

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ТРОМБИНА С МЕМБРАНОЙ ТРОМБОЦИТА

© 2024 г. Р. Р. Керимов^а, Д. Ю. Нечипуренко^{а, б, с, *}, М. А. Пантелеев^{а, б, с},

^аЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^бМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

^сНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, 117997 Россия

*e-mail: ne4ipur@gmail.com

Поступила в редакцию 03.11.2023

После доработки 07.12.2023

Принята к печати 11.12.2023

Тромбин — ключевой фермент системы свертывания крови, который активно изучается с начала прошлого века. Образование тромбина из протромбина в области повреждения сосуда приводит не только к формированию фибрина — важного структурного компонента гемостатического сгустка, но и к активации тромбоцитов, эндотелия и клеток иммунной системы. Считается, что связывание тромбина с поверхностью тромбоцитов играет критическую роль в процессе их активации, а также может обеспечивать поддержание высокой концентрации тромбина внутри тромба вследствие концентрирования протеазы на поверхности тромбоцитов. На данный момент все основные рецепторы тромбина на тромбоцитах тщательно охарактеризованы: благодаря различным экспериментальным методам установлены физико-химические параметры соответствующих межмолекулярных взаимодействий. Так как взаимодействие тромбина с тромбоцитами приводит к их активации, включающей изменения количества рецепторов в результате секреции гранул, правильная интерпретация наблюдаемых особенностей кинетических кривых связывания сильно усложняется. Известно, что некоторые рецепторы в результате активации тромбоцита способны перераспределяться на мембране и образовывать димеры и кластеры, что делает кинетику связывания тромбина с тромбоцитами чрезвычайно сложным процессом, зависящим от множества факторов, таких как концентрации активаторов, состояние тромбоцитов и других локальных параметров системы. Данный обзор ставит своей целью описать современные представления о взаимодействии тромбина с мембраной тромбоцита и обозначить важные нерешенные вопросы в данной области исследований. В обзоре представлена не только информация о структурных и кинетических особенностях связывания тромбина с отдельными мембранными белками тромбоцита, но и анализ связи между соответствующими параметрами взаимодействия и ранее полученными данными о кинетике связывании протеазы с поверхностью тромбоцита.

Ключевые слова: тромбин, тромбоциты, гликопротеины, PAR-рецепторы, константа связывания, мембранный комплекс

DOI: 10.31857/S0233475524030026, **EDN:** csvdqu

ВВЕДЕНИЕ

Тромбин (фактор свертывания IIa) играет центральную роль в системе свертывания крови и является одним из главных активаторов тромбоцитов [1, 2], что объясняет его популярность как объекта медицинских и биохимических исследований. Большинство ныне используемых антикоагулянтных препаратов либо блокируют тромбин напрямую, либо повышают эффективность естественных ингибиторов тромбина или же блокируют фактор Ха, отвечающий за наработку тромбина

[3]. Как более ранние, так и современные научные работы свидетельствуют о критической роли накопления тромбина в тромбоцитарных агрегатах для их стабилизации [1, 3]. Рост локальной концентрации тромбина напрямую влияет на своевременную и необратимую активацию тромбоцитов, а также на их необратимую агрегацию, которые необходимы для увеличения плотности упаковки тромбов и последующего образования фибрина.

Связывание молекул тромбина с мембранными белками не только запускает процесс активации

тромбоцитов, но и играет значительную роль в накоплении тромбина в растущем тромбоцитарном агрегате. Так как в тромбе подавляющее большинство объема заполнено плотно упакованными тромбоцитами, считается, что существенная часть суммарной концентрации тромбина в тромбе определяется именно связанной фракцией тромбина.

Таким образом, знание особенностей процесса связывания тромбина с тромбоцитами и кинетики его накопления на поверхности этих клеток имеет большое значение для развития как более глубокого понимания механизмов гемостатического ответа, так и соответствующих клинических приложений.

Краткая история исследований

Наиболее ранние экспериментальные исследования взаимодействия тромбина с тромбоцитами можно датировать концом 1910-х годов. Статья Райта и Минот [2] дала начало этому направлению исследований гемостаза и показала, что тромбин способен вызывать активацию и следующие за этим “метаморфозы” тромбоцитов.

К концу XX века ряд лабораторий поставили своей целью количественное определение кинетики связывания тромбина с поверхностью тромбоцитов. В качестве основного метода исследования данные работы использовали радиоактивно-меченный тромбин (^{125}I -тромбин) [4–11, 12]. Идея эксперимента заключается в том, что радиоактивно-меченный тромбин связывается с тромбоцитами с такой же кинетикой, как и немеченый тромбин, и радиоактивное излучение йода можно использовать для оценки количества свободного и связанного тромбина. При инкубации суспензии тромбоцитов с радиоактивным тромбином их мембраны связывают определенное количество молекул протеазы, и измерение уровня излучения данных тромбоцитов после их выделения из раствора показывает количество связанного тромбина, которое можно нормализовать на количество клеток. Следует отметить, что в ранних работах молекулярные механизмы связывания тромбина с мембраной тромбоцита были неизвестны, в том числе было неясно, происходит ли связывание с фосфолипидами или мембранными белками. Тем не менее, инкубируя тромбоциты с меченым тромбином (при разных концентрациях), ученые могли построить зависимость количества связанного тромбина от начальной добавленной концентрации. Полученные результаты с помощью метода Штека–Уоллоха [13] можно представить в виде зависимости обратных величин связанного тромбина от свободного, график которой будет иметь вид линейной зависимости при условии

равновесной реакции. По параметрам этой прямой можно определить количество сайтов связывания и константу диссоциации реакции.

