

АДСОРБЦИЯ ФИБРИНОГЕНА НА ЛИПИДНОЙ ПОВЕРХНОСТИ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ФИБРИНООБРАЗОВАНИЯ

© 2021 г. Д.А. Файзуллин*, Ю.А. Валиуллина*, В.В. Сальников*, Ю.Ф. Зуев*

*Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН»,
420111, Казань, ул. Лобачевского 2/31

E-mail: dfaizullin@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.06.2020 г.

Принята к публикации 26.10.2020 г.

Установлено, что ферменты каскада коагуляции взаимодействуют с липидными микрочастицами или микровезикулами природного или искусственного происхождения, циркулирующими в крови. Такие взаимодействия могут модулировать гемостаз. Менее известно о последствиях прямого взаимодействия фибриногена/фибрина с микровезикулами. С использованием очищенных систем в работе показано, что присутствие в растворе липидных частиц различного состава может оказывать специфическое влияние на кинетику полимеризации фибрина. Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие, что эти эффекты являются следствием адсорбции фибриногена на поверхности микровезикул. В частности, показано, что адсорбция фибриногена в достаточно высокой концентрации приводит к ускорению индуцированной тромбином полимеризации фибрина, благодаря локальному концентрирующему эффекту и включению микровезикул в структуру сгустка. Таким образом, непосредственное взаимодействие фибриногена с микровезикулами представляет собой существенный фактор гемостаза, который следует учитывать при анализе нарушения свертывания крови и разработке искусственных липидных носителей лекарственных препаратов.

Ключевые слова: липиды, фибрин, адсорбция, коагуляция.

DOI: 10.31857/S0006302921010099

Фибриноген является ключевым участником системы гемостаза. Для поддержания коагуляционного равновесия значение имеют как концентрация фибриногена в крови, так и его активность. Известно, что одним из компонентов крови, который оказывает существенное влияние на свертывание крови, являются липиды. Липиды в кровотоке представлены в форме липопротеинов высокой и низкой плотности и в виде микровезикул, которые отшнуровываются от наружной клеточной мембраны в ходе активации и апоптоза клеток крови и эндотелиоцитов. Микровезикулы окружены фосфолипидной мембраной и характеризуются размерами приблизительно от 30–100 нм (экзосомы) до 1 мкм (клеточные микровезикулы) и больше (апоптотические тела и частицы липидных отложений). Основную популяцию циркулирующих в крови микровезикул образуют тромбоцитарные микровезикулы, выделяемые в кровотоки при активации тромбоцитов. Установ-

лено, что микровезикулы крови могут влиять на фибринообразование, структуру и устойчивость сгустка к лизису благодаря их участию в генерации активного тромбина и плазмينا [1–5]. Вместе с тем имеются данные, что влияние тромбоцитарных микровезикул 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 [3, 6–12].

Помимо естественно циркулирующих в крови липидных микровезикул, на гемостаз могут влиять также искусственные липидные частицы, применяемые в качестве носителей лекарств [13–15] или заменителей тромбоцитов [16]. Имеются данные, что липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина обладают прокоагулянтной активностью, значительно превышающей активность других тромбоцитарных липидов [7].

Одной из причин изменения свертывающих свойств фибриногена может быть его адсорбция на поверхности липидных частиц [17–19], поскольку вторичная и третичная структура и ориентация молекул относительно поверхности вли-

Сокращения: ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, ПОФГ – 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерин), ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин.

яют на доступность молекул фибриногена для тромбина [20–23]. В свою очередь, изменение динамики полимеризации фибрина приводит к вариациям его пористости, толщины и разветвленности волокон [24], определяющих механическую устойчивость, проницаемость и скорость лизиса сгустка [25, 26].

В настоящей работе методами турбидиметрии и инфракрасной спектроскопии, а также микровесовым методом изучена адсорбция фибриногена на поверхности липидных бислоев из дипальмитоилфосфатидилхолина и бинарных липидных смесей и обсуждаются факторы, влияющие на способность фибриногена к свертыванию в этих условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибриноген из плазмы быка (Calbiochem, Германия) растворяли в воде, после чего переводили в буфер (20 мМ трис; 150 мМ NaCl, pH 7,4), используя колонки Zeba 7 kDa (ThermoFisher, USA). Концентрацию белка определяли, принимая коэффициент экстинкции равным $E_{280\text{нм}}^{1\%} = 15,1$. Формирование сгустка инициировали введением тромбина из плазмы быка (Sigma, США).

