

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ РАН

На правах рукописи

ПОДОПЛЕРОВА Надежда Александровна

**Взаимодействие факторов свертывания крови с
субпопуляциями активированных тромбоцитов**

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
М.А. Пантелеев

Москва 2017

Введение	5
Глава 1. Обзор литературы	10
1.1 Свертывание крови	10
1.2 Тромбоциты и их субпопуляции	12
1.3 Мембранно-зависимые реакции в свертывании крови	22
1.3.1 Комплекс протромбиназы и внутренней теназы	22
1.3.2 Механизмы мембранно-зависимых реакций	25
1.4 Взаимодействие факторов свертывания с субпопуляциями активированных тромбоцитов	27
1.4.1 Витамин К-зависимые факторы (VII(a), IX(a), X(a), а также протромбин, протеины C, S и Z).....	27
1.4.2 Кофакторы Va и VIIIa	29
1.4.3 Тканевый фактор и тромбомодулин.....	30
1.4.4 Факторы, взаимодействующие с тромбоцитами и микровезикулами через рецепторы	31
Постановка задачи	32
Глава 2. Материалы и методы.....	33
2.1 Материалы	33
2.2 Пациенты	35
2.3 Методы.....	36
2.3.1 Выделение тромбоцитов из цельной крови	36
2.3.2 Конъюгирование факторов свертывания с флуоресцентной меткой	36
2.3.3 Подготовка искусственных фосфолипидных везикул	37
2.3.4 Равновесное связывание факторов X и Xa с активированными тромбоцитами и искусственными фосфолипидными везикулами.....	38
2.3.5 Исследование кинетики взаимодействия факторов X и Xa с активированными тромбоцитами и искусственными фосфолипидными везикулами	39

2.3.6 Исследование взаимодействия фактора Ха с тромбоцитарным тромбом в условиях потока.....	40
2.3.7 Исследование взаимодействия фактора X с фосфолипидными мембранами методом плазмонного резонанса	41
2.3.8 Визуализация олигомеров фактора X и Аннексина V	41
2.3.9 Равновесное связывание фактора XII тромбоцитами.....	42
2.3.10 Микроскопическое исследование распределения кофакторов V и VIII на мембране активированных тромбоцитов.....	42
2.3.11 Микроскопическое исследование распределения факторов IXa, Ха, X, протромбина, а также аннексина V на мембране активированных тромбоцитов	43
2.3.12 Измерение скорости активации фактора X комплексом внутренней теназы	44
2.3.13 Исследование ультраструктуры тромбоцитов методом трансмиссионная электронная микроскопия.....	44
2.3.14 Исследование ультраструктуры тромбоцитов методом сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком.....	45
2.3.15 Исследование распределения аннексина V и факторов свертывания в тромбоцитарном тромбе	45
2.3.16 Статистическая обработка.....	46
Глава 3. Результаты.....	47
3.1 Механизмы взаимодействия факторов свертывания X и Ха с фосфолипидными мембранами	47
3.1.1 Взаимодействие факторов X и Ха с мембраной активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции.....	47
3.1.2 Кинетические характеристики связывания факторов X и Ха с мембраной фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов	50
3.1.3 Взаимодействие факторов X и Ха с фосфолипидными везикулами...	54
3.1.4 Взаимодействие факторов X и Ха с активированными тромбоцитами у пациентов с синдромом серых тромбоцитов.....	54

3.1.5	Исследование взаимодействия фактора X с фосфолипидной мембраной методом поверхностного плазмонного резонанса	56
3.1.6	Влияние различных условий на взаимодействие факторов X и Xa с фосфолипидной мембраной	57
3.1.7	Сравнение кинетики взаимодействия ФХ и ФХа с фосфолипидными везикулами при различных концентрациях факторов.....	59
3.1.8	Возможность гетероолигомеризации факторов X и Xa	60
3.1.9	Взаимодействие факторов X и Xa с тромбоцитарным тромбом	61
3.1.10	Визуализация олигомеров фактора X и Аннексина V.....	63
3.2	Взаимодействие фактора XII с активированными тромбоцитами.....	64
3.3	Распределение факторов на мембране активированных тромбоцитов	67
3.3.1	Распределение Аннексина V	67
3.3.2	Распределение факторов.....	69
3.3.3	Распределение кофакторов	71
3.3.4	Распределение факторов у пациентов с синдромом серых тромбоцитов.....	73
3.3.5	Влияние концентрирования факторов на ускорение мембранных реакций	74
3.3.6	Изменение морфологии тромбоцитов при активации.....	75
3.3.7	Ультраструктура активированных тромбоцитов	76
3.3.8	Распределение аннексина V и факторов свертывания в тромбоцитарном тромбе	79
Глава 4. Обсуждение		81
Заключение.....		85
Выводы.....		86
Список сокращений и обозначений.....		87
Благодарности.....		88
Список литературы.....		89

Введение

Актуальность темы

Свертывание крови представляет собой сложную сеть биохимических реакций, направленных на остановку кровотечения. Основные реакции свертывания крови протекают на отрицательно заряженных фосфолипидных поверхностях, в отсутствие которых большинство ферментов проявляют незначительную активность по отношению к своим субстратам. Связывание факторов свертывания с фосфолипидными поверхностями, по-видимому, приводит к увеличению их локальной концентрации, а также к конформационным изменениям, обеспечивающим оптимальное взаимодействие фермента, кофактора и субстрата. В организме человека такие поверхности предоставляют активированные тромбоциты. Все ранние работы по характеристике взаимодействия факторов свертывания с тромбоцитами были сделаны на гомогенных суспензиях клеток. Однако в начале 2000-х годов было обнаружено, что при сильной активации тромбоциты разделяются на две субпопуляции, принципиально отличающиеся по своим свойствам. Было показано, что факторы свертывания преимущественно связываются только с одной субпопуляцией, которая характеризуется наличием фосфатидилсерина на внешнем слое клеточной мембраны. Однако, несмотря на это для большинства факторов при изучении их взаимодействия с активированными тромбоцитами, гетерогенность тромбоцитов по-прежнему не учитывается. Таким образом, необходимо охарактеризовать связывание факторов свертывания с активированными тромбоцитами с учетом их деления на субпопуляции.

Кроме того, в последние годы было обнаружено, что субпопуляция фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов имеет повышенную концентрацию альфа-гранулярных белков на своей мембране, среди которых фактор V. В недавних работах было показано, что некоторые альфа-гранулярные белки (такие как, фибриноген и тромбоспондин), сконцентрированы в небольшой области тромбоцитарной мембраны. Кроме того сообщалось, что фактор XIIIa и

плазминоген также сконцентрированы в небольшой области тромбоцитарной мембраны, а не равномерно распределены по всей поверхности клетки.

Таким образом, можно предположить, что фактор V будет распределен на мембране тромбоцитов аналогичным образом. В литературе есть данные, что фактор V является высокоаффинным сайтом связывания для фактора Ха. В связи с этим было бы интересно изучить влияние фактора V на взаимодействие фактора Ха с тромбоцитарной мембраной.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – исследовать взаимодействие факторов свертывания крови с мембранами субпопуляций активированных тромбоцитов

Задачи:

- 1) Исследовать зависимость равновесного связывания факторов свертывания X и Ха с активированными тромбоцитами от их концентрации
- 2) Исследовать кинетические характеристики связывания факторов свертывания X и Ха с активированными тромбоцитами
- 3) Сравнить распределение факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляций;
- 4) Изучить распределение факторов свертывания на поверхности тромбоцитов при формировании тромбоцитарного тромба в проточной камере.

Научная новизна. Количественно охарактеризовано связывание факторов X и Ха с субпопуляциями активированных тромбоцитов и искусственными фосфолипидными везикулами. Обнаружено, что взаимодействие факторов X и Ха с фосфолипидными мембранами — многостадийный процесс, который не может быть описан классической моделью обратимого одношагового связывания: процесс ассоциации-диссоциации протекает с гистерезисом. Показано, что механизмы закрепления на мембране для факторов X и Ха различаются. Для фактора Ха основную роль играет мультимеризация, в том числе могут образовываться гетеромультимеры факторов X и Ха, которые хуже диссоциируют с мембраны, чем мономеры. Закрепление фактора X на фосфолипидной мембране

происходит за счет его стабилизации. Мультимеризация фактора Ха может препятствовать его вымыванию из тромба в условиях потока. Охарактеризовано распределение факторов свертывания IXa, Ха, X, V / Va, VIII / VIIIa, протромбина, а также аннексина V на мембране ФС-положительных тромбоцитов. Показано, что данные факторы и аннексин V в основном локализованы в небольшой области мембраны, где их средняя концентрация выше в несколько раз. Подобное концентрирование факторов может приводить к ускорению до 50 раз реакции активации фактора X комплексом внутренней теназы.

Научно-практическое значение результатов данной работы связано с вкладом в понимание механизмов мембранно-зависимых реакций свертывания крови и взаимодействия факторов системы свертывания с фосфолипидными везикулами и активированными тромбоцитами. Результаты данной работы могут быть использованы для создания новых методов диагностики и терапии нарушений гемостаза.

Методология и методы исследования. Для исследования взаимодействия факторов X/Ха с фосфолипидными везикулами и активированными тромбоцитами использовался метод проточной цитофлуориметрии. Кроме того полученные данные были подтверждены методом поверхностного плазмонного резонанса. Взаимодействие фактора Ха с тромбоцитарным тромбом в условиях потока, а также распределения факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов исследовали в плоскопараллельных проточных камерах методом конфокальной микроскопии. Для исследования ультраструктуры активированных тромбоцитов были использованы методы трансмиссионной электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком.

Положения, выносимые на защиту:

1. Взаимодействие факторов X и Ха с фосфолипидными мембранами — многостадийный процесс, который не может быть описан классической моделью

одношагового связывания. Процесс ассоциации-диссоциации факторов протекает с гистерезисом.

2. Механизмы закрепления на мембране для факторов X и Xa различаются. Для фактора Xa основную роль, играет мультимеризация, в том числе могут образовываться гетеромультимеры FX и FXa. Закрепление фактора X на фосфолипидной мембране происходит благодаря наличию промежуточных состояний.

3. Мультимеризация фактора Xa может препятствовать его вымыванию из тромба в условиях потока;

4. Все изученные факторы свертывания, IXa, Xa, X, V / Va, VIII / VIIIa, протромбин, а также аннексин V распределены неоднородно на мембране ФС-положительных тромбоцитов, и в основном локализованы в небольшой области мембраны, где их средняя концентрация выше в несколько раз. Подобное концентрирование факторов может приводить к ускорению в 50 раз реакции активации фактора X комплексом внутренней теназы.

Личный вклад автора. Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены при личном участии автора. Все работы по исследованию связывания факторов свертывания X и Xa с активированными тромбоцитами, сравнение распределения факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляций; и изучение распределения факторов свертывания на поверхности тромбоцитов при формировании тромбоцитарного тромба в проточной камере, а также написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились либо лично автором, либо при непосредственном участии автора.

Достоверность и обоснованность результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых методов, таких как проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия с фокусированным ионным пучком. Также достоверность результатов обеспечивалась использованием аттестованных средств измерения,

удовлетворительной оценкой погрешности измерений, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, полученных различными методами исследования.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на V Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, Россия, 31 января- 3 февраля 2012); VI Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечнососудистой хирургии (Москва, Россия, 31.01.2013-02.02.2013); 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 06.07.2013-11.07.2013); XXIV congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Амстердам, Нидерланды, 29.06.2013-11.07.2013); 39th FEBS Congress (Париж, Франция, 30.08.2014-04.09.2014); 2nd EUPLAN Conference (Бешенберг, Франция, 24.09.2014-26.09.2014); XXIV congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Торонто, Канада, 20.06.2015-25.06.2015); 62nd Annual Meeting of the Scientific and Standardisation Committees of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Монпелье, Франция, 25.05.2016-28.05.2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 публикаций. Статей в рецензируемых журналах – 7; публикаций в трудах конференций и съездов – 9.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), результатов (глава 3), обсуждения (глава 4), заключение, выводы, список сокращений и обозначений, благодарности и список цитированной литературы (128 библиографических ссылок). Работа содержит 40 рисунков и 1 таблицу.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Свертывание крови

Свертывание крови представляет собой сложную сеть ферментативных реакций, в основе которой лежит каскад сериновых протеиназ (Рисунок 1).

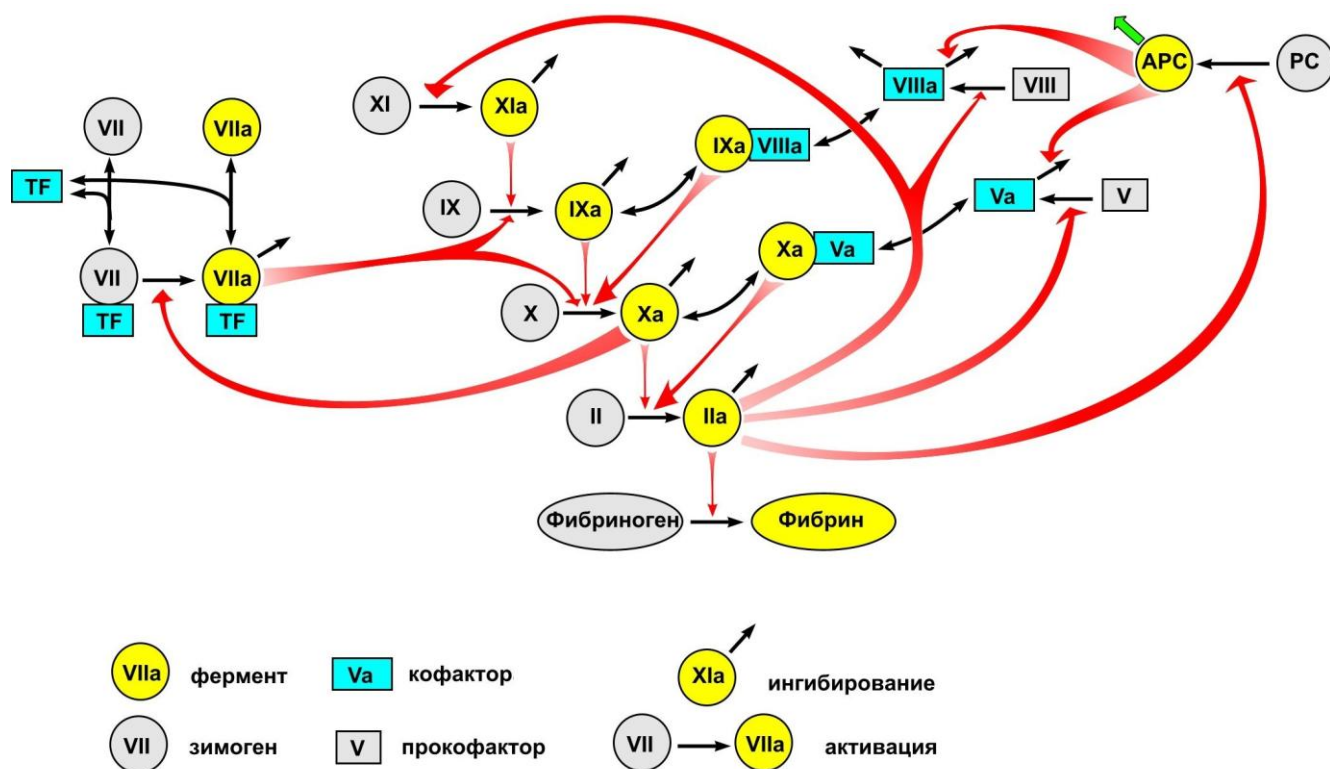


Рисунок 1. Основные реакции плазменной системы свертывания крови. Реакции активации факторов свертывания показаны односторонними черными стрелками. Красные фигурные стрелки показывают под действием, каких именно ферментов происходит эта активация. Обратимые реакции формирования комплексов показаны двухсторонними черными стрелками [1]

В самом низу этого каскада находится реакция превращения растворимого белка фибриногена в фибрин и его последующая полимеризация [2]. Именно эта реакция является главной в каскаде свертывания и отвечает за переход плазмы из жидкого состояния в гелеобразное и остановку кровотечения при повреждении сосуда. Все остальные реакции каскада выполняют исключительно регуляторную роль, их задача обеспечить быстрое и локальное превращение фибриногена в

фибрин. Нарушения в балансе свертывания крови ведут к кровотечениям и тромбозам, которые в настоящее время являются ведущей причиной смертности в мире.

Стоит отметить, что кроме основной своей задачи – остановки кровотечения каскад свертывания участвует в защите организма от различных внутренних повреждений и кровоизлияний, микротравм, которые постоянно возникают при любой мышечной нагрузке, заживлении ран, иммунном ответе, формировании сосудистой системы при ангиогенезе.

Важной особенностью свертывания крови является то, что все основные реакции протекают не в самой плазме, а на фосфолипидных мембранах различных клеток, а также микровезикул, которые эти клетки выплескивают [3–5].

К мембранно-зависимым реакциям относятся процесс запуска свертывания (на мембранах клеток обнажившегося субэндотелия, воспаленного эндотелия или активированных иммунных клеток, с участием кофактора тканевого фактора), все реакции основного каскада — активация факторов IX, X, II, а также активация фактора XI тромбином (на мембранах активированных тромбоцитов, эритроцитов, липопротеидов разных фракций и микровезикул разных типов), реакции пути протеина C и инактивации ферментов свертывания (на мембранах клеток эндотелия с участием кофакторов тромбомодулина, эндотелиального рецептора протеина C, гепаран сульфата), реакции контактного пути (предположительно, мембраны тромбоцитов и некоторых микровезикул с участием неизвестны кофакторов).

Во всем каскаде, есть только два типа реакций, напрямую не зависящих от фосфолипидных мембран — инактивация ферментов свертывания антитромбином и другими ингибиторами в плазме крови и активация факторов V, VIII, фибриногена тромбином. Однако и эти реакции не являются полностью безразличными к присутствию мембран. Так связанные с мембраной в составе белковых комплексов факторы IXa и Xa становятся не доступны для плазменных ингибиторов. Активация факторов V и VIII не тромбином, а фактором Xa уже является мембранно-зависимой.

Несмотря на такую тесную связь свёртывания крови и фосфолипидных мембран, механизмы мембранных реакций крайне плохо изучены. Можно предположить, что их роль заключается в ускорении процессов свертывания. На сегодняшний день существуют две гипотезы их ускорения. В соответствии с первой связывание факторов на фосфолипидной мембране приводит к увеличению их локальной концентрации за счет перехода из трехмерного в двухмерное пространство. Вторая гипотеза заключается в том, что мембрана является аллостерическим регулятором факторов, обеспечивая оптимальное взаимодействие факторов со своими кофакторами [6]. Но достоверно это не установлено. Для тех случаев, когда существует несколько типов поверхности для одной реакции, их сравнительные вклады непонятны.

1.2 Тромбоциты и их субпопуляции

Физиологическим источником фосфолипидных мембран могут выступать тромбоциты и их микровезикулы.

Тромбоциты представляют собой небольшие (2-4 мкм в диаметре) безъядерные клеточные фрагменты, которые циркулируют в кровотоке в концентрации 200-400 тыс.кл./мкл [7]. Традиционно их называют клетками, однако выяснение деталей их формирования и функционирования привело к отходу от этой терминологии. Это именно фрагменты, большие и сложно структурированные, генерируемые мегакариоцитами в костном мозге. В среднем от одного мегакариоцита может отделиться до 1000 тромбоцитов, каждый из которых циркулирует в кровотоке от 5 до 11 дней.

В кровотоке тромбоциты представляют собой двояковыпуклые диски, которые благодаря небольшому размеру свободно проходят через капилляры не меняя свою форму [8, 9]. Однако, при активации происходит перестройка цитоскелета и значительные морфологические изменения. Цитоскелет тромбоцитов представлен кольцом из тубулиновых микротрубочек, которое расположено на периферии клетки и разрушается при активации, а также

спектрином, который придает их оболочке упругость [8]. Стоит отметить, что внутренняя среда тромбоцита представляет собой сеть мембранных каналов, которая служит дополнительным источником мембраны при активации и способствует секреции гранул [10].

В цитоплазме клетки содержится множество гранул, которые подразделяют на три основных типа: альфа-гранулы, плотные гранулы (δ -гранулы) и лизосомы (Рисунок 2).

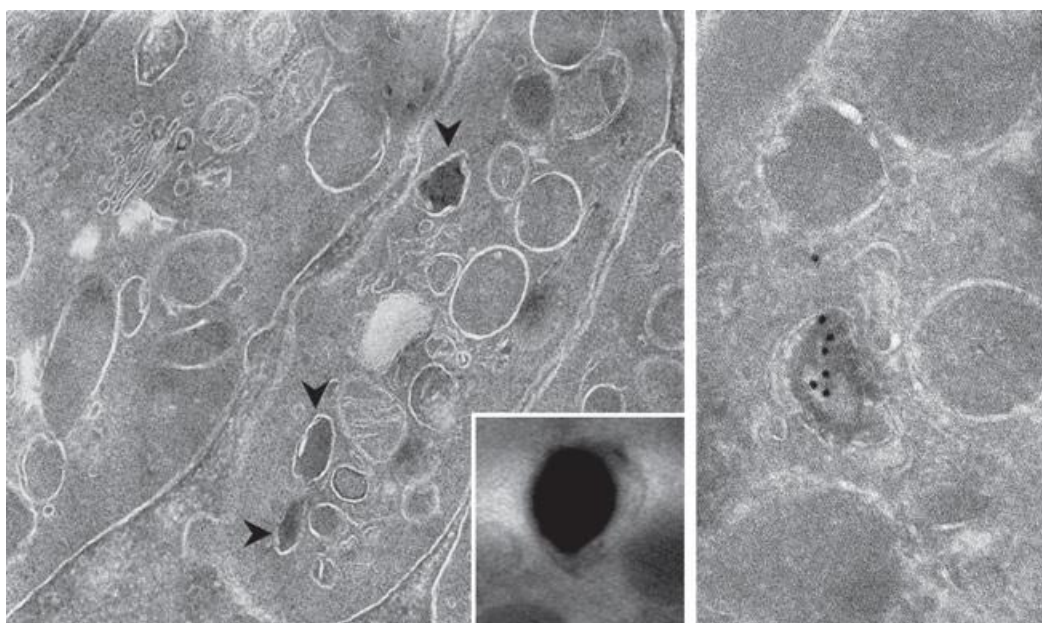


Рисунок 2. Основные типы тромбоцитарных гранул: альфа-гранулы, плотные гранулы (δ -гранулы) и лизосомы [11].

Самыми крупными (200-500 нм) и наиболее распространенными (50-80 штук на тромбоцит) гранулами тромбоцита являются альфа-гранулы [11]. Они преимущественно содержат белки такие, как факторы свертывания (фактор V и фактор Виллебранда), адгезионные белки (тромбоспондин, P-селектин, фибриноген, фибронектин, витронектин), а также большое количество медиаторов воспаления и ангиогенеза (тромбоцитарный фактор 4, интерлейкин-8, тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий фактор роста и фактор роста эндотелия сосудов) [12]. Внешняя мембрана гранул содержит P-селектина и интегрин α IIb β 3. На периферии гранул находятся каналцы (до 20 нм), содержащие мультимеры фактора Виллебранда. Некоторые альфа-гранулы также

имеют небольшие пузырьки (40-100 нм) или экзосомы, содержащие белок CD63 [10, 12].

Плотных гранул значительно меньше, чем альфа-гранул, от трех до восьми на тромбоцит. Они преимущественно содержат низкомолекулярные вещества, такие как АДФ/АТФ, кальций, магний и серотонин. Высокие концентрации этих веществ придают этим гранулам темный непрозрачный цвет на электронно-микроскопических фотографиях. Плотные гранулы играют важную роль в гемостазе в качестве механизма положительной обратной связи, высвобождающийся из них АДФ стимулирует рецептор P2Y₁₂ на тромбоцитах [13, 14].

В тромбоцитарных лизосомах содержатся кислые гидролазы такие, как катепсины, галактозидаза, арилсульфатаза, кислая фосфатаза и др., кроме того CD63 и LAMP-1/2, более характерные для плотных гранул. Функции лизосом в тромбоцитах на данный момент до конца не понятны. Предполагается, что секреция лизосомального содержимого может иметь важные внеклеточные функции, такие как фибринолиз и деградации компонентов внеклеточного матрикса, а также ремоделирование сосудистой сети [13, 14].

Тромбоциты являются ключевым элементом системы гемостаза. Они способны адгезировать к поверхности и агрегировать между собой, образуя тромбоцитарную бляшку. На начальных этапах формирования тромба важную роль играет способность тромбоцитов адгезировать к поврежденной стенке сосуда. Адгезия тромбоцитов в первую очередь происходит через фактор Виллебранда, который взаимодействует с тромбоцитарным рецептором гликопротеином Ib-V-IX [15, 16]. После адгезии к поврежденной стенке сосуда тромбоциты способны проходить через специализированный процесс изменения, называемый активацией [17].

Один из основных физиологических активаторов тромбоцитов – это коллаген, который представляет собой фибриллярный белок, входящий в состав соединительной ткани и обеспечивающий ее прочность и эластичность. Тромбоциты не прикрепляются к стенке не поврежденного сосуда, так как кровь

изолирована от коллагена эндотелием кровеносных сосудов, при повреждении которого происходит обнажение волокон коллагена, в результате чего тромбоциты адгезируют к месту повреждения [16, 18]. Стоит отметить, что не все типы коллагена при взаимодействии с тромбоцитами приводят к их активации.

Основную роль при активации тромбоцитов играет коллаген I и III типов [19]. На тромбоцитах выделяют три основных рецептора, отвечающих за взаимодействие с коллагеном. В первую очередь это интегрин $\alpha 2\beta 1$, отвечающий непосредственно за адгезию тромбоцитов к коллагену, кроме того, как все интегрины, является также и сигнальным рецептором и вносит вклад в активацию клеток [20–22]. Однако, главный сигнальный рецептор для коллагена – это гликопротеин VI. Коллаген при взаимодействии с гликопротеином VI приводит к повышению концентрации внутриклеточного кальция, секреции гранул, изменению формы, а так же появлению фосфатидилсерина на внешнем слое тромбоцитарной мембраны [23, 24]. Кроме того коллаген опосредованно через фактор Виллебранда способен взаимодействовать с гликопротеином Ib-V-IX. Так же, в литературе встречаются данные о других рецепторах коллагена, но эти данные спорные и рецепторы все еще плохо охарактеризованы.

Другой важный активатор тромбоцитов – это тромбин, который помимо активации тромбоцитов играет ключевую роль в каскаде свертывания крови, превращая фибриноген в фибрин. На тромбоцитах человека выделяют два основных тромбиновых рецептора сопряженных с G-белками – PAR1 и PAR4, а на тромбоцитах мышей – PAR3 и PAR4. Активация данных рецепторов происходит за счет отщепления их N-концевого фрагмента, что в свою очередь приводит к мгновенной активации тромбоцитов [25]. Главным, высокоаффинным тромбиновым рецептором считается PAR1. Он активируется низкими концентрациями тромбина около 50-200 пМ. PAR4 является низкоаффинным рецептором и вносит вклад в активацию тромбоцитов в случае ингибирования или десенсебилизации PAR1 [26–29]. Кроме того известно, что отличается кинетика активации тромбоцитов через рецепторы PAR1 и PAR4. Так, активация PAR1 приводит к мгновенной активации тромбоцитов, однако этот рецептор

быстро десенсибилизируется при высоких концентрациях тромбина. В то же время активация PAR4 приводит к более продолжительному ответу, который может поддерживаться даже при высоких концентрациях тромбина [30]. Активация тромбоцитов тромбином приводит к их агрегации, выбросу АДФ и АТФ, синтезу тромбоксана A₂, а также к появлению фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны [19].