В большинстве подобных исследований наблюдалось, что тромбоциты обладают по крайней мере двумя типами сайтов связывания тромбина: так называемыми “высоко” и “низкоаффинными” сайтами (следует отметить, что некоторые данные показывали наличие “среднего” типа [11]). Основным параметром для данной классификации являлась константа диссоциации K_d комплекса тромбина с соответствующими типами сайтов. Важно отметить, что значения вышеописанных параметров, приведенные в литературе, демонстрируют существенный разброс. Если представить графически выборку результатов значений K_d и количества сайтов связывания тромбина (рис. 1), то можно видеть, что в разных работах эти значения могли отличаться более чем на 2 порядка. Это могло быть вызвано различием экспериментальных методов, используемых концентраций тромбина или отсутствием общепринятой классификации сайтов по их аффинности [14]. Также следует отметить, что тип метки и ее локализация на молекуле белка могут существенно влиять на процессы взаимодействия тромбина с рецепторами на поверхности тромбоцита.

Решение этой проблемы не заставило себя долго ждать: развитие молекулярно-биологических, протеомных и биохимических методов исследования позволили ученым не только определить специфичные рецепторы тромбина на поверхности тромбоцитов, но также выделить их и описать кинетику всех реакций и белковых взаимодействий. Кроме того, стало возможным количественно оценить уровни экспрессии рецепторов в тромбоцитах. В основе современной картины специфического взаимодействия тромбина с тромбоцитами человека лежит его взаимодействие с тремя основными рецепторами.

Сайты связывания тромбина на тромбоцитах

Первым предполагаемым сайтом связывания тромбина оказался так называемый гликокалицин — гликозилированный внеклеточный участок гликопротеина GPIb α , входящего в состав комплекса GPIb/IX/V [15]. Эти комплексы в изобилии присутствуют на поверхности тромбоцитов, в количестве 20 000–50 000 копий на тромбоцит [1, 16, 17]. Было установлено, что данная субъединица содержит сайт связывания, характеризующийся высоким сродством к α -тромбину, на долю которого приходится до 90% общего количества тромбина, взаимодействующего с тромбоцитами [18]. Оценки K_d связывания тромбина с данным

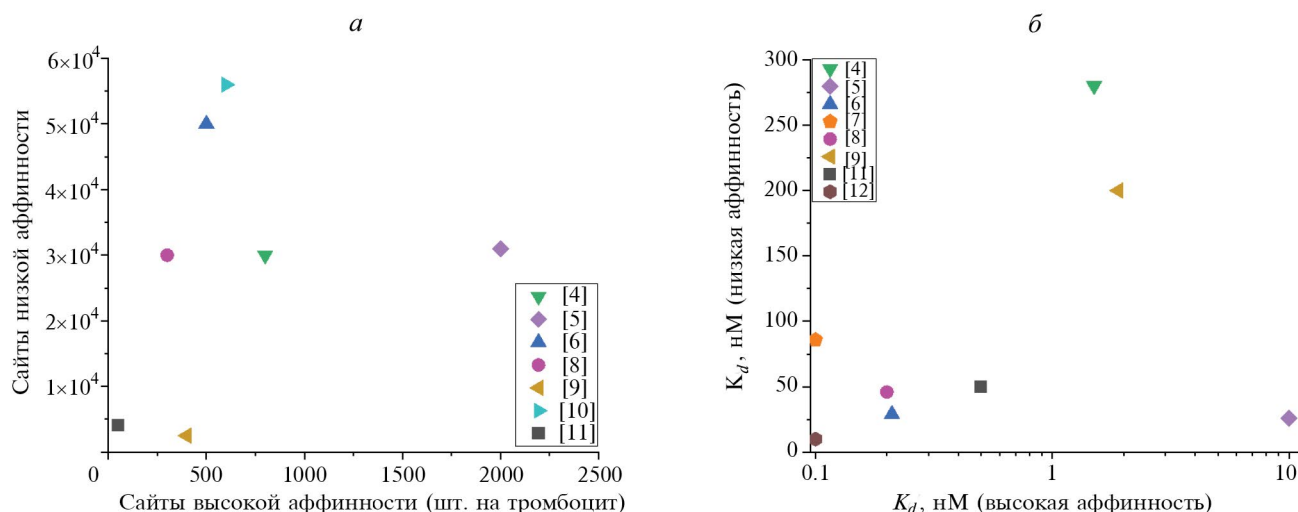


Рис. 1. Графическое представление количества сайтов связывания тромбина и их аффинности в выборке различных экспериментальных работ. *a* — Среднее количество сайтов связывания тромбина на поверхности тромбоцита. По оси X отложено количество сайтов высокой аффинности, по оси Y — низкой аффинности. *б* — Средняя константа диссоциации для сайтов высокой и низкой аффинности. По оси X — K_d сайтов высокой аффинности (логарифмический масштаб), по оси Y — низкой аффинности. Каждая точка — данные из определенной статьи, представленной в обзоре. Цвет и форма символа соответствуют номеру статьи в списке литературы.

