

Взаимодействие протромбина с субпопуляциями активированных тромбоцитов.

The prothrombin interaction to subpopulations of activated platelets.

П.А. Соловьева^{1,2}, С.И. Обыденный^{1,3}, Н. А. Подоплелова^{1,3,*}.

1. ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва
2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»
3. ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Автор для переписки: podoplelovan@yandex.ru

Получено: 01.03.2024

Принято к публикации: 26.03.2024

Опубликовано: 30.06.2024

EDN: BXLQLD

Аннотация

Одной из основных реакций свертывания крови является мембранозависимая активация протромбина комплексом протромбиназой. Существует по крайней мере две субпопуляции активированных тромбоцитов отличающиеся по способности взаимодействовать с факторами свертывания и участвовать в мембранных реакциях. Систематические кинетические исследования связывания протромбина с мембранами активированных тромбоцитов с учетом их деления на субпопуляции отсутствуют.

В рамках данной работы было количественно охарактеризовано взаимодействие протромбина с активированными тромбоцитами. Показано, что протромбин преимущественно связывался с фосфатидилсерин-положительной субпопуляцией тромбоцитов. Полученные параметры связывания протромбина с ФС-положительными тромбоцитами: $K_d = 1,4 \pm 0,4$ мкМ (среднее $\pm$ SD, $n = 3$) и 8500 ± 2500 сайтов связывания на тромбоцит. Константу прямой реакции k_+ из полученных данных рассчитать невозможно. Константа обратной реакции $k_- = 0,8 \pm 0,2$ с⁻¹ (среднее $\pm$ SD, $n = 4$).

Ключевые слова: Мембранозависимые реакции; Тромбоциты; Свертывание крови; Протромбин; Фосфатидилсерин.

Annotation

One of the main reactions of blood coagulation is membrane-dependent activation of prothrombin by the prothrombinase complex. There are at least two subpopulations of activated platelets that differ in their ability to interact with clotting factors and participate in membrane reactions. There are no systematic kinetic studies of the binding of prothrombin to the membranes of activated platelets, taking into account

their division into subpopulations.

In this work, the interaction of prothrombin with activated platelets was quantified. It was shown that prothrombin was predominantly bound to the phosphatidylserine-positive platelet subpopulation. Additional parameters for communication with software components: $K_d = 1.4 \pm 0.4$ μ M (average $\pm$ SD, $n = 3$) and 8500 ± 2500 binding sites on the platelet. It is impossible to calculate the the direct reaction constant k_+ from the received data. The the feedback constant is $k_- = 0,8 \pm 0,2$ s⁻¹ (average $\pm$ SD, $n = 4$).

Key words: Membrane-dependent reactions; Platelets; Blood coagulation; Prothrombin; Phosphatidylserine.

Введение

Свертывание крови представляет собой каскад ферментативных реакций, регулирующих образование фибриновой сети и остановку кровотечения в результате повреждения сосудов. Однако только незначительная часть реакций свертывания происходит в самой плазме крови. Все основные процессы на самом деле являются двумерными реакциями, локализованными на мембранах активированных тромбоцитов, эндотелиальных клеток или поврежденного субэндотелия, либо микрочастиц, выделяемых этими клетками [1, 2].

Стимуляция тромбоцитов мощными агонистами, такими как тромбин или коллаген, приводит к выставлению фосфатидилсерина на внешний слой клеточной мембраны у части тромбоцитов [3, 4]. По-видимому, основной функцией фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов является поддержание реакции плазменного свертывания. В ряде работ

было показано, что факторы свертывания преимущественно связываются именно с фосфатидилсерин-положительными тромбоцитами [3, 5–8]. И именно на поверхности этих тромбоцитов происходят основные реакции плазменного свертывания. До сих пор до конца не ясно, чем обусловлена такая сильная зависимость большинства 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 двумерное 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 [1, 2]. Еще одно объяснение заключается в том, что белки свертывания в связанном с тромбоцитами состоянии не вымываются из тромбоцитарного тромба и не уносятся потоком крови[9].

Первый наиболее важный шаг любой мембранной реакции – это непосредственно связывание белка с мембраной. В нескольких исследованиях сообщалось о скоростях и параметрах связывания для ассоциации протромбина с очищенными фосфолипидными мембранами [10–12]. Тем не менее, механизм этого связывания, как это ни парадоксально, никогда не изучался подробно, а данные о связывании с естественными активированными мембранами тромбоцитов ограничены.