Еще одним важным активатором тромбоцитов является АДФ (аденозиндифосфат), который секретируется из плотных гранул тромбоцитов, либо из поврежденных клеток сосудистого эндотелия [31]. Для нормальной активацией АДФ на мембране тромбоцита должны экспонироваться два пуриnergических рецептора P2Y₁ и P2Y₁₂ [32]. При активации тромбоцитов сильными активаторами такими, как тромбин и коллаген, происходит экспонирование дополнительного количества рецепторов P2Y₁ и P2Y₁₂ из α -гранул [33, 34]. В отличие от коллагена и тромбина АДФ является слабым активатором, так как не приводит к появлению фосфатидилсерина на внешнем слое тромбоцитарной мембраны, но способен вносит вклад в работу более сильных агонистов [35]. При активации тромбоцитов АДФ происходит выброс около 6% плотных гранул [36], синтез и выброс тромбоксана A₂ [37], кроме того тромбоциты изменяют свою форму, а также становятся способны к агрегации. В плазме крови АДФ гидролизуется до АМФ под действием АДФазы, которую секретируют лимфоциты и клетки эндотелия [38]. Кроме того, эритроциты также могут принимать участие в гидролизе АДФ до АМФ [39]. Этот процесс предотвращает появление в крови спонтанно активированных тромбоцитов.

Кроме АДФ в плотных гранулах тромбоцитов содержится почти в два раза больше АТФ [40]. АТФ взаимодействует с рецептором P2X₁, являющийся кальциевым каналом [19]. Даже небольшие концентрации АТФ приводят к быстрой десенсибилизации этого рецептора, а его восстановление происходит примерно за 5 минут в случае полного отсутствия АТФ [41]. АТФ играет вспомогательную роль при активации тромбоцитов другими агонистами, а так же очень важен при высоких скоростях сдвига, когда происходит задержка в

появлении других активаторов [42–48]. При этом АТФ может приводить к изменению формы тромбоцитов, быстрой и обратимой централизации секреторных гранул, но агрегация тромбоцитов при этом не происходит [19, 42, 49]. Попадая в плазму АТФ гидролизуется до АДФ под действием АТФазы, которая секретируется лимфоцитами и клетками эндотелия [38].

Так же к слабым активаторам относится тромбоксан А₂, который считается еще более слабым активатором, чем АДФ [31]. Его дополнительная функция – стимуляция вазоконстрикции. Единственный рецептор к тромбоксану А₂ на тромбоцитах – это ТР-рецептор. При активации тромбоцитов сильными активаторами такими, как тромбин и коллаген, происходит экспонирование дополнительного количества рецепторов из альфа-гранул [26]. При активации тромбоксаном А₂ тромбоциты меняют свою форму, становятся способны к агрегации, повышается уровень внутриклеточного кальция, а также происходит фосфорилирование белков [50]. В присутствии тромбоцитов тромбоксан А₂ гидролизуется до тромбоксана В₂, что сильно ограничивает область его распространения [19, 51].

Кроме того, существует несколько ингибиторов активации тромбоцитов, которые позволяют ограничить размер тромба в месте повреждения. К ингибиторам относятся простаглицлин и оксид азота (NO). Основную роль в ингибировании активации тромбоцитов играют клетки эндотелия, в которых синтезируется простаглицлин [52]. Для простаглицлина на тромбоцитах присутствует рецептор IP, сопряженный с G-белками [53]. Было показано, что при внутривенном введении простаглицлин перестает ингибировать активацию тромбоцитов примерно через 30 минут, хотя его период полураспада порядка 60 минут [19]. Так же одним из основных регуляторов гемостаза является оксид азота, который способен ингибировать активацию и агрегацию тромбоцитов. NO синтезируется многими типами клеток в том числе, тромбоцитами, эндотелиальными клетками и макрофагами [54]. Показано, что тромбоциты способны секретировать NO, при чем при активации этот процесс усиливается. Таким образом [55], простаглицлин и оксид азота способны регулировать рост

гемостатической пробки, предотвращая спонтанную активацию тромбоцитов.

Активированные тромбоциты становятся способными прикрепляться к месту повреждения и друг к другу, формируя пробку, перекрывающую повреждение. Кроме того, они участвуют в плазменном свертывании двумя основными способами — экспонированием прокоагулянтной мембраны и секрецией альфа-гранул.

Мембрана неактивированных тромбоцитов не способна поддерживать реакции свертывания. Хотя некоторые факторы свертывания могут связываться и с неактивированными тромбоцитами, активные ферментативные комплексы при этом не образуются [56]. Только после активации на внешнем слое клеточной мембраны появляются отрицательно заряженные фосфолипиды, в первую очередь фосфатидилсерин [57, 58]. Активация тромбоцитов имеет несколько степеней и экспрессия прокоагулянтных поверхностей является одной из высших [17, 59].

Было показано, что экспонирование отрицательно-заряженных фосфолипидов при активации, как правило, сосредоточено в одной тромбоцитарной субпопуляциях (Рисунок 3) [60–62]. Именно эта субпопуляция тромбоцитов представляет особый интерес для дальнейших исследований с точки зрения предположительного активного участия в формировании тромба.

Исследования механизма действия одного из наиболее успешных антитромботических препаратов клопидогрела (торговое наименование Плавикс) установили тесную связь между воздействием препарата и ингибированием субпопуляции тромбоцитов, экспонирующей отрицательно-заряженные фосфолипиды [63].

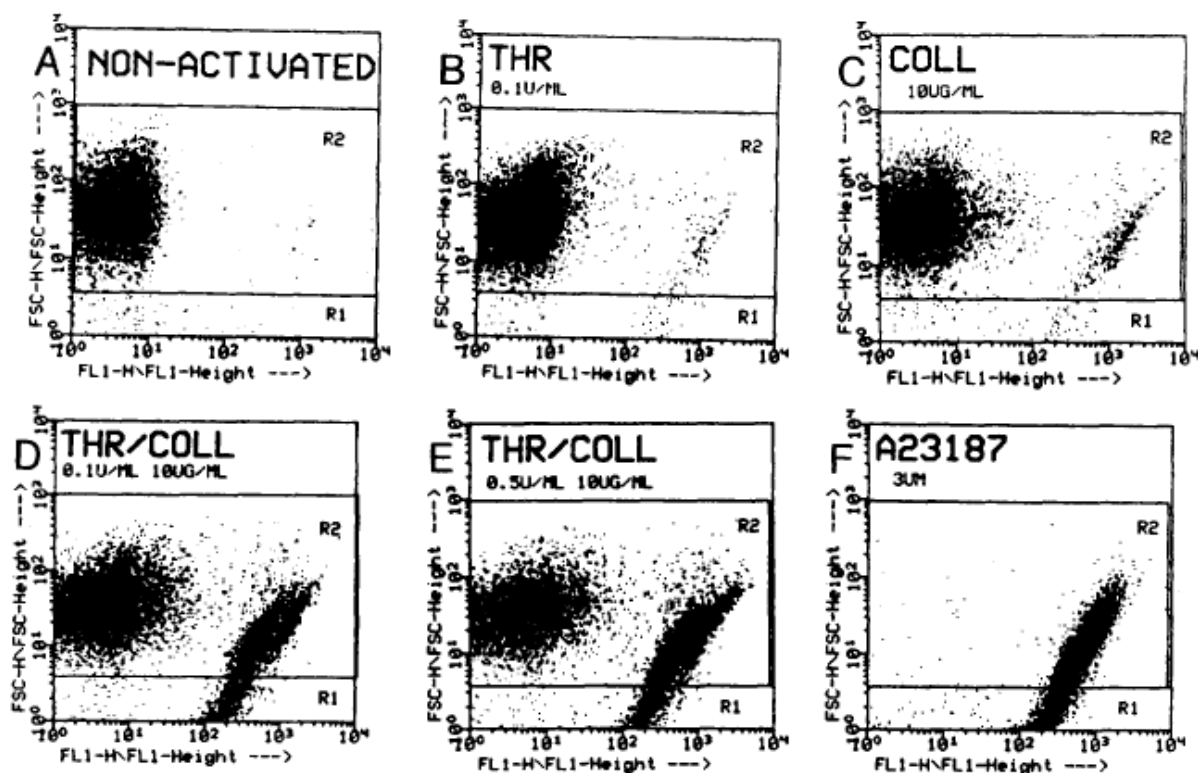


Рисунок 3. Связывание Аннексина V с неактивированными тромбоцитами (A), тромбоцитами активированными 0,1 U/мл тромбина (B), 10 мкг/мл коллагена (C); 0,1 U/мл тромбина + 10 мкг/мл коллагена (D), 0,5 U/мл тромбина + 10 мкг/мл коллагена (E), или 3 мкМ ионофора A23187 (F) [62].

Как было сказано выше, тромбоциты содержат несколько типов гранул, содержимое которых секретируется в процессе активации. Главными для свертывания являются α -гранулы, содержащие высокомолекулярные белки, такие как фактор V, фибриноген и др. При этом ранее было показано, что α -гранулярные белки неравномерно по мембране тромбоцитов, а сконцентрированы только в ее небольшой области. [64–67]

В течение длительного времени считалось, что тромбоциты гомогенны и за исключением обычных разбросов по размерам клетки не имеют ни морфологических, ни функциональных различий. Однако, еще в 60-х годах были описаны морфологические различия тромбоцитов, подвергнутых гипотоническому стрессу [68]. Кроме того в конце 90-х годов с помощью проточной цитометрии было показано, что Аннексин V (специфический маркер фосфатидилсерина) связывается не со всеми тромбоцитами, активированными

тромбином с коллагеном [62]. Так же было показано, что при адгезии на коллаген примерно половина тромбоцитов начинает связывать Аннексин V, в то же время при добавлении тромбина доля таких клеток увеличивается до 80% [69]. Было обнаружено, что при активации тромбином с коллагеном появляется субпопуляция клеток, экспрессирующих на своей поверхности α -гранулярный белок фактор V [70]. Кроме того, эта же субпопуляция клеток характеризуется наличием фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны, а так же связывает большое количество других альфа-гранулярных белков (фибриноген, фактор Виллебранда, тромбоспондин, фибронектин и α 2-антиплазмин) [60]. Несмотря на большое количество работ, посвященных субпопуляциям тромбоцитов, только к 2010 г. феномен был признан окончательно, хотя общего названия у субпопуляций тромбоцитов до сих пор нет.

Долгое время оставались не понятны механизмы, приводящие к разделению тромбоцитов на субпопуляции. Предположение, что тромбоциты еще до активации принадлежат к той или иной субпопуляции не нашло подтверждения, так как соотношение двух субпопуляций сильно зависит от используемых активаторов и их концентраций [71].

Эксперименты с различными ингибиторами, агонистами, а также с тромбоцитами пациентов, имеющих различные наследственные функциональные дефекты, позволило выявить основные рецепторы и сигнальные пути, приводящие к образованию двух субпопуляций [23, 35].

В недавних работах было показано, что стимуляция тромбоцитов тромбином или SFLLRN (агонистом PAR1 рецептора) приводит к появлению кальциевых спаек в цитозоли. При этом для SFLLRN их частота со временем затухает, а для тромбина нет. Часть тромбоцитов остается в таком состоянии, в то время как в других происходит переход к стабильно высокому уровню внутриклеточного кальция. Это происходит из-за перегрузки митохондрий Ca^{2+} , которая приводит к падению мембранного потенциала на митохондриальной мембране и открытия митохондриальной поры, после чего наблюдается появление фосфатидилсерина на внешнем слое клеточной мембраны тромбоцитов [72]. При этом падение

мембранного потенциала на митохондриальной мембране может быть обратимым. При необратимом падении, митохондриальная коллапс не происходит одновременно во всех митохондриях, а постепенно распространяется по всей клетке.

Таким образом становится понятным, что ключевую роль в разделении тромбоцитов на субпопуляции играют кальциевые спайки в цитозоли, которые приводят к перегрузке митохондрий и открытию митохондриальной поры [72].

Еще одной важной проблемой в исследовании субпопуляций активированных тромбоцитов является их способность к агрегации. Долгое время считалось, что только фосфатидилсерин-отрицательные тромбоциты способны агрегировать, так как только они несут на своей поверхности активные интегрины $\alpha 2b\beta 3$ [60, 73]. Кроме того, в литературе существуют данные, что ингибирование образования фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов приводит к увеличению скорости роста тромбов в проточных камерах, а адгезия неактивированных тромбоцитов к монослою активированных существенно снижается, если в монослое есть фосфатидилсерин-положительные клетки [74]. Однако, в более поздних работах показан возможный механизм вовлечения фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов в растущий тромб за счет связывания активированных интегринов $\alpha 2b\beta 3$ на фосфатидилсерин-отрицательных тромбоцитах с фибриногеном на фосфатидилсерин-положительных [75].

Однако, по-видимому, основной функцией фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов является поддержание основные реакции плазменного свертывания. В ряде работ было показано, что факторы свертывания преимущественно связываются именно с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами (Рисунок 4) [71, 76, 77]. И именно на поверхности этих тромбоцитов происходят основные реакции плазменного свертывания: активация фактора X и протромбина комплексами внутренней теназы (состоит из фактора VIIIa и IXa, связанных с фосфолипидной мембраной) и протромбиназы (состоит из фактора Va и Xa, связанных с фосфолипидной мембраной) соответственно.

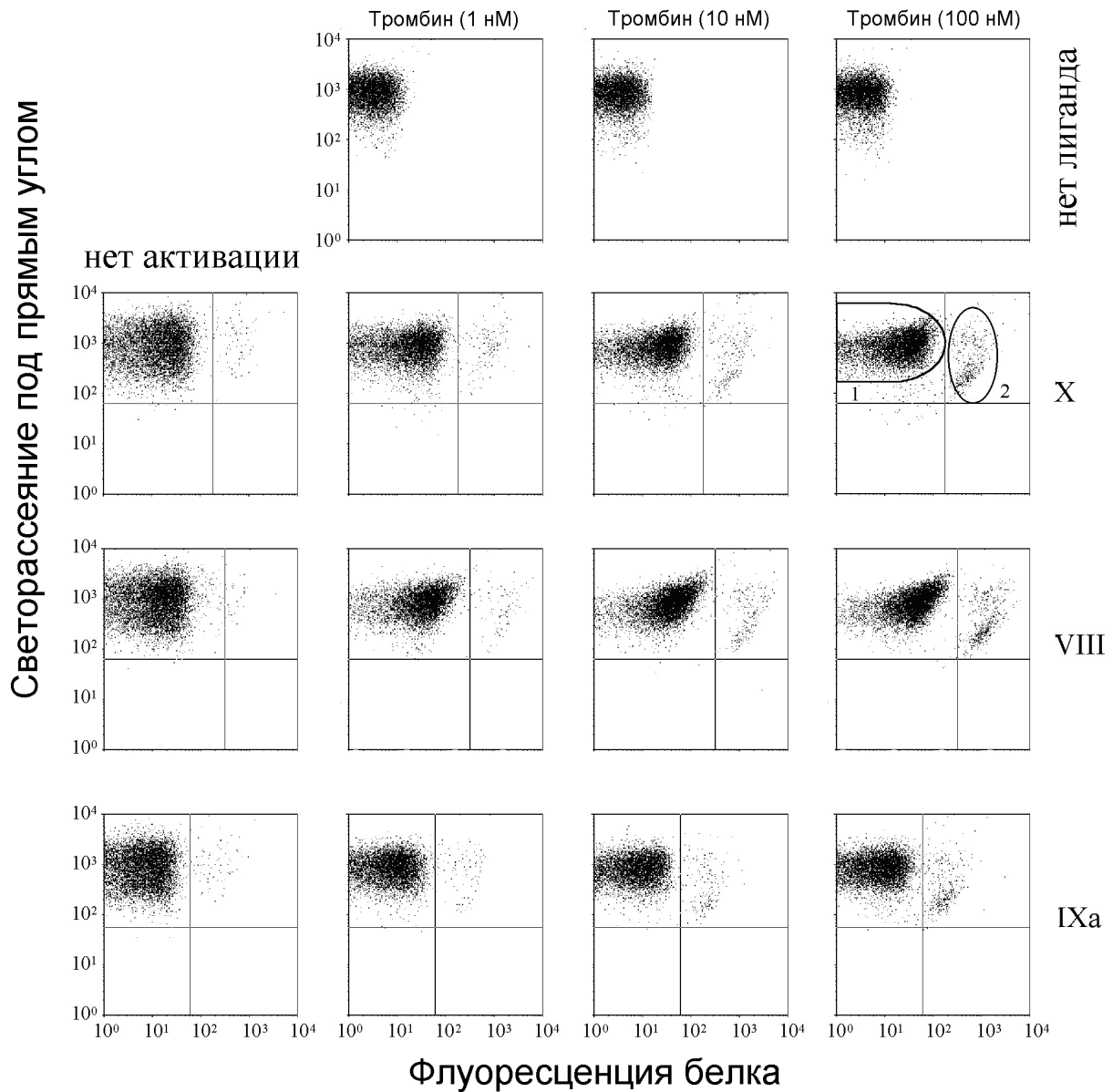


Рисунок 4. Связывание факторов с тромбоцитами, активированными различными концентрациями тромбина. Регион 2 показывает субпопуляцию тромбоцитов, имеющих на своей внешней мембране фосфатидилсерин [76].

1.3 Мембранно-зависимые реакции в свертывании крови

1.3.1 Комплекс протромбиназы и внутренней теназы

Две главные мембранные реакции свертывания – это активация фактора X комплексом внутренней теназы и активация протромбина комплексом

протромбиназы. Эти комплексы гомологичны, и реакции идут по близким законам.

Протромбиназа представляет собой комплекс сериновой протеиназы фактора Ха и кофактора Va, связанных с фосфолипидной мембраной (Рисунок 5). Фактор Ха способен сам по себе активировать протромбин до тромбина, однако эта реакция идет очень медленно. Для ее ускорения собирается комплекс из фактора, кофактора и фосфолипидной мембраны. При этом скорость реакции возрастает на несколько порядков [78, 79].

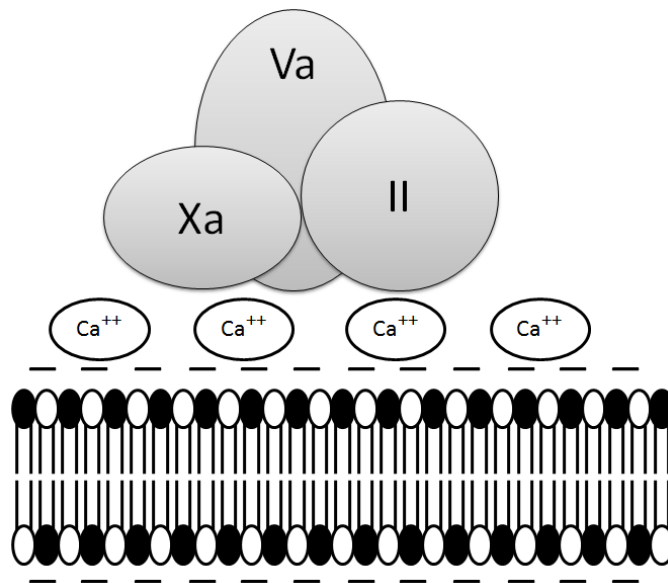


Рисунок 5. Схематичное изображение комплекса протромбиназы. Комплекс состоит из витамин К-зависимого фактора Ха и его кофактора Va, взаимодействующих с фосфолипидной мембраной. Комплекс протромбиназы отвечает за производство главного фермента свертывания тромбина из его неактивного предшественника протромбина (II).

Фактор X – это плазменный α -глобулин (мол. масса 58,8 кДа). Средняя плазменная концентрация фактора X — 200 нМ. Синтезируется в печени витамин К-зависимым образом. Состоит из легкой (139 аминокислот) и тяжелой (303 аминокислоты) цепей, соединенных дисульфидной связью (Рисунок 7). На N-конце легкой цепи имеется 11 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla-домен), с помощью которого в присутствии Ca^{2+} способен связываться с фосфолипидной мембраной. За Gla-доменом следуют два EGF-домена. Функции

данных доменов до конца не ясны, однако считается, что второй EGF -домен играет важную роль во взаимодействии с кофактором Va/VIIIa. Тяжелая цепь, в свою очередь, содержит каталитический домен.

Под действием комплексов внутренней или внешней теназы может происходить расщепление связи Arg52-Phe53, при этом образуется активный фактор Ха и небольшой пептид, состоящий из 52 аминокислот.

Второй важный участник комплекса протромбиназы – кофактор V представляющий собой плазменный β -глобулин (мол. масса 330 кДа). Может быть активирован тромбином и, в меньшей степени, фактором Ха [80]. Средняя плазменная концентрация 20 нМ. Секретируется в частично активной форме из α -гранул тромбоцитов при их активации в количестве $4,4 \text{ мкг}/10^9$ тромбоцитов. Состоит из легкой и тяжелой цепей (Рисунок 8). Связь с фосфолипидной мембраной осуществляется с помощью легкой цепи Ca^{2+} -независимо, но Ca^{2+} необходим для удержания легкой и тяжелой цепей вместе.

Еще одна важная мембранно-зависимая реакция свертывания – это активация фактора X комплексом внутренней теназы, состоящим из сериновой протеиназы фактора IXa, кофактора VIIIa и фосфолипидной мембраны (Рисунок 6).

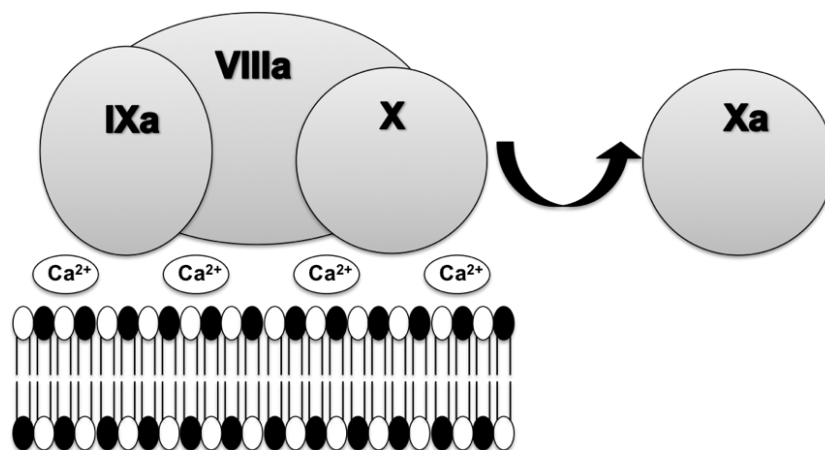


Рисунок 6. Схематичное изображение комплекса внутренней теназы. Комплекс состоит из витамин K-зависимого фактора IXa и его кофактора VIIIa, взаимодействующих с фосфолипидной мембраной. Комплекс внутренней теназы отвечает за активацию фактора X в фактор Ха.

Человеческий фактор свёртывания IX – это плазменный α_1 -глобулин (мол. масса 56 кДа), неактивный предшественник сериновой протеиназы фактора IXa (Рисунок 7). Синтезируется в печени витамин K-зависимым образом.

Фактор IX может быть активирован фактором XIa (внутренний путь свёртывания); или комплексом фактора VIIa и тканевого фактора (внешний путь свёртывания). Обе реакции ведут к расщеплению связей: Arg 145-Ala 146 и Arg 180-Val 181 в факторе IX. При этом образуется активный фактор IXa (мол. масса 45 000) и небольшой пептид (мол. масса 11 000). Фактор IXa состоит из легкой (мол. масса 18 000) и тяжелой (мол. масса 28 000) цепей, соединенных дисульфидным мостиком. Также как остальные витамин K-зависимые факторы, фактор IX имеет на N конце Gla-домен, состоящий из 12 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. За Gla-доменом следуют два EGF-домена. В первом EGF-домене есть высокоаффинный сайт связывания ионов Ca^{2+} .

Фактор VIII – это плазменный β_2 -глобулин (мол. масса 330 кДа) (Рисунок 8), является прокофактором, гомологичен фактору V. Синтезируется в печени. Циркулирует в комплексе с фактором фон Виллебранда, который диссоциирует при активации. Может быть активирован тромбином или фактором Xa, однако не стабилен и способен спонтанно терять активность из-за диссоциации на субъединицы либо вследствие протеолитического расщепления факторами IXa и Xa, либо активированным протеином C.

1.3.2 Механизмы мембранно-зависимых реакций

Чтобы разобраться, как в целом работают мембранные реакции, рассмотрим протромбиназу – центральный ферментативный комплекс каскада свертывания, который отвечает за активацию протромбина до тромбина.

Как было сказано выше фактор Xa, входящий в комплекс протромбиназы, сам по себе активирует протромбин очень медленно. Для того, чтобы эта реакция протекала с высокой скоростью должен собраться комплекс протромбиназы, состоящий из фактора Xa его кофактора Va и отрицательно заряженной

фосфолипидной мембраны [78, 81]. Фактор Va получается из своего неактивного предшественника фактора V путем частичного протеолиза тромбином [80]. Таким образом, круг замкнулся: фактор Xa активирует небольшое количество протромбина до тромбина, который в свою очередь активирует фактор V. Затем фактор Va увеличивает скорость активации протромбина фактором Xa, а продукт этой реакции – тромбин, снова активирует фактор V. Такой тип регуляции, когда продукт реакции стимулирует свое собственное производство, называется петлей положительной обратной связи.

В каскаде свертывания существуют и другие петли положительной обратной связи. Так например, фактор X может активироваться как комплексом внешней теназы (фактор VII и тканевый фактор) [82, 83], так и фактором IXa (который в свою очередь может быть активирован комплексом внешней теназы). Однако, реакция активации фактором IXa также очень медленная и ускоряется при формировании комплекса фактора IXa с кофактором VIIIa на фосфолипидной мембране, который во многом похож на комплекс протромбиназы [6, 84]. Так факторы V и VIII гомологичны и оба активируются тромбином.

Положительные обратные связи необходимы для формирования порогов в системе свертывания, а также для регуляции пространственного роста фибринового сгустка [85, 86]. Однако, создать такие регуляторные блоки можно было бы и без мембранных реакций. Поэтому до конца не ясно, чем обусловлена такая сильная зависимость всех реакций свертывания от фосфолипидных мембран.

Одним из возможных объяснений может быть ускорение мембранных реакций за счет того, что связывание факторов на фосфолипидной мембране приводит к увеличению их локальной концентрации за счет перехода из трехмерного в двухмерное пространство. Есть указания, что скорость работы комплексов теназы и протромбиназы ограничена не каталитической активностью фермента, а скоростью диффузии субстрата к мембране. Возможно, что концентрирование факторов на мембране позволяет ускорять эти реакции выше диффузионного предела для реакций с растворимыми ферментами.

Еще одно объяснение заключается в том, что белки свертывания в связанном с тромбоцитами состоянии не вымываются из тромбоцитарного тромба и не уносятся потоком крови.

1.4 Взаимодействие факторов свертывания с субпопуляциями активированных тромбоцитов

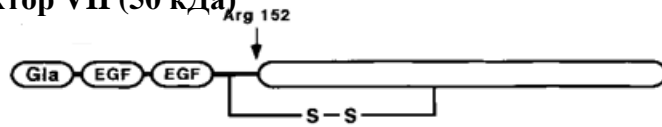
1.4.1 Витамин К-зависимые факторы (VII(a), IX(a), X(a), а также протромбин, протеины С, S и Z)

Ключевые факторы свертывания, такие как VII(a), IX(a), X(a), а также протромбин, протеины С, S и Z после своего синтеза в печени проходят посттрансляционные изменения под воздействием витамина К (Рисунок 7). Эти изменения заключаются в том, что часть остатков глутаминовой кислоты на N-конце белков заменяется на остатки γ -карбоксихлутаминовой кислоты. При этом формируется так называемый Gla-домен, участок примерно из 45 аминокислот, содержащих 9-13 остатков γ -карбоксихлутаминовой кислоты [87]. Посредством Gla-домена происходит взаимодействие этих факторов свертывания с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами.

