

УДК 612.115

РЕГУЛЯЦИЯ МЕМБРАННО-ЗАВИСИМЫХ РЕАКЦИЙ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

© 2015 г. Н. А. Подоплелова¹, Я. Н. Котова^{1,2}, Е. Н. Липец^{1,2},
Ф.И. Атауллаханов^{1,2,3}, М. А. Пантелеев^{1,2,3}

¹ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии
и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, РФ

² Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН

³ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Физический факультет

Ключевые реакции свертывания крови протекают не в плазме крови, а в двухмерной фазе, на фосфолипидных мембранах. Поверхности для сборки белковых комплексов в различных реакциях предоставляются практически всеми клетками, липопротеидами и микрочастицами сосудистого русла. Центральную роль среди них играют тромбоциты и отщепляемые ими микровезикулы, на которых происходят ключевые прокоагулянтные реакции активации фактора X и протромбина, и которые играют важные роли в прочих процессах – активации контактного пути свертывания, активации фактора XI тромбином, появлении ферментативной активности у фактора VIIa и т.д. В данном обзоре рассматриваются мембранно-зависимые реакции свертывания, обсуждаются их механизмы и регуляция, значимость, возможные перспективы исследования.

Ключевые слова: свертывание крови, факторы свертывания, мембранно-зависимые реакции, тромбоциты, микровезикулы.

ВВЕДЕНИЕ: СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

Свертывание крови представляет собой сложную сеть ферментативных реакций, основой которой служит каскад активирующих друг друга сериновых протеиназ, охваченный многочисленными петлями положительных и отрицательных обратных связей – это реакции, в которых ферменты нижних ступеней каскада воздействуют на компоненты, находящиеся на более высоких ступенях (рис. 1). Основная задача свертывания заключается в предотвращении потери крови при нарушении целостности сосудистой системы. Она реализуется посредством расщепления белка фибриногена, присутствующего в плазме крови, которое ведет к его превращению в способный к полимеризации белок фибрин. В свою очередь, формирование сети волокон фибрина приводит к локальному переходу плазмы крови из жидкого в гелеобразное состояние и остановке кровотечения. Помимо наиболее очевидной функции, остановки кровотечения при ранениях, свертывание крови участвует в защите организма от различных внутренних повреждений и кровоизлияний, микротравм, которые постоянно возникают при любой мышечной нагрузке, заживлении ран, иммун-

ном ответе, формировании сосудистой системы при ангиогенезе. Нарушения в балансе свертывания крови ведут к кровотечениям и тромбозам, которые в совокупности являются ведущей причиной смертности в современном мире.

Одним из самых интересных и сложных вопросов в биохимии и физиологии свертывания крови является его сильнейшая зависимость от фосфолипидных мембран. Практически все ключевые реакции свертывания идут не в самой плазме крови, а на специфических мембранах различных клеток, с участием как липидов, так и специальных рецепторов [24, 61]. В этот список входят: сам процесс запуска свертывания (на мембранах клеток обнажившегося субэндотелия, воспаленного эндотелия или активированных иммунных клеток, с участием кофактора тканевого фактора), все реакции основного каскада – активация факторов IX, X, II, а также активация фактора XI тромбином (на мембранах активированных тромбоцитов, эритроцитов, липопротеидов разных фракций и микровезикул разных типов), реакции пути протеина C и инактивации ферментов свертывания (на мембранах клеток эндотелия с участием кофакторов тромбомодулина, эндотелиального рецептора протеина C, гепаран сульфата),

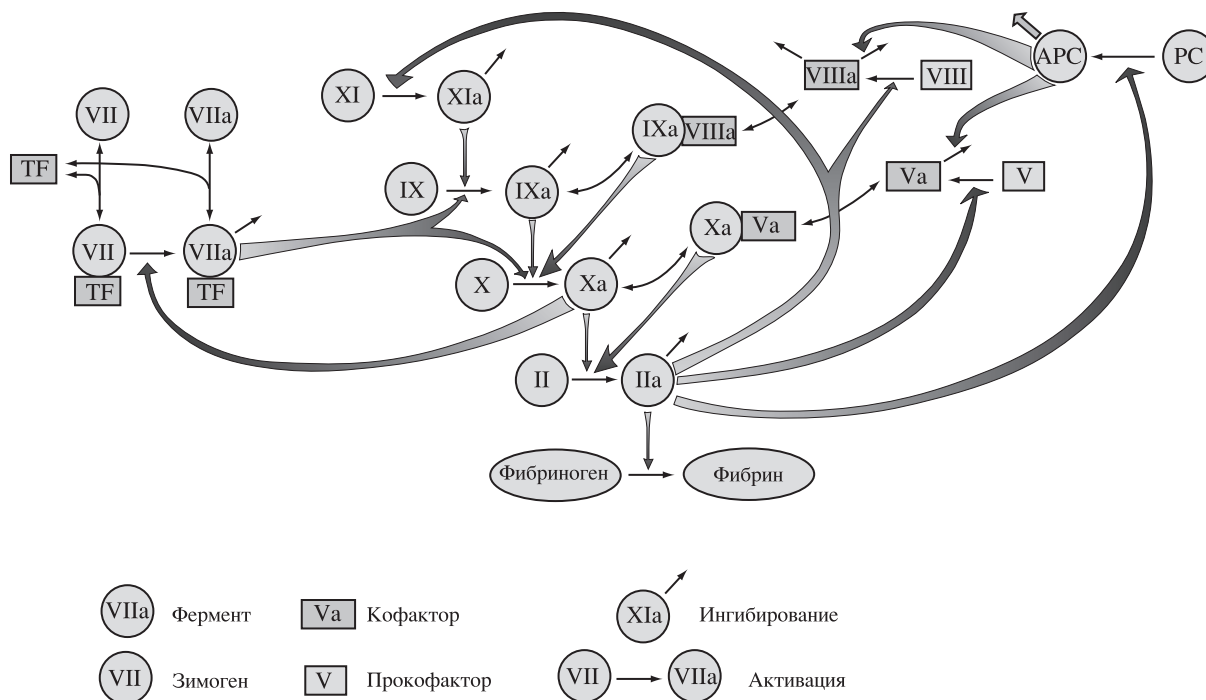


Рис. 1. Основные реакции плазменной системы свертывания крови. Реакции активации факторов свертывания показаны односторонними черными стрелками. Серые фигурные стрелки показывают под действием каких именно ферментов происходит эта активация. Обратимые реакции формирования комплексов показаны двусторонними тонкими черными стрелками.

реакции контактного пути (предположительно, мембраны тромбоцитов и некоторых микровезикул с участием неизвестных кофакторов).

