

УДК 577.29

МЕМБРАННЫЕ РЕАКЦИИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ: КЛАССИЧЕСКИЙ ВЗГЛЯД И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

© 2024 г. Т. А. Коваленко^{a, b, *}, М. А. Пантелеев^{a, b, c}

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, 117997 Россия

^cМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: after-ten@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.04.2024

После доработки 16.05.2024

Принята к печати 17.05.2024

Для остановки кровопотери при повреждении кровеносного сосуда в живых организмах существует сложный механизм, называемый гемостазом. В этом процессе условно выделяют два тесно взаимосвязанных звена — сосудисто-тромбоцитарный и плазменный гемостаз. Плазменный гемостаз представляет собой систему протеолитических реакций, в которых участвуют белки плазмы крови, называемые факторами свертывания. Ключевой особенностью этой системы является протекание большинства ферментативных реакций на поверхности фосфолипидных мембран, что увеличивает их скорость до 5 порядков. В данном обзоре описываются основные механизмы связывания факторов свертывания с фосфолипидными мембранами, пути сборки комплексов и реакций активации, обсуждается роль мембран в этом процессе, их состав и источники. Связывание факторов свертывания с прокоагулянтными мембранами приводит не только к ускорению процессов свертывания, но также к их избирательному протеканию в определенных областях и защите от смывания потоком. Эффективность реакций свертывания регулируется составом внешнего слоя мембраны, преимущественно через специальный механизм митохондриально-управляемой некротической смерти тромбоцитов.

Ключевые слова: факторы свертывания, липиды, теназа, протромбиназа

DOI: 10.31857/S0233475524050063, **EDN:** cbkzdd

1. ВВЕДЕНИЕ

Для остановки кровопотери при повреждении кровеносного сосуда в многоклеточных организмах существует сложный механизм, называемый гемостазом. В этом процессе у позвоночных условно выделяют два тесно взаимосвязанных звена — сосудисто-тромбоцитарный и плазменный гемостаз [1, 2]. В первом участвуют стенки кровеносного сосуда и специализированные клетки крови тромбоциты [3, 4]. Главные участники второго — белки плазмы крови, называемые факторами свертывания, а также их разнообразные ингибиторы [5, 6].

Факторы свертывания представляют собой сериновые протеазы или их аллостерические активаторы — кофакторы. Они циркулируют в кровотоке в форме неактивных предшественников-зимогенов

и переходят в активные формы в результате ограниченного протеолиза другими факторами свертывания. Исключением является фактор VII, 1% которого циркулирует в активной форме фактора VIIa (суффикс «a» используется для обозначения активной формы фактора) [7]. Последовательность актов активации одного фактора другим носит название процесса свертывания крови.

Свертывание крови инициируется, когда плазма крови входит в контакт с внесосудистыми тканями организма, клетки которых экспрессируют интегральный мембранный белок тканевый фактор (TF), который присутствует на внешней мембране этих клеток [8, 9]. При этом TF связывает фактор VII (FVII) и фактор VIIa (FVIIa) из плазмы крови. В результате на поверхности клеточной мембраны формируется комплекс VIIa/TF, называемый внешней теназой, в котором FVIIa является

активной протеазой, а TF — его кофактором [8, 10]. Этот комплекс активирует факторы X и IX с образованием активных факторов Ха и IXa [11, 12]. Сами по себе Ха и IXa являются протеазами и способны медленно активировать протромбин с образованием тромбина и фактор X с образованием фактора Ха соответственно. Однако эти реакции многократно ускоряются в присутствии кофакторов Va и VIIIa, с которыми Ха и IXa образуют ферментативные комплексы протромбиназу (Ха/Va) и внутреннюю теназу (IXa/VIIIa) [13–16]. Образованный под действием протромбиназы тромбин активирует белок фибриноген с образованием фибрина, а полимеризация фибрина приводит к переходу плазмы крови из жидкого состояния в состояние геля, что препятствует ее вытеканию из сосуда [17] (рис. 1).

Альтернативный путь активации свертывания крови происходит по так называемому контактному механизму, который начинается с активации фактора XII при контакте с отрицательно заряженными поверхностями, активации фактора XI фактором XIIa и фактора IX фактором XIa [18–20] (рис. 1).

Система свертывания крови включает в себя многочисленные обратные связи. Так, тромбин, белок, который формируется на поздних стадиях системы свертывания, способен активировать факторы V и VIII, а фактор Ха активирует комплекс VII/TF в VIIa/TF [21–23] (рис. 1).

Помимо системы активации свертывания крови в плазме существует набор белков, служащий для ее ингибирования. Одним из основных ингибиторов является антитромбин (АТ), ингибитор практически всех протеаз системы свертывания включая тромбин, FXa и FIXa [24]. Кроме того, существует путь белка C, который способен расщеплять кофакторы Va и VIIIa, ингибируя протромбиназу и внутреннюю теназу. Кофактором для белка C является белок S, который усиливает его активность. Белок C активируется тромбином в комплексе с белком эндотелия тромбомодулином [25]. Ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) действует как на фактор Ха, так и на внешнюю теназу, связываясь с тройным комплексом VIIa/TF/Ха. При этом для ингибирования фактора Ха TFPI требуется белок S, который усиливает аффинность TFPI к фактору Ха [26]. Ингибирование фактора Ха также происходит по пути белка Z. Белок Z является кофактором для Z-зависимого протеазного ингибитора (ZPI), комплекс из этих белков быстро ингибирует фактор Ха [27] (рис. 1).

Ключевой особенностью реакций свертывания крови как активации, так и ингибирования, является то, что эти реакции преимущественно

происходят на поверхности фосфолипидных мембран, источником которых могут быть как клетки (например, активированные тромбоциты), так и фосфолипидные микрочастицы — везикулы. В силу сложности процессов на мембранах и нестабильности промежуточных комплексов вплоть до настоящего времени мембранные реакции являются наиболее плохо понятой частью свертывания крови. В последние годы активно появляются работы, указывающие на необходимость радикального пересмотра этих важных процессов. В настоящем обзоре приведены современные представления о структуре, составе и основных источниках таких мембран, о механизмах связывания и, соответственно, локализации на мембранах факторов свертывания и ключевых принципах формирования и функционирования белковых ферментативных комплексов на фосфолипидных мембранах.

2. СТРУКТУРА И СОСТАВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Различные мембраны в составе клеток (плазматическая мембрана, мембраны органелл) отличаются по липидному составу. Для всех этих мембран основными структурными липидами являются фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилэтаноламин (PE) [28, 29]. Однако мембрана митохондрий, в отличие от других мембран, содержит кардиолипин (CL) [30], а в плазматической мембране содержится самый высокий процент сфингомиелина (SM) и холестерина [29, 31].

Ключевой особенностью плазматической мембраны живых клеток является асимметричность состава и свойств двух липидных слоев в бислое [32, 33]. У эритроцита крови внешний слой мембраны состоит преимущественно из PC и SM [34, 35], хотя в нем также было обнаружено до 4% фосфатидилсерина (PS) [35]. Внутренний цитоплазматический слой состоит преимущественно из PC, PS, содержание которого доходит до 30% [35] и PE. Кроме того, фосфатидная кислота (PA), фосфатидилинозитол (PI) и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP2) также находятся преимущественно во внутреннем слое [34, 35]. Аналогичный состав слоев мембраны был описан для неактивированного тромбоцита [34]. Внешний и внутренний слой мембраны эритроцита отличаются входящими в их состав жирными кислотами [35]. Около 35% внешнего слоя составляют липиды с ненасыщенными жирными кислотами в их составе, а большинство (> 80%) липидов имеют ноль, одну или две двойные связи на молекулу липида. С другой стороны, во внутреннем слое большая часть липидов имеет 2 и более двойных связей на молекулу липида с 35%

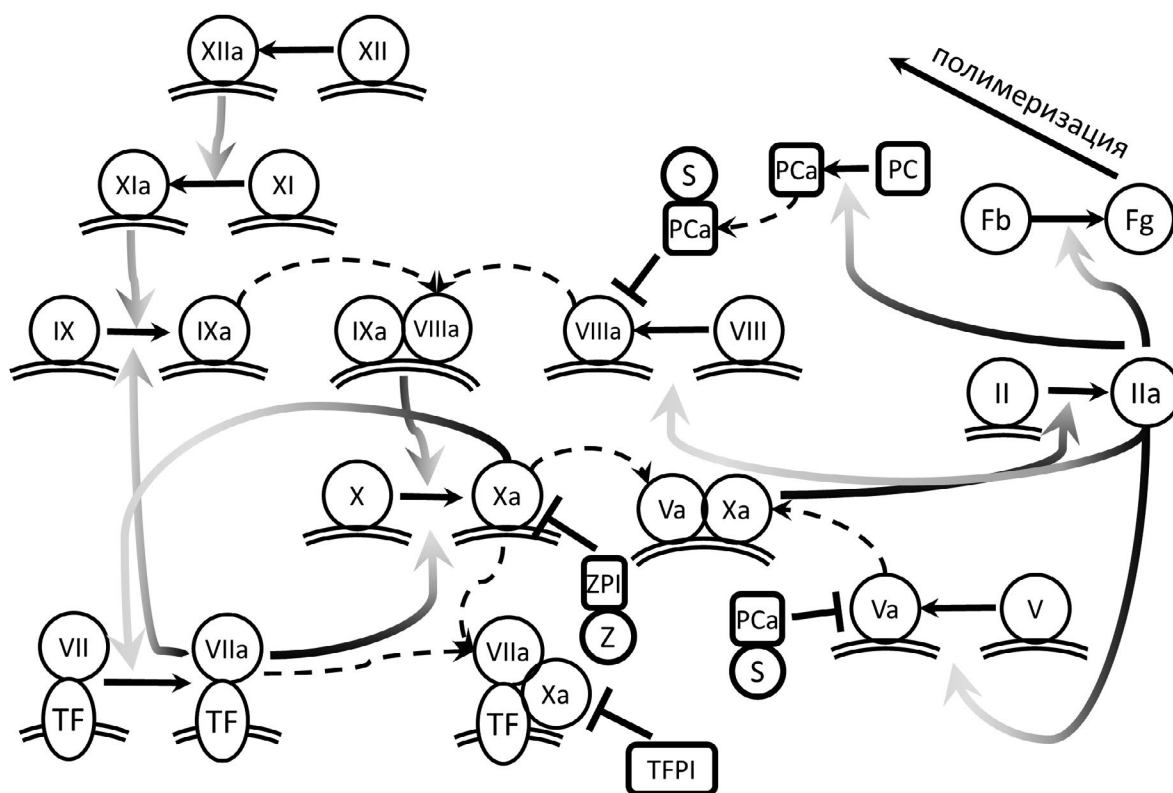


Рис. 1. Упрощенная схема реакций свертывания крови. Римскими цифрами обозначены факторы свертывания (V, VII, VIII, IX, X, XI, XII), суффикс «a» используется для обозначения активной формы. II – протромбин, Fb – фибриноген, Fg – фибрин, TFPI – ингибитор пути тканевого фактора, TF – тканевый фактор, S, Z – белки S и Z, PCa – активированный белок C. Двойная черная линия – схематическое изображение мембраны. Черные стрелки – каталитическая активация, черные пунктирные стрелки – формирование комплексов, серые градиентные стрелки – действие ферментативного комплекса или фермента на субстрат, —|— ингибирование. Во избежание перегруженности на схеме не указано ингибирование факторов свертывания антитромбином и медленные реакции активации факторов энзимами без кофакторов.

липидов, имеющими 4 двойные связи на молекулу [35]. Отличия в составе слоев ведут к различиям их физических свойств. Внешний слой является менее текучим, липиды в нем имеют меньший коэффициент диффузии и более плотно упакованы по сравнению с внутренним слоем [35].

Асимметрия плазматической мембраны имеет большое значение для правильного функционирования клетки. Высокое процентное содержание PS на внутреннем слое, а также присутствие PIP₂, позволяет ключевым внутриклеточным сигнальным молекулам связываться с мембраной с помощью разнообразных мембраносвязывающих доменов в их составе [36, 37]. Так, различные белки из группы протеин киназ C (PKC) связываются с мембранами, содержащими PS, PA и PIP₂, и такое связывание необходимо для их активации [38, 39]. Кроме того, асимметрия распределения PS в мембране облегчает включение трансмембранных белков в мембрану [40].

Асимметрия липидного бислоя активно поддерживается в живой клетке АТФ-зависимыми флиппазами, которые переносят PS и PE с внешнего слоя на внутренний [41]. В тромбоците это, предположительно, флиппазы АТР11А и АТР11С [41, 42]. Флиппазы ингибируются, если в цитозоле повышается концентрация ионов Ca²⁺ в результате активации тромбоцитов различными агонистами. В этих условиях активируются скрамблазы (в тромбоците TMEM16F), которые перемешивают липиды в мембране, что приводит к появлению PS и PE на внешней стороне мембраны тромбоцита [42]. Такое нарушение асимметрии наблюдалось при активации тромбоцитов тромбином, когда PS/PI детектировались на внешнем слое мембраны, а также на поверхности липидных микровезикул тромбоцитарного происхождения [34].

Поверхность PS-содержащей мембраны служит платформой для формирования каталитически активных комплексов системы свертывания крови.

Такие поверхности являются эффективным «