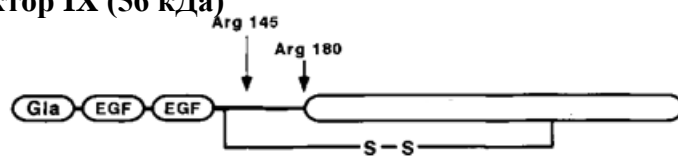
Долгое время считалось, что связывание фактора с фосфолипидной мембраной происходит за счет так называемых кальциевых мостиков между карбоксильной группой малоновой кислоты в Gla-домене и гидрофильной головой фосфолипида [88, 89]. При этом основную роль во взаимодействии белка с липидной поверхностью играют электростатические взаимодействия, а вклад гидрофобных незначителен [90, 91]. Однако, после получения кристаллической структуры Gla-доменов некоторых факторов(например, протромбина [92], факторов VII [93], IX [94, 95] и X [96]) становится ясным, что взаимодействие намного сложнее. По всей видимости взаимодействие Gla-домена с фосфолипидной мембраной происходит за счет частичного проникновения ω -петли в мембрану, при этом ионы Ca^{2+} выполняют двойную функцию:

стабилизация структуры и поддержание оптимальной конформации Gla-домена, а так же непосредственное взаимодействие с отрицательно заряженными фосфолипидами [97]. Было показано, что витамин К-зависимые факторы преимущественно связываются с «укутанными» тромбоцитами [57, 76]

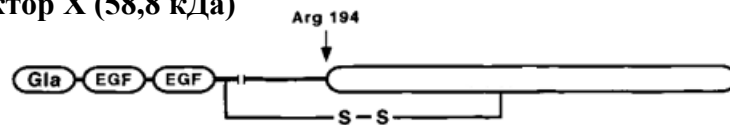
Фактор VII (50 кДа)



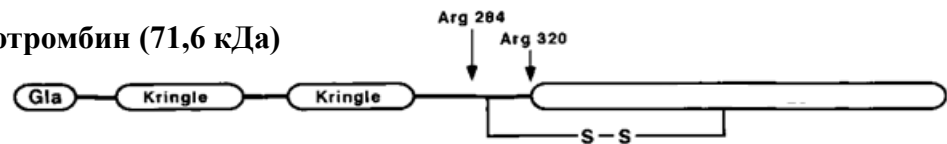
Фактор IX (56 кДа)



Фактор X (58,8 кДа)



Протромбин (71,6 кДа)



Протеин С (62 кДа)

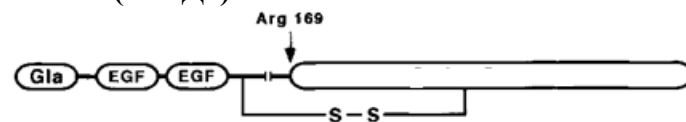
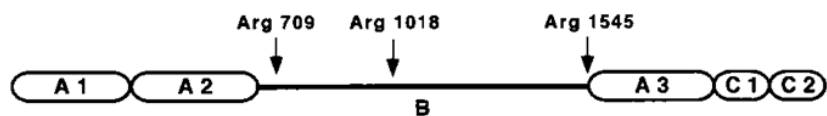


Рисунок 7. Схематичное изображение витамин К-зависимых факторов свертывания. Gla – участок примерно из 45 аминокислот, содержащих 9-13 остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты. EGF – домен подобный эпидермальному фактору роста. Стрелками показаны связи, которые расщепляются при активации факторов [6].

1.4.2 Кофакторы Va и VIIIa

Кофакторы V и VIII гомологичны друг другу и состоят из трех А-доменов, двух С- доменов и В- домена, который теряют в процессе активации (Рисунок 8) [80, 98]. Активированные факторы Va и VIIIa состоят из тяжелой цепи(A1 и A2 – домены) и легкой цепи(A3, C1 и C2- домены)[81, 99]. В отличие от витамин К-зависимых факторов кофакторы V и VIII взаимодействуют с фосфолипидной мембраной без участия ионов Ca^{2+} . Однако Ca^{2+} необходим для взаимодействия легкой и тяжелой цепей. Исследования показали, что за связывание с фосфолипидной мембраной отвечает легкая цепь кофакторов [100, 101]. В то время как за образование комплекса с витамин К-зависимым фактором отвечает тяжелая цепь [80].

Фактор V (330 кДа)



Фактор VIII (330 кДа)

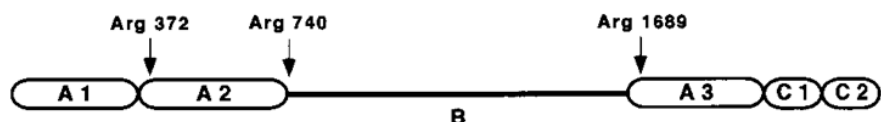


Рисунок 8. Схематичное изображение кофакторов V и VIII. Стрелками показаны связи, которые расщепляются при активации факторов [6].

Последние данные свидетельствуют, что за взаимодействие с фосфолипидной мембраной отвечает N-концевой участок C2- домена. Полученные в последние годы кристаллические структуры факторов V [102] и VIII [103] пролили свет на механизмы взаимодействия C2 – домена с фосфолипидной мембраной.

Так C2 – домен фактора V образует β – бочку с тремя выступающими петлями. Гидрофобные аминокислотные остатки на вершинах этих петель проникают в фосфолипидную мембрану и взаимодействуют с неполярными хвостами фосфолипидов. В то же время карманы, образуемые петлями, непосредственно взаимодействуют с полярными головами фосфатидилсерина [102, 104]. Подобная структура C2 – домена характерна и для фактора VIII. Также есть данные, что C2 – домен обладает стереоселективностью в отношении фосфатидил- L- серина.

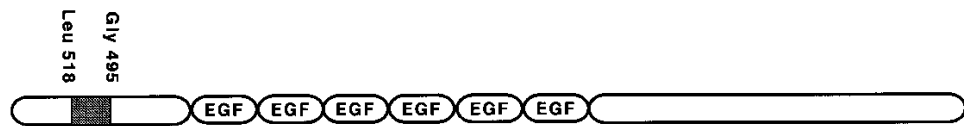
1.4.3 Тканевый фактор и тромбомодулин

Тканевый фактор и тромбомодулин – трансмембранные белки, достаточно отличающиеся друг от друга. Единственное их сходство проявляется в общей структурной организации. Оба белка имеют в своем составе внутриклеточный, трансмембранный и внеклеточный домены (Рисунок 9).

Тромбомодулин является кофактором тромбина при активации протеина C, находится на клетках эндотелия сосудов [105]. Внеклеточный домен содержит шесть EGF-доменов. Было показано, что 5 и 6 домены содержат сайт связывания с тромбином [106, 107].

Тканевый фактор представляет собой кофактор, связывающий фактор VIIa из плазмы, формируя комплекс внешней теназы и активируя факторы IX и X. В норме присутствует во всех тканях, кроме эндотелия и клеток крови. Таким образом, он изолируется от крови, а его экспонирование или экспрессирование является ключевым механизмом запуска свертывания [82, 83].

Тромбомодулин (100 кДа)



Тканевый фактор (29,6 кДа)

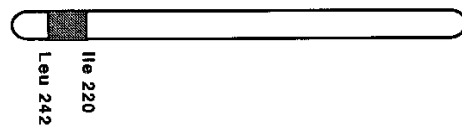


Рисунок 9. Схематичное изображение тромбомодулина и тканевого фактора. Заштрихованный участок соответствует трансмембранному домену. EGF – домен подобный эпидермальному фактору роста [108].

1.4.4 Факторы, взаимодействующие с тромбоцитами и микровезикулами через рецепторы

Многие факторы свертывания не напрямую взаимодействуют с фосфолипидами мембраны, а посредством специфичных рецепторов. Так было показано, что факторы XI [109], XII [110], тромбин [111] и высокомолекулярный кининоген [112] могут связываться с гликопротеином Iba. Кроме того активированные тромбоциты экспрессируют рецептор gC1q-R/p33, с которым также связываются высокомолекулярный кининоген и фактор XII. Для фактора XIII рецептором может выступать гликопротеин IIb-IIIa [113, 114].

Кроме того некоторые витамин K-зависимые факторы могут связываться с фосфолипидными мембранами не только через свой Gla-домен, но и посредством рецепторов. Так было показано, что протромбин специфично и Ca^{2+} - зависимо связывается с гликопротеином IIb-IIIa [115].

Постановка задачи

Целью данной работы является исследовать взаимодействие факторов свертывания крови с мембранами субпопуляций активированных тромбоцитов

Были поставлены следующие задачи исследования:

- 1) Исследовать зависимость равновесного связывания факторов свертывания X и Xa с активированными тромбоцитами от их концентрации
- 2) Исследовать кинетические характеристики связывания факторов свертывания X и Xa с активированными тромбоцитами
- 3) Сравнить распределение факторов свертывания на мембранах активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляций;
- 4) Изучить распределение факторов свертывания на поверхности тромбоцитов при формировании тромбоцитарного тромба в проточной камере

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы

В работе были использованы следующие реагенты:

- Пробирки вакуумные VACUETTE с натрия цитратом 3,2% (Greiner Bio-One, Кремсмюнстер, Австрия)
- HEPES (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- Сефароза CL-2B (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- KCl (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- Глюкоза (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- цитрат натрия (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- NaOH (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- Апираза (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- CaCl_2 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- MgCl_2 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- гидроксилламин гидрохлорид (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- фосфатный буфер (PBS) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США)
- Простогландин E1 (PGE1) (MP Biochemicals, Ирвин, США)
- Тромбин (Haematologic Technologies, Колчестер, США)
- Коллаген-подобный пептид (CRP) был любезно предоставлен профессором Р. В. Фарндейлом (Университет Кембриджа, Кембридж, Великобритания)
- L- α -фосфатидилсерин (Avanti Polar Lipids, Алабама, США)
- L- α -фосфатидилхолин (Avanti Polar Lipids, Алабама, США)
- Кальциевый зонд Fura Red (Molecular Probes, США)
- Липофильный краситель DiI16(3) (Molecular Probes, США)

- Флуоресцеин изотиоцинат (ФИТЦ) (Molecular Probes, США)
- Человеческий фактор IXa_i (Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, США)
- Человеческий фактор X (Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, США)
- Человеческий фактор Xa (Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, США)
- Протромбин (Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, США)
- Человеческий фактор V
- Человеческий фактор VIII (Hemophil M, Baxter Russia, Москва, Россия)
- Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Helicon, Москва, Россия)
- Н-D-фенилаланил-пролил-аргинил хлорметилкетон (PPACK) (Calbiochem, Дармштадт, Германия)
- S2765 (Chromogenix, Милан, Италия) (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США)
- аннексин V конъюгированный с ФИТЦ
- аннексин V конъюгированный с Alexa Fluor 647 (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США)
- Антитела фактор V
- Антитела фактор VIII
- Сефадекс G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция)
- Диметилсульфоксид (ДМСО) (Merck, Германия)
- Этиловый спирт (Merck, Германия)

В работе были использованы следующие растворы:

1. Буфер Тироде для работы с тромбоцитами, рН 7,4 (Буфер А):_

- 150 мМ NaCl
- 2,7 мМ KCl
- 1 мМ MgCl₂
- 0,4 мМ NaH₂PO₄
- 20 мМ HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфониевая кислота)
- 5 мМ глюкоза
- 0,5% бычий сывороточный альбумин

2. Буфер для плазмонного резонанса, рН 7,4 (Буфер HBS-N)

- 10 мМ HEPES
- 150 мМ NaCl

3. Раствор цитрата натрия 106 мМ, рН 5,5

4. Раствор хлорида кальция 100 мМ

5. Фосфатный буфер(PBS) рН 7,3-7,4

6. Бикарбонатный буфер, рН 9,0

7. Бикарбонат натрия 100 мМ

8. Раствор гидроксиламин гидрохлорида 1,5 М, рН 8,5

9. Буфер для приготовления везикул, рН 7,5:

- 20 мМ HEPES,
- 140 мМ NaCl,

2.2 Пациенты

Пациентка с синдромом серых тромбоцитов (ССТ1) наблюдается в госпитале ля Тимон (Марсель, Франция), диагноз был поставлен по результатам проточной цитометрии и электронной микроскопии тромбоцитов. Кроме того, наблюдалась уменьшенная агрегация со всеми агонистами.

Еще три пациента с синдромом серых тромбоцитов наблюдаются в ФНКЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева (Москва, Россия), диагноз поставлен по результатам проточной цитометрии.

2.3 Методы

2.3.1 Выделение тромбоцитов из цельной крови

Забор цельной крови у здоровых доноров проводили в вакуумные пробирки Vacuette, содержащие 3,2% цитрат натрия. В кровь добавляли простагландин E1 (PGE1) (1 мкМ) и апиразу (0.1 ед./мл) после чего центрифугировали при комнатной температуре при 100g в течение 8 минут. После центрифугирования отбирали богатую тромбоцитами, в которую, для предотвращения агрегации клеток, добавляли раствор цитрата натрия (106 мМ, рН 5.5) в соотношении плазма:цитрат – 3:1. Затем, плазму центрифугировали при комнатной температуре при 400g в течение 5 минут. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 300 мкл буфера Тироде (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0.4 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ глюкозы, 0.5% бычий сывороточный альбумин, рН 7.4). Очистку тромбоцитов от белков плазмы проводили методом гель-хроматографии на сефарозе CL-2B. Для экспериментов, включающих определение внутриклеточной концентрации Ca²⁺, тромбоциты перед хроматографией инкубировали 30 минут при 0,1 ед./мл). Активацию клеток проводили тромбином(100 нМ), CRP (20 мкг/мл) либо тромбином(100 нМ) с CRP (20 мкг/мл) в течение 15 минут при комнатной температуре в присутствии CaCl₂ (2,5 мМ)

2.3.2 Конъюгирование факторов свертывания с флуоресцентной меткой

Предварительно факторы были диализованы при +40С в течение 2 часов против фосфатного буфера (рН 7,3-7,4) с использованием диализных мембран с размером пор 3,5 кДа. В качестве флуоресцентной метки использовали

флуоресцеин изотиоционат (ФИТЦ). Реакцию проводили в бикарбонатном буфере (0,1 М; рН 9,0) при +40С в течение 2 часов при постоянном перемешивании. Молярное отношение краски к белку в реакционной смеси составляло 5. Реакцию останавливали добавлением избытка гидроксиламингидрохлорида (30 мМ, рН 8,5). Очистку от непрореагировавшей флуоресцентной метки проводили гель-хроматографией на Сефадексе G-25. Во всех полученных конъюгатах молярное соотношение ФИТЦ/белок составляло 2-3 к 1. Оценку активности полученных конъюгатов проводили с помощью клоттинговых тестов. Во всех случаях активность факторов свертывания была более 80%.

2.3.3 Подготовка искусственных фосфолипидных везикул

Синтетические фосфолипидные везикулы, содержавшие фосфатидилхолин (75%) и фосфатидилсерин (25%) были приготовлены в соответствии с рекомендацией фирмы-производителя (Avanti Polar Lipids, Алабастер, Алабама, США) с незначительными доработками. Для детекции фосфолипидных везикул с помощью проточного цитометра в их состав добавляли липофильный краситель DiI C16 (3) в концентрации 0,2%. Фосфолипиды, растворенные в хлороформе, переносили в круглодонную колбу и сушили при комнатной температуре в течение 30 минут под струей азота. Затем, фосфолипиды гидратировали в буфере (20 мМ HEPES, 140 мМ NaCl, рН 7,5) при температуре >50 °С в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Полученный раствор подвергали циклу заморозки-разморозки, нагревали до температуры >50 °С, а затем пропускали через мембрану экструдера (размер пор мембраны 800 нм). Полученные фосфолипидные везикулы хранили в инертной атмосфере при +4 °С в течение не более 4 дней.

2.3.4 Равновесное связывание факторов X и Xa с активированными тромбоцитами и искусственными фосфолипидными везикулами

Искусственные фосфолипидные везикулы (ФС:ФХ 25:75, 5 мкМ) или активированные тромбином (100нМ) тромбоциты в присутствии CaCl₂ (2.5 мМ) инкубировали в течение 20 минут с ФИТЦ-ФХ (ФИТЦ-ФХа) в различных концентрациях. Затем суспензию клеток (микровезикул) анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США). Регион ФС-положительных тромбоцитов выделяли по флуоресценции Fura Red.

Средние параметры связывания рассчитывали из трех независимых экспериментов. Кривые связывания для отдельных экспериментов аппроксимировали стандартной односайтовой моделью связывания (1).

$$[X^B] = \frac{n^x \cdot [X]}{K_d + [X]}, \quad (1)$$

где $[X^B]$ – концентрация связавшегося фактора, $[X]$ – концентрация добавленного фактора, n^x – кажущееся число сайтов связывания на тромбоцит/везикулу, K_d – кажущаяся константа диссоциации фактора

Кривые связывания ФХа с активированными тромбоцитами аппроксимировали двухсайтовой моделью связывания. При этом K_d и количество сайтов связывания рассчитывали только для высоко-аффинного сайта связывания (2).

$$[X^B] = \frac{n_1^x \cdot [X]}{K_{d1} + [X]} + \frac{n_2^x \cdot [X]}{K_{d2} + [X]}, \quad (2)$$

где $[X^B]$ – концентрация связавшегося фактора, $[X]$ – концентрация добавленного фактора, n_1^x – кажущееся число высокоаффинных сайтов связывания на тромбоцит/везикулу, K_{d1} – кажущаяся константа диссоциации фактора для высокоаффинных сайтов, n_2^x – кажущееся число низкоаффинных сайтов связывания на тромбоцит/везикулу, K_{d2} – кажущаяся константа диссоциации фактора для низкоаффинных сайтов.

Для пересчета интенсивности флуоресценции в количество молекул фактора на тромбоцит использовали калибровочную кривую. Для построения данной калибровочной кривой использовали полистироловые шарики, покрытые стрептавидином, которые через биотинилированные олигонуклеотиды конъюгировали с GFP зеленым флуоресцентным белком (GFP). Среднее количество молекул GFP на одном шарике определяли методом микроскопии полного внутреннего отражения.

2.3.5 Исследование кинетики взаимодействия факторов X и Xa с активированными тромбоцитами и искусственными фосфолипидными везикулами

К искусственным фосфолипидным везикулы (ФС:ФХ 25:75, 5 мкМ) или активированным тромбином (100нМ) тромбоцитам (5×10^4 кл./мкл) добавляли ФИТЦ-ФХ (250 нМ) или ФИТЦ-ФХа (30 нМ). Суспензию клеток (микровезикул) анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США) в моменты времени 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут после добавления фактора. После этого образцы разводили в 20 раз буфером А, содержащим CaCl_2 (2,5 мМ) и анализировали с помощью проточного цитометра. Индивидуальные кривые ассоциации (3) и диссоциации (4) аппроксимировали экспоненциальной моделью.

$$[X^B] = [X]_{\max} \cdot (1 - e^{(-k[X]t)}), \quad (3)$$

где $[X^B]$ – количество связанного фактора в каждый момент времени, $[X]$ – концентрация добавленного фактора, $[X]_{\max}$ – максимальное количество связанного фактора, k – константа ассоциации, t – время.

$$[X^B] = [X]_0 \cdot e^{(-k \cdot t)}, \quad (4)$$

где $[X^B]$ – количество связанного фактора в каждый момент времени, $[X]_0$ – количество связанного фактора в начальный момент времени, k – константа диссоциации, t – время.

2.3.6 Исследование взаимодействия фактора Ха с тромбоцитарным тромбом в условиях потока

Стеклянные покровные стекла (24×24 мм, Heinz Herenz) очищали раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте, после чего промывали дистиллированной водой и сушили при +50⁰С. Чистые стекла инкубировали в течение часа при комнатной температуре во влажной камере с раствором нативного коллагена I типа (200 мкг/мл). Не связавшийся со стеклами белок удаляли промывкой в дистиллированной воде. Стекла сушили при 37⁰С и затем собирали, как часть плоскопараллельной проточной камеры. Рабочее пространство камеры имело размеры 17 мм × 2 мм × 0,08 мм (длина × ширина × высота) (объем около 2,72 мкл) и ограничивалось сверху пластиковой поверхностью с подведенными через специальные отверстия входной и выходной трубками, а снизу покровным стеклом с иммобилизованным на нем коллагеном.

Для забивки мест неспецифического связывания тромбоцитов использовался раствор альбумина 0,5% в буфере Тироде (20 мМ HEPES; 150 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 1 мМ MgCl₂; 0,4 мМ NaH₂PO₄; 5 мМ глюкоза, pH 7,4).

У здоровых доноров производили забор крови в вакуумные пробирки Vacuette, содержащие цитрат натрия 3,8%. Затем, в кровь добавляли CaCl₂ (100мМ) до физиологической концентрации свободного ионизированного кальция (около 1мМ). Разбавление крови при этом не превышало 10%. Рекальцифицированную кровь в течение 4 минут прокачивали через проточную камеру с постоянной скоростью потока, которая соответствовала скорости сдвига 500 с⁻¹. Затем, камеру промывали в течение 4 минут буфером Тироде, содержащим альбумин 0,5% и CaCl₂ 2,5 мМ. После этого камеру промывали раствором фактора Ха (5нМ) в течение 2 минут, затем раствором фактора Ха (50нМ) еще в течение 2 минут и снова раствором фактора Ха (5нМ) в течение 2 минут. Затем, камеру промывали в течение 4 минут буфером Тироде, содержащим альбумин 0,5% и CaCl₂ 2,5 мМ. И, наконец, камеру промывали в течение 4 минут

буфером Тироде, содержащим альбумин 0,5% и ЭДТА 10 мМ. Микрофотографии были получены в режиме реального времени с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss).

2.3.7 Исследование взаимодействия фактора X с фосфолипидными мембранами методом плазмонного резонанса

Эксперименты по связыванию проводили с использованием прибора BIAcore 3000 (GE Healthcare).

Фосфолипидные везикулы, полученные описанным выше методом, инкубировали с сенсорным чипом L1 в течение 20 мин при 25 ° С при скорости потока 1 мкл/мин. Затем, чип инкубировали с 0,2 мг/мл бычьим сывороточным альбумином в течение 20 мин. при скорости потока 1 мкл/мин.

Инъекцию ФХ в концентрации 0-800 нМ в буфере (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,4), содержащем 2,5 мМ CaCl₂, осуществляли в течение 5 минут при скорости потока 10 мкл/мин. Затем, проводили инъекцию буфера с 2,5 мМ CaCl₂ без ФХ и регистрировали диссоциацию ФХ с поверхности чипа. Кривые специфических взаимодействий белков с иммобилизованными на чипе фосфолипидами получали в виде разности сигналов биосенсора между опытным и контрольным каналами. В качестве последнего был использован канал без иммобилизованных фосфолипидных везикул. После каждого цикла регистрации поверхность чипа регенерировали с помощью инъекции буфера (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,4), содержащем 10 мМ ЭДТА.

2.3.8 Визуализация олигомеров фактора X и Аннексина V

Белки инкубировали с фосфолипидными везикулами (5мкМ) в присутствии 2,5 мМ CaCl₂ в течение 20 минут при 25⁰С. Затем, к полученной суспензии добавляли 0,1% параформальдегид, через 5 минут реакцию останавливали добавлением глицина(0,5 М). После этого для удаления фосфолипидов к 100 мкл

раствора добавляли 60 мкл метанола, 120 мкл хлороформа, и 450 мкл деионизированной воды. Полученный раствор аккуратно перемешивали и центрифугировали при 13 000 g в течение 5 минут. Воду удаляли, а к оставшемуся раствору добавляли 450 мкл метанола. Полученный раствор аккуратно перемешивали и центрифугировали при 13 000 g в течение 5 минут. Супернатант удаляли, а полученный осадок ресуспендировали в буфере для образцов. Продукты кросс-сшивки анализировали методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле.

2.3.9 Равновесное связывание фактора XII тромбоцитами

К неактивированным или активированным тромбином (100нМ) тромбоцитам (20×10^4 кл./мкл) добавляли ФИТЦ- XII (0-1000 нМ) и AlexaFluor 647- аннексин V (1.5% v/v), инкубировали 5 минут при комнатной температуре, а затем разводили в 10 раз и анализировали при помощи проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США). Полученные значения интенсивности флуоресценции конвертировали в среднее число связанных молекул фXII на один тромбоцит, используя калибровочную кривую, которая была получена при помощи специализированного набора реактивов фирмы Invitrogen (Green Flow Cytometry Intensity Calibration Kit at 488- nm excitation and 515-nm emission).

2.3.10 Микроскопическое исследование распределения кофакторов V и VIII на мембране активированных тромбоцитов

Очищенные стеклянные покровные стекла (24×24 мм, Heinz Herenz) инкубировали в течение 40 минут при комнатной температуре во влажной камере с раствором фибриногена (20 мг/мл). Не связавшийся со стеклами белок удаляли промывкой в дистиллированной воде, а стекла сушили при 37С.

Тромбоциты (5×10^4 кл./мкл), выделенные из крови доноров с использованием гель-фильтрации для очистки от белков плазмы крови, активировали CRP (20

мкг/мл) (в случае фактора VIII) или смесью тромбин (100 нМ) + CRP (20 мкг/мл) (в случае фактора V) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем, активированные тромбоциты инкубировали со специфичными антителами для детекции фактора V/Va в течение 5 минут. Либо, активированные тромбоциты инкубировали с фактором VIII (1нМ) в течение 5 минут, а затем, со специфичными антителами для детекции фактора VIII/VIIIa в течение 5 минут.

Затем, суспензию тромбоцитов инкубировали в течение 5 минут с покровными стеклами с иммобилизованным на них фибриногеном. Микрофотографии тромбоцитов были получены с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss).

2.3.11 Микроскопическое исследование распределения факторов IXa, Ха, Х, протромбина, а также аннексина V на мембране активированных тромбоцитов

Покровные стекла подготовили, как было описано выше.

Тромбоциты (5×10^4 кл./мкл), выделенные из крови доноров с использованием гель-фильтрации для очистки от белков плазмы крови, активировали смесью тромбин (100 нМ) + CRP (20 мкг/мл) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем, активированные тромбоциты инкубировали с ФИТЦ-аннексином V (23 нМ), ФИТЦ-IXa (60 нМ), ФИТЦ-Х (250 нМ), ФИТЦ-Ха (30 нМ) или ФИТЦ-протромбином (60 нМ) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 5 минут.

Затем, суспензию тромбоцитов инкубировали в течение 5 минут с покровными стеклами с иммобилизованным на них фибриногеном. Микрофотографии тромбоцитов были получены с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss).

2.3.12 Измерение скорости активации фактора X комплексом внутренней теназы

Фактор VIII активировали тромбином (10 нМ) в течение 1 мин, после чего ингибировали тромбин РРАСК (2 мкМ). Затем, искусственные фосфолипидные везикулы 5:95 ФС:ФХ (10 мкМ) или 25:75 ФС:ФХ (2мкМ), фактор IXa (1 нМ), фактор VIIIa (20 нМ) в присутствии CaCl₂ 2,5 мМ инкубировали при 37 ° С в течение 4 мин. Реакцию инициировали добавлением фактора X (400 нМ). Затем, после 4 минут реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 10 мМ. Концентрация образовавшегося фактора Xa была рассчитана по скорости расщепления хромогенного субстрата S-2765 (конечная концентрация 0,4 мМ). Скорость расщепления субстрата контролировали по поглощению при 405 нм с использованием микропланшетного ридера ThermoMax (Thermo Fisher Scientific).

2.3.13 Исследование ультраструктуры тромбоцитов методом трансмиссионная электронная микроскопия

Тромбоциты (5×10^4 кл./мкл), выделенные из крови доноров с использованием гель-фильтрации для очистки от белков плазмы крови, активировали смесью тромбин (100 нМ) + CRP (20 мкг/мл) в присутствии CaCl₂ 2,5 мМ в течение 3 минут при комнатной температуре. Затем, активированные тромбоциты фиксировали свежеприготовленным 2,5% глутаральдегидом в PBS (pH 7,4) в течение 2 часов. После чего промывали четыре раза с использованием PBS (pH 7,4) и проводили постфиксацию 1% тетраоксидом осмия в течение 1 часа. Затем образцы дегидратировали в этаноле и залили эпоксидной смолой Эпон (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Ультратонкие срезы были изготовлены с помощью ультрамикротомы Ultracut E (Reichert, Austria). Полученные срезы контрастировали с использованием цитрата свинца и уранилацетата, а затем

анализировали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL Tokyo, Japan).

2.3.14 Исследование ультраструктуры тромбоцитов методом сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком

Тромбоциты (3×10^5 кл./мкл), выделенные из крови доноров, активировали смесью тромбин (1 U/мл) + конвульксин (6 нМ) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем, тромбин был заингибирован добавлением гирудина (0,6 U/мл) и тромбоциты инкубировали в течение 2 минут с аннексином V (5 мкг), мечеными частицами золота 10 нм. В качестве контроля использовали свободные частицы золота 10 нм. После этого тромбоциты фиксировали свежеприготовленным 2,5% глутаральдегидом в 0,1 М натрий-какодилатном буфере (рН 7,3) в течение 1 часа. Полученные образцы анализировали с использованием сканирующего электронного микроскопа с фокусированным ионным пучком.