сайтом, полученные в разных работах, лежат в достаточно широком диапазоне значений от 50 до 500 нМ [10, 19]. Этот белок способен связывать молекулу тромбина, взаимодействуя как с экзосайтом I, так и с экзосайтом II тромбина [20–22]. Ранние кристаллические структуры комплексов GPIIb/IIIa–тромбин демонстрировали, что одна молекула GPIIb/IIIa связывает одну молекулу тромбина (часть работ также предполагала возможность связывания двух молекул тромбина разными экзосайтами на одной молекуле GPIIb/IIIa), однако более современные исследования показали, что как раз тромбин, используя оба своих экзосайта, связывается с двумя соседними молекулами GPIIb/IIIa, тем самым повышая стабильность прикрепления к мембране тромбоцита [11, 23].

Хотя было установлено, что GPIIb/IIIa может связывать тромбин в значительных количествах и играет ключевую роль в активации тромбоцитов, наличие одного подобного сайта не позволяло полностью описать сложную кинетику связывания тромбина с тромбоцитами. Число сайтов GPIIb/IIIa и их K_d количественно соответствовали параметрам ранее описанных сайтов низкой аффинности, однако наличие сайтов высокой аффинности, число которых измерялось сотнями или тысячами на тромбоцит, а K_d даже по самым высоким оценкам не превышала 10 нМ, не могло быть объяснено взаимодействием с GPIIb/IIIa. Более того, было показано, что GPIIb/IIIa при связывании с тромбином не подвергается

протеолитическому расщеплению [24], что вызвало еще больше вопросов о его роли в процессе активации тромбоцитов тромбином. Также при помощи флуоресцентной микроскопии удалось показать, что в процессе связывания тромбина на поверхности тромбоцита, локализация GPIIb/IIIa на мембране может не совпадать с “высоко-аффинными” сайтами [25], что, по всей видимости, означает наличие другого, более чувствительного рецептора тромбина на мембране тромбоцита.

Через несколько лет после открытия GPIIb/IIIa произошел значительный прорыв в данной области, когда удалось открыть весьма многообещающую мишень — трансмембранные белки, известные как PAR (protease-activated receptors) и образующие подсемейство рецепторов, связанных с G-белками, активируемых путем расщепления участка их внеклеточного домена. Несколько вариантов подобных рецепторов были обнаружены как в тромбоцитах человека, так и мыши [26]. Среди них основные рецепторы тромбина в тромбоцитах человека были названы PAR1 и PAR4 [14, 27, 28] (примечательно, что в мышинных тромбоцитах PAR1 не синтезируется, а его роль, предположительно, выполняет PAR3).

PAR1 стал первым открытым рецептором тромбина из данного семейства в тромбоцитах человека [29]. В среднем тромбоцит имеет порядка 1000–3000 копий PAR1 на своей мембране [1, 30]. При

связывании с PAR1 тромбин расщепляет экзодомен, находящийся у внеклеточного N-конца PAR1, что приводит к образованию нового N-конца, который выступает лигандом, специфично связываясь с другой областью рецептора PAR1 и запуская сигнальный путь активации тромбоцитов [26, 31]. Экзодомен PAR1 имеет два сайта связывания тромбина: помимо связывания с активным центром, PAR1 обладает гирудин-подобной последовательностью, которая взаимодействует с экзосайтом I тромбина, вызывая аллостерические эффекты, тем самым снижая энергетический барьер для расщепления PAR1 [32, 33]. Роль этой гирудин-подобной последовательности в усилении активации PAR1 была показана на основе экспериментальных данных, полученных для тромбина, содержащего мутации как в экзосайте I, так и в экспериментах с PAR-1 с мутацией в его экзодомене. Исследования показали, что константа диссоциации связывания тромбина с PAR1 находится в низком наномолярном диапазоне ($K_d \sim 1$ нМ), с константой Михаэлиса $K_m = 10\text{--}28$ мкМ и $k_{cat} = 58\text{--}340$ с⁻¹ [34, 35]. Эти значения свидетельствуют об относительно высокой аффинности связывания, что обеспечивает активацию PAR1 и запуск соответствующих сигнальных путей при наличии даже низких концентраций тромбина (<0.01 ед/мл, что примерно соответствует <0.1 нМ).

PAR4 был четвертым открытым рецептором данного семейства и является значительно менее аффинным рецептором тромбина в тромбоцитах человека [36]. В отличие от PAR1, у PAR4 отсутствует гирудин-подобная последовательность, поэтому его взаимодействие с тромбином происходит только в активном сайте [36, 37]. Было показано, что рекомбинантный экзодомен PAR4 расщепляется α -тромбином с $K_m = 61$ мкМ и $k_{cat} = 17\text{--}18$ с⁻¹ [13, 36]. Примечательно, что ключевое различие заключается в k_{cat} , который по оценкам от 4 до 20 раз ниже, чем у PAR1. Это уменьшение, в первую очередь, связано именно с отсутствием гирудин-подобной последовательности в PAR4, что делает его неспособным, в отличие от PAR1, менять свою конформацию для снижения энергетического барьера расщепления при связывании с тромбином.

На сегодняшний день точная роль PAR4 в связывании с тромбином и последующем запуске сигнальных путей, остается предметом дискуссий. Некоторые более ранние исследования показали, что ингибирование PAR4 не оказывает существенного влияния на активацию тромбоцитов и образование тромбов [37]. В свою очередь, результаты других работ позволяют предположить, что PAR4 из-за его более низкого сродства к тромбину может

играть важную роль дополнительного рецептора в присутствии более высоких концентраций тромбина [38]. Также было показано, что активация PAR4 влияет на уровень внутриклеточного кальция тромбоцитов, и его ингибирование ведет к уменьшению концентрации кальция в тромбоците, особенно на поздних этапах активации [39].

