

---

---

ОБЗОРНЫЕ  
И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

---

---

NO/цГМФ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ В ТРОМБОЦИТАХ

© 2019 г. С. П. Гамбарян<sup>1</sup>, \*, В. С. Шпакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: [gambaryan.stepan@gmail.com](mailto:gambaryan.stepan@gmail.com)

Поступила в редакцию 13.06.2019 г.

После доработки 18.06.2019 г.

Принята к публикации 18.06.2019 г.

Активность тромбоцитов в циркулирующей крови контролируется различными стимулирующими и ингибирующими факторами, и регулируемое равновесие между этими двумя процессами существенно для нормального функционирования сосудов. NO/цГМФ/РКГ сигнальный путь является одним из ключевых в ингибировании активности тромбоцитов. В последнее время в литературе стали появляться новые гипотезы о стимулирующих или двойственных функциях РКГ (протеинкиназы G) в тромбоцитах. Данный обзор сфокусирован на трех основных проблемах: 1) стимулирующая и двойственная функции РКГ в тромбоцитах, “подводные камни” в изучении NO/цГМФ/РКГ сигнального пути, артефакты и некорректная интерпретация данных, которые приводят к развитию необоснованных гипотез; 2) новые субстраты РКГ, которые вовлечены в различные механизмы ингибирования тромбоцитов; и 3) клинические аспекты использования препаратов, приводящих к высвобождению NO и активации гуанилатциклазы (ГЦ). В заключение обсуждается недавно разработанный метод количественной фосфорпротеомики, который обещает стать мощным инструментом в анализе РКГ-опосредованных эффектов. Этот метод позволит определить новые РКГ-специфичные субстраты, анализ которых может стать основой для разработки новых лекарств, направленных на специфические аспекты функционирования тромбоцитов.

*Ключевые слова:* тромбоцит, протеинкиназа G, циклический гуанозинмонофосфат, оксид азота

DOI: 10.1134/S0869813919080053

РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О ФУНКЦИЯХ  
цГМФ В ТРОМБОЦИТАХ

Молекула циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) впервые была синтезирована в 1960 г. [1], а вскоре после этого из мочи кролика был выделен цГМФ эндогенного происхождения [2]. Первые публикации о функциях цГМФ в тромбоцитах начали появляться в середине 70-х годов прошлого века, и в некоторых из работ было показано увеличение концентрации цГМФ в ответ на различные соединения, вызывающие активацию и агрегацию тромбоцитов. Например, коллаген в зависимости от дозы, модели эксперимента и метода измерения цГМФ (радиоиммунологический анализ или преинкубация с [<sup>3</sup>H] гуанином), вызывал увеличение цГМФ в тромбоцитах на 50–400% [3–6]. Для АДФ, адреналина и арахидоновой кислоты также была показана способность увеличивать количество цГМФ в тромбоцитах, однако не столь эффективно [5, 6]. Исходя из этих данных, была описана АДФ- или

коллаген-стимулированная агрегация тромбоцитов, опосредованная цГМФ [7]. Соответственно в то время основной гипотезой относительно функций цГМФ в тромбоцитах, поддерживаемой в основном группой R. J. Haslam [3, 8, 9], являлась теория активирующей роли цГМФ в тромбоцитах. В то же время другим группам не удалось обнаружить увеличения содержания цГМФ в активированных тромбоцитах или доказать участие цГМФ в их активации [10, 11]. В тромбоцитах, активированных тромбином, концентрация цГМФ не изменялась, с другой стороны, воздействие нитропруссид натрия (SNP), который вызывает увеличение цГМФ, не ингибировало активацию тромбоцитов [12]. В связи с этим авторы, основываясь на собственных данных и проведя анализ литературы, сделали заключение, что увеличение количества цГМФ является скорее следствием агрегации тромбоцитов, нежели опосредует этот процесс [12].

Вскоре после этого в литературе стали появляться данные, демонстрирующие мощный ингибиторный эффект цГМФ в тромбоцитах. И здесь R. J. Haslam [13] был одним из первых, кто предположил, что цГМФ может ингибировать активацию тромбоцитов, вызванную различными стимулами, а затем доказал эту теорию экспериментально [14]. Было показано, что цГМФ оказывает ингибиторный эффект на обмен фосфатидилинозитола в тромбоцитах [15], на активацию тромбоцитов и мобилизацию кальция [16]. В то же время была открыта цГМФ-зависимая протеинкиназа G (PKG), которая предположительно опосредовала ингибирующее действие цГМФ и вызывала фосфорилирование белка VASP (vasodilator-stimulated protein), который на сегодняшний день является известным индикатором активности PKG и/или PKA в тромбоцитах [17, 18]. Позже во многих статьях было описано цГМФ/PKG-опосредованное ингибирование активации тромбоцитов, данные по которому были суммированы в нескольких обзорах [19–22].

Таким образом, можно сделать заключение, что увеличение концентрации цГМФ, вызванное различными активаторами, и гипотеза о стимулирующей роли цГМФ в тромбоцитах представляют интерес скорее исторический, нежели научный. Причина наблюдаемого увеличения количества цГМФ в тромбоцитах в ответ на активаторы, скорее всего, заключалась в недостатках методик измерения цГМФ. Эта проблема актуальна и по сегодняшний день, особенно в изучении тромбоцитов [23]. Существование первоначальной гипотезы о роли цГМФ в тромбоцитах можно объяснить тем, что после открытия цГМФ, механизм его действия рассматривался как антагонистичный эффектам циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [24, 25], который на тот момент уже был известен как ингибитор функций тромбоцитов.

## I. ЗАБЛУЖДЕНИЯ

### *1. Активирующие функции PKG в тромбоцитах*

После 1980-х годов, в течение более чем 20 лет в литературе существовала четкая концепция об ингибирующей роли цГМФ/PKG и цАМФ/PKA в тромбоцитах. Однако в 2003 году группой из Китая под руководством X. Du снова был поднят вопрос о функциях цГМФ/PKG и их роли в активации тромбоцитов [26, 27]. Чтобы продемонстрировать несостоятельность данных об активирующей роли PKG в тромбоцитах, представленных группой X. Du, мы обратим внимание на некоторые их работы. Одним из основных постулатов для “теории активирующей роли PKG” X. Du являются данные, полученные на нокаутных по PKG гену мышах, которые полностью противоречат первым работам о функциях тромбоцитов, полученных при помощи этой модели [28]. S. Massberg с соавт. четко показали, что PKG (указанная в работе как cGKI) выполняет только ингибиторную функцию в тромбоцитах при активации коллагеном или тромбином и в модели ишемии/реперфузии (И/Р). В модели И/Р адгезия тромбоцитов к поврежденному эндотелию, помимо GPVI

рецептора, обеспечивается активацией рецептора GPIb-IX к фактору фон Виллебранда (vWF) и интегринов  $\alpha$ IIb3, при этом PKG активно участвует в ингибировании как GPIb-IX, так и интегринов. X. Du и его группа, используя ту же самую модель, однако в несколько отличных экспериментах (адгезия тромбоцитов к иммобилизованному vWF), и ту же тромбин-индуцированную активацию, получили данные, абсолютно противоположные результатам, полученным ранее другими группами [27].

Следующим важным открытием X. Du стали данные об увеличении цГМФ в тромбоцитах, активированных vWF [27]. Нашей группой было обнаружено небольшое (максимум в 2.5 раза) увеличение количества цГМФ в тромбоцитах, активированных vWF с ристоцетином [29, 30], однако повышение уровня цГМФ в этом случае скорее представляло цепь отрицательной обратной связи, нежели играло роль в активации [30]. В 2004 г. одновременно в журнале "Blood" были опубликованы две статьи [29, 31] и письмо к редактору [32], где было показано, что основные эксперименты (в том числе модель с нокаутными по PKG мышами), на которых основана "теория активирующей роли PKG", не воспроизводимы и содержат методологические ошибки. Однако в своем ответе [33] и последующих публикациях X. Du [33–38] попросту проигнорировал все предоставленные аргументы и продолжил развивать "теорию активирующей роли PKG". Здесь необходимо определить три основные причины (помимо модели с нокаутными по PKG мышами), почему результаты группы X. Du являются, по всей вероятности, артефактами и не отражают реальной ситуации внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах. Прежде всего, ингибитор PKG KT5823, который использовался для доказательства PKG-специфичных эффектов, не является специфичным [39] и не ингибирует PKG как в тромбоцитах, так и в других типах клеток [40, 41]. Второе, цГМФ аналоги как стимуляторы (8-Br-cGMP, 8-pCPT-cGMP, 8-Br-PET-cGMP), так и ингибиторы (Rp-8-PCPT-cGMPs, Rp-8-Br-PET-cGMPs) могут ингибировать или активировать тромбоциты независимо от действия на PKG [29, 31, 32, 41–43]. Двухфазный эффект цГМФ на тромбоциты (быстрая активация, затем ингибирование после 10 мин инкубации с аналогами цГМФ) может быть объяснен тем, что цГМФ-аналогам необходимо 10 мин, чтобы достигнуть нужной концентрации для активации PKG в тромбоцитах [29, 41, 44]. То есть активирующий эффект опосредован неспецифической (цГМФ/PKG-независимой) активацией тромбоцитов, а ингибиторный эффект отражает реальное цГМФ/PKG-зависимое блокирование активации тромбоцитов. И, наконец, третьей причиной является описание PKG-зависимой активации p38 и ERK MAP киназ, которую автор использовал для объяснения своей теории. Важно отметить, что начиная с 2003 г. никому не удалось воспроизвести эти данные, напротив, во многих статьях был описан противоположный эффект (PKG-зависимое ингибирование активности MAP киназ) [29, 31, 45–47]. Также никому не удалось воспроизвести активирующий эффект силденафила (ингибитор цГМФ-специфической фосфодиэстеразы 5 типа) на тромбоциты, продемонстрированный в работе X. Du с соавт. [27]. S. J. Marshall с соавт. в тех же экспериментах наблюдали только ингибирование агрегации тромбоцитов и активации интегринов  $\alpha$ IIb3 после воздействия силденафила [31]. Во многих других статьях было показано, что силденафил оказывает только ингибирующий эффект на тромбоциты, и особенно сильное потенцирование этого эффекта наблюдается после использования соединений, повышающих уровень NO [48–54]. Наша группа провела ряд экспериментов с силденафилом, однако нам не удалось зафиксировать какого-либо активирующего эффекта на тромбоциты, который оценивался по агрегации, активации интегринов  $\alpha$ IIb3, экспрессии P-селектина или по внутриклеточным маркерам активации (MAPK, PKC, PKB) (неопубликованные данные). Небольшие различия в эффекте силденафила на тромбоциты (от полного отсутствия ингибирования или лишь потенцирования действия NO до

слабого или относительно сильного ингибирования) можно объяснить двумя причинами: первое, силденафил менее эффективен в PRP (platelet-rich-plasma); и второе, силденафил, растворенный в воде или ДМСО, нестабилен, и после нескольких дней хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  становится менее эффективным.

