

На правах рукописи



Подоплелова Надежда Александровна

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ С  
СУБПОПУЛЯЦИЯМИ АКТИВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ**

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
«Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук»

**Научный руководитель:**

**Пантелеев Михаил Александрович**  
доктор физико-математических наук

**Официальные оппоненты:**

**Холмухамедов Эхсон Лукманович**  
доктор биологических наук, ведущий  
научный сотрудник лаборатории тканевой  
инженерии ФГБУН «Институт  
теоретической и экспериментальной  
биофизики Российской академии наук»

**Литвинов Рустем Игоревич**  
доктор медицинских наук, профессор  
кафедры биохимии и биотехнологии  
Института фундаментальной медицины и  
биологии Казанского федерального  
университета

**Ведущая организация:**

ФГБУ «Российский кардиологический  
научно-производственный комплекс»  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации

Защита диссертации состоится « 19 » апреля 2017 года в 11 часов 00 минут на заседании  
Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном  
учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии  
наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической физики им.  
Н.Н.Семенова Российской академии наук» по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект,  
дом 38 и на сайте: <http://ibcp.chph.ras.ru/diss-sovet/razmeshchennye-dissertatsii>.

Автореферат разослан «    » февраля 2017 года

Ученый секретарь  
Диссертационного совета, Д 002.039.01,  
кандидат химических наук



Л.И. Мазалецкая

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 Xa. В связи с этим было бы интересно изучить влияние фактора V на взаимодействие фактора Xa 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 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.

**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 Ха различаются. Для фактора Ха 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 Ха может препятствовать его вымыванию из тромба в условиях потока;

4. Все изученные факторы свертывания, IXa, Ха, 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), описание материалов и методов (глава 2), результаты (глава 3), обсуждение (глава 4), заключение, выводы, список сокращений и обозначений, благодарности и список цитированной литературы (128 библиографических ссылок). Работа содержит 40 рисунков и 1 таблицу.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во введении описана актуальность исследуемой темы, сформулированы цели и задачи исследования и дана общая характеристика работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Приведены основные сведения о свертывании крови, функциях тромбоцитов и видах их ответа на активацию. Описаны феномен гетерогенности активированных тромбоцитов и основные свойства их субпопуляций. Изложены основные сведения о свойствах и механизмах мембранно-зависимых реакций свертывания крови. Описаны основные механизмы взаимодействия факторов свертывания с отрицательно заряженными фосфолипидными мембранами.

В главе 2 описаны материалы и методы, используемые в работе. Помимо конкретных методов, применяемых в работе и кратко изложенных ниже, приведены все реактивы,

использовавшиеся при проведении экспериментов, методика выделения тромбоцитов из крови доноров с использованием гель-фильтрации для очистки от белков плазмы крови, конъюгирование факторов свертывания с флуоресцентной меткой, методика приготовления фосфолипидных везикул. Описаны принципы проточной цитометрии и конфокальной микроскопии, а также процедура обработки результатов, получаемых с помощью этих методов.

#### **Конъюгирование факторов свертывания с флуоресцентной меткой**

Предварительно факторы были диализованы при +4<sup>0</sup>С 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 +4<sup>0</sup>С в течение 2 часов при постоянном перемешивании. Молярное отношение краски к белку в реакционной смеси составляло 5. Реакцию останавливали добавлением избытка гидроксилламингидрохлорида (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 все случаях активность факторов свертывания была более 80%.

#### **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 DiIC16 (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.

#### **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 CaCl<sub>2</sub> (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. Кривые связывания ФХа с активированными тромбоцитами аппроксимировали двухсайтовой моделью связывания. При этом K<sub>d</sub> и количество сайтов связывания рассчитывали только для высокоаффинного сайта связывания. 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. Среднее количество молекул GFP на одном шарике определяли методом микроскопии полного внутреннего отражения.

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

К искусственным фосфолипидным везикулам (ФС:ФХ 25:75, 5 мкМ) или активированным тромбином (100 нМ) тромбоцитам ( $5 \times 10^4$  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  $\text{CaCl}_2$  (2,5 мМ) и анализировали с помощью проточного цитометра. Индивидуальные кривые связывания и диссоциации аппроксимировали экспоненциальной моделью.

### **Исследование взаимодействия фактора Xa с тромбоцитарным тромбом в условиях потока**

Стекланные покровные стекла (24×24 мм, Heinz Herenz) очищали раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте, после чего промывали дистиллированной водой и сушили при +50°C. Чистые стекла инкубировали в течение часа при комнатной температуре во влажной камере с раствором нативного коллагена I типа (200 мкг/мл). Несвязавшийся со стеклами белок удаляли промывкой в дистиллированной воде. Стекла сушили при 37°C и затем собирали, как часть плоско-параллельной 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  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 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  $\text{CaCl}_2$  (100 мМ) до физиологической концентрации свободного ионизированного кальция (около 1 мМ). 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  $500 \text{ c}^{-1}$ . Затем, камеру промывали в течение 4 минут буфером Тироде, содержащим альбумин 0,5% и  $\text{CaCl}_2$  2,5 мМ. После этого камеру промывали раствором фактора Xa (5 нМ) в течение 2 минут, затем раствором фактора Xa (50 нМ) еще в течение 2 минут и снова раствором фактора Xa (5 нМ) в течение 2 минут. Затем, камеру промывали в течение 4 минут буфером Тироде, содержащим альбумин 0,5% и  $\text{CaCl}_2$  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).

### **Микроскопическое исследование распределения кофакторов V и VIII на мембране активированных тромбоцитов**

Очищенные стекланные 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 37°C.

Тромбоциты ( $5 \times 10^4$  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  $\text{CaCl}_2$  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).

#### **Микроскопическое исследование распределения факторов IXa, Xa, X, протромбина, а также аннексина V на мембране активированных тромбоцитов**

Покровные стекла подготовили, как было описано выше.

Тромбоциты ( $5 \times 10^4$  кл./мкл), выделенные из крови доноров с использованием гелевой фильтрации для очистки от белков плазмы крови, активировали смесью тромбин (100 нМ) + CRP (20 мкг/мл) в присутствии  $\text{CaCl}_2$  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-X (250 нМ), ФИТЦ-Xa (30 нМ) или ФИТЦ-протромбином (60 нМ) в присутствии  $\text{CaCl}_2$  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).