В рамках данной работы было исследовано взаимодействие протромбина с мембранами субпопуляций активированных тромбоцитов с использованием проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Материалы и Методы

Материалы

В работе были использованы следующие реагенты: пробирки вакуумные VACUETTE с натрия цитратом 3,2% (Greiner Bio-One, Кремс-мюнстер, Австрия); простагландин E₁ (PGE₁) (MP Biochemicals, Ирвин, США); тромбин (Haematologic Technologies, Колчестер, США); кальциевый зонд Fura Red; краситель кальцеин; краситель Alexa647 (Molecular Probes, США); протромбин (Enzyme Research Laboratories, Саут-Бенд, Индиана, США). Если не указано иного, то был использован реагент производства Sigma-

Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США.

Методы

Выделение тромбоцитов из цельной крови.

Цельную кровь у здоровых доноров набирали в вакуумные пробирки Vacuette, содержащие 3,2% цитрат натрия. В кровь добавляли простагландин E₁ (PGE₁) (1 мкМ) и апиразу (3 ед./мл) после чего центрифугировали при комнатной температуре при 100g в течение 8 минут. После завершения центрифугирования цельной крови отбирали богатую тромбоцитами плазму, в которую, для предотвращения агрегации клеток, добавляли раствор цитрата натрия (106 мМ, pH 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, pH 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 с красителем Fura Red (2 мкМ) 30 минут при комнатной температуре в присутствии простагландина E₁ (3 мкМ). Активацию клеток проводили тромбином (100 нМ здесь и далее указана концентрация активных сайтов фермента) в течение 15 минут при комнатной температуре в присутствии CaCl₂ (2,5 мМ).

Конъюгирование протромбина с флуоресцентной меткой.

Перед конъюгацией с флуоресцентным красителем проводили диализ протромбина при +40С в течение 2 часов против фосфатного буфера (pH 7,3-7,4) с использованием диализных мембран с размером пор 3,5 кДа. В качестве флуоресцентной метки использовали краситель Alexa647. Реакцию проводили в бикарбонатном буфере (0,1 М; pH 9,0) при +40С в течение 2 часов при постоянном перемешивании. Молярное отношение красителя к белку в реакционной смеси составляло 5. Реакцию останавливали добавлением избытка гидроксилламингидрохлорида (30 мМ, pH 8,5). Очистку от непрореагировавшей флуоресцентной метки проводили гель-хроматографией на Сефадексе G-25. Во всех полученных конъюгатах молярное соотношение краситель/белок составляло 2-3 к 1. Оценку активности полученных конъюгатов проводили с помощью клоттинговых тестов. Во всех случаях активность протромбина была более 80%.

Оценка образования агрегатов в процессе активации тромбоцитов.

Для исключения агрегатов из анализа

связывания протромбина с активированными тромбоцитами, тромбоциты перед проведением гель-хроматографии были разделены на два образца. Один образец тромбоцитов перед хроматографией инкубировали с красителем Fura Red (2 мкМ) 30 минут при комнатной температуре в присутствии простагландина E1 (3 мкМ). Второй образец инкубировали с красителем кальцеин-AM (50 нМ) 30 минут при 37°C в присутствии простагландина E1 (3 мкМ). После инкубации с красителями проводили гель-хроматографию полученных образцов на сефарозе CL-2B. Затем образцы тромбоцитов, загруженные Fura Red и кальцеин-AM смешивали в соотношении 1:1, активировали тромбином (100 нМ) и использовали для исследования связывания протромбина. Агрегаты определяли, как двойные позитивные события по Fura Red и кальцеин-AM (рисунок 1B, агрегаты выделены синим), и исключали из дальнейшего рассмотрения.

Равновесное связывание протромбина с активированными тромбоцитами.

Активированные тромбином (100 нМ) тромбоциты (5×10^4 кл./мкл) в присутствии CaCl_2 (2,5 мМ) инкубировали в течение 20 минут с флуоресцентно меченым протромбином (Alexa647-ФII) в различных концентрациях. Затем суспензию клеток анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США). Две субпопуляции активированных тромбоцитов отличаются по концентрации внутриклеточного кальция, которую можно визуализировать с помощью красителя Fura Red. Субпопуляция с высокой концентрацией внутриклеточного кальция, что соответствует низкому сигналу флуоресценции красителя Fura Red, экспонирует фосфатидилсерин на внешнем слое мембраны [13]. Поэтому в данной работе регион FC-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. Пересчет интенсивности флуоресценции в количество молекул протромбина на тромбоцит было проведено согласно методике, описанной в [14].

