

**СВЯЗЫВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ С ФИБРИНОМ
В ПРОЦЕССЕ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

© Р. М. Набиуллина,¹ А. Р. Мухитов,² Р. И. Литвинов,³
Л. Д. Зубаирова¹

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
E-mail: nabiullina.rosa@yandex.ru;

² Казанский институт биохимии и биофизики Казанского
научного центра РАН, Казань, Россия

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Исследовано прямое влияние микровезикул крови на процесс формирования и структуру фибриновых сгустков. Параллельно изучены сгустки, сформированные из бестромбоцитарной плазмы крови человека, и плазмы, обедненной микровезикулами путем фильтрации, до и после добавления фосфолипидов. Образование фибрина инициировалось тромбином без ионов кальция для исключения образования эндогенного тромбина и связанных с этим не прямых кинетических эффектов микровезикул. В присутствии микровезикул и экзогенных фосфолипидов наблюдалось снижение оптической плотности, а следовательно, и изменение структуры сгустков по сравнению со сгустками в отсутствие микровезикул. Сканирующая электронная и конфокальная микроскопия показали, что сгустки, образованные из бестромбоцитарной плазмы, в отличие от плазмы, обедненной микровезикулами, содержали CD61-позитивные зернистые образования размером 0.1—0.5 мкм, связанные с волокнами и идентичные частицам на фильтре, использованном для отделения микровезикул. Результаты свидетельствуют о связывании микровезикул тромбоцитарного происхождения с фибрином. Обнаруженное взаимодействие клеточных микровезикул с фибрином лежит в основе ранее не известной роли микровезикул в гемостазе и тромбозе как компонентов и модуляторов структуры фибринового сгустка.

Ключевые слова: клеточные микровезикулы, фибрин, свертывание крови.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 102. № 5. С. 000—000. 2016

R. M. Nabiullina,¹ A. R. Mukhitov,² R. I. Litvinov,³ L. D. Zubairova.¹ BINDING OF CELL-DERIVED MICROPARTICLES WITH FIBRIN IN BLOOD CLOTTING. ¹ Kazan State Medical University, Kazan, Russia, e-mail: nabiullina.rosa@yandex.ru; ² Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center, Russian Academy of Science, Kazan, Russia; ³ Kazan Federal University, Kazan, Russia.

Direct effects of circulating blood microparticles on fibrin formation and structure were studied. Clots made from platelet-free plasma and from microparticle-depleted plasma obtained by filtration was studied in parallel, including clots from the microparticle-depleted plasma replenished with phospholipids. Fibrin formation was induced by exogenous thrombin without Ca²⁺ to prevent formation of endogenous thrombin and exclude indirect kinetic effects of microparticles related to thrombin generation. In the presence of natural microparticles or exogenous phospholi-

pids the maximal turbidity of fibrin clots was significantly smaller, indicating structural distinctions from the clots formed in the absence of microparticles. Scanning electron microscopy and confocal microscopy showed that clots formed from platelet-free plasma, i. e. in the presence of microparticles, unlike clots from the microparticle-depleted plasma, contained 0.1-0.5- μ m-large CD61-positive granules associated with fibrin fibers that were identical to the particles found on the surface of filters used for microparticle removal. The results show that platelet-derived microparticles bind to fibrin and affect its structure. The revealed interactions of cell-derived microparticles with fibrin highlight a previously unknown role of microparticles in hemostasis and thrombosis as constituents and modulators of a fibrin clot structure.

Key words: cell-derived microparticles, fibrin, blood clotting.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 102. N 5. P. 000—000. 2016

Фибрин — конечный продукт свертывания крови, составляет структурную основу гемостатического сгустка или тромба. Результатом полимеризации фибрина и его ковалентной сшивки под действием фактора XIIIa является формирование фибриновых волокон в виде разветвленной трехмерной сети, обеспечивающей механическую прочность сгустков и тромбов [15]. Структура волокон фибриновой сети варьирует под влиянием различных факторов: активности тромбина, pH, концентрации ионов кальция, концентрации фибриногена, включения в состав фибрина белков и липидов плазмы [8, 14], клеток крови [5] и других физических и биохимических воздействий.