#### **Измерение скорости активации фактора X комплексом внутренней теназы**

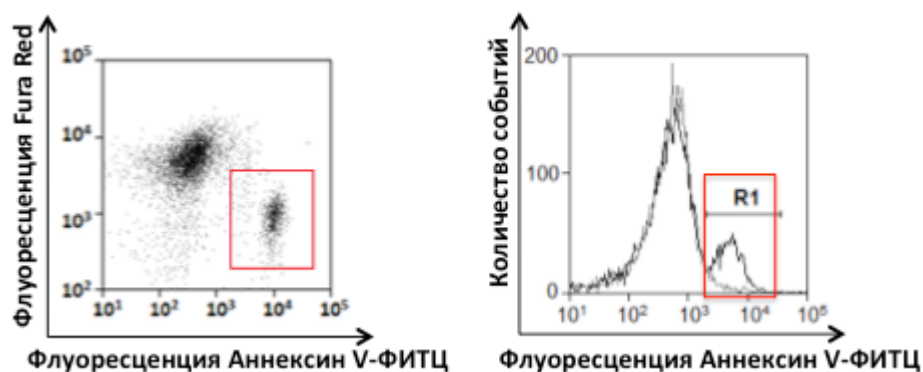
Фактор VIII активировали тромбином (10 нМ) в течение 1 мин, после чего ингибировали тромбин РРАСК (2 мкМ). Затем, искусственные фосфолипидные везикулы 5:95 ФС:ФХ (10 мкМ) или 25:75 ФС:ФХ (2мкМ), фактор IXa (1 нМ), фактор VIIIa (20 нМ) в присутствии  $\text{CaCl}_2$  2,5 мМ инкубировали при 37 ° С в течение 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).

Главы 3 и 4 посвящены описанию результатов и их обсуждению.

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

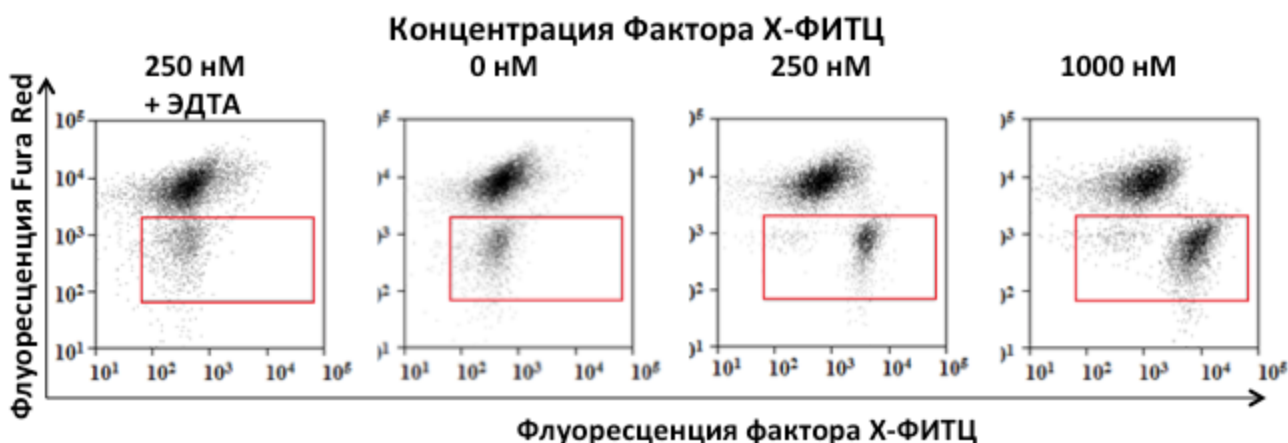
При сильной активации тромбином (100 нМ) мы получили две субпопуляции тромбоцитов, отличающиеся по содержанию фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны (ФС-положительная и ФС-отрицательная субпопуляции) (рисунок 1). Также эти две субпопуляции отличаются по концентрации внутриклеточного кальция, которую 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.





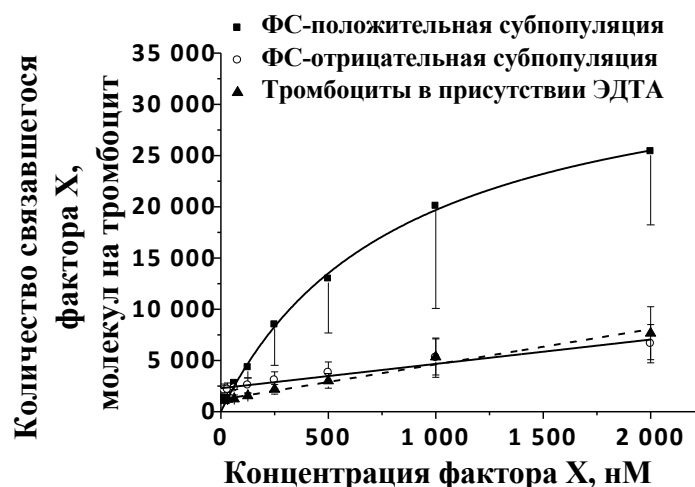
**Рисунок 1.** Связывание Аннексина V с двумя субпопуляциями активированных тромбоцитов. (А)Связывание аннексина V- ФИТЦ с субпопуляциями активированных тромбоцитов. Красным выделена субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов. (Б)Тромбоциты в концентрации 50 000 кл./мкл активировали тромбином( 100 нМ) в присутствии CaCl<sub>2</sub>(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 рамкой. Представлены результаты типичного эксперимента из трех, проведенных с кровью разных доноров.

Как видно из рисунка 2, 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<sup>2+</sup>- зависимым.



**Рисунок 2.** 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 3).



**Рисунок 3.** 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).

### **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 4). 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.

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 4, достигается плато, которое находится значительно выше, чем можно было бы предположить из экспериментов по равновесному связыванию с той же концентрацией свободного фактора (рисунок 4 врезки). Другими словами, процесс связывания- диссоциации факторов X и Xa с мембраной активированных идет с гистерезисом. То есть, связанный фактор состоит из двух фракций, одна из которых, связана обратимо, а вторая необратимо