Исследование кинетики взаимодействия протромбина с активированными тромбоцитами.

К активированному тромбином (100 нМ) тромбоцитам (5×10^4 кл./мкл) добавляли Alexa647-ФII (1400 нМ). Суспензию клеток анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США) в моменты времени 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20 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 и диссоциации аппроксимировали экспоненциальной моделью.

Микроскопическое исследование распределения протромбина на мембране активированных тромбоцитов.

Очищенные 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 (5×10^4 кл./мкл), выделенные из крови доноров с использованием гель-фильтрации для очистки от белков плазмы крови, активировали тромбином (100 нМ) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем, активированные тромбоциты инкубировали с Alexa647-ФII (60 нМ) в присутствии CaCl_2 2,5 мМ в течение 5 минут. 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).

Результаты

Суспензию активированных тромбином (100 нМ) тромбоцитов анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния, США). Тромбоциты отделяли от возможно присутствующих в суспензии других клеток крови и микровезикул по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, характеризующим размер клеток и их гранулярность (Рисунок 1A). Как видно из рисунка 1B после активации тромбином (100 нМ) можно выделить две субпопуляции тромбоцитов, отличающиеся по концентрации внутриклеточного кальция (визуализирована с помощью красителя FuraRed) и по способности связывать факторы свертывания, в частности протромбин. FC-положительная субпопуляция тромбоцитов (показана зеленым на рисунке 1B) характеризуется высокой внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} , что соответствует низкой флуоресценции FuraRed (краситель FuraRed является инвертированным). Следует отметить, что в регионе, соответствующем FC-отрицательной субпопуляции тромбоцитов (показан красным на рисунке 1B), наблюдается небольшая популяция клеток с довольно высоким связыванием протромбина (показана синим на рисунке 1B). Так как даже такое небольшое количество клеток в регионе FC-отрицательных тромбоцитов может существенно

искажить результаты была предпринята попытка разобраться в причине такого высокого связывания протромбина.

В первую очередь была проверена гипотеза, что данные события с высоким связыванием протромбина соответствуют агрегатам ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Для этого часть тромбоцитов как описано выше была загружена красителем FuraRed, а часть тромбоцитов загружена кальцеином. Затем тромбоциты с FuraRed и кальцеином были смешаны в соотношении 1:1, активированы тромбином (100 нМ) и проинкубированы с Alexa647-ФII. На рисунке 1В красным показана популяция тромбоцитов, окрашенных только красителем FuraRed, зеленым – популяция тромбоцитов, окрашенных только кальцеином. Как видно из рисунка есть небольшая популяция событий, окрашенных сразу обоими красителями (показано синим рисунок 1В), это указывает на то, что данные события соответствуют агрегатам ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов и они должны быть исключены из анализа связывания протромбина с субпопуляцией ФС-отрицательных тромбоцитов. Как видно на рисунке 1Г исключение из рассмотрения событий, окрашенных кальцеином, снижает количество событий, с высоким связыванием протромбина, в регионе ФС-отрицательных тромбоцитов.

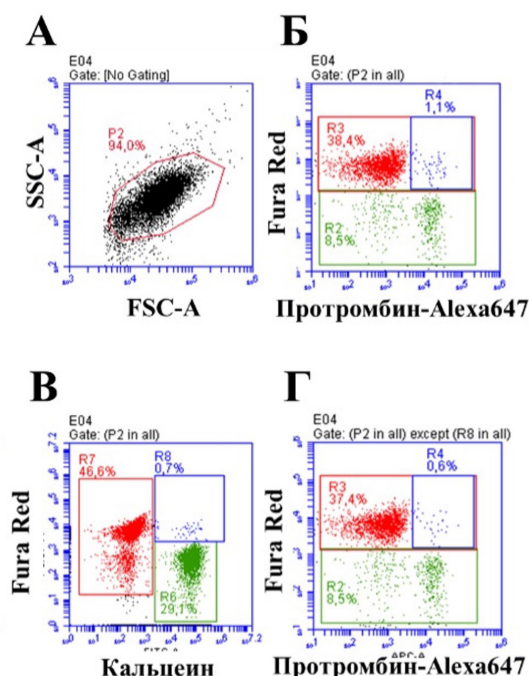


Рисунок 1. Связывание протромбина с субпопуляцией активированных тромбоцитов. На рисунке приведены типичные точечные диаграммы. А – выделение региона тромбоцитов по прямому и боковому светорассеянию. Б – связывание протромбина с популяциями активированных тромбоцитов до исключения из рассмотрения агрегатов ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Зеленым показана субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов, красным – ФС-отрицательных тромбоцитов, синим – события с высоким связыванием протромбина в