Собственно, есть только два типа реакций свертывания крови, не связанных напрямую с мембраной: инактивация ферментов свертывания антитромбином и другими ингибиторами в плазме крови и активация факторов V, VIII, XIII, фибриногена тромбином. Но и тут нельзя сказать, что все эти реакции безразличны по отношению к мембранам: так, связывание факторов IXa и Xa с мембраной в составе белковых комплексов, наоборот, существенным образом защищает их от ингибиторов плазмы. А активация факторов V и VIII другим ферментом – фактором Xa – является мембранно-зависимой. В целом, все свертывание крови оказывается теснейшим образом переплетено с поверхностями разнообразных клеток.

Механизмы мембранных реакций сложны и крайне плохо изучены. Можно предположить, что роль мембран в первую очередь заключается в ускорении процессов свертывания крови (за счет концентрации белков на мембранах и использования мембраны как “воронки”, направляющей субстрат к ферментам). Но достоверно это также не установлено. Для тех случаев, когда существует несколько типов поверхности для одной реакции, их сравнительные вклады непонятны.

В настоящий момент вопросы, связанные с мембранными реакциями свертывания, имеют высокую актуальность как для фундаментальных задач биофизики и биохимии крови, так и для понимания патогенеза заболеваний системы крови и разработки новых методов диагностики и терапии. В настоящем обзоре мы рассмотрим текущее состояние дел в данной области, отметим нерешенные вопросы и осветим возможные перспективы.

МЕХАНИЗМЫ МЕМБРАННЫХ РЕАКЦИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ И МИКРОЧАСТИЦ

Чтобы разобраться, как в целом работают мембранные реакции, рассмотрим типичный случай протромбиназы – центрального ферментативного мембранного комплекса каскада свертывания, который отвечает за производство главного фермента свертывания, тромбина (рис. 2).

Сериновая протеиназа, стоящая выше по каскаду (фактор Xa), сама по себе активирует протромбин очень медленно. Для того, чтобы эта реакция шла с высокой скоростью, ей необходимы кофакторы – активированный фактор V и отрицательно заряженная фосфолипидная поверхность [32, 50]. По-видимому, эта поверхность в организме пре-

доставляется активированными тромбоцитами, микрочастицами и липопротеинами плазмы. При запуске системы свертывания происходит стимуляция тромбоцитов, и в результате некоторые тромбоциты выставляют на внешнем слое своей мембраны отрицательно заряженный фосфолипид фосфатидилсерин и специальные белки [1, 12]. Скорее всего, это запускается высокими концентрациями внутриклеточного кальция и реализуется с помощью фермента-скрамблазы, недавно открытого *TMEM16F* [66, 72]. Есть указания на то, что для ряда белков это связывание может быть связано не только с белок-липидными взаимодействиями, но также зависеть от рецепторов на мембранах тромбоцитов [4, 8, 9, 26, 43].

Возвращаясь к теме, фактор *Va* представляет собой неферментативный белок-кофактор, получающийся из своего предшественника фактора *V* путем частичного расщепления под действием тромбина [29]. Как мы видим, круг замыкается. Фактор *Xa* изначально активирует небольшое количество протромбина в тромбин, который активирует фактор *V*. Затем фактор *Va* увеличивает скорость активации протромбина фактором *Xa*, а продукт этой реакции, тромбин, опять активирует фактор *V*. Такой тип регуляции называется петлей положительной обратной связи: продукт системы стимулирует свое собственное производство.

Вторая важная петля положительной обратной связи в свертывании крови связана с активацией фактора *X*. Помимо того, что этот фактор активируется комплексом фактора *VIIa* и тканевого фактора (внешней теназой, от английского *ten* – “десять”) [37, 45], он активируется фактором *IXa* (который, в свою очередь, также активируется внешней теназой). Однако, эта реакция сама по себе тоже протекает крайне медленно. Она ускоряется благодаря формированию комплекса факторами *IXa* и *VIIIa* на поверхности активированных тромбоцитов, который во многом аналогичен комплексу протромбиназы [42, 75]. Как и внешняя теназа, этот комплекс активирует фактор *X* и называется “внутренней теназой”. Факторы *V* и *VIII* гомологичны и оба активируются тромбином. Дефицит фактора *VIII* ведет к тяжелому заболеванию кровоточивости, гемофилии *A*.

В чем смысл такого регуляторного блока в системе свертывания? Один вариант ответа связан с механизмом ускорения, который называется “редукция числа измерений”. Его идея заключается в том, что ферменты, субстраты и кофактора из большого объема концентрируются на маленькой площади, и там им намного проще друг друга найти. Липидная мембрана и кофактор на ней могут

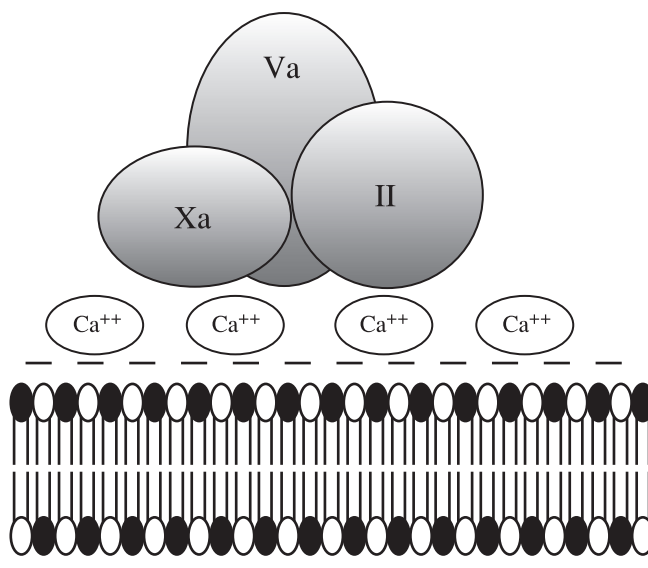


Рис. 2. Схематичное изображение комплекса протромбиназы. Комплекс состоит из витамин *K*-зависимого фактора *Xa* и его кофактора *Va*, взаимодействующих с фосфолипидной мембраной. Комплекс протромбиназы отвечает за производство главного фермента свертывания тромбина из его неактивного предшественника протромбина(II).

работать как “воронка” для субстрата, собирающая его из раствора и направляющая к ферменту. Есть указания, что комплексы теназы и протромбиназы работают в режиме “диффузионного лимитирования”, т.е. что скорость их работы ограничена не каталитической активностью фермента, а скоростью диффузии, доставляющей субстрат к мембране. Не исключено, что использование мембранной “воронки” позволяет ускорять эти реакции выше диффузионного предела для реакций с использованием растворимых ферментов.

Вторая возможность – пространственная локализация и удержание белков свертывания. Поскольку первым шагом в гемостазе и тромбозе обычно бывает формирование тромбоцитарного агрегата, белки свертывания при связывании с тромбоцитами оказываются пойманными агрегатом и не уносятся дальше потоком.