Кроме растворенных веществ и клеток в крови содержатся субклеточные структуры — микровезикулы (МВ), представляющие собой белково-фосфолипидные пузырьки размером 0.1—1 мкм, которые «отшнуровываются» от наружной клеточной мембраны в ходе активации и апоптоза клеток крови и эндотелиоцитов. Известно участие МВ в инициации свертывания крови, благодаря экспрессии на их поверхности тканевого фактора — основного триггера коагуляционного каскада, и распространении генерации тромбина за счет отрицательно заряженных мембранных фосфолипидов, являющихся матрицей для сборки прокоагулянтных ферментных комплексов [10]. Остается открытым вопрос о том, в какой мере циркулирующие МВ крови вовлечены в завершающий этап гемокоагуляции — формирование фибринового сгустка. Нами было показано, что МВ оказывают косвенное кинетическое влияние на структуру фибрина и его стабильность, обусловленное ускорением образования тромбина в присутствии МВ [1]. В настоящей работе исследована гипотеза о том, что влияние МВ на строение и свойства фибрина не ограничивается тромбин-опосредованным кинетическим механизмом, но может также быть прямым, т. е. за счет их непосредственного связывания с фибрином в процессе его образования.

МЕТОДИКА

Бестромбоцитарная плазма (БТП), обедненная МВ плазма (ОМП) и обедненная МВ плазма с добавлением кефалина (ОМП-К). Индивидуальные образцы цитратной крови от 19 здоровых доноров центрифугировали дважды при 1500g по 15 мин для отделения эритроцитов и лейкоцитов и далее при 10000g 5 мин для осаждения тромбоцитов и получения БТП. Для удаления МВ и получения ОМП БТП пропускали через фильтр с размером пор 0.1 мкм (EMD Millipore, США). В качестве положительного контроля восстанавливали уровень фосфолипидов в ОМП добавлением взвеси кефалина (Технология-Стандарт, Россия) в конечной концентрации 300 мкг/мл (ОМП-К). В каждом опыте параллельно исследовали родственные образцы свежей плазмы, БТП, ОМП и ОМП-К, полученные от одного донора.

Подсчет МВ в образцах плазмы крови. Общее количество МВ определяли методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur («Becton Dickinson»),

США). Абсолютную концентрацию МВ определяли по светорассеянию, регистрируя количество событий за единицу времени с учетом скорости потока [9]. Цитометрический анализ распределения частиц по размеру (FSC) и гранулярности (SSC) позволяет локализовать сигналы МВ в определенной зоне, соответствующей частицам размером менее 1 мкм. Для калибровки прибора и ограничения области подсчета МВ использовали стандартные синтетические сферические частицы с диаметром 1, 2, 3, 5, 6 и 10 мкм («BD Pharmingen», США).

Изучение полимеризации фибрина методом динамической турбидиметрии. Свертывание плазмы крови инициировали в кювете спектрофотометра (Perkin-Elmer Lambda 25, Molecular Devices) путем добавления α -тромбина (HYPHEN BioMed, Франция) в конечной концентрации 0.1 ЕД/мл без ионов кальция. Формирование сгустка регистрировали по увеличению оптической плотности образца вследствие образования нерастворимого геля из растворимого фибриногена. Регистрацию проводили при длине волны 350 нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм при 37 °С. При анализе турбидиметрической кривой определяли следующие параметры: лаг-период (Lag), соответствующий времени генерации тромбина и образования протофибрилл; скорость полимеризации (V) — повышение оптической плотности на отрезке ее нарастания в единицу времени, которая характеризует скорость латеральной агрегации протофибрилл и формирования волокон фибрина; максимальную оптическую плотность при данной длине волны (A_{350}), определяемую количеством полимеризованного белка и толщиной фибриновых волокон.