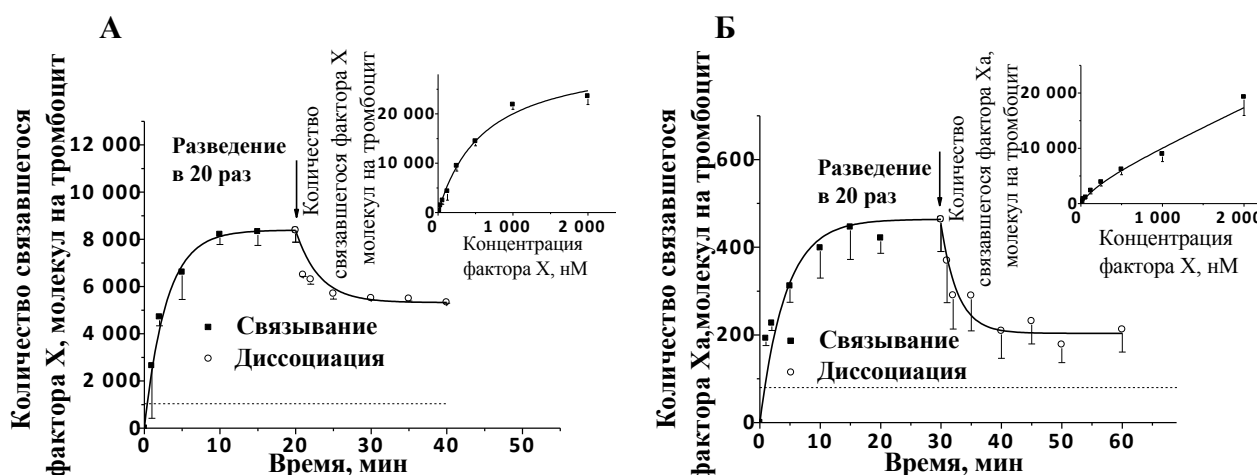
**Таблица 1.** Кинетические параметры взаимодействия факторов X и Xa с фосфолипидными везикулами и фосфатидилсерин положительными тромбоцитами<sup>a</sup>

	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 <sup>a</sup>
$k_+ \pm SEM$ (нМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup> )	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>	0,0020±0.0003	0,010±0,002
$k_- \pm SEM$ (с <sup>-1</sup> )	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>	0,9±0,3	0,5±0,3
Кажущееся число сайтов связывания на тромбоцит/ везикулу± SEM	8000±800	10000±1900	10000±900	500±6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Параметры были рассчитаны по кривым на рисунках 4 и 5. Приведены средние ±SEM (n=3).

<sup>b</sup> Данные до достижения плато отсутствуют, что не позволяет получить точные значения.

<sup>c</sup> 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)



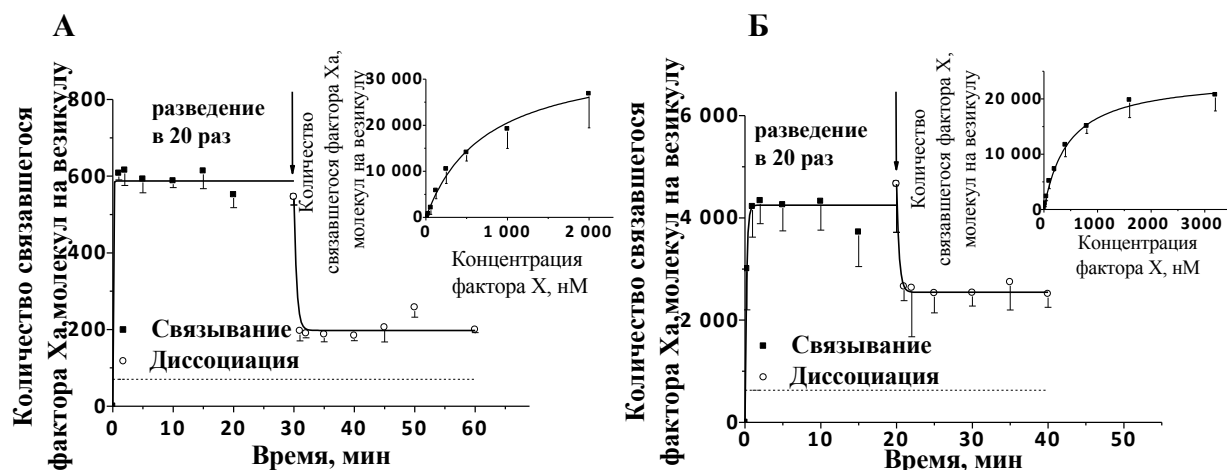
**Рисунок 4.** Кинетика связывания и диссоциации факторов X(A) и Xa(B) с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. Связывание факторов X-ФИТЦ(Xa-ФИТЦ) анализировали с помощью проточного цитометра в моменты времени: 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут после добавления фактора. После достижения насыщения, образцы разводили в 20 раз буфером А с CaCl<sub>2</sub> (2,5 мМ), для анализа диссоциации факторов. На графиках приведены средние±SD (n=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 5). 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 процесс ассоциации-диссоциации протекает с гистерезисом. Это свидетельствует о том, что гистерезис может быть объяснен только взаимодействием факторов с фосфолипидной мембраной, а не присутствием каких-либо тромбоцитарных белков.