Кроме того, сами по себе положительные обратные связи играют ключевые роли в формировании порогов в системе свертывания и в регуляции пространственной динамики роста фибринового сгустка [5, 55]. Однако создать положительные обратные связи можно было бы и без мембранных реакций, другими способами, так что способ реализации тут вряд ли критичен. Тем более, что к мембране “закреплены” почти все реакции системы, не только опосредующие положительные обратные связи.

ЧТО ПРОИСХОДИТ НА МЕМБРАНЕ ПОМИМО СБОРКИ КОМПЛЕКСА ПРОТРОМБИНАЗЫ И ЗАЧЕМ?

Как описано выше, две главные мембранные реакции свертывания: катализ с участием комплексов внутренней теназы и протромбиназы. Эти комплексы гомологичны, и реакции идут по близким законам. К ним примыкает третья важная реакция – активация фактора X внешней теназой. В ней слабоактивный фермент фактор VIIa связывается с белком тканевым фактором на поврежденных или воспаленных клетках, чтобы стать полноценным ферментом. Это самая первая реакция, “реакция-переключатель” в каскаде свертывания. Четвертый важнейший мембранный процесс – инактивация кофакторов протеином C на здоровом эндотелии, протекающий при участии мембранного кофактора тромбомодулина.

Еще несколько реакций менее известны и/или хуже изучены. Процесс активации фактора XI тромбином, играющий важную роль при росте фибринового сгустка [2], протекает на поверхности тромбоцитов по неизвестному механизму. Наша недавняя работа показала, что активация фактора свертывания XII тромбоцитами, в большой степени определяющая патологическое тромбообразование, также является мембранной реакцией [74], но кофакторы в ней известны только предположительно.

СУБПОПУЛЯЦИИ АКТИВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

Физиологическим источником фосфолипидных мембран могут выступать тромбоциты и их микровезикулы. Долгое время считалось, что активированные тромбоциты одинаковые, и за исключением обычных разбросов по размерам клетки и количеству молекул не имеют ни морфологических, ни функциональных различий. Однако, уже в середине 60-х гг. появляются первые работы, где описываются морфологические различия среди тромбоцитов, которые подверглись гипотоническому стрессу [71]. Следующие работы, свидетельствующие о появлении различия внутри популяции тромбоцитов, появляются только в конце 90-х гг. В пионерской работе лаборатории Алана Нурдена (Франция), применившего проточный цитометр и специфический маркер фосфатидилсерина, аннексин V, было однозначно показано, что лишь часть тромбоцитов выставляет фосфатидилсерин в ответ на мощную стимуляцию тромбином и коллагеном. В работе Йохана Хеемскерка (Нидерланды) было показано, что приблизительно половина тромбоцитов, при адгезии на коллаген

экспонируют на внешнем слое мембраны фосфатидилсерин. При добавлении тромбина доля таких клеток увеличивалась приблизительно до 80% [21]. Все эти работы указывают на то, что одна из групп характеризуется высоким уровнем фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны.

Прорывной работой в области открытия нового подкласса прокоагулянтных тромбоцитов можно считать публикацию Лоренцо Альберто в 2000-м г. [1], где было показано, что использование комбинированной активации тромбоцитов двумя физиологическими агонистами, тромбином и коллагеном, способствует экспрессии α -гранулярного фактора V на поверхности части тромбоцитов; это была та же самая субпопуляция, что несла на внешнем слое мембраны фосфатидилсерин. После этой статьи появились работы, где было показано, что помимо фактора V, на данной группе тромбоцитов обнаруживаются и другие α -гранулярные белки (фибриноген, фактор Виллебранта, тромбоспондин, фибронектин и α 2-антиплазмин) [12]. За этими работами последовал вал сообщений о наличии двух или большего числа субпопуляций активированных тромбоцитов в разных условиях [ссылки]. Только к 2010 г. феномен был признан окончательно, хотя общего названия у субпопуляций тромбоцитов до сих пор нет: несущие фосфатидилсерин тромбоциты продолжают называть “укутанными”, прокоагулянтными, некротическими и еще несколькими терминами.

Открытым остается и вопрос механизмов: как образуется данная субпопуляция тромбоцитов? Какие сигнальные пути приводят к столь драматическому разделению на первый взгляд одинаковых клеток? Есть ряд работ, говорящих об участии клеточных трансглутаминаз (фактор XIIIa и тканевая трансглутаминаза) и гликопротеина IIb-IIIa в формировании данной субпопуляции тромбоцитов [11, 12, 25, 33]. К тому же, было обнаружено, что изменение потенциала на мембране митохондрий тоже вовлечено в процесс формирования гетерогенности тромбоцитов [60]. Также было обнаружено, что в этом процессе участвует АДФ, выделяемый из плотных гранул тромбоцитов при их активации [31]. Кроме того, было показано, что инактивация аденилатциклазы является необходимым, но не лимитирующим звеном для этого процесса. В дополнении обнаружили, что ингибирование фосфатидилинозитол 3-киназы и Src-тирозин киназы (PP2) в несколько раз снижало прокоагулянтную субпопуляцию [68]. Все эти данные дают возможность построить примерный сложный сигнальный путь, ведущий к разделению тромбоцитов на субпопуляции. В начале 2015 г. нашей командой была опубликована статья, в которой впервые была построена детальная ме-