Исследование сгустков и фильтров методом сканирующей электронной микроскопии. Фибриновые сгустки, полученные путем рекальцификации БТП, ОМП и ОМП-К, а также фильтры, использованные для удаления МВ из плазмы, отмывали 0.05 М раствором каодилята натрия, содержащим 0.1 М NaCl (pH 7.4), фиксировали в 2%-ном глутаровом альдегиде, обезвоживали в этаноле от 30 до 100 %, фиксировали гексаметилдисилазаном (HMDS, Sigma-Aldrich, США), после чего напыляли слой золота с палладием (Polaron, e5100 sputter coater, Quorum Technologies, Великобритания) [4]. Образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе Quanta 250 (FEI, США). Размеры частиц на фильтрах и на волокнах фибрина (500 частиц в трех различных сгустках или фильтрах) измеряли с использованием программы Adobe Photoshop CS6.

Исследование сгустков и фильтров методом конфокальной микроскопии. После рекальцификации БТП или ОМП раствором хлорида кальция (24 ммоль/л) при температуре 37 °С сгустки формировались в течение 30 мин; отмывались в течение 30 мин фосфатным буфером; фиксировались 2%-ным глутаровым альдегидом 2 ч при комнатной температуре; инкубировались в 1М растворе этаноламина 10 ч при 4 °С. Для обнаружения частиц тромбоцитарного происхождения сгустки окрашивались добавлением моноклональных антител к $\beta 3$ субъединице (CD61) тромбоцитарных интегринов $\alpha IIb\beta 3$ и $\alpha V\beta 3$, меченных Alexa-647 («BioLegend», США). После инкубации в темноте в течение 30 мин сгустки фибрина анализировались при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM780 (Carl Zeiss, Германия). На фильтры, использованные для удаления МВ из плазмы, наносили FITC-меченные анти-CD61-антитела с последующей конфокальной микроскопией. Для исключения неспецифической флуоресценции сгустки инкубировали с мечеными флуорофором отрицательным изотипическим контролем.

Обработка и статистический анализ данных. Статистический анализ проводили с использованием пакетов программ Excel и BioStat. Достоверность различия средних определялась с помощью парного t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Контроль удаления МВ из плазмы крови. С целью выявления роли МВ в образовании фибрина фосфолипидные частицы удалялись из плазмы крови путем фильтрации через фильтр с размером пор 0.1 мкм, что соответствует нижней границе диаметра МВ. В результате фильтрации были получены образцы обедненной МВ (ОМП), которые сравнивались с теми же образцами до фильтрации (БТП). Сравнительная проточная цитометрия парных образцов БТП и ОМП ($n = 7$), полученных из крови тех же доноров, показала высокую эффективность фильтрации. Количество МВ в исходной БТП составило $6.8 \pm 1.3 \times 10^7/\text{мл}$, тогда как в ОМП — $0.9 \pm 0.4 \times 10^7/\text{мл}$ ($p < 0.0001$, $n = 7$), т. е. при фильтрации удалялось ~90 % МВ, определяемых на проточном цитометре. Чтобы исключить возможность удаления фибриногена и его высокомолекулярных производных при фильтрации, в БТП и ОМП определяли концентрацию коагулируемого фибриногена; его уровень в плазме до и после фильтрации достоверно не отличался и составил соответственно 3.14 ± 0.21 г/л и 3.0 ± 0.22 г/л ($p > 0.05$, $n = 7$).