регионе ФС-отрицательных тромбоцитов. В – выделение агрегатов ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Зеленым показаны тромбоциты, окрашенные кальцеином, красным – окрашенные FuraRed, синим – события окрашенные и кальцеином, и FuraRed. Г – связывание протромбина с популяциями активированных тромбоцитов после исключения из рассмотрения агрегатов ФС-положительных и ФС-отрицательных тромбоцитов. Зеленым показана субпопуляция ФС-положительных тромбоцитов, красным – ФС-отрицательных тромбоцитов, синим – события с высоким связыванием протромбина в регионе ФС-отрицательных тромбоцитов. Представлены результаты типичного эксперимента из трех, проведенных с кровью разных доноров.

Из литературы известно, что связывание витамин К-зависимых факторов свертывания с ФС-положительными тромбоцитами зависит от Ca^{2+} и невозможно в его отсутствии. Однако, при добавлении хелатирующего агента ЭДТА часть фактора остается связанным с тромбоцитами. Связывание с ФС-отрицательной субпопуляцией тромбоцитов, обычно не зависит от Ca^{2+} и сопоставимо с количеством фактора, оставшегося на мембране тромбоцитов в присутствии ЭДТА. Было сделано предположение, что Ca^{2+} -независимое связывание факторов свертывания с активированными тромбоцитами обусловлено взаимодействием флуорофора, а не самого фактора с мембраной тромбоцитов. Для проверки данной гипотезы был проведен эксперимент с активированными тромбоцитами, когда вместо Alexa647-ФII был добавлен только флуорофор Alexa647 в концентрациях, соответствующих концентрациям в пробе с Alexa647-ФII. На рисунке 2 видно, что сигнал от Alexa647-ФII, связавшегося с тромбоцитами в присутствии ЭДТА сопоставим с сигналом от чистого флуорофора. Это подтверждает нашу гипотезу, что связывание протромбина с активированными тромбоцитами в присутствии ЭДТА обусловлено флуорофором. В дальнейшем сигнал от связывания протромбина в присутствии ЭДТА вычитался из общей интенсивности флуоресценции Alexa647-ФII, связанного с тромбоцитами.

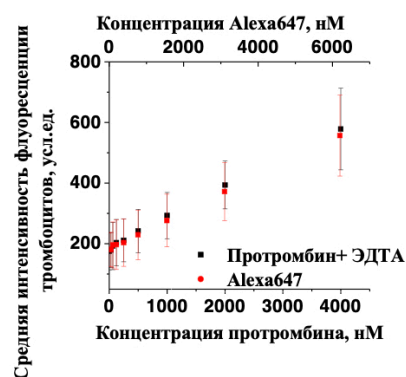


Рисунок 2. Неспецифическое взаимодействие флуорофора с активированными тромбоцитами. Черным цветом показано связывание протромбина-Alexa647 с активированными тромбоцитами в присутствии ЭДТА. Красным показано взаимодействие флуорофора Alexa647 активированными тромбоцитами.

Как видно из рисунка 3А, субпопуляции тромбоцитов сильно отличаются по своей способности связывать Alexa647-ФII. Весь протромбин связывается с ФС-положительной субпопуляцией, а связывание с ФС-отрицательной находится на фоновом уровне. Средние параметры связывания рассчитывали из трех независимых экспериментов. Кривые связывания для отдельных экспериментов аппроксимировали стандартной односайтовой моделью связывания. Полученные параметры связывания протромбина с ФС-положительными тромбоцитами: $K_d = 1,4 \pm 0,4$ мкМ (среднее $\pm$ SD, $n = 3$) и 8500 ± 2500 сайтов связывания на тромбоцит.