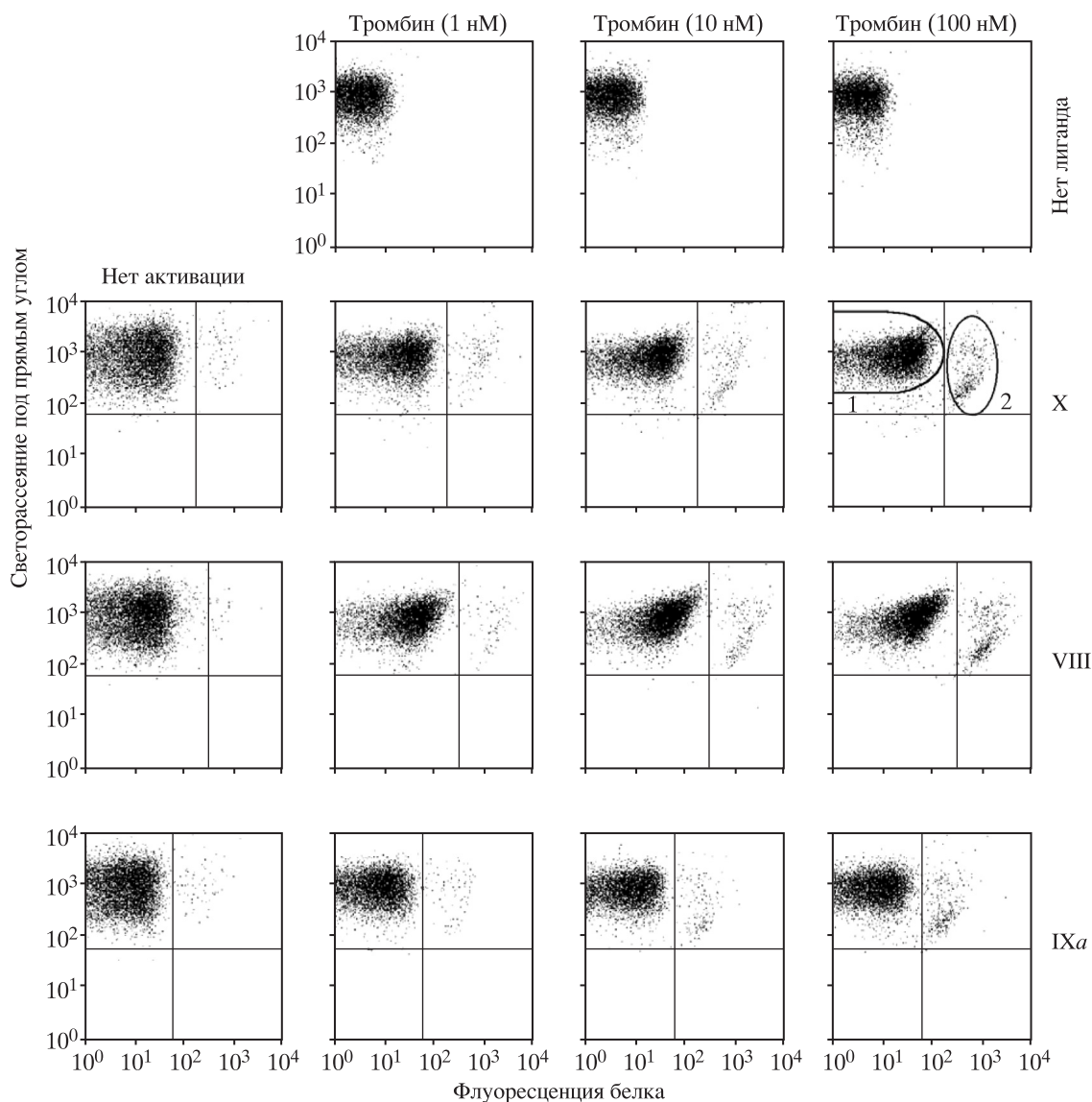


Рис. 3. Связывание факторов с тромбоцитами, активированными различными концентрациями тромбина. Регион 2 показывает субпопуляцию тромбоцитов, имеющих на своей внешней мембране фосфатидилсерин.

ханизменная стохастическая модель кальциевой сигнализации в тромбоцитах крови (включая митохондрии) и показано, как осцилляции кальция ведут к захвату кальция митохондрией, заканчивающемуся открытием поры у части клеток, коллапсу митохондрий и клеточной смерти.

В дополнении к фундаментальным исследованиям ведутся и клинические наблюдения. Так, например, показано, что у пациентов, проходящих гемодиализ, увеличивается уровень прокоагулянтных тромбоцитов, что может приводить к повышению риска тромбоза в конечной стадии заболевания почек [69]. С другой стороны было обнаружено, что при самопроизвольном внутричерепном кровоотечении уровень прокоагулянт-

ных тромбоцитов значительно снижен [59]. Сейчас количество клинических работ, исследующих тромбоцитарные субпопуляции, исчисляется десятками.

Таким образом, при сильной физиологической активации тромбоциты делятся на две группы, одна из которых имеет высокий уровень фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны, а также связывает α -гранулярные белки на своей поверхности. Во многих работах показано, что именно эта субпопуляция тромбоцитов в основном связывает факторы VIII, IX, IXa, X (рис. 3) [30, 54]. То есть, на мембранах этих тромбоцитов протекают важные для свертывания крови реакции: теназная и протромбиназная.

МИКРОВЕЗИКУЛЫ, КАК ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ИСТОЧНИК ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Другим важным физиологическим источником фосфолипидных мембран являются микровезикулы (МВ), частицы клеток крови или эндотелия, образованные в результате активации клеток или их гибели. Опухолевые клетки также могут выпускать микровезикулы в кровоток. К микровезикулам относят частицы диаметром 0.1–1 мкм. Частицы меньшего размера относят к экзосомам, они происходят от внутриклеточных мультивезикулярных объектов и отличаются по антигенному составу [22]. Состав поверхности и внутреннего содержимого зависит от клеточного происхождения микровезикулы и типа воздействия, вызвавшего ее формирование. В процессе везикуляции может происходить “сортировка” молекул так, что биологическая активность микровезикулы и родительской клетки может отличаться. Разные клетки образуют микровезикулы под воздействием разных сигналов. Таким образом, везикуляция – хорошо регулируемый процесс. МВ осуществляют межклеточное взаимодействие, передавая от родительской клетки к клетке-мишени рецепторы на поверхности мембраны, мРНК [70], участников воспалительного процесса (цитокины, архидоновую кислоту), факторы роста (*TGF beta*, *VEGF*) [18]. Этими факторами объясняется их участие в процессах свертывания крови, воспаления, регуляции активности сосудистой стенки, апоптоза, ангиогенеза [47, 73].

Процесс образования МВ, по-видимому, связан с повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что приводит к активации скрамблазы и кальпаинов, а, следовательно, к экспонированию на поверхности фосфатидилсерина и частичной деградации цитоскелета [47, 73].

В норме более 80% микровезикул имеют тромбоцитарное происхождение [15]. При различных патологиях меняется не только концентрация микровезикул, но и клетки, из которых микровезикулы формируются. При остром коронарном синдроме, повышается концентрация эндотелиальных [41], при менингококковом сепсисе – тромбоцитарных и гранулоцитарных [52], при диабете – тромбоцитарных, эндотелиальных и моноцитарных [46], при серповидно-клеточной анемии – увеличена концентрация эритроцитарных [7], моноцитарных, эндотелиальных микровезикул. Для ряда из перечисленных выше болезней, например, сепсиса и серповидно-клеточной анемии, показано, что количество микровезикул коррелирует с маркерами активации свертывания в плазме (*D*-димеры, тромбин-антитромбиновый комплекс, фрагменты

протромбина) и добавление в нормальную плазму везикул, выделенных из плазмы пациентов, ускоряет свертывание в различных тестах на свертывание крови [52, 62].

Микровезикулы поддерживают свертывание за счет выставления фосфатидилсерина, и концентрирования на своей поверхности рецепторов для связывания факторов [63]. Кроме того, они сами могут служить активаторами свертывания выставив на поверхности тканевый фактор (моноцитарные, эндотелиальные, раковые), либо же запуская свертывание по контактному пути (тромбоцитарные и эритроцитарные) [44].

Кроме того, моноцитарные микровезикулы экспонируют на своей поверхности адгезивные молекулы, такие как *CD-15* или гликолиганд 1 к *P*-селектину, улучшающие связывание с активированными тромбоцитами через *P*-селектин [10]. Это приводит к накоплению ТФ в месте развития тромба и, по-видимому, поддерживает распространение тромба в пространстве.