В качестве липидной компоненты использовали липосомы, приготовленные из следующих фосфолипидов: яичного лецитина (Sigma, США), 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ДПФХ) (Sigma, США), 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерина) (ПОФГ) и 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) (Avanti, США). Навески липидов растворяли в хлороформе, выпаривали под вакуумом и разводили в буфере. Суспензию кефалина («Технология–стандарт», Россия) готовили в соответствии с рекомендациями изготовителя. Полученные грубые липидные дисперсии подвергали нескольким циклам замораживания при температуре жидкого азота и оттаивания при 55°C. Липосомы получали методом экструзии через поликарбонатные фильтры с размером пор 100 нм (Avanti, США) при 55°C.

Измерение сорбции фибриногена на пленках липидов проводили с помощью кварцевых микровесов QCM-200 (Stanford Research Systems, США). Использовали кварцевые резонаторы на 5 МГц с золотым покрытием. Исследуемые растворы липидов (1 мг/мл) в смеси хлороформ/этанол (95 : 5 по объему) наносили на поверхность электрода кварцевого резонатора и сушили при комнатной температуре. Полноту удаления растворителей контролировали по постоянству частоты колебания резонатора. По изменению частоты колебаний резонатора до и после нанесения вещества судили о массе образовавшейся

пленки: $\Delta M = -\Delta F/Cf$, где ΔF – наблюдаемое изменение частоты в Гц; ΔM – изменение массы на единицу площади, в мкг/см²; Cf – коэффициент чувствительности кристалла (56.6 Гц · мкг⁻¹ · см²). Толщину пленки липида оценивали, используя значение удельного объема для ДПФХ, равное 0.94 см³/г [27]. Толщина пленок липидов варьировала в пределах 100 ÷ 200 нм. Затем погружали открытую резонаторную ячейку с высушенной пленкой липида в буферный раствор при 60°C в течение 60 мин для гидратации и формирования однородного слоя [28, 29]. После уравнивания и охлаждения вносили аликвоты стокового раствора фибриногена, последовательно увеличивая его концентрацию. Измеряли изменение частоты колебаний, пропорциональное массе сорбированного фибриногена. Все измерения проводили в идентичных условиях при температуре 25°C.

Кинетику полимеризации фибрина изучали методом турбидиметрии [30]. В кювете спектрофотометра Lambda 25 (Perkin-Elmer, США) с толщиной оптического слоя 1 см смешивали раствор фибриногена и буферный раствор (контроль) или раствор, содержащий липосомы, в соотношении 1 : 1 по объему. Смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C, после чего вносили тромбин. Конечные концентрации фибриногена и тромбина составляли 1 мг/мл и 0.26 ед/мл, соответственно. Концентрация липидов – 1.0 или 0.5 мг/мл. Формирование сгустка регистрировали по увеличению оптической плотности образца на длине волны 350 нм. Максимальную скорость роста рассеяния и длительность лаг-периода определяли по графику первой производной от турбидиметрической кривой.

Инфракрасные спектры регистрировали на спектрофотометре IR Affinity1 (Shimadzu, Япония) на приставке нарушенного полного внутреннего отражения с кристаллом ZnSe в качестве измерительного элемента. Спектральное разрешение 8 см⁻¹, число накоплений 512. Суспензии свободных липосом и липосом с фибриногеном пропускали через проточную микрокювету, смонтированную на кристалле приставки нарушенного полного внутреннего отражения. Адсорбцию липосом на поверхности измерительного элемента регистрировали по росту интенсивности полосы поглощения эфирных карбониллов 1730 см⁻¹ до завершения кинетики. Неадсорбированные липосомы удаляли, пропуская раствор буфера. Кювету термостатировали при 37°C.