В начале 2000-х годов была выдвинута гипотеза, что даже одного PAR1 достаточно для описания всей активации тромбоцитов, индуцированной тромбином, особенно при низких концентрациях тромбина [20]. Кроме того, модель двух рецепторов PAR с различной аффинностью к тромбину идейно соответствует ранее полученным данным о двух-сайтовом профиле связывания тромбина. Однако даже самые высокие оценки количества молекул PAR на поверхности тромбоцитов не согласуются с параметрами взаимодействия тромбина с поверхностью тромбоцитов, описанных в ранних работах: суммарное количество рецепторов PAR, экспрессируемых в тромбоцитах, оказывается почти в 10 раз меньше общего числа сайтов связывания тромбина.

Кроме того, модель взаимодействия тромбоцитов с тромбином, основанная только на PAR, не могла объяснить ранее полученные экспериментальные результаты, в которых ингибирование GPIIb/IIIa оказывало критическое влияние на ответ тромбоцитов на тромбин, особенно при его низких концентрациях [19, 24, 29, 40]. Более того, отсутствие GPIIb/IIIa у пациентов с синдромом Бернара-Сулье (характеризующимся дефицитом комплекса GP IIb-IX-V) не только влияет на взаимодействие тромбоцитов с мультимерами фактора фон Виллебранда, но и вызывает дефекты активации тромбоцитов тромбином [41]. Снижение уровня активации в таком случае сравнимо с эффектом, описанным в экспериментах по ингибированию сайтов GPIIb/IIIa на поверхности тромбоцита [19, 24].

Современная картина взаимодействия тромбина с мембраной тромбоцитов

Накопленные за десятилетия исследований результаты позволяют предположить наличие сложных взаимодействий между рецепторами PAR и сайтами связывания GPIIb/IIIa в процессах активации тромбоцитов под действием тромбина. Одним из таких примеров является то, что PAR1 и PAR4 обладают способностью образовывать кластеры (гомодимеры PAR1-PAR1, PAR4-PAR4 и гетеродимеры PAR1-PAR4), состоящие из двух, реже трех молекул, а также кластеры PAR-GPIIb/IIIa [1, 42]. Примечательно, что эти кластеры обычно отсутствуют в покоящихся тромбоцитах, но могут собираться

на мембране при их активации [43]. Было также показано, что для образования гетеродимеров PAR1 и PAR4 требуется их конформационное изменение, которое индуцируется в ответ на активацию рецепторов α -тромбином. Комплексы GPIb/IX/V также способны образовывать так называемые кластеры — мультимерные комплексы из нескольких рецепторов — в ответ не только на биохимическую активацию, но и на достаточные напряжения сдвига, которые могут испытывать прикрепленные к поверхности тромбоциты в условиях артериального потока [44].

В одной из работ было продемонстрировано, что GPIb α способен ускорять расщепление PAR1 тромбином, тем самым увеличивая эффективность активации тромбоцитов человека [45]. В работах по изучению гидролиза PAR1 на неактивных тромбоцитах было показано, что ингибирование связывания тромбина с GPIb α также препятствует расщеплению PAR1 на тромбоцитах человека. Примечательно, что связывание GPIb α с тромбином увеличивает отношение k_{cat}/K_m , характеризующее процесс расщепления PAR1 примерно в 6–7 раз, что позволяет предположить, что GPIb α потенциально служит “кофактором” для индуцированной тромбином активации PAR1 и дальнейшей сигнализации в тромбоцитах *in situ*, в особенности в ответ на низкие концентрации тромбина [46–48]. Точные механизмы, с помощью которых взаимодействие тромбина с GPIb α ускоряет гидролиз PAR1, остаются неизвестными.

С физико-химической точки зрения характерное время связывания тромбина с GPIb α должно быть сравнимо или даже меньше, чем соответствующий параметр для процесса образования комплекса тромбин-PAR1 [24, 45].

Даже если константы скорости ассоциации тромбина-GPIb α сравнимы с кинетикой реакции тромбин-PAR1, то количество GPIb α на мембране тромбоцитов как минимум на порядок больше, чем PAR1. Можно предположить, что молекула тромбина, связавшись одним из своих экзосайтов с GPIb α , имеет повышенную аффинность и сниженный энергетический барьер для образования комплекса с PAR1 и последующего расщепления рецептора. Таким образом, при наличии пары близко расположенных GPIb α и PAR1 молекула тромбина способна прочно связаться через экзосайт II с GPIb α , после чего экзосайт I тромбина связывается с PAR1, что приводит к его расщеплению и запуску внутриклеточного сигнального пути активации тромбоцита. Эта гипотеза парного связывания тромбина через комбинацию GPIb α — PAR1 также согласуется с наличием наблюдаемых

в *in vitro* сайтов высокой аффинности ($K_d < 1$ нМ), превышающих аффинность связывания изолированных PAR1 ($K_d \sim 1$ нМ) и GPIb α ($K_d \sim 100$ нМ).

Сегодня известно, что при активации тромбоцитов существенная часть комплекса GPIb-IX-V локализуется в липидных рафтах [49, 50]. Учитывая связывание тромбина с GPIb α , можно предположить, что такие рафты позволяют существенно сконцентрировать ключевых участников тромбин-зависимых реакций на поверхности тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как современные представления об описанных выше мембранных белках тромбоцита и их взаимодействии с тромбином соотносятся с данными о кинетике связывания тромбина с тромбоцитами, описанными в литературе?

