

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОНТАННЫХ СГУСТКОВ В НОРМАЛЬНОЙ ПЛАЗМЕ И ПЛАЗМЕ БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ А

Н. Г. Коротина¹, М. В. Ованесов¹, О. П. Плющ¹, К. Г. Копылов¹, Е. Г. Лопатина¹,
Е. Л. Саенко², А. А. Бутылин³, Ф. И. Атауллаханов^{1,3}

¹Гематологический научный центр РАМН, Москва; ²Американский Красный Крест, Роквилл, США; ³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Резюме. Как известно, в донорской плазме *in vitro* после рекальцификации, даже при отсутствии активаторов, процесс свертывания начинается через 10—20 мин спонтанно в отдельных центрах. Далее спонтанные сгустки увеличиваются в размере, постепенно заполняя весь объем плазмы. Нами показано, что количество спонтанных центров с уменьшением числа тромбоцитов в плазме снижается. После ультрацентрифугирования плазмы при 50 000 g в течение 1 ч при 21°C для удаления всех тромбоцитов и крупных фосфолипидных везикул спонтанные центры практически не образуются. Возвращение 10% тромбоцитов, или микровезикул, образующихся из тромбоцитов при активации А-23187, восстанавливает спонтанную тромбогенную активность плазмы. Добавление 0,1% эритроцитов или искусственных фосфолипидных везикул состава фосфатидилсерин:фосфатидилхолин (25:75) в концентрации 10 мкМ (в пересчете на липиды) восстанавливает нормальную спонтанную активность. Ингибитор контактной фазы (ингибитор, полученный из зерен кукурузы, 0,2 мг/мл) сильно снижает число спонтанных центров, но не убирает их полностью. В плазме больных гемофилией спонтанные сгустки не образуются. Мы показали, что при возмещении дефицита фактора VIII (FVIII) в плазме больных тяжелой гемофилией А число спонтанных сгустков возрастает. Нормализация спонтанного тромбообразования происходит при 5% (от нормального) уровня FVIII. Дальнейшее увеличение концентрации фактора вызывает образование большего числа спонтанных сгустков, чем в нормальной плазме, что указывает на гиперкоагулянтные свойства гемофильной плазмы, развивающиеся, вероятно, по компенсаторным механизмам. Наблюдение за спонтанными сгустками может быть использовано для мониторинга заместительной терапии больных гемофилией.

Ключевые слова: свертывание крови, гемофилия, тромбоциты, фосфолипиды

Summary. Spontaneous clots in normal plasma and plasma of patients with hemophilia A. N. G. Korotina, M. V. Ovanesov, O. P. Plyusch, K. G. Kopylov, E. G. Lopatina, E. L. Saenko, A. A. Butylin, F. I. Ataullakhanov. Hematological Research Center, Moscow, Russia; American Red Cross, Rockwill, USA; M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. In donor plasma *in vitro* after recalcification, even in the absence of the activators, clotting begins spontaneously in 10-20 min in a few centers. Later, spontaneous clots grow in size, filling up all plasma volume. The number of the spontaneous centers diminished with lowering number of plasma platelets. Ultracentrifugation of plasma (50000g, 1 hour, 21°C) stops formation of the spontaneous centers. Return of 10% platelets or microvesicles, produced of platelets in activation of A-23187, reestablishes spontaneous thrombogenic activity of plasma. The addition of 0,1% erythrocytes or artificial phospholipid vesicles consisting of phosphatidylserine:phosphatidylcholine (25:75%) in concentration 10mCM (on conversion to lipids) restores normal spontaneous activity. The inhibitor of the contact phase significantly decreases the number of spontaneous centers. In plasma of hemophiliacs spontaneous clots do not form. In compensation of factor VIII (pVIII) deficiency in plasma of pa-

tients with severe hemophilia A, the number of spontaneous clots increases. Normalisation of spontaneous thrombogenesis occurs in 5% level of factor VIII compared to normal. Higher concentrations of the factor lead to formation of spontaneous clots in quantities higher than in normal plasma. This points to hypercoagulatory properties of hemophilic plasma. The control over spontaneous clots may be used for monitoring of replacement therapy of hemophilia patients.