Исследование кинетики связывания протромбина с активированными тромбоцитами проводили при концентрации 1,4 мкМ. Как видно из рисунка 3Б после добавления Alexa647-ФII происходит резкое увеличение флуоресценции тромбоцитов, что свидетельствует о связывании факторов с мембраной. Это связывание достигает своего насыщения уже через 5 минут после добавления протромбина. Экспериментальные данные были аппроксимированы использованием нелинейного метода наименьших квадратов в предположении экспоненциальной зависимости. Константу прямой реакции k_+ из полученных данных рассчитать невозможно. Константа обратной реакции $k_- = 0,8 \pm 0,2$ с⁻¹ (среднее $\pm$ SD, $n = 4$).

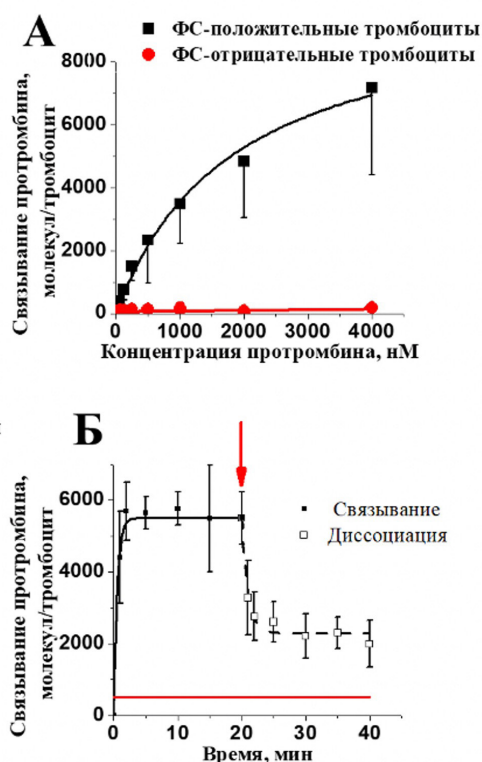


Рисунок 3. Связывание протромбина с субпопуляцией активированных тромбоцитов. А — равновесное связывание с ФС-положительными (черная кривая) и ФС-отрицательными (красная кривая) тромбоцитами. Связывание оценивали методом проточной цитометрии. На графике приведены средние $\pm$ SD ($n=3$). Б — кинетика

связывания и диссоциации протромбина-Alexa647 с фосфатидилсерин положительными тромбоцитами. Связывание протромбина-Alexa647 анализировали с помощью проточного цитометра в моменты времени: 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20 минут после добавления белка. После достижения насыщения, образцы разводили в 20 раз буфером Тироде с CaCl_2 (2,5 мМ), для анализа диссоциации белка. На графиках приведены средние $\pm$ SD ($n=4$).

Следует отметить, что наблюдаемая после разбавления в 20 раз диссоциация протромбина 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 белка. Вторая стадия медленная, диссоциирует значительно меньшее количество протромбина. При этом, как видно из рисунка 3Б, достигается плато, которое находится значительно выше, чем можно было бы предположить из экспериментов по равновесному связыванию с той же концентрацией свободного фактора (красная прямая на рисунке 3Б).

Нами было изучено распределение Alexa647-ФII на мембранах активированных тромбоцитов. Как видно на рисунке 4 ФС-отрицательные тромбоциты, не связывающие Alexa647-ФII, образуют ламеллиподии и распластываются по поверхности покровного стекла, покрытого фибриногеном. В то же время ФС-положительные тромбоциты, связывающие Alexa647-ФII, характеризуются шарообразной формой.