Как видно из рис. 1, в большинстве работ оценки количества сайтов низкой аффинности имели значения более 20 000, что, в целом, соответствует измеренному количеству молекул GPIb α на поверхности тромбоцита. Также имеется неплохое согласие между соответствующими диапазонами K_d , описанными для GPIb α (50–500 нМ) и описанными параметрами для низкоаффинных сайтов (10–300 нМ, рис. 1). Таким образом, образование комплекса тромбина с GPIb α , по всей видимости, соответствует связыванию с сайтами, характеризующимися низкой аффинностью (рис. 2а). Связывание тромбина с сайтами высокой аффинности, в свою очередь, соответствует взаимодействию тромбина с PAR-рецепторами, а также одновременно взаимодействию тромбина с GPIb α и PAR-рецептором (рис. 2б, 2в). Таким образом, образование более стабильных комплексов тромбина одновременно с GPIb α и PAR, которое может соответствовать взаимодействию с сайтами высокой аффинности, может происходить в два этапа: связывание с GPIb α и последующее взаимодействие с PAR-рецепторами, запускающее их протеолитическую активацию. В пользу такой картины свидетельствуют данные о существенном уменьшении скорости активации PAR1 рецепторов при ингибировании связывания тромбина с GPIb α [45].

Следует отметить, что тромбин — центральный фермент каскада свертывания крови — не имеет Gla-домена и поэтому, в отличие от большинства факторов свертывания, не связывается с отрицательно заряженными фосфолипидами. Однако достаточно большое количество молекул GPIb α в мембране тромбоцита может приводить

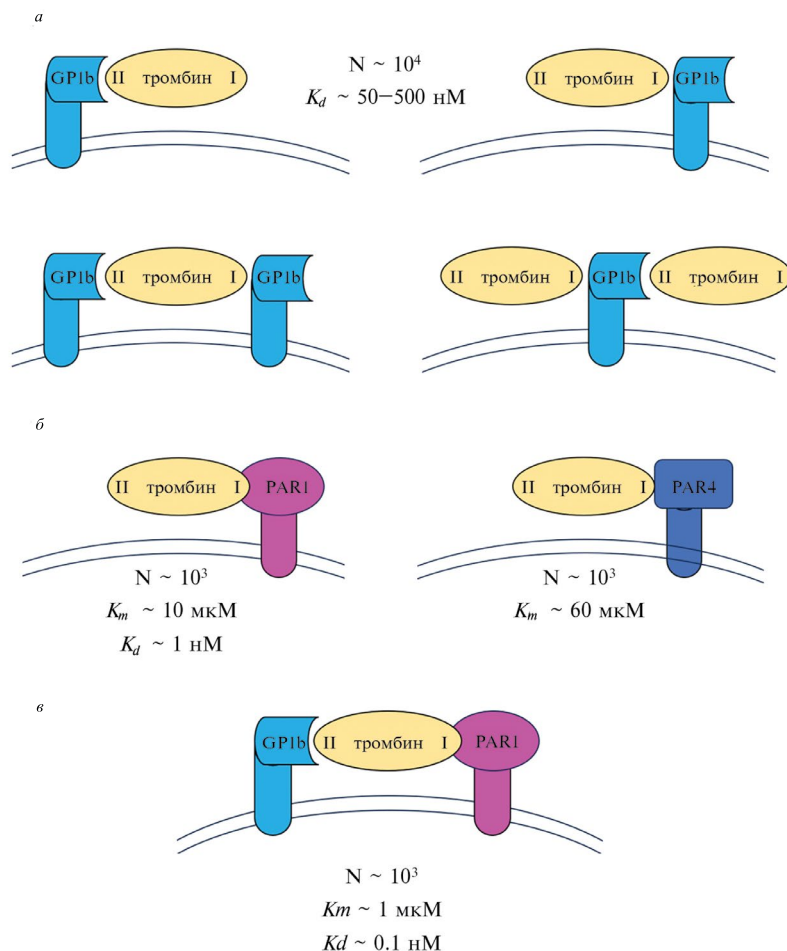


Рис. 2. Иллюстрация возможных взаимодействий тромбина с рецепторами на поверхности тромбоцита. Римскими цифрами I и II показаны соответствующие эксосайты молекулы тромбина. *а* – Связывание тромбина с GPIIb. Оба эксосайта тромбина способны связываться с сайтом GPIIb. Связывание одной молекулы тромбина двумя соседствующими GPIIb является наиболее частой конформацией. Связывание двух молекул тромбина с одной молекулой GPIIb, предположительно нестабильно и не реализуется *in vivo*. *б* – Связывание тромбина с PAR1 и PAR4 и основные параметры реакции расщепления рецепторов. *в* – Возможная конформация – кластер GP-PAR1 с высокой аффинностью к тромбину, где GPIIb выступает в качестве кофактора в реакции расщепления PAR1 тромбином.

к существенному накоплению тромбина на поверхности этих клеток, а также влиять на параметры его переноса в тромбоцитарном агрегате.