Key words: blood coagulation, hemophilia, platelets, phospholipids

В ответ на повреждение стенки сосуда активируется каскад биохимических реакций системы свертывания, результатом работы которого является образование фибринового сгустка, препятствующего потере крови. Почти все реакции каскада свертывания являются поверхностно-зависимыми [2, 5, 10, 12, 17]. Для связывания факторов свертывания необходим отрицательно заряженный фосфолипид — фосфатидилсерин (PS), который присутствует в мембранах тромбоцитов, эритроцитов, лимфоцитов (5—20% общего липидного состава мембраны) [7, 22, 24], а также в составе липопротеинов и малых фосфолипидных везикул [8, 14]. Таким образом, клетки крови [11], микровезикулы, образующиеся при стимуляции тромбоцитов и моноцитов [7, 23], липопротеины плазмы способны поддерживать свертывание. Однако, несмотря на наличие избыточной прокоагулянтной поверхности, *in vivo* плазма крови всегда находится в жидком состоянии, *in vitro* она сворачивается. Механизм спонтанного свертывания плазмы в настоящее время до конца не выяснен. Было показано, что через некоторое время после рекальцификации в тонком слое плазмы спонтанно появляются локализованные центры фибринообразования, которые со временем занимают весь объем плазмы. Образование спонтанных центров зависит от количества тромбоцитов в плазме [3].

Настоящая работа посвящена исследованию природы образования спонтанных сгустков. Мы определили влияние фосфолипидов плазмы и системы контактной активации на спонтанное свертывание в плазме. Показано, что важным отличием плазмы больных гемофилией от плазмы нормальных доноров является отсутствие спонтанного образования сгустков. Мы также показали, что при возмещении дефицита фактора VIII (FVIII) в плазме больных тяжелой гемофилией А число спонтанных сгустков растет с ростом активности FVIII. Нормализация спонтанного тромбообразования происходит уже при 5% (от нормального) уровне FVIII. Наш метод относительно прост и может найти применение в новых способах регистрации и мониторинга лечения больных гемофилией.

Материалы и методы. В работе были использованы следующие материалы: PS, фосфатидилхолин (PC), 4-метил-7-аминокумарин (AMC), "Sigma", США; трипсиновый ингибитор из зерен кукурузы (КТИ) любезно предоставлен Г. А. Смоляниновой (Институт белка РАН), Пушкино; фактор человека VIII высокой степени очистки [20]; субстрат S_{2366} : Gly-Pro-Arg-NH-NP, любезно предоставлен В. Ф. Позднеевым (ИБМХ РАН); ионофор A23187 Merck, Германия; набор реагентов для проведения теста на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), "Ренам", Москва, Россия.

Буфер I: 76 мМ NaCl; 36 мМ tris-HCl; 14 мМ trisma-B; буфер II: 140 мМ NaCl; 9 мМ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 1,3 мМ $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$; 5 мМ глюкоза; pH 7,4; буфер III: 100 мМ цитрата Na; pH 5,5; буфер IV: 145 мМ NaCl; 4 мМ NaCl; 0,5 мМ $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$; 0,1% глюкоза; 0,1% альбумин; 5 мМ Hesper; pH 6,8.

Исследование было проведено на пулах плазм, полученных от 70 здоровых доноров, и на плазмах 21 больного гемофилией А (активность FVIII менее 1%). У больных гемофилией А кровь брали вне эпизода кровотечения, не ранее 4—5 дней после последнего введения препаратов, содержащих дефицитный фактор [13]. Цельную кровь, взятую от здоровых доноров или от больных гемофилией А, заготавливали на цитратном консервирующем растворе в соотношении кровь:цитрат 9:1. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами — ОТП (содержание тромбоцитов 100—300 тыс/мкл), кровь центрифугировали при 200 г в течение 10 мин при 21°C. Бедную тромбоцитами плазму — БТП (содержание тромбоцитов 30—50 тыс/мкл) получали центрифугированием ОТП при 1000 г в течение 20 мин при 21°C. Свободную от тромбоцитов плазму (СТП) получали по-

вторным центрифугированием БТП при 1000 г в течение 20 мин при 21°C или 6000 г в течение 5 мин. Для удаления из плазмы фосфолипидных везикул СТП подвергали ультрацентрифугированию в полиалюмерных пробирках "Quik-Seal" ("Bechman") при 50 000 г в течение 1 ч при 21°C. Плазму после ультрацентрифугирования (УП) делили на 3 фракции: срезали запаянный верх пробирки и аккуратно отбирали верхнюю фракцию (с легкими фосфолипидсодержащими компонентами), затем прокалывали ее на 2/3 высоты и отбирали среднюю фракцию (плазма без фосфолипидов), в последнюю очередь отбирали нижнюю фракцию (в которой должны были осесть плотные макромолекулярные комплексы контактной фазы). Хранили приготовленные препараты в стерильных контейнерах при комнатной температуре не более 72 ч. Для предотвращения сильного щелочного сдвига pH в образцах плазмы в ходе инкубаций предварительно производилась процедура стабилизации pH путем инкубации плазмы с молочной кислотой [21].

Измерение АЧТВ [1] проводили с использованием реагентов фирмы "Ренам" (Москва). Время свертывания измеряли на компьютерном лазерном фотометре "Viola" (КНЦ РАН) по изменению светопропускания при образовании сгустка. Время свертывания рекальцифицированной плазмы определяли в пластиковой кювете спектрофотометрическим методом на длине волны 680 нм при перемешивании. В пластиковую измерительную кювету наливали 1620 мкл рекальцифицированной плазмы и 230 мкл буфера I. Образование сгустка регистрировали по изменению светопоглощения.

Для приготовления тромбоцитарных микровезикул к 5 мл ОТП добавляли 1,25 мл буфера III. Полученную смесь центрифугировали при 350 г 15 мин при 21°C, после чего осадок тромбоцитов ресуспендировали в буфере IV. Тромбоциты активировали добавлением ионофора A23187 (конечная концентрация 1 мкМ). Смесь инкубировали 10 мин при 37°C без перемешивания, центрифугировали при 6000 г 30 мин при 21°C. Микровезикулы содержались в супернатанте. Искусственные фосфолипидные везикулы состава PS:PC (25:75) были приготовлены по стандартной методике [4]. Фосфолипидные везикулы и микровезикулы из тромбоцитов измеряли фотометрическим способом по методике [6].

Оценку количества активных факторов контактной активации в пробе определяли по скорости расщепления флюорогенного субстрата S_{2366} флюорометрическим методом [18, 19].

Для исследования пространственной динамики образования спонтанных центров использовали специально сконструированную в нашей лаборатории компьютерную установку "система исследования гемостаза" (СИГ) [3, 9]. Регистрацию сгустков производили в тонком (1 мм) слое рекальцифицированной плазмы по вызываемому ими светорассеянию при освещении красным светом (600 нм). В качестве контроля использовали регистрацию роста сгустка от стандартного активатора внутреннего пути (стекло) в той же постановке. В ходе эксперимента каждые 30 с компьютер записывал изображение выбранного участка экспериментальной камеры размером 7,2 × 5,4 мм. По последовательности экспериментальных кадров на одной картинке собирали контуры растущих сгустков, соответствующие последовательным 2-минутным интервалам времени. Контур вычисляли на уровне половины максимальной интенсивности светорассеяния в сгустке. Динамика контуров характеризует спонтанное свертывание и свертывание, инициируемое активатором.

Визуальное наблюдение центров спонтанного фибринообразования осуществляли в чашке Петри (диаметр 40 мм). 1 мл рекальцифицированной плазмы наливали в чашку Петри, помещали в термостат при 37°C. Образование сгустков регистрировали визуально, через разные промежутки времени подсчитывали число образовавшихся спонтанных сгустков.

Результаты и обсуждение. Влияние тромбоцитов и эритроцитов на образование спонтанных сгустков в нормальной плазме. Спонтанные сгустки, появляющиеся в плазме крови *in vitro*, спустя 10—20 мин (для разных доноров) после рекальцификации, являются характерной чертой свертывания нормальной плазмы в наших опытах. Мы исследовали, как влияет концентрация

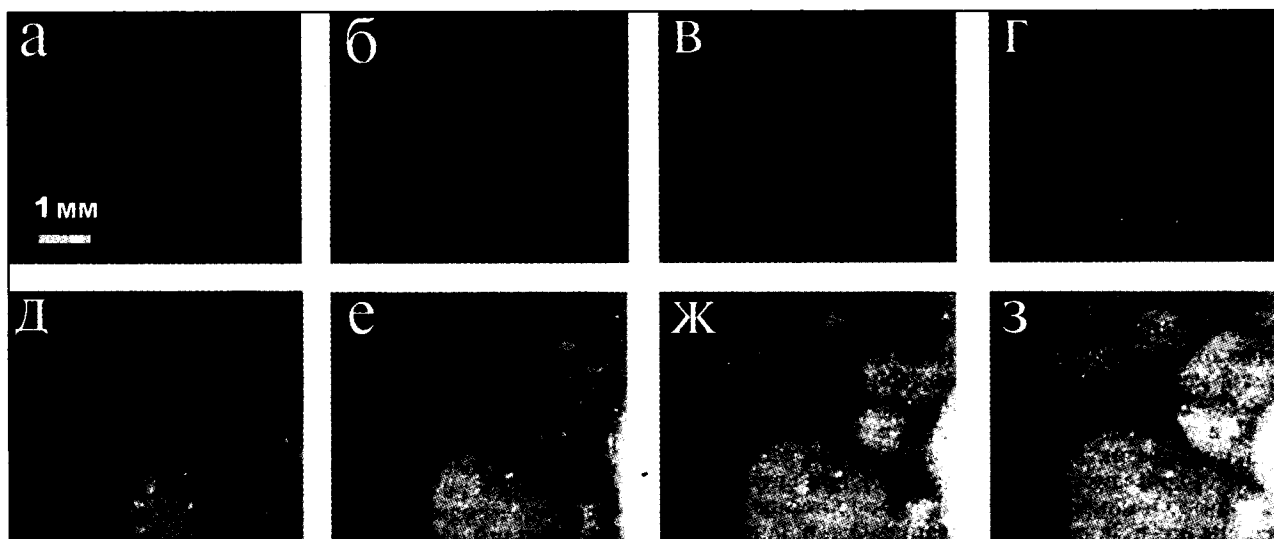


Рис. 1. Динамика образования спонтанных сгустков в нормальной плазме.

Рекальцифицированная плазма крови помещалась в чашку Петри, затем устанавливалась в рабочую камеру СИГ и инкубировалась в течение 60 мин. а — 10-я минута инкубации, последующие кадры (б—з) сняты с интервалом 5 мин.

тромбоцитов на спонтанное тромбообразование. На рис. 1 представлена динамика образования сгустков, полученная в СИГ. С течением времени количество и размер сгустков увеличивается, заполняется весь объем несвернувшейся плазмы (к 30—60-й минуте).

При визуальном наблюдении образование спонтанных сгустков отмечается раньше и идет тем быстрее, чем больше тромбоцитов в плазме (табл. 1). Так, в ОТП уже на 10-й минуте их насчитывается 11, в БТП — 5, в СТП — 0, а на 20-й минуте объем ОТП заполнился фибриновым гелем. Эти данные хорошо коррелировали с результатами исследования в СИГ: в БТП наблюдалось множественное центрообразование, и через 30 мин весь объем плазмы переходил в твердое состояние.

Исследование влияния эритроцитов (отмытых буфером II) на динамику образования спонтанных сгустков показало, что при добавлении в УП (см. Материалы и методы) 0,1% эритроцитов спонтанное свертывание возрастает и заканчивается на 45-й минуте.

Удаление фосфолипидных компонентов плазмы ультрацентрифугированием. В СТП спонтанные сгустки все равно образуются, поэтому их появление может быть связано с наличием в плазме фосфолипидов другой природы: остаточные тромбоциты, микровезикулы, крупные фосфолипидные везикулы (хиломикроны). Известно также, что комплексы активных факторов контактной

фазы свертывания могут длительное время присутствовать в плазме [19]. Для исследования индивидуального влияния этих компонентов мы проводили ультрацентрирование плазм (см. Материалы и методы). Для каждой фракции УП отдельно измеряли общую коагуляционную способность (АЧТВ), активность факторов контактной активации (скорость расщепления S_{2366}), спонтанную коагуляционную активность плазмы (время рекальцификации) (табл. 2). Из табл. 2 видно, что факторы контактной активации действительно локализованы в нижней фракции, верхняя фракция содержит достаточное число фосфолипидов для свертывания (время рекальцификации нормальное), и только средняя фракция сохранила коагуляционную способность, но при этом обладает слабой спонтанной активностью — время рекальцификации в 2,7 раза больше нормы. В средней фракции УП спонтанные сгустки не образовывались в течение 90 мин. Для дальнейших экспериментов была выбрана средняя фракция УП.

Восполнение УП тромбоцитарными микровезикулами. Отделение фосфолипидных поверхностей из плазмы ультрацентрифугированием привело к снижению числа спонтанных центров. Мы исследовали образование спонтанных центров в присутствии микровезикул, являющихся источником такой поверхности [7]. Полученные микровезикулы (см. Материалы и методы) в разных концентрациях добавляли в УП, исследование производили в СИГ. С увеличением концентрации микровезикул число спонтанных центров растет со временем (рис. 2). При концентрации микровезикул 0,8 мМ (в пересчете на глицерин) застывание объема плазмы происходит на 30-й минуте, как и для БТП.

Таблица 1

Число спонтанных сгустков в плазмах с различным содержанием тромбоцитов (характерный эксперимент)

Время, мин	ОТП	БТП	СТП	УП
1	0	0	0	0
5	0	0	0	0
10	11	5	0	0
15	~50	30	2	0
20	*	~50	4	0
25		*	10	0
45			*	0
90				0

Примечание. * — полное свертывание: в момент заполнения всего объема плазмы нитями фибрина.

Таблица 2

Характеристики фракций УП (усредненные данные по 10 экспериментам, указано среднее отклонение)

Фракция/тест	АЧТВ, с	Скорость расщепления S_{2366} , мкМ/мин	Время рекальцификации, мин
Верхняя	36 ± 3	0,10 ± 0,03	31 ± 4
Средняя	36 ± 2	0,11 ± 0,03	105 ± 21
Нижняя	27 ± 2	0,32 ± 0,04	24 ± 4
Исходная СТП	35 ± 2	0,12 ± 0,04	39 ± 9

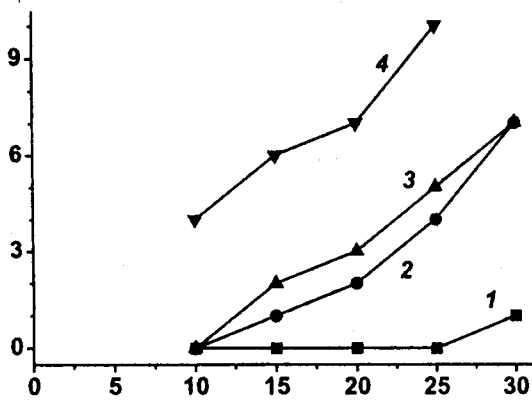


Рис. 2. Зависимость числа спонтанных сгустков в УП от времени для разных концентраций добавленных микровезикул.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — число спонтанных сгустков. 1 — плазма после ультрацентрифугирования (УП), 2 — УП + 0,2 ммоль микровезикул, 3 — УП + 0,4 ммоль микровезикул, 4 — УП + 0,8 ммоль микровезикул. (Концентрации микровезикул дана в единицах концентрации глицерина.)

Восполнение УП искусственными везикулами. При взмешении фосфолипидных поверхностей искусственными везикулами наблюдалось восстановление спонтанной активности. Количество добавленных везикул хорошо коррелировало с числом образующихся спонтанных центров. При 10 мкМ (в пересчете на фосфолипиды) добавленных везикул спонтанная активность сравнялась с аналогичной активностью СТП.

Влияние контактной активации на образование спонтанных сгустков. Влияние контактной активации мы оценили, используя ингибитор контактной фазы КТИ. Концентрация добавленного КТИ (0,2 мг/мл конечная) была выбрана таким образом, что дальнейшее повышение концентрации ингибитора не приводило к удлинению теста АЧТВ. В БТП КТИ полностью ингибировал образование спонтанных сгустков (более 90 мин). При одновременном добавлении фосфолипидных везикул и КТИ спонтанные центры образовывались, но их количество было меньше, чем без КТИ (рис. 3).

Спонтанное тромбообразование в плазме больных гемофилией А при восполнении дефицита FVIII. Если из плазмы больных гемофилией удалить большую часть тромбоцитов (СТП или БТП), то спонтанных сгустков в течение экспериментального времени наблюдения не образуется. Однако при восполнении дефицита фактора очищенным FVIII, начиная с конечной концентрации, равной 0,05% уровня фактора в нормальной плазме, спонтанные сгустки начинали появляться. С ростом концентрации добавленного фактора число спонтанных центров увеличивается, и их рост становится более интенсивным. При 5—10% активностях FVIII количество спонтанных центров значительно превышает их число в нормальной плазме. Подавление контактной активации (ингибитором КТИ) в такой плазме приводило к тому, что спонтанные сгустки не наблюдались в течение более чем 1 ч. Подобные результаты были получены и при восполнении дефицита FVIII свежей донорской плазмой *in vitro*. В этом случае для достижения уровня спонтанной активности, характерного для гемофильной плазмы с добавленным очищенным FIII, требовалось в 4 раза большей активности фактора, приносимой нор-

мальной плазмы. Так, смесь гемофильной и нормальной плазмы в соотношении 60:40 (активность фактора 40%) обладает такой же высокой спонтанной активностью, как и гемофильная плазма с добавлением FVIII до уровня 5—10%. Эксперименты на БТП больных гемофилией А показали, что присутствие тромбоцитов вызывает образование спонтанных сгустков независимо от уровня FVIII.

Спонтанное свертывание крови *in vitro* может быть вызвано двумя причинами: 1) нативная кровь отличается от плазмы *in vitro* тем, что плазма в процессе взятия крови активируется и поэтому после рекальцификации сворачивается даже в отсутствие сильного активатора (каолина, тромбопластина), или же (2) поверхности любых контейнеров, с которыми рекальцифицированная плазма вступает в контакт вне сосудистой стенки, вызывают контактную активацию, достаточную для запуска свертывания. В данной работе мы исследовали, насколько способность плазмы образовывать спонтанные сгустки связана с двумя компонентами: комплексами факторов контактной активации, образующимися при взятии крови, и с отрицательно заряженными фосфолипидами и рецепторами, экспрессирующимися в плазму при активации тромбоцитов. Оказалось, что с ростом числа тромбоцитов число спонтанных сгустков растет (см. табл. 1). Однако, даже в отсутствие тромбоцитов и эритроцитов, спонтанные сгустки образуются. Поскольку известно, что при взятии крови, при отделении клеток крови в плазму попадают микровезикулы, которые выбрасываются тромбоцитами, подвергшимися механическому воздействию [24], мы удалили эти компоненты ультрацентрифугированием. При этом одновременно были удалены и макромолекулярные комплексы контактных факторов свертывания. В полученной бедной фосфолипидами и очищенной от факторов контактной активации плазме, действительно, спонтанных сгустков образовывалось мало. Поскольку восполнение только концентрации фосфолипидов в такой плазме очищенными фосфолипидами и тромбоцитарными везикулами приводило к восстановлению количества сгустков, макромолекулярные комплексы контактной активации не обязательны для появления спонтанных сгустков.

В следующих экспериментах мы исследовали влияние контактной активации, вызванной поверхностью контейнеров. Оказалось, что при полностью подавленной ингибитором (КТИ) системе контактной активации в СТП спонтанных сгустков не образуется. В плазме (СТП и БТП) больных гемофилией А (у которых нарушен внутренний, контактный, путь свертывания) также спонтанных сгустков не образуется. Из этого можно сде-

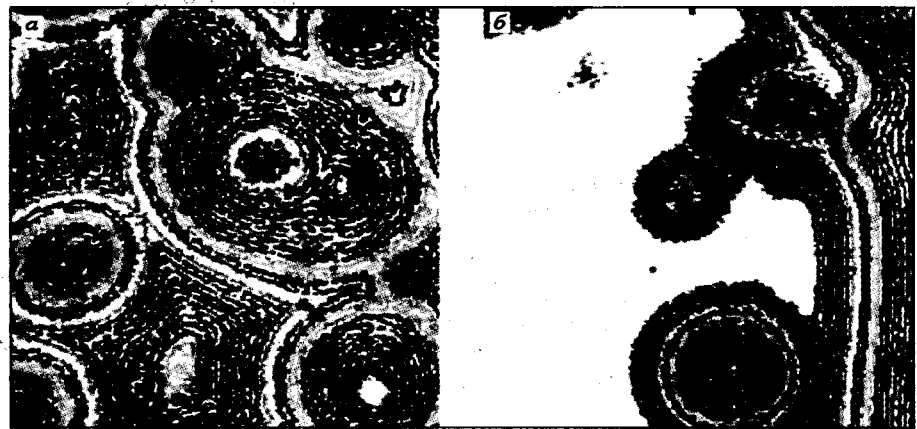


Рис. 3. Влияние КТИ на спонтанное свертывание.

Контуров спонтанных сгустков, образовавшихся в УП с добавлением 10 мкМ (в пересчете на фосфолипиды) искусственных везикул и 0,2 мг/мл КТИ. Панели соответствуют 30-й минуте инкубации в СИГ. а — без добавления КТИ, б — с добавлением КТИ.

лать вывод, что основной причиной возникновения спонтанных сгустков в плазме является контактная активация от стенок контейнеров.

В ОТП спонтанные сгустки образовывались даже в присутствии КТИ. Более того, в ОТП больных гемофилией А происходит образование спонтанных сгустков. Эти данные можно объяснить только тем, что тромбоциты могут активировать свертывание сами, по не зависящему от контактной фазы способу. Было показано, что (1) тромбоциты содержат некоторое количество активатора внешнего пути свертывания, тканевого фактора (ТФ), который экспрессируется при их активации [23], и (2) фактор VIIa (FVIIa) может активировать свертывание (без ТФ) на поверхности тромбоцитов и фосфолипидных везикул [16]. В наших экспериментах добавление больших концентраций очищенных фосфолипидов в плазму, содержащую КТИ, действительно, вызывало спонтанное свертывание. Его мог вызывать FVIIa, который в отличие от остальных активированных факторов свертывания почти не ингибируется в плазме [16]. Однако индивидуальный вклад FVIIa и ТФ в спонтанное свертывание требует дополнительного исследования.

Таким образом, наши исследования показали, что спонтанное свертывание *in vitro* вызвано (в БТП и СТП) активацией свертывания стенками контейнера, в которых хранится плазма или (в ОТП) поверхностью активированных тромбоцитов, но не активацией контактных факторов при взятии крови.

Тот факт, что спонтанные сгустки в БТП вызваны контактной активацией свертывания, которая нарушена при гемофилии А, делает наблюдение за спонтанными сгустками удобным методом для мониторинга заместительной терапии у больных гемофилией. Наши эксперименты по восполнению дефицита FVIII *in vitro* показали, что число спонтанных сгустков пропорционально уровню FVIII. При этом 5–10% фактора было достаточно для нормализации тромбообразования в гемофильной плазме. Именно этот уровень называется зарубежными авторами как критический: при меньших активностях FVIII требуется превентивное лечение гемофилии заместительной терапией [15].

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 00-04-48855.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью. — М., 1990.
2. Физиология системы гемостаза / Под ред. В. П. Балуды. — М., 1995.
3. *Ataullakhanov F. I., Guria G. T., Sarbash V. I. et al. // Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1425. — P. 453–468.
4. *Barenholz Y., Gibbes D., Litman B. J. et al. // Biochemistry.* — 1977. — Vol. 16. — P. 2806–2810.
5. *Gilbert G. E., Arena A. A. // J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 11120–11125.
6. *Gottfried S. P., Rosénberg B. // Clin. Chem.* — 1973. — Vol. 19, N 9. — P. 1077–1078.
7. *Heijnen H. F. G., Schiel A. E., Fijnheer R. et al. // Blood.* — 1999. — Vol. 94. — P. 3791–3799.
8. *Kjalke M., Silveira A., Hamsten A. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — Vol. 20. — P. 1835–1841.
9. *Krasotkina Y. V., Sinauridze E. I., Ataullakhanov F. I. // Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — Vol. 1474. — P. 337–345.
10. *Lindhout T., Govers-Riemslog J. W. P., Waart P. et al. // Biochemistry.* — 1982. — Vol. 21. — P. 5494–5502.
11. *Peyrou V., Lormeau J. C., Herault J. P. et al. // Thrombos. Haemostas.* — 1999. — Vol. 81. — P. 400–406.
12. *Mann K. G., Nesheim M. E., Church W. R. et al. // Blood.* — 1990. — Vol. 76. — P. 1–16.
13. *Morfini M., Lee M., Messori A. // Thrombos. Haemostas.* — 1991. — Vol. 66. — P. 384–386.
14. *Moyer M. P., Tracy R. P., Trasy P. B. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1998. — Vol. 18. — P. 458–465.
15. *Replacement Therapy // Hemophilia / Eds I. M. Nilsson et al. — New York, 1994. — P. 48–65.*
16. *Nemerson Y. // Blood.* — 1988. — Vol. 77. — P. 1–8.
17. *Pellequer J.-L., Gale A. J., Getzoff E. D. // Curr. Opin. Biol.* — 2000. — Vol. 10. — P. 237–240.
18. *Pokhilkó A. V., Ataullakhanov F. I. // J. Theor. Biol.* — 1998. — Vol. 191. — P. 213–219.
19. *Pokhilkó A. V. // Thrombos. Res.* — 2000. — Vol. 99. — P. 285–293.
20. *Saenko E. L., Shima M., Gilbert G. E. et al. // J. Biol. Chem.* — 1996. — Vol. 271. — P. 27424–27431.
21. *Sinauridze E. I., Volkova R. I., Krasotkina Y. V. et al. // Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 1425. — P. 607–616.
22. *Wagner G., Chiu D., Yee M. et al. // J. Lab. Clin. Med.* — 1986. — Vol. 108. — P. 315–324.
23. *Zillmann A., Luther T., Muller I. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 281. — P. 603–609.
24. *Zwaal R. F., Comfurius P., Bevers E. M. // Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — Vol. 1180. — P. 1–8.