Недавно на поверхности микровезикул были обнаружены ингибитор пути тканевого фактора (*TFPI*), тромбомодулин (*TM*) и эндотелиальный рецептор к протеину *C* (*EPCR*), оказывающие антикоагулянтное воздействие, а также ряд белков усиливающих фибринолиз [36].

Наиболее распространенным методом анализа микровезикул является проточная цитометрия. Она позволяет определить их происхождение и качественно оценить концентрацию. Однако этот метод не позволяет увидеть частицы размерами менее 0.2–0.3 мкм. В то время как, есть данные [20], что значительная часть прокоагулянтных МВ имеет меньший размер, в среднем 121 ± 54 нм. Существуют методы такие как, электронная микроскопия, атомная силовая микроскопия и динамическое светорассеяние, которые позволяют работать с микровезикулами меньшего размера. Однако эти методы дают информацию о размере частиц, но не о их происхождении. Так же часто применяются функциональные тесты на прокоагулянтную активность микровезикул.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ С ФОСФОЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

Первым шагом любой мембран-зависимой реакции является взаимодействие белка с мембраной. В зависимости от происхождения и особенностей взаимодействия можно разделить все факторы на 4 типа:

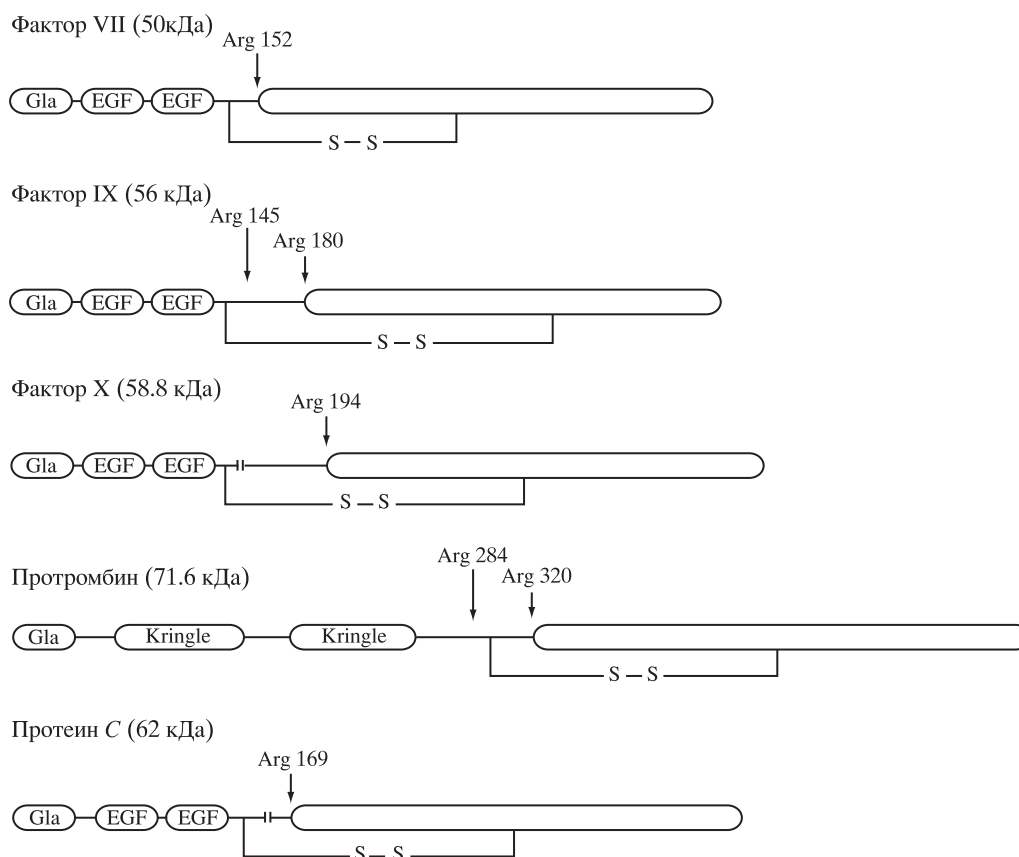


Рис. 4. Схематичное изображение витамин *K*-зависимых факторов свертывания. *Gla*-участок примерно из 45 аминокислот, содержащих 9–13 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. *EGF* – домен подобный эпидермальному фактору роста. Стрелками показаны связи, которые расщепляются при активации факторов. Воспроизведено из [75].

Витамин K-зависимые факторы (VII(a), IX(a), X(a), а также протромбин, протеины C, S и Z) (рис. 4). Эти белки на своем N-конце имеют так называемый Gla-домен, участок примерно из 45 аминокислот, содержащих 9–13 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты [48]. Именно Gla-домен отвечает за связывание этих белков с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами. Долгое время считалось, что связывание фактора с фосфолипидной мембраной происходит за счет так называемых кальциевых мостиков между карбоксильной группой малоновой кислоты в Gla-доме и гидрофильной головкой фосфолипида [13, 38]. При этом основную роль во взаимодействии белка с липидной поверхностью играют электростатические взаимодействия, а вклад гидрофобных незначителен [3, 39]. Однако после получения кристаллической структуры Gla-доменов некоторых факторов (например, протромбина [64], факторов VII [6], IX [16, 17] и X [65]) становится ясным, что взаимодействие намного сложнее. По всей видимости взаимодействие Gla-домена с фосфолипидной мембраной происходит за счет частичного проникновения

*ω -петли в мембрану, при этом ионы Ca^{2+} выполняют двойную функцию: стабилизация структуры и поддержание оптимальной конформации Gla-домена, а также непосредственное взаимодействие с отрицательно заряженными фосфолипидами [53]. Было показано, что витамин *K*-зависимые факторы преимущественно связываются с “укутаннными” тромбоцитами [30, 54].*

*Кофакторы V и VIII гомологичны друг другу и состоят: из трех A-доменов, двух C-доменов и B-домена, который теряют в процессе активации (рис. 5) [28, 29]. Активированные факторы Va и VIIIa состоят из легкой цепи (A1- и A2-домены) и тяжелой цепи (A3-, C1- и C2-домены) [49, 51]. В отличие от витамин *K*-зависимых факторов кофакторы V и VIII взаимодействуют с фосфолипидной мембраной без участия ионов Ca^{2+} . Однако Ca^{2+} необходим для взаимодействия легкой и тяжелой цепей. Исследования показали, что за связывание с фосфолипидной мембраной отвечает легкая цепь кофакторов [23, 27]. В то время как за образование комплекса с витамином *K*-зависимым фактором отвечает тяжелая цепь [29].*