Последующие статьи X. Du с соавт., где “теория активирующей роли PKG” получила дальнейшее развитие [34–38], были основаны на тех же неспецифических эффектах стимуляторов и/или ингибиторов PKG, и не будут подробно рассматриваться в данном обзоре за исключением статьи, где авторами был описан стимулирующий эффект липополисахаридов (ЛПС) на тромбоциты [55]. Данные, представленные в работе, полностью противоречат гипотетическому двухфазному эффекту цГМФ на тромбоциты в их первой статье [27]. В статье X. Du с соавт. [27] на рис. 6 представлены данные о раннем стимулирующем эффекте цГМФ/PKG, который через 5 мин блокирует тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, в то время как в одной из последующих статей [55] на рис. 5 показано, что ЛПС вызывает увеличение цГМФ более чем в 3 раза через 30 с и потенцирует тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов после 5 мин инкубации. Важно отметить, что подготовка проб для экспериментов в обоих случаях была идентичной. При этом фосфорилирование белка VASP, которое должно наблюдаться при подобном значительном увеличении цГМФ, вызванным ЛПС, среди данных не было представлено. Подобно опытам с силденафилом, мы провели множество экспериментов на отмытых тромбоцитах с использованием различных концентраций ЛПС и не обнаружили значимого фосфорилирования белка VASP (неопубликованные данные). Важность упомянутой выше работы заключается в том, что в 2015 г. вышли две статьи других авторов, где вновь поднимается вопрос о стимулирующих функциях PKG в тромбоцитах [56, 57].

В работе S. Vogel с соавт. [56] был описан новый механизм активации тромбоцитов, опосредованной белком HMGB1 (high-mobility group box 1). Однако объяснение того, что молекулярный механизм действия данного белка опосредован PKG (указана в работе как cGKI), является чисто умозрительным и очень спорным. Если данное предположение верно, оно противоречит всем данным по ингибирующему эффекту PKG в тромбоцитах, и любой NO донор или активатор PKG должны были бы вызывать активацию тромбоцитов. Однако подобных данных не было представлено в статье и, за исключением группы X. Du, до сих пор никому не удалось их получить. Далее, если активированные тромбоциты секретируют HMGB1, который связывается с TLR4 и активирует его, что, в свою очередь, приводит к активации гуанилатциклазы (ГЦ), тогда все тромбоцитарные агонисты (тромбин, коллаген, тромбоксан, АДФ) также должны стимулировать ГЦ путем секреции HMGB1 и увеличивать количество цГМФ, чего в действительности не происходит. И, наконец, в качестве одного из доказательств стимулирующей роли PKG в своих экспериментах S. Vogel с соавт. используют PKG ингибитор DT-2, который неспецифичен *in vivo* [56].

В экспериментах, проведенных нашей группой с человеческими тромбоцитами, проинкубированными в течение 5 мин с ЛПС, действительно, было показано небольшое потенцирование активации тромбоцитов, стимулированных низкими дозами тромбина или конвульксина (неопубликованные данные). Однако данный эффект был PKG-независимым, поскольку не наблюдалось фосфорилирование белка VASP по Ser157 или Ser239. То есть, S. Vogel с соавт. показали очень интересный механизм NO-независимой и TLR4-опосредованной активации ГЦ, которая может быть специфичной для мышиных, но не для человеческих тромбоцитов (увеличение цГМФ в человеческих тромбоцитах не показано на рис. 7) [56]. Примечательно, что в тромбоцитах крысы ЛПС также стимулирует ГЦ через активацию PKC и PKB, что приводит к 5-кратному увеличению содержания цГМФ и коррелирует с мощным ингибированием тромбоцитов [59]. Следует отметить, что эффект ЛПС на тромбоциты неоднозначен и порой дает очень противоречивые результаты. В за-

висимости от постановки эксперимента (модели *in vitro* или *in vivo*, разные животные, человек) ЛПС может как ингибировать, так и потенцировать активацию тромбоцитов [60–63], поэтому многие вопросы относительно эффекта ЛПС на тромбоциты остаются открытыми.

Во второй работе были описаны экспрессия и функциональное значение белка NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) в человеческих и мышинных тромбоцитах [57]. Авторы представили очень интересные данные (особенно для воспалительного процесса), показав, что NOD2 задействован в активации тромбоцитов, индуцированной агонистами, и способен ее потенцировать. Однако аргументы в пользу того, что действие NOD2 опосредовано цГМФ/PKG активностью, не выглядят убедительными. Авторы в своем заключении основываются на двух результатах: первое – агонисты NOD2 увеличивают количество тромбоцитарного цГМФ путем активации индуцибельной NO-синтазы (iNOS) (касательно экспрессии NOS в тромбоцитах см. следующую главу) и второе – данные, полученные с использованием неспецифического PKG ингибитора KT5823.

К сожалению, S. Vogel с соавт. [56] и S. Zhang с соавт. [57] вместо проведения более детального анализа реальной вовлеченности PKG в TLR4- и NOD2-индуцированную активацию тромбоцитов, поддержали очень сомнительную гипотезу об активирующей роли PKG, которую разрабатывает группа X. Du.

Исходя из представленного материала, мы можем заключить, что на данный момент нет ни одного неопровержимого и воспроизводимого другими группами факта, который можно было бы рассматривать в качестве основания для доказательств существования “теории активирующей роли PKG”. Напротив, множество статей, которые содержат результаты, воспроизводимые другими группами, без каких-либо сомнений подтверждают, что ГЦ/цГМФ/PKG путь играет исключительно ингибирующую роль как в человеческих, так и в мышинных тромбоцитах.

## 2. Двойственные функции ГЦ в тромбоцитах

Статья все той же группы X. Du [64], в которой очень убедительно описан феномен двухфазного эффекта ГЦ в тромбоцитах, не будет подробно рассматриваться в данном обзоре по двум причинам. Во-первых, статья содержит невоспроизводимые результаты, что было изложено в письме к редактору журнала “Blood” [65], а во-вторых, представленные в работе результаты снова противоречат результатам, ранее полученным этой группой. В предыдущих работах [35, 66, 67] было показано, что тромбин и коллаген увеличивают концентрацию цГМФ в мышинных тромбоцитах в 2, максимум 3.5 раза по сравнению с контролем. Однако в вышеупомянутой статье тромбин увеличивает количество цГМФ более чем в 13 раз, а коллаген более чем в 7 раз по сравнению с контролем [64]. При этом не были представлены данные по фосфорилированию белка VASP, которое должно быть достаточно мощным при подобных концентрациях цГМФ. В экспериментах нашей группы с постоянной воспроизводимостью было показано, что тромбин никогда не вызывал увеличения, даже несколько уменьшал базальный уровень фосфорилирования VASP по Ser239 [65, 68]. Увеличение же фосфорилирования VASP по Ser159 опосредовано цГМФ- и цАМФ-независимой активацией PKA [69]. Что более занятно, в данных G. Zhang с соавт. [64] тромбин и коллаген увеличивают концентрацию цГМФ в 6 и в 5 раз соответственно даже в тромбоцитах мышей, нокаутных по ГЦ. Единственным ферментом, ответственным за синтез цГМФ в тромбоцитах, является растворимая ГЦ [70], в связи с чем данные результаты можно объяснить только ошибками в определении цГМФ. Как нашей группой [65, 71], так и другими авторами [72], использовавшими тех же самых мышей с общим нокаутом по ГЦ и мышей с нокаут-

ными по ГЦ тромбоцитами, в соответствии со многими другими публикациями, был обнаружен только ингибиторный эффект ГЦ в тромбоцитах.

В заключение к этой части можно лишь повторить, что нет ни одного убедительного результата в поддержку “теории активирующей роли PKG” в тромбоцитах. Результаты, представленные G. Zhang с соавт. [64] являются невоспроизводимыми, противоречат их собственным данным, а возможно попросту являются артефактами.

### *3. Экспрессия NOS и регуляция ее функций в тромбоцитах*

В данном обзоре мы не будем проводить подробного анализа экспрессии и функций NOS в тромбоцитах, поскольку этот вопрос детально был описан в одном из предыдущих обзоров [23], в котором мы сделали акцент на трех основных проблемах в этой области. Первая и наиболее важная из них связана с экспрессией и регуляцией активности NOS в тромбоцитах. И самым большим вопросом здесь является определение эндотелиальной NOS (eNOS) в тромбоцитах. Еще в 2008 г. нашей группой было обнаружено, что фосфо-eNOS<sup>S1177</sup> антитела, которые широко используются в качестве индикатора активации eNOS, могут детектировать увеличение фосфорилирования eNOS<sup>S1177</sup> в активированных тромбоцитах, выделенных из крови нокаутных по eNOS мышей [30]. К сожалению, даже после публикации полученных нами данных, эти антитела все еще используются для определения активации eNOS в тромбоцитах. В этой связи одна статья, в которой представлены очень интересные данные касательно предотвращения образования тромбозов небивололом, заслуживает особого внимания [73]. К сожалению, авторы использовали те же неспецифичные антитела для определения экспрессии NOS и ее активации по фосфорилированию eNOS<sup>S1177</sup> без контроля на нокаутных по eNOS мышинных тромбоцитах [73].

Следующая проблема связана с определением цГМФ в тромбоцитах. Мы провели множество экспериментов с определением уровня цГМФ методами ELISA, EIA и RIA и пришли к выводу, что во многих случаях все эти подходы могут дать ошибочные позитивные результаты для тромбоцитов, стимулированных различными агонистами. К сожалению, невозможно предсказать в каком случае результат отражает реальное увеличение цГМФ, поскольку позитивный контроль (тромбоциты, стимулированные донором NO), вне зависимости от используемого метода, всегда дает достоверные данные, в отличие от опытного образца, где результат может зависеть от буфера, в котором растворены тромбоциты (HEPES или PBS) или от того, каким образом была остановлена реакция (TCA, HCl, или этанол). Именно поэтому данные по содержанию цГМФ в тромбоцитах, стимулированных агонистами, всегда должны использоваться с осторожностью и с проверкой фосфорилирования белка VASP по Ser239 в качестве позитивного контроля (предпочтительный для PKG сайт, который очень чувствителен к увеличению цГМФ) [74]. Следует также учитывать, что независимо от NO, через белок-белковое взаимодействие ГЦ могут активировать Hsp70, Hsp90, PSD95 и MyD88, которые рекрутируют ГЦ к плазматической мембране после фосфорилирования по Ser/Thr и/или по Tyr [30, 56, 75, 76]. К тому же, несколько соединений, в том числе ингибиторы тромбина [77] и гемфиброзил [78], могут стимулировать активность ГЦ в тромбоцитах независимо от NO. Следовательно, даже в случае корректного измерения цГМФ и наличия фосфорилирования белка VASP, нельзя без сомнений утверждать, что активация ГЦ в тромбоцитах опосредована активностью NOS.

