

Тиоловые изомеразы – возможная мишень для борьбы с тромбозами

Ирина Владимировна Грибкова^{1*}, Мария Вафаевна Давыдовская^{1,2}

¹ Центр клинических исследований и оценки медицинских технологий, Департамент здравоохранения г. Москвы. Россия, 121096, Москва, ул. Минская, 12 корп. 2

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Несмотря на то, что растет количество анти тромботических агентов с подтвержденной клинической эффективностью, тромбозы остаются ведущей причиной смертности в развитых странах. Поэтому существует необходимость в разработке новых видов терапии с использованием альтернативных мишеней компонентов свертывания крови на основе новых знаний о механизмах тромбообразования. Благодаря новым методам и подходам к исследованию этих механизмов в последнее время неожиданно было открыто, что в процессы тромбообразования вовлечены внеклеточные тиоловые изомеразы. Протеин дисульфид изомераза (ПДИ) выделяется из тромбоцитов и эндотелиальных клеток после активации и локализуется на поверхности мембраны. Учитывая роль ПДИ в регулировании как агрегации тромбоцитов, так и генерации фибрина *in vivo*, обсуждается возможность использования ПДИ в качестве анти тромботической мишени. Тогда как большинство существующих анти тромботических средств направлены либо против агрегации тромбоцитов, либо против активации плазменного свертывания, ингибиторы ПДИ имеют потенциал для предупреждения тромбозов в условиях патологической активации обоих путей, вовлеченных в сложные тромботические заболевания, такие как инфаркт миокарда и тромбозы, связанные с онкологическими заболеваниями. В обзоре рассмотрены последние данные о роли ПДИ в формировании тромба, основные мишени и механизмы действия, а также ингибиторы ПДИ как кандидаты на новый класс анти тромботической терапии с антиагрегантной и антикоагулянтной активностью для предотвращения тромбообразования в организме человека.

Ключевые слова: тромбозы, анти тромботические средства, тиоловые изомеразы

Для цитирования: Грибкова И.В., Давыдовская М.В. Тиоловые изомеразы – возможная мишень для борьбы с тромбозами. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2017;13(6):835-840. DOI: 10.20996/1819-6446-2017-13-6-835-840

Thiol Isomerases – a Possible Target for Thrombosis Control

Irina V. Gribkova^{1*}, Marya V. Davydovskaya^{1,2}

¹ Clinical Trials and Healthcare Technology Assessment Centre, Moscow Department of Healthcare Minskaya ul. 12-2, Moscow, 121096 Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University Ostrovitianova ul. 1, Moscow, 117997 Russia

While there are an increasing number of antithrombotic agents with demonstrated clinical efficacy, thrombosis remains the leading cause of mortality in developed countries. Therefore, there is a need further development of therapies targeting alternative components of the blood clotting mechanism, based on new knowledge about the mechanisms of thrombus formation. Recently, among several unexpected findings of new methods and approaches to the study of these mechanisms it was discovered that protein disulfide isomerase (PDI) serves an essential role in the processes of thrombus formation. PDI is secreted by platelets and endothelial cells following activation and localizes to the membrane surface. Given the role of PDI in regulating both platelet aggregation and fibrin generation *in vivo*, the possibility of using PDI as an antithrombotic target is discussed. While most antithrombotic target either platelet or coagulation activation, PDI inhibitors have the potential to prevent thrombosis in conditions with pathologic activation of both pathways as implicated in complex thrombotic disorders such as myocardial infarction and cancer associated thrombosis. This review considers what is known about the role of PDI in thrombus formation, main targets and mechanisms of action, as well as PDI inhibitors, as candidates for a new class of antithrombotic agents with both antiplatelet and anticoagulant properties to prevent thrombosis in humans.

Keywords: thrombosis, antithrombotic agents, thiol isomerases.