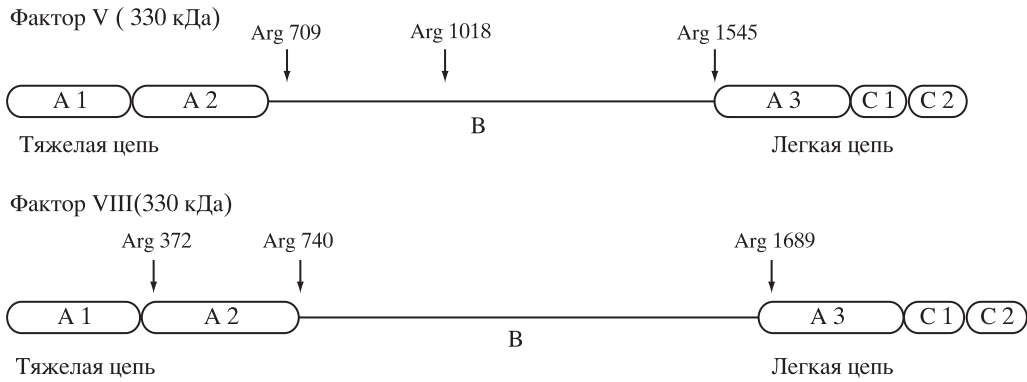


Рис. 5. Схематичное изображение кофакторов V и VIII. Стрелками показаны связи, которые расщепляются при активации факторов. Воспроизведен из [75].

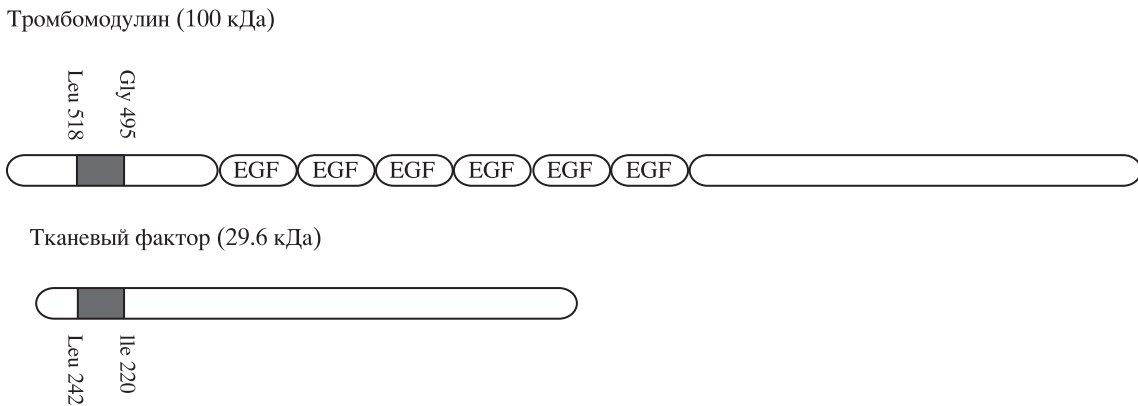


Рис. 6. Схематичное изображение тромбомодулина и тканевого фактора. Заштрихованный участок соответствует трансмембранному домену. EGF – домен подобный эпидермальному фактору роста. Воспроизведен из [75].

Последние данные свидетельствуют, что за взаимодействие с фосфолипидной мембраной отвечает *N*-концевой участок *C2*-домена. Полученные в последние годы кристаллические структуры факторов V [40] и VIII [58] пролили свет на механизмы взаимодействия *C2*-домена с фосфолипидной мембраной.

Так *C2*-домен фактора V образует β -бочку с тремя выступающими петлями. Гидрофобные аминокислотные остатки на вершинах этих петель проникают в фосфолипидную мембрану и взаимодействуют с неполярными хвостами фосфолипидов. В то же время карманы, образуемые петлями, непосредственно взаимодействуют с полярными головами фосфатидилсерина [40, 57]. Подобная структура *C2*-домена характерна и для фактора VIII. Также есть данные, что *C2*-домен обладает стереоселективностью в отношении фосфатидил-*L*-серина.

Тканевый фактор и тромбомодулин – трансмембранные белки, достаточно отличающиеся друг от друга. Единственное их сходство проявляется в

общей структурной организации. Оба белка имеют в своем составе внутриклеточный, трансмембранный и внеклеточный домены (рис. 6).

Тромбомодулин является кофактором тромбина при активации протеина С, находится на клетках эндотелия сосудов [14]. Внеклеточный домен содержит шесть EGF-доменов. Было показано, что 5 и 6 домены содержат сайт связывания с тромбином [34, 35].

Тканевый фактор представляет собой кофактор, связывающий фактор VIIa из плазмы, формируя комплекс внешней теназы и активируя факторы IX и X. В норме присутствует во всех тканях, кроме эндотелия и клеток крови. Таким образом, он изолируется от крови, а его экспонирование или экспрессирование является ключевым механизмом запуска свертывания [37, 45].

Факторы, взаимодействующие с тромбоцитами и микровезикулами через рецепторы. Многие факторы свертывания не напрямую взаимодействуют с фосфолипидами мембраны, а посредством

специфических рецепторов. Так было показано, что факторы XI [4], XII [8], тромбин [43] и высокомолекулярный кининоген [26] могут связываться с гликопротеином Iba. Кроме того активированные тромбоциты экспрессируют рецептор *gC1q-R/p33*, с которым также связываются высокомолекулярный кининоген и фактор XII. Для фактора XIII рецептором может выступать гликопротеин IIb–IIIa [19, 56].

Кроме того некоторые витамин K-зависимые факторы могут связываться с фосфолипидными мембранами не только через свой *Gla*-домен, но и посредством рецепторов. Так было показано, что протромбин специфично и Ca^{2+} -зависимо связывается с гликопротеином IIb–IIIa [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на существенный прогресс в последние годы, в области мембранных реакций остается еще немало загадок.

Как тромбоцит решает, в какую популяцию идти и выпускать ли везикулы? Сейчас на эту тему есть только теоретические предположения [67]. Существуют ли белковые рецепторы на мембране для ферментов и кофакторов свертывания? Каков реальный вклад разнообразных липидных поверхностей в мембранные реакции при гемостазе и тромбозе, в норме и патологии? Каковы конкретные механизмы мембранных реакций, последовательность сборки комплексов, пути доставки субстрата? Зачем и как активируется контактный путь на тромбоцитах?