Для того чтобы оценить потенциальные эффекты такого связывания, можно рассмотреть ситуацию в равновесии, когда локальная концентрация свободного тромбина соответствует 10 нМ. В таком случае в 10 фл (10 мкм³) плазмы будет содержаться в среднем 60 молекул тромбина (рис. 3). Данный объем соответствует среднему объему тромбоцита, на поверхности которого, в свою очередь, в случае равновесия будет связано порядка 1000 молекул (если считать $K_d = 100 \text{ нМ}$ для сайтов низкой аффинности, а их количество взять равным 10 000). Таким образом, даже в случае достаточно рыхлого тромба, половину объема которого составляет плазма, а половину – тромбоциты, количество связанного тромбина в равновесии будет на порядок

превышать количество свободного. Данный эффект может иметь несколько последствий с точки зрения регуляции тромбообразования: во-первых, накопление тромбина на мембране тромбоцита может служить важным механизмом, предотвращающим его активный перенос потоком на раннем этапе тромбообразования, – по аналогии с похожим эффектом, который, по всей видимости, имеет место для факторов свертывания при их взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидами [51]. Во-вторых, процесс связывания тромбина с тромбоцитами может существенно влиять на динамику его распространения в тромбоцитарном агрегате и тем самым – на пространственно-временную картину его активности в тромбе. Однако для оценки данного эффекта необходимо знать не только равновесные константы связывания, но и кинетические параметры взаимодействия

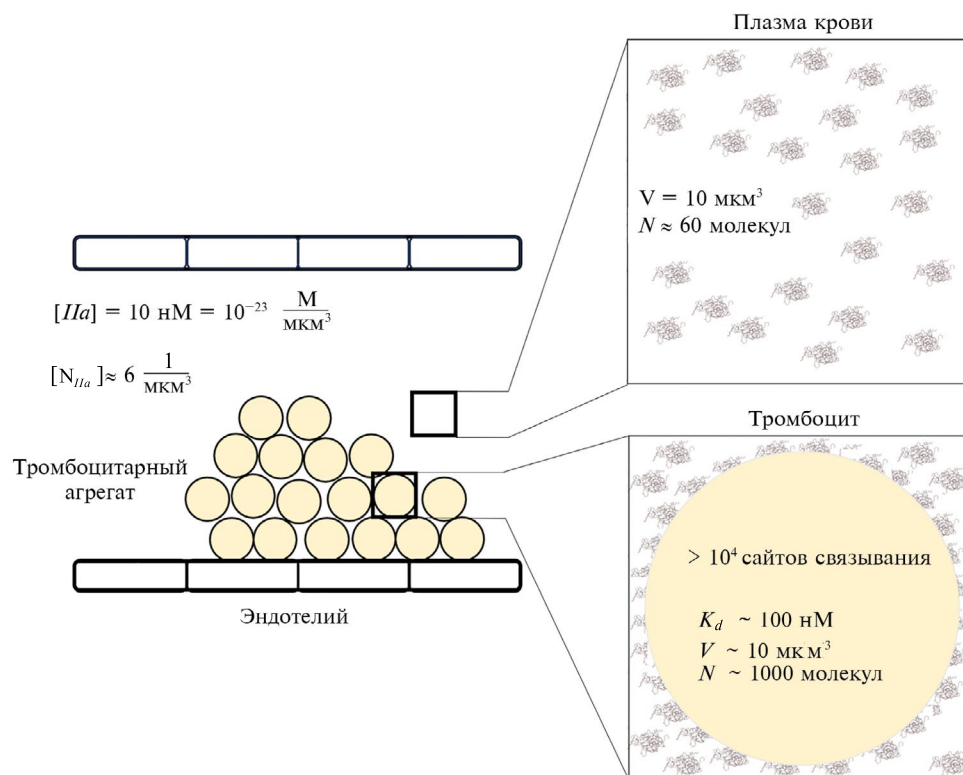


Рис. 3. Анализ количества свободного и связанного тромбина в тромбоцитарном агрегате. Расчеты произведены при условии, что локальная концентрация тромбина достигает 10 нМ, а один тромбоцит имеет порядка 10^4 сайтов связывания тромбина с $K_d \sim 100$ нМ.

тромбина с тромбоцитами. Кинетические кривые, полученные в ранних работах, свидетельствуют о характерном времени отсоединения тромбина (предположительно, от сайтов низкой аффинности, т.е. GPIIb/IIIa) – порядка 5 мин [6], что соответствует скорости реакции диссоциации комплекса порядка 0.003 с^{-1} . Связывание тромбина с тромбоцитами может также влиять на скорость его ингибирования. Известно, что время полужизни тромбина в плазме человека без тромбоцитов составляет порядка минуты. К сожалению, надежных данных о характерном времени жизни тромбина в связанной с тромбоцитами форме на сегодняшний день нет, однако, исходя из молекулярных особенностей взаимодействия тромбина с рецепторами на поверхности тромбоцитов, а также с основным ингибитором – антитромбином III, кажется разумным предположить, что время полужизни тромбина в связанном состоянии будет больше, чем в свободном.

В заключение следует отметить, что наличие достаточно широкого диапазона значений описанных в литературе параметров связывания тромбина с тромбоцитами (рис. 1) диктует необходимость экспериментального анализа процесса

распространения тромбина в тромбе и привлечение соответствующих математических моделей для количественной оценки влияния связывания на параметры транспорта этого центрального активатора в структуре тромбоцитарного агрегата.

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.Д. Мегалинскому за техническую помощь.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 22-24-01028.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P. 2019. *Platelets*. 4th Edition. Academic Press. Elsevier, p. 169–221, 243–257.
2. Wright J.H., Minot G.R. 1917. The viscous metamorphosis of the blood platelets. *J. Exp. Med.* **26**, 395–409.