For citation: Gribkova I.V., Davydovskaya M.V. Thiol Isomerases – a Possible Target for Thrombosis Control. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology* 2017;13(6):835-840. (In Russ). DOI: 10.20996/1819-6446-2017-13-6-835-840

*Corresponding Author (Автор, ответственный за переписку): igribkova@yandex.ru

Received / Поступила: 26.07.2017

Accepted / Принята в печать: 07.08.2017

Введение

Исследования, выполненные в последние 50 лет, убедительно продемонстрировали, что тромбоз является трагическим финалом большинства заболеваний, в основе которых лежит патология сосудистой стенки [1]. Тромбоз, в результате которого развиваются инфаркт миокарда и инсульт, а также венозная тромбоэмболия, тромбоз глубоких вен и эмболия легких остаются наиболее распространенными причинами смертности. С физиологической точки зрения тромб предназначен для закрытия повреждения сосудистой стенки и формируется независимо от причины, вызвавшей повреждение. Механизмы тромбообразования связаны с активацией тромбоцитов и каскада коагуляции, в результате чего формируется тромб, закрывающий дефект сосудистой стенки.

Молекулярные и клеточные основы системы гемостаза и тромбоза в основном изучались путем очистки компонентов, в том числе, белков и клеток, с последующей оценкой их действия в системах, состав которых был смоделирован самим экспериментатором и точно определен. Каскад свертывания крови был проанализирован *in vitro* с использованием для инициации этого процесса экзогенного тканевого фактора для активации внешнего пути, или каолина (или аналогичного вещества) – для активации внутреннего пути [2]. Активация тромбоцитов изучалась *in vitro* путем добавления различных агонистов, включая тромбин, коллаген, адреналин, арахидоновую кислоту, АДФ и др. В последнее время для изучения тромбообразования и оценки молекулярных и клеточных механизмов развития тромбозов все большее применение получают такие инструменты, как генетически модифицированные мыши и прижизненная микроскопия. Изучение тромбообразования в целом животном со всеми присутствующими компонентами привнесло новый взгляд на процесс формирования тромба [3]. Пожалуй, самым неожиданным открытием стало вовлечение внеклеточных тиоловых изомераз в инициацию тромбообразования [4]. Тиоловые изомеразы наиболее известны из-за своей роли в окислительном фолдинге секреторных белков в эндоплазматическом ретикулуме, но значение этих тиоредоксин-подобных белков как в секреторном пути, так и за его пределами постоянно расширяется.

Мониторинг в реальном времени тромбообразования в живых мышцах с помощью прижизненной микроскопии показал, что тиоловые изомеразы быстро высвобождаются после повреждения сосудов и накапливаются на участке травмы [4]. Появление тиоловых изомераз предшествует накоплению тромбоцитов. Последующие исследования показали, что тиоловые изомеразы, которые быстро высвобождаются после повреждения сосудов, секреторируются

эндотелием, а накопление тиоловых изомераз со временем связано с их высвобождением из тромбоцитов [5]. Ингибирование тиоловых изомераз аннулирует образование тромба *in vivo*, при этом блокируются формирование тромбоцитарного тромба и генерация фибрина [4, 6-8].

Среди большого семейства из двадцати тиоловых изомераз к формированию тромба *in vivo* причастны протеин дисульфид изомеразы (ПДИ) [4, 7, 8] и ERp57 [9-13]. Интегрины $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ тромбоцитов и $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ эндотелия играют ключевую роль в этом процессе и напрямую взаимодействуют с ПДИ, ERp5 и ERp57 [13].

Образование тромба запускается через повреждение сосудов, а тиоловые изомеразы, выделяющиеся из поврежденных клеток, являются иницирующим сигналом.

Механизмы, с помощью которых тиоловые изомеразы способствуют активации тромбоцитов и генерации фибрина, до сих пор не выяснены. Пока непонятно, каковы внеклеточные субстраты и функции тиоловых изомераз, и почему для формирования тромба требуются разные тиоловые изомеразы. Однако тот факт, что тиоловые изомеразы играют важную роль в формировании тромба, привел к тому, что антагонисты протеин дисульфид изомеразы в настоящее время разрабатываются как анти тромботические средства. Открытие того, что содержащийся в обычной пище флавоноид кверцетин (кверцетин-3-рутинозид) ингибировал протеин дисульфид изомеразу и блокировал тромбообразование в доклинических исследованиях, заложило основу для клинических испытаний антагонистов протеин дисульфид изомеразы как анти тромботических средств [15].