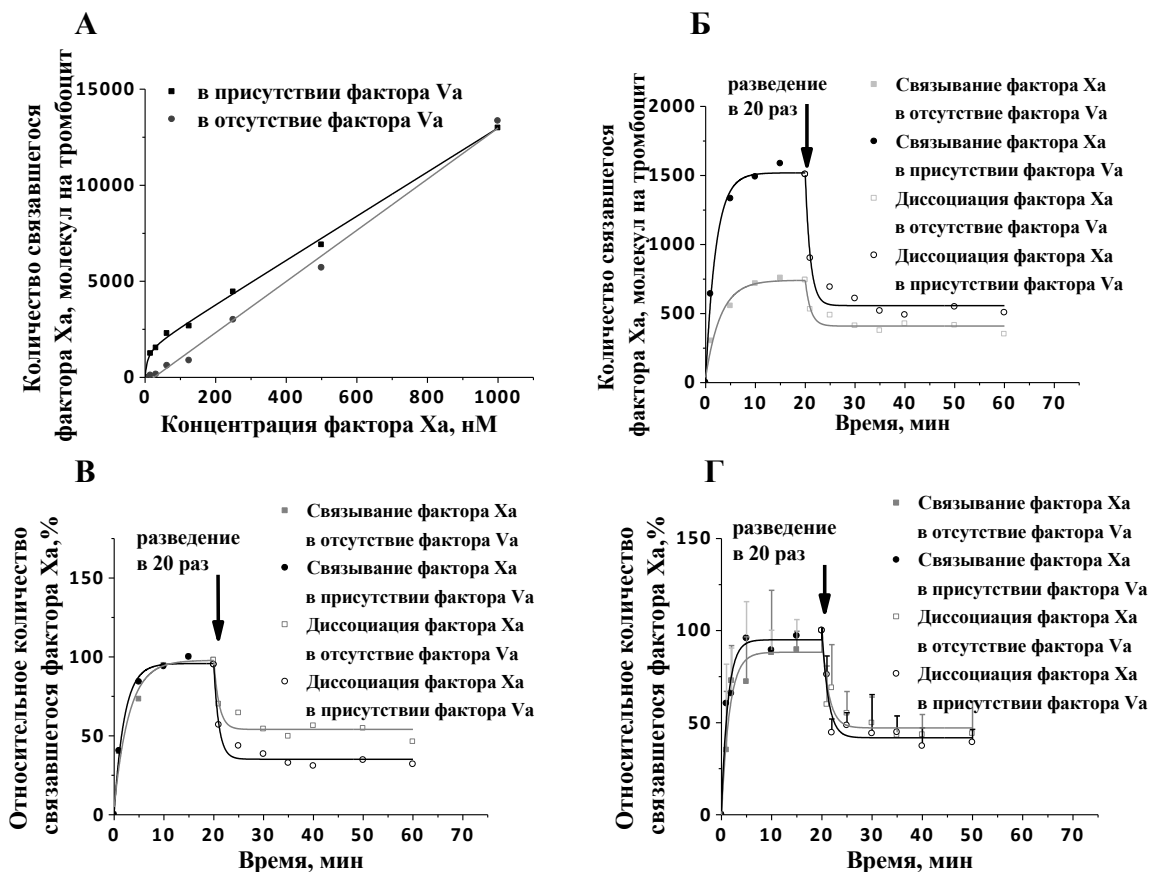


**Рисунок 5.** Кинетика связывания и диссоциации факторов X(A) и Xa(B) с фосфолипидными везикулами. На графиках приведены средние  $\pm$ SD (n=3).

### 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 6).

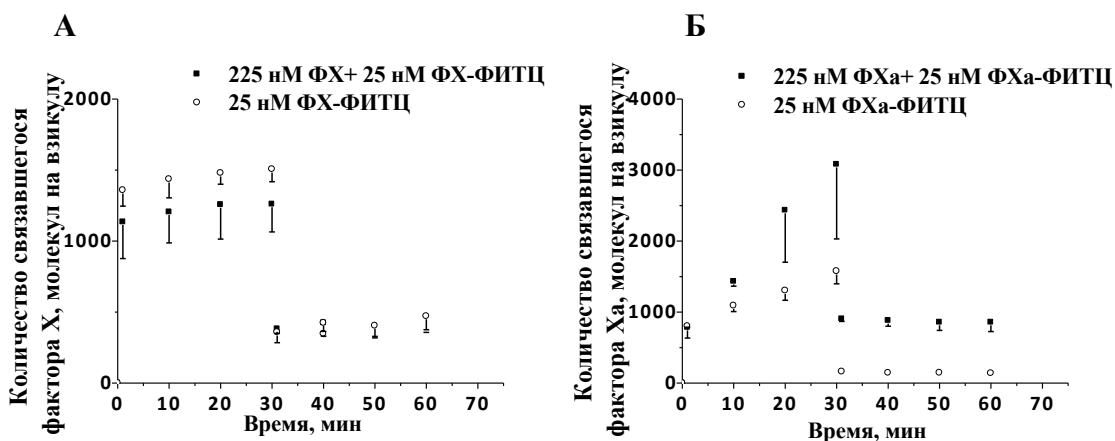
При этом процесс ассоциации-диссоциации фактора Xa продолжает идти с гистерезисом, но высокоаффинный сайт связывания пропадает. Эти данные дополнительно подтвердили, что явление гистерезиса не объясняется наличием каких-либо специфических белков на мембране активированных тромбоцитов и связано только с взаимодействием факторов с фосфолипидами мембраны.



**Рисунок 6.** 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 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).

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

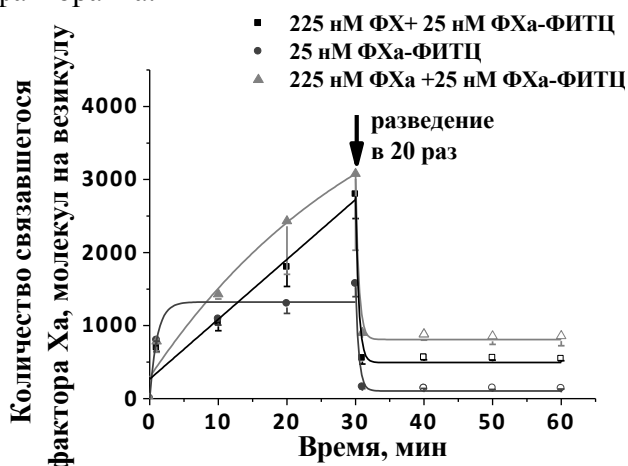
Как видно из рисунка 7, связывание ФХ-ФИТЦ незначительно ингибируется избытком немеченого ФХ. В то время, как для ФХа картина совершенно другая. Немеченый ФХа значительно увеличивает связывание ФХа-ФИТЦ. Кроме того значительно больше фактора остается связанным с мембраной после разбавления буфером. Эти данные могут указывать на то, что отличаются механизмы закрепления ФХ и ФХа на фосфолипидных мембранах. По всей видимости, для фактора Xa основную роль, играет мультимеризация. В то время, как закрепление фактора X на фосфолипидной мембране происходит за счет его стабилизации.



**Рисунок 7.** 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  $\text{CaCl}_2$ , для анализа диссоциации. На графике приведены средние  $\pm$ SD (n=3)

### Гетероолигомеризация факторов X и Ха

Эксперименты по связыванию меченого ФХа в присутствии немеченого ФХ (рисунок 8) показали, что ФХ способен значительно увеличивать связывание ФХа. Это свидетельствует о том, что могут образовываться гетероолигомеры факторов X и Ха, и это может способствовать задержанию фактора Ха на фосфолипидной мембране. Кроме того в составе гетероолигомеров факторов X и Ха на мембране может оставаться гораздо больше фактора Ха, чем в составе гомоолигомеров Ха-Ха, так как концентрация фактора X в крови на несколько порядков больше, чем концентрация фактора Ха.