Эти и другие вопросы сейчас находятся в центре внимания исследователей, и их разрешение, как ожидается, позволит качественно изменить наши взгляды на регуляцию гемостаза и тромбоза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-00670, 15-54-45036, 13-04-00401.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T. et al. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin // *Blood*. 2000. V. 9. № 5. P. 1694–1702.
2. Ataullakhanov F.I., Dashkevich N.M., Negrier C., Panteleev M.A. Factor XI and traveling waves: the key to understanding coagulation in hemophilia? // *Expert review of hematology*. 2013. V. 3. № 2. P. 111–113.
3. Atkins J.S., Ganz P.R. The association of human coagulation factors VIII, IXa and X with phospholipid vesicles involves both electrostatic and hydrophobic interactions // *Molecular and cellular biochemistry*. 1992. V. 10. № 1. P. 61–71.
4. Baglia F.A., Badellino K.O., Li C.Q. et al. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin // *The Journal of biological chemistry*. 2002. V. 277. № 3. P. 1662–8.
5. Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A. et al. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation // *Biophysical journal*. 2011. V. 101, № 8. P. 1816–24.
6. Banner D.W., D'Arcy A., Chène C., Winkler F.K. et al. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor // *Nature*. 1996. V. 380. № 6569. P. 41–6.
7. Beers Van E.J., Schaap M.C.L., Berckmans R.J. et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease // *Haematologica*. 2009. V. 94. № 11. P. 1513–9.
8. Bradford H.N., Pixley R.A., Colman R.W. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation // *The Journal of biological chemistry*. 2000. V. 275. № 30. P. 22756–63.
9. Byzova T.V., Plow E.F. Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation // *The Journal of biological chemistry*. 1997. V. 272. № 43. P. 27183–8.
10. Conde Del I., Shrimpton C.N., Thiagarajan P., López J.A. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation // *Blood*. 2005. V. 106. № 5. P. 1604–11.
11. Cox A.D., Devine D. V. Factor XIIIa binding to activated platelets is mediated through activation of glycoprotein IIb–IIIa // *Blood*. 1994. V. 83. № 4. P. 1006–16.
12. Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S. F. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface // *Nature*. 2002. V. 415. № 6868. P. 175–9.
13. Dombrose F.A., Gitel S.N., Zawalich K., Jackson C.M. The association of bovine prothrombin fragment 1 with phospholipid. Quantitative characterization of the Ca^{2+} ion-mediated binding of prothrombin fragment 1 to phospholipid vesicles and a molecular model for its association with phospholipids // *The Journal of biological chemistry*. 1979. V. 254. № 12. P. 5027–40.
14. Esmon C.T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation // *The Journal of biological chemistry*. 1989. V. 264. № 9. P. 4743–6.

15. Flaumenhaft R., Dilks J.R., Richardson J., Alden E. et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles // *Blood*. 2009. V. 113. № 5. P. 1112–21.
16. Freedman S.J., Furie B.C., Furie B., Baleja J.D. Structure of the metal-free gamma-carboxyglutamic acid-rich membrane binding region of factor IX by two-dimensional NMR spectroscopy // *The Journal of biological chemistry*. 1995. V. 270. № 14. P. 7980–7.
17. Freedman S.J., Furie B.C., Furie B., Baleja J.D. Structure of the calcium ion-bound gamma-carboxyglutamic acid-rich domain of factor IX // *Biochemistry*. 1995. V. 34. № 38. P. 12126–37.
18. George F.D. Microparticles in vascular diseases // *Thrombosis research*. 2008. (122 Suppl). P. S55–9.
19. Ghebrehiwet B., CebadaMora C., Tantral L. (Jesty J.) et al. *gC1qR/p33* serves as a molecular bridge between the complement and contact activation systems and is an important catalyst in inflammation // *Advances in experimental medicine and biology*. 2006. V. 586. P. 95–105.
20. Gheldof D., Hardij J., Cecchet F., Chatelain B. et al. Thrombin generation assay and transmission electron microscopy: a useful combination to study tissue factor-bearing microvesicles // *Journal of extracellular vesicles*. 2013. (2).
21. Heemskerk J.W., Vuist W.M., Feijge M.A. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca^{2+} responses // *Blood*. 1997. V. 90. № 7. P. 2615–25.
22. Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R. (Geuze H.J.) et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules // *Blood*. 1999. V. 94. № 11. P. 3791–9.
23. Higgins D.L. and Mann K.G. The interaction of bovine factor V and factor V-derived peptides with phospholipid vesicles // *The Journal of biological chemistry*. 1983. V. 258. № 10. P. 6503–8.
24. Hoffman M., Monroe D.M. A cell-based model of hemostasis // *Thrombosis and haemostasis*. 2001. V. 85. № 6. P. 958–65.
25. Jobe S.M., Leo L., Eastvold J.S. (Dickneite G.) et al. Role of FcRgamma and factor XIIIa in coated platelet formation // *Blood*. 2005. V. 106. № 13. P. 4146–51.
26. Joseph K., Nakazawa Y., Bahou W.F. et al. Platelet glycoprotein Ib: a zinc-dependent binding protein for the heavy chain of high-molecular-weight kininogen // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 1999. V. 5. № 8. P. 555–63.
27. Kalafatis M., Rand M.D., Mann K.G. Factor Va-membrane interaction is mediated by two regions located on the light chain of the cofactor // *Biochemistry*. 1994. V. 33. № 2. P. 486–93.
28. Kane W.H., Ichinose A., Hagen F.S., Davie E.W. Cloning of *cDNAs* coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats // *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 20. P. 6508–14.
29. Kane W.H., Davie E.W. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders // *Blood*. 1988. V. 71. № 3. P. 539–55.
30. Kempton C.L., Hoffman M., Roberts H.R., Monroe D.M. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005. V. 25. № 4. P. 861–6.
31. Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the *P2Y12*-receptor // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008. V. 6. № 9. P. 1603–5.
32. Krishnaswamy S., Jones K.C., Mann K.G. Prothrombinase complex assembly. Kinetic mechanism of enzyme assembly on phospholipid vesicles // *The Journal of biological chemistry*. 1988. V. 263. № 8. P. 3823–34.
33. Kulkarni S., Jackson S.P. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIb beta3 adhesive function and thrombus growth // *The Journal of biological chemistry*. 2004. V. 279. № 29. P. 30697–706.
34. Kurosawa S., Galvin J.B., Esmon N.L., Esmon C.T. Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin // *The Journal of biological chemistry*. 1987. V. 262. № 5. P. 2206–12.
35. Kurosawa S., Stearns D.J., Jackson K.W., Esmon C.T. A 10-kDa cyanogen bromide fragment from the epidermal growth factor homology domain of rabbit thrombomodulin contains the primary thrombin binding site // *The Journal of biological chemistry*. 1988. V. 263. № 13. P. 5993–6.
36. Lacroix R., Dubois C., Leroyer A.S., Sabatier F. et al. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis // *J. of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013. (11 Suppl 1). P. 24–35.
37. Lawson J.H., Kalafatis M., Stram S., Mann K.G. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study // *The J. of biological chemistry*. 1994. V. 269. № 37. P. 23357–66.
38. Lim T.K., Bloomfield V.A., Nelsestuen G.L. Structure of the prothrombin- and blood clotting factor X-membrane complexes // *Biochemistry*. 1977. V. 262. № 19. P. 4177–81.
39. London F., Walsh P.N. The role of electrostatic interactions in the assembly of the factor X activating complex on both activated platelets and negatively-