Далее в обзоре будет подробно рассмотрена ПДИ. Похожие результаты были получены также и для ERp57 и ERp5 (подробную информацию можно получить из обзоров [16, 17]).

Протеин дисульфид изомеразы

Протеин дисульфид изомеразы являются типичным членом семейства тиоловых изомераз, роль которых, как первоначально считали, состоит в модификации дисульфидных связей в ходе синтеза белка и в фолдинге белков [18, 19]. Хотя многие из тиоловых изомераз были очищены и изучены в лабораторных условиях, уникальные функции и эндогенные субстраты большинства белков этого семейства остаются неясными [20, 21]. ПДИ является наиболее изученным тиоредоксин-подобным белком. Это полипептид с молекулярным весом 57000 Да. ПДИ изобилует в эндоплазматическом ретикулуме ядродержащих клеток. Она также находится в мелких секреторных гранулах эндотелиальных клеток и т-гранулах тромбоцитов [5, 22], а также и во внеклеточном простран-

стве [23]. ПДИ принимает участие в реакциях окисления-восстановления дисульфидных связей, реакциях изомеризации, обладает шаперонной активностью. ПДИ могут выступать в качестве агентов денитрозилирования, удаляя оксид азота из субстрата белка, или как транснаитрозиляторы, перенося оксид азота в клетках [24,25]. Эти разные свойства зависят от окислительно-восстановительной среды, pH, аллостерических модуляторов и характеристик субстрата.

Запас ПДИ может быть освобожден из тромбоцитов и эндотелиальных клеток при их активации. Только что высвобожденная ПДИ связывает $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ на поверхности тромбоцитов и $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ на поверхности эндотелиальных клеток [13]. В модели на живой мыши показано, что появление ПДИ на поверхности эндотелия, и впоследствии – на поверхности связанных тромбоцитов следует сразу после лазерной травмы, после чего следует стремительная экспрессия тканевого фактора [4, 5]. Эти события происходят в присутствии кальция [5]. Также было показано *in vitro*, что ПДИ быстро выделяется из тромбоцитов при стимуляции тромбоцитов агонистами [26].

Роль протеин дисульфид изомеразы в образовании тромбов

О выделении ПДИ из тромбоцитов и ее присутствии на тромбоцитарной поверхности мембраны известно уже в течение нескольких десятилетий [26]. Также было показано, что ингибиторы тиоловых изомераз изменяют агрегацию тромбоцитов [27] и взаимодействие фибриногена с интегрином $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ тромбоцитов [28] *in vitro*. Однако биологическое значение этих ранних наблюдений не было оценено до тех пор, пока в модели прижизненного тромбообразования у мыши не было продемонстрировано, что ингибирование ПДИ приводит к торможению образования тромба [4, 29]. В одном из этих исследований наблюдали процесс тромбообразования в артериоле путем прижизненной микроскопии, и была показана секреция ПДИ в крови после лазер-индуцированного повреждения сосудов. Ингибирование ПДИ блокирующим антителом полностью останавливало образование тромбоцитарных тромбов и генерацию фибрина. В другом исследовании образование тромбов было вызвано перевязкой сосуда. Образование фибрина, которое визуализировалось с помощью прижизненной микроскопии, было значительно ослаблено ингибирующим антителом к ПДИ [29]. Роль ПДИ в тромбообразовании также изучалась в модели тромбоза, инициированного хлоридом железа. ПДИ, необнаруживаемые в целостной артериоле, накапливались в месте повреждения. Экспрессия ПДИ при травме артериолы достигала пика примерно через 5 мин, а затем медленно уменьшалась. Чтобы доказать,

что ПДИ непосредственно играет роль в FeCl_3 -индуцированном тромбозе, изучали влияние ингибирующего анти-ПДИ-антитела RL90 на осаждение тромбоцитов после FeCl_3 -индуцированной травмы. Введение этих антител мышам задерживало появление начального тромбоцитарного тромба и заметно снижало генерации фибрина. Эти результаты указывают на то, что во время формирования тромба в модели FeCl_3 -индуцированного тромбоза ПДИ важны как для аккумуляции тромбоцитов, так и для генерации фибрина [17].