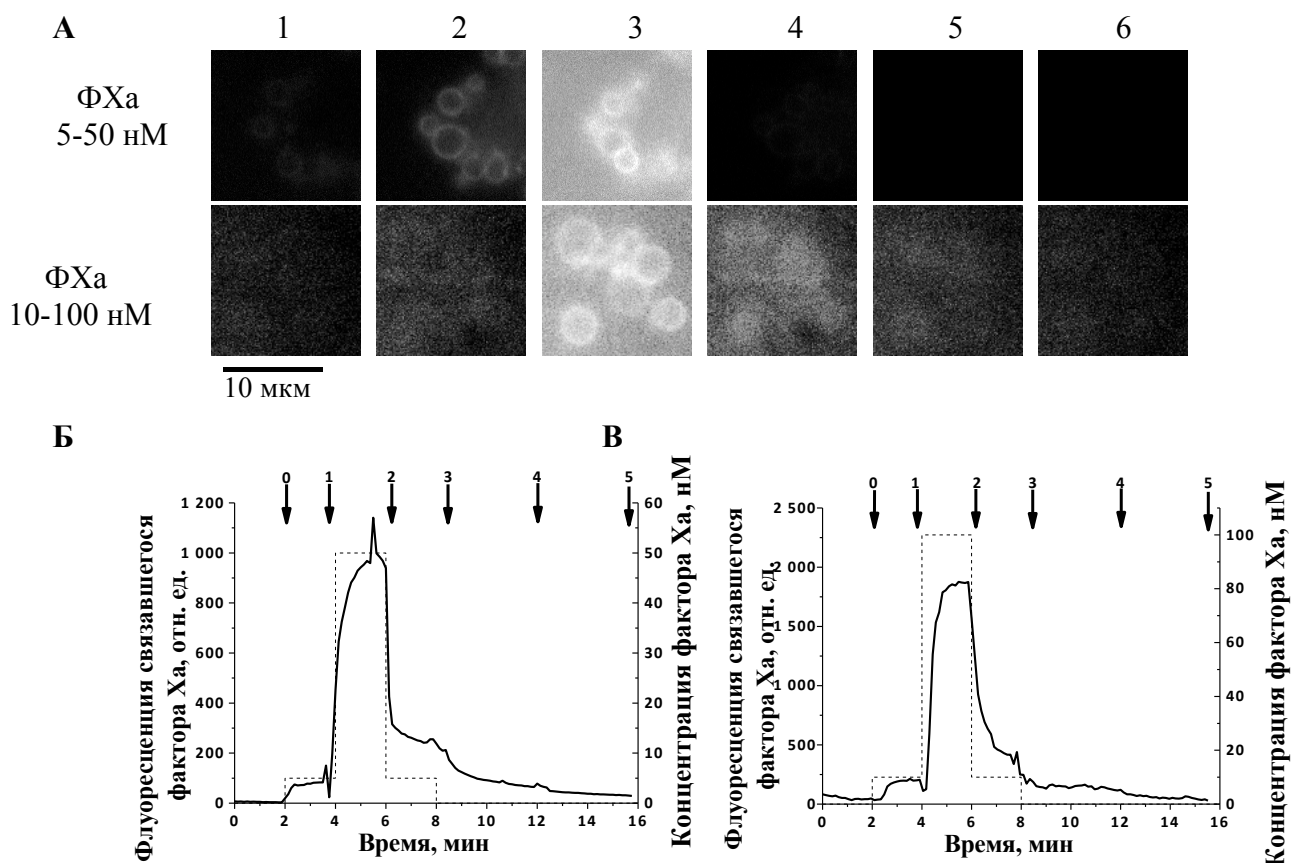


**Рисунок 8.** Кинетика связывания – диссоциации ФХ(Ха) с фосфолипидными везикулами. (А) Фосфолипидные везикулы (5мкМ) инкубировали с ФХа-ФИТЦ (25 нМ) в присутствии ФХа(225 нМ) или ФХ(225 нМ) в течение 30 мин. В моменты времени 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 минут отбирали аликвоты и анализировали их с помощью проточного цитометра. После достижения насыщения раствор разбавляли в 20 раз буфером, содержащим  $\text{CaCl}_2$ , для анализа диссоциации. На графике приведены средние  $\pm$ SD (n=3).

### Взаимодействие факторов X и Ха с тромбоцитарным тромбом

Вымывание факторов свертывания из тромба в условиях потока может ухудшать стабилизацию тромбов фибрином, а также может приводить к нежелательной коагуляции и

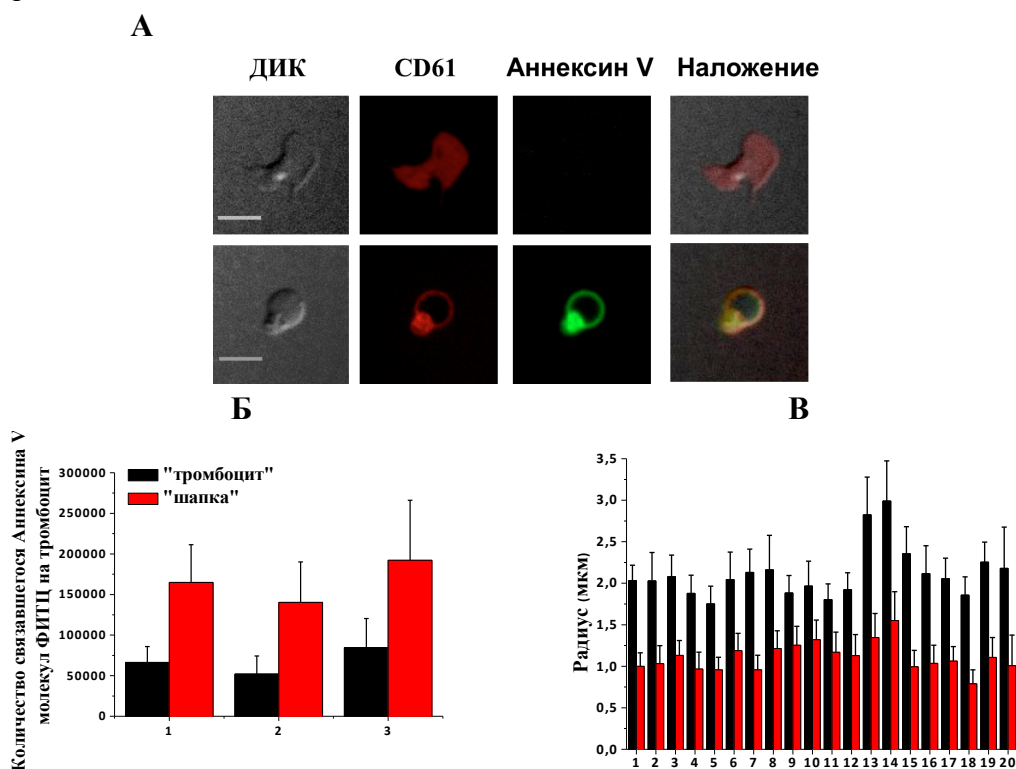
эмболизации ниже по течению кровяного русла. Естественно предположить, что явление гистерезиса может препятствовать вымыванию факторов свертывания из тромбов в условиях потока. Мы проверили эту гипотезу экспериментально с использованием плоско-параллельных камер с коллагеном при скорости сдвига  $500 \text{ c}^{-1}$  (рисунок 9). Проточные камеры промывали раствором флуоресцентно меченого ФХа 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  $\text{CaCl}_2$ . Эксперимент показал, что и в случае тромбоцитарного тромба наблюдается гистерезис при ассоциации-диссоциации фактора Ха.