Более подробно проблемы относительно измерения активности NOS описаны в обзоре [23]. Как было сказано выше, распространенные подходы содержат много ошибок, особенно в измерении активности NOS в тромбоцитах. Активность NOS в тромбоцитах в литературе колеблется от 8 фмоль/мин/мг белка [79] до

16 пмоль/мин/мг [80], т.е. разница в три порядка. В тромбоцитах, стимулированных коллагеном, наблюдалось образование лишь 5 фмоль NO/мг белка в течение 60 мин [81], что, учитывая содержание 2.1 пг белка на один тромбоцит, равно образованию 6.3 молекул NO в одном тромбоците в час. Различия значений в 2–3 порядка являются обычным делом в литературе, даже при условии одинакового количества стимулированных агонистами тромбоцитов.

В заключение к этой части можно добавить, что на сегодняшний день не было зафиксировано наличия NOS в человеческих или мышиных тромбоцитах ни методом вестерн-блот анализа [30, 82], ни при помощи протеомного анализа (для человеческих тромбоцитов) [83]. При этом также не удалось обнаружить мРНК NOS в человеческих и мышиных тромбоцитах при помощи метода полногеномного РНК-секвенирования [84] и электронного ресурса [www.plateletomics.com](http://www.plateletomics.com). Исходя из вышесказанного, гипотеза о наличии экспрессии и функционирования NOS в тромбоцитах, судя по всему, далека от реальности и должна использоваться с большой осторожностью, особенно это касается клиницистов.

#### 4. Эритроциты синтезируют NO, который ингибирует активацию тромбоцитов

Недавно в нескольких статьях [85–88] было описано ингибирование активации тромбоцитов красными клетками крови (RBCs). Во всех этих работах демонстрировалось ингибирование тромбоцитов деоксигенированными RBCs, способными превращать нитриты в NO. Действительно, одним из источников NOS-независимого образования NO может быть восстановление нитрита до NO при участии деоксигемоглобина [89, 90], деоксимиоглобина [91], ксантиноксидазы [92] и карбоангидразы [93]. Теоретически, все эти (и некоторые другие) пути могут существовать и осуществлять продукцию NO из нитритов, особенно в случае изолированных ферментов *in vitro*. Образование NO, особенно из гемоглобина, было зафиксировано многими методами, однако, как было отмечено ранее в нашем обзоре [23], измерение NO часто может дать непредсказуемый ошибочно положительный результат. Что более важно, ни в одной из упомянутых работ не было показано прямой активации ГЦ в тромбоцитах, индуцированной RBCs. Описанное ингибирование [85–88] измерялось при помощи агрегометрии и проточной цитометрии с использованием маркеров тромбоцитарной активации, которые не позволяют определить, был ли ингибиторный эффект опосредован исключительно активацией NO/цГМФ пути в тромбоцитах. В нескольких публикациях был описан прямой синтез NO в эритроцитах, опосредованный eNOS [94, 95], однако результаты других исследований не показали наличия функционально активной NOS в эритроцитах [96]. Мы не будем поднимать вопрос относительно наличия экспрессии eNOS в эритроцитах, возможно, эти данные связаны с проблемой неспецифичности eNOS антител. Наиболее важная проблема, касающаяся ингибирования тромбоцитов, опосредованного эритроцитами, независимо от eNOS активности. Нь или других механизмов, заключается в том, что никогда не была показана способность эритроцитов активировать ГЦ напрямую. Для того, чтобы прояснить этот вопрос, мы провели эксперименты на цельной крови и на тромбоцитах, проинкубированных с эритроцитами в разных состояниях (окси-, деокси- или нагруженный NO гемоглобин) и с очищенной ГЦ [97]. Эксперименты показали, что эритроциты во всех исследованных состояниях не способны активировать ни тромбоцитарную, ни очищенную ГЦ, напротив, они участвуют в захвате NO.

Подводя итог данному разделу, можно заключить, что в последнее время в литературе появилось несколько новых гипотез относительно функций NO/ГЦ/цГМФ/ПКГ в тромбоцитах, которые нужно рассматривать с большой осторожностью по трем

причинам: 1) большая часть данных, на которых основаны гипотезы, являются невоспроизводимыми; 2) данные из разных статей одних и тех же авторов часто противоречат друг другу; и 3) использование методов, взятых для доказательства гипотез, может приводить к получению ошибочных результатов или артефактов. Поэтому все еще существует множество нерешенных и важных вопросов, касающихся цГМФ сигнализации в тромбоцитах.

## II. РЕАЛЬНОСТЬ

### 1. Специфичность ингибиторов PKG и ГЦ

В предыдущем разделе мы обсуждали ингибиторы PKG, и можем лишь подчеркнуть, что не существует специфичных PKG ингибиторов, которые могли бы использоваться для определения связанных с PKG функций в тромбоцитах. Что касается упомянутого выше KT-5823, это соединение не ингибирует PKG, однако является достаточно мощным ингибитором GSK3 $\beta$  и нескольких других киназ [39], играющих важную роль в активации тромбоцитов [98, 99] и в поддержании целостности тромба в условиях увеличивающегося градиента скорости сдвига [100]. Проникающие через мембрану ингибиторы – аналоги цГМФ (Rp-8pCPT-cGMPS и Rp-8-Vr-RET-cGMPS) могут специфично ингибировать PKG, однако из-за их неспецифической способности активировать тромбоциты в первые минуты после инкубации интерпретация данных относительно функционального эффекта PKG на тромбоциты может быть некорректна. Сравнительно недавно разработанные DT-олигопептиды, которые были представлены как высоко специфичные, способные проникать через мембрану пептиды, блокирующие PKG [101, 102], исходя из наших данных, не могут использоваться *in vivo* как ингибиторы PKG в принципе, поскольку нашей группой был детально проанализирован эффект данных веществ на тромбоциты и другие клетки [58], и было показано, что DT-2 не ингибирует PKG в интактных клетках разных типов. При этом DT-2 сам по себе способен ингибировать активацию тромбоцитов, индуцированную тромбином и в то же время потенцировать ответ тромбоцитов на коллаген [58]. Оба описанных эффекта являются PKG-независимыми.

ODQ, наиболее часто используемый ингибитор ГЦ, судя по всему, не оказывает какого-либо неспецифического действия на тромбоциты. В некоторых статьях ODQ использовался для определения цГМФ-зависимых и независимых эффектов в тромбоцитах [103–105]. Мы решили проверить действие ODQ на человеческих и мышиных по ГЦ мышинных тромбоцитах [71, 106] и, согласно полученным результатам, если блокирующий эффект ODQ не наблюдается, то это не исключает наличие цГМФ-зависимой сигнализации в тромбоцитах, особенно в присутствии больших доз донора NO. В мышинных тромбоцитах, нокаутных по ГЦ, ингибирование активации тромбоцитов и их апоптоз были исключительно цГМФ-зависимыми, и лишь блокирование образования активных форм кислорода (АФК) отчасти ингибировалось цГМФ-независимыми механизмами, скорее всего за счет прямого захвата свободных радикалов [71, 72].

### 2. Реакция изменения формы (*shape change*) тромбоцитов

Как было упомянуто выше, в последние годы публикуется множество данных, посвященных описанию различных аспектов PKG-зависимого ингибирования тромбоцитов, полученных разными группами в разных лабораториях. Эти данные уже были обобщены в нескольких обзорах [21, 22, 107], поэтому PKG-зависимое ингибирование агрегации тромбоцитов на данный момент является бесспорным, однако относительно реакции *shape change* все не так однозначно. Согласно результатам, полученным В.О. Jensen с соавт. [108], NO вызывает PKA-, но не PKG-опосредованное ингибирование изменения формы тромбоцитов, активированных тромбином.



Авторы объясняют этот эффект тем, что цГМФ инактивирует фосфодиэстеразу-3, которая путем гидролиза блокирует функции цАМФ. Эти данные были получены разными методами регистрации изменения формы тромбоцитов с использованием различных аналогов циклических нуклеотидов (индукторы активации 8-Br-РЕТ-сGMP, 8-pCPT-сGMP, сBIMPS, 8-АНА-сAMP, 8-pCPT-сAMP; ингибиторы активации Rp-8-pCPT-сGMPS, Rp-8-Br-сAMPS, Rp-сAMPS). Что касается аналогов циклических нуклеотидов, ранее мы упоминали, что они могут оказывать неспецифический эффект на тромбоциты, не связанный с PKA/PKG активностью. В связи с этим мы проверили, вызывает ли риоцигуат (активатор растворимой ГЦ, который не влияет на уровень цАМФ) ингибирование изменения формы тромбоцитов, вызванное АДФ [109].

Следует отметить, что в тромбоцитах обнаружено три подтипа P2 фосфатных рецепторов: АДФ-зависимые рецепторы P2Y1 и P2Y12, ассоциированные с G-белками, и АТФ-зависимый ионный канал P2X1 [110]. Было показано, что риоцигуат дозозависимо ингибирует реакцию изменения формы тромбоцитов, опосредованную активацией АДФ, но не АТФ, что указывает на отсутствие связи между активацией PKG и активностью рецептора P2X1 [109]. При этом изменение формы тромбоцитов, индуцированное АДФ, может быть заблокировано при помощи ингибиторов P2Y1 рецептора, но не P2Y12 [111]. Однако поскольку вопрос относительно влияния цГМФ/PKG на изменение формы тромбоцитов не был изучен на нокаутных по PKG мышах, до сих пор остается неясным, какая из киназ ответственна за ингибирование реакции shape change.