3. Harter K., Levine M., Henderson S.O. 2015. Anticoagulation drug therapy: A review. *West J. Emerg. Med.* **16** (1), 11–17.
4. Workman E.F. Jr., White G.C. II, Lundblad R.L. 1977. High affinity binding of thrombin to platelets. Inhibition by tetranitromethane and heparin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 925–932.
5. White G.C., Lundblad R.L., Griffith M.J. 1981. Structure–function relations in platelet–thrombin reactions. Inhibition of platelet–thrombin interactions by lysine modification. *J. Biol. Chem.* **256**, 1763–1766.
6. Tollefsen D.M., Feagler J.R., Majerus P.W. 1974. The binding of thrombin to the surface of human platelets. *J. Biol. Chem.* **249** (8), 2646–2651.
7. Tollefsen D.M., Majerus P.W. 1976. Evidence for a single class of thrombin-binding sites on human platelets. *Biochemistry*. **15**, 2144–2149.
8. Shuman M.A., Tollefsen D.M., Majerus P.W. 1976. The binding of human and bovine thrombin to human platelets. *Blood*. **47**, 43–54.
9. Martin B.M., Wasiewski W.W., Fenton J.W., Dewtiller T.C. 1976. Equilibrium binding of thrombin to platelets. *Biochemistry*. **15** (22), 4886–4893.
10. Mustard J.F., Kinlough-Rathbone R.L., Packham M.A. 2002. *History of platelets. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. Pathophysiology, pharmacology, and therapeutics*. Cambridge University Press, p. 3–24.
11. De Marco L., Mazzucato M., Masotti A., Ruggeri Z.M. 1994. Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. *J. Biol. Chem.* **269** (9), 6478–6484.
12. Gralnick H.R., Williams S., McKeown L.P., Hansmann K., Fenton J.W. 2nd, Krutzsch H. 1994. High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: Identification of two binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91** (14), 6334–6338.
13. Steck T., Wallach D. 1965. The binding of kidney-bean phytohemagglutinin by Ehrlich ascites carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*. **97** (3), 510–522.
14. Lundblad R.L., White G.C. 2005. The interaction of thrombin with blood platelets. *Platelets*. **16** (7), 373–375.
15. Okumura T., Jamieson G.A. 1976. Platelet glycoprotein: A single receptor for platelet aggregation induced by thrombin or ristocetin. *Thromb. Res.* **8**, 701–706.
16. Burkhart J.M., Vaudel M., Gambaryan S. 2012. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood*. **120**, e73–e82.
17. Harmon J.T., Jamieson G.A. 1985. Thrombin binds to a high-affinity approximately 900,000-dalton site on human platelets. *Biochemistry*. **24**, 58–64.
18. Mazzucato M., Marco L.D., Masotti A., Pradella P., Bahou W.F., Ruggeri Z.M. 1998. Characterization of the initial alpha-thrombin interaction with glycoprotein Ib alpha in relation to platelet activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 1880–1887.
19. Dörmann D., Clemetson K.J., Kehrel B.E. 2000. The GPIb α thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. **96** (7), 2469–2478.
20. Rivera J., Lozano M.L., Navarro-Núñez L., Vicente V. 2009. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. **94**, 700–711.
21. De Cristofaro R., De Candia E., Landolfi R., Rutella S., Hall S.W. 2001. Structural and functional mapping of the thrombin domain involved in the binding to the platelet glycoprotein Ib. *Biochemistry*. **40**, 13268–13273.
22. Clemetson K.J., Clemetson J.M. 1995. Platelet GPIb α –V–IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin. Thromb. Hemost.* **21**, 130–136.
23. Zarpellon A., Celikel R., Roberts J.R., McClintock R.A., Mendolicchio G.L., Moore K.L., Jing H., Varughese K.I., Ruggeri Z.M. 2011. Binding of α -thrombin to surface-anchored platelet glycoprotein Ib α sulfotyrosines through a two-site mechanism involving exosite I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108** (21), 8628–8633.
24. Ruggeri Z.M., Zarpellon A., Roberts J.R., McClintock R.A., Jing H., Mendolicchio G.L. 2010. Unraveling the mechanism and significance of thrombin binding to platelet glycoprotein Ib. *J. Thromb. Haemost.* **104** (5), 894–902.
25. Hayes K.L., Tracy P.B. 1999. The platelet high-affinity binding site for thrombin mimics hirudin, modulates thrombin-induced platelet activation, and is distinct from the glycoprotein Ib–IX–V complex. *J. Biol. Chem.* **274** (2), 972–980.
26. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. **64**, 1057–1068.
27. De Candia E. 2012. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thromb. Res.* **129** (3), 250–256.
28. Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J., Ishihara H., Coughlin S.R. 1999. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* **103** (6), 879–887.
29. Coughlin S.R. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 11023–11027.
30. Brass L.F., Vassallo R.R. Jr., Belmonte E., Ahuja M., Cichowski K., Hoxie J.A. 1992. Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J. Biol. Chem.* **267**, 13795–13798.
31. Andersen H., Greenberg D.L., Fujikawa K., Xu W., Chung D.W., Davie E.W. 1999. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of