Для сканирующей электронной микроскопии на поверхность металлического (золотого) электрода кварцевого резонатора наносили раствор фибриногена, инкубировали при 37°C в течение 1 часа, ополаскивали буфером и наносили рас-

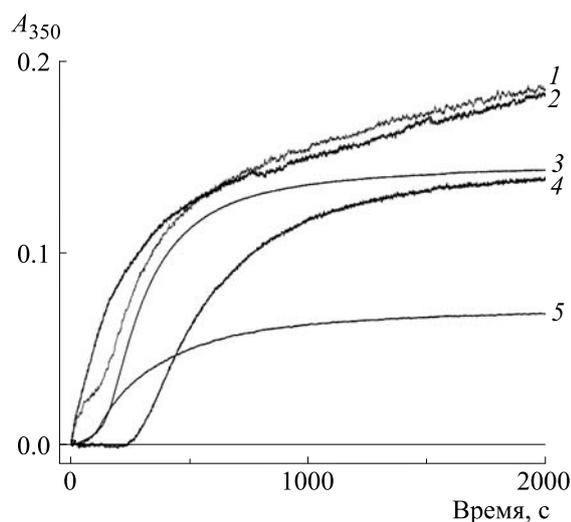


Рис. 1. Кинетика полимеризации фибриногена в суспензии липосом. Номера на кривых соответствуют: 1, 2 – ДПФХ, 3 – контроль без липида, 4 – ДПФХ + 20% ПОФХ, 5 – ДПФХ + 20% ПОФГ; 1, 4–5 – концентрация липида 1 мг/мл, 2 – 0.5 мг/мл. Концентрация фибриногена 1 мг/мл.

твор тромбина. Через 1 ч поверхность ополаскивали буфером и водой и высушивали на воздухе. Образующиеся структуры исследовали без предварительной металлизации на сканирующем микроскопе Merlin (Carl Zeiss, Германия) в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» КФУ (Казань).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика фибринообразования, отслеживаемая по росту светорассеяния в буфере и в суспензии липосом, приведена на рис. 1. На контрольной кривой без липидов (кривая 3 на рис. 1) рост рассеяния происходит с задержкой от момента

добавления тромбина. В течение этого времени, называемого лаг-периодом, происходит образование и рост коротких двухтяжевых протофибрилл. По достижении критического размера протофибрилл начинается быстрый рост рассеяния, обусловленный латеральной агрегацией протофибрилл и формированием относительно толстых многотяжевых нитей фибрина. От толщины нитей фибрина и пористости сгустка зависит уровень рассеяния на плато после завершения формирования фибрина [24]. Присутствие липидных частиц вызывает ряд эффектов в зависимости от химической природы липида (табл. 1). Наиболее выраженное воздействие оказывает ДПФХ: по сравнению с контролем наблюдается сокращение лаг-периода до нуля, некоторое увеличение начальной скорости и линейный рост рассеяния вместо выхода на плато после завершения полимеризации (кривая 1). Двукратное уменьшение концентрации липида усложняет зависимость: наблюдается как начальный резкий рост рассеяния, так и сокращенный по длительности участок лаг-периода (кривая 2). Добавление 20% ПОФГ в липосомы из ДПФХ существенно нивелирует воздействие последнего: увеличивается длительность лаг-периода и уменьшается начальная скорость, при этом существенно понижается уровень плато (кривая 5). Влияние таких липидов, как яичный лецитин и кефалин, минимально и заключается в небольших вариациях длительности лаг-периода и начальной скорости роста рассеяния (зависимости не приводятся). В смеси «ДПФХ + 20% ПОФХ» наблюдается существенное удлинение лаг-периода и уменьшение начальной скорости (кривая 4). Таким образом, присутствие липидных частиц влияет на все основные параметры кинетической кривой. Результатом является образование фибринового сгустка, морфологические характеристики которого

Таблица 1. Параметры кинетики фибринообразования в суспензиях липидов

Липид	Длительность лаг-периода, с	Максимальная скорость роста светорассеяния, с ⁻¹
Контроль без липида, фибриноген 1 мг/мл	55 ± 8	6.35e-4 ± 0.2
ДПФХ 1 мг/мл, фибриноген 1 мг/мл	0	6.95e-4 ± 0.4
ДПФХ 0,5 мг/мл, фибриноген 1 мг/мл	0	4.22e-4 ± 0.4
ДПФХ / 20% ПОФХ, фибриноген 1 мг/мл	207 ± 20	2.91e-4 ± 0.6
ДПФХ / 20% ПОФГ, фибриноген 1 мг/мл	82 ± 17	2.20e-4 ± 0.2
Яичный лецитин, фибриноген 1 мг/мл	61 ± 8	5.98e-4 ± 0.2
Кефалин, фибриноген 1 мг/мл	59 ± 6	