Таким образом, исследования с использованием различных моделей повреждения сосудов показали, что образование тромбоцитарных тромбов и генерация фибрина зависят от наличия ПДИ.

Механизмы и мишени, с помощью которых протеин дисульфид изомераза регулирует процесс образования тромбов

Модели на животных ясно демонстрируют, что ингибирование ПДИ уменьшает образование тромбоцитарных тромбов и генерацию фибрина. Однако конкретные мишени и механизмы действия, посредством которых ПДИ регулирует процесс тромбообразования, до конца не ясны и активно обсуждаются.

ПДИ, по-видимому, контролирует начало образования тромба, однако механизм этого действия в настоящее время неизвестен, хотя некоторые предварительные результаты получены. Показано, что ПДИ модулирует активность тканевого фактора, тем самым инициируя свертывание крови и, в конечном итоге, генерацию тромбина и формирование фибрина [30]. Генерация фибрина под действием тканевого фактора *in vivo* опосредуется связыванием факторов VIIa и X, образуя комплекс теназы, в результате чего образуется тромбин и происходит осаждение фибрина. Однако известно, что в норме в сосудистой системе тканевой фактор присутствует в неактивной или «скрытой» конформации [31, 32]. Описание Cys186-Cys209 дисульфидной связи в тканевом факторе, которая подвержена тиол-зависимым изменениям, вызвало предположение о возможности того, что ПДИ выступает как «главный переключатель», регулирующий тиол-зависимую генерацию фибрина и агрегацию тромбоцитов [30, 33]. Однако эта гипотеза не доказана, и остается весьма спорной спустя восемь лет после своего появления. Остается неясным, определяется ли взаимодействие между ПДИ и тканевым фактором непосредственным дисульфидным обменом, или опосредуется нижестоящими эффекторами, регулируемые ПДИ [34]. Например, Furlan-Freguia и соавт. продемонстрировали, что ингибирование ПДИ предотвращает выброс микроча-

стиц, несущих прокоагулянтный тканевой фактор через активацию рецептора P2X7 на макрофагах и гладкомышечных клетках [35].

Ингибирование ПДИ изменяет связывание факторов свертывания на отрицательно заряженной поверхности фосфолипидов и снижает генерацию тромбина независимым от тканевого фактора образом [36]. Также известно, что все коагуляционные факторы богаты дисульфидными доменами [37-41]. Следовательно, можно предположить возможность воздействия на них ПДИ, что, в свою очередь, будет влиять на состояние системы свертывания. Уже получены некоторые данные, подтверждающие эту гипотезу. Так, показано, что ПДИ модифицирует фактор XI (FXI), при этом FXI гораздо лучше активируется тромбином, а также фактором XII (FXII) и активированным фактором XI (FXIa) [42]. Авторы также сообщают, что пациенты с антифосфолипидным синдромом (АФС) содержат более высокий уровень такого модифицированного FXI, чем в норме. Это может быть одной из причин тромбозов при АФС. Также показано, что фактор XIII (FXIII; его А-цепь) обладает активностью ПДИ, и тем самым способствует адгезии и агрегации тромбоцитов [43, 44].

Показано, что ПДИ влияют на фибринолитическую активность, активируя плазминоген, но не напрямую через тканевой активатор плазминогена [45]. При этом отсутствует влияние на протеин С.

Более глубокое понимание механизмов и мишеней, с помощью которых ПДИ регулируют свертываемость, будет способствовать клиническим разработкам ингибиторов ПДИ в качестве анти тромботических средств.

Ингибиторы протеин дисульфид изомеразы в качестве анти тромботических средств

После открытия того факта, что ПДИ играет ключевую роль в формировании тромба *in vivo*, возникает вопрос о том, могут ли ингибиторы ПДИ служить новым классом анти тромботических средств. Несмотря на то, что растет количество анти тромботических агентов с подтвержденной клинической эффективностью, тромбозы остаются ведущей причиной смертности в развитых странах. Тогда как большинство анти тромботических средств направлены либо против агрегации тромбоцитов, либо против активации плазменного свертывания, ингибиторы ПДИ имеют потенциал для предупреждения тромбозов в условиях патологической активации обоих путей, вовлеченных при сложных тромботических состояниях, таких как инфаркт миокарда и тромбозы, связанные с онкологическими заболеваниями.