**Рисунок 9.** (А) 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  $500 \text{ c}^{-1}$ . После этого через проточную камеру прокачивали буфер А, содержащий  $\text{CaCl}_2$  (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  $\text{CaCl}_2$  (панель 4). В заключение, проточную камеру промыли буфером А, содержащим 10 мМ ЭДТА (панель 5). (Б,В) 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.

## Распределение аннексина V на мембране активированных тромбоцитов

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 1). В соответствии с микроскопическими данными, две субпопуляции тромбоцитов отличаются не только способностью связывать Аннексин V, но и по морфологическим признакам. Как видно на рисунке 10 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. 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

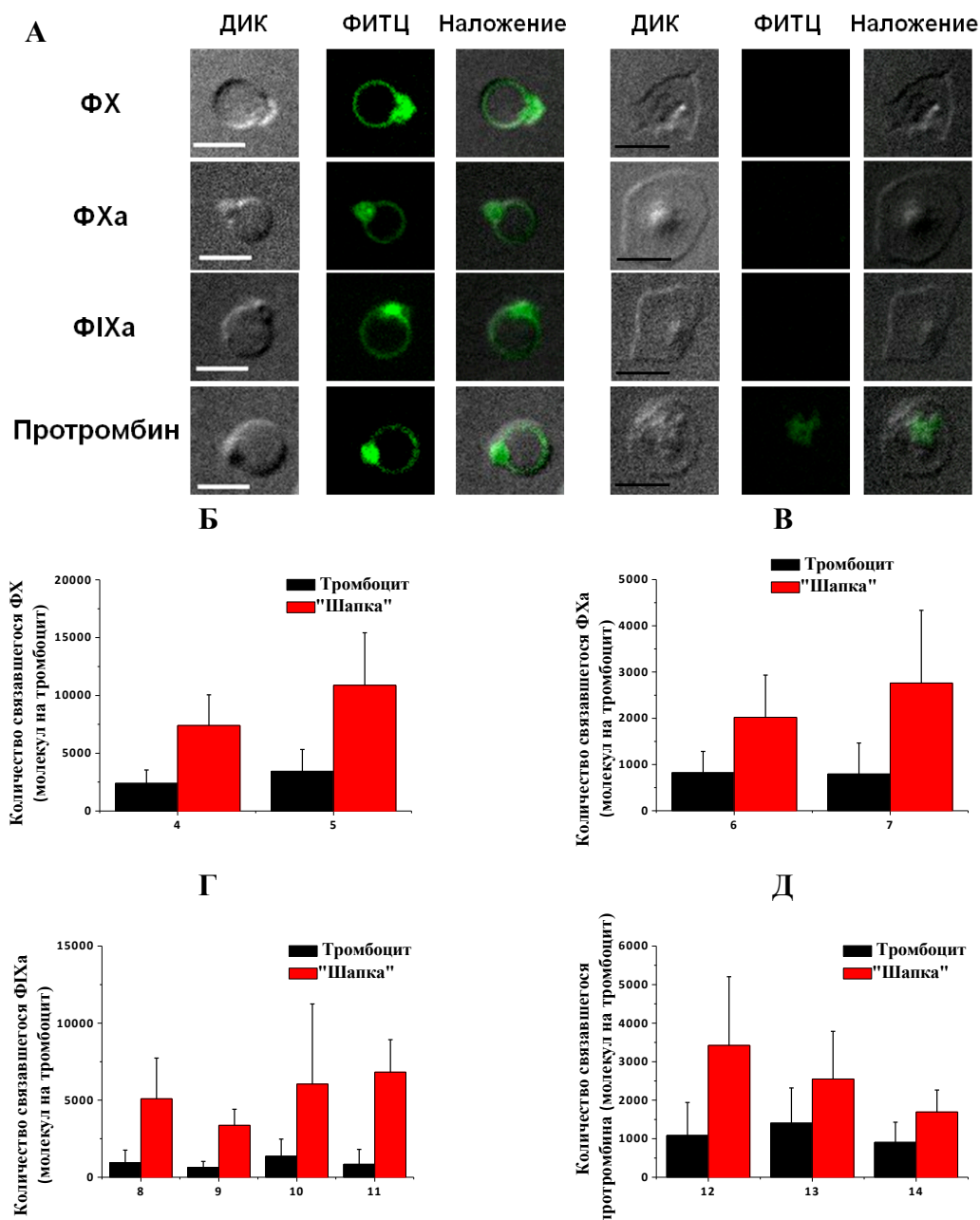


**Рисунок 10.** (А) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Красным показана флуоресценция CD61-PE, зеленым- флуоресценция Аннексин V-ФИТЦ. В первом ряду показаны ФС-отрицательные тромбоциты, во втором ФС-положительные. (Б) Количество связавшегося Аннексина V с ФС-положительными тромбоцитами 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.



## Распределение факторов витамин К- зависимых факторов свертывания на мембране фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов

Нами было изучено распределение флуоресцентно меченых витамин К-зависимых факторов на мембранах активированных тромбоцитов, как видно из рисунка 11 оно аналогично распределению Аннексина V. С «шапкой» связывается в два раза больше факторов X, Ха и протромбина и на порядок больше фактора IXa, чем с остальной мембраной тромбоцита.