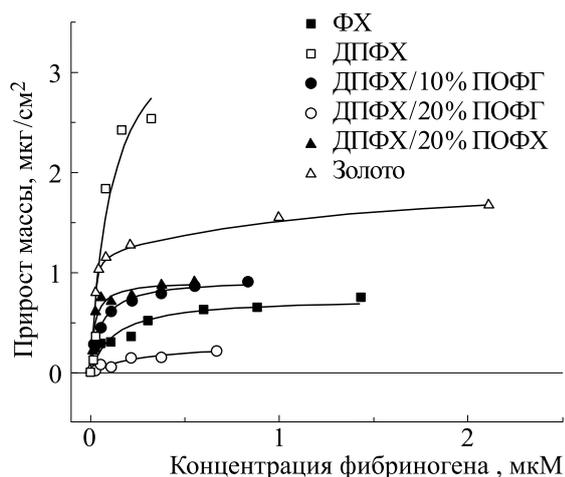


Рис. 2. Изотермы адсорбции фибриногена на иммобилизованных липидных бислоях и поверхности золотого электрода. Обозначения экспериментальных точек указаны на легенде. Зависимости аппроксимированы моделью Ленгмюра (сплошные линии).

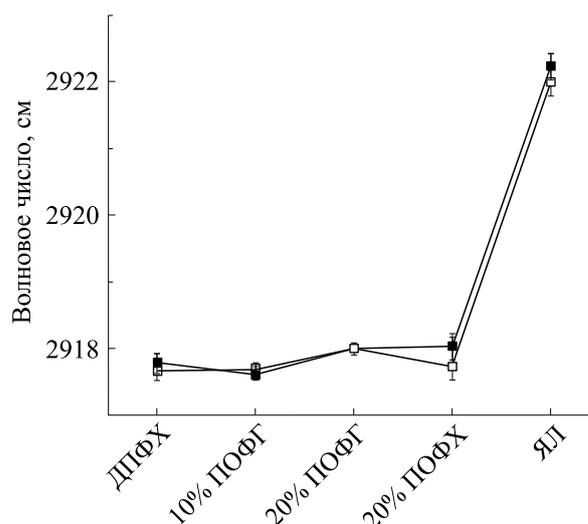


Рис. 3. Положение максимума полосы метиленовых групп липида в контроле (темные символы) и при адсорбции фибриногена (светлые символы).

видоизменяются в зависимости от химической структуры липидных частиц [3, 6].

Одной из возможных причин указанных явлений может быть адсорбция молекул фибриногена на поверхности липидных микрочастиц. Изображенные на рис. 2 изотермы сорбции фибриногена на плоских иммобилизованных липидных бислоях свидетельствуют, что фибриноген способен адсорбироваться на липидной поверхности, причем константа и предельная величина адсорбции зависят от химической структуры липида (табл. 1). Максимальную адсорбирующую способность по отношению к фибриногену имеет бислоем из ДПФХ – незаряженного липида с полностью насыщенными жирнокислотными остатками. Добавление к ДПФХ липидов, содержащих ненасыщенные жирнокислотные цепи или несущих отрицательный заряд, снижает сродство к фибриногену.

Взаимодействие фибриногена с липидным бислоем оценивали также на основании анализа инфракрасных спектров. Известно, что частота колебаний метиленовых групп имеет более низкое значение в бислоях с более упорядоченной структурой гидрофобного слоя [31]. Из данных на рис. 3 следует, что в бислое из ДПФХ валентное колебание метиленовых групп имеет частоту $2917.7 \pm 0.1 \text{ см}^{-1}$, что соответствует высокоупорядоченному состоянию жирнокислотных цепей. Добавление к ДПФХ 10% ПОФГ – отрицательно заряженного липида с одной ненасыщенной цепью – практически не сказывается на упорядоченности углеводородной части бислоя. Увеличение содержания ПОФГ до 20% приводит уже к заметному росту частоты, что указывает на

увеличение подвижности алифатических групп. Аналогичный эффект оказывает добавление 20% ПОФХ, нейтрального по заряду. Максимальную подвижность имеют гетерогенные по структуре жирнокислотные цепи яичного лецитина. Присутствие фибриногена не оказывает достоверного влияния на упорядоченность гидрофобной части бислоя, из чего можно заключить, что фибриноген не проникает глубоко в структуру бислоя, адсорбируясь на его внешней поверхности.