- charged phospholipid vesicles // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 37. P. 12146–54.
40. *Macedo-Ribeiro S., Bode W., Huber R. et al.* Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V // *Nature*. 1999. V. 402. № 6760. P. 434–9.
 41. *Mallat Z., Benamer H., Hugel B. et al.* Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes // *Circulation*. 2000. V. 101. № 8. P. 841–3.
 42. *Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R. et al.* Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes // *Blood*. 1990. V. 76. № 1. P. 1–16.
 43. *Marco De L., Mazzucato M., Masotti A., Ruggeri, Z.M.* Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha // *The J. of biological chemistry*. 1994. V. № 9. P. 6478–84.
 44. *Meijden Van Der P.E.J., Van Schilfgaarde M., Van Oerle R., Renné T. et al.* Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa // *J. of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012. V. 10. № 7. P. 1355–62.
 45. *Monroe D.M., Key N.S.* The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking // *J. of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007. V. 5. № 6. P. 1097–105.
 46. *Morel O., Toti F., Hugel B., Bakouboula B. et al.* Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006. V. 26. № 12. P. 2594–604.
 47. *Morel O., Jesel L., Freyssinet J.-M. and Toti F.* Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011. V. 31. № 1. P. 15–26.
 48. *Nelsestuen G.L., Shah A.M., Harvey S.B.* Vitamin K-dependent proteins // *Vitamins and hormones*. 2000. V. 58. P. 355–89.
 49. *Nesheim M.E., Myrmet K.H., Hibbard L., Mann K.G.* Isolation and characterization of single chain bovine factor V // *The J. of biological chemistry*. 1979. V. 254. № 2. P. 508–17.
 50. *Nesheim M.E., Kettner C., Shaw E., Mann K.G.* Cofactor dependence of factor Xa incorporation into the prothrombinase complex // *The J. of biological chemistry*. 1981. № 13 (256). C. 6537–40.
 51. *Nesheim M.E., Mann K.G.* Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V // *The Journal of biological chemistry*. 1979. V. 254. № 4. P. 1326–34.
 52. *Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S. et al.* Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis // *Blood*. 2000. V. 95. № 3. P. 930–5.
 53. *Ohkubo Y.Z., Tajkhorshid E.* Distinct structural and adhesive roles of Ca²⁺ in membrane binding of blood coagulation factors // *Structure (London, England: 1993)*. 2008. V. 16. № 1. P. 72–81.
 54. *Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J et al.* Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex // *J. of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2005. V. 3. № 11. P. 2545–53.
 55. *Panteleev M.A., Balandina A.N., Lipets E.N. et al.* Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation // *Biophysical j.* 2010. V. 98. № 9. P. 1751–61.
 56. *Peerschke E.I.B., Murphy T.K., Ghebrehiwet B.* Activation-dependent surface expression of gC1qR/p33 on human blood platelets // *Thrombosis and haemostasis*. 2003. V. 89. № 2. P. 331–9.
 57. *Pellequer J.L., Gale A.J., Griffin J.H., Getzoff E.D.* Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: a proposed membrane binding mode for FV and FVIII C2 domains // *Blood cells, molecules & diseases*. 1998. V. 24. № 4. P. 448–61.
 58. *Pratt K.P., Shen B.W., Takeshima K. et al.* Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution // *Nature*. 1999. 402. № 6760. P. 439–42.
 59. *Prodan C.I., Vincent A.S., Padmanabhan R.* Coated-platelet levels are low in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage // *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009. V. 40. № 7. P. 2578–80.
 60. *Remenyi G., Szasz R., Friese P., Dale G.L.* Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005. 25. № 2. P. 467–71.
 61. *Roberts H.R., Hoffman M., Monroe D.M.* A cell-based model of thrombin generation // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2006. (32 Suppl 1). P. 32–8.
 62. *Shet A.S., Aras O., Gupta K. et al.* Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes // *Blood*. 2003. V. 102. № 7. P. 2678–83.
 63. *Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y. et al.* Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets // *Thrombosis and haemostasis*. 2007. V. 97. № 3. P. 425–34.
 64. *Soriano-Garcia M., Padmanabhan K., de Vos A.M., Tulinsky A.* The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1 // *Biochemistry*. 1992. V. 31. № 9. P. 2554–66.
 65. *Sunnerhagen M., Forsén S., Hoffrén A.M. et al.* Structure of the Ca²⁺-free Gla domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins // *Nature structural biology*. 1995. № 6 (2). P. 504–9.

66. Suzuki J., Umeda M., Sims P.J., Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F // *Nature*. 2010. V. 468. № 7325. P. 834–8.
67. Svshnikova A.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through *PAR1* // *Molecular bioSystems*. 2015. V. 11. № 4. P. 1052–60.
68. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Pantelev M.A. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation // *British journal of haematology*. 2012. V. 157. № 1. P. 105–15.
69. Valaydon Z.S., Lee P., Dale G.L., Januszewski A.S. et al. Increased coated-platelet levels in chronic haemodialysis patients // *Nephrology (Carlton, Vic.)*. 2009. V. 14. № 2. P. 148–54.
70. VanWijk M.J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases // *Cardiovascular research*. 2003. 59. № 2. P. 277–87.
71. Webber A.J., Firkin B.G. Two Populations of Platelets // *Nature*. 1965. V. 205. № 4978. P. 1332–1333.
72. Yang H., Kim A., David T., Palmer D. et al. TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation // *Cell*. 2012. V. 151. № 1. P. 111–22.
73. Yuana Y., Sturk A., Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions // *Blood reviews*. 2013. V. 27. № 1. P. 31–9.
74. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A. et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII // *PloS one*. 2015. V. 10. № 2. P. e0116665.
75. Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. Lipid-protein interactions in blood coagulation // *Biochimica et biophysica acta*. 1998. V. 1376. № 3. P. 433–53.

Поступила в редакцию
20.06.2015 г.

Regulation of Membrane-Dependent Reactions of Blood Coagulation

N.A. Podoplelova¹, Y. N. Kotova^{1,2}, E. N. Lipets^{1,2}, F.I. Ataulakhanov^{1,2,3},
M. A. Pantelev^{1,2,3}

¹ Dmitry Rogachev Federal Scientific and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology

² Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russia

³ Moscow State University, Lenin's Hills, Russia

All major coagulation reactions do not occur in blood plasma itself, these processes are actually two-dimensional reactions localized to the phospholipid membranes. Almost all blood cells, lipoproteins, and microparticles provide assembly of protein complexes. A central role among them are played by platelets and platelet-derived microparticles. On their membranes occurs the most important coagulation reactions such as activation of prothrombin by prothrombin complex, activation of factor X by complexes intrinsic and extrinsic tenase. These reactions are important for processes activation of the contact path coagulation, activation factor XI by thrombin, appearance of enzymatic activity of factor VIIa etc. This review is focused on the membrane-dependent reactions, here are discussed mechanisms and regulation these reactions and the possible prospects of the study.

Key words: blood coagulation, coagulation factors, membrane-dependent reactions, blood platelets, microparticles.