Вопрос о возможности ПДИ быть доступной мишенью для анти тромботической терапии не является про-

стым. ПДИ присутствует повсеместно и выполняет важную функцию сворачивания белков, о чем свидетельствует тот факт, что снижение экспрессии гена, кодирующего ПДИ, является летальным для дрожжей и клеточных линий млекопитающих [46]. Однако в образовании тромба играет роль внеклеточная ПДИ, являющаяся посредником сворачивания белков, а не находящаяся в эндоплазматическом ретикулуме. Следовательно, селективное ингибирование внеклеточной ПДИ является жизнеспособной стратегией. Кроме того, внеклеточная ПДИ может быть более подходящей мишенью для небольших молекул ингибиторов, чем ПДИ, которая сосредоточена в эндоплазматическом ретикулуме. Идея использования ПДИ в качестве мишени для целенаправленного блокирования тромбообразования казалась не очень привлекательной до тех пор, пока не выяснилось, что обычно употребляемые в пищу флавоноиды кверцетиновой группы, содержащиеся во фруктах, овощах, чае и зерне, ингибируют ПДИ.

Открытие того, что флавоноиды кверцетиновой группы блокируют функцию ПДИ, произошло во время скрининга высокой производительности для идентификации новых ингибиторов ПДИ. Кверцетин-3-рутинозид продемонстрировал наиболее сильную ингибирующую активность из 5000 молекул соединений с известными биологическими функциями [7].

При испытании на мышах показано, что кверцетин-3-рутинозид ингибирует тромбообразование при введении в концентрациях от 0,1 мг/кг и при концентрации 0,5 мг/кг полностью тормозит как аккумуляцию тромбоцитов, так и образование фибрина. Кверцетин-3-рутинозид также проявлял ингибиторную активность, будучи введен перорально, но для этого требовалась концентрация примерно в 100 раз больше [7]. Тем не менее, кверцетин-3-рутинозид являлся анти тромботическим агентом в концентрациях, которые безопасны для человека. Эти выводы дают предварительные подтверждения того, что ингибирование ПДИ с целью блокирования тромбообразования может быть безопасным [15].

Эффективность анти тромботического связывания ПДИ при употреблении флавоноида кверцетина до сих пор не установлена в клинических исследованиях. Однако данные, полученные в популяционных группах, показывают, что кверцетин и подобные ему флавоноиды существенно снижают смертность при сердечно-сосудистых заболеваниях. В исследовании пожилых мужчин в Нидерландах показано, что относительный риск смерти от коронарной болезни сердца был примерно на 70% ниже у тех, кто соблюдал диету с высоким содержанием флавоноидов по сравнению с теми, кто употреблял пищу с меньшим содержанием флавоноидов, даже с поправкой на возраст и другие

сердечно-сосудистые факторы риска [47]. Точно так же в большой группе примерно 100000 взрослых человек в США потребление флавоноидов связано со значительным 18% снижением сердечно-сосудистой смертности с поправкой на возраст, вес, курение, деятельность, использование гормонов и алкоголя [48]. Тенденция снижения смертности от сердечно-сосудистых заболеваний была прослежена в целом ряде крупных эпидемиологических исследований [49], при этом потребление флавоноидов было связано с уменьшением случаев нефатального и фатального инсульта [50, 51]. Данное положительное влияние кверцетина на сердечно-сосудистую систему вряд ли полностью опосредуется через ингибирование ПДИ, так как флавоноиды также известны, как антиоксиданты, и могут ингибировать активацию тромбоцитов через пути, независимые от ПДИ [52, 53].