Состояние полярной области бислоя оценивали по спектрам фосфатных групп липидов. Полоса асимметричных валентных колебаний $\nu_{as} \text{PO}_2^-$ имеет двухкомпонентную структуру, образуемую расщеплением основного колебания при образовании водородной связи [32–34]. Величина расщепления зависит от силы водородной связи с окружением и для исследованных нами липидов определяется преимущественно гидратированностью фосфатной группы. Мы сопоставили величины предельной адсорбции фибриногена с интенсивностью расщепления фосфатной полосы (рис. 4). Данные свидетельствуют, что фибриноген проявляет меньшее сродство к липидам, у которых расщепление и, следовательно, гидратированность поверхности препятствует адсорбции. Ранее уже отмечалось, что низкое сродство фибриногена к липидам с ненасыщенными жирнокислотными остатками, в частности к яичному лецитину, может быть следствием высокой подвижности липидных молекул в бислое и гидратированности их полярных частей [35]. Известно, что при температурах выше точки плавления липидных структур одновременно с увеличением

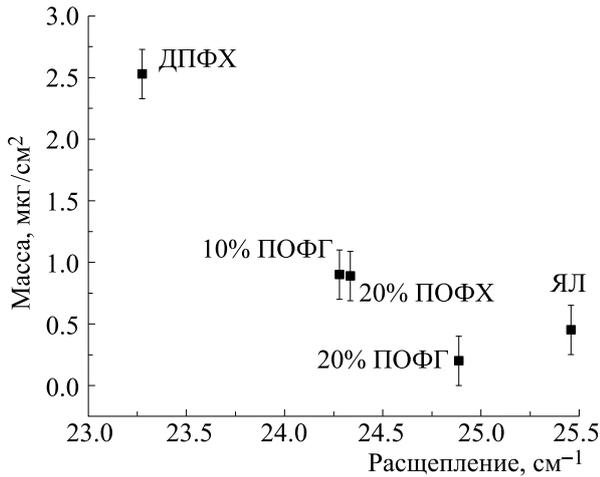


Рис. 4. Соотношение между величиной предельной адсорбции и величиной расщепления компонент полосы поглощения $\nu_{as}PO_2^-$ фосфатной группы липида.

подвижности возрастает и гидратация [36]. Из использованного набора липидов только ДПФХ при температуре $37^\circ C$ находится в высокоупорядоченном гелевом состоянии. Добавление к бислою из ДПФХ липидов, содержащих ненасыщенные жирнокислотные цепи, приводит к понижению температуры плавления, так что при $37^\circ C$ бислою находится в более подвижной жидкокристаллической конформации. Фибриноген интенсивно адсорбируется на наименее гидратированной поверхности жесткого бислоя из ДПФХ. В то же время наименьшим сродством фибриноген обладает к высокогидратированной поверхности рыхлого и подвижного бислоя яичного лецитина. Таким образом, различия в сорбционной способности изученных нами липидных бислоев по отношению к фибриногену в значительной мере определяются их гидратированностью.

Определенные выводы о структуре адсорбционных слоев фибриногена можно сделать, сопоставляя их механические (вязкоупругие) свойства с интенсивностью адсорбции. На рис. 5 приведены величины коэффициента потерь при возбуждении радиочастотных колебаний резонатора с нанесенной на его поверхность липидной пленкой в зависимости от массы адсорбированного фибриногена. При адсорбции фибриногена непосредственно на металлической поверхности резонатора коэффициент потерь, соответствующий начальному крутому участку изотермы (см. рис. 2), имеет небольшую величину и слабо зависит от массы, что характерно для плотных адсорбционных слоев, прочно связанных с поверхностью [37].

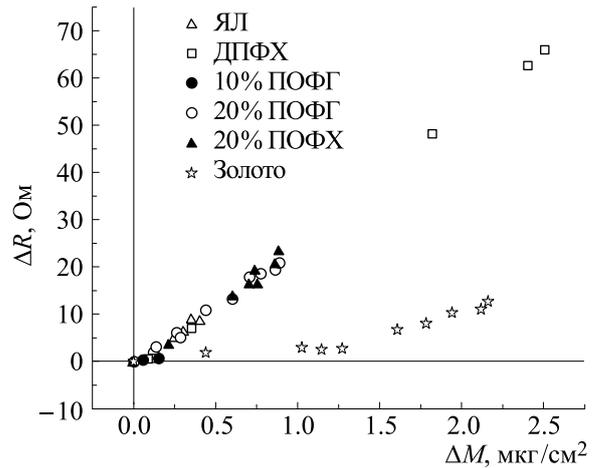


Рис. 5. Корреляции между приростом коэффициента потерь ΔR и массы ΔM при адсорбции фибриногена на иммобилизованных липидных бислоях. Обозначения экспериментальных точек указаны на легенде.

