

## Программируемая клеточная смерть тромбоцитов при их сверхактивации

Е.О. Артеменко<sup>1,2</sup>, А.Н. Свешникова<sup>1,2</sup>, М.А. Пантелеев<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

**Контакты:** Михаил Александрович Пантелеев [mapanteleev@yandex.ru](mailto:mapanteleev@yandex.ru)

Программируемая клеточная смерть — это гибель клетки по строго определенному механизму с возможностями воздействия на него и, за счет этого, управления самой гибелью, в том числе с помощью фармакологических препаратов. Сейчас выделяют довольно много различных типов клеточной смерти, однако только 2 основных из них на данный момент достаточно полно охарактеризованы: апоптоз и программируемый некроз. Тромбоциты являются одним из ключевых участников процесса свертывания крови в организме. При их критической агонист-индуцируемой активации происходит появление группы тромбоцитов, экспонирующих фосфатидилсерин (ФС), с характерными признаками программируемой клеточной смерти. Такая сверхактивация тромбоцитов, сопровождающаяся последующей гибелью клетки, является не до конца охарактеризованным клеточным процессом. Мы рассматриваем сверхактивацию тромбоцитов в сравнении с основными известными типами гибели клетки, поскольку группа экспонирующих ФС тромбоцитов имеет большое значение для процессов свертывания крови, на несколько порядков ускоряя реакции плазменного свертывания, и важна для формирования тромба.

**Ключевые слова:** программируемая клеточная смерть, свертывание крови, сверхактивация тромбоцитов, фосфатидилсерин

### Programmed cell death of platelets during their overactivation

E.O. Artemenko<sup>1,2</sup>, A.N. Sveshnikova<sup>1,2</sup>, M.A. Panteleev<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Centre for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>2</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

<sup>3</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University

Programmed cell death — it is a cell death by a strictly defined mechanism with possible impact on him and, due to this, the death control, including using of pharmacological agents. Currently known many different types of cell death, but only two basic types of cell death are adequately characterized: apoptosis and programmed necrosis. Platelets are one of the key components of the blood clotting process. A group of platelets, exposing phosphatidylserine (PS), with the programmed cell death characteristics appears at their critical agonist-induced activation. This overactivation of platelets accompanied by subsequent cell death is not completely characterized cellular processes. We view the platelets overactivation in comparison with the main known types of cell death because the platelets group exposing PS is important for blood coagulation processes, accelerating by several orders the plasma coagulation, and important for the thrombus formation.

**Key words:** programmed cell death, coagulation, overactivation of platelets, phosphatidylserine

#### Программируемая клеточная гибель

В организме в норме физиологическая гибель клеток контролируется специальным генетически запрограммированным механизмом. Целью этого процесса является уничтожение нежелательных клеток, что реализуется в следующих 3 случаях [1]: 1) при развитии организма и для поддержания его гомеостаза; 2) в качестве защитного механизма; 3) в процессе старения. В многоклеточных организмах такую запрограммированную гибель с характерными морфологическими изменениями называют термином «апоптоз». Долгое время считали, что апоптоз является единственным программируемым типом клеточной смерти, однако сейчас номенклатурный комитет по клеточной смерти (NCCD, Nomenclature Committee on Cell Death) выделяет более десятка типов регулируемой клеточной гибели, ориентируясь уже не столько на их морфологические признаки, сколько на реализующиеся моле-

кулярные механизмы [2]. На настоящий момент описаны типы клеточной гибели, такие как: апоптоз (тип I); клеточная смерть, ассоциированная с аутофагией (тип II); некроз или онкоз (тип III), аноикоз, митотическая катастрофа, эксайтотоксичность, валлеровская дегенерация и ороговение кожи [3]. Насколько все эти процессы клеточной смерти являются запрограммированными и регулируемые с помощью фармакологических препаратов, на данный момент остается неясным. Однако наиболее изученными и потенциально регулируемые на сегодня остаются 2 основных типа клеточной гибели — это апоптоз и программируемый некроз.

#### Апоптоз

Апоптотические клетки имеют типичные, хорошо известные морфологические изменения, такие как пузырение плазматической мембраны, конденсация хро-

матина, кариорексис и формирование апоптотических телец [4]. Существует несколько основных критериев, которые являются характерными для апоптотического типа гибели: отличная от некроза кинетика экспозиции фосфатидилсерина (ФС) на внешнем слое мембраны, отличные от некроза изменения в проницаемости митохондриальной мембраны, высвобождение митохондриальных белков в межмембранное пространство, зависимость гибели клетки от активации специфических цистеиновых протеиназ каспаз и специфическое ферментативное расщепление ДНК клетки [5]. Идентификация этих морфологических и биохимических признаков при наблюдаемой гибели клетки позволяет отличить апоптоз от некроза и других типов клеточной смерти.

С точки зрения биохимии апоптоз – это совокупность типов клеточной смерти, объединенных морфологическими признаками и зависящих от специальных ферментов – каспаз [6]. Апоптоз может запускаться как в результате внешнего сигнала (это так называемый апоптоз, запускаемый «снаружи» клетки через специальные сигнальные рецепторы, которые обычно называют «рецепторами смерти»), так и изнутри клетки (апоптоз, запускаемый по «внутреннему пути», который связан с угнетением функционирования митохондрий).

Апоптоз по «внешнему пути» происходит при воздействии на клетки таких стимулов, как фактор некроза опухолей альфа (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ ), TNF-подобный апоптоз-индуцирующий лиганд (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) и др. [7]. Данные лиганды связываются со своими специфическими рецепторами на мембране клетки (например, TNF- $\alpha$  связывается с соответствующим рецептором TNF-R1), что приводит к взаимодействию различных адапторных молекул с цитоплазматической частью соответствующего рецептора и запуску дальнейшего внутриклеточного сигнала, одним из ключевых элементов которого является активация каспаз [8].

Апоптоз по «внутреннему пути» может вызываться рядом различных воздействий на клетку и регулируется через митохондрии. Вследствие угнетения функций митохондрий, которое может происходить в результате различных процессов, протекающих в митохондриях (например, при перепроизводстве активных форм кислорода), происходит ряд сигнальных событий, которые в итоге приводят к открытию митохондриальных пор. В результате этого происходит выход ряда специальных регулирующих апоптоз белков из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль клетки, в частности цитохрома *c*, что приводит к активации каспаз [9] и запускает последующий процесс апоптотической гибели клетки.

Пути внутриклеточной сигнализации после активации каспаз и до появления ФС на мембране клетки и других протекающих морфологических изменений пока мало изучены.

### *Программируемый некроз*

В нормально функционирующем организме большинство клеток гибнут по апоптотическому пути, однако гибель клеток может происходить и по другим механизмам, и на 2-м месте по распространенности стоит некротический путь. Он характеризуется быстрым разбуханием клетки, результатом подобного разбухания является разрыв плазматической мембраны и нарушение целостности внутриклеточных органелл [10]. Некроз давно был охарактеризован как результат крайнего физико-химического стрессорного воздействия на клетку, такого как нагревание, осмотический шок, механический стресс, замораживание и оттаивание, высокие концентрации перекиси водорода и др. При таких условиях гибель клетки происходит очень быстро благодаря прямому грубому воздействию стрессорных факторов, и поэтому этот процесс гибели клеток был описан как случайный и неконтролируемый [5]. Однако позднее было показано, что многие различные клеточные стимулы (TNF- $\alpha$ , интерферон- $\gamma$ , истощение аденозинтрифосфата, ишемия) способны вызывать некротический процесс, который определенными своими процессами и сигнальными событиями напоминает истинную программу клеточной гибели и который можно контролировать [11].

В отличие от апоптоза в программируемом некрозе (некроптозе) не участвуют цистеиновые протеиназы каспазы. В отсутствие активации каспаз гибель клетки может протекать по механизму программируемого некроза [12]. Программируемый некроз также запускается в результате воздействия ряда физиологических лигандов на клеточные рецепторы, например действия TNF- $\alpha$  на TNF-R1. Основными регуляторами клеточной гибели в случае программируемого некроза являются киназы семейства RIP (receptor interacting protein), которые, помимо некроптоза, также могут быть вовлечены и в регуляцию апоптотического типа гибели [12]. После активации соответствующего рецептора его лигандом специальный «домен смерти» RIP1-киназы связывается с соответствующим цитоплазматическим доменом активированного «рецептора смерти» (например, TNF-R1) в результате чего происходит фосфорилирование RIP1-киназы и запускается программа некроптоза [13].

### *Клеточная смерть, ассоциированная с аутофагией*

Значительный интерес сейчас привлекает еще один тип клеточной смерти: клеточная гибель, ассоциированная с аутофагией. Клетки, подвергающиеся клеточной гибели, ассоциированной с аутофагией, характеризуются присутствием характерных для аутофагии специфических мембранных вакуолей. В то время как апоптоз отвечает за физиологическую гибель клеток в организме, аутофагия является одним из важнейших механизмов, ответственных за выживание клеток. Клеточная смерть, ассоциированная с аутофагией, активируется в клетках, испытывающих отсутствие

питательных веществ или ростовых факторов. Когда клеточный стресс является продолжительным, то клеточная смерть может реализоваться по механизму как самой ассоциированной с аутофагией гибели, так может сдвинуться и в сторону апоптотического или некротического типа гибели [14]. Пути регуляции гибели, ассоциированной с аутофагией, еще недостаточно изучены, однако известно, что мутации в генах семейства Atg подавляют аутофагию и связанную с ней клеточную смерть [15], что позволяет в дальнейшем искать пути регуляции данного типа клеточной смерти.

### **Прокоагулянтные тромбоциты и их гибель при сверхактивации**

Тромбоциты – безъядерные клетки крови, основной функцией которых является остановка кровотечения, однако тромбоциты также участвуют в иммунном ответе организма [16] и процессах регенерации тканей [17]. Тромбоциты представляют собой самые мелкие форменные элементы крови, имеющие форму диска в неактивированном состоянии. Физиологическая гибель тромбоцитов в организме происходит в 2 основных случаях: при удалении тромбоцитов из кровотока в процессе обновления клеток крови и при их сверхактивации, когда формируются прокоагулянтные тромбоциты, играющие важную роль в процессе свертывания крови. Оба процесса имеют особенности, характерные для программируемой клеточной гибели.

В последние годы изучение механизмов активации тромбоцитов ведется очень активно в связи с тем, что система активации тромбоцитов, которая играет важнейшую роль в гемостазе и тромбозе, изучена недостаточно. Довольно долго считали, что тромбоциты при формировании тромба из неактивированного состояния (в котором они циркулируют в кровотоке) переходят в единственное активированное состояние. Однако в 2002 г. был предложен пересмотр всей концепции активации тромбоцитов в связи с обнаружением активированных тромбоцитов, имеющих высокую концентрацию ФС на внешнем слое мембраны, в противоположность остальным, где количество этого фосфолипида после активации почти не изменяется [18]. Такие тромбоциты, имеющие на своей внешней поверхности мембраны ФС, были потом названы прокоагулянтными, поскольку было показано, что присутствие ФС на мембранах активированных тромбоцитов ускоряет важнейшие реакции свертывания на несколько порядков [19] и, таким образом, является крайне важным для гемостаза. Природа прокоагулянтных тромбоцитов стала предметом многочисленных исследований [20], однако механизмы появления ФС на внешнем слое плазматической мембраны изучены слабо. Прокоагулянтные тромбоциты морфологически представляют собой клетки округлой формы, что предположительно связано с кардинальной перестройкой их цитоскелета. Такие тромбоциты характеризуются рядом свойств, которые их принципно

отличают от неактивированных и активированных непрокоагулянтных тромбоцитов: высокая концентрация кальция в цитозоле клетки [21], отсутствие активной формы интегрина  $\alpha_{IIb}\beta_3$  на поверхности таких тромбоцитов [22], неспособность связывать фибриноген [23], неспособность к агрегации [23] и др. Экспозиция ФС на мембране активированного тромбоцита сопровождается потерей целостности плазматической мембраны тромбоцита и гибелью клетки, механизмы которых до сих пор неясны.

### **К какому типу относится смерть тромбоцитов?**

На сегодняшний день нет единого мнения по поводу типа клеточной гибели, который реализуется при сверхактивации тромбоцитов. Долгое время считали, что гибель тромбоцита при его сверхактивации протекает по апоптотическому механизму, поскольку некоторые исследования предполагали участие каспаз – цистеиновых протеиназ, играющих ключевую роль в апоптозе, – в формировании таких тромбоцитов [24]. Однако в последнее время появляется все больше данных, что гибель сверхактивированных тромбоцитов не является апоптозом, а протекает по некротическому типу [25].

Проведем сравнение основных характерных признаков, присущих апоптозу и некрозу: 1) апоптоз является длительным процессом и занимает порядка нескольких часов, в то время как некроз протекает за считанные минуты; 2) апоптоз контролируется активацией цистеиновых протеиназ каспаз, в то время как регулируемый некроз контролируется RIP-киназой; 3) при апоптозе происходит формирование апоптотических телец, в то время как при некрозе – нет; 4) апоптоз зависит от кальциевой сигнализации [26], но не сопровождается значительным увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция, в то время как некроз ассоциирован с резким увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция [27]; 5) активация кальпаина является характерным признаком некроза, хотя есть данные о том, что кальпаин может быть задействован и в апоптозе [28].

Рассмотрим характерные особенности, присущие сверхактивации тромбоцитов и формированию ими прокоагулянтной субпопуляции: 1) формирование прокоагулянтной субпопуляции протекает очень быстро – за несколько минут; 2) появление ФС на внешней мембране тромбоцитов, по данным последних исследований, является независимым от активации каспаз; 3) экспозиция ФС сопровождается отшнуровыванием микровезикул от поверхности прокоагулянтных тромбоцитов; 4) экспозиция ФС сопровождается деградацией некоторых цитоскелетных белков; 5) прокоагулянтная субпопуляция активированных тромбоцитов характеризуется высоким содержанием ионов внутриклеточного кальция; 6) формирование прокоагулянтной субпопуляции сопряжено с активацией кальпаи-

на, который контролирует деградацию цитоскелетных белков и образование микровезикул.

Таким образом, анализ характерных признаков сверхактивации тромбоцита приводит к тому, что гибель тромбоцита, сопровождающую его сверхактивацию, нельзя отнести ни к апоптозу, ни к программируемому некрозу, поскольку она имеет ряд признаков, характерных как для апоптоза, так и для некроза. Однако удаление тромбоцитов из кровотока осуществляется классическим апоптотическим путем [29], кроме того, ряд исследований указывает на то, что при хранении тромбоцитов в виде тромбоконцентратов также происходит их постепенная гибель по механизму апоптоза [30].

### Заключение

Все эти данные позволяют предположить, что в тромбоцитах есть не только одна программа клеточной гибели, реализующаяся при апоптозе в ходе старения или хранения *in vitro*, но и другая, которая реализуется

при их переходе в прокоагулянтное сверхактивированное состояние. В отличие от других видов клеточной смерти, ее задачей является не уничтожение клетки само по себе, а быстрый перевод ее в качественно новое состояние, в котором она обладает уникальными гемостазиологическими качествами. Эта программа использует ряд механизмов, характерных для клеточной гибели, но является нестандартной, не относимой однозначно к классическому апоптозу или некрозу. Выявление механизмов, лежащих в ее основе, имеет фундаментальное значение для понимания феномена клеточной смерти в целом и может привести к разработке новых терапевтических стратегий и антитромботических препаратов.

*Работа авторов поддержана стипендией Президента РФ СП-6064.2013.4, грантом РФФИ № 13-04-00401-а и программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».*

## ЛИТЕРАТУРА

- Vaux D.L., Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(6):2239–44.
- Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012;19(1):107–20.
- Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P. et al.; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005;12 Suppl 2:1463–7.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239–57.
- Krysko D.V., Vanden Berghe T., D'Herde K., Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008;44(3):205–21.
- Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231–41.
- Han S.I., Kim Y.S., Kim T.H. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep* 2008;41(1):1–10.
- Gross A., Yin X.M., Wang K. et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999;274(2):1156–63.
- Liu X., Kim C.N., Yang J. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 1996;86(1):147–57.
- Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146(1):3–15.
- Vanden Berghe T., Declercq W., Vandenabeele P. NADPH oxidases: new players in TNF-induced necrotic cell death. *Mol Cell* 2007;26(6):769–71.
- Declercq W., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* 2009;138(2):229–32.
- Zhang D., Lin J., Han J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol* 2010;7(4):243–9.
- Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(9):741–52.
- Denton D., Nicolson S., Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* 2012;19(1):87–95.
- Duerschmied D., Bode C., Ahrens I. Immune functions of platelets. *Thromb Haemost* 2014;112(4):678–91.
- Kaltalioglu K., Coskun-Cevher S. A bioactive molecule in a complex wound healing process: platelet-derived growth factor. *Int J Dermatol* 2014 Oct 14. [Epub ahead of print].
- Dale G.L., Friese P., Batar P. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature* 2002;415(6868):175–9.
- Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R. et al. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990;76(1):1–16.
- Dale G.L. Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J Thromb Haemost* 2005;3(10):2185–92.
- 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. *Br J Haematol* 2012;157(1):105–15.
- Mattheij N.J., Gilio K., van Kruchten R. et al. Dual mechanism of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem* 2013;288(19):13325–36.
- Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N. et al. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys J* 2012;102(10):2261–9.
- Shcherbina A., Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood* 1999;93(12):4222–31.
- Jackson S.P., Schoenwaelder S.M. Procoagulant platelets: are they necrotic? *Blood* 2010;116(12):2011–8.
- Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(7):552–65.
- Rasola A., Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 2011;50(3):222–33.
- Wang K.K. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000;23(1):20–6.
- Mason K.D., Carpinelli M.R., Fletcher J.I. et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 2007;128(6):1173–86.
- Shiri R., Yari F., Ahmadinejad M. et al. The caspase-3 inhibitor (peptide Z-DEVD-FMK) affects the survival and function of platelets in platelet concentrate during storage. *Blood Res* 2014;49(1):49–53.