### 3. Кальциевая сигнализация

Все агонисты тромбоцитов действуют через специфические рецепторы, запуская различные сигнальные процессы, приводящие в итоге к увеличению концентрации внутриклеточного кальция  $[iCa^{2+}]$ . Регуляция  $[iCa^{2+}]$  в тромбоцитах является многофункциональным процессом, включающим системы, ответственные за транспорт  $Ca^{2+}$  внутрь клетки, выведение  $Ca^{2+}$  из клетки через плазматическую мембрану, и закачивание  $Ca^{2+}$  во внутриклеточные хранилища. За увеличение  $[iCa^{2+}]$  ответственны системы, высвобождающие  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо и транспортирующие  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану внутрь клетки. За уменьшение  $[iCa^{2+}]$  в тромбоцитах отвечают две системы: саркоплазматические/эндоплазматические  $Ca^{2+}$ -АТФазы (SERCAs), закачивающие  $Ca^{2+}$  обратно в хранилища, и  $Ca^{2+}$ -АТФазы на плазматической мембране (PMCA), выкачивающие кальций из клетки [112]. Известно, что активация PKG вызывает ингибирование увеличения  $[iCa^{2+}]$  в тромбоцитах [113, 114], однако молекулярные механизмы и субстраты PKG на сегодняшний день определены только для системы высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Первыми в качестве субстрата были обнаружены рецепторы к инозитол-1,4,5-трифосфату (ИФ3) [115–117]. Однако до сих пор неясно, приводит ли к ингибированию высвобождения кальция фосфорилирование ИФ3 рецептора. Согласно данным, полученным M.J. Betzenhauser с соавт., фосфорилирование ИФ3 рецептора 2 типа, опосредованное PKA (которая также способна ингибировать увеличение  $[iCa^{2+}]$  в тромбоцитах), по Ser937 приводит к увеличению  $[iCa^{2+}]$  в DT40-3КО клетках [118]. Следующим в качестве мишени для PKG в передаче кальциевого сигнала в тромбоцитах был описан белок IRAG (IP<sub>3</sub> receptor associated cGK I substrate protein). IRAG, выделенный из клеток гладкой мускулатуры вместе с PKGI и ИФ3 рецептором, подвергается фосфорилированию PKG по Ser664 и Ser677 [119]. Фосфорилирова-

ние белка IRAG, опосредованное PKG, приводит к ингибированию мобилизации кальция и активации тромбоцитов [120, 121].

Высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных хранилищ вызывает депо-управляемый вход кальция (SOCE) через плазматическую мембрану, который осуществляется несколькими белками, среди которых STIM1 (stromal interaction molecule 1), CRACM1 или Orai1 (calcium-release activated calcium modulator 1) и некоторые TRPC (transient receptor potential channels) [112]. В настоящее время в литературе нет данных о том, что функции STIM1 или Orai1 могут модулироваться активностью PKG, однако белки TRPC семейства могут подвергаться фосфорилированию PKG по Thr11 и Ser263 [122]. До сих пор остается открытым вопрос относительно того, влияют ли данные модификации белков на транспорт кальция через плазматическую мембрану [112, 123]. Активность другого хорошо известного кальциевого канала, рецептора P2X1 к АТФ, вероятно, также не регулируется PKG. По крайней мере, активация PKG не приводит к ингибированию реакции shape change, которое опосредовано активацией P2X1 [109]. Также нет никаких данных относительно влияния PKG на регуляцию функций SERCA и PMCA каналов. Известно лишь, что PMCA может быть задействован в регуляции активности PKG, о чем свидетельствуют данные, полученные с использованием PMCA ингибитора карбоксиэозина, который вызывает дозозависимую активацию PKG и фосфорилирование белка VASP в тромбоцитах. Однако молекулярные механизмы, ответственные за активацию PKG карбоксиэозином, до сих пор неизвестны [124].

#### 4. Малые ГТФазы

В тромбоцитах синтезируются все основные ГТФазы семейства Rho, включая RhoA, Rac, Cdc42, Rap и некоторые атипичные Rho ГТФазы, такие как RhoV, RhoF и RhoG [83, 125]. В целом активность малых ГТФаз контролируется белками GEF (guanine nucleotide exchange factor) и GAP (GTPase-activating proteins). Белок GEF способствует диссоциации ГДФ и связыванию ГТФ, что приводит к активации ГТФазы, в то время как GAP вызывает гидролиз ГТФ, тем самым инактивируя ГТФазу. цГМФ/PKG путь может ингибировать активность малых ГТФаз либо напрямую, либо через фосфорилирование некоторых GEF и GAP белков. На ядерных клетках было показано, что PKG фосфорилирует RhoA по Ser188, что приводит к ингибированию ее функций [126]. В тромбоцитах PKA-опосредованное фосфорилирование RhoA по тому же сайту предотвращает связывание RhoA с Rho киназой ROCK2, которая через активацию фосфатаз вызывает уменьшение фосфорилирования легких цепей миозина и ингибирование реакции изменения формы тромбоцитов [127]. Неясно, фосфорилирует ли PKG белок RhoA по Ser188 в тромбоцитах, однако известно, что ингибирование активации RhoA в тромбоцитах, стимулированных тромбоксаном A2 (TXA<sub>2</sub>), является PKA-, но не PKG-зависимым [128].

Белок PAK (p21-activated kinase) является основным эффектором Rac и Cdc42, двух других основных ГТФаз Rho семейства. Обе эти ГТФазы вовлечены в активацию тромбоцитов, образования филоподий и ламеллоподий [125]. По всей видимости, Rac и Cdc42 не являются прямыми мишенями PKG, в то время как PAK фосфорилируется PKG по Ser21 в клетках эндотелия и HeLa клетках, что приводит к взаимодействию PAK с белком VASP и поляризации клетки [129]. Белки Rac, PAK и VASP синтезируются в тромбоцитах [83], однако по данным литературы нет никаких свидетельств наличия в тромбоцитах подобных реакций. Известно, что PKG может ингибировать активность Rac1 путем уменьшения количества Rac1-GTP в тромбоцитах, что является признаком того, что Rac1-специфичные GEF и/или GAP могут быть прямыми мишенями PKG. По недавно полученным нами данным, действительно, оказалось, что Rac1-специфичные GEF ARHGEF6 и GAP ARHGAP17 яв-

ляются прямыми мишенями PKA и PKG [130]. При помощи различных подходов, включавших анализ протеома тромбоцитов, данные фосфопротеомики, Phos-tag, вестерн блота и точечных мутаций специфичных аминокислот, нам удалось установить, что ARHGEF6 подвергается фосфорилированию по Ser684, а ARHGAP17 – по Ser702. ARHGEF6 образует стабильный комплекс с рецептором GIT1 (G protein-coupled receptor kinase-interactor 1), фосфорилирование которого способствует связыванию комплекса с белком 14-3-3, что коррелирует с уменьшением активности Rac1 [131]. Фосфорилирование ARHGAP17 по Ser702 приводит к диссоциации CIP4 (Cdc42-interacting protein 4) от CIP4/ARHGAP17 стабильного комплекса, что приводит к стимулированию функций ARHGAP17 и снижению активности Rac. Все эти данные свидетельствуют о том, что PKG-зависимое ингибирование активности белка Rac в тромбоцитах является сложным процессом, который опосредован фосфорилированием множества субстратов, включая GEF, GAP и, возможно, PAK1.

Другая малая ГТФаза – Rap1 играет важную роль в активации интегринов  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 и агрегации тромбоцитов. Rap1b является основной изоформой среди всех ГТФаз, синтезирующихся в тромбоцитах [83, 132], и быстро активируется в ответ на большинство агонистов [133–137]. У нокаутных по Rap1b мышей наблюдается блокирование активации и агрегации тромбоцитов [138]. Активация цГМФ/PKG сигнального пути приводит к ингибированию активности Rap1b [139]. Регуляция активности Rap1b протеинкиназой G в тромбоцитах является комплексным процессом, включающим фосфорилирование самой Rap1b, фосфорилирование CalDAG-GEF1 (calcium and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor 1), являющегося основным GEF белком для Rap1, и фосфорилирование единственного синтезирующегося в тромбоцитах GAP для Rap1 – Rap1GAP2 [140]. PKG может фосфорилировать Rap1b по Ser179 [141, 142], однако кинетика этого процесса гораздо медленнее, чем ингибирование самой Rap1b [139], и фосфорилирование не оказывает прямого эффекта на активность Rap1b [141]. Фосфорилирование Rap1GAP2 по Ser9 приводит к диссоциации от Rap1GAP2 белка 14-3-3, который связан со стимулированием активности Rap1b, что приводит к ее ингибированию [140, 143]. CalDAG-GEF1 является важным регулятором активации Rap1b в тромбоцитах. По аналогии с нокаутом по гену *Rap1b*, нокаут белка CalDAG-GEF1 у мышей приводит к пролонгированию времени кровотечения [144], блокированию агрегации тромбоцитов и, соответственно, к защите от артериальных тромбозов [145]. CalDAG-GEF1 содержит в своей структуре четыре предполагаемых сайта для фосфорилирования протеинкиназами A и G (Serins116, 117, 147, 587), которые являются очень консервативными среди CalDAG-GEF1 белков у млекопитающих. На интактных человеческих тромбоцитах при помощи метода фосфопротеомики было показано, что основным сайтом фосфорилирования CalDAG-GEF1 является Ser587. Фосфорилирование этого сайта PKA напрямую коррелирует с ингибированием активности Rap1b [146, 147]. Важно отметить, что в интактных человеческих тромбоцитах Ser587 фосфорилируется PKA и очень слабо PKG, что указывает на возможность существования различных путей ингибирования Rap1b этими киназами [147].

Атипичные Rho ГТФазы, такие как RhoB, RhoF и RhoG, также играют важную роль в различных активационных сигнальных путях в тромбоцитах [125], однако в литературе отсутствуют данные о регуляции функций данных ГТФаз, опосредованной PKG.

##### *5. Передача сигнала от рецепторов, ассоциированных с G-белками (GPCR)*

Основные агонисты активации тромбоцитов АДФ, тромбин и ТХА<sub>2</sub> активируют рецепторы, ассоциированные с G-белками (GPCRs), которые запускают передачу сигнала путем замены ГДФ на ГТФ на G $\alpha$  субъединице рецептора, в то время как

RGS (regulator of G-protein signaling), действуя как GAP, ускоряет гидролиз ГТФ, что способствует воссоединению  $G\alpha$  и  $G\beta\gamma$  субъединиц и завершает процесс передачи сигнала [148]. Было показано, что среди тромбоцитарных рецепторов, ассоциированных с G-белками (GPCR) только рецептор к  $TXA_2$  фосфорилируется PKA, что приводит к прямому ингибированию активности ГТФаза, специфичных для  $TXA_2$  [149]. Позже было показано PKG-опосредованное фосфорилирование рецептора к  $TXA_2$  по Ser331 в клетках НЕК 293 [150].