По достижении определенного уровня адсорбции, соответствующей выходу изотермы адсорбции на более пологий участок, зависимость потерь от массы адсорбированного белка усиливается, что указывает на формирование более рыхлого и гидратированного слоя [38]. Качественно сходный вид имеют и зависимости, полученные при адсорбции на бислоях липидов, с тем отличием, что начальный пологий участок имеет небольшую протяженность, а основная масса белка образует адсорбционный слой с высоким коэффициентом потерь, более рыхлый и вязкий по сравнению с адсорбцией на металле. Очевидно, что в рыхлом слое молекулы фибриногена более подвижны и доступны растворителю, что делает их также более доступными и действию тромбина. О том, что адсорбированный в виде рыхлого слоя фибриноген сохраняет способность к полимеризации, свидетельствуют результаты исследования методом атомно-силовой микроскопии поверхности адсорбированного фибриногена на металле после действия тромбина. При адсорбции из раствора с очень низкой концентрацией белка (0.01 мкМ), соответствующей начальному крутому участку изотермы адсорбции, образуется плотный слой фибриногена, не полимеризующийся под действием тромбина. В то же время фибриноген, адсорбированный из раствора с концентрацией 3 мкМ и образующий более толстые и рыхлые слои, под действием тромбина превращается в фибрин, формируя длинные волокна (рис. 6). Сходство вязкоупругих характеристик фибриногена, адсорбированного на золоте и на липидном бислое, позволяет предполагать структурное сходство адсорбционных слоев и сохранение коагуляционной способности фибриногена при адсорбции на липидной поверхности.

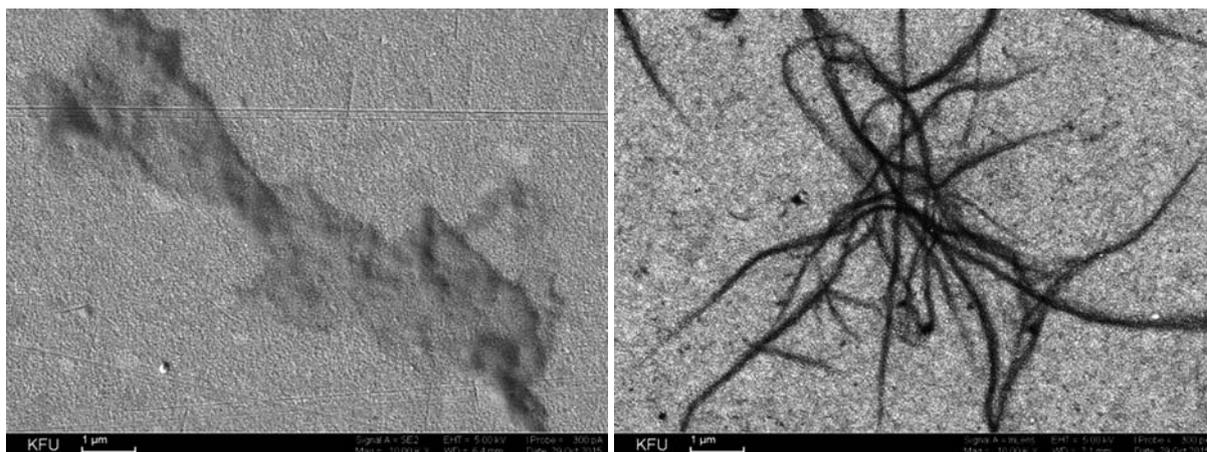


Рис. 6. Поверхность металлического золота после адсорбции фибриногена из раствора с концентрацией белка 4 мкг/мл (слева) и 1 мг/мл (справа) и обработки его тромбином. Изображение получено методом сканирующей электронной микроскопии.

Степень влияния адсорбированного фибриногена на формирование структуры объемного сгустка, таким образом, зависит от доли адсорбированного белка и в нашем случае максимальна для липосом из ДПФХ. Наличие прочно связанного с поверхностью фибриногена способствует удержанию и включению липидных частиц в состав фибриновой сети [2, 6].

Другим очевидным фактором, влияющим на пространственную структуру сгустка, является само присутствие в растворе объемных липидных частиц в достаточно высокой концентрации. При низкой доле адсорбированного фибриногена эффекты пространственного ограничения на диффузию и фибриллообразование начинают преобладать, что проявляется в виде увеличения

длительности лаг-периода и более медленного образования пространственной сети на примере липосом из ДПФХ/20% ПОФХ (рис. 1, кривая 4).

Довольно специфичной выглядит кинетика фибринообразования в суспензии с добавкой отрицательно заряженного ПОФГ (рис. 1, кривая 5). Низкий уровень рассеяния на плато обусловлен образованием более тонких фибрилл [6]. По-видимому, электростатические взаимодействия одноименно заряженных фибриногена и ПОФГ в объеме раствора также играют роль, модифицируя процесс фибриллообразования [39], однако конкретный механизм такого взаимодействия пока неясен и требует дальнейшего изучения.

Таблица 2. Параметры аппроксимации сорбционных зависимостей моделью Ленгмюра ($y = (kxA) / (1 + kx)$)

Липид	Значение	
Яичный лецитин	<i>A</i>	0.75 ± 0.06
	<i>k</i>	7.77 ± 2.33
ДПФХ	<i>A</i>	3.73 ± 0.82
	<i>k</i>	8.64 ± 4.61
ДПФХ/10%ПОФГ	<i>A</i>	0.93 ± 0.03
	<i>k</i>	17.63 ± 2.70
ДПФХ/20%ПОФГ	<i>A</i>	0.30 ± 0.07
	<i>k</i>	3.48 ± 1.72
ДПФХ/20%ПОФХ	<i>A</i>	0.91 ± 0.06
	<i>k</i>	45.22 ± 14.26