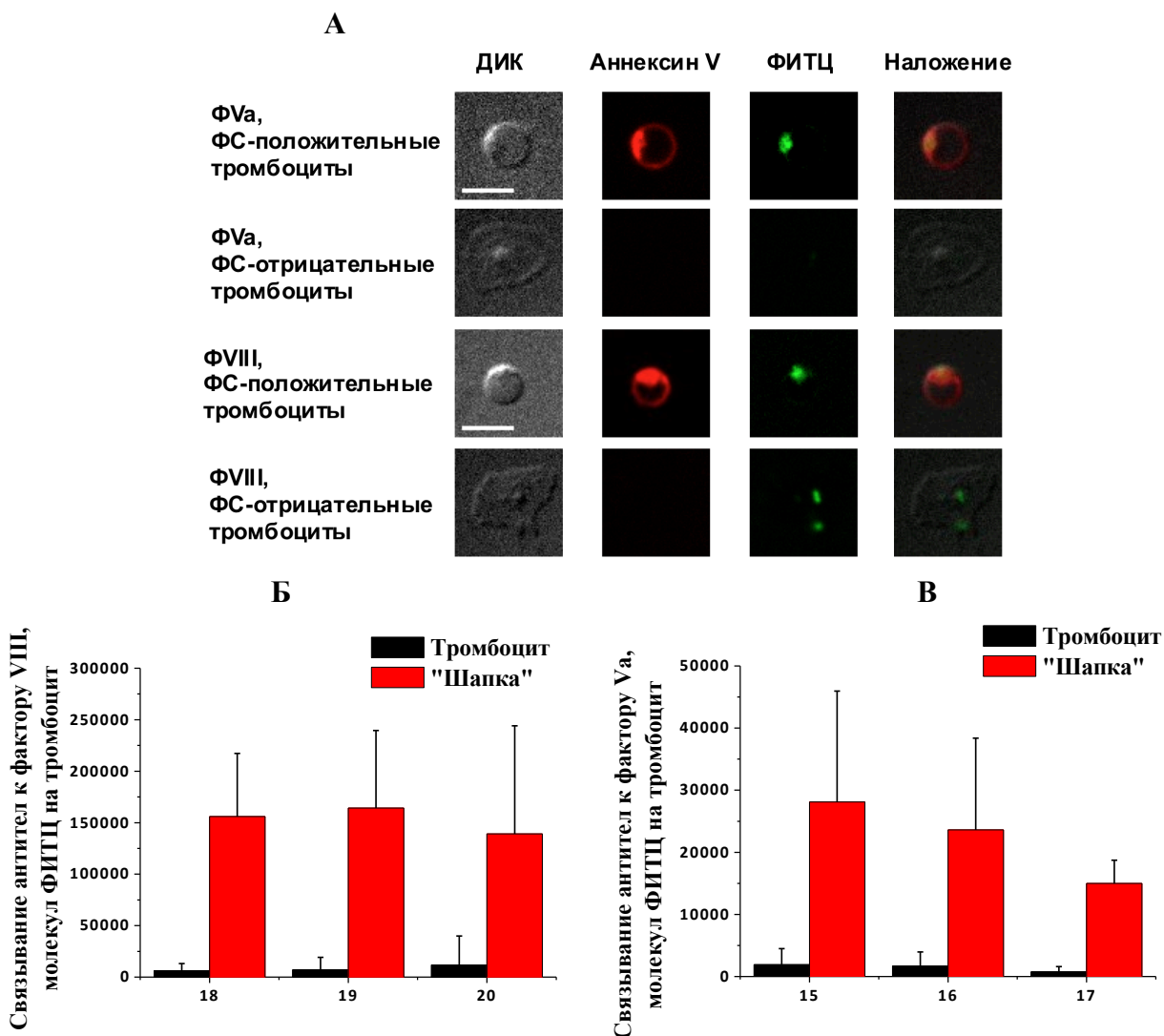


**Рисунок 11.** Распределение факторов IXa, X, Ха и протромбина на мембране активированных тромбоцитов. (А) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Зеленым показана флуоресценция флуоресцентно меченых факторов IXa, X, Ха и протромбина. Справа показаны ФС-отрицательные тромбоциты, слева ФС-положительные. (Б-Д) Количество связавшихся факторов IXa, X, Ха и протромбина с ФС-положительными тромбоцитами в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Приведены средние значения  $\pm$ SD.

## 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 12 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.

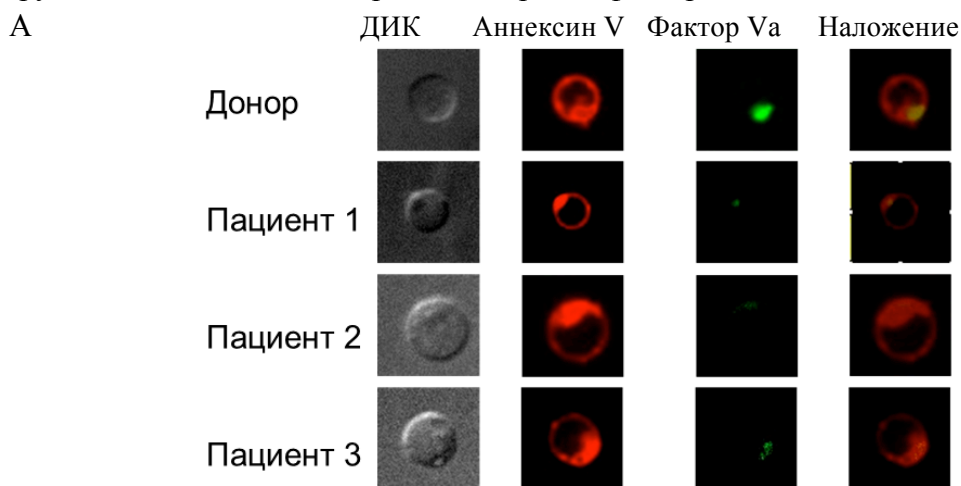
В случае фактора VIII мы добавляли внешний фактор, а затем детектировали его также с использованием специфичных антител. При этом, как видно из рисунка 13, флуоресценция антител к фактору VIII наблюдалась как в «шапке» ФС-положительных тромбоцитов, так и на ФС-отрицательных тромбоцитах. Скорее всего такое различие обусловлено взаимодействием фактора VIII не только с ФС, но и с фактором Виллебранда, связанным с GPIb.



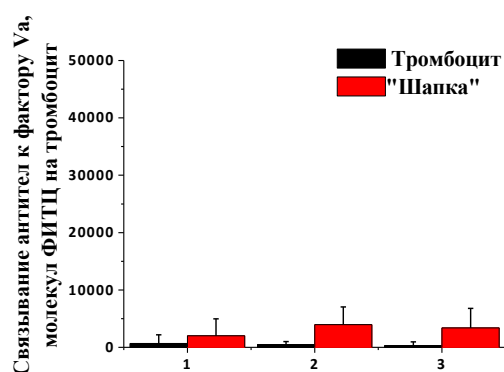
**Рисунок 12.** Распределение кофакторов Va и VIII на мембране активированных тромбоцитов. (A) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Красным показана флуоресценция Аннексина V-Alexa647, зеленым – флуоресценция антител к факторам Va и VIII. (Б-В) Интегральная флуоресценция антител к факторам Va и VIII в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Данные приведены для трех различных доноров. Приведены средние значения  $\pm$ SD.