- thrombin-stimulated platelet procoagulant activity (clotting, phospholipid, annexin V, calcium flux). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 11189–11193.
32. Heuberger D.M., Schuepbach R.A. 2019. Protease-activated receptors (PARs): Mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis J.* **17**, 4.
33. Gandhi P.S., Chen Z., Appelbaum E., Zapata F., Di Cera E. 2011. Structural basis of thrombin–protease-activated receptor interactions. *Life*. **63** (6), 375–382.
34. Nieman M.T., Schmaier A.H. 2007. Interaction of thrombin with PAR1 and PAR4 at the thrombin cleavage site. *Biochemistry*. **46** (29), 8603–8610.
35. Vu T.K., Wheaton V.I., Hung D.T., Charo I., Coughlin S.R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. 1991. *Nature*. **353**, 674–677.
36. Xu W.F., Andersen H., Whitmore T.E., Presnell S.R., Yee D.P., Ching A., Gilbert T., Davie E.W., Foster D.C. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 6642–6646.
37. Coughlin S.R. 2005. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1800–1814.
38. Boknäs N., Faxälv L., Centellas D.S., Wallstedt M., Ramström S., Grenegård M., Lindahl T.L. 2014. Thrombin-induced platelet activation via PAR4: Pivotal role for exosite II. *Thromb. Haemost.* **112**, 558–565.
39. Covic L., Gresser A.L., Kuliopulos A. 2000. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*. **39**, 5458–5467.
40. Ramakrishnan V., DeGuzman F., Bao M., Hall S.W., Leung L.L., Phillips D.R. 2001. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98** (4), 1823–1828.
41. Jamieson G.A., Okumura T. 1978. Reduced thrombin binding and aggregation in Bernard–Soulier platelets. *J. Clin. Invest.* **61**, 861–864.
42. Milligan G., Smith N.J. 2007. Allosteric modulation of heterodimeric G-protein coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 615–620.
43. Arachiche A., Mumaw M.M., de la Fuente M., Nieman M.T. 2013. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by α -thrombin. *J. Biol. Chem.* **288** (45), 32553–32562.
44. Ozaki Y., Suzuki-Inoue K., Inoue O. 2013. Platelet receptors activated via multimerization: Glycoprotein VI, GPIb α -IX-V, and CLEC-2. *J. Thromb. Haemost.* **11** (Suppl. 1), 330–339.
45. De Candia E., Hall S.W., Rutella S., Landolfi R., Andrews R.K., De Cristofaro R. 2001. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J. Biol. Chem.* **276** (7), 4692–4698.
46. Estevez B., Kim K., Delaney M.K., Stojanovic-Terpo A., Shen B., Ruan C., Cho J., Ruggeri Z.M., Du X. 2016. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*. **127** (5), 626–636.
47. Yaping Z., Samuel M.E., Cheng Z., Xiaoping D. 2022. Signaling mechanisms of the platelet glycoprotein Ib–IX complex. *Platelets*. **33** (6), 823–832.
48. Nieman M.T. 2016. Protease-activated receptors in hemostasis. *Blood*. **128** (2), 169–177.
49. Shrimpton C.N., Borthakur G., Larrucea S., Cruz M.A., Dong J.F., López J.A. 2002. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib–IX–V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation. *J. Exp. Med.* **196** (8), 1057–1066.
50. Komatsuya K., Kaneko K., Kasahara K. 2020. Function of platelet glycosphingolipid microdomains/lipid rafts. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (15), 5539–5556.
51. Megalinskiy A.D., Loginova V.M., Shibeko A.M., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A., Nechipurenko D.Y. 2022. The role of immobilized phospholipids in the initiation of blood coagulation under flow conditions. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A, Membr. Cell Biol.* **16**, 38–48.

Physicochemical Features of Thrombin Binding to Platelet Membrane

© 2024 г. R. R. Kerimov¹, D. Yu. Nechipurenko^{1–3, *}, M. A. Panteleev^{1–3}

¹*Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia*

²*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

³*National Medical Research Center of Children's Hematology, Oncology and Immunology named after D. Rogachev, Moscow, 117997 Russia*

*e-mail: ne4ipur@gmail.com

Thrombin is a key enzyme of the blood coagulation system, which has been actively studied since the beginning of the last century. The formation of thrombin from prothrombin in the area of vessel injury leads not only to the formation of fibrin – an important structural component of the hemostatic clot – but also to the activation of platelets, endothelium and immune system cells. The binding of thrombin to the platelet surface is thought to play a critical role in the process of platelet activation and may also ensure the maintenance of a high concentration of thrombin within the thrombus due to the concentration of protease on the platelet surface. To date, all major thrombin receptors on platelets have been thoroughly characterized: through various experimental methods, the physicochemical parameters of the corresponding intermolecular interactions have been established. Since the interaction of thrombin with platelets leads to their activation, which includes changes in the number of receptors as a result of granule secretion, the interpretation of the observed kinetic binding curves faces a number of difficulties. It is known that some receptors as a result of platelet activation are able to redistribute on the membrane and form dimers and clusters, which makes the kinetics of thrombin binding to platelets an extremely complex process depending on many factors, such as activator concentrations, platelet state, and other local parameters of the system. This review aims to describe the current understanding of the interaction of thrombin with the platelet membrane and to outline important unresolved issues in this area of research. The survey provides not only information on structural and kinetic features of thrombin binding to individual platelet membrane proteins, but also analyzes the relationship between the relevant interaction parameters and previously obtained data on the integral kinetics of protease binding to the platelet surface.

Keywords: thrombin, platelets, glycoproteins, PAR receptors, binding constant, membrane complex