Из 37 различных RGS в тромбоцитах в основном присутствуют RGS10 и RGS18 [83, 151]. Функциональная активность RGS18 модулируется при помощи PKA и PKG через прямое фосфорилирование по Ser216 и при помощи PKA через фосфорилирование скэффолдного белка спинофилина (PPP1R9B) [152, 153]. Активация GPCR на тромбоцитах увеличивает фосфорилирование RGS18 по Ser49 (киназа не установлена), что способствует связыванию белка 14-3-3 с RGS18 и предотвращает RGS18-опосредованное ингибирование передачи сигнала от GPCR. Фосфорилирование RGS18 по Ser216, опосредованное PKG, предотвращает связывание 14-3-3 с RGS18, что способствует активности RGS18 для завершения передачи сигнала от GPCR [152]. Другие механизмы регуляции функций RGS18 в тромбоцитах относят к PKA, которая фосфорилирует спинофилин по Ser94 [153]. Ранее на нервных клетках было показано, что фосфорилирование спинофилина по Ser94 приводит к нарушению его взаимодействия с актиновыми филаментами [154]. В тромбоцитах спинофилин отчасти ассоциирован и формирует комплекс с RGS18 и SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1). Фосфорилирование спинофилина по Ser94, опосредованное PKA, приводит к увеличению концентрации свободного RGS18, что способствует завершению передачи сигнала от GPCR [153]. Последовательность аминокислот спинофилина рядом с Ser94 (VRLSL) свидетельствует о том, что данный сайт может быть субстратом для PKA, но не для PKG, что является наглядным примером того, как обе эти киназы по-разному могут быть вовлечены в регуляцию ингибирования тромбоцитов.

#### *6. Другие субстраты PKG в тромбоцитах*

В одном из самых исчерпывающих и относительно недавних обзорах о сигнализации циклических нуклеотидов, упоминается о 9 установленных субстратах PKG [22]. В последние годы не появилось новой информации относительно функций субстратов, описанных в обзоре, включая VASP, LASP, филамин-A, кальдесмон и PDE5, поэтому в данной работе мы не будем акцентировать свое внимание на этих белках. За прошедшее время были идентифицированы только четыре новых субстрата (CalDAG-GEF-1, RGS18, ARHGAP17 и ARHGEF6) и их функции в ингибировании активации тромбоцитов были детально описаны в нескольких работах [130, 147, 152]. Также нужно отметить фосфорилирование  $TXA_2$  рецептора по Ser331 [149, 150], которое не упоминалось в статье А. Smolenski [22]. Однако с уверенностью можно сказать, что в тромбоцитах содержится гораздо больше субстратов для PKG. В статье, посвященной данным по фосфопротеомике тромбоцитов, было описано 270 фосфорилируемых белков, и 23 из них содержали предполагаемый сайт фосфорилирования для PKA/PKG [155]. PKA и PKG содержат общую типичную последовательность (R/K|R/K|X|S/T) и во многих случаях могут фосфорилировать те же сайты на одинаковых белках-мишенях, таких как VASP, LASP, HSP27, RGS18, ARHGAP17, ARHGEF6 и другие. Соответственно, основываясь на совпадении субстратов, можно предположить, что молекулярные механизмы ингибирования тромбоцитов для PKA и PKG будут одинаковыми. С другой стороны, некоторые белки, содержащие одинаковую типичную последовательность, по непонятным причинам, могут специфически или предпочтительно фосфорилироваться PKA либо

PKG. Например, белок VASP фосфорилируется PKA предпочтительно по Ser157, тогда как PKG – по Ser239, однако при сильной активации любой из киназ фосфорилированию могут подвергаться оба сайта. При этом последствия фосфорилирования VASP по разным сайтам в тромбоцитах до сих пор неизвестны. В эндотелиальных клетках фосфорилирование VASP по Ser157 ингибирует его связывание с  $\alpha$ II-спектрином [156]. В человеческих тромбоцитах PDE5 специфически фосфорилируется PKG, но не PKA [21]. IRAG, который был описан как специфичный субстрат для PKG [120], может фосфорилироваться и PKA [157]. В нокаутных по IRAG мышинных тромбоцитах ингибирование высвобождения кальция из внутриклеточных хранилищ опосредовано PKG, но не PKA, что указывает на различия в регуляции кальциевой сигнализации упомянутыми киназами [120]. Активность Rap1b ингибируется PKA и PKG, однако только блокирование PKA коррелирует с мощным фосфорилированием CalDAG-GEF-1 по Ser587, тогда как тот же сайт слабо фосфорилируется PKG, из чего можно заключить, что в регуляцию активности белка Rap1b в тромбоцитах могут быть вовлечены разные механизмы [147]. В одной из наших работ было определено почти 300 белков, которые подвергаются PKA-опосредованному фосфорилированию. Среди них 137 содержат последовательность сайта фосфорилирования для PKA [157]. Очевидно, не все эти белки, но многие из них и, возможно, некоторые другие, могут быть специфическими субстратами для PKG.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель данного обзора заключалась в том, чтобы показать, насколько сложной является регуляция PKA/PKG ингибиторных путей в тромбоцитах. Также мы еще раз хотели подчеркнуть, что нет никаких надежных данных для обоснования “теории активирующей роли PKG” в тромбоцитах. Это особенно важно в клиническом аспекте, поскольку множество препаратов, включая вазодилататоры, прямые стимуляторы PKG, (например, недавно разработанный риоцигулат), ингибиторы PDE (дипиридамол или силденафил), которые стимулируют цГМФ/PKG сигнальный путь, используются в клинике для терапии различных заболеваний. В литературе нет данных о том, что эти препараты могут активировать функции тромбоцитов. Недавно разработанный метод количественной фосфопротеомики открывает новую эру в изучении внутриклеточной сигнализации, особенно в исследовании функций киназ/фосфатаз. Этот метод позволит определить новые субстраты определенных киназ, а анализ этих субстратов, их проверка и изучение участия в ингибирующих процессах в тромбоцитах могут стать основой для разработки новых лекарств, направленных на специфические аспекты функционирования тромбоцитов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом КОМФИ № 17-00-00141 (17-00-00139) и государственным заданием № АААА-А18-118012290371-3.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smith M., Drummond G.I., Khorana H.G.* Cyclic phosphates. IV. Ribonucleoside 3',5'-cyclic phosphates. A general method for synthesis and some properties. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 698–706. 1961.
2. *Ashman D.F., Lipton R., Melicow M.M., Price T.D.* Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11: 330–334. 1963.
3. *Haslam R.J., McClenaghan M.D.* Effects of collagen and of aspirin on the concentration of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate in human blood platelets: Measurement by a prelabeling technique. *Biochem. J.* 138(2): 317–320. 1974.

4. *Chiang T.M., Beachey E.H., Kang A.H.* Interaction of a chick skin collagen fragment (alpha1-CB5) with human platelets. Biochemical studies during the aggregation and release reaction. *J. Biol. Chem.* 250(17): 6916–6922. 1975.
5. *Haslam R.J., Davidson M.M., Davidson M.M., McClenaghan M.D.* Cytochalasin B, the blood platelet release reaction and cyclic GMP. *Nature.* 253(5491): 455–457. 1975.
6. *Davies T., Davidson M.M., McClenaghan M.D., Say A., Haslam R.J.* Factors affecting platelet cyclic GMP levels during aggregation induced by collagen and by arachidonic acid. *Thromb. Res.* 9(4): 387–405. 1976.
7. *Chiang T.M., Dixit S.N., Kang A.H.* Effect of cyclic 3',5'-guanosine monophosphate on human platelet function. *J. Lab. Clin. Med.* 88(2): 215–221. 1976.
8. *Haslam R.J., Davidson M.M., Davies T., Lynham J.A., McClenaghan M.D.* Regulation of blood platelet function by cyclic nucleotides. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9: 533–552. 1978.
9. *Haslam R.J., Davidson M.M., Fox J.E., Lynham J.A.* Cyclic nucleotides in platelet function. *Thromb. Haemost.* 40(2): 232–240. 1978.
10. *Henson P.M., Oades Z.G.* Activation of platelets by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. II. The role of serine proteases, cyclic nucleotides, and contractile elements in PAF-induced secretion. *J. Exp. Med.* 143(4): 953–968. 1976.
11. *Claesson H.E., Malmsten C.* On the interrelationship of prostaglandin endoperoxide G2 and cyclic nucleotides in platelet function. *Eur. J. Biochem.* 76(1): 277–284. 1977.
12. *Weiss A., Baenziger N.L., Atkinson J.P.* Platelet release reaction and intracellular cGMP. *Blood.* 52(3): 524–531. 1978.
13. *Haslam R.J., Salama S.E., Fox J.E.B., Lynham J.A., Davidson M.M.L.* Cellular Response Mechanism and their Biological Significance. In: *Platelets.* A. Rotman A., Meyer F.A., Gilter C., Silberberg A. New York. John Wiley & Sons Ltd: 213–231. 1980.
14. *Jang E.K., Azzam J.E., Dickinson N.T., Davidson M.M., Haslam R.J.* Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by nitroprusside. *Br. J. Haematol.* 117(3): 664–675. 2002.
15. *Takai Y., Kaibuchi K., Matsubara T., Nishizuka Y.* Inhibitory action of guanosine 3', 5'-monophosphate on thrombin-induced phosphatidylinositol turnover and protein phosphorylation in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101(1): 61–67. 1981.
16. *Nakashima S., Tohmatu T., Hattori H., Okano Y., Nozawa Y.* Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, polyphosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135(3): 1099–1104. 1986.
17. *Waldmann R., Bauer S., Gobel C., Hofmann F., Jakobs K.H., Walter U.* Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets. *Eur. J. Biochem.* 158(1): 203–210. 1986.
18. *Waldmann R., Nieberding M., Walter U.* Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur. J. Biochem.* 167(3): 441–448. 1987.
19. *Haslam R.J., Dickinson N.T., Jang E.K.* Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets. *Thromb. Haemost.* 82(2): 412–423. 1999.
20. *Lohmann S.M., Walter U.* Tracking functions of cGMP-dependent protein kinases (cGK). *Front. Biosci.* 10: 1313–1328. 2005.
21. *Walter U., Gambaryan S.* cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handb. Exp. Pharmacol.* 191: 533–548. 2009.
22. *Smolenski A.* Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 10(2): 167–176. 2012.
23. *Gambaryan S., Tsikas D.* A review and discussion of platelet nitric oxide and nitric oxide synthase: Do blood platelets produce nitric oxide from L-arginine or nitrite? *Amino Acids.* 47(9): 1779–1793. 2015.
24. *Hadden J.W., Hadden E.M., Haddox M.K., Goldberg N.D.* Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69(10): 3024–3027. 1972.
25. *Goldberg N.D., Haddox M.K.* Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 823–896. 1977.
26. *Li Z., Ajdic J., Eigenthaler M., Du X.* A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood.* 101(11): 4423–4429. 2003.
27. *Li Z., Xi X., Gu M., Feil R., Ye R.D., Eigenthaler M., Hofmann F., Du X.* A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell.* 112(1): 77–86. 2003.
28. *Massberg S., Sausbier M., Klatt P., Bauer M., Pfeifer A., Siess W., Fassler R., Ruth P., Krombach F., Hofmann F.* Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J. Exp. Med.* 189(8): 1255–1264. 1999.