ВЫВОДЫ

Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что особенности кинетики полимеризации фибриногена в суспензии липосом могут быть в значительной мере обусловлены реактивностью белка, адсорбированного на поверхности липосом. Адсорбция максимальна на поверхности бислоя из ДПФХ и уменьшается при добавлении липидов с ненасыщенными жирнокислотными остатками или несущих отрицательный заряд, что связано с ростом гидратированности поверхности. Фибриноген адсорбируется в виде рыхлого гидратированного слоя, сохраняя способность к коагуляции под действием тромбина. Участие адсорбированного фибриногена в коагуляции проявляется в сокращении лаг-периода и увеличении скорости фибринообразования, что позволяет охарактеризовать такой белок, как более тромбогенный.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования с применением сканирующей электронной микроскопии выполнены в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» Казанского федерального университета (Казань).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- R. M. Nabiullina, D. A. Faizullin, C. Nagaswami, et al., *Blood* **124**, 2807 (2014).
- Р. М. Набиуллина, И. Г. Мустафин, Ю. Ф. Зуев и др., *Докл. РАН* **562** (1), 111 (2015).
- L. D. Zubairova, R. M. Nabiullina, C. Nagaswami, et al., *Sci. Rep.* **5**, 1 (2015).
- M. T. Cunningham, B. A. Citron, and T. A. Koerner, *Thrombosis Res.* **95**, 325 (1999).
- V. Váradi, K. Kolev, K. Tenekedjiev, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 39863 (2004).
- Д. Р. Бакирова, Д. А. Файзуллин, Ю. А. Валиуллина и др., *Бюлл. эксперим. биологии и медицины* **163** (6), 687 (2017).
- A. M. Galán, M. R. Hernández, J. Bozzo, et al., *Transfusion* **38** (11–12), 1004 (1998).
- B. Alving, *Transfusion* **38** (11–12), 997 (1998).
- M. R. Hernández, P. Urbán, E. Casals, et al., *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2339 (2012).
- N. Amabile, C. Guignabert, D. Montani, et al., *Eur. Respir. J.* **42** (1), 272 (2013).
- F. Kunz, W. D. Zwierzina, and H. Hörtnagl, *Atherosclerosis* **49** (2), 195 (1983).
- M. F. Matus, C. Vilos, B. A. Cisterna, et al., *Vasc. Pharmacol.* **101**, 1 (2018).
- A. S. Jakate, C. M. Einhaus, A. P. DeAnglis et al., *Cancer Res.* **63** (21), 7314 (2003).
- A. Tanka-Salamon, A. Bóta, A. Wacha, et al., *BioMed Res. Int.* **2017**, 5130495 (2017).
- Y. Hu, C. Wu, C. Zhu, et al., *Int. J. Pharm.* **552**, 319 (2018).
- M. Shukla, U. D. Sekhon, V. Betapudi, et al., *J. Thromb. Haemost.* **15** (2), 375 (2017).
- Yu. F. Zuev, R. I. Litvinov, A. E. Sitnitsky, et al., *J. Phys. Chem. B* **121**, 7833 (2017).
- T. Ueda, D. Murakami, and M. Tanaka, *Front. Chem.* **6**, 542 (2018).
- K. Sankaranarayanan, *Biointerphases* **10**, 021009 (2015).
- B. C. Cook and G. S. Retzinger, *J. Colloid Interface Sci.* **162** (1), 171 (1994).
- G. S. Retzinger, B. C. Cook, A. P. DeAnglis, *J. Colloid Interface Sci.* **168**, 514 (1994).
- Z. Adamczyk, J. Barbasz, and M. Cieśla, *Langmuir* **27**, 6868 (2011).
- L. Zhang, B. Casey, D. K. Galanakis, et al., *Acta Biomater.* **54**, 164 (2017).
- J. W. Weisel and C. Nagaswami, *Biophys. J.* **63**, 111 (1992).
- T. Sugo, H. Endo, M. Matsuda, et al., *J. Thromb. Haemost.* **4**, 1738 (2006).
- J. W. Weisel and R. I. Litvinov, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **6**, 161 (2008).
- A. I. Greenwood, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, *Chem. Phys. Lipid.* **143**(1–2), 1 (2006).
- Y. Okahata and H. Ebato, *Anal. Chem.* **63**, 203 (1991).
- S. R. Tabaei, J.-H. Choi, G. H. Zan, et al., *Langmuir* **30**(34), 10363 (2014).
- R. R. Hantgan and J. Hermans, *J. Biol. Chem.* **254**, 11272 (1979).
- P. T. T. Wong, D. J. Siminovitich, and H. H. Mantsch, *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 139 (1988).
- F. M. Goñi and J. L. Arrondo, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81**, 117 (1986).
- T. Shimanouchi, M. Sasaki, A. Hiroiwa, et al., *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **88**, 221 (2011).
- S. J. Hug, *J. Colloid Interface Sci.* **188**, 415 (1997).
- K. Glasmästar, C. Larsson, F. Höök, and B. Kasemo, *J. Colloid Interface Sci.* **246** (1), 40 (2002).
- R. Koynova and B. Tenchov, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (John Wiley & Sons, Hoboken, 2009), vol. 2, pp. 601–615.
- P. Jia, M. He, Y. Gong, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7** (12), 6422 (2015).
- T. Nezu, M. Taira, S. Saitoh, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **46** (4), 396 (2010).
- S. R. Baker and R. A. S. Ariëns, in *Cardiovascular Thrombus*, Ed. by O. Topaz (Acad. Press, London, San Diego, Cambridge, Oxford, 2018), pp. 31–49.

Fibrinogen Adsorption on the Lipid Surface as a Factor of Regulation of Fibrin Clot Formation

D.A. Faizullin*, Yu.A. Valiullina*, V.V. Salnikov*, and Yu.F. Zuev*

**Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center "Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences", ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan, 420111 Russia*

It has been established that enzymes of the coagulation cascade can interact with lipid microparticles or microvesicles of natural or artificial origin circulating in the blood. Such interactions can modulate hemostasis. Less is known about the effects of the direct interaction of fibrinogen/fibrin with microvesicles. Using purified systems in this study, it was shown that the presence of lipid particles of various compositions in solution may have a specific effect on the kinetics of fibrin polymerization. Experimental evidence presented here reveals that this effect arises from fibrinogen adsorption on the surface of the microvesicles. In particular, it was demonstrated that the adsorption of fibrinogen in a sufficiently high concentration leads to acceleration of the thrombin-induced fibrin polymerization due to the local concentration effect and the inclusion of microvesicles into the structure of the clot. Thus, the direct interaction of fibrinogen with microvesicles is an essential factor in hemostasis, which should be taken into account when analyzing blood coagulation diseases and developing an artificial lipid as drug carriers.

Keywords: lipids, fibrin, adsorption, coagulation