Заключение

Тромбообразование – это очень сложный процесс, на который оказывает влияние множество факторов: различные типы клеток, белки плазмы, биологически активные медиаторы, активные формы кислорода и физические воздействия. В отличие от моделей *in vitro*, которые, как правило, сосредоточены только на нескольких параметрах, модели тромбообразования на животных включают в себя все эти компоненты. Хотя модели *in vivo* имеют свои ограничения, они дают информацию, которую нелегко получить в лабораторных исследованиях *in vitro*. Открытие того факта, что тиоловые изомеразы являются важными компонентами формирования тромба, является ярким примером необходимости изучения тромбообразования в условиях *in vivo*. В то время как исследования *in vitro* давали противоречивые результаты в отношении роли тиоловых изомераз в коагуляции, исследования *in vivo* обстоятельно доказали их важность как для агрегации тромбоцитов, так и для генерации фибрина после повреждения сосудов.

References / Литература

1. Panchenko E.P. Anticoagulant therapy in cardiology: past, present, future. *Kardiologija*. 2010;7:4-7. (In Russ.) [Панченко Е.П. Антикоагулянтная терапия в кардиологии: вчера, сегодня завтра. *Кардиология*. 2010;7:4-7.]
2. Furie B., Furie B.C. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;359:938-49. doi: 10.1056/NEJMra0801082
3. Falati S., Gross P., Merrill-Skoloff G., et al. Real-time *in vivo* imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med*. 2002;8:1175-81. doi:10.1038/nm782
4. Cho J., Furie B.C., Coughlin S.R., et al. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:1123-31. doi: 10.1172/JCI34134
5. Jasuja R., Furie B., Furie B.C. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation *in vivo*. *Blood*. 2010;116:4665-74. doi: 10.1182/blood-2010-04-278184
6. Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23:264-8. doi: 10.1016/j.tcm.2013.03.001

Доказательства того, что ингибирование тиоловых изомераз блокирует тромбообразование, являются достаточно сильными, и ингибитор ПДИ изокверцетин уже проходит клинические испытания. Количество других низкомолекулярных ингибиторов ПДИ существенно возросло в последние годы. Многие из них намного превосходят по силе и селективности те ингибиторы тиоловых изомераз, которые были использованы на протяжении десятилетий. Впрочем, являются ли эти недавно открытые антагонисты тиоловых изомераз кандидатами в лекарства, еще предстоит определить.

Пока мало известно о том, как тиоловые изомеразы опосредуют тромбоз, и какие тиоловые изомеразы представляют лучшие мишени для лекарственных препаратов. Способность этих ферментов взаимодействовать и изменять несколько субстратов свидетельствует о том, что они не действуют только в одном из компонентов свертывания крови или на один рецептор тромбоцитов, но, скорее, действуют как регуляторы, которые взаимодействуют со многими субстратами. Задача будет заключаться в определении тех фермент-субстратных взаимодействий, которые являются критическими для образования тромба. Возможно, эти исследования приведут к новым терапевтическим режимам для физических лиц, для которых стандартные подходы к лечению тромбозов либо недостаточны, либо неэффективны.

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Disclosures. All authors have not disclosed potential conflicts of interest regarding the content of this paper.

Благодарности

Авторы благодарят Академика РАН Савченко В.Г. и профессора Гурия Г.Т. за внимание к данной теме.

7. Jasuja R., Passam F.H., Kennedy D.R., et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest*. 2012;122:2104-13. doi: 10.1172/JCI61228
8. Kim K., Hahn E., Li J., et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood*. 2013;122:1052-61. doi: 10.1182/blood-2013-03-492504
9. Holbrook L.M., Sasikumar P., Stanley R.G., et al. The platelet-surface thiol isomerase enzyme ERp57 modulates platelet function. *J Thromb Haemost*. 2012;10:278-88. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04593.x
10. Wang L., Wu Y., Zhou J., et al. Platelet-derived ERp57 mediates platelet incorporation into a growing thrombus by regulation of the alphaIIb beta3 integrin. *Blood*. 2013;122:3642-50. doi: 10.1182/blood-2013-06-506691
11. Wu Y., Ahmad S.S., Zhou J., et al. The disulfide isomerase ERp57 mediates platelet aggregation, hemostasis, and thrombosis. *Blood*. 2012;119:1737-46. doi: 10.1182/blood-2011-06-360685
12. Zhou J., Wu Y., Wang L., et al. The disulfide isomerase ERp57 is required for fibrin deposition *in vivo*. *J Thromb Haemost*. 2014;12:1890-7. doi: 10.1111/jth.12709