29. *Gambaryan S., Geiger J., Schwarz U.R., Butt E., Begonja A., Oberfell A., Walter U.* Potent inhibition of human platelets by cGMP analogs independent of cGMP-dependent protein kinase. *Blood*. 103(7): 2593–2600. 2004.
30. *Gambaryan S., Kobsar A., Hartmann S., Birschmann I., Kuhlencordt P.J., Muller-Esterl W., Lohmann S.M., Walter U.* NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J. Thromb. Haemost.* 6(8): 1376–1384. 2008.
31. *Marshall S.J., Senis Y.A., Auger J.M., Feil R., Hofmann F., Salmon G., Peterson J.T., Burslem F., Watson S.P.* GPIb-dependent platelet activation is dependent on Src kinases but not MAP kinase or cGMP-dependent kinase. *Blood*. 103(7): 2601–2609. 2004.
32. *Walter U., Gambaryan S.* Roles of cGMP/cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Blood*. 104(8): 2609. 2004.
33. *Du X., Marjanovic J.A., Li Z.* On the roles of cGMP and glycoprotein Ib in platelet activation. *Blood*. 103(11): 4371–4372; author reply 4372–4373. 2004.
34. *Li Z., Zhang G., Marjanovic J.A., Ruan C., Du X.* A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279(41): 42469–42475. 2004.
35. *Marjanovic J.A., Li Z., Stojanovic A., Du X.* Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J. Biol. Chem.* 280(45): 37430–37438. 2005.
36. *Li Z., Zhang G., Feil R., Han J., Du, X.* Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin alphaIIb beta3. *Blood*. 107(3): 965–972. 2006.
37. *Yin H., Liu J., Li Z., Berndt M.C., Lowell C.A., Du, X.* Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway. *Blood*. 112(4): 1139–1146. 2008.
38. *Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X.* Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30(12): 2341–2349. 2010
39. *Bain J., McLaughlan H., Elliott M., Cohen P.* The specificities of protein kinase inhibitors: An update. *Biochem. J.* 371(Pt 1): 199–204. 2003.
40. *Burkhardt M., Glazova M., Gambaryan S., Vollkommer T., Butt E., Bader B., Heermeier K., Lincoln T.M., Walter U., Palmethofer A.* KT5823 inhibits cGMP-dependent protein kinase activity in vitro but not in intact human platelets and rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 275(43): 33536–33541. 2000.
41. *Kirkby N.S., Lundberg M.H., Chan M.V., Vojnovic I., Solomon A.B., Emerson M., Mitchell J.A., Warner T.D.* Blockade of the purinergic P2Y<sub>12</sub> receptor greatly increases the platelet inhibitory actions of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110(39): 15782–15787. 2013.
42. *Valtcheva N., Nestorov P., Beck A., Russwur M., Hillenbran M., Weinmeister P., Feil R.* The commonly used cGMP-dependent protein kinase type 1 (cGKI) inhibitor Rp-8-Br-PET-cG-MPS can activate cGKI in vitro and in intact cells. *J. Biol. Chem.* 284(1): 556–562. 2009.
43. *Nygaard G., Herfindal L., Kopperud R., Aragay A.M., Holmsen H., Doskeland S.O., Kleppe R., Selheim F.* Time-dependent inhibitory effects of cGMP-analogues on thrombin-induced platelet-derived microparticles formation, platelet aggregation, and P-selectin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449(3): 357–363. 2014.
44. *Werner K., Schwede F., Genieser H.G., Geiger J., Butt E.* Quantification of cAMP and cGMP analogs in intact cells: Pitfalls in enzyme immunoassays for cyclic nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 384(2): 169–176. 2011.
45. *Schwarz U.R., Kobsar A.L., Koksich M., Walter U., Eigenthaler M.* Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem. Pharmacol.* 60(9): 1399–1407. 2000.
46. *Garcia A., Quinton T.M., Dorsam R.T., Kunapuli S.P.* Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A<sub>2</sub> generation are essential for VWF/GPIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets. *Blood*. 106(10): 3410–3414. 2005.
47. *Begonja A.J., Geiger J., Rukoyatkina N., Rauchfuss S., Gambaryan S., Walter U.* Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A<sub>2</sub> and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Blood*. 109(2): 616–618. 2007.
48. *Berkels R., Klotz T., Sticht G., Englemann U., Klaus W.* Modulation of human platelet aggregation by the phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37(4): 413–421. 2001.
49. *Halcox J.P., Nour K.R., Zalos G., Mincemoyer R.A., Waclawiw M., Rivera C.E., Willie G., Ellahham S., Quyyumi A.A.* The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 40(7): 1232–1240. 2002.
50. *Dunkern T.R., Hatzelmann A.* The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. *Cell Signal.* 17(3): 331–339. 2005.

51. *Gudmundsdottir I.J., McRobbie S.J., Robinson S.D., Newby D.E., Megson I.L.* Sildenafil potentiates nitric oxide mediated inhibition of human platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337(1): 382–385. 2005.
52. *Villagra J., Shiva S., Hunter L.A., Machado R.F., Gladwin M.T., Kato G.J.* Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood.* 110(6): 2166–2172. 2007.
53. *Wilson L.S., Elbatarny H.S., Crawley S.W., Bennett B.M., Maurice D.H.* Compartmentation and compartment-specific regulation of PDE5 by protein kinase G allows selective cGMP-mediated regulation of platelet functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(36): 13650–13655. 2008.
54. *Apostoli G.L., Solomon A., Smallwood M.J., Winyard P.G., Emerson M.* Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. *J. Thromb. Haemost.* 12(11): 1880–1889. 2014.
55. *Zhang G., Han J., Welch E.J., Ye R.D., Voyno-Yasenetskaya T.A., Malik A.B., Du X., Li Z.* Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J. Immunol.* 182(12): 7997–8004. 2009.
56. *Vogel S., Bodenstein R., Chen Q., Feil S., Feil R., Rheinlaender J., Schaffer T.E., Bohn E., Frick J.S., Borst O., Munzer P., Walker B., Markel J., Csanyi G., Pagano P.J., Loughran P., Jessup M.E., Watkins S.C., Bullock G.C., Sperry J.L., Zuckerbraun B.S., Billiar T.R., Lotze M.T., Gawaz M., Neal M.D.* Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J. Clin. Invest.* 125(12): 4638–4654. 2015.
57. *Zhang S., Hu L., Zhai L., Xue R., Ye J., Chen L., Cheng G., Mruk J., Kunapuli S.P., Ding Z.* Nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor is expressed in platelets and enhances platelet activation and thrombosis. *Circulation.* 131(13): 1160–1170. 2015.
58. *Gambaryan S., Butt E., Kobsar A., Geiger J., Rukoyatkina N., Parnova R., Nikolaev V.O., Walter U.* The oligopeptide DT-2 is a specific PKG I inhibitor only in vitro, not in living cells. *Br. J. Pharmacol.* 167(4): 826–838. 2012.
59. *Lopes-Pires M.E., Naime A.C., Almeida Cardelli N.J., Anjos D.J., Antunes E., Marcondes S.* PKC and AKT Modulate cGMP/PKG Signaling Pathway on Platelet Aggregation in Experimental Sepsis. *PLoS One.* 10(9): e0137901. 2015.
60. *Yaguchi A., Lobo F.L., Vincent J.L., Pradier O.* Platelet function in sepsis. *J. Thromb. Haemost.* 2(12): 2096–2102. 2004.
61. *Stahl A.L., Svensson M., Morgelin M., Svanborg C., Tarr P.I., Mooney J.C., Watkins S.L., Johnson R., Karpman D.* Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 108(1): 167–176. 2006.
62. *Jayachandran M., Brunn G.J., Karnicki K., Miller R.S., Owen W.G., Miller V.M.* In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: Implications for thrombotic risk. *J. Appl. Physiol.* (1985) 102(1): 429–433. 2007.
63. *Sun Z.* Platelet TLR4: A critical link in pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 114(10): 1551–1553. 2014.
64. *Zhang G., Xiang B., Dong A., Skoda R.C., Daugherty A., Smyth S.S., Du X., Li Z.* Biphasic roles for soluble guanylyl cyclase (sGC) in platelet activation. *Blood.* 118(13): 3670–3679. 2011.
65. *Gambaryan S., Friebe A., Walter U.* Does the NO/sGC/cGMP/PKG pathway play a stimulatory role in platelets? *Blood.* 119(22): 5335–5336, author reply 5336–5337. 2012.
66. *Stojanovic A., Marjanovic J.A., Brovkoych V.M., Peng X., Hay N., Skidgel R.A., Du X.* A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. *J. Biol. Chem.* 281(24): 16333–16339. 2006.
67. *Marjanovic J.A., Stojanovic A., Brovkoych V.M., Skidgel R.A., Du X.* Signaling-mediated functional activation of inducible nitric-oxide synthase and its role in stimulating platelet activation. *J. Biol. Chem.* 283(43): 28827–28834. 2008.
68. *Rauchfuss S., Geiger J., Walter U., Renne T., Gambaryan S.* Insulin inhibition of platelet-endothelial interaction is mediated by insulin effects on endothelial cells without direct effects on platelets. *J. Thromb. Haemost.* 6(5): 856–864. 2008.
69. *Gambaryan S., Kobsar A., Rukoyatkina N., Herterich S., Geiger J., Smolenski A., Lohmann S.M., Walter U.* Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. *J. Biol. Chem.* 285(24): 18352–18363. 2010.
70. *Gambaryan S., Subramanian H., Rukoyatkina N., Herterich S., Walter U.* Soluble guanylyl cyclase is the only enzyme responsible for cyclic guanosine monophosphate synthesis in human platelets. *Thromb. Haemost.* 109(5): 973–975. 2013.
71. *Rukoyatkina N., Walter U., Friebe A., Gambaryan S.* Differentiation of cGMP-dependent and -independent nitric oxide effects on platelet apoptosis and reactive oxygen species production using platelets lacking soluble guanylyl cyclase. *Thromb. Haemost.* 106(5): 922–933. 2011.



72. Dangel O., Mergia E., Karlisch K., Groneberg D., Koesling D., Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J. Thromb. Haemost.* 8(6): 1343–1352. 2010.
73. Momi S., Caracchini R., Falcinelli E., Evangelista S., Gresele P. Stimulation of platelet nitric oxide production by nebulivol prevents thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34(4): 820–829. 2014.
74. Mo E., Amin H., Bianco I.H., Garthwaite J. Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *J. Biol. Chem.* 279(25): 26149–26158. 2004.
75. Balashova N., Chang F.J., Lamothe M., Sun Q., Beuve A. Characterization of a novel type of endogenous activator of soluble guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 280(3): 2186–2196. 2005.
76. Meurer S., Pioch S., Gross S., Muller-Esterl W. Reactive oxygen species induce tyrosine phosphorylation of and Src kinase recruitment to NO-sensitive guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 280(39): 33149–33156. 2005.
77. Kobsar A., Koessler J., Kehrer L., Gambaryan S., Walter U. The thrombin inhibitors hirudin and Refludan((R)) activate the soluble guanylyl cyclase and the cGMP pathway in washed human platelets. *Thromb. Haemost.* 107(3): 521–529. 2012.
78. Sharina I.G., Sobolevsky M., Papakyriakou A., Rukoyatkina N., Spyroulias G.A., Gambaryan S., Martin E. The fibrate gemfibrozil is a NO- and haem-independent activator of soluble guanylyl cyclase: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* 172(9): 2316–2329. 2015.
79. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(13): 5193–5197. 1990.
80. Chrapko W., Jurasz P., Jurasz P., Radomski M.W., Archer S.L., Newman S.C., Baker G., Lara N., Le Melleo J.M. Alteration of decreased plasma NO metabolites and platelet NO synthase activity by paroxetine in depressed patients. *Neuropsychopharmacology.* 31(6): 1286–1293. 2006.
81. Riba R., Sharifi M., Farndale R.W., Naseem K.M. Regulation of platelet guanylyl cyclase by collagen: evidence that Glycoprotein VI mediates platelet nitric oxide synthesis in response to collagen. *Thromb. Haemost.* 94(2): 395–403. 2005.
82. Ozuyaman B., Godecke A., Kusters S., Kirchhoff E., Scharf R. E., Schrader J. Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Thromb. Haemost.* 93(6): 1161–1167. 2005.
83. Burkhart J.M., Vaudel M., Vaudel M., Gambaryan S., Radau S., Walter U., Martens L., Geiger J., Sickmann A., Zahedi R.P. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 120(15): e73–e82. 2012.
84. Rowley J.W., Oler A.J., Tolley N.D., Hunter B.N., Low E.N., Nix D.A., Yost C.C., Zimmerman G.A., Weyrich A.S. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood.* 118(14): e1101–e1111. 2011.
85. Srihirun S., Sriwantana T., Unchern S., Kittikool D., Noulsri E., Pattanapanyasat K., Fucharoen S., Pikhova B., Schechter A.N., Sibmooh N. Platelet inhibition by nitrite is dependent on erythrocytes and deoxygenation. *PLoS One.* 7(1): e30380. 2012.
86. Park J.W., Pikhova B., Huang P.L., Noguchi C.T., Schechter A.N. Effect of blood nitrite and nitrate levels on murine platelet function. *PLoS One.* 8(2): e55699. 2013.
87. Akrawinhawong K., Park J.W., Pikhova B., Sibmooh N., Fucharoen S., Schechter A.N. A flow cytometric analysis of the inhibition of platelet reactivity due to nitrite reduction by deoxygenated erythrocytes. *PLoS One.* 9(3): e92435. 2014.
88. Liu C., Wajih N., Liu X., Basu S., Janes J., Marvel M., Keggi C., Helms C.C., Lee A.N., Belanger A.M., Diz D.I., Laurienti P., Caudell D.L., Wang J., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D. B. Mechanisms of Human Erythrocytic Bioactivation of Nitrite. *J. Biol. Chem.* 2014.
89. Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H., Patel R.P., Reiter C.D., Martyr S., Yang B.K., Waclawiw M.A., Zalos G., Xu X., Huang K.T., Shields H., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Cannon R.O., 3rd, Gladwin M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.* 9(12): 1498–1505. 2003.
90. Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. Mechanisms of nitrite bioactivation. *Nitric Oxide.* 38: 58–68. 2014.
91. Rassaf T., Fogel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: Oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ. Res.* 100(12): 1749–1754. 2007.
92. Millar T.M., Stevens C.R., Benjamin N., Eisenthal R., Harrison R., Blake D.R. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 427(2): 225–228. 1998.
93. Aamand R., Dalsgaard T., Jensen F. B., Simonsen U., Roepstorff A., Fago A. Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: A possible link between metabolic activity and vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297(6): H2068–H2074. 2009.
94. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Jax T., Kumara I., Gharini P., Kabanova S., Ozuyaman B., Schnurch H.G., Godecke A., Weber A.A., Robenek M., Robenek H.,

- Bloch W., Rosen P., Kelm M.* Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 107(7): 2943–2951. 2006.
95. *Cortese-Krott M.M., Rodriguez-Mateos A., Sansone R., Kuhnle G.G., Thasian-Sivarajah S., Krenz T., Horn P., Krisp C., Wolters D., Heiss C., Kroncke K.D., Hogg N., Feelisch M., Kelm M.* Human red blood cells at work: Identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*. 120(20): 4229–4237. 2012.
96. *Bohmer A., Beckmann B., Sandmann J., Tsikas D.* Doubts concerning functional endothelial nitric oxide synthase in human erythrocytes. *Blood*. 119(5): 1322–1323. 2012.
97. *Gambaryan S., Subramanian H., Kehrer L., Mindukshev I., Sudnitsyna J., Reiss C., Rukoyatkina N., Friebe A., Sharina I., Martin E., Walter U.* Erythrocytes do not activate purified and platelet soluble guanylate cyclases even in conditions favourable for NO synthesis. *Cell Commun. Signal*. 14(1):16. 2016.
98. *Moore S.F., van den Bosch M.T., Hunter R.W., Sakamoto K., Poole A.W., Hers I.* Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3)alpha/beta by protein kinase C (PKC)alpha and Akt promotes thrombin-mediated integrin alphaIIb beta3 activation and granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem*. 288(6): 3918–3928. 2013.
99. *Jones C.I., Sage T., Moraes L.A., Vaiyapuri S., Hussain U., Tucker K.L., Barrett N.E., Gibbins J.M.* Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 inhibits platelet response to thrombin and von Willebrand factor by regulating the internalization of glycoprotein Ib via AKT/glycogen synthase kinase-3/dynamin and integrin alphaIIb beta3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 34(9): 1968–1976. 2014.
100. *Laurent P.A., Severin S., Hechler B., Vanhaesebroeck B., Payrastra B., Gratacap M.P.* Platelet PI3Kbeta and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate. *Blood*. 125(5): 881–888. 2015.
101. *Lavogina D., Nickl C.K., Enkvist E., Raidaru G., Lust M., Vaasa A., Uri A., Dostmann W.R.* Adenosine analogue-oligo-arginine conjugates (ARCs) serve as high-affinity inhibitors and fluorescence probes of type I cGMP-dependent protein kinase (PKGIalpha). *Biochim. Biophys. Acta*. 1804(9): 1857–1868. 2010.
102. *Nickl C.K., Raidas S.K., Zhao H., Sausbier M., Ruth P., Tegge W., Brayden J.E., Dostmann W.R.* (D)-Amino acid analogues of DT-2 as highly selective and superior inhibitors of cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Biochim. Biophys. Acta*. 1804(3): 524–532. 2010.
103. *Marcondes S., Cardoso M.H., Morganti R.P., Thomazzi S.M., Lilla S., Murad F., De Nucci G., Antunes E.* Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: A role for alpha-actinin nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(9): 3434–3439. 2006.
104. *Kobsar A., Klinker E., Kuhn S., Koessler A., Yilmaz P., Boeck M., Koessler J.* Increasing susceptibility of nitric oxide-mediated inhibitory platelet signaling during storage of apheresis-derived platelet concentrates. *Transfusion*. 54(7): 1782–1789. 2014.
105. *Kobsar A., Simonis S., Klinker E., Koessler A., Kuhn S., Boeck M., Koessler J.* Specific inhibitory effects of the NO donor MAHMA/NONOate on human platelets. *Eur. J. Pharmacol*. 735: 169–176. 2014.
106. *Lies B., Groneberg D., Gambaryan S., Friebe A.* Lack of effect of ODO does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol*. 170(2): 317–327. 2013.
107. *Makhoul S., Walter E., Pagel O., Walter U., Sickmann A., Gambaryan S., Smolenski A., Zahedi R.P., Jurk K.* Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. *Nitric Oxide*. (76): 71–80. 2018.
108. *Jensen B.O., Selheim F., Doskeland S.O., Gear A.R., Holmsen H.* Protein kinase A mediates inhibition of the thrombin-induced platelet shape change by nitric oxide. *Blood*. 104(9): 2775–2782. 2004.
109. *Reiss C., Mindukshev I., Bischoff V., Subramanian H., Kehrer L., Friebe A., Stasch J.P., Gambaryan S., Walter U.* The sGC stimulator riociguat inhibits platelet function in washed platelets but not in whole blood. *Br. J. Pharmacol*. 172(21): 5199–5210. 2015.
110. *Mahaut-Smith M.P., Jones S., Evans R.J.* The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal*. 7(3): 341–356. 2011.
111. *Mindukshev I., Gambaryan S., Kehrer L., Schuetz C., Kobsar A., Rukoyatkina N., Nikolaev V.O., Krivchenko A., Watson S.P., Walter U., Geiger J.* Low angle light scattering analysis: A novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. *Clin. Chem. Lab. Med*. 50(7): 1253–1262. 2012.
112. *Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B.* Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 7(7): 1057–1066. 2009.
113. *Geiger J., Nolte C., Butt E., Sage S.O., Walter U.* Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89(3): 1031–1035. 1992.
114. *Geiger J., Nolte C., Walter U.* Regulation of calcium mobilization and entry in human platelets by endothelium-derived factors. *Am. J. Physiol*. 267(1 Pt 1): C236–C244. 1994.

115. *Komalavilas P., Lincoln T.M.* Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J. Biol. Chem.* 271(36): 21933–21938. 1996.
116. *Tertyshnikova S., Yan X., Fein A.* cGMP inhibits IP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J. Physiol. (Pt 1)*. 512: 89–96. 1998.
117. *Haug L.S., Jensen V., Hvalby O., Walaas S.I., Ostvold A.C.* Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J. Biol. Chem.* 274(11): 7467–7473. 1999.
118. *Betzenhauser M.J., Fike J.L., Wagner L.E. 2nd, Yule D.I.* Protein kinase A increases type-2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activity by phosphorylation of serine 937. *J. Biol. Chem.* 284(37): 25116–25125. 2009.
119. *Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong X., Huber A., Neubauer G., Wang G.X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., Hofmann F., Ruth P.* Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP<sub>3</sub> receptor and cGMP kinase I $\beta$ . *Nature*. 404(6774): 197–201. 2000.
120. *Antl M., von Bruhl M. L., Eiglsperger C., Werner M., Konrad I., Kocher T., Wilm M., Hofmann F., Massberg S., Schlossmann J.* IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*. 109(2): 552–559. 2007.
121. *Schinner E., Salb K., Schlossmann J.* Signaling via IRAG is essential for NO/cGMP-dependent inhibition of platelet activation. *Platelets*. 22(3): 217–227. 2011.
122. *Yao X.* TRPC, cGMP-dependent protein kinases and cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Handb. Exp. Pharmacol.* (179): 527–540. 2007.
123. *Hassock S.R., Zhu M.X., Zhu M.X., Trost C., Flockertz V., Authi K.S.* Expression and role of TRPC proteins in human platelets: Evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood*. 100(8): 2801–2811. 2002.
124. *Jones S., Solomon A., Sanz-Rosa D., Moore C., Holbrook L., Cartwright E.J., Neyses L., Emerson M.* The plasma membrane calcium ATPase modulates calcium homeostasis, intracellular signaling events and function in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 8(12): 2766–2774. 2010.
125. *Goggs R., Williams C.M., Mellor H., Poole A.W.* Platelet Rho GTPases—a focus on novel players, roles and relationships. *Biochem. J.* 466(3): 431–442. 2015.
126. *Sawada N., Itoh H., Yamashita J., Doi K., Inoue M., Masatsugu K., Fukunaga Y., Sakaguchi S., Sone M., Yamahara K., Yurugi T., Nakao K.* cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280(3): 798–805. 2001.
127. *Aburima A., Wraith K.S., Raslan Z., Law R., Magwenzi S., Naseem K.M.* cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood*. 122(20): 3533–3545. 2013.
128. *Gratacap M.P., Payrastrre B., Nieswandt B., Offermanns S.* Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 276(51): 47906–47913. 2001.
129. *Fryer B.H., Wang C., Vedantam S., Zhou G.L., Jin S., Fletcher L., Simon M.C., Field J.* cGMP-dependent protein kinase phosphorylates p21-activated kinase (Pak) 1, inhibiting Pak/Nck binding and stimulating Pak/vasodilator-stimulated phosphoprotein association. *J. Biol. Chem.* 281(17): 11487–11495. 2006.
130. *Nagy Z., Wynne K., von Kriegsheim A., Gambaryan S., Smolenski A.* Cyclic Nucleotide-dependent Protein Kinases Target ARHGAP17 and ARHGEF6 Complexes in Platelets. *J. Biol. Chem.* 290(50): 29974–29983. 2015.
131. *Chahdi A., Sorokin A.* Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates beta1Pix guanine nucleotide exchange factor activity through 14-3-3beta binding. *Mol. Cell. Biol.* 28(5): 1679–1687. 2008.
132. *Klinz F.J., Seifert R., Schwaner I., Gausepohl H., Frank R., Schultz G.* Generation of specific antibodies against the rap1A, rap1B and rap2 small GTP-binding proteins. Analysis of rap and ras proteins in membranes from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 207(1): 207–213. 1992.
133. *Franke B., Akkerman J.W., Bos J.L.* Rapid Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.* 16(2): 252–259. 1997.
134. *Franke B., van Triest M., de Bruijn K.M., van Willigen G., Nieuwenhuis H.K., Negrier C., Akkerman J.W., Bos J.L.* Sequential regulation of the small GTPase Rap1 in human platelets. *Mol. Cell. Biol.* 20(3): 779–785. 2000.
135. *Lova P., Paganini S., Sinigaglia F., Balduini C., Torti M.* A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets. *J. Biol. Chem.* 277(14): 12009–12015. 2002.
136. *Woulfe D., Jiang H., Mortensen R., Yang J., Brass L.F.* Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets. *J. Biol. Chem.* 277(26): 23382–23390. 2002.

137. Lova P., Paganini S., Hirsch E., Barberis L., Wymann M., Sinigaglia F., Balduini C., Torti M. A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B. *J. Biol. Chem.* 278(1): 131–138. 2003.
138. Chrzanowska-Wodnicka M., Smyth S.S., Schoenwaelder S.M., Fischer T.H., White G.C. 2nd. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J. Clin. Invest.* 115(3): 680–687. 2005.
139. Danielewski O., Schultess J., Smolenski A. The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I. *Thromb. Haemost.* 93(2): 319–325. 2005.
140. Schultess J., Danielewski O., Smolenski A. Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets. *Blood.* 105(8): 3185–3192. 2005.
141. Kawata M., Kikuchi A., Hoshijima M., Yamamoto K., Hashimoto E., Yamamura H., Takai Y. Phosphorylation of smg p21, a ras p21-like GTP-binding protein, by cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system and in response to prostaglandin E1 in intact human platelets. *J. Biol. Chem.* 264(26): 15688–15695. 1989.
142. Hoffmeister M., Riha P., Neumuller O., Danielewski O., Schultess J., Smolenski A.P. Cyclic nucleotide-dephosphorylation of smg p21, a ras p21-like GTP-binding protein, by cyclic AMP-dependent protein kinase in platelets. *J. Biol. Chem.* 283(4): 2297–2306. 2008.
143. Miura Y., Kaibuchi K., Itoh T., Corbin J.D., Francis S.H., Takai Y. Phosphorylation of smg p21B/rap1B p21 by cyclic GMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 297(1–2): 171–174. 1992.
144. Crittenden J.R., Bergmeier W., Zhang Y., Piffath C.L., Liang Y., Wagner D.D., Housman D.E., Graybiel A.M. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat. Med.* 10(9): 982–986. 2004.
145. Stolla M., Stefanini L., Roden R.C., Chavez M., Hirsch J., Greene T., Ouellette T.D., Maloney S.F., Diamond S.L., Poncz M., Woulfe D.S., Bergmeier W. The kinetics of alphaIIb beta3 activation determines the size and stability of thrombi in mice: Implications for antiplatelet therapy. *Blood.* 117(3): 1005–1013. 2011.
146. Guidetti G.F., Manganaro D., Consonni A., Canobbio I., Balduini C., Torti M. Phosphorylation of the guanine-nucleotide-exchange factor CalDAG-GEFI by protein kinase A regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of platelet Rap1b GTPase. *Biochem. J.* 453(1): 115–123. 2013.
147. Subramanian H., Zahedi R.P., Sickmann A., Walter U., Gambaryan S. Phosphorylation of CalDAG-GEFI by protein kinase A prevents Rap1b activation. *J. Thromb. Haemost.* 11(8): 1574–1582. 2013.
148. Hollinger S., Hepler J.R. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* 54(3): 527–559. 2002.
149. Wang G.R., Zhu Y., Halushka P.V., Lincoln T.M., Mendelsohn M. E. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(9): 4888–4893. 1998.
150. Yamamoto S., Yan F., Zhou H., Tai H.H. Serine 331 is the major site of receptor phosphorylation induced by agents that activate protein kinase G in HEK 293 cells overexpressing thromboxane receptor alpha. *Arch. Biochem. Biophys.* 393(1): 97–105. 2001.
151. Ma P., Cierniewska A., Signarvic R., Cieslak M., Kong H., Sinnamon A.J., Neubig R.R., Newman D.K., Stalker T.J., Brass L.F. A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling. *Blood.* 119(8): 1935–1945. 2012.
152. Gegenbauer K., Elia G., Blanco-Fernandez A., Smolenski A. Regulator of G-protein signaling 18 integrates activating and inhibitory signaling in platelets. *Blood.* 119(16): 3799–3807. 2012.
153. Ma P., Ou K., Sinnamon A.J., Jiang H., Siderovski D.P., Brass L.F. Modulating platelet reactivity through control of RGS18 availability. *Blood.* 126(24): 2611–2620. 2015.
154. Hsieh-Wilson L.C., Benfenati F., Snyder G.L., Allen P.B., Nairn A.C., Greengard P. Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 278(2): 1186–1194. 2003.
155. Zahedi R.P., Lewandrowski U., Wiesner J., Wortelkamp S., Moebius J., Schutz C., Walter U., Gambaryan S., Sickmann A. Phosphoproteome of resting human platelets. *J. Proteome Res.* 7(2): 526–534. 2008.
156. Benz P.M., Blume C., Moebius J., Oschatz C., Schuh K., Sickmann A., Walter U., Feller S.M., Renne T. Cytoskeleton assembly at endothelial cell-cell contacts is regulated by alphaII-spec-trin-VASP complexes. *J. Cell Biol.* 180(1): 205–219. 2008.
157. Beck F., Geiger J., Gambaryan S., Veit J., Vaudel M., Nollau P., Kohlbacher O., Martens L., Walter U., Sickmann A., Zahedi R.P. Time-resolved characterization of cAMP/PKA-dependent signaling reveals that platelet inhibition is a concerted process involving multiple signaling pathways. *Blood.* 123(5): e1–e10. 2014.

**NO/cGMP Pathways in Platelets****S. P. Gambaryan<sup>a, \*</sup>, V. S. Shpakova<sup>a</sup>**<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia**\*e-mail: gambaryan.stepan@gmail.com*

**Abstract**—In circulated blood, platelets are controlled by stimulatory and inhibitory factors and tightly regulated equilibrium between these two opposing processes is essential for normal platelet and vascular function. NO/cGMP/PKG pathway plays one of the most significant roles in platelet inhibition. However, recently in the literature appeared some new hypothesis that PKG pathway plays a stimulatory or dual role in platelets. Three main points are in the focus of our review i) stimulatory, or dual role of PKG in platelets with a particular emphasis on the pitfalls, artifacts, and incorrect interpretations of the data that leads to developing these new hypotheses, ii) data on new PKG substrates in platelets which are involved in different mechanisms of PKG-mediated platelet inhibition, and iii) clinical aspects of NO-liberating drugs and sGC activation. In conclusions, we suggested that recently developed quantitative phosphoproteomic method might be one of the most powerful tools for analysis of PKG-mediated effects. Analysis of phosphoproteins in PKG activated platelets will reveal many new PKG substrates. Future validations of these substrates and their involvement on different platelet inhibitory pathways could be a basis for the development of new antiplatelet drugs that might target only specific aspects of platelet functions.

*Keywords:* platelets, protein kinase G, cyclic guanosine monophosphate, nitrogen oxide

**ЦИТИРОВАТЬ:**

Гамбарян С.П., Шпакова В.С. NO/цГМФ сигнальный путь в тромбоцитах. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(8): 933–953.

DOI: 10.1134/S0869813919080053

**TO CITE THIS ARTICLE:**

Gambaryan S.P., Shpakova V.S. NO/cGMP pathways in platelets. Russian Journal of Physiology. 105(8): 933–953.

DOI: 10.1134/S0869813919080053