2.3.15 Исследование распределения аннексина V и факторов свертывания в тромбоцитарном тромбе

У здоровых доноров производили забор крови в вакуумные пробирки с гирудином. В цельную кровь добавляли аннексин V (5%) или ФХ, а затем прокачивали через проточную камеру с коллагеном (200 мкг/мл) с постоянной скоростью потока, которая соответствовала скорости сдвига 1000 с^{-1} . Микрофотографии тромбов были получены с помощью микроскопа Leica DMI 4000 B (Leica Microsystems).

2.3.16 Статистическая обработка

Результаты анализировались программным обеспечением OriginPro v.8.5 (Microcal Software; США) и были представлены в виде среднего, по меньшей мере, 3 повторных измерений \pm стандартное отклонение (SD), если не указано другое.

Глава 3. Результаты

3.1 Механизмы взаимодействия факторов свертывания X и Xa с фосфолипидными мембранами

3.1.1 Взаимодействие факторов X и Xa с мембраной активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции

При сильной активации тромбином (100 нМ) мы получили две субпопуляции тромбоцитов, отличающиеся по содержанию фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны (ФС-положительная и ФС-отрицательная субпопуляции) (Рисунок 10).

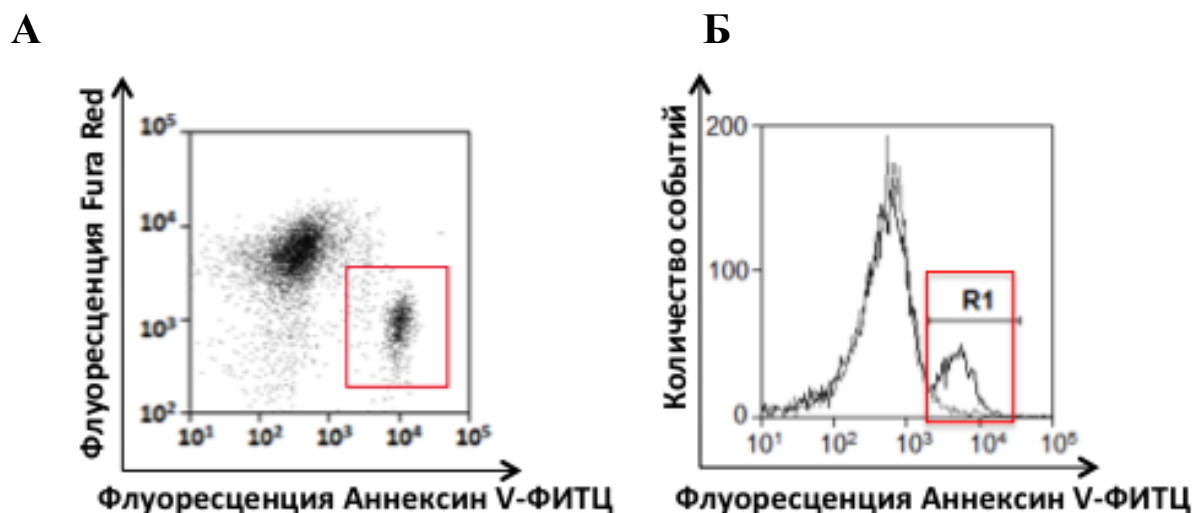


Рисунок 10. Связывание Аннексина V с двумя субпопуляциями активированных тромбоцитов. (А) Связывание аннексина V- ФИТЦ с субпопуляциями активированных тромбоцитов. Красным выделена субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов. (Б) Тромбоциты в концентрации 50 000 кл./мкл активировали тромбином (100 нМ) в присутствии CaCl_2 (2,5 мМ). К суспензии активированных тромбоцитов добавляли флуоресцентно меченный аннексин V (22,6 нМ) инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. После этого тромбоциты инкубировали 5 минут в присутствии или отсутствие хелатирующего агента ЭДТА (10 мМ). На гистограмме представлено распределение тромбоцитов по связыванию фактора X в присутствии (серая линия) или отсутствии (черная линия) ЭДТА. Укутанные тромбоциты выделены регионом R1. Представлены результаты типичного эксперимента из трех, проведенных с кровью разных доноров.

Также эти две субпопуляции отличаются по концентрации внутриклеточного кальция, которую мы визуализировали с помощью краски Fura Red. Субпопуляция с высокой концентрацией внутриклеточного кальция способна связывать аннексин V (белок, имеющий высокое сродство к фосфатидилсерину). В дальнейшей работе, для разделения двух субпопуляций активированных тромбоцитов мы использовали только Fura Red, краску на внутриклеточный кальций.

Как видно из рисунка 11, субпопуляции тромбоцитов сильно отличаются по своей способности связывать фактор X-ФИТЦ. Субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов, которую мы выделяли по флуоресценции краски Fura Red, связывает в несколько раз больше фактора, чем субпопуляции ФС-отрицательных тромбоцитов. При этом добавление хелатирующего агента- ЭДТА приводит к полной диссоциации фактора с мембраны ФС-положительных тромбоцитов. Таким образом, связывание с ФС-положительной субпопуляцией тромбоцитов является обратимым и Ca^{2+} -зависимым [116].

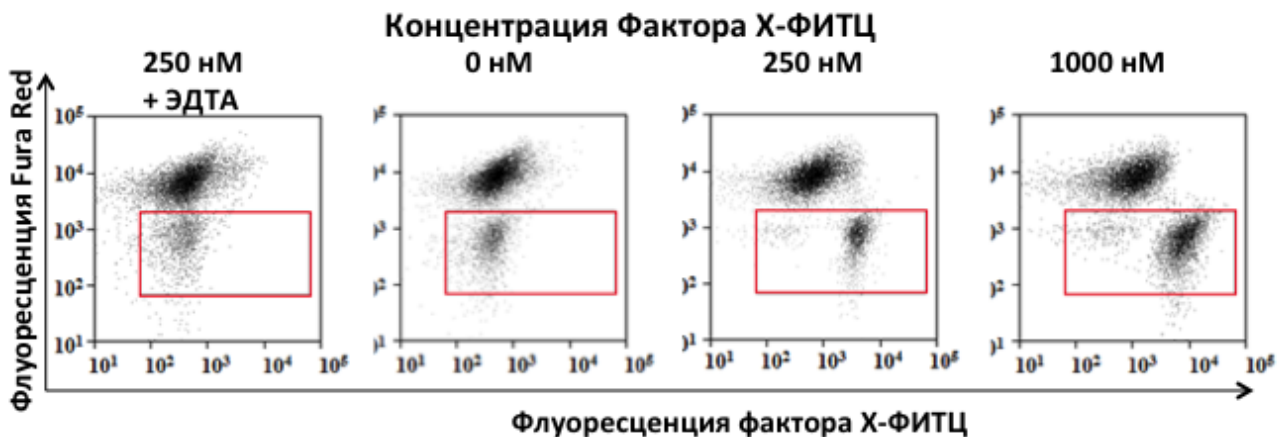


Рисунок 11. Связывание ФХ с двумя субпопуляциями активированных тромбоцитов. К суспензии активированных тромбоцитов добавляли флуоресцентно меченный фактор X в указанных концентрациях и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. На точечных диаграммах представлено распределение тромбоцитов по связыванию фактора X (ось абсцисс) и свечению краски Fura Red (ось ординат). Укутанные тромбоциты выделены рамкой. Представлены результаты типичного эксперимента из трех, проведенных с кровью разных доноров

В то же время, связывание с ФС-отрицательной субпопуляцией незначительное и не превышает неспецифического связывания (Рисунок 12). Кроме того наблюдается конкуренция за сайты связывания при добавлении избытка немеченого фактора (Рисунок 13) [116].

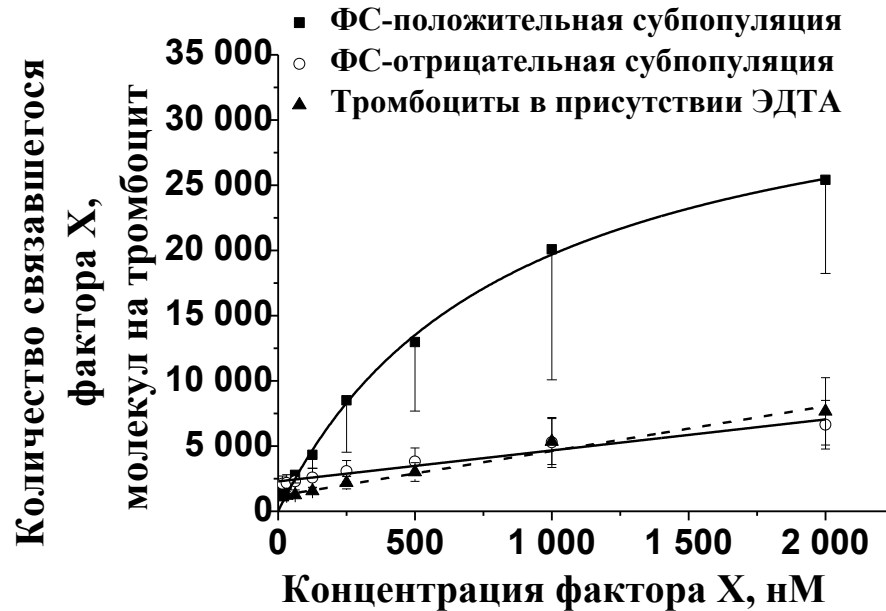


Рисунок 12. Связывание факторов X с субпопуляциями активированных тромбоцитов в присутствии (пунктирная линия) и в отсутствии (сплошные линии) ЭДТА. Связывание оценивали методом проточной цитометрии. На графике приведены средние \pm SD (n=3).

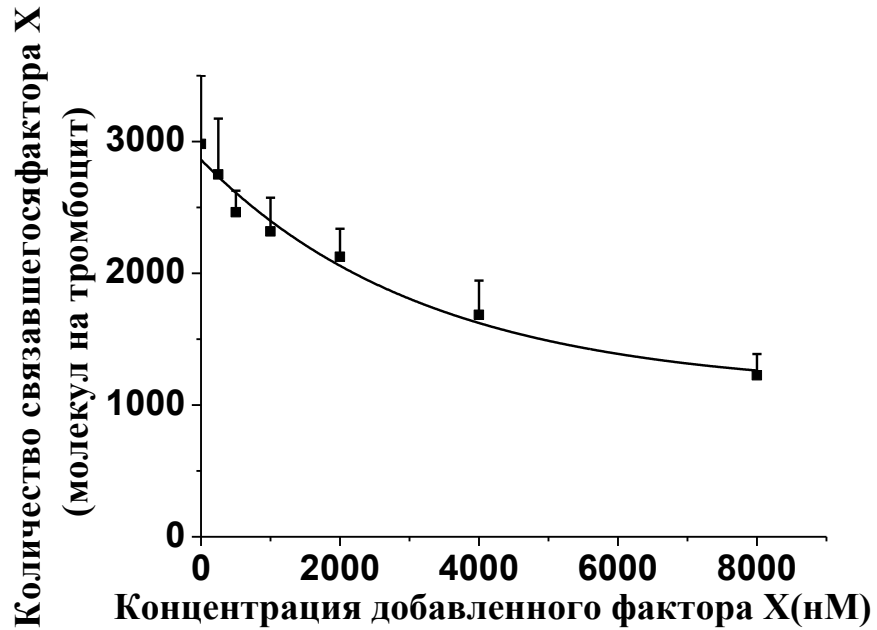


Рисунок 13. Связывание фактора X-ФИТЦ в присутствии избытка немеченого фактора X. Меченный флуоресцеином фактор X (250 нМ) инкубировали с активированными тромбином (100 нМ) тромбоцитами (50 000 кл/мкл) при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем в смесь добавляли немеченый фактор X в указанных концентрациях и инкубировали в течение 5 минут. Связывание оценивали методом проточной цитометрии. На рисунке показано связывание только с ФС - положительной субпопуляцией тромбоцитов.

3.1.2 Кинетические характеристики связывания факторов X и Xa с мембраной фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов

После добавления флуоресцентно меченого фактора X или Xa наблюдалось резкое увеличение флуоресценции тромбоцитов, что свидетельствует о связывании факторов с мембраной (Рисунок 14). Это связывание достигало своего насыщения примерно через 10 минут после добавления факторов. Экспериментальные данные были аппроксимированы с использованием нелинейного метода наименьших квадратов в предположении экспоненциальной зависимости. Полученные при этом кинетические константы ассоциации приведены в таблице 1 [116].

Таблица 1. Кинетические параметры взаимодействия факторов X и Xa с фосфолипидными везикулами и фосфатидилсерин положительными тромбоцитами

	ФХ, фосфолипидные везикулы	ФХа, фосфолипидные везикулы	ФХ, фосфатидилсерин положительные тромбоциты	ФХа, фосфатидилсерин положительные тромбоциты
Кажущаяся $K_d \pm SEM$ (нМ)	400±80	700±60	600±100	70±20 ^a
$k_+ \pm SEM$ (нМ ⁻¹ с ⁻¹)	— ^b	— ^b	0,0020±0.0003	0,010±0,002
$k_- \pm SEM$ (с ⁻¹)	— ^b	— ^b	0,9±0,3	0,5±0,3
Кажущееся число сайтов связывания на тромбоцит/ везикулу± SEM	8000±800	10000±1900	10000±900	500±6 ^c

^a Параметры были рассчитаны по кривым на рисунках. Приведены средние ±SEM (n=3).

^b Данные до достижения плато отсутствуют, что не позволяет получить точные значения.

^c Приведены данные только для высокоаффинного сайта. Для аппроксимации кривой связывания фактора Xa с ФС-положительными тромбоцитами была выбрана двухсайтовая модель связывания. Кажущаяся K_d и количество сайтов связывания на тромбоцит было рассчитано только для высокоаффинного сайта. Для низкоаффинного сайте можно рассчитать только наклон (7.8±0.9 молекул/нМ)

Наблюдаемая после разбавления в 20 раз диссоциация фактора с мембраны тромбоцитов представляет собой двухступенчатый процесс. Первая стадия процесса протекает достаточно быстро, буквально в первые пять минут, при этом с мембраны диссоциирует 30 – 50 % связавшегося фактора. Вторая стадия медленная, диссоциирует значительно меньшее количество фактора. При этом, как видно из рисунка 14, достигается плато, которое находится значительно

выше, чем можно было бы предположить из экспериментов по равновесному связыванию с той же концентрацией свободного фактора (Рисунок 14 врезки).

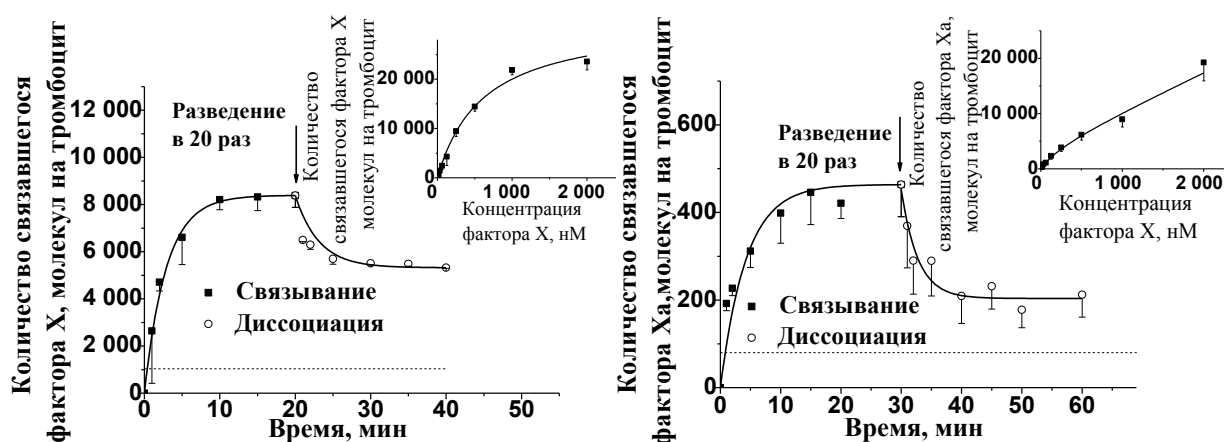


Рисунок 14. Кинетика связывания и диссоциации факторов X (А) и Xa(Б) с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. Связывание факторов X-ФИТЦ (Xa-ФИТЦ) анализировали с помощью проточного цитометра в моменты времени: 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут после добавления фактора. После достижения насыщения, образцы разводили в 20 раз буфером А с CaCl_2 (2,5 мМ), для анализа диссоциации факторов. На графиках приведены средние \pm SD (n=3).

Другими словами, процесс связывания- диссоциации факторов X и Xa с мембраной активированных идет с гистерезисом (Рисунок 15). То есть, связанный фактор состоит из двух фракций, одна из которых, связана обратимо, а вторая необратимо.

Для исследования возможных отличий в случае активации тромбоцитов сразу двумя агонистами, мы провели дополнительные эксперименты. Тромбоциты были активированы в концентрации 50 000 кл/мкл с использованием тромбина 100 нМ и коллаген подобного пептида 20 мкг/мл. После этого суспензию активированных тромбоцитов инкубировали с фактором Xa-ФИТЦ (30 нМ). Существенных отличий по сравнению с тромбоцитами активированными только тромбином (100 нМ) не наблюдалось (Рисунок 16). Фактор, оставшийся на мембране ФС-положительных тромбоцитов после разведения в 20 раз может быть полностью удален добавлением ЭДТА(10 мМ) [116].

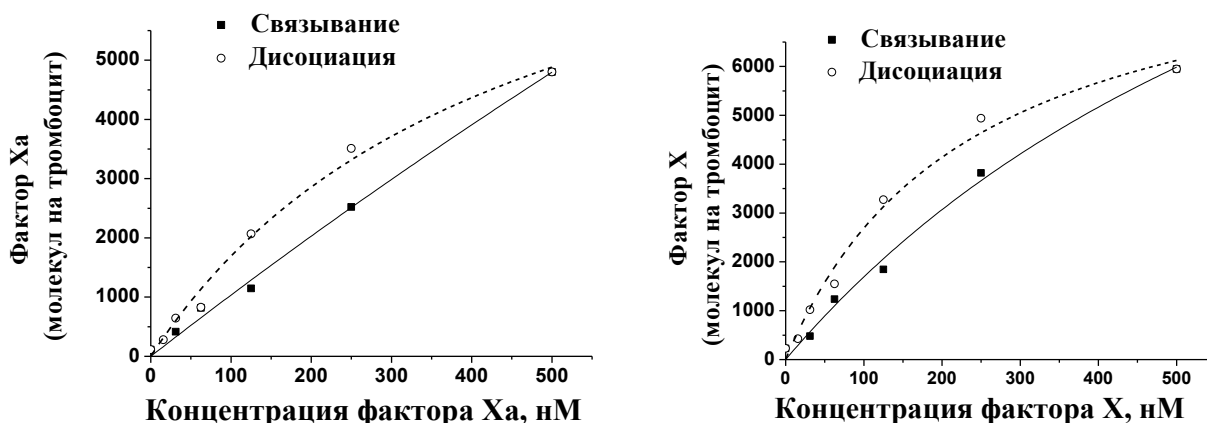


Рисунок 15. Кривые связывания- диссоциации факторов свертывания X - ФИТЦ (Ха-ФИТЦ) с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. Фактор X-ФИТЦ (Ха-ФИТЦ) в указанной концентрации инкубировали с активированными тромбоцитами(50 000 кл/мкл) в течение 20 минут. Связывание факторов X-ФИТЦ (Ха-ФИТЦ) анализировали с помощью проточного цитометра в моменты времени: 0; 1; 10; 20; 30 минут после добавления фактора. После достижения насыщения, образцы разводили в два раза буфером А с CaCl_2 (2,5 мМ), для анализа диссоциации факторов. Связывание фактора показано сплошной линией, диссоциация – пунктирной.

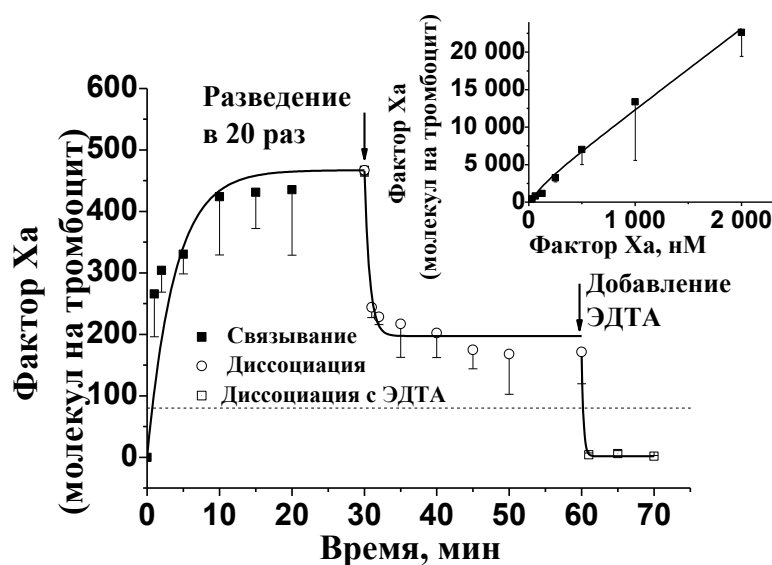


Рисунок 16. Кинетика связывания и диссоциации факторов Ха (Б) с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. Фактор Ха-ФИТЦ(30 нМ) инкубировали с тромбоцитами(50 000 кл/мкл), активированными тромбином(100 нМ) и коллаген подобным пептидом (20 мкг/мл). Связывание фактора Ха-ФИТЦ анализировали с помощью проточного цитометра в моменты времени: 0; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут после добавления фактора. После достижения насыщения, образцы разводили в 20 раз буфером А с CaCl_2 (2,5 мМ), для анализа диссоциации факторов. На графиках приведены средние \pm SD (n=3).

3.1.3 Взаимодействие факторов X и Xa с фосфолипидными везикулами

Единственным различием, которое наблюдалось между тромбоцитами и фосфолипидными везикулами, было повышение сродства связывания ФХа с тромбоцитами (Рисунок 17). Это хорошо согласуется с литературными данными, что на тромбоцитах для ФХа существует дополнительный высокоаффинный сайт в виде ФVa.

Так же как и в случае ФС-положительных тромбоцитов для фосфолипидных везикул часть фактора оказывается необратимо связанной с мембраной. Это свидетельствует о том, что данное явление может быть объяснено только взаимодействием факторов с фосфолипидной мембраной, а не присутствием каких-либо тромбоцитарных белков.

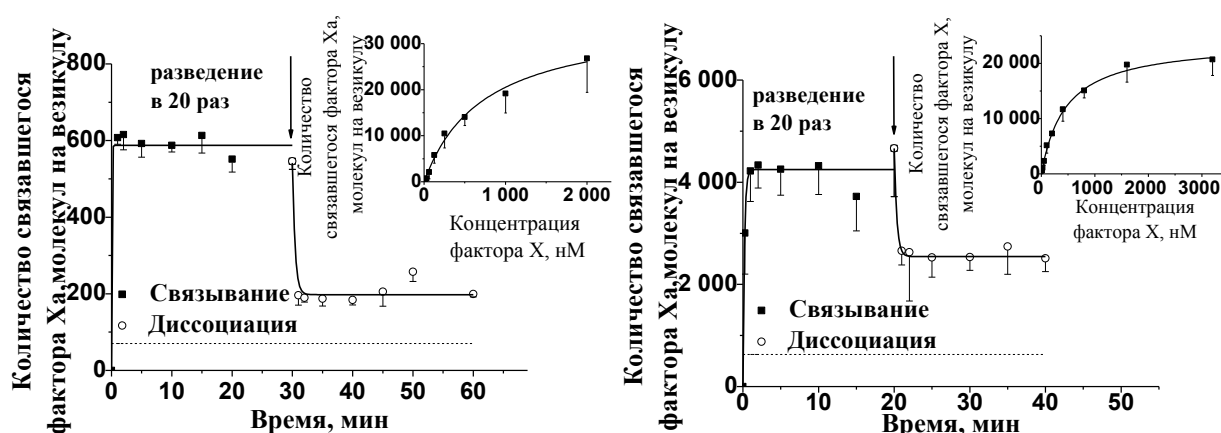


Рисунок 17. Кинетика связывания и диссоциации факторов X (А) и Xa (Б) с фосфолипидными везикулами. На графиках приведены средние \pm SD ($n=3$).

3.1.4 Взаимодействие факторов X и Xa с активированными тромбоцитами у пациентов с синдромом серых тромбоцитов

Основное качественное отличие тромбоцитов и фосфолипидных везикул – это наличие на тромбоцитах дополнительного сайта связывания (таблица 1). В литературе существуют данные, что в качестве высокоаффинного сайта связывания выступает фактор Va, выходящий из альфа-гранул тромбоцитов. Это

было подтверждено в экспериментах с тромбоцитами пациентов с синдромом серых тромбоцитов (Рисунок 18).

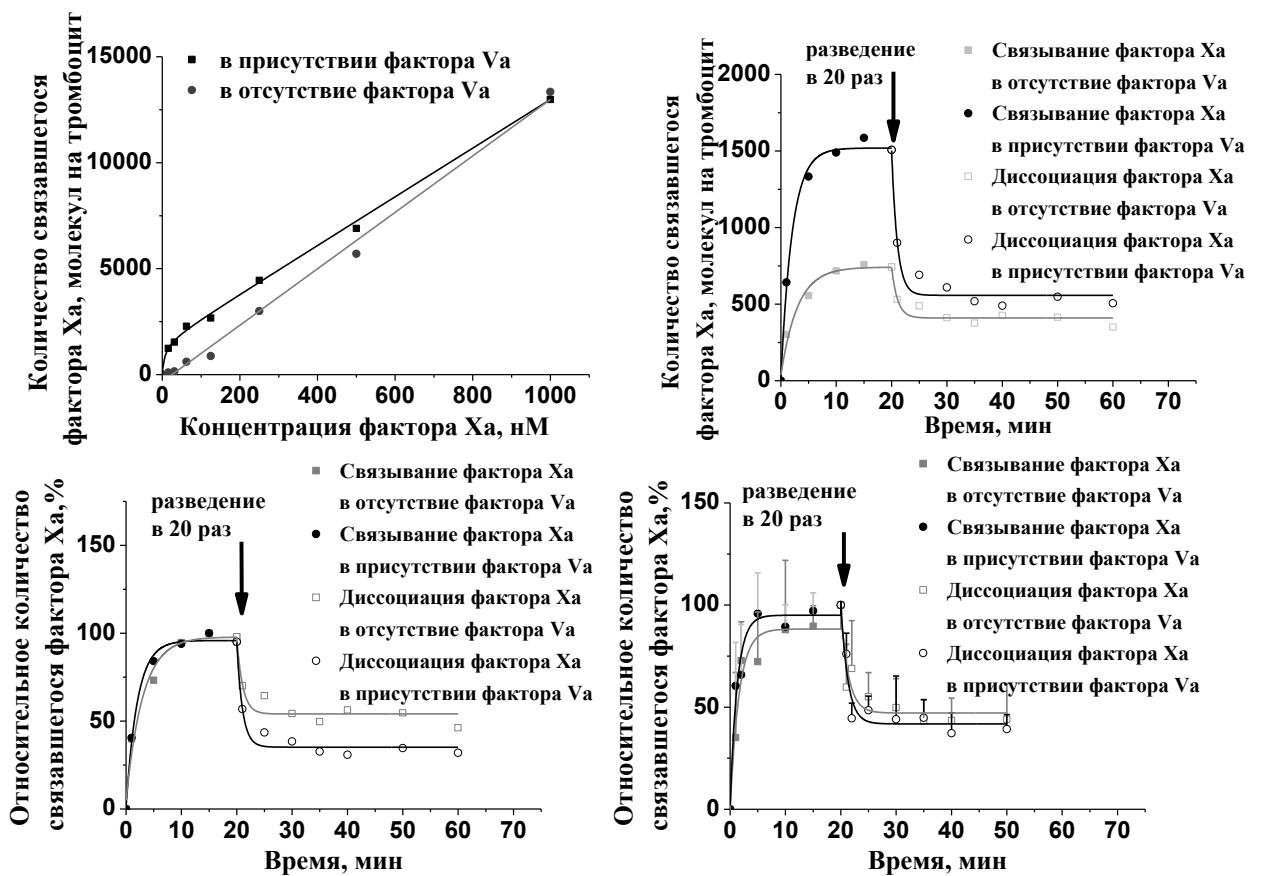


Рисунок 18. Связывание ФХа с активированными тромбоцитами пациентов с синдромом серых тромбоцитов. (А) Равновесное связывание ФХа с ФС-положительными тромбоцитами в присутствии (черная линия) или отсутствии (серая линия) фактора Va (20 нМ). (Б) Кинетика связывания и диссоциации ФХа с ФС-положительными тромбоцитами. ФХа (30 нМ) инкубировали с активированными тромбоцитами (50 000 кл/мкл) в присутствии (черная линия) или отсутствии (серая линия) фактора Va (20 нМ). (В) Относительное связывание ФХа в присутствии (черная линия) или отсутствии (серая линия) фактора Va (20 нМ). Представлены результаты типичного эксперимента из четырех, проведенных с кровью разных доноров. (Г) Относительное связывание ФХа в присутствии (черная линия) или отсутствии (серая линия) фактора Va (20 нМ) для четырех различных пациентов. На графике приведены средние \pm SD (n=4).