13. Passam F.H., Lin L., Gopal S., et al. Both platelet- and endothelial cell-derived ERp5 support thrombus formation in a laser-induced mouse model of thrombosis. *Blood*. 2015;125:2276-85. doi: 10.1182/blood-2013-12-547208
14. Cho J., Kennedy D.R., Lin L., et al. Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation in vivo depends on the presence of beta3 integrins. *Blood*. 2012;120:647-655. doi: 10.1182/blood-2011-08-372532.
15. Flaumenhaft R., Furie B., Zwicker J.I. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:16-23. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303410
16. Furie B., Flaumenhaft R. Thiol Isomerases in Thrombus Formation. *Circulation Research*. 2014;114:1162-73. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301808
17. Schulman S., Bendapudi P., Sharda A., et al. Extracellular Thiol Isomerases and Their Role in Thrombus Formation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016;24:1-15. doi: 10.1089/ars.2015.6530
18. De Lorenzo F., Goldberger R.F., Steers E., et al. Purification and properties of an enzyme from beef liver which catalyzes sulfhydryl-disulfide interchange in proteins. *J Biol Chem*. 1966; 241:1562-7.
19. Goldberger R.F., Epstein C.J., Anfinsen C.B. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J Biol Chem*. 1963; 238:628-35.
20. Appenzeller-Herzog C., Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:535-48. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.11.010
21. Hatahet F., Ruddock L.W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:2807-50. doi: 10.1089/ARS.2009.2466
22. Thon J.N., Peters C.G., Machlus K.R., et al. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol*. 2012;198:58-74. doi: 10.1083/jcb.201111136
23. Chen K., Detwiler T.C., Essex D.W. Characterization of protein disulfide isomerase released from activated platelets. *Br J Haematol*. 1995; 90:425-31.
24. Sliskovic I., Raturi A., Mutus B. Characterization of the s-nitrosation activity of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*. 2005;280:8733-8741. doi: 10.1074/jbc.M408080200
25. Zai A., Rudd M.A., Scribner A.W., et al. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1999;103:393-9. doi: 10.1172/JCI4890
26. Chen K., Lin Y., Detwiler T.C. Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets. *Blood*. 1992;79:2226-8.
27. Jordan P.A., Stevens J.M., Hubbard G.P., et al. A role for the thiol isomerase protein erp5 in platelet function. *Blood*. 2005;105:1500-7. doi: 10.1182/blood-2004-02-0608
28. Lahav J., Jurk K., Hess O., et al. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood*. 2002;100:2472-8. doi: 10.1182/blood-2001-12-0339
29. Reinhardt C., von Bruhl M.L., Manukyan D., et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118:1110-22. doi: 10.1172/JCI32376
30. Chen V.M., Ahamed J., Versteeg H.H., et al. Evidence for Activation of Tissue Factor by an Allosteric Disulfide Bond. *Biochemistry*. 2006;45:12020-8. doi:10.1021/bi061271a
31. Walsh J.D., Geczy C.L. Discordant expression of tissue factor antigen and procoagulant activity on human monocytes activated with lps and low dose cycloheximide. *Thromb Haemost*. 1991;66:552-8.
32. Le D.T., Rapaport S.I., Rao L.V. Relations between factor viia binding and expression of factor viia/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J Biol Chem*. 1992;267:15447-54.
33. Ahamed J., Versteeg H.H., Kerver M., et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl AcadSci USA*. 2006;103:13932-7. doi: 10.1073/pnas.0606411103
34. Versteeg H.H., Ruf W. Tissue factor coagulant function is enhanced by protein-disulfide isomerase independent of oxidoreductase activity. *J Biol Chem*. 2007;282:25416-24. doi: 10.1074/jbc.M702410200
35. Furlan-Freguia C., Marchese P., Gruber A., et al. P2x7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2932-44. doi: 10.1172/JCI46129
36. Jurk K., Lahav J., VAN Aken H., et al. Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding. *J Thromb Haemost*. 2011;9:2278-90. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04509.x
