} = 0,14 \text{ c}^{-1}$	[197; 203]
				$K_m^{Btk} = 37 \text{ мкМ}$	*
				$Kr^{PLC} = 8,6 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$	
производство ИФ ₃	$\overline{PL_7}$	$I_1 \rightleftharpoons I_3$	$S_{PM} \times \left(\frac{p^* \times S_{PM} \times k_{cat}^{PLC\gamma 2} \times (Ca)}{V_{JM}} \right) \times I_1 - V_{Cyt} \times Kr^{IP_3} \times I_3$	$k_{cat}^{PLC\gamma 2} = 30,5 \text{ c}^{-1}$	*
				$K_m^{PLC\gamma 2} = 0,78 \text{ мкМ}$	
				$Kr^{IP_3} = 60 \text{ c}^{-1}$	

* - подобрано в рамках настоящего исследования.