При этом часть фактора также оказывается необратимо связанной с мембраной, но высокоаффинный сайт связывания пропадает. Эти данные дополнительно подтвердили, что данное явление не объясняется наличием каких-

либо специфических белков на мембране активированных тромбоцитов и связано только с взаимодействием факторов с фосфолипидами мембраны.

3.1.5 Исследование взаимодействия фактора X с фосфолипидной мембраной методом поверхностного плазмонного резонанса

Для того, чтобы проверить, будет ли наблюдаться гистерезис другими более известными методами изучения белок-мембранного взаимодействия, мы провели эксперименты с использованием метода плазмонного резонанса (который не требует маркировки белка и является классическим высокочувствительным методом с хорошим временным разрешением). Результаты полученные методом плазмонного резонанса полностью согласуются с данными проточной цитометрии, то есть связанный фактор состоит из двух фракций, одна из которых, связана обратимо, а вторая необратимо. Другими словами, процесс связывания-диссоциации фактора X с фосфолипидной мембраной идет с гистерезисом (Рисунок 19) [116].

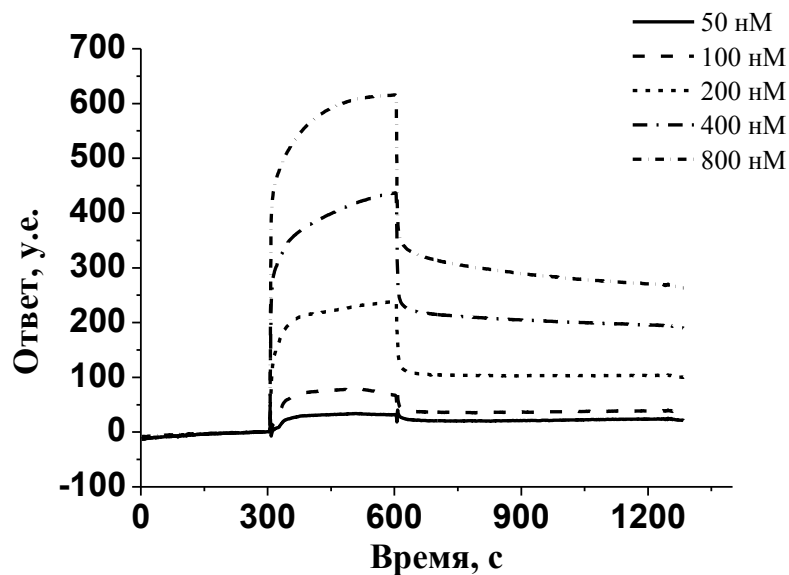


Рисунок 19. Кривые ассоциации-диссоциации фактора X с фосфолипидной мембраной, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса.

3.1.6 Влияние различных условий на взаимодействие факторов X и Xa с фосфолипидной мембраной

Большинство экспериментов в данной работе были проведены в буфере Тироде, содержащем 2,5 мМ CaCl₂ и с использованием фосфолипидных везикул с составом 25:75 PS: PC. Данные условия являются классическими для подобного рода экспериментов. Однако, нами были проведены эксперименты для того, чтобы убедиться, что необратимо связанная с мембраной часть фактора, сохранится и в условиях более близких к физиологическим (концентрация CaCl₂ 1,5 мМ и состав везикул 12:88 ФС: ФХ). Как видно из рисунка 20 данный феномен сохраняется не зависимо от выбранных условий эксперимента.

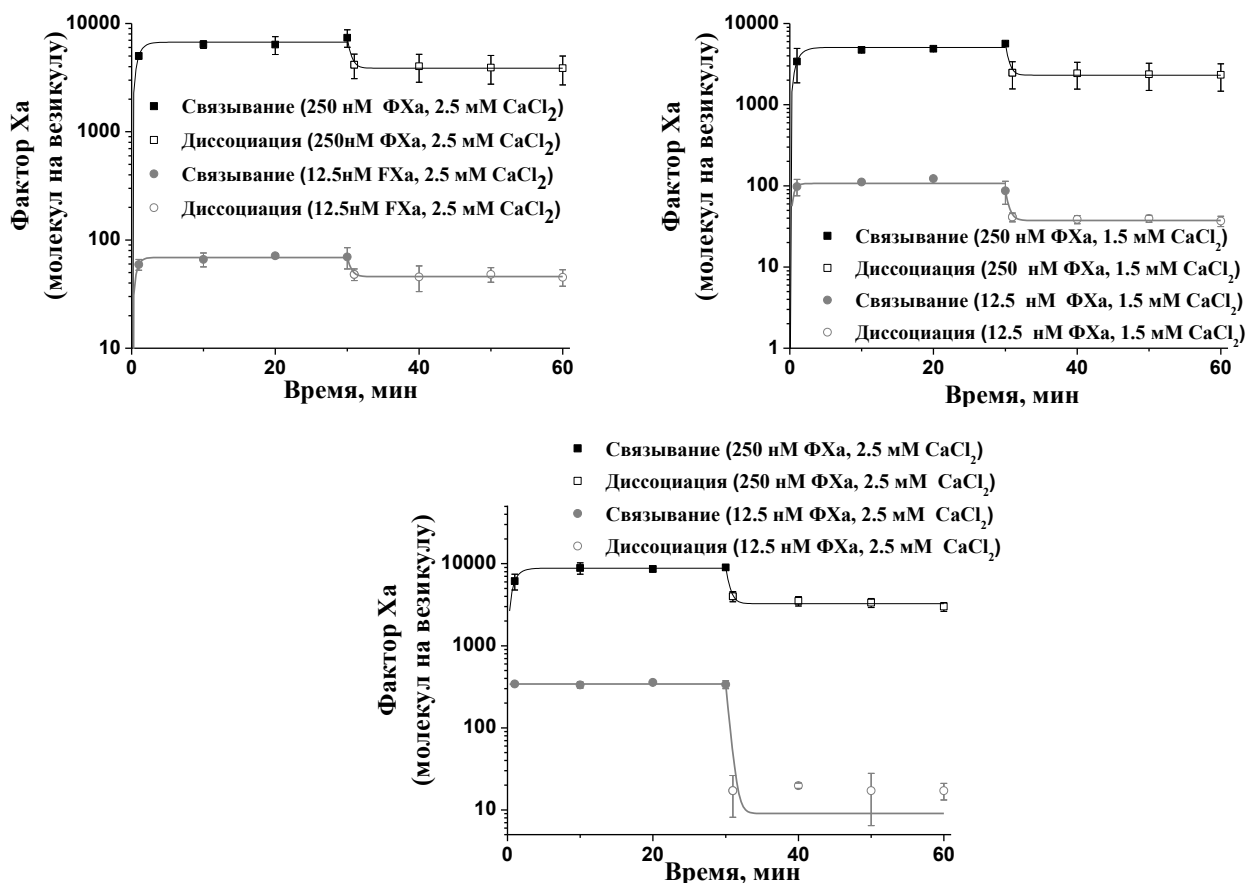


Рисунок 20. Влияние концентрации ионов Ca²⁺ и различного фосфолипидного состава на взаимодействие фактора Ха с искусственными фосфолипидными везикулами.

Кроме того, как видно из рисунка 21 при разведении в различные моменты времени после начала ассоциации на фосфолипидных везикулах остается различное количество ФХ. Эти данные свидетельствуют о том, что появление необратимо связанного с мембраной фактора обусловлено какими-то процессами, протекающими на мембране. Эти процессы приводят к тому, что со временем ФХ и ФХа начинают хуже диссоциировать. Существуют два возможных объяснения данного явления. Первое – многоступенчатая ассоциация, когда каждая отдельная молекула со временем начинает крепче удерживаться на мембране. Вторая – образование олигомеров, когда молекулы фактора взаимодействуют между собой, чтобы сделать взаимодействие с мембраной крепче. Так, существуют данные о том, что ФХа способен образовывать димеры при взаимодействии с фосфолипидными мембранами. Именно олигомеризация фактора на мембране могла бы объяснить такое плохое вытеснение меченого фактора избытком немеченого на рисунке 13. Концентрации немеченого фактора значительно превышают кажущуюся K_d , однако значительная доля меченого фактора остается связанной с мембраной, по всей видимости, из-за того, что вытесняются только слабо связанные с мембраной мономеры.

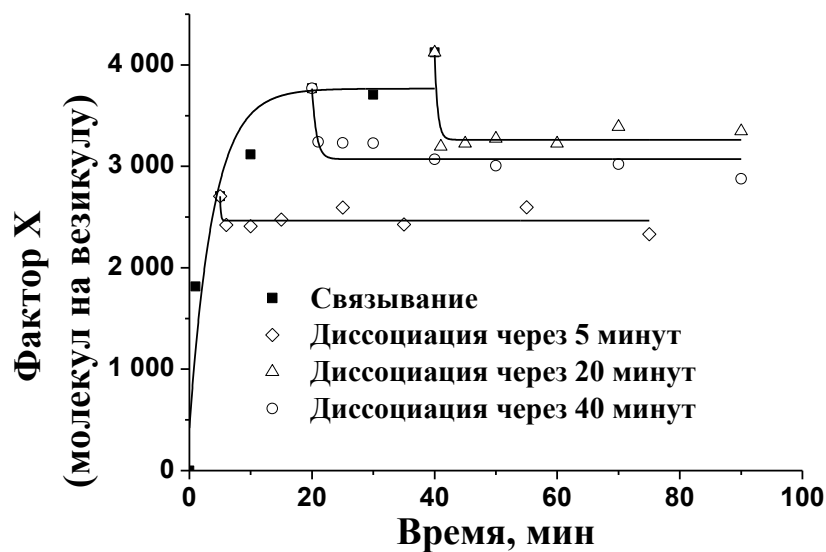


Рисунок 21. Кривые диссоциации фактора X при разбавлении в различные моменты времени

3.1.7 Сравнение кинетики взаимодействия ФХ и ФХа с фосфолипидными везикулами при различных концентрациях факторов

Как видно из рисунка 22, связывание ФХ-ФИТЦ незначительно ингибируется избытком немеченого ФХ. В то время как для ФХа картина совершенно другая. Немеченый ФХа значительно увеличивает связывание ФХа-ФИТЦ. Кроме того значительно больше фактора остается связанным с мембраной после разбавления буфером. Эти данные могут указывать на то, что отличаются механизмы закрепления ФХ и ФХа на фосфолипидных мембранах. По всей видимости, для фактора Ха основную роль, играет мультимеризация. В то время, как закрепление фактора Х на фосфолипидной мембране происходит за счет его стабилизации [116].

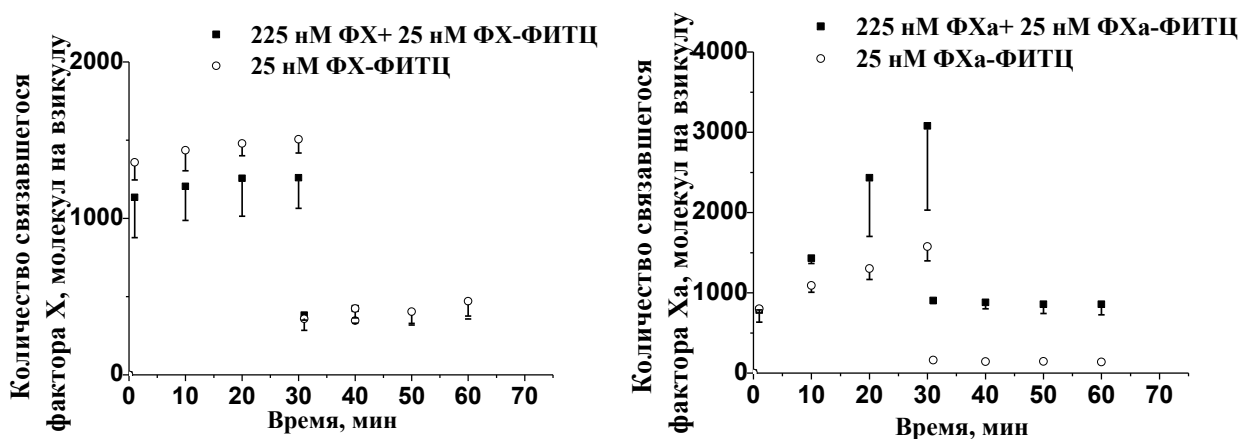


Рисунок 22. Сравнение кинетики взаимодействия ФХ (А) и ФХа (Б) с фосфолипидными везикулами при различных концентрациях факторов. Фосфолипидные везикулы (5мкМ) инкубировали с ФХ-ФИТЦ / ФХа-ФИТЦ (25 нМ) в присутствии ФХ(225 нМ) / ФХа(225 нМ) в течение 30 мин. В моменты времени 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут отбирали аликвоты и анализировали их с помощью проточного цитометра. После достижения насыщения раствор разбавляли в 20 раз буфером, содержащим CaCl_2 , для анализа диссоциации. На графике приведены средние \pm SD (n=3)

3.1.8 Возможность гетероолигомеризации факторов X и Xa

Эксперименты по связыванию меченого ФХа в присутствии немеченого FX (рисунок 23) показали, что FX способен значительно увеличивать связывание ФХа. Это свидетельствует о том, что могут образовываться гетероолигомеры факторов X и Xa, и это может способствовать задержанию фактора Xa на фосфолипидной мембране. Кроме того в составе гетероолигомеров факторов X и Xa на мембране может оставаться гораздо больше фактора Xa, чем в составе гомоолигомеров Xa-Xa, так как концентрация фактора X в крови на несколько порядков больше, чем концентрация фактора Xa.

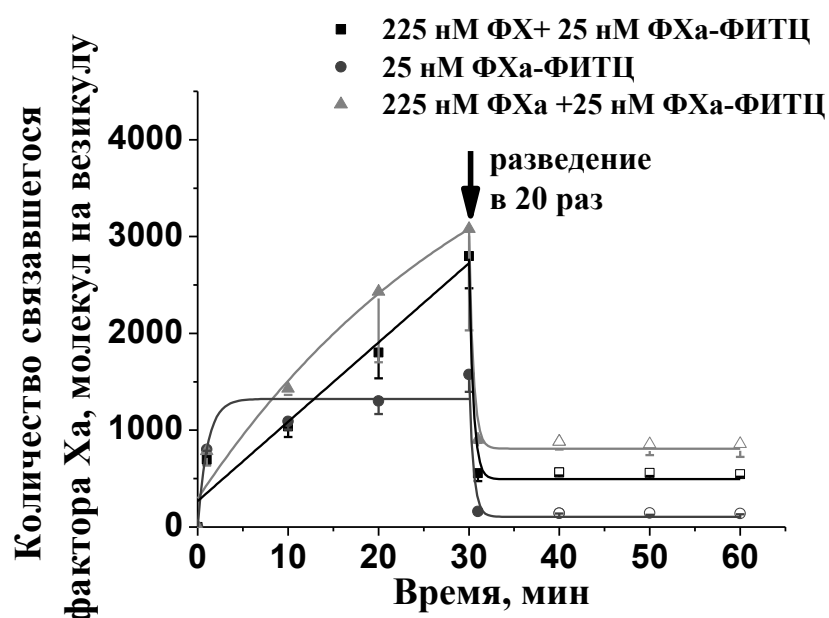


Рисунок 23. Кинетика связывания — диссоциации FX (Xa) с фосфолипидными везикулами. (А) Фосфолипидные везикулы (5мкМ) инкубировали с ФХа-ФИТЦ (25 нМ) в присутствии ФХа(225 нМ) или FX(225 нМ) в течение 30 мин. В моменты времени 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут отбирали аликвоты и анализировали их с помощью проточного цитометра. После достижения насыщения раствор разбавляли в 20 раз буфером, содержащим CaCl₂, для анализа диссоциации. На графике приведены средние ±SD (n=3).

3.1.9 Взаимодействие факторов X и Xa с тромбоцитарным тромбом

Вымывание факторов свертывания из тромба в условиях потока может ухудшать стабилизацию тромбов фибрином, а также может приводить к нежелательной коагуляции и эмболизации ниже по течению кровяного русла. Естественно предположить, что закрепление факторов на мембране может препятствовать их вымыванию из тромбов в условиях потока. Мы проверили эту гипотезу экспериментально с использованием плоскопараллельных камер с коллагеном при скорости сдвига 500 c^{-1} (Рисунок 24).

Проточные камеры промывали раствором флуоресцентно меченого FXa в двух концентрациях 5 нМ или 10 нМ. Затем, концентрация фактора в промывающем растворе была увеличена в 10 раз, после чего снова уменьшена до 5 нМ и 10 нМ соответственно. После этого камеру промывали Буфером Тироде, содержащим 2,5 мМ CaCl_2 . Эксперимент показал, что и в случае тромбоцитарного тромба часть фактора Xa оказывается необратимо связанной с мембраной тромбоцитов [116].

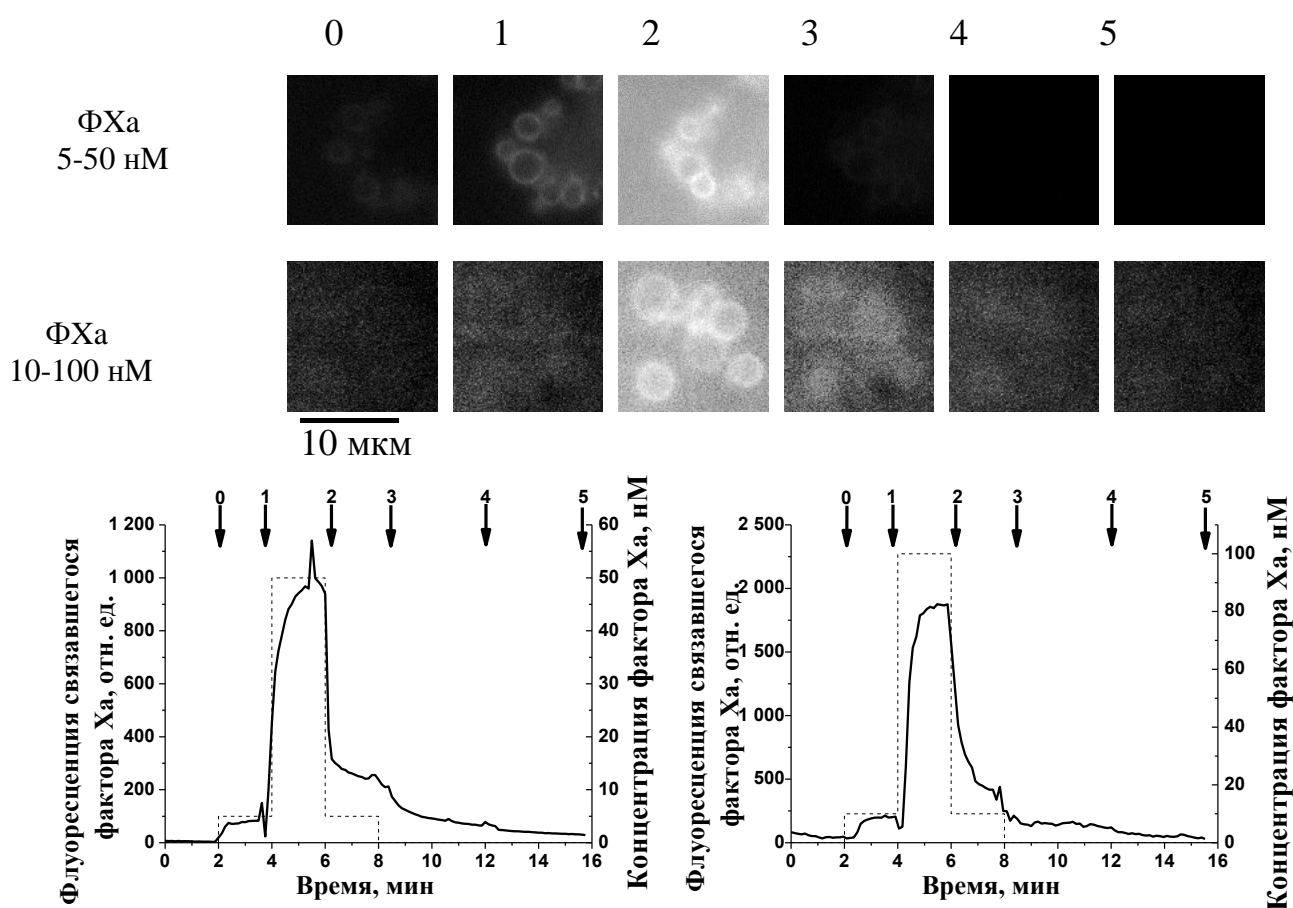


Рисунок 24. Типичные микрофотографии тромбоцитарного агрегата, полученного в плоскопараллельной проточной камере с нанесенным коллагеном. Фотографии получены методом конфокальной микроскопии. В цельную кровь здоровых доноров в качестве антикоагулянта добавляли цитрат натрия (106 мМ) в соотношении 1:9. Затем кровь рекальцифицировали и прокачивали через плоскопараллельную проточную камеру со скоростью сдвига 500 с^{-1} . После этого через проточную камеру прокачивали буфер А, содержащий CaCl_2 (панель 0). Затем проточную камеру промывали раствором, содержащим ФХа (5нМ), в течение двух минут (панель 1). После этого камеру в течение двух минут промывали раствором, содержащим ФХа (50нМ) (панель 2). После чего проточную камеру вновь промывали раствором, содержащим ФХа (5нМ), в течение пяти минут (панель 3). После этого через проточную камеру в течение пяти минут прокачивали буфер А, содержащий 2,5 мМ CaCl_2 (панель 4). В заключение, проточную камеру промыли буфером А, содержащим 10 мМ ЭДТА (панель 5). (Б) Показана типичная кривая ассоциации-диссоциации фактора Ха с тромбоцитарным агрегатом в условиях потока. Относительная флуоресценция ФХа показана сплошной линией, концентрация ФХа в растворе показана пунктиром. Представлены результаты типичного эксперимента из четырех, проведенных с кровью разных доноров.

3.1.10 Визуализация олигомеров фактора X и Аннексина V

Для проверки гипотезы о том, что олигомеры диссоциируют с мембраны хуже, чем мономеры мы использовали аннексин V – хорошо охарактеризованный белок, который при связывании с фосфатидилсерин-содержащей мембраной образует тримеры. Как видно из рисунка 25 кривые ассоциации-диссоциации аннексина V качественно не отличаются от таковых для факторов X/Ха. Это хорошо согласуется с работами Бриссона, который обнаружил, что мембраносвязанный аннексин V из двух фракций, одна из которых связана обратимо, а вторая – необратимо. Это косвенно подтверждает, что олигомеры белков могут быть более тесно связаны с мембраной, чем мономеры.

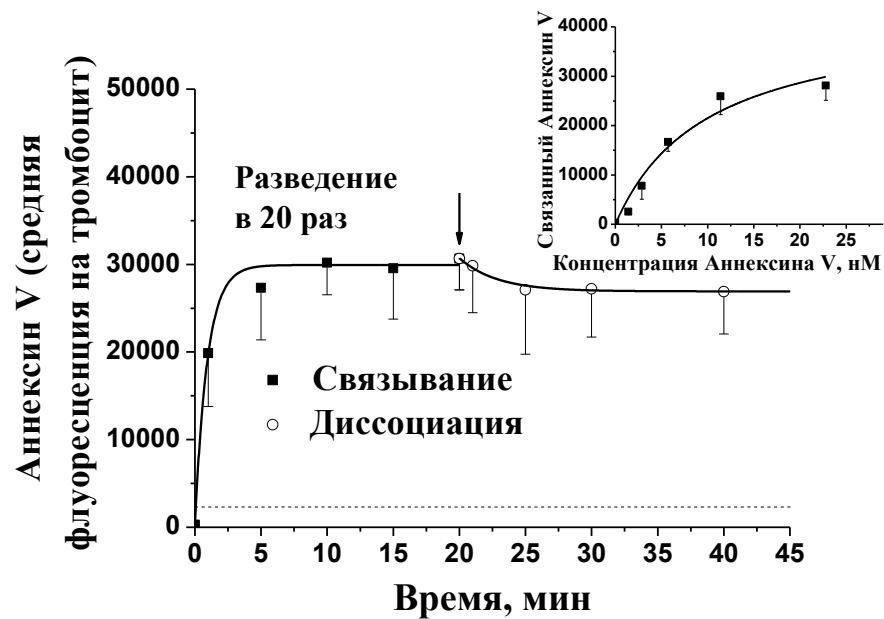


Рисунок 25. Кинетика связывания и диссоциации аннексина V с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. На графиках приведены средние \pm SD (n=3).

Однако, как видно на рисунке 26 с помощью электрофореза в полиакриламидном геле напрямую визуализировать удастся только олигомеры аннексина V, но не фактора X [116].

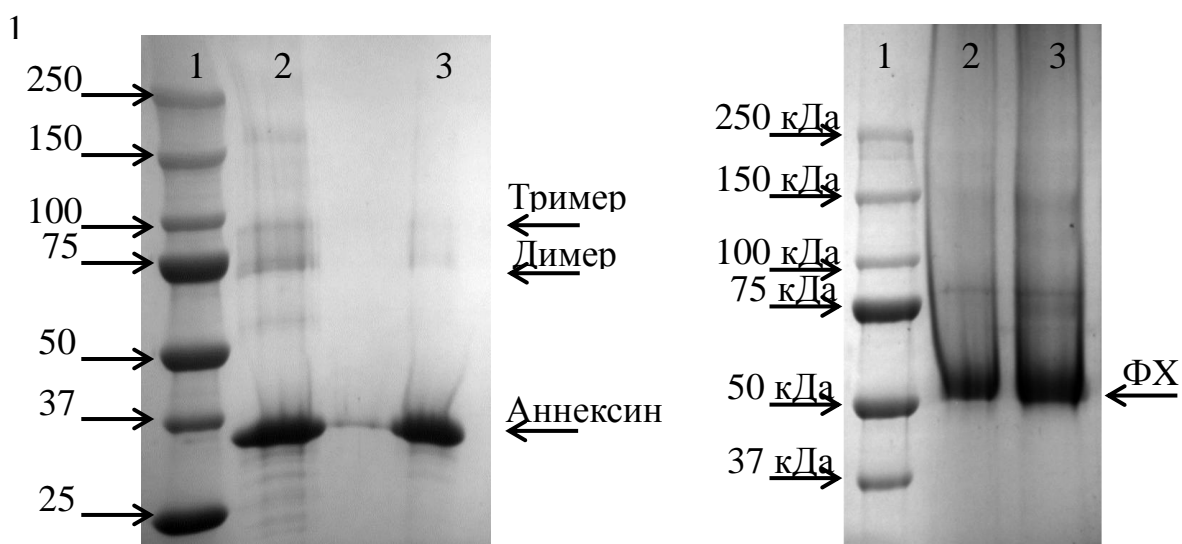
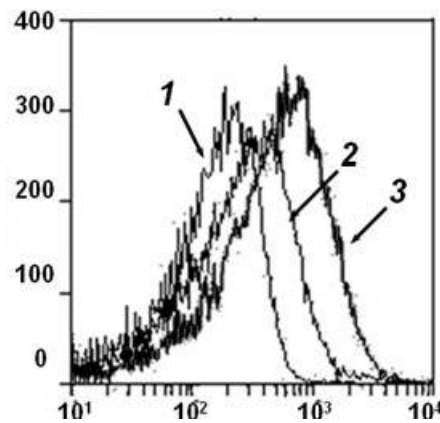


Рисунок 26. Электрофорез аннексина V (слева) и фактора X (справа) в присутствии или в отсутствие фосфолипидных везикул. Для электрофореза использовали полиакриламидный гель с градиентом 4-15%. На левой панели: 1 - стандарт молекулярной массы 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа; 2 – аннексин V сшитый 0,1% параформальдегидом в присутствии 2,5 мМ CaCl₂ и фосфолипидных везикул (PS: PC 25:75); 3 – аннексин V сшитый 0,1% параформальдегидом без везикул. На правой панели: 1 – стандарт молекулярной массы 250, 150, 100, 75, 50, 37 и 25 кДа; 2 – фактор X сшитый 0,1% параформальдегидом в присутствии 2,5 мМ CaCl₂ и фосфолипидных везикул (PS: PC 25:75); 3 – фактор X сшитый 0,1% параформальдегидом без везикул.

3.2 Взаимодействие фактора XII с активированными тромбоцитами.

Для оценки участия тромбоцитов в связывании фактора XII были использованы препарат очищенного фактора XII и тромбоциты, очищенные гель-фильтрацией от белков и кофакторов плазмы. Эти условия позволяли исключить возможный вклад факторов плазмы в наблюдаемые эффекты. Препарат фактора XII был конъюгирован с флуорохромом (ФИТЦ) так, как описано выше. Оценку деградации белка в процессе меченья проводили методом электрофореза в ПААГ. Кроме того потеря активности полученного конъюгата ФИТЦ-XII оцененная с использованием коммерческого набора фирмы Ренам (Москва, Россия) была не более 15%.

Для исследования взаимодействия с ФИТЦ-ХII использовали неактивированные и активированные тромбином (100 нМ) тромбоциты (Рисунок 27). Тромбоциты в концентрации 200 тыс./мкл инкубировали 5 мин с ФИТЦ-ХII (0-1000 нМ) и AlexaFluor 647- аннексином V (1,5% v/v), разводили в 10 раз и анализировали при помощи проточного цитофлуориметра. Полученные значения интенсивности флуоресценции конвертировали в среднее число связанных молекул фактора ХII на один тромбоцит, используя калибровочную кривую, которая была получена при помощи специализированного набора реактивов фирмы Invitrogen (Green Flow Cytometry Intensity Calibration Kit at 488-nm excitation and 515-nm emission).



Флуоресценция ФИТЦ-ХII, у.е.

Рисунок 27. Связывание Фактора ХII с тромбоцитами. На гистограмме представлено распределение тромбоцитов по связыванию фактора ХII: 1 - контроль (тромбоциты без FXII); 2 - активированные тромбином (100 нМ) тромбоциты; 3 - неактивированные тромбоциты. Представлены результаты типичного эксперимента из трех, проведенных с кровью разных доноров.

В результате проведенных исследований было выявлено, что ФИТЦ-ХII связывался активированными тромбоцитами существенно лучше, чем неактивированными, причем избирательно с фосфатидилсерин- положительной субпопуляцией. Связывание было независимым от кальция и не имело насыщения в диапазоне концентраций ФИТЦ-ХII от 0 до 1 мкМ (Рисунок 28). При

физиологической концентрации фактора XII (450 нМ) количество связанного фактора составило 630 ± 90 молекул/тромбоцит (Рисунок 29) [117].

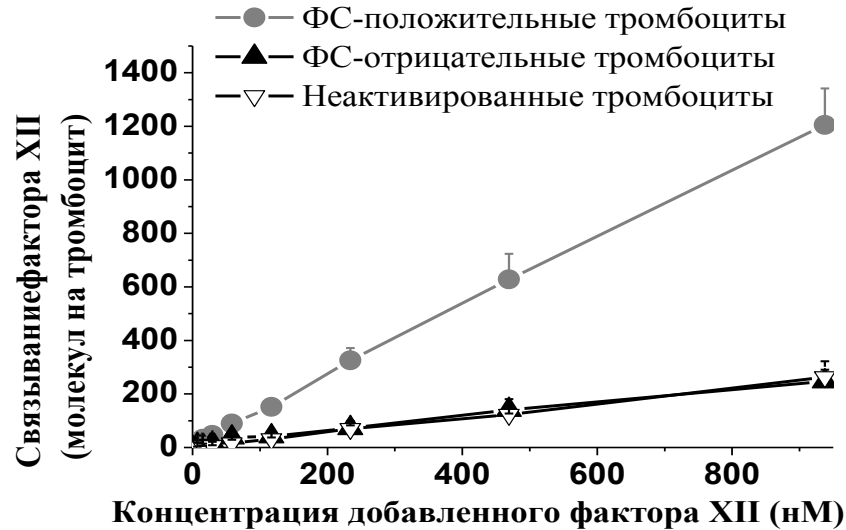


Рисунок 28. Связывание факторов XII с неактивированными тромбоцитами или с субпопуляциями активированных тромбоцитов. Связывание оценивали методом проточной цитометрии. На графике приведены средние \pm SD (n=3).

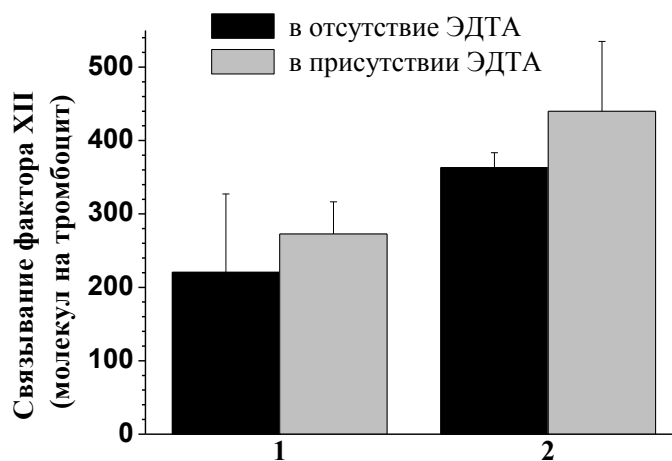


Рисунок 29. Влияние ЭДТА на связывание фактора XII (450 нМ) с (1) неактивированными или (2) активированными тромбоцитами (100 нМ).

3.3 Распределение факторов на мембране активированных тромбоцитов

3.3.1 Распределение Аннексина V

Как было сказано раньше, при сильной активации тромбином (100 нМ) или тромбином (100 нМ) + CRP (20 мкг/мл) тромбоциты делятся на две субпопуляции, отличающиеся по своей способности связывать аннексин V (рисунок 8). В соответствии с микроскопическими данными, две субпопуляции тромбоцитов отличаются не только способностью связывать Аннексин V, но и по морфологическим признакам. Как видно на рисунке 30 ФС-отрицательные тромбоциты, не связывающие Аннексин V, образуют ламеллиподии и распластываются по поверхности покровного стекла, покрытого фибриногеном. В то же время ФС-положительные тромбоциты, связывающие аннексин V, характеризуются шарообразной формой. При этом на поверхности ФС-положительных тромбоцитов выделяется небольшая область («шапка»), с которой связывается в несколько раз больше Аннексина, чем со всей остальной мембраной тромбоцита [64, 118].

A

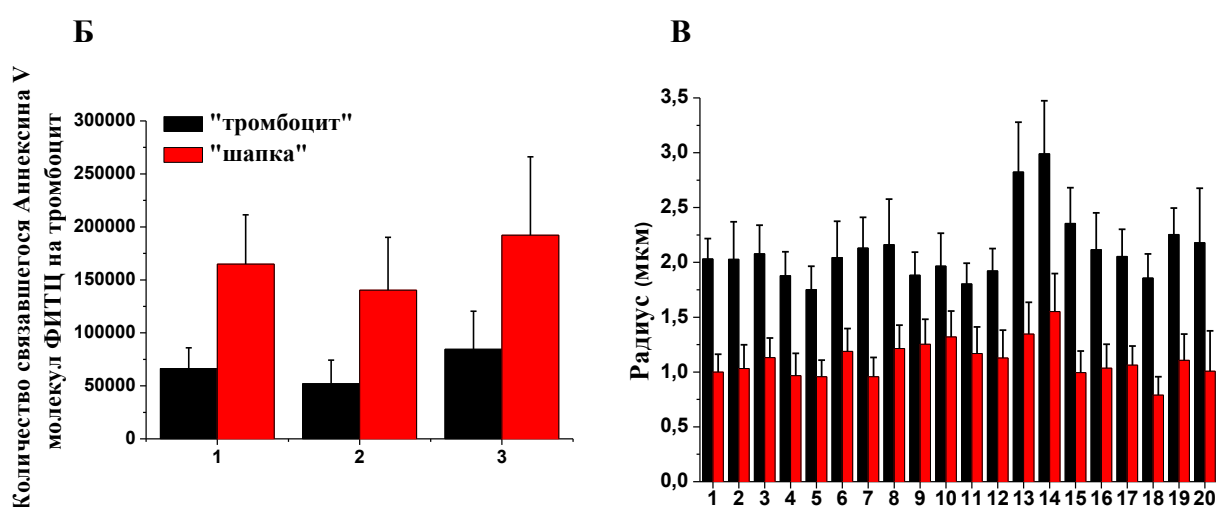
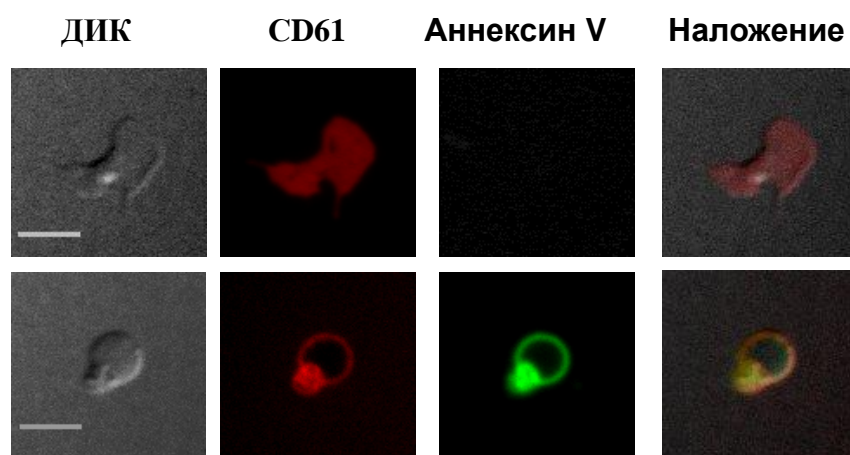


Рисунок 30. Распределение Аннексина V на мембране активированных тромбоцитов. Микрофотографии были получены с помощью конфокального микроскопа (A) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Красным показана флуоресценция CD61-PE, зеленым - флуоресценция Аннексин V-ФИТЦ. В первом ряду показаны ФС-отрицательные тромбоциты, во втором ФС-положительные. Приведенный масштаб соответствует 5 мкм. (Б) Количество связавшегося Аннексина V с ФС-положительными тромбоцитами в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Данные приведены для трех различных доноров. (В) Соотношение размеров «шапки» и всего тромбоцита для двадцати доноров. Приведены средние значения \pm SD (n=50).

Для количественной оценки связывания Аннексина V с прокоагулянтными тромбоцитами мы интегрировали интенсивность флуоресценции Аннексина V в «шапке» и на остальной поверхности тромбоцита. Мы получили, что с «шапкой» связывается в несколько раз больше Аннексина V, чем со всей остальной

мембраной тромбоцита. Была проведена оценка размеров «шапки» и всего тромбоцита. При этом получили, что радиус шапки составляет около 1 мкм, в то время как радиус тромбоцита около 2 мкм. Таким образом, получается четырехкратное различие в размерах и восьмикратная разница в объеме. В любом случае локальная концентрация аннексина в шапке в несколько раз выше, чем на остальной мембране тромбоцитов [118].

3.3.2 Распределение факторов

Нами было изучено распределение флуоресцентно меченых витамин К-зависимых факторов на мембранах активированных тромбоцитов, как видно из рисунка 31 оно аналогично распределению Аннексина V. С «шапкой» связывается в два раза больше факторов X, Xa и протромбина и на порядок больше фактора IXa, чем с остальной мембраной тромбоцита [118].

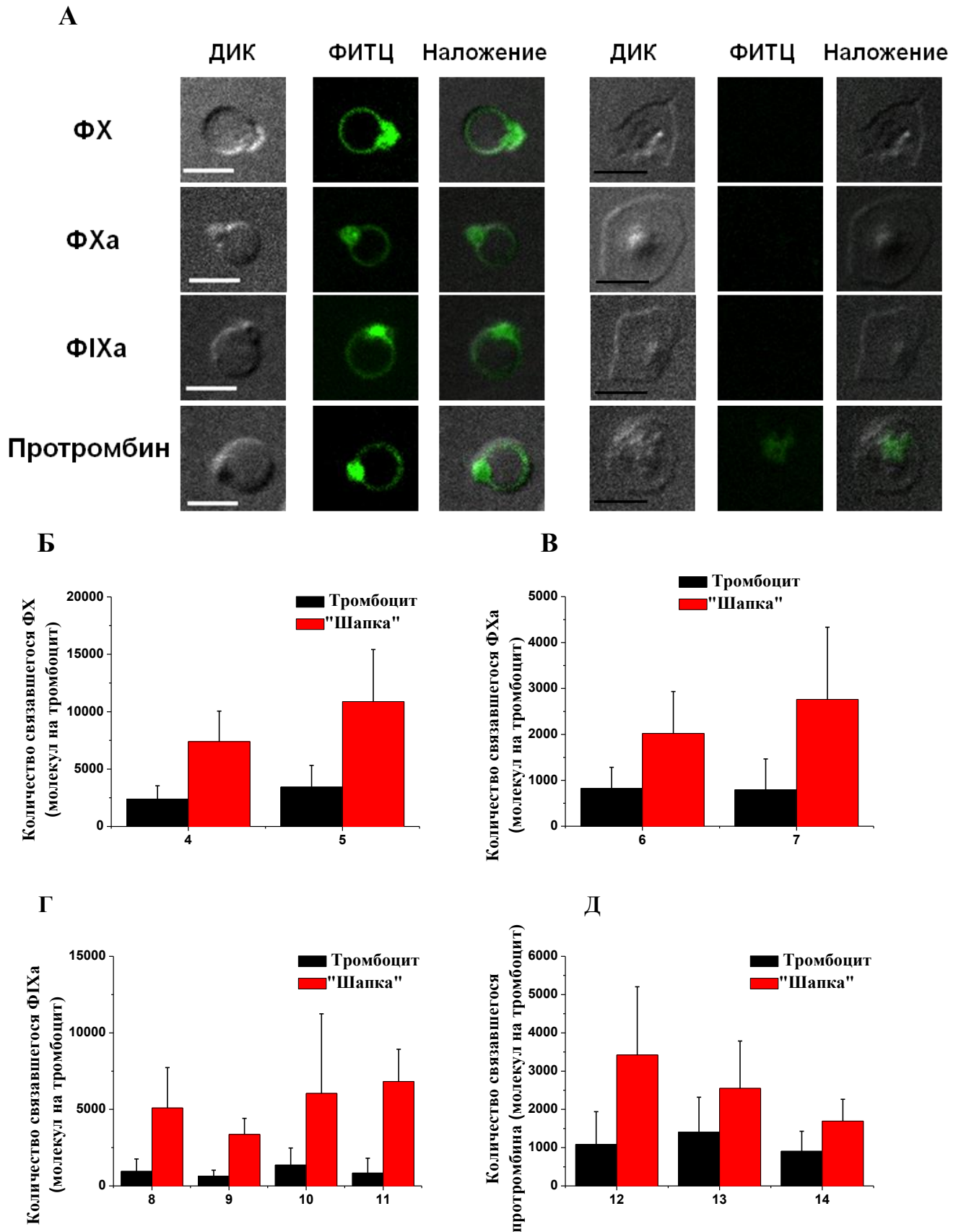


Рисунок 31. Распределение факторов IXa, X, Ха и протромбина на мембране активированных тромбоцитов. (А) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Зеленым показана флуоресценция флуоресцентно меченых факторов IXa, X, Ха и протромбина. Справа показаны ФС-отрицательные

тромбоциты, слева ФС-положительные. Приведенный масштаб соответствует 5 мкм. (Б-Д) Количество связавшихся факторов IXa, X, Xa и протромбина с ФС-положительными тромбоцитами в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Данные приведены для трех различных доноров. Приведены средние значения \pm SD (n=50).

3.3.3 Распределение кофакторов

Распределение кофакторов на мембране активированных тромбоцитов изучали с использованием специфичных антител. При этом мы изучали распределение только секретируемого тромбоцитами фактора V, без добавления внешнего фактора. Как можно увидеть из рисунка 29 флуоресценция антител к фактору V наблюдается только на ФС-положительных тромбоцитах в шапке. На остальной мембране ФС-положительных тромбоцитов, так же как на ФС-отрицательных тромбоцитах фактор V не детектируется.

В случае фактора VIII мы добавляли внешний фактор, а затем детектировали его также с использованием специфичных антител. При этом, как видно из рисунка 32, флуоресценция антител к фактору VIII наблюдалась как в «шапке» ФС-положительных тромбоцитов, так и на ФС-отрицательных тромбоцитах. Скорее всего такое различие обусловлено взаимодействием фактора VIII не только с ФС, но и с фактором Виллебранда, связанным с гликопротеином Ib [118].

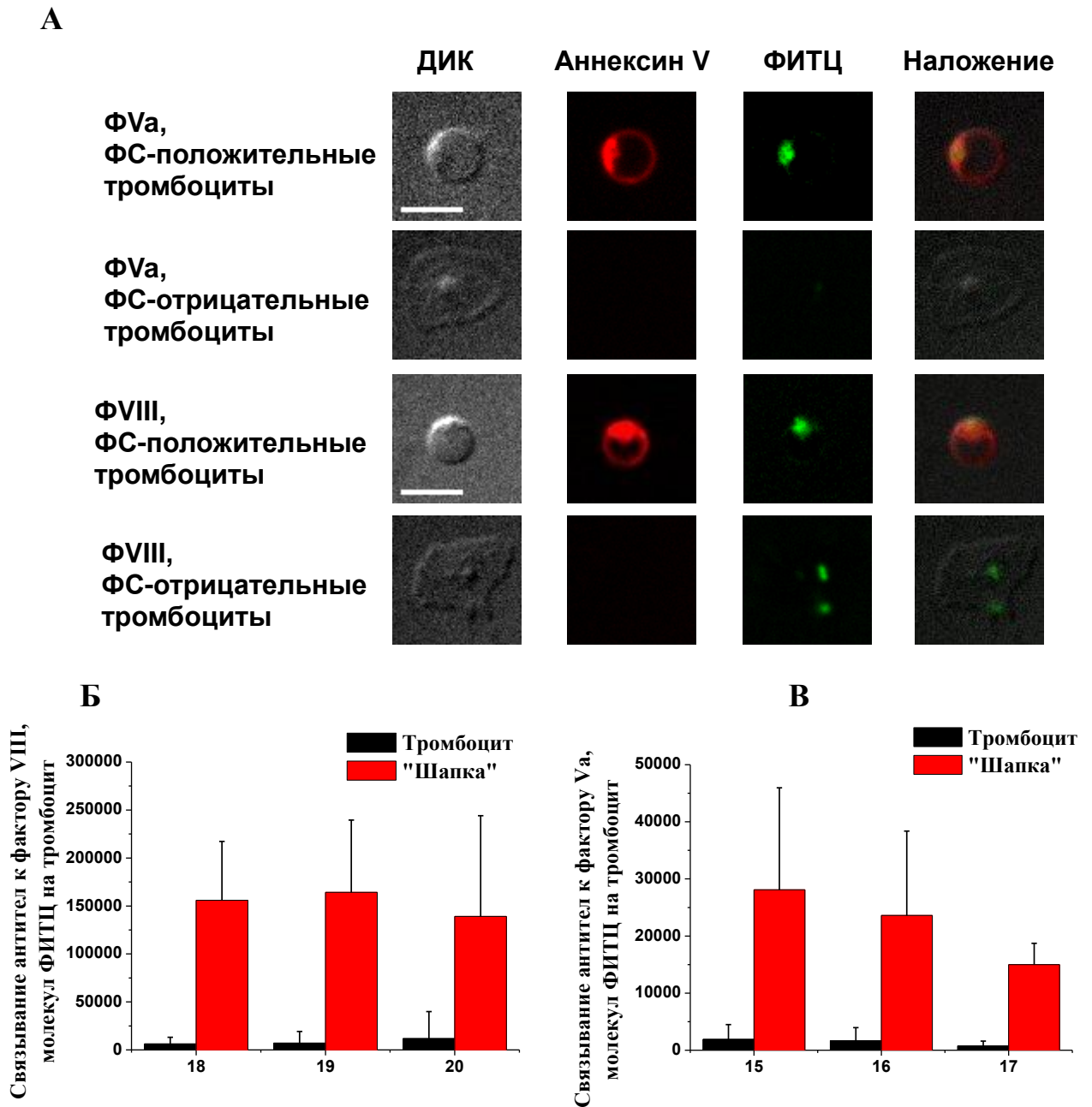


Рисунок 32. Распределение кофакторов Va и VIII на мембране активированных тромбоцитов. (А) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Красным показана флуоресценция Аннексина V-Alexa647, зеленым – флуоресценция антител к факторам Va и VIII. Приведенный масштаб соответствует 5 мкм. (Б-В) Интегральная флуоресценция антител к факторам Va и VIII в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Данные приведены для трех различных доноров. Приведены средние значения \pm SD (n=50).

3.3.4 Распределение факторов у пациентов с синдромом серых тромбоцитов

Как было сказано выше, у пациентов с синдромом серых тромбоцитов наблюдается дефицит тромбоцитарных альфа-гранул и как следствие не происходит секреция фактора V тромбоцитами. Как видно на рисунке 33 на тромбоцитах таких пациентов действительно не удается детектировать фактор V. Это свидетельствует о том, что при очистке тромбоцитов гель-фильтрацией мы полностью избавились от плазменного фактора V и в дальнейшем детектировали связывание только тромбоцитарного фактора.

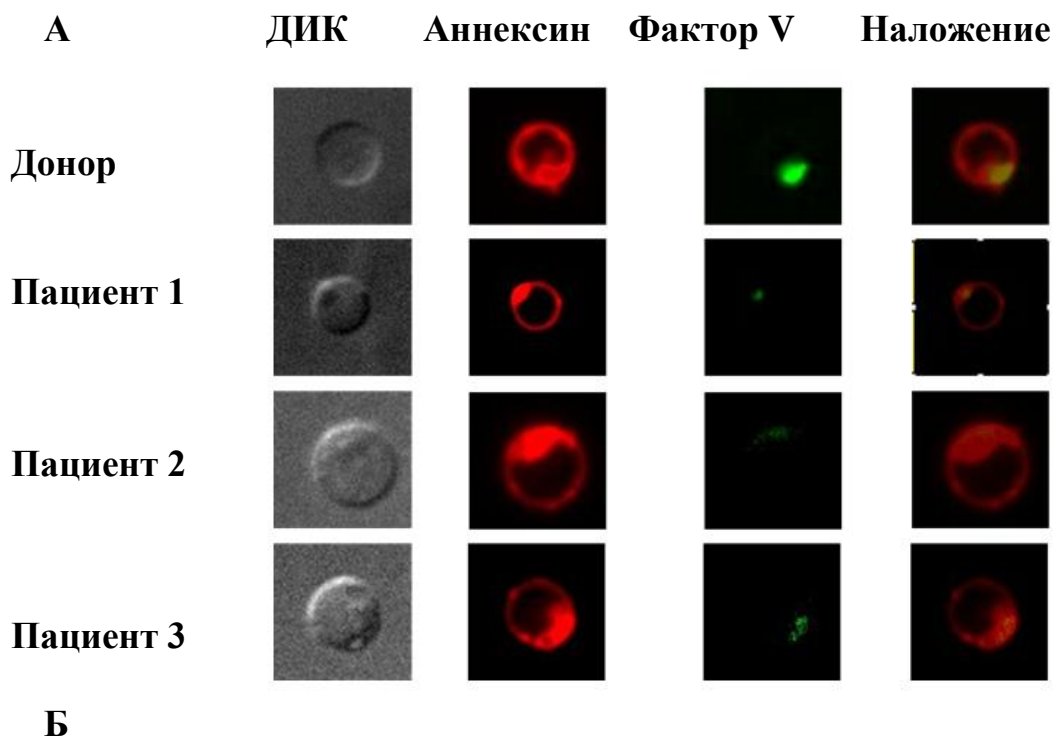


Рисунок 33. Распределение кофактора Va на мембране активированных тромбоцитов у пациентов с синдромом серых тромбоцитов. (А) Типичные

микрофотографии активированных тромбоцитов. Красным показана флуоресценция Аннекисна V-Alexa647, зеленым – флуоресценция антител к фактору Va. Приведенный масштаб соответствует 5 мкм. (Б) Интегральная флуоресценция антител к факторам Va в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Данные приведены для трех различных доноров. Приведены средние значения \pm SD (n=50).

3.3.5 Влияние концентрирования факторов на ускорение мембранных реакций

Для проверки гипотезы, что увеличение локальной концентрации факторов свертывания может приводить к увеличению скорости мембранно-зависимых реакций, нами был сделан эксперимент с использованием искусственных везикул разного фосфолипидного состава. Нами были использованы фосфолипидные везикулы диаметром 0,8 мкм содержащие ФС/ФХ в пропорции 25/75 или 5/95. Данные везикулы были использованы для сборки комплекса внутренней теназы, содержащего факторы IXa, VIIIa, и FX. При этом концентрация везикул (10 мкМ при составе ФС/ФХ: 5/95 и 2 мкМ при составе ФС/ФХ: 25/75) подбиралась так, чтобы количество добавленного фосфатидилсерина было одинаковым (0,4 мкМ). Как видно из рисунка 34 в случае, когда фосфатидилсерин сконцентрирован на меньшей площади мембраны (везикулы ФС/ФХ: 25/75) активируется в 50 раз больше фактора Ха, чем в случае, когда фосфатидилсерин не сконцентрирован (ФС/ФХ: 5/95). Таким образом, данный эксперимент подтверждает гипотезу, что увеличение локальной концентрации фосфатидилсерина, и как следствие концентрирование факторов свертывания, может приводить к ускорению мембранно-зависимых реакций [118].

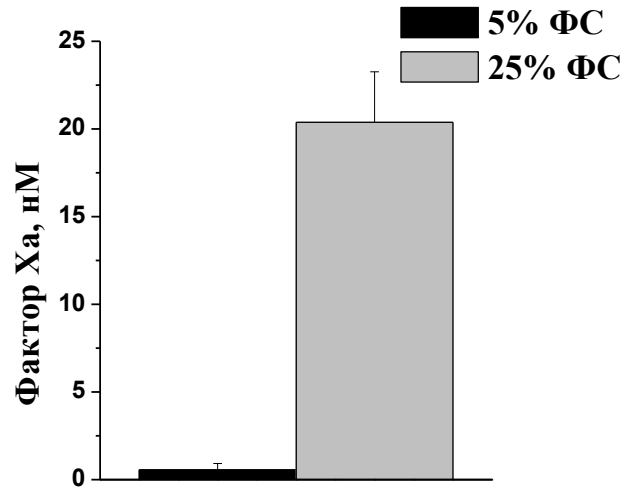


Рисунок 34. Влияние различной плотности связывания факторов на активацию фактора X. На рисунке приведены средние значения \pm SEM (n=3).

3.3.6 Изменение морфологии тромбоцитов при активации

На рисунке 35 показано, как меняется форма тромбоцита при активации в разные моменты времени. Видно, что шарообразная часть тромбоцита получается в результате раздувания одного из его регионов, в то время как шапка – это оставшаяся неизменной часть тромбоцита.