37. Maun H.R., Eigenbrot C., Raab H., et al. Disulfide locked variants of factor VIIa with a restricted beta-strand conformation have enhanced enzymatic activity. *Protein Sci*. 2005;14:1171-80. doi: 10.1110/ps.041097505
38. Hessel B., Jorvall H., Thorell L., et al. Structure-function relationships of human factor VIII complex studied by thio redox dependent disulfide reduction. *Thromb Res*. 1984;35:637-51.
39. Higashi S., Matsumoto N., Iwanaga S. Conformation of factor VIIa stabilized by a labile disulfide bond (Cys-310-Cys-329) in the protease domain is essential for interaction with tissue factor. *J Biol Chem*. 1997; 272:25724-30.
40. Bush-Pelc L.A., Marino F., Chen Z., et al. Important role of the cys-191 cys-220 disulfide bond in thrombin function and allostery. *J Biol Chem*. 2007;282:27165-70. doi: 10.1074/jbc.M703202200
41. Miller T.N., Sinha D., Baird T.R., et al. A catalytic domain exosite (Cys527-Cys542) in factor XIa mediates binding to a site on activated platelets. *Biochemistry* 2007; 46: 14450-14460. doi: 10.1021/bi701310x
42. Giannakopoulos B., Gao L., Qi M., et al. Factor XI is a substrate for oxidoreductases: enhanced activation of reduced FXI and its role in antiphospholipid syndrome thrombosis. *Autoimmun*. 2012;39:121-9. doi: 10.1016/j.jaut.2012.05.005
43. Lahav J., Tivito A., Bagoly Z., et al. Factor XIII improves platelet adhesion to fibrinogen by protein disulfide isomerase-mediated activity. *Thromb Res*. 2013;131:338-41. doi: 10.1016/j.thromres.2012.12.003
44. Lahav J., Karniel E., Bagoly Z., et al. Coagulation factor XIII serves as protein disulfide isomerase. *Thromb Haemost*. 2009; 101: 840-844.
45. Smith C.L., Shah C.M., Kamaludin N., et al. Inhibition of thiol isomerase activity diminishes endothelial activation of plasminogen, but not of protein C. *Thromb Res*. 2015;135:748-53. doi: 10.1016/j.thromres.2015.01.034
46. Appenzeller-Herzog C., Ellgaard L. The human pdi family: Versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:535-48. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.11.010
47. Hertog M.G., Feskens E.J., Hollman P.C., et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet*. 1993;342:1007-11.
48. McCullough M.L., Peterson J.J., Patel R., et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of us adults. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:454-64. doi: 10.3945/ajcn.111.016634
49. Huxley R.R., Neil H.A. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:904-8. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601624
50. Keli S.O., Hertog M.G., Feskens E.J., et al. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: The Zutphen study. *Arch Intern Med*. 1996;156:637-42.
51. Hollman P.C., Geelen A., Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr*. 2010;140:600-4. doi: 10.3945/jn.109.116632
52. Wright B., Moraes L.A., Kemp C.F., et al. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *British Journal of Pharmacology*. 2010;159:1312-25. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00632.x
53. Mulvihill E.E., Huff M.W. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Can J Cardiol*. 2010; 26:17A-21A. doi: 10.1016/S0828-282X(10)71056-4

About the Authors:

Irina V. Gribkova – PhD (in Biology), Leading Researcher, Scientific and Clinical Department, Clinical Trials and Healthcare Technology Assessment Centre, Moscow Department of Healthcare
Marya V. Davydovskaya – MD, PhD, Deputy Director for Scientific Work, Clinical Trials and Healthcare Technology Assessment Centre, Moscow Department of Healthcare; Professor, Chair of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Pirogov Russian National Research Medical University

Сведения об авторах

Грибкова Ирина Владимировна – к.б.н., в.н.с., научно-клинический отдел, Центр клинических исследований и оценки медицинских технологий, Департамент здравоохранения г. Москвы
Давыдовская Мария Вафаевна – д.м.н., зам. директора по научной работе, Центр клинических исследований и оценки медицинских технологий, Департамент здравоохранения г. Москвы; профессор, кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова