

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-73-78>

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО КОНЦЕНТРАТА ФИБРИНОГЕНА

Хурдин В. В.^{1,*}, Берковский А. Л.², Сергеева Е. В.², Суворов А. В.²

¹ ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», 119571, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель работы — разработать метод получения концентрата фибриногена, свободного от балластных белков, для производства гемостатического препарата на основе фармацевтической субстанции фибриногена.

Материалы и методы. Метод основан на выделении фибриногена из раствора криопреципитата осаждением раствором полиэтиленгликоля с последующей вирусной инактивацией сольвент/детергентом. Очистку от продуктов вирусной инактивации и балластных белков проводили путем двухступенчатой обработки полученного концентрата фибриногена раствором глицина.

Результаты. Разработанная лабораторная методика выделения фибриногена была оптимизирована по основным параметрам и масштабирована в условиях опытного производства.

Заключение. Разработанная лабораторная методика выделения фибриногена характеризуется высоким выходом целевого продукта и может применяться при производстве гемостатического препарата.

Ключевые слова: фибриноген, препараты крови, фибриновый клей, фракционирование плазмы, гипофибриногенемия

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Хурдин В.В., Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. Получение очищенного концентрата фибриногена. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 73–78. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-73-78>

PRODUCTION OF PURIFIED FIBRINOGEN CONCENTRATE

Khurdin V. V.^{1,*}, Berkovskiy A. L.², Sergeeva E. V.², Suvorov A. V.²

¹ MIREA-Russian Technological University, 119571, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To present a technique for obtaining fibrinogen concentrate purified from ballast proteins, which can be used in hemostatic drug production.

Materials and methods. The proposed method is based on isolating fibrinogen from a cryoprecipitate solution by its precipitation with a polyethylene glycol solution followed by virus inactivation by a solvent/detergent. Purification from viral

inactivation products and ballast proteins is performed by a two-step processing of the obtained fibrinogen concentrate with glycine solution.

Results. The developed laboratory method for isolating fibrinogen has been optimized in terms of main parameters and scaled in pilot production.

Conclusion. The presented laboratory technique for fibrinogen extraction is characterized by a high yield of the target product, thus being suitable for the production of hemostatic drugs.

Keywords: fibrinogen, blood drugs, fibrin glue, plasma fractionation, hypofibrinogenemia

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Khurdin V.V., Berkovskiy A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V. Production of purified fibrinogen concentrate. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 73–78 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-73-78>

Введение

На протяжении многих лет хирургия нуждалась в гемостатических препаратах, которые могли бы остановить кровотечение при минимальной инвазивности вмешательства и изменениях соединяемых тканей и улучшить процесс регенерации за счет биологического сродства используемых материалов. Использование биологических адгезивных средств в качестве гемостатических препаратов открывает возможности в хирургической практике. Таким биологическим адгезивом может являться фибриновый клей, компоненты которого выделяются из плазмы крови человека.

Фибриноген (фактор свертывания I) представляет собой белок плазмы крови, растворимый гликопротеин — комплекс трех пар полипептидных (α , β и γ) цепей [1], который под действием тромбина (фактора свертывания IIa) преобразуется в фибрин — нерастворимый биополимер, сеть волокон которого является основой кровяного сгустка, обеспечивающего гемостаз. Наряду с обеспечением гемостаза фибриноген участвует в заживлении ран, развитии опухолей и в метастазировании [2]. Недостаточность фибриногена проявляется нарушением гемостаза и приводит к кровотечениям. Дефицит фибриногена может быть как врожденным, так и приобретенным. Наиболее распространенным является приобретенный дефицит в результате гемолиции, кровопотери и диссеминированного внутрисосудистого свертывания [3]. Основным методом лечения и профилактики гипофибриногенемии является заместительная терапия препаратами и компонентами крови, содержащими фибриноген [4].

Добавление тромбина к раствору фибриногена инициирует процесс перехода растворимого фибриногена в фибрин с образованием плотного, вязкоэластичного, клейкого сгустка. Механизм, посредством которого мономеры фибрина полимеризуются с образованием решетчатой трехмерной структуры, был объектом множества исследований. Наличие катионов Ca^{2+} и Zn^{2+} уменьшает время образования сгустка и увеличивает как его вязкоэластичность, так и плотность [5]. Трансформация растворимого фибриногена в сгусток разделена на ряд последовательных этапов, а именно:

образование фибрин-мономеров, их полимеризация с формированием линейных протофибрилл и образование нерастворимого трехмерного геля (коагуляция, гелеобразование). Фактор XIIIa вызывает полимеризацию и образование поперечных сшивок между фибрином и фибронектином, а также другими адгезивными белками, усиливая взаимодействие фибрина с тромбоцитами и сосудистой стенкой, что обеспечивает повышение гемостатических свойств фибрина. Благодаря действию фактора XIIIa аналогичным образом вовлекается в сгусток α_2 -антиплазмин и тем самым увеличивается его резистентность к плазмину [5].

В настоящее время существуют несколько методов выделения фибриногена. К ним относятся спирто-холодовое осаждение [6], высаливание и обработка раствора, содержащего фибриноген, хлоридом аммония [7]. Все эти способы характеризуются низким выходом целевого продукта и делают процесс выделения трудоемким за счет приготовления сложных буферных растворов и необходимости их последующего отмывания. Длительность этих процедур приводит к значительным потерям продукта в ходе получения. Более того, часто используемая стадия термической пастеризации раствора фибриногена с целью инактивации вирусов и других патогенов приводит к частичной полимеризации в конечном продукте, что, в свою очередь, сказывается на конечной концентрации фибриногена.

Целью данной работы является разработка способа получения лиофилизированной формы вирус-безопасного высокоочищенного концентрата фибриногена с оптимизацией технологических условий процесса выделения, который может конкурировать с существующими в настоящее время методами выделения по чистоте конечного продукта.

Материалы и методы

В качестве исходного сырья использовали свежемороженную плазму (СЗП) человека, полученную в отделении заготовки крови и ее компонентов (ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва) согласно «Инструкции по проведению донорского

прерывистого плазмафереза», утвержденной Минздравом России 23.09.2002 [8]. Аттестацию СЗП проводили в соответствии с техническим регламентом «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 года № 29 [9].

Концентрацию фибриногена (г/л) измеряли коагулологическим методом на анализаторе MC 4 PLUS (Merlin Medical, Германия). Для проведения коагулологических измерений использовали плазму-калибратор, аттестованную по содержанию фибриногена, и высокоактивный тромбин. Для разведения исследуемых образцов использовали имидазоловый буфер. Контроль построения калибровочных прямых осуществляли с помощью контрольной плазмы (плазма крови человека с нормальными и патологическими параметрами системы гемостаза). Использовали реагенты производства МБООИ «Общество больных гемофилией» (Россия).

Содержание фибриногена в процессе выделения и получения концентрата определяли, смешивая в кювете коагулометра по 100 мкл исследуемого раствора фибриногена и 50 мкл тромбина с активностью 50 МЕ/мл. Измеряли время от момента добавления тромбина до момента образования сгустка. Содержание фибриногена определяли по калибровочному графику, построенному заранее с использованием последовательных разведений вторичного стандарта фибриногена (плазма-калибратор) с известной концентрацией фибриногена.

Концентрацию общего белка определяли методом Бредфорда на спектрофотометре Ultrospec 2100 pro (GE Healthcare, США). В качестве калибратора использовали раствор бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 60 г/л (ООО «Агат-Мед», Россия). Молекулярно-массовое распределение в полученных образцах концентрата фибриногена изучали методом SDS-электрофореза на полиакриламидном геле в градиенте 4–15 %. Использовали систему для электрофореза Fast System (GE Healthcare, США).

Результаты

Основным сырьем для получения фибриногена явился криопреципитат (КП), полученный из СЗП человека. В качестве метода получения КП использовали криофракционирование. Для этого СЗП подвергали медленному размораживанию при 0–2 °С для того, чтобы большая часть криоглобулиновых белков оста-

лась в осадке, который затем отделяли центрифугированием. Содержание фибриногена в КП составляло ~90 % от общего белка. Полученный КП растворяли в трехкратном объеме дистиллированной воды в присутствии нефракционированного гепарина (2 МЕ/мл). После растворения КП его обрабатывали 3 % гелем гидроксида алюминия при интенсивном перемешивании. Сорбирующий гель отделяли от раствора центрифугированием, а полученный супернатант обрабатывали полиэтиленгликолем (ПЭГ)-4000. Активность факторов протромбинового комплекса после сорбции значительно уменьшилась и составила не более 0,04 МЕ/мл (контроль активности вели по фактору II). Фибриноген из раствора выделяли, осаждая его ПЭГ-4000 при интенсивном перемешивании. pH раствора при этом доводили до величины, близкой к изоэлектрической точке фибриногена (6,6–6,8), 0,5 М раствором уксусной кислоты. Полученный супернатант передавали на производство очищенного фактора VIII, а преципитат использовали далее для получения концентрата фибриногена.

Содержащую фибриноген пасту растворяли при интенсивном перемешивании в десятикратном объеме буфера, содержащего 10 mM трехзамещенного цитрата натрия и 0,15 М хлорида натрия. pH корректировали 0,5 М раствором трис-основания до уровня 7,8–8,0. После растворения пасты раствор центрифугировали для осветления. Процесс растворения фибриногена зависел от температуры: концентрация фибриногена в растворе возрастала с 25 до 38 г/л при увеличении температуры растворения с 20 до 37 °С.

С целью обеспечения вирусной безопасности концентрата фибриногена была проведена сольвент/детергентная вирусная инаktivация раствора, содержащего фибриноген. В качестве агентов вирусной инаktivации были выбраны 1 % раствор Tween-80 (моноолеат полиоксиэтиленсорбитан) и 0,3 % TnBP (три-н-бутилфосфат) [10]. Раствор, содержащий фибриноген, инкубировали при комнатной температуре при непрерывном перемешивании в течение 6–10 часов. Для очистки концентрата фибриногена от продуктов вирусной инаktivации и инаktivирующих агентов полученный раствор подвергали процедуре 3-кратной экстракции вазелиновым маслом при интенсивном перемешивании в течение 2 часов. Затем супернатант, содержащий фибриноген, центрифугировали и отделяли водный слой, содержащий раствор фибриногена. Отделение фибриногена от балластных белков проводили

Таблица 1. Влияние температуры на концентрацию фибриногена при растворении фибриноген-содержащей пасты
Table 1. Effect of temperature on the fibrinogen concentration during the process of fibrinogen-containing paste dissolution

Температура растворения, °С Dissolution temperature, °C	37	30	20
Концентрация фибриногена в растворе, г/л Fibrinogen concentration in solution, g/l	37–39	34–36	24–26

методом переосаждения. В раствор при интенсивном перемешивании добавляли глицин. При этом образовывался осадок фибриногена, который затем отделяли центрифугированием. Осадок растворяли в буфере, содержащем 10 мМ трехзамещенный цитрат натрия и 0,15 М хлорид натрия. Процедуру осаждения проводили дважды, каждый раз отмывая осадок холодным раствором глицина. При добавлении глицина по мере его растворения наблюдалось образование белкового осадка. После его отделения центрифугированием были взяты пробы надосадочной жидкости, в которой определяли концентрацию фибриногена (табл. 2).

При добавлении глицина до концентрации в растворе, равной 1 М, к концентрату фибриногена при интенсивном перемешивании наблюдалось мгновенное образование белковых сгустков. После центрифугирования были взяты пробы надосадочной жидкости, при исследовании которых установлено, что в них содержится еще значительное количество (5,81 г/л) неосадившегося фибриногена. Увеличение концентрации глицина в растворе до 1,5 М привело к тому, что в пробах надосадочной жидкости практически полностью перестал определяться растворенный фибриноген. При этом концентрация переосажденного фибриногена составила 20–23 г/л. Увеличение концентрации глицина в растворе до 2,0 и 2,8 М привело к обратному результату: концентрация переосажденного фибриногена в растворе после растворения осадка уменьшалась до 15 и 10 г/л соответственно. В последнем случае количество глицина было настолько высоким, что он не растворялся полностью.

Диапазон значений pH на стадии осаждения был выбран наиболее близким к физиологическим величинам (7,0–7,8).

pH корректировали 0,5 М раствором трис-основания. Оптимальным для осаждения глицином являлся pH, равный 7,5 (табл. 3).

Осадок фибриногена растворяли в буфере, содержащем цитрат натрия и хлорид натрия, при pH 7,5–7,8 до концентрации 20–25 г/л и подвергали стерилизующей фильтрации. Стерилизующую фильтрацию и розлив проводили в зоне с ламинарным воздушным потоком, соответствующей по чистоте классу А. Все емкости и оборудование (флаконы, пробки, колпачки, фильтр) после стерилизации поступали в «чистую зону». Фильтрацию осуществляли через стерилизующий фильтр Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. Далее весь объем жидкости разливали по 2 мл во флаконы. Флаконы закрывали стерильными пробками и далее передавали на стадию лиофильной сушки. После розлива флаконы с препаратом помещали в поддоны лиофилизатора. Программу лиофилизации и термической инактивации задавали с помощью компьютера. Процесс состоял из трех стадий:

- 1) заморозка раствора при температуре -50°C и давлении 1 бар в течение 7,5 ч;
- 2) лиофилизация при температуре от -20 до $+30^{\circ}\text{C}$ и давлении 60 мкбар в течение 40,5 ч;
- 3) термическая вирусная инаktivация при температуре 60°C и давлении 60 мкбар в течение 72 ч.

Полученный лиофилизат укупоривали под вакуумом, флаконы обжимали алюминиевыми колпачками. Для дальнейшего исследования полученного концентрата фибриногена флаконы вскрывали, растворяли концентрат до жидкого состояния дистиллированной водой с помощью легкого покачивания, затем

Таблица 2. Влияние концентрации глицина на растворимость фибриногена при избавлении концентрата фибриногена от балластных белков
Table 2. Effect of glycine concentration on the fibrinogen solubility during purification of the fibrinogen concentrate from ballast proteins

Концентрация глицина, М Glycine concentration, M	1		1,5		2		2,8	
Образец Sample	Надосадочная жидкость Supernatant	Переосажденный фибриноген Precipitated fibrinogen	Надосадочная жидкость Supernatant	Переосажденный фибриноген Precipitated fibrinogen	Надосадочная жидкость Supernatant	Переосажденный фибриноген Precipitated fibrinogen	Надосадочная жидкость Supernatant	Переосажденный фибриноген Precipitated fibrinogen
Концентрация фибриногена в растворе, г/л Fibrinogen concentration in solution, g/l	5–7	8–10	0–0,2	20–23	0–0,5	13–16	0	7–9,5

Таблица 3. Влияние pH на концентрацию фибриногена при растворении преципитата фибриногена

Table 3. Effect of pH on the fibrinogen concentration during the process of precipitated fibrinogen dissolution

pH	7,00	7,50	8,00
Концентрация фибриногена в растворе, г/л Fibrinogen concentration in solution, g/l	30–31	34–36	30–32

выдерживали при комнатной температуре до полного растворения в течение 15 минут.

Чтобы охарактеризовать полученный концентрат фибриногена по количеству действующего вещества и наличию примесей, был проведен электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях на системе Phast System Pharmacia (рис. 1).

На рисунке 1 представлена пластина с полиакриламидным гелем с нанесенными образцами. Образцы 1 и 3 представляют собой маркеры для низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений соответственно. Образец 2 представляет собой разведенную пробу полученного фибриногена с концентрацией общего белка примерно 2 г/л. На рисунке видно, как α -, β - и γ -цепи человеческого фибриногена с массой 68, 56 и 46 кД соответствующим образом разделяются при электрофорезе. Полученные данные проведенного электрофореза свидетельствуют о высокой чистоте целевого продукта.

Обсуждение

Использование плазмы крови человека в качестве основного сырья для производства КП обеспечивает наилучшую физиологическую совместимость компонентов биологического адгезива с организмом больного.

Для подавления активации факторов протромбинового комплекса полученный криопреципитат растворяли в присутствии нефракционированного гепарина. Поскольку факторы протромбинового комплекса в физиологических условиях проявляют сильное сродство к отрицательно заряженным поверхностям, то, используя это свойство, была проведена обработка специфическими сорбентами, направленная на удаление предшественников сериновых протеаз. Одним из таких сорбентов является гидроксид алюминия.

Фибриноген, как и другие биологические молекулы (белки, аминокислоты), при достижении значения своей изоэлектрической точки чаще всего выпадает

в осадок. Фибриноген-содержащую пасту в виде осадка после центрифугирования растворяли при интенсивном перемешивании в буфере, содержащем антикоагулирующий агент цитрат натрия. pH выводили из значения изоэлектрической точки фибриногена для ускорения процесса растворения.

Задачей настоящей работы являлось обеспечение оптимальных параметров в процессе выделения целевого белка, поэтому были оптимизированы основные параметры, такие как температура растворения фибриногена и pH растворов на различных стадиях процесса, а также концентрация глицина на стадии переосаждения фибриногена. Для очистки концентрата фибриногена от продуктов вирусной инактивации и инактивирующих агентов полученный раствор подвергали процедуре экстракции вазелиновым маслом при интенсивном перемешивании с последующим центрифугированием. Температуру при осаждении понижали до 4 °С, поскольку известно, что фибриноген является криоглобулиновым белком и лучше осаждается при пониженной температуре.

В дальнейшем последовали процедуры стерильной фильтрации, розлива и лиофилизации. Фибриноген сохраняет значительное количество воды даже после лиофилизации. Фибриноген образует с водой комплекс, в котором участвуют 174 молекулы воды на одну молекулу фибриногена, причем молекулы воды являются структурно запертыми в каждой молекуле белка, имея возможность высвободить воду только в случае растяжения или сжатия молекулы белка [11, 12]. При лиофилизации фибриногена до полной обезвоженности следует учитывать, сколько воды сухой порошок фибриногена сможет впитать, чтобы восстановиться до применимого состояния за разумное время. С практической точки зрения растворение порошка сухого фибриногена в водном буфере лучше проводить, просто позволяя порошку абсорбировать воду, таким образом позволяя белку медленно растворяться без перемешивания или встряхивания [11–13]. Полученные результаты SDS-PAGE электрофореза свидетельствуют о высокой чистоте полученного продукта.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан лабораторный метод получения стабильного высокоочищенного вирус-безопасного концентрата фибриногена, применимый для малых и больших объемов исходного сырья для производства препарата фибриногена. Проведена оптимизация таких технологических показателей процесса выделения, как температура растворения фибриногена, pH, концентрация глицина. Разработанный метод характеризуется высоким выходом целевого продукта и снижением трудоемкости за счет исключения приготовления необходимых в других методах сложных буферных растворов и их последующего отмывания, что обуславливает отсутствие значительных потерь целевого продукта в ходе выделения.

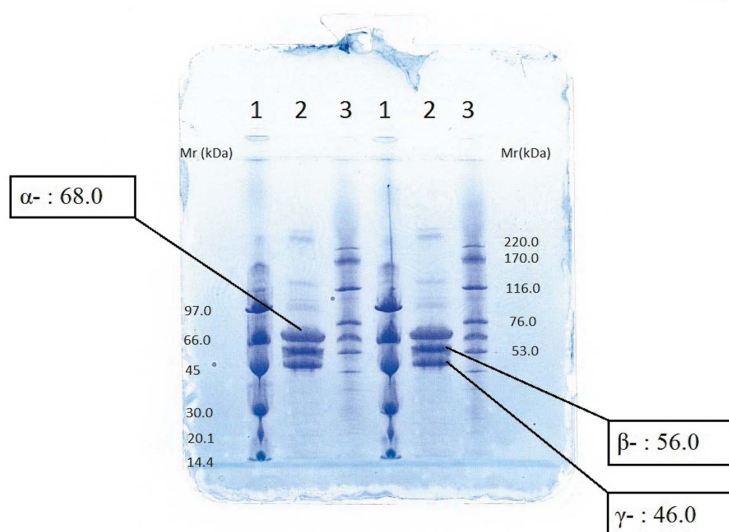


Рисунок 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях
Figure 1. Polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions

Литература

1. Redman C., Xia H. Fibrinogen biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 480–95.
2. Козлов А.А., Берковский А.Л., Качалова Н.Д. и др. Пособие для врачей-лаборантов по методам исследования плазменного гемостаза. Факторы свертывания крови. М.: Ренам; 2008.
3. Братчик А.М. Клинические проблемы фибринолиза. Киев; 1993.
4. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. Казань; 2000.
5. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1894–904.
6. Крайнова Т.А., Пискарева Ю.К., Анастасиев В.В. Препараты крови. Инструктивно-методические материалы по контролю и производству. М.; 1976.
7. Инструкция по проведению донорского прерывистого плазмафереза. Утверждена Министерством здравоохранения России 23.09.2002.
8. Технический Регламент «О требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии». Утвержден Постановлением Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 г. № 29.
9. Billy D., Speijer H., Zwaal R.F.A., et al. Anticoagulant and membrane-degrading effects of secretory (non-pancreatic) phospholipase A2, are inhibited in plasma. *Thromb. Haemost.* 2002; 87: 978–84.
10. Yermolenko I.S., Lishko V.K., Ugarova T.P., Magonov S.N. High-resolution visualization of fibrinogen molecules and fibrin fibers with atomic force microscopy. *Biomacromolecules.* 2011; 12: 70–9.
11. Brown J.H., Volkmann N., Jun G., et al. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 85–90.
12. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., Weisel J.W. Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM. *Biophys J.* 2007; 92: 39–41.
13. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., et al. Multi-scale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science.* 2009; 325: 741–4.

Информация об авторах

Хурдин Вячеслав Викторович*, аспирант ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», кафедра биотехнологии и промышленной фармации,
e-mail: khurdin90@gmail.com

Берковский Арон Леонидович, кандидат биологических наук, консультант ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: aron_56@mail.ru

Сергеева Елена Владимировна, заведующая производством НПО «Ренам» МБООИ «Общество больных гемофилией»,
e-mail: serg_helen@mail.ru

Суворов Александр Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НПО «Ренам» МБООИ «Общество больных гемофилией»,
e-mail: suvorov1983@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку

Поступила 17.05.2018

Принята к печати 24.12.2018

References

1. Redman C., Xia H. Fibrinogen biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 480–95.
2. Kozlov A.A., Berkovskij A.L., Kachalova N.D., et al. The manual for laboratory assistant on methods of studying plasma hemostasis. Coagulation factors. Moscow: Renam; 2008 (In Russian).
3. Bratchik A.M. Clinical problems of fibrinolysis. Kiev; 1993 (In Russian).
4. Zubairov D.M. Molecular basis of blood clotting and thrombus formation. Kazan; 2000 (In Russian).
5. Mosesson M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3: 1894–904.
6. Krajnova T.A., Piskareva Yu.K., Anastasiev V.V. Blood medicine. Instructive and methodological materials for control and production. Moscow; 1976 (In Russian).
7. Instruction for conducting donor intermittent plasmapheresis. The Ministry of Health of Russia, 23.09.2002 (In Russian).
8. Technical Regulations on blood safety requirements, its products, blood-substituting solutions and technical equipment used in transfusion-infusion therapy. Approved RF Government Decree of 26 January. 2010, № 29 (In Russian).
9. Billy D., Speijer H., Zwaal R.F.A., et al. Anticoagulant and membrane-degrading effects of secretory (non-pancreatic) phospholipase A2, are inhibited in plasma. *Thromb. Haemost.* 2002; 87: 978–84.
10. Yermolenko I.S., Lishko V.K., Ugarova T.P., Magonov S.N. High-resolution visualization of fibrinogen molecules and fibrin fibers with atomic force microscopy. *Biomacromolecules.* 2011; 12: 70–9.
11. Brown J.H., Volkmann N., Jun G., et al. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 85–90.
12. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., Weisel J.W. Forced unfolding of coiled-coils in fibrinogen by single-molecule AFM. *Biophys J.* 2007; 92: 39–41.
13. Brown A.E., Litvinov R.I., Discher D.E., et al. Multi-scale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science.* 2009; 325: 741–4.

Information about the authors

Vyacheslav V. Khurdin*, Postgraduate Researcher, MIREA — Russian Technological University, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, e-mail: khurdin90@gmail.com

Aron L. Berkovsky, Cand. Sci. (Med.), Consultant, National Research Center for Hematology,
e-mail: aron_56@mail.ru

Elena V. Sergeeva, Production Manager, NPO Renam “Society of Hemophilia Patients”,
e-mail: serg_helen@mail.ru

Alexander V. Suvorov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, NPO Renam “Society of Hemophilia Patients”,
e-mail: suvorov1983@mail.ru

* Corresponding author

Received 17 May 2018

Accepted 24 Dec 2018