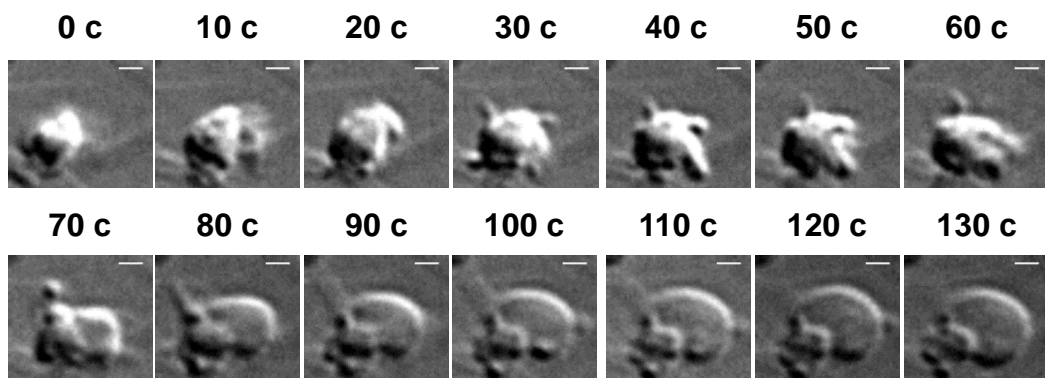


Рисунок 35. Изменение морфологии тромбоцитов при активации в различные моменты времени. Приведенный масштаб соответствует 1 мкм.

Интересно отметить, что в экспериментах с кальцеином (рисунок 36) мы видим, что обедненный по кальцеину регион шапки еще до активации, так же как

участки в центральной части фосфатидилсерин-отрицательных распластанных тромбоцитов (рисунок 37). Вероятно, это связано с тем, что в данных регионах клетки основной объем занимают органеллы (такие как: митохондрии, плотные и а-гранулы), а на долю цитоплазмы почти ничего не остается (можно заметить только тонкую полоску цитоплазмы с кальцеином по периметру «шапки») [118].

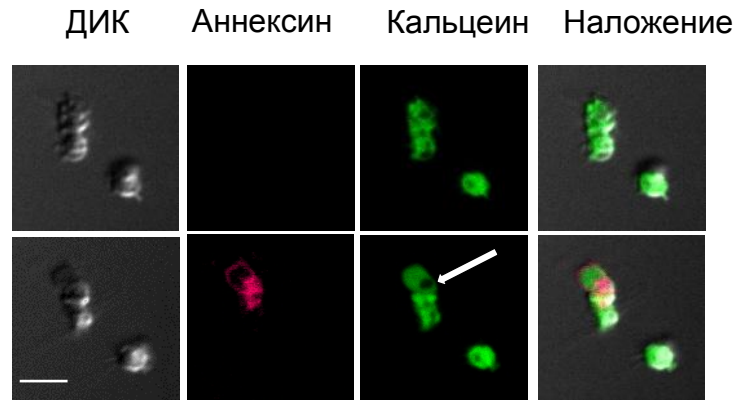


Рисунок 36. Распределение кальцеина в прокоагулянтных тромбоцитах через 5 минут (верхняя строка) и через 20 минут (нижняя строка) после активации. Красным показана флуоресценция Аннексина V-Alexa647, зеленым-флуоресценция кальцеина. Приведенный масштаб соответствует 10 мкм.

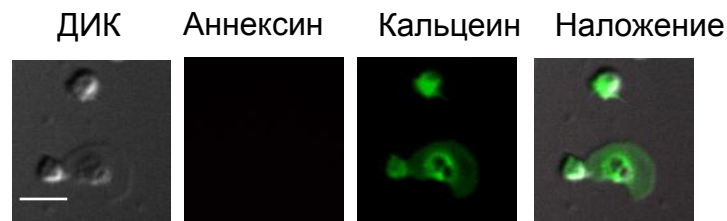


Рисунок 37. Распределение кальцеина в непрокоагулянтных тромбоцитах. Красным показана флуоресценция Аннексина V-Alexa647, зеленым-флуоресценция кальцеина. Приведенный масштаб соответствует 10 мкм.

3.3.7 Ультраструктура активированных тромбоцитов

Для того чтобы лучше изучить ультраструктуру активированных тромбоцитов мы использовали трансмиссионную электронную микроскопию. На рисунке 38 показаны четыре репрезентативных фотографии прокоагулянтных тромбоцитов с «шапками». Можно увидеть, что в шарообразная части тромбоцита

цитоплазма гомогенизирована, никаких внутренних структур и органелл не наблюдается. В то же время «шапка» имеет более сложное строение с множеством складок мембраны и органеллами (например, можно увидеть митохондрии) [118].

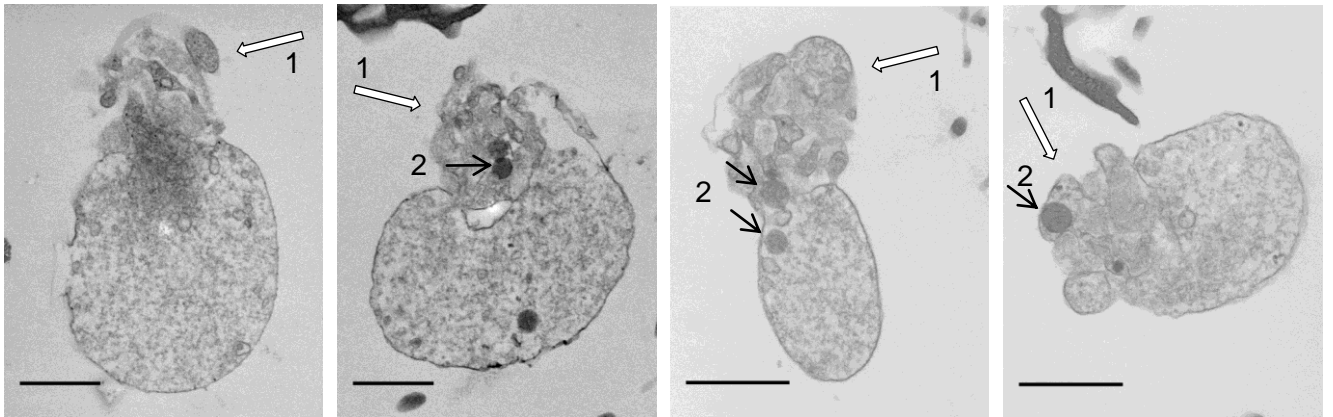
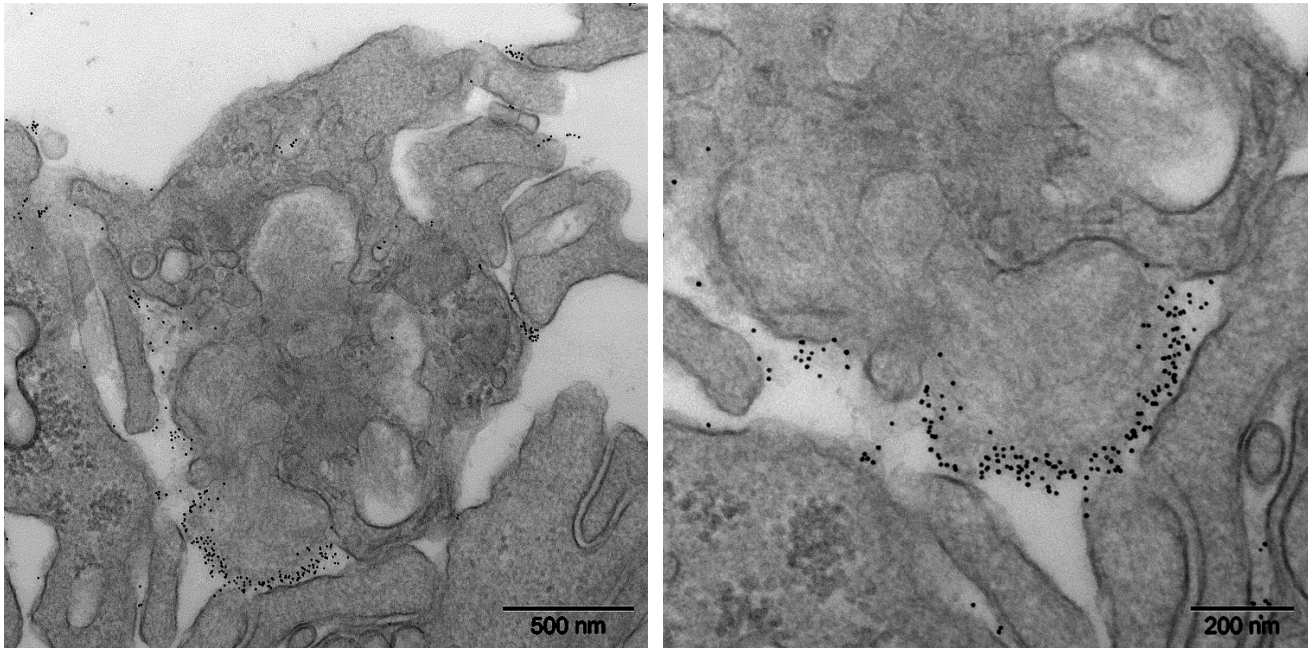


Рисунок 38. Ультраструктура прокоагулянтных тромбоцитов. Микрофотографии получены методом трансмиссионной электронной микроскопии. Белыми стрелками (1) показаны «шапки», черными стрелками (2) показаны митохондрии. Приведенный масштаб соответствует 1 мкм.

Для дальнейшей характеристики ультраструктуры фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов мы использовали метод сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком, а также иммуноокрашивание тромбоцитов Аннексином V, конъюгированным с наночастицами золота. Данный метод позволил детально визуализировать и провести полную 3D реконструкцию всей клетки. На рисунке 39 показаны результаты репрезентативного эксперимента. На поверхности фосфатидилсерин-положительного тромбоцита наблюдается одна «шапка», которая является неотделимой частью всего тромбоцита.

А



Б



В

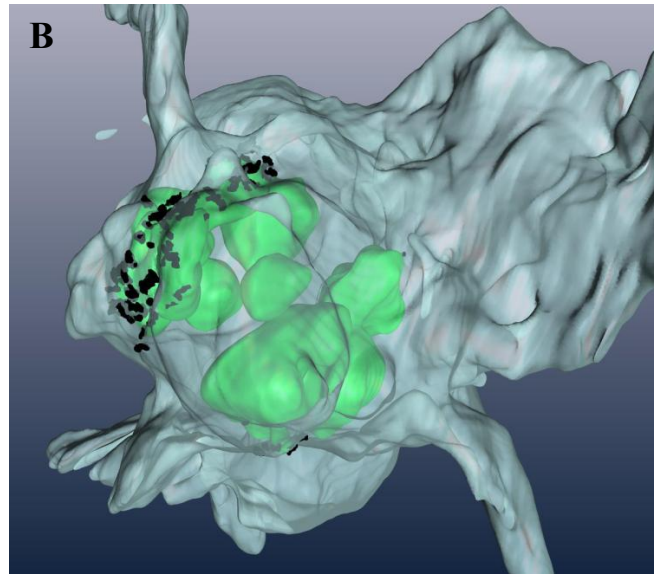


Рисунок 39. Ультраструктура прокоагулянтных тромбоцитов. Микрофотографии получены методом сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком, а также иммуноокрашивание тромбоцитов Аннексином V, конъюгированным с наночастицами золота. (А) Связывания с тромбоцитами аннексина V; правая панель показывает большее увеличение. (Б) Микрофотография, полученная методом сканирующей электронной микроскопии с фокусированным ионным пучком (слева) и (В) 3D-реконструкция прокоагулянтного тромбоцита (справа).

3.3.8 Распределение аннексина V и факторов свертывания в тромбоцитарном тромбе

Для того, чтобы оценить, распределение аннексина и факторов свертывания в тромбоцитарном тромбе в условиях потока мы провели эксперимент в проточной камере с нанесенным коллагеном. После того, как на коллагене сформировались тромбы камера была промыта раствором аннексина фактора X или Xa. Микрофотографии были получены с помощью флуоресцентной микроскопии. Проккоагулянтные тромбоциты в составе тромбов прокрашивались точно так же, как индивидуальные тромбоциты в экспериментах, описанных выше. То есть на мембране тромбоцитов наблюдался небольшой регион, в котором была повышенная концентрация факторов и аннексина (Рисунок 40). При этом интересно отметить, что «шапки» во всех случаях находились в месте контакта тромбоцита с тромбом, как и было показано ранее [118].

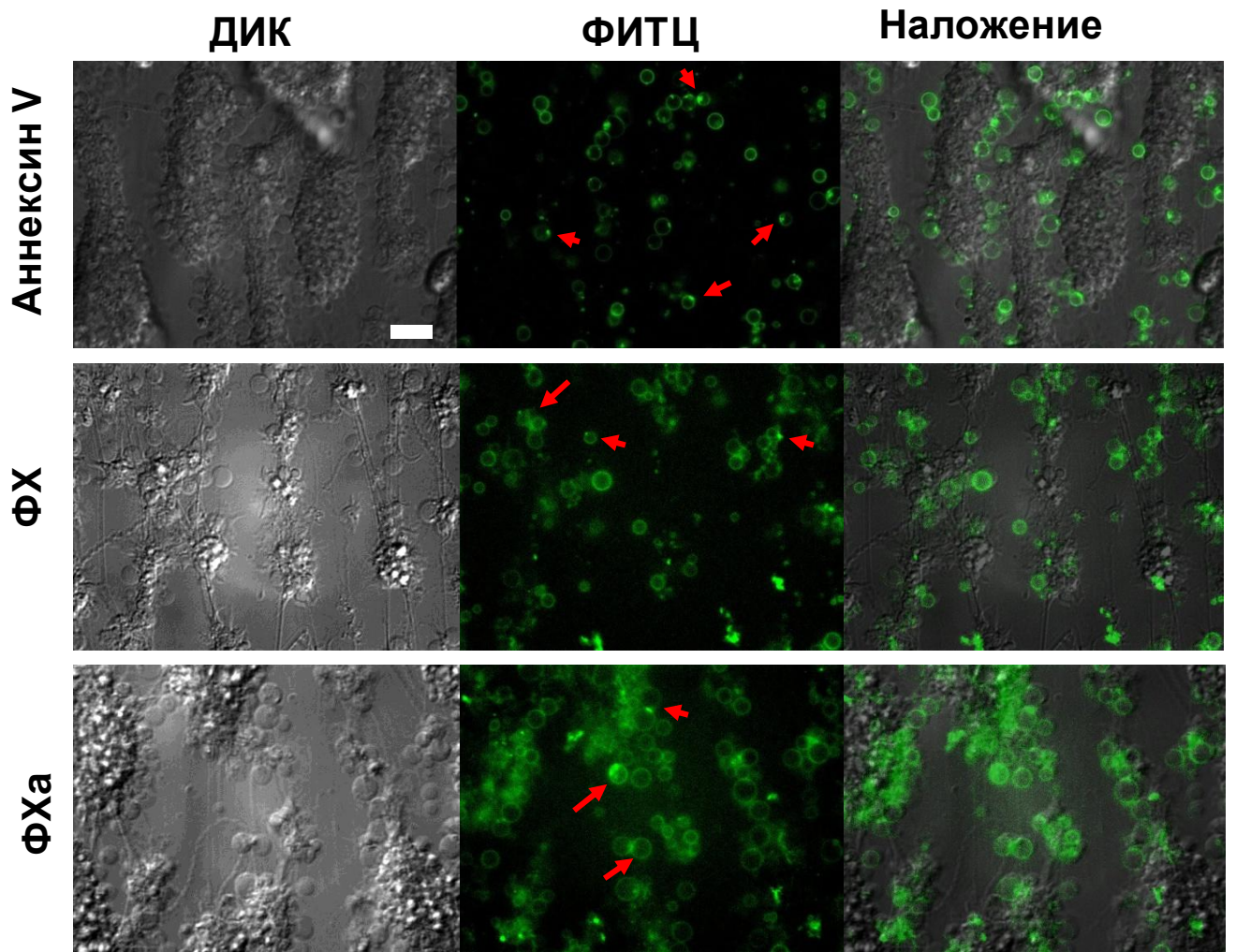


Рисунок 40. Распределение аннексина (верхний ряд), фактора X (средний ряд) и фактора Ха (нижний ряд) в тромбоцитарном тромбе. Зеленым показана флуоресценция ФИТЦ, красные стрелки показывают прокоагулянтные тромбоциты с «шапками». Приведенный масштаб соответствует 10 мкм.

Глава 4. Обсуждение

Одним из главных результатов данного исследования является то, что связывание факторов X и Xa с фосфолипидными мембранами является более сложным процессом, чем предполагалось ранее, а именно, это многоступенчатым процесс, в ходе которого могут образовываться различные олигомеры (в том числе гетероолигомеры, состоящие как из фактора X, так и из фактора Xa). Данные олигомеры прочнее связаны с мембраной и хуже диссоциируют, чем мономеры. В реальных тромбах это явление может предотвращать вымывание факторов потоком. Кроме того, было показано, что этот феномен не зависит от типа активации тромбоцитов, а также сохраняется на искусственных фосфолипидных везикулах различного состава в широком диапазоне концентраций Ca^{2+} и белка во внешней среде [116].

Почти все опубликованные ранее работы предполагали обратимое односайтовое связывание факторов свертывания [119, 120]. Исключение составили исследования, посвященные фактору VIII, в которых показана двухступенчатая диссоциация фактора VIII с фосфолипидной мембраны [121, 122]. Интересно, что в литературе существуют данные, что связанный с фосфолипидной мембраной фактор VIII представляет собой димер. Кроме того было показано, что есть две фракции мембраносвязанного аннексина V, однако стоит помнить, что аннексин V не является фактором свертывания крови [123, 124].

В настоящей работе, с использованием нескольких подходов было показано, что связанные как с искусственными фосфолипидными мембранами, так и с активированными тромбоцитами (в том числе в составе тромбоцитарного тромба) факторы X и Xa состоят из двух фракций, только одна из которых может легко диссоциировать. В своей работе мы приводим несколько доказательств того, что закрепление факторов X и Xa связано именно с многоступенчатой ассоциацией и олигомеризацией факторов на фосфолипидной мембране. Во-первых, данный феномен наблюдается, как при взаимодействии факторов X и Xa с тромбоцитами,

так и при взаимодействии с искусственными фосфолипидными везикулами. Это означает, что в связывании факторов с мембраной не вовлечены никакие другие белки, кроме самих факторов. Во-вторых, закрепление для фактора Ха более ярко выражено при большей концентрации фактора, то есть взаимодействие молекул фактора является важным, в противном случае концентрация фактора не оказывала бы такого большого влияния. В-третьих, для аннексина V, который, как известно, образует тримеры, характерно такое же поведение при взаимодействии с фосфолипидной мембраной, как и для факторов X и Ха. В четвертых, мы напрямую показываем, что предварительная инкубация везикул с фактором X или Ха улучшает связывание фактора Ха и в то же время почти не влияет на связывание фактора X. Эти данные указывают на образование по меньшей мере димеров факторов X и Ха. Кроме того, в литературе есть данные о том, что фактор Ха может образовывать димеры при связывании с фосфолипидной мембраной. Исходя из всех этих данных можно утверждать, что механизмы закрепления факторов X и Ха на мембране отличаются, олигомеризация менее важна для фактора X, чем для фактора Ха [116].

Кроме того, в экспериментах с проточными камерами было показано, что закрепление факторов на мембране тромбоцитов может препятствовать вымыванию этих факторов потоком. Можно предположить, что наибольшее значение будет иметь гетероолигомеризация факторов X и Ха, так как фактор X присутствует в плазме крови в больших концентрациях, чем фактор X.

Другим важным результатом данной работы является то, что все проанализированные нами факторы свертывания концентрируются в небольшом регионе мембраны прокоагулянтных тромбоцитов (“шапке”). Такое распределение может выполнять две функции: первое, резкое ускорение скорости мембранно-зависимых реакций из-за повышенной локальной концентрации белков, и второе, обеспечение защиты факторов свертывания от вымывания потоком [118].

Таким образом, в ходе данной работы показана важная роль субпопуляции фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов в поддержании реакций

свертывания крови. А значит, ее ингибирование может иметь важное терапевтическое значение

В литературе ранее сообщалось, что некоторые альфа-гранулярные белки, такие как фибриноген и тромбоспондин локализованы в “шапке” [64, 125]. Кроме того сообщалось, что фактор XIIIa [66] и плазминоген [67] также распределены подобным образом. Данный феномен объяснялся тем, что все эти белки (тромбоспондин, фактор XIIIa, плазмин) хорошо связываются с фибрином, что и объясняет их схожее распределение [126].

В данной работе было впервые показано, что факторы свертывания, связывающиеся с фосфатидилсерином, распределены неравномерно на мембране активированных тромбоцитов. Данный феномен уже не может быть объяснен связыванием с фибрином, так как в настоящее время существуют данные только о том, что фибрин играет важную роль во взаимодействии фактора VIII с мембраной тромбоцитов [127]. Механизм же концентрирования витамин К-зависимых факторов требует дополнительного исследования.

Исследование ультраструктуры активированных тромбоцитов с помощью электронной микроскопии показало, что “шапки” имеют сложную структуру с большим количеством складок мембраны и органелл. Кроме того, была проведена детальная 3D-реконструкция всего тромбоцита и показано, что мембрана «шапки» является непрерывной и неотделимой от всего остального тромбоцита.

Результаты данной работы (наличие органелл в "шапках", и динамика морфологических изменений активированных тромбоцитов) согласуются с литературными данными [65]. В которых, предполагалось, что “шапка” представляет собой то, что осталось от тромбоцита после его гибели. В таком случае более высокий уровень фосфатидилсерина в шапке может быть связан с тем, что при выходе тромбоцитарных гранул их мембрана с более высоким содержанием фосфатидилсерина сливается с клеточной мембраной [128].

Хотя, витамин К-зависимые факторы связываются со всей мембраной тромбоцита, а не только с “шапкой”, из-за меньших размеров “шапки” их локальная концентрация в данном регионе тромбоцитарной мембраны

оказывается намного выше. Как известно из предыдущих теоретических и экспериментальных исследований, уменьшение площади поверхности фосфолипидной мембраны может приводить к ускорению мембранно-зависимых реакций. В данной работе было напрямую показано, что концентрирование факторов на небольшой площади мембраны приводит к ускорению мембранной реакции на два порядка.

В опубликованных ранее работах предполагается, что фосфатидилсерин-положительные тромбоциты могут встраиваться в растущий тромб за счет сконцентрированного в «шапке» фибриногена [64, 75, 125]. Эксперименты в проточных камерах, сделанные в ходе данной работы, косвенно подтверждают эту гипотезу. Так как все наблюдаемые фосфатидилсерин-положительные тромбоциты были повернуты своими «шапками» к тромбу. Кроме того, было показано, что при формировании тромбоцитарного тромба в условиях потока на прокоагулянтных тромбоцитах в регионе «шапки» наблюдался повышенная концентрация факторов и аннексина V. Исходя из данных электронной микроскопии «шапка» на прокоагулянтном тромбоците имеет сложную складчатую структуру мембраны. Можно предположить, что связавшиеся факторы будут крайне плохо вымываться потоком из такого образования. Что предотвратит нежелательной коагуляцию и эмболизацию ниже по течению кровяного русла.

Все эти данные позволяют предположить, что «шапки» играют важную роль в свертывании крови, способствуя ускорению мембранных реакций и препятствуя вымыванию факторов потоком.

Таким образом, в ходе выполненной работы получены важные данные, позволяющие лучше разобраться в механизмах мембранно-зависимых реакций свертывания крови. В частности, объясняются механизмы предотвращающие вымывание факторов из тромбоцитарных тромбов в условиях потока, а также механизмы ускорения мембранно-зависимых реакций.

Заключение

В настоящей работе, с использованием нескольких подходов было показано, что связанные как с искусственными фосфолипидными мембранами, так и с активированными тромбоцитами (в том числе в составе тромбоцитарного тромба) факторы X и Xa состоят из двух фракций, только одна из которых может легко диссоциировать. При этом связывание факторов это многоступенчатый процесс, в ходе которого могут образовываться различные олигомеры факторов X/Xa. Данные олигомеры прочнее связаны с мембраной и хуже диссоциируют, чем мономеры. В реальных тромбах это явление может предотвращать вымывание факторов потоком. Кроме того, было показано, что этот феномен не зависит от типа активации тромбоцитов, а также сохраняется на искусственных фосфолипидных везикулах различного состава в широком диапазоне концентраций Ca^{2+} и белка во внешней среде.

Другим важным результатом данной работы является то, что все проанализированные нами факторы свертывания концентрируются в небольшом регионе мембраны прокоагулянтных тромбоцитов (“шапке”). Такое распределение может выполнять две функции: первое, резкое ускорение скорости мембранно-зависимых реакций из-за повышенной локальной концентрации белков, и второе, обеспечение защиты факторов свертывания от вымывания потоком. Исследование ультраструктуры активированных тромбоцитов с помощью электронной микроскопии показало, что “шапки” имеют сложную структуру с большим количеством складок мембраны и органелл. Кроме того, была проведена детальная 3D-реконструкция всего тромбоцита и показано, что мембрана «шапки» является непрерывной и неотделимой от всего остального тромбоцита.

Таким образом, В результате данной работы получены новые уникальные данные по механизмам взаимодействия факторов свертывания с фосфолипидными мембранами, которые могут применяться для разработки новых подходов к диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний.

Выводы

1. Взаимодействие факторов X и Xa с фосфолипидными мембранами — многостадийный процесс. Связанные с мембраной факторы X и Xa состоят из двух фракций, только одна из которых может легко диссоциировать.
2. Механизмы закрепления на мембране для факторов X и Xa различаются. Для фактора Xa основную роль играет мультимеризация, в том числе могут образовываться гетеромультимеры факторов X и Xa. Закрепление фактора X на фосфолипидной мембране происходит благодаря наличию промежуточных состояний.
3. Мультимеризация фактора Xa может препятствовать его вымыванию из тромба в условиях потока.
4. Факторы свертывания IXa, Xa, X, V / Va, VIII / VIIIa, протромбин, а также аннексин V распределены неоднородно на мембране ФС-положительных тромбоцитов, и в основном локализованы в небольшой области мембраны, где их средняя концентрация выше в несколько раз. Подобное концентрирование факторов может приводить к ускорению реакции активации фактора X комплексом внутренней теназы до 50 раз.

Список сокращений и обозначений

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ДИК – дифференциально-интерференционный контраст

ДМСО – диметилсульфоксид

ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоционат

ФVa – фактор Va

ФVIII – фактор VIII

FIXa – фактор IXa

FX – фактор X

FXa – фактор Xa

FXII – фактор XII

FXIIa – фактор XIIa

FX – L- α -фосфатидилхолин

ФС – L- α -фосфатидилсерин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

CRP – коллаген подобный пептид

DiIC16 (3) – 1, 1-дигексадецил -3, 3, 3, 3-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат

GFP – зеленый флуоресцентный белок

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота

NO – оксид азота (II)

PAR – протеаза-активируемый рецептор

PBS – фосфатный буфер

PE – фикоэритрин

PGE1 – простагландин E1

PPACK – N-D-фенилаланил-пролил-аргинил хлорометилкетон

SD – стандартное отклонение

SEM – стандартная ошибка среднего

Благодарности

Я глубоко признательна моему научному руководителю Михаилу Александровичу Пантелееву и директору Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН Фазоилу Иноятовичу Атауллаханову, а также Анастасие Никитичне Свешниковой, Сергею Ивановичу Обыденному, Яне Николаевне Котовой и Дмитрию Юрьевичу Нечипуренко за плодотворное сотрудничество. Также я хотела бы поблагодарить весь коллектив лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева за помощь и всестороннюю поддержку.