Влияние МВ на кинетику образования и оптические свойства фибрина под действием экзогенного тромбина. Для определения влияния МВ на формирование фибринового сгустка, методом динамической турбидиметрии параллельно исследовали 3 родственных образца плазмы: исходную плазму, содержащую МВ (БТП); фильтрованную плазму, обедненную МВ (ОМП); ту же фильтрованную плазму с добавлением фосфолипидных частиц в виде кефалина (ОМП-К). Чтобы исключить опосредованные кинетические эффекты МВ, обусловленные их влиянием на образование тромбина, динамику образования фибрина изучали после свертывания плазмы экзогенным тромбином без добавления ионов кальция, что исключало генерацию эндогенного тромбина. Параметры турбидиметрии БТП и ОМП отличались: максимальная оптическая плотность сгустков БТП была достоверно ниже, чем сгустка ОМП ($p < 0.05$, $n = 6$); в то же время удаление МВ не сопровождалось изменением лаг-периода и скорости полимеризации ($p > 0.05$, $n = 6$), (см. таблицу). При внесении в ОМП фосфолипидов происходило снижение максимальной оптической плотности по сравнению с ОМП до исходных уровней, соответствующих параметрам БТП (см. таблицу). Это свидетельствует о том, что при исключении кинетического эффекта МВ, опосредованного образованием тромбина с их участием, сохраняется влияние МВ на оптические свойства сгустка. Такое же влияние на оптическую плотность сгустка оказывают и экзогенные фосфолипиды.

Визуализация МВ в фибриновом сгустке. Подсчет МВ в плазме до образования сгустка и сыворотке после свертывания в образцах БТП и ОМП методом проточной цитометрии показал снижение количества МВ и в БТП ($7.1 \pm 1.1 \times 10^7/\text{мл}$ и $3.9 \pm 0.9 \times 10^7/\text{мл}$), и в ОМП ($0.8 \pm 0.2 \times 10^7/\text{мл}$ и $0.5 \pm 0.1 \times 10^7/\text{мл}$). Это давало основание предполагать, что МВ вовлекаются в состав

Влияние микровезикул на турбидиметрические параметры при индукции свертывания тромбином без кальция

Параметры турбидиметрии	БТП	ОМП	ОМП-К
Lag (мин)	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.008
V (единицы ОП/с) $\times 10^{-3}$	0.04 ± 0.001	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.001
Amax (единицы ОП)	0.42 ± 0.02	$0.48 \pm 0.005^*$	0.44 ± 0.002

Примечание. ОП — оптическая плотность, БТП — бестромбоцитарная плазма, ОМП — обедненная МВ плазма, ОМП-К — обедненная МВ плазма с добавлением кефалина. Достоверность различий по сравнению с БТП и ОМП-К, $*p < 0.05$.

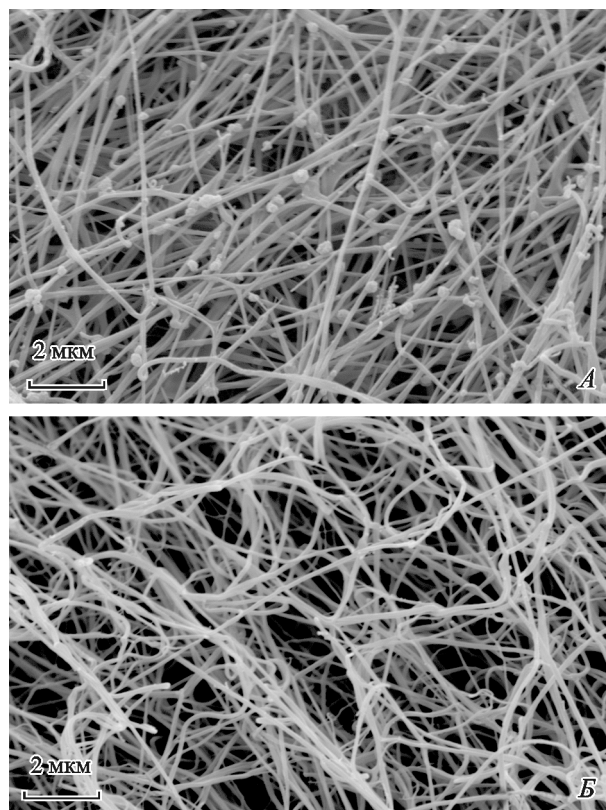


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия сгустков. Шероховатая структура волокон сгустков БТП (А), гладкие волокна сгустков ОМП (Б).

сгустка. Для прямого подтверждения взаимодействия МВ с фибрином мы предприняли эксперименты по их визуализации на волокнах фибрина.

При сканирующей электронной микроскопии сгустков обращало на себя внимание наличие множественных зернистых образований на поверхности волокон фибрина, сформированного в присутствии МВ в сгустках из БТП (рис. 1, А). В то же время волокна фибрина в сгустках из ОМП, т. е. сформированные в отсутствие МВ, были гладкими, без признаков зернистости (рис. 1, Б). Фибриновые сгустки, сформированные из ОМП-К в присутствии экзогенных фосфолипидов, напоминали сгустки БТП, а именно: волокна фибрина имели шероховатую структуру, хотя зернистость была выражена меньше, чем в сгустках из БТП.

Гранулярный материал, ассоциированный с волокнами фибрина (рис. 2, А), был исследован методом сканирующей электронной микроскопии в сравнении с частицами на поверхности фильтров, использованных для отделения МВ от плазмы. Как на фибрине, так и на поверхности фильтров мы наблюдали сходные зернистые образования, часть которых была агрегирована (рис. 2, В). Диаметр частиц на волокнах фибрина варьировал от 0.1 до 0.5 мкм с двумя характерными пиками в области 0.1 и 0.3 мкм (рис. 2, Б), что соответствовало распределению размеров частиц на фильтрах, использованных для удаления МВ из БТП (рис. 2, Г).

Обнаружение МВ тромбоцитарного происхождения в составе фибрина. Конфокальная микроскопия сгустков и фильтров при окраске мечеными антителами к CD61 выявила следующее: на снимках сгустков из БТП наблюдались све-

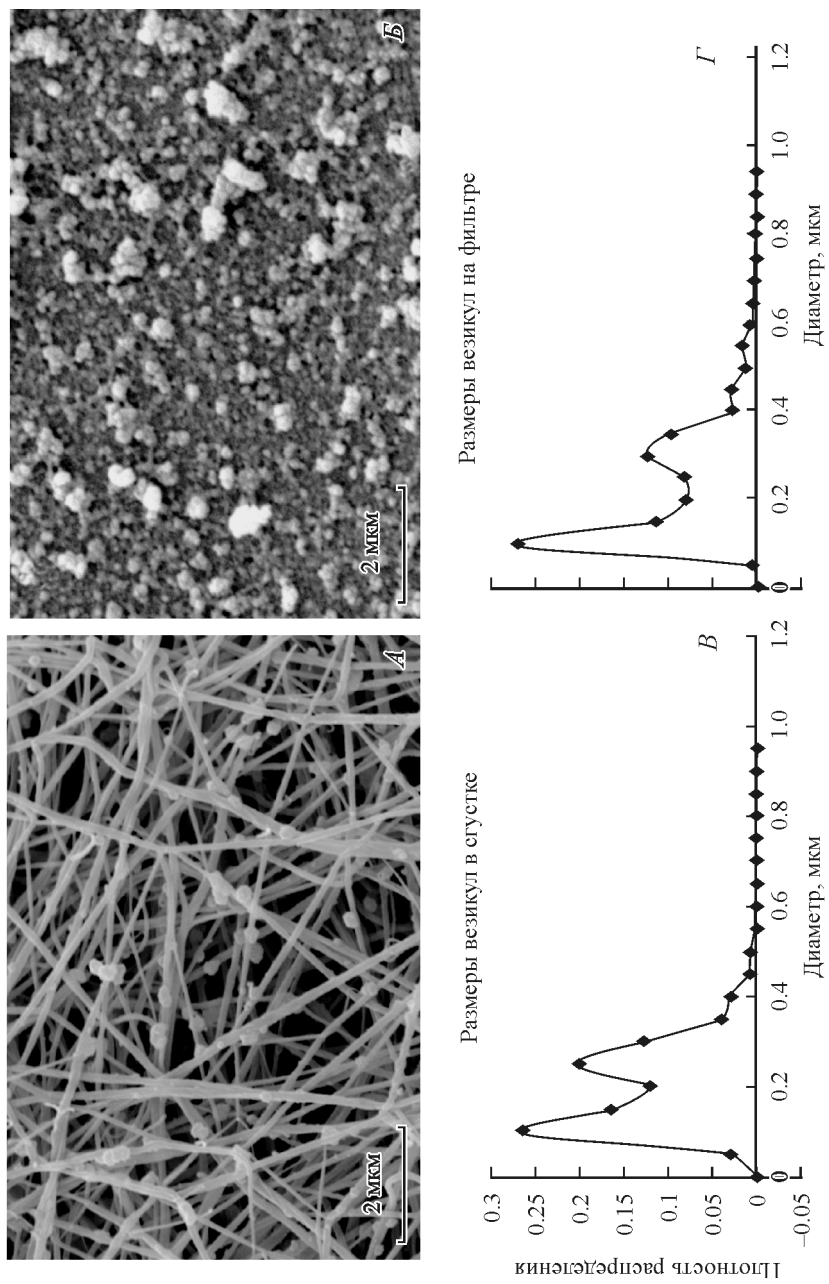


Рис. 2. Результаты визуализации микровезикул методом сканирующей микроскопии: *A* — в составе фибринового сгустка; *B* — на фильтре, использованных для удаления микровезикул. *B*, *Г* — расчет размеров везикул.

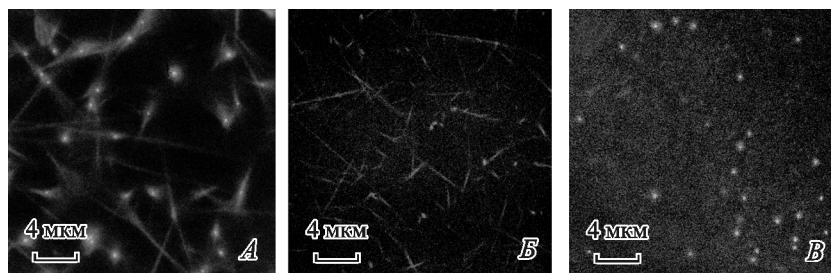


Рис. 3. Результаты визуализации микровезикул методом конфокальной микроскопии: *A* — в составе фибринового сгустка, сформированного из БТП; *Б* — в составе фибринового сгустка, сформированного из ОМП; *В* — на фильтрах, использованных для удаления микровезикул.

тящиеся точки размером менее 1 мкм, ассоциированные с фибриновыми волокнами (рис. 3, *A*), тогда как на сгустках из ОМП подобных структур практически не наблюдалось (рис. 3, *Б*). Обнаруженные частицы отличались по величине от флюоресцирующих тромбоцитов, имевших существенно большие размеры в контрольных сгустках из богатой тромбоцитами плазмы. Аналогичные светящиеся образования обнаруживались на поверхности фильтров, использованных для удаления МВ из плазмы (рис. 3, *В*). Другими словами, гранулярный материал, связанный с фибрином, имеет тромбоцитарное происхождение и идентичен тромбоцитарным МВ, которые отделялись при фильтрации плазмы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе исследован вопрос о новой гемостатической функции клеточных МВ крови, а именно: их роль как модулятора гемокоагуляции на ее конечном этапе — формировании фибринового сгустка. Ранее было показано, что МВ, благодаря их участию в генерации активного тромбина [2], оказывают кинетическое, опосредованное тромбином влияние на фибринообразование, структуру и устойчивость сгустка к лизису [1]. В то же время, поскольку свойства сгустка изменяются при включении в его состав компонентов крови, мы предположили, что влияние МВ может быть не только опосредованным, но и прямым за счет их связывания с фибрином.

Эффект МВ определяли по разнице структуры и свойств фибрина до и после удаления МВ из плазмы фильтрацией. Для оценки влияния МВ сравнили кинетику полимеризации фибрина при инициации свертывания плазмы тромбином без добавления экзогенного кальция, что исключало образование эндогенного тромбина и возможность непрямого кинетического эффекта МВ. При активации свертывания добавлением тромбина наблюдалось достоверное различие максимальной оптической плотности сгустков фибрина в присутствии и в отсутствие МВ. Восполнение удаленных фосфолипидов путем добавления к ОМП кефалина (ОМП-К) сопровождалось восстановлением оптической плотности сгустка до уровня исходной БТП.

Таким образом, результаты турбидиметрического исследования после добавления тромбина извне свидетельствовали о прямом вмешательстве МВ в структуру сгустка, независимо от их функции матрицы для активации прокоагулянтных ферментных комплексов. Подтверждением этого вывода явились эксперименты по визуализации МВ в составе сгустка. Подсчет числа МВ в плазме до и после образования сгустка в образцах БТП показал, что в среднем около половины (45 %) МВ предположительно включается в состав сгустка. На этом основа-

нии сгустки, полученные из БТП и ОМП, а также фильтры, использованные для удаления МВ, были исследованы микроскопически с целью прямой визуализации МВ.

Сканирующая электронная микроскопия сгустков БТП, т. е. образованных в присутствии МВ, выявила зернистый материал, ассоциированный с волокнами фибрина. При этом распределение размеров частиц на фибрине соответствовало размерам частиц на фильтрах, примененным для удаления МВ из БТП и составляли от 0,1 до 0,5 микрон. Сравнимую оценку размеров МВ дают и другие авторы [7, 12]. Эти данные позволяют заключить, что шаровидные частицы, связанные с фибрином, представляют собой МВ.

Поскольку наиболее многочисленной популяцией МВ в крови здоровых людей являются частицы, образующиеся из тромбоцитов [3], мы исследовали сгустки методом иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии для подтверждения клеточного (тромбоцитарного) происхождения материала, осаждаемого на фибрине. При окраске сгустков из БТП мечеными антителами к CD61 ($\beta 3$ субъединица тромбоцитарных интегринов $\alpha \text{IIb}\beta 3$ и $\alpha \text{V}\beta 3$) выявлены светящиеся точки размером менее 1 мкм, ассоциированные с фибриновыми волокнами; в сгустках из ОМП их количество существенно ниже. Полученные результаты указывают на то, что частицы, ассоциированные с фибрином, имеют тромбоцитарное происхождение. Похожие по размеру частицы, реагирующие с анти-CD61-антителами, обнаруживались и на фильтрах, применяемых для удаления МВ из плазмы. Таким образом, эти эксперименты однозначно указывают на присутствие тромбоцитарных МВ в составе фибрина.

Взаимодействия МВ с фибриногеном/фибрином по своей физической природе могут быть, по меньшей мере, двух типов: связывание через фосфолипидный компонент или с участием интегриновых рецепторов, которые сохраняются на поверхности тромбоцитарных МВ, отделившихся от плазматической мембраны родительской клетки. Поскольку при восполнении удаленных фосфолипидов в ОМП происходила коррекция оптической плотности сгустка, вероятно, именно фосфолипиды МВ обеспечивают их взаимодействие с фибрином. Наряду с интегрин-опосредованным взаимодействием МВ с фибриногеном/фибрином связывание белков с бислоем фосфолипидов может быть обусловлено электрическим зарядом полярной головки липидной молекулы (электростатические взаимодействия), а также структурой ламеллярной фазы слоя липидов (гидрофобные взаимодействия) [13]. Детали механизма и (пато)физиологических последствий прямого связывания МВ с фибрином, обнаруженного нами, требуют дальнейшего изучения.

Независимо от характера взаимодействия МВ с фибриногеном/фибрином, прямое влияние на структуру, а следовательно и на свойства фибринового сгустка представляет собой новый, впервые выявленный нами механизм тромбогенности этих субклеточных образований. Значение и роль МВ как модуляторов образования, структуры и свойств фибрина может существенно возрастать при заболеваниях, сопровождающихся многократным увеличением числа МВ в крови и осложняющихся тромбозом [6, 11],

Таким образом, важным компонентом гемокоагуляционной активности циркулирующих в крови МВ является их влияние на финальный этап свертывания крови — образование фибрина. Более оптически плотная структура сгустков в присутствии МВ крови обусловлена не только их косвенным влиянием через образование тромбина, но и прямым взаимодействием этих частиц с фибрином.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и правительства Республики Татарстан в рамках научного проекта № 15-44-02230 и государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Набиуллина Р. М., Мустафин И. Г., Атауллаханов Ф. И., Литвинов Р. И., Зубаирова Л. Д. Опосредованное тромбином влияние микровезикул крови на кинетику образования, структуру и стабильность фибринового сгустка Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 101 (7) : 812—821. 2015.
- [2] Berckmans R. J., Nieuwland R., Boing A. N., Romijn F. P., Hack C. E., Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 85 (4) : 639—646. 2001.
- [3] Boilard E., Duchez A. C., Brisson A. The diversity of platelet microparticles. *Curr. Opin. Hematol.* 22 (5) : 437—44. 2015.
- [4] Brown A. E. X., Litvinov R. I., Discher D. E., Purohit P. K., Weizel J. W. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science*. 325 (5941): 741—744. 2009.
- [5] Campbell R. A., Overmyer K. A., Bagnell C. R., Wolberg A. S. Cellular procoagulant activity dictates clot structure and stability as a function of distance from the cell surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (12) : 2247—2254. 2008.
- [6] Cui Y., Zheng L., Jiang M., Jia R., Zhan X., Quan Q., Du G., Shen D., Zhao X., Sun W., Xu H., Huang L. Circulating microparticles in patients with coronary heart disease and its correlation with interleukin-6 and C-reactive protein. *Mol. Biol. Rep.* 40 (11) : 6437—6442. 2013.
- [7] Doeuvre, L., Plawinski, L., Goux, D., Vivien, D. & Angles-Cano, E. Plasmin on adherent cells: from microvesiculation to apoptosis. *Biochem. J.* 432 : 365—373. 2010.
- [8] Galanakis D. K. Anticoagulant albumin fragments that bind to fibrinogen/fibrin: Possible implications. *Sem. Thromb Hemost.* 18 : 44—52. 1992.
- [9] Iversen L. V., Ostergaard O., Nielsen C. T., Jacobsen S., Heegaard N. H. A heparin-based method for flow cytometric analysis of microparticles directly from platelet-poor plasma in calcium containing buffer. *J. Immunol. Methods*. 388 (1—2) : 49—59. 2013.
- [10] Lacroix R., Dubois C., Leroyer A. S., Sabatier F., Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 11 (1) : 24—35. 2013.
- [11] Marchetti M., Tartari C. J., Russo L., Panova-Noeva M., Leuzzi A., Rambaldi A., Finazzi G., Woodhams B., Falanga A. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *Am. J. Hematol.* 89 (1) : 68—73. 2014.
- [12] Peramo A., Diaz J. A. Physical characterization of mouse deep vein thrombosis derived microparticles by differential filtration with nanopore filters. *Membranes*. 2 : 1—15. 2012.
- [13] Surewicz W. K., Epand R. M., Pownall H. J., Hui S. W. Human apolipoprotein A-1 forms thermally stable complexes with anionic but not with zwitterionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 261: 16191—16197. 1986.
- [14] Varadi B., Kolev K., Tenekedijev K., Meszaros G., Kovalszky I., Lonstaff C., Machovich R. Phospholipid barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gel-phase crystalline structure. *J. Biol. Chem.* 279 (38) : 39863—39871. 2004.
- [15] Weisel J. W., Litvinov R. I. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*. 121 (10) : 1712—1719. 2013.

Поступила 26 II 2015