### 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 13 на тромбоцитах таких пациентов действительно не удается детектировать фактор V. Это свидетельствует о том, что при очистке тромбоцитов гель-фильтрацией мы полностью избавляемся от плазменного фактора V и в дальнейшем детектируем связывание только тромбоцитарного фактора.



Б

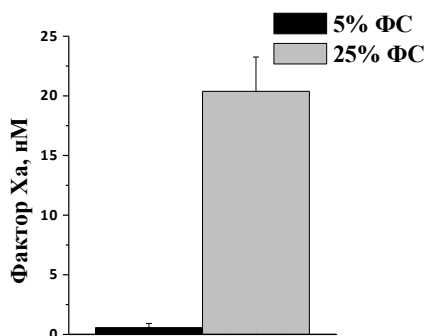


**Рисунок 13.** Распределение кофактора Va на мембране активированных тромбоцитов у пациентов с синдромом серых тромбоцитов. (А) Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Красным показана флуоресценция Аннексина V-Alexa647, зеленым – флуоресценция антител к фактору Va. (Б) Интегральная флуоресценция антител к факторам Va в «шапке» и на остальной мембране тромбоцита. Данные приведены для трех различных доноров. Приведены средние значения  $\pm$ SD.

### 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 14 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.



**Рисунок 14.** Влияние различной плотности связывания факторов на активацию фактора X. На рисунке приведены средние значения  $\pm$ SEM.

### 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 Ха 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/Ха. 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, было 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 основных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Podoplelova, N.A. Coagulation factors bound to procoagulant platelets are concentrated in their 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., Panteleev, M. A. // *Blood*. – 2016. – Vol. 128. – № 13. – P. 1745-1755
2. 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., Panteleev, M. A. // *Biochim Biophys Acta*. – 2016 – Vol. 1858. – P. 1216-1227.
3. Подоплелова Н.А. Регуляция мембранно-зависимых реакция свертывания крови / Подоплелова Н.А., Котова Я. Н., Липец Е. Н., Атауллаханов Ф. И., Пантелеев М. А. // *Успехи физиологических наук*. – 2015. – Т. 46. – №4. – С. 3-14.
4. 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
5. 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., Panteleev M.A. // *PLoS One* – 2015. – Vol.10. – №2, – P. e0116665
6. Abaeva, A.A. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered “cap” on a surface that promotes attachment to aggregates / A.A.Abaeva, M.Canault, Y.N.Kotova, S.I.Obydennyu, A.O.Yakimenko, N.A.Podoplelova, V.N.Kolyadko, H.Chambost, A.V.Mazurov, F.I.Ataullakhanov, A.T.Nurden, M.-C.Alessi, M.A.Panteleev // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – P. 29621–29632
7. Кудрявцев К.В. Ингибирование прокоагулянтной активности тромбоцитов крови винилсульфонилпроизводными пирролидин-2-карбоновой кислоты. / Кудрявцев К.В.,

- Подоплелова Н.А., Новикова А.А., Пантелеев М.А., Заболотнев Д.В., Зефирова Н.С. // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2011. – №4. – С. 665-670
8. Podoplelova N. A. Coagulation factors X and Xa bind to phospholipid membranes in a hysteresis manner which allows them to be retained in thrombi under flow conditions. / Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Ataulakhanov F. I., Panteleev M. A. // FEBS Journal: FEBS-EMBO Conference, 30 August – 4 September 2014, Paris, France. – Vol. 281,Suppl. 1. – P. 65.
  9. Podoplelova N. A. Non-uniform distribution of coagulation factors on the membrane of activated platelets. / Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Ataulakhanov F. I., Panteleev M. A. // J. Thromb. Haemost: Abstracts of the XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 29 June – 4 July, 2013, Amsterdam, Netherlands. – Vol. 11Supplement 2. – P. 903.
  10. Podoplelova N. A. Binding of factor X to the activated platelet membrane demonstrates a multistep dissociation process that allows hysteresis effects. / Podoplelova N. A., Ataulakhanov F. I., Panteleev M. A. // J. Thromb. Haemost: Abstracts of the XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 29 June - 4 July, 2013, Amsterdam, Netherlands. – Vol. 11,Supplement 2. – P. 904.
  11. Podoplelova N. A. The kinetics of binding of factor X to the activated platelet membrane. / Podoplelova N. A., Ataulakhanov F. I., Panteleev M. A. // FEBS Journal: Abstracts of the 38th FEBS Congress, 6–11 July, 2013, Saint Petersburg. – Vol. 280,Supplement 1. – P. 106.
  12. Подоплелова Н. А. Изучение связывания фактора X с мембраной активированных тромбоцитов. / Подоплелова Н. А., Пантелеев М. А. // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: сборник тезисов шестой всероссийской конференция, 31 января – 2 февраля 2013, Москва – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2013. – С. 324-325.
  13. Podoplelova N. A. Coagulation factors X and Xa bind to procoagulant platelets in a hysteresis manner enabling their retention in thrombi despite rapid flows. / Podoplelova N. A., Sveshnikova A. N., Ataulakhanov F. I., Panteleev M. A. // The 2<sup>nd</sup> EUPLAN Conference. 24-26 September, 2014. – Le Bishenberg, France, , Abstracts. – P. 107.
  14. Podoplelova N. Blood coagulation factors bound to procoagulant platelets are concentrated in their cap structures to promote clotting. / Podoplelova N, Sveshnikova A, Kotova Y, Receveur N, Nechipurenko D, Obydenyi S, Kireev I, Gachet C, Ataulakhanov F, Mangin P, Panteleev M. // J. Thromb. Haemost: 62<sup>nd</sup> annual meeting of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. 25-28 May, 2016. Montpellier, France. – Vol.14(Supplement 1). – P. 108.
  15. Подоплелова Н. А. Взаимодействие факторов свертывания с субпопуляциями активированных тромбоцитов. / Подоплелова Н. А., Свешникова А. Н., Котова Я. Н., Нечипуренко Д. Ю., Обыденный С. И., Атауллаханов Ф. И., Пантелеев М. А. // Сборник тезисов V съезда физиологов СНГ. 4–8 октября 2016. Сочи – Дагомыс. – Сочи, 2016. – С. 151
  16. Podoplelova N.A. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to lipids protects from blood flow. / Podoplelova N.A., Sveshnikova A. N., Kurasawa J. H., Sarafanov A. G., Ataulakhanov F. I., Panteleev, M. A. // J. Thromb. Haemost: Abstracts of the XXV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis, 20 – 25 June, 2015. Toronto, Canada. – Vol. 13(Supplement 2). – P. 51-52