Список литературы

1. Баландина А.Н. Система свертывания крови и ее регуляция / Баландина А.Н., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И // Природа – 2011. – № 3 – С.32–38.
2. Tanaka K.A. Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation / Tanaka K.A., Key N.S., Levy J.H. // Anesthesia & Analgesia – 2009. – Т. 108 – № 5 – С.1433–1446.
3. Hoffman M. A cell-based model of hemostasis. / Hoffman M., Monroe D.M. // Thrombosis and haemostasis – 2001. – Т. 85 – № 6 – С.958–65.
4. Roberts H.R. A cell-based model of thrombin generation. / Roberts H.R., Hoffman M., Monroe D.M. // Seminars in thrombosis and hemostasis – 2006. – Т. 32 Suppl 1 – С.32–38.
5. Panteleev M.A. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: Roles of geometry, flow and diffusion / Panteleev M.A., Dashkevich N.M., Ataullakhanov F.I. // Thrombosis Research – 2015. – Т. 136 – № 4 – С.699–711.
6. Zwaal R.F. Lipid-protein interactions in blood coagulation. / Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. // Biochimica et biophysica acta – 1998. – Т. 1376 – № 3 – С.433–453.
7. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов / Мазуров А.В. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011.– 480с.
8. Пантелеев М.А. Тромбоциты и гемостаз / Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. // Онкогематология – 2014. – № 2 – С.65–73.
9. Якименко А.О. Этот загадочный тромбоцит / Якименко А.О., Свешникова А.Н., Артеменко Е.О., Пантелеев М.А. // Природа – 2014. – Т. 1182 – № 2 – С.3–8.
10. Nispen tot Pannerden H. van The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular α -granule subtypes / Nispen tot Pannerden H. van, Haas F. de, Geerts W., Posthuma G., Dijk S. van, Heijnen H.F.G. // Blood – 2010. – Т. 116 – № 7.
11. Heijnen H. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? / Heijnen H., Sluijs P. van der // Journal of Thrombosis and Haemostasis – 2015. – Т. 13 – № 12 – С.2141–2151.
12. Blair P. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates / Blair P., Flaumenhaft R. // Blood Reviews – 2009. – Т. 23 – № 4 – С.177–189.

13. Rendu F. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions / Rendu F., Brohard-Bohn B. // *Platelets* – 2001. – Т. 12 – № 5 – С.261–273.
14. Peters C.G. Granule exocytosis is required for platelet spreading: Differential sorting of alpha-granules expressing VAMP-7 / Peters C.G., Michelson A.D., Flaumenhaft R. // *Blood* – 2012. – Т. 120 – № 1 – С.199–206.
15. Nieswandt B. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? / Nieswandt B., Watson S.P. // *Blood* – 2003. – Т. 102 – № 2 – С.449–461.
16. Clemetson K.J. Collagen Receptors as Potential Targets for Novel Anti-Platelet Agents / Clemetson K.J., Clemetson J.M. // *Curr Pharm Des* – 2007. – Т. 26 – № 13 – С.2673–2683.
17. Heemskerk J.W.M. Platelet activation and blood coagulation. / Heemskerk J.W.M., Bevers E.M., Lindhout T. // *Thrombosis and haemostasis* – 2002. – Т. 88 – № 2 – С.186–193.
18. Clemetson K.J. Snake venom proteins affecting platelets and their applications to anti-thrombotic research. / Clemetson K.J., Lu Q., Clemetson J.M. // *Current pharmaceutical design* – 2007. – Т. 13 – № 28 – С.2887–2892.
19. Шатурный В.И. Активаторы, Рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови / Шатурный В.И., Шахиджанов С.С., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. // *Биомедицинская химия* – 2014. – Т. 60 – № 2 – С.182–200.
20. Gardiner E.E. Platelet Receptor Shedding / Gardiner E.E., Al-Tamimi M., Andrews R.K., Berndt M.C. – 2012. – № 4 – С.321–339.
21. Jung S.M. Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. / Jung S.M., Moroi M. // *Trends in cardiovascular medicine* – 2000. – Т. 10 – № 7 – С.285–292.
22. Ni H. Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V. / Ni H., Ramakrishnan V., Ruggeri Z.M., Papalia J.M., Phillips D.R., Wagner D.D. // *Blood* – 2001. – Т. 98 – № 2 – С.368–373.
23. Topalov N.N. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. / Topalov N.N., Kotova Y.N.,

Vasil'ev S.A., Pantelev M.A. // *British journal of haematology* – 2012. – T. 157 – № 1 – C.105–115.

24. Gilio K. Functional divergence of platelet protein kinase C (PKC) isoforms in thrombus formation on collagen. / Gilio K., Harper M.T., Cosemans J.M.E.M., Konopatskaya O., Munnix I.C.A., Prinzen L., Leitges M., Liu Q., Molkentin J.D., Heemskerk J.W.M., Poole A.W. // *The Journal of biological chemistry* – 2010. – T. 285 – № 30 – C.23410–23419.

25. Vu T.-K.H. Domains specifying thrombin–receptor interaction / Vu T.-K.H., Wheaton V.I., Hung D.T., Charo I., Coughlin S.R. // *Nature* – 1991. – T. 353 – № 6345 – C.674–677.

26. Stalker T.J. Platelet Signaling / Stalker T.J., Newman D.K., Ma P., Wannemacher K.M., Brass L.F. // *Handbook of experimental pharmacology* – 2012. – № 210 – C.59–85.

27. Holmsen H. Significance of testing platelet functions in vitro. / Holmsen H. // *European journal of clinical investigation* – 1994. – T. 24 Suppl 1 – C.3–8.

28. Coughlin S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology / Coughlin S.R. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – 2005. – T. 3 – № 8 – C.1800–1814.

29. Woulfe D.S. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis / Woulfe D.S. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – 2005. – T. 3 – № 10 – C.2193–2200.

30. Candia E. De Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history / Candia E. De // *Thrombosis Research* – 2012. – T. 129 – № 3 – C.250–256.

31. Versteeg H.H. New Fundamentals in Hemostasis / Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M., Reitsma P.H. // *Physiological Reviews* – 2013. – T. 93 – № 1 – C.327–358.

32. Offermanns S. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. / Offermanns S., Toombs C.F., Hu Y.H., Simon M.I. // *Nature* – 1997. – T. 389 – № 6647 – C.183–186.

33. Nurden P. The evolution of megakaryocytes to platelets. / Nurden P., Poujol C., Nurden A.T. // *Bailliere's clinical haematology* – 1997. – T. 10 – № 1 – C.1–27.

34. Haberstock-Debic H. A Clopidogrel-Insensitive Inducible Pool of P2Y12 Receptors Contributes to Thrombus Formation: Inhibition by Elinogrel, a Direct-Acting, Reversible P2Y12 Antagonist / Haberstock-Debic H., Andre P., Mills S., Phillips D.R., Conley P.B. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* – 2011. – T. 339 – № 1 – C.54–61.
35. Kotova Y.N. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. / Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* – 2008. – T. 6 – № 9 – C.1603–1605.
36. Lantz N. A high concentration of ADP induces weak platelet granule secretion independently of aggregation and thromboxane A2 production. / Lantz N., Hechler B., Ravanat C., Cazenave J.-P., Gachet C. // *Thrombosis and haemostasis* – 2007. – T. 98 – № 5 – C.1145–1147.
37. Caterina R. De Thromboxane-B2 generation during ex-vivo platelet aggregation. / Caterina R. De, Giannessi D., Gazzetti P., Bernini W. // *The Journal of nuclear medicine and allied sciences* – T. 28 – № 3 – C.185–196.
38. Coade S.B. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. / Coade S.B., Pearson J.D. // *Circulation research* – 1989. – T. 65 – № 3 – C.531–537.
39. Lüthje J. Demonstration of a novel ecto-enzyme on human erythrocytes, capable of degrading ADP and of inhibiting ADP-induced platelet aggregation. / Lüthje J., Schomburg A., Ogilvie A. // *European journal of biochemistry* – 1988. – T. 175 – № 2 – C.285–289.
40. Holmsen H. Secretory mechanisms. Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline. / Holmsen H., Day H.J., Setkowsky C.A. // *The Biochemical journal* – 1972. – T. 129 – № 1 – C.67–82.
41. Surprenant A. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. / Surprenant A., Buell G., North R.A. // *Trends in neurosciences* – 1995. – T. 18 – № 5 – C.224–229.
42. Toth-Zsamboki E. P2X1-mediated ERK2 Activation Amplifies the Collagen-induced Platelet Secretion by Enhancing Myosin Light Chain Kinase Activation / Toth-Zsamboki E., Oury C., Cornelissen H., Vos R. De, Vermynen J., Hoylaerts M.F. // *Journal of Biological Chemistry* – 2003. – T. 278 – № 47 – C.46661–46667.

43. Oury C. Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype / Oury C., Kuijpers M.J.E., Toth-Zsamboki E., Bonnefoy A., Danloy S., Vreys I., Feijge M.A.H., Vos R. De, Vermylen J., Heemskerk J.W.M., Hoylaerts M.F. // *Blood* – 2003. – T. 101 – № 10 – C.3969–3976.
44. Hechler B. A role of the fast ATP-gated P2X₁ cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. / Hechler B., Lenain N., Marchese P., Vial C., Heim V., Freund M., Cazenave J.-P., Cattaneo M., Ruggeri Z.M., Evans R., Gachet C. // *The Journal of experimental medicine* – 2003. – T. 198 – № 4 – C.661–667.
45. Fung C.Y.E. A major role for P2X₁ receptors in the early collagen-evoked intracellular Ca²⁺ responses of human platelets. / Fung C.Y.E., Brearley C.A., Farndale R.W., Mahaut-Smith M.P. // *Thrombosis and haemostasis* – 2005. – T. 94 – № 1 – C.37–40.
46. Erhardt J.A. P2X₁ stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation / Erhardt J.A., Toomey J.R., Douglas S.A., Johns D.G. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – 2006. – T. 4 – № 4 – C.882–890.
47. Fung C.Y.E. Primary and secondary agonists can use P2X₁ receptors as a major pathway to increase intracellular Ca²⁺ in the human platelet / Fung C.Y.E., Cendana C., Farndale R.W., Mahaut-Smith M.P. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – 2007. – T. 5 – № 5 – C.910–917.
48. Hu H. The P2X₁ ion channel in platelet function / Hu H., Hoylaerts M.F. // *Platelets* – 2010. – T. 21 – № 3 – C.153–166.
49. Vial C. Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X₁ receptors supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis / Vial C., Pitt S.J., Roberts J., Rolf M.G., Mahaut-Smith M.P., Evans R.J. // *Blood* – 2003. – T. 102 – № 10 – C.3646–3651.
50. Jennings L.K. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis / Jennings L.K. // *Thrombosis and Haemostasis* – 2009. – T. 102 – № 2 – C.248–257.
51. Smith J.B. Persistence of thromboxane A₂-like material and platelet release-inducing activity in plasma. / Smith J.B., Ingerman C., Silver M.J. // *Journal of Clinical Investigation* – 1976. – T. 58 – № 5 – C.1119–1122.

52. Namba T. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. / Namba T., Oida H., Sugimoto Y., Kakizuka A., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S. // *The Journal of biological chemistry* – 1994. – T. 269 – № 13 – C.9986–9992.
53. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets / Smolenski A. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – 2012. – T. 10 – № 2 – C.167–176.
54. Giustarini D. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. / Giustarini D., Milzani A., Colombo R., Dalle-Donne I., Rossi R. // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* – 2003. – T. 330 – № 1-2 – C.85–98.
55. Freedman J.E. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. / Freedman J.E., Loscalzo J., Barnard M.R., Alpert C., Keaney J.F., Michelson A.D. // *Journal of Clinical Investigation* – 1997. – T. 100 – № 2 – C.350–356.
56. Tracy P.B. Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. / Tracy P.B., Nesheim M.E., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1981. – T. 256 – № 2 – C.743–51.
57. Kempton C.L. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. / Kempton C.L., Hoffman M., Roberts H.R., Monroe D.M., Kalafatis M., Swords N.A., Rand M.D., Mann K.G. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* – 1994. – T. 25 – № 3 – C.861–866.
58. Briedé J.J. Heterogeneity in microparticle formation and exposure of anionic phospholipids at the plasma membrane of single adherent platelets. / Briedé J.J., Heemskerk J.W., Hemker H.C., Lindhout T. // *Biochimica et biophysica acta* – 1999. – T. 1451 – № 1 – C.163–172.
59. Sims P.J. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. / Sims P.J., Wiedmer T., Esmon C.T., Weiss H.J., Shattil S.J. // *The Journal of biological chemistry* – 1989. – T. 264 – № 29 – C.17049–17057.
60. Dale G.L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. / Dale G.L., Friese P., Batar P., Hamilton S.F., Reed G.L., Jackson K.W., Clemetson K.J., Alberio L. // *Nature* – 2002. – T. 415 – № 6868 – C.175–179.

61. Prodan C.I. Coated-platelet levels are low in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage. / Prodan C.I., Vincent A.S., Padmanabhan R., Dale G.L. // *Stroke; a journal of cerebral circulation* – 2009. – T. 40 – № 7 – C.2578–80.
62. Dachary-Prigent J. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. / Dachary-Prigent J., Freyssinet J.M., Pasquet J.M., Carron J.C., Nurden A.T. // *Blood* – 1993. – T. 81 – № 10 – C.2554–2565.
63. Norgard N.B. Clopidogrel Attenuates Coated-platelet Production in Patients Undergoing Elective Coronary Catheterization / Norgard N.B., Saya S., Hann C.L., Hennebry T.A., Schechter E., Dale G.L. // *Journal of Cardiovascular Pharmacology* – 2008. – T. 52 – № 6 – C.536–539.
64. Abaeva A.A. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered “cap” on their surface that promotes their attachment to aggregates. / Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obydenny S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., Kolyadko V.N., Chambost H., Mazurov A. V, Ataulakhanov F.I., Nurden A.T., Alessi M.-C., Panteleev M.A. // *The Journal of biological chemistry* – 2013. – T. 288 – № 41 – C.29621–29632.
65. Agbani E.O. Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant-Spreading in Human Platelets. / Agbani E.O., Bosch M.T.J. van den, Brown E., Williams C.M., Mattheij N.J.A., Cosemans J.M.E.M., Collins P.W., Heemskerk J.W.M., Hers I., Poole A.W. // *Circulation* – 2015. – T. 132 – № 15 – C.1414–1424.
66. Mitchell J.L. Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface / Mitchell J.L., Lionikiene A.S., Fraser S.R., Whyte C.S., Booth N.A., Mutch N.J. // *Blood* – 2014. – T. 124 – № 26 – C.3982–3990.
67. Whyte C.S. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow / Whyte C.S., Swieringa F., Mastenbroek T.G., Lionikiene A.S., Lance M.D., Meijden P.E.J. van der, Heemskerk J.W.M., Mutch N.J. // *Blood* – 2015. – T. 125 – № 16 – C.2568–2578.
68. Webber A.J. Two Populations of Platelets / Webber A.J., Firkin B.G. // *Nature* – 1965. – T. 205 – № 4978 – C.1332–1332.
69. Heemskerk J.W. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses. /

Heemskerk J.W., Vuist W.M., Feijge M.A., Reutelingsperger C.P., Lindhout T. // *Blood* – 1997. – T. 90 – № 7 – C.2615–2625.

70. Alberio L. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. / Alberio L., Safa O., Clemetson K.J., Esmon C.T., Dale G.L. // *Blood* – 2000. – T. 95 – № 5 – C.1694–1702.

71. Kempton C.L. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. / Kempton C.L., Hoffman M., Roberts H.R., Monroe D.M. // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* – 2005. – T. 25 – № 4 – C.861–866.

72. Obydenny S.I. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation / Obydenny S.I., Sveshnikova A.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis* – 2016. – T. 14 – № 9 – C.1867–1881.

73. Mattheij N.J.A. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. / Mattheij N.J.A., Gilio K., Kruchten R. van, Jobe S.M., Wieschhaus A.J., Chishti A.H., Collins P., Heemskerk J.W.M., Cosemans J.M.E.M. // *The Journal of biological chemistry* – 2013. – T. 288 – № 19 – C.13325–36.

74. Kulkarni S. *Techniques to Examine Platelet Adhesive Interactions Under Flow* New Jersey: Humana Press, 2004. – 165–186c.

75. Yakimenko A.O. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. / Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. // *Biophysical journal* – 2012. – T. 102 – № 10 – C.2261–2269.

76. Pantelev M.A. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. / Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataulakhanov F.I., Saenko E.L. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* – 2005. – T. 3 – № 11 – C.2545–2553.

77. London F.S. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. / London F.S., Marcinkiewicz M., Walsh P.N. // *The Journal of biological chemistry* – 2004. – T. 279 – № 19 – C.19854–19859.

78. Krishnaswamy S. Prothrombinase complex assembly. Kinetic mechanism of enzyme assembly on phospholipid vesicles. / Krishnaswamy S., Jones K.C., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1988. – T. 263 – № 8 – C.3823–3834.
79. Nesheim M.E. Cofactor dependence of factor Xa incorporation into the prothrombinase complex. / Nesheim M.E., Kettner C., Shaw E., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1981. – T. 256 – № 13 – C.6537–40.
80. Kane W.H. Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. / Kane W.H., Davie E.W. // *Blood* – 1988. – T. 71 – № 3 – C.539–555.
81. Nesheim M.E. Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V. / Nesheim M.E., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1979. – T. 254 – № 4 – C.1326–1334.
82. Lawson J.H. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. / Lawson J.H., Kalafatis M., Stram S., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1994. – T. 269 – № 37 – C.23357–23366.
83. Monroe D.M. The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. / Monroe D.M., Key N.S. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* – 2007. – T. 5 – № 6 – C.1097–105.
84. Mann K.G. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. / Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R., Haley P., Krishnaswamy S. // *Blood* – 1990. – T. 76 – № 1 – C.1–16.
85. Panteleev M.A. Task-oriented modular decomposition of biological networks: trigger mechanism in blood coagulation. / Panteleev M.A., Balandina A.N., Lipets E.N., Ovanesov M. V, Ataulakhanov F.I. // *Biophysical journal* – 2010. – T. 98 – № 9 – C.1751–1761.
86. Balandina A.N. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation. / Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A., Novikova A.A., Shmirev I.I., Panteleev M.A., Ataulakhanov F.I. // *Biophysical journal* – 2011. – T. 101 – № 8 – C.1816–1824.
87. Nelsestuen G.L. Vitamin K-dependent proteins. / Nelsestuen G.L., Shah A.M., Harvey S.B. // *Vitamins and hormones* – 2000. – T. 58 – C.355–389.

88. Lim T.K. Structure of the prothrombin- and blood clotting factor X-membrane complexes. / Lim T.K., Bloomfield V.A., Nelsestuen G.L. // *Biochemistry* – 1977. – T. 16 – № 19 – C.4177–81.
89. Dombrose F.A. The association of bovine prothrombin fragment 1 with phospholipid. Quantitative characterization of the Ca²⁺ ion-mediated binding of prothrombin fragment 1 to phospholipid vesicles and a molecular model for its association with phospholipids. / Dombrose F.A., Gitel S.N., Zawalich K., Jackson C.M. // *The Journal of biological chemistry* – 1979. – T. 254 – № 12 – C.5027–40.
90. Atkins J.S. The association of human coagulation factors VIII, IXa and X with phospholipid vesicles involves both electrostatic and hydrophobic interactions. / Atkins J.S., Ganz P.R. // *Molecular and cellular biochemistry* – 1992. – T. 112 – № 1 – C.61–71.
91. London F. The role of electrostatic interactions in the assembly of the factor X activating complex on both activated platelets and negatively-charged phospholipid vesicles. / London F., Walsh P.N. // *Biochemistry* – 1996. – T. 35 – № 37 – C.12146–54.
92. Soriano-Garcia M. The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. / Soriano-Garcia M., Padmanabhan K., Vos A.M. de, Tulinsky A. // *Biochemistry* – 1992. – T. 31 – № 9 – C.2554–2566.
93. Banner D.W. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. / Banner D.W., D'Arcy A., Chène C., Winkler F.K., Guha A., Konigsberg W.H., Nemerson Y., Kirchhofer D. // *Nature* – 1996. – T. 380 – № 6569 – C.41–46.
94. Freedman S.J. Structure of the metal-free gamma-carboxyglutamic acid-rich membrane binding region of factor IX by two-dimensional NMR spectroscopy. / Freedman S.J., Furie B.C., Furie B., Baleja J.D. // *The Journal of biological chemistry* – 1995. – T. 270 – № 14 – C.7980–7.
95. Freedman S.J. Structure of the calcium ion-bound gamma-carboxyglutamic acid-rich domain of factor IX. / Freedman S.J., Furie B.C., Furie B., Baleja J.D. // *Biochemistry* – 1995. – T. 34 – № 38 – C.12126–12137.
96. Sunnerhagen M. Structure of the Ca(2+)-free Gla domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. / Sunnerhagen M., Forsén S., Hoffrén A.M.,

Drakenberg T., Teleman O., Stenflo J. // *Nature structural biology* – 1995. – T. 2 – № 6 – C.504–9.

97. Ohkubo Y.Z. Distinct structural and adhesive roles of Ca²⁺ in membrane binding of blood coagulation factors. / Ohkubo Y.Z., Tajkhorshid E. // *Structure* (London, England : 1993) – 2008. – T. 16 – № 1 – C.72–81.

98. Kane W.H. Cloning of cDNAs coding for the heavy chain region and connecting region of human factor V, a blood coagulation factor with four types of internal repeats. / Kane W.H., Ichinose A., Hagen F.S., Davie E.W. // *Biochemistry* – 1987. – T. 26 – № 20 – C.6508–14.

99. Nesheim M.E. Isolation and characterization of single chain bovine factor V. / Nesheim M.E., Myrnel K.H., Hibbard L., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1979. – T. 254 – № 2 – C.508–17.

100. Higgins D.L. The interaction of bovine factor V and factor V-derived peptides with phospholipid vesicles. / Higgins D.L., Mann K.G. // *The Journal of biological chemistry* – 1983. – T. 258 – № 10 – C.6503–6508.

101. Kalafatis M. Factor Va-membrane interaction is mediated by two regions located on the light chain of the cofactor. / Kalafatis M., Rand M.D., Mann K.G. // *Biochemistry* – 1994. – T. 33 – № 2 – C.486–93.

102. Macedo-Ribeiro S. Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. / Macedo-Ribeiro S., Bode W., Huber R., Quinn-Allen M.A., Kim S.W., Ortel T.L., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Stubbs M.T., Kane W.H., Fuentes-Prior P. // *Nature* – 1999. – T. 402 – № 6760 – C.434–9.

103. Pratt K.P. Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. / Pratt K.P., Shen B.W., Takeshima K., Davie E.W., Fujikawa K., Stoddard B.L. // *Nature* – 1999. – T. 402 – № 6760 – C.439–42.

104. Pellequer J.L. Homology models of the C domains of blood coagulation factors V and VIII: a proposed membrane binding mode for FV and FVIII C2 domains. / Pellequer J.L., Gale A.J., Griffin J.H., Getzoff E.D. // *Blood cells, molecules & diseases* – 1998. – T. 24 – № 4 – C.448–61.

105. Esmon C.T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. / Esmon C.T. // *The Journal of biological chemistry* – 1989. – T. 264 – № 9 – C.4743–6.

106. Kurosawa S. Proteolytic formation and properties of functional domains of thrombomodulin. / Kurosawa S., Galvin J.B., Esmon N.L., Esmon C.T. // *The Journal of biological chemistry* – 1987. – T. 262 – № 5 – C.2206–2212.
107. Kurosawa S. A 10-kDa cyanogen bromide fragment from the epidermal growth factor homology domain of rabbit thrombomodulin contains the primary thrombin binding site. / Kurosawa S., Stearns D.J., Jackson K.W., Esmon C.T. // *The Journal of biological chemistry* – 1988. – T. 263 – № 13 – C.5993–6.
108. Zwaal R.F. Lipid-protein interactions in blood coagulation. / Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. // *Biochimica et biophysica acta* – 1998. – T. 1376 – № 3 – C.433–53.
109. Baglia F.A. Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. / Baglia F.A., Badellino K.O., Li C.Q., Lopez J.A., Walsh P.N. // *The Journal of biological chemistry* – 2002. – T. 277 – № 3 – C.1662–1668.
110. Bradford H.N. Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation. / Bradford H.N., Pixley R.A., Colman R.W. // *The Journal of biological chemistry* – 2000. – T. 275 – № 30 – C.22756–22763.
111. Marco L. De Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein Ib alpha. / Marco L. De, Mazzucato M., Masotti A., Ruggeri Z.M. // *The Journal of biological chemistry* – 1994. – T. 269 – № 9 – C.6478–84.
112. Joseph K. Platelet glycoprotein Ib: a zinc-dependent binding protein for the heavy chain of high-molecular-weight kininogen. / Joseph K., Nakazawa Y., Bahou W.F., Ghebrehiwet B., Kaplan A.P. // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* – 1999. – T. 5 – № 8 – C.555–563.
113. Ghebrehiwet B. gC1qR/p33 serves as a molecular bridge between the complement and contact activation systems and is an important catalyst in inflammation. / Ghebrehiwet B., CebadaMora C., Tantral L., Jesty J., Peerschke E.I.B. // *Advances in experimental medicine and biology* – 2006. – T. 586 – C.95–105.
114. Peerschke E.I.B. Activation-dependent surface expression of gC1qR/p33 on human blood platelets. / Peerschke E.I.B., Murphy T.K., Ghebrehiwet B. // *Thrombosis and haemostasis* – 2003. – T. 89 – № 2 – C.331–9.

115. Byzova T. V Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation. / Byzova T. V, Plow E.F. // *The Journal of biological chemistry* – 1997. – T. 272 – № 43 – C.27183–27188.
116. Podoplelova N.A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. / Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kurasawa J.H., Sarafanov A.G., Chambost H., Vasil'ev S.A., Demina I.A., Ataulakhanov F.I., Alessi M.-C., Pantelev M.A. // *Biochimica et biophysica acta* – 2016. – T. 1858 – № 6 – C.1216–1227.
117. Zakharova N. V Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. / Zakharova N. V, Artemenko E.O., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Demina I.A., Ataulakhanov F.I., Pantelev M.A. // *PloS one* – 2015. – T. 10 – № 2 – C.e0116665.
118. Podoplelova N.A. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting / Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., Obydennyi S.I., Kireev I.I., Gachet C., Ataulakhanov F.I., Mangin P.H., Pantelev M.A. // *Blood* – 2016. – T. 128 – № 13 – C.1745–1755.
119. Ahmad S.S. Structural and functional characterization of platelet receptor-mediated factor VIII binding. / Ahmad S.S., Scandura J.M., Walsh P.N. // *The Journal of biological chemistry* – 2000. – T. 275 – № 17 – C.13071–13081.
120. Walsh P.N. The role of platelets in intrinsic factor-Xa formation. / Walsh P.N., Biggs R. // *British journal of haematology* – 1972. – T. 22 – № 6 – C.743–760.
121. Gilbert G.E. Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles. / Gilbert G.E., Furie B.C., Furie B. // *The Journal of biological chemistry* – 1990. – T. 265 – № 2 – C.815–822.
122. Bardelle C. Membrane binding kinetics of factor VIII indicate a complex binding process. / Bardelle C., Furie B., Furie B.C., Gilbert G.E. // *The Journal of biological chemistry* – 1993. – T. 268 – № 12 – C.8815–8824.
123. Oling F. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. / Oling F., Bergsma-Schutter W., Brisson A. // *Journal of structural biology* – 2001. – T. 133 – № 1 – C.55–63.

124. Richter R.P. On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. / Richter R.P., Him J.L.K., Tessier B., Tessier C., Brisson A.R. // *Biophysical journal* – 2005. – Т. 89 – № 5 – С.3372–3385.
125. Кумскова М.А. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза / Кумскова М.А., Дёмина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серёгина Е.А., Бондар Е.В., Полетаев А.В., Коняшина Н.И., Пантелеев М.А. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2015. – Т. 14 – № 4 – С.17–24.
126. Подоплелова Н.А. Регуляция мембранно-зависимых реакция свертывания крови / Подоплелова Н.А., Котова Я.Н., Е.Н. Л., Атауллаханов Ф.И., Пантелеев М.А. // *Успехи физиологических наук* – 2015. – Т. 46 – № 4 – С.3–14.
127. Gilbert G.E. Platelet binding sites for factor VIII in relation to fibrin and phosphatidylserine. / Gilbert G.E., Novakovic V.A., Shi J., Rasmussen J., Pipe S.W. // *Blood* – 2015. – Т. 126 – № 10 – С.1237–1244.
128. Polasek J. Procoagulant potential of platelet alpha granules. / Polasek J. // *Platelets* – 2004. – Т. 15 – № 7 – С.403–407.