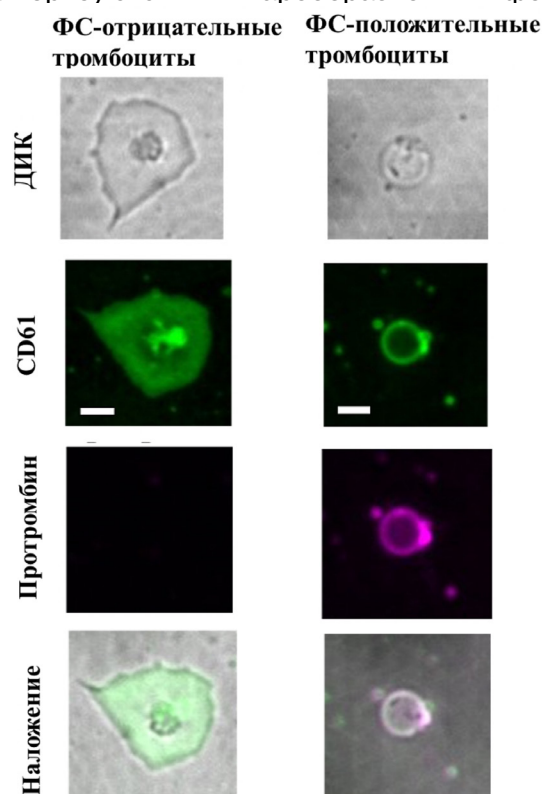


Рисунок 4. Распределение флуоресцентно меченного протромбина на мембране активированных тромбоцитов. Типичные микрофотографии активированных тромбоцитов. Зеленым показана флуоресценция CD61-ФИТЦ, пурпурным — флуоресценция Alexa647-ФII. В первом ряду показаны ФС-отрицательные тромбоциты, во втором

ФС-положительные. Приведенный масштаб соответствует 3 мкм. средние $\pm$ SD (n=3). Б - кинетика

При этом на поверхности ФС-положительных тромбоцитов выделяется небольшая область, с которой связывается в несколько раз больше протромбина, чем со всей остальной мембраной тромбоцита [9, 15].

Обсуждение результатов

Одним из главных результатов данного исследования является то, что связывание протромбина с фосфолипидными мембранами является сложным процессом, что следует из неполной диссоциации протромбина с мембраны ФС-положительных тромбоцитов. Ранее уже сообщалось о сложной кинетике ассоциации и диссоциации протромбина с искусственными фосфолипидными мембранами [16, 17]. Авторы этих работ объясняют двухступенчатую диссоциацию белка с фосфолипидной мембраны возможными конформационными изменениями в молекуле протромбина, которые приводят к более плотному связыванию с мембраной и изменению константы диссоциации [18–20]. Мы не можем исключить конформационные изменения в молекуле протромбина, как одну из причин сложной кинетики ассоциации и диссоциации. Однако, основываясь на своих предыдущих данных по связыванию факторов X, Ха и IXa [7, 8] предлагаем в качестве объяснения неполной диссоциации протромбина его возможную олигомеризацию при взаимодействии с фосфолипидной мембраной. Тем более для протромбина напрямую показана такая возможность [21].

Кроме рассмотренных выше данных в литературе есть данные о двухступенчатой диссоциации фактора VIII с фосфолипидной мембраны [22, 23]. Интересно, что связанный с мембраной фактор VIII также может представлять собой димер [24]. Также было показано, что есть две фракции мембраносвязанного аннексина V, что обусловлено его олигомеризацией на мембране [25, 26]. Однако стоит помнить, что аннексин V не является фактором свертывания крови.

Таким образом, существует две фракции связанного с мембраной протромбина, отличающиеся по своей способности к диссоциации. В реальных тромбах это явление может предотвращать вымывание белка потоком. Стоит отметить, что необходимы дальнейшие исследования механизмов взаимодействия протромбина с субпопуляции активированных тромбоцитов и, возможно, искусственными фосфолипидными везикулами для того, чтобы более полно охарактеризовать данный феномен. 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.

Вклад авторов

ПАС эксперименты, редактирование. СИО эксперименты. НАП эксперименты, обработка данных, написание и редактирование. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи».

Финансирование

Работа поддержана грантом РНФ № 23-75-10120.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 2001;85:958–65.
2. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin. Thromb. Hemost.* 2006;32 Suppl 1:32–38.10.1055/s-2006-939552.
3. Panteleev MA, Ananyeva NM, Greco NJ, Ataullakhanov FI, Saenko EL. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3:2545–53.10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x.
4. Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM, Kalafatis M, Swords NA, et al. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2005;25:861–66.10.1161/01.ATV.0000155987.26583.9b.
5. London FS, Marcinkiewicz M, Walsh PN. A subpopulation of platelets responds to thrombin- or SFLRN-stimulation with binding sites for factor IXa. *J. Biol. Chem.* 2004;279:19854–59.10.1074/jbc.M310624200.
6. Kempton CL, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:861–66.10.1161/01.ATV.0000155987.26583.9b.
7. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kurasawa JH, et al. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016;1858:1216–27.10.1016/j.bbamem.2016.02.008.
8. Soloveva PA, Podoplelova NA, Panteleev MA. Binding of coagulation factor IXa to procoagulant platelets revisited: Low affinity and interactions with other factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2024;720:150099.10.1016/J.BBRC.2024.150099.
9. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, Eckly A, Receveur N, Nechipurenko DY, et al. Coagulation factors bound to procoagulant

- platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*. 2016;128:1745–5510.1182/blood-2016-02-696898.
10. Lu Y, Nelsestuen GL. Dynamic features of prothrombin interaction with phospholipid vesicles of different size and composition: Implications for protein-membrane contact. *Biochemistry*. 1996;35:8193–20010.1021/BI960280O.
 11. Lu Y, Nelsestuen GL. The Prothrombinase Reaction: “Mechanism Switching” between Michaelis–Menten and Non-Michaelis–Menten Behaviors†. *Biochemistry*. 1996;35:8201–0910.1021/BI960281G.
 12. Kuharsky AL, Fogelson AL. Surface-mediated control of blood coagulation: The role of binding site densities and platelet deposition. *Biophys. J.* 2001;80:1050–7410.1016/S0006-3495(01)76085-7/ASSET/7F902F68-A160-411B-A648-CE16A3B759A0/MAIN.ASSETS/GR12.GIF.
 13. Obydennyy SI, Sveshnikova AN, Ataullakhanov FI, Panteleev MA. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14:1867–8110.1111/jth.13395.
 14. Podoplelova N, Soloveva P, Dasgupta AG, Filkova A, Panteleev M. Analyzing the Interaction of Fluorescent-Labeled Proteins with Artificial Phospholipid Microvesicles using Quantitative Flow Cytometry. *J. Vis. Exp.* 202210.3791/63459.
 15. Abaeva AA, Canault M, Kotova YN, Obydennyy SI, Yakimenko AO, Podoplelova NA, et al. Procoagulant Platelets Form an alpha-Granule Protein-covered ‘Cap’ on Their Surface That Promotes Their Attachment to Aggregates. *J. Biol. Chem.* 2013;288:29621–3210.1074/jbc.M113.474163.
 16. Smith E, Vekaria R, Brown KA, Longstaff C. Kinetic regulation of the binding of prothrombin to phospholipid membranes. *Mol. Cell. Biochem.* 2013;382:193–20110.1007/S11010-013-1735-2/FIGURES/4.
 17. Houston DF, Timson DJ. Interaction of prothrombin with a phospholipid surface: Evidence for a membrane-induced conformational change. *Mol. Cell. Biochem.* 2011;348:109–1510.1007/S11010-010-0644-X/FIGURES/4.
 18. Wu JR, Lentz BR. Fourier transform infrared spectroscopic study of Ca²⁺ and membrane-induced secondary structural changes in bovine prothrombin and prothrombin fragment 1. 10.1016/S0006-3495(91)82031-8.
 19. Hof M. Picosecond tryptophan fluorescence of membrane-bound prothrombin fragment 1. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1998;1388:143–5310.1016/S0167-4838(98)00174-5.
 20. Wu JR, Lentz BR. Phospholipid-specific conformational changes in human prothrombin upon binding to procoagulant acidic lipid membranes. *Thromb. Haemost.* 1994;71:596–60410.1055/S-0038-1642489/ID/JR_7/BIB.
 21. Anderson PJ. A dimeric form of prothrombin on membrane surfaces. *Biochem. J.* 1998;336 (Pt 3):631–3810.1042/BJ3360631.
 22. Gilbert GE, Furie BC, Furie B. Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 1990;265:815–22.
 23. Bardelle C, Furie B, Furie BC, Gilbert GE. Membrane binding kinetics of factor VIII indicate a complex binding process. *J. Biol. Chem.* 1993;268:8815–24.
 24. Dalm D, Galaz-Montoya JG, Miller JL, Grushin K, Villalobos A, Koyfman AY, et al. Dimeric Organization of Blood Coagulation Factor VIII bound to Lipid Nanotubes. *Sci. Rep.* 2015;5:1121210.1038/srep11212.
 25. Oling F, Bergsma-Schutter W, Brisson A. Trimers, dimers of trimers, and trimers of trimers are common building blocks of annexin a5 two-dimensional crystals. *J. Struct. Biol.* 2001;133:55–6310.1006/jsbi.2000.4337.
 26. Richter RP, Him JLK, Tessier B, Tessier C, Brisson AR. On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophys. J.* 2005;89:3372–8510.1529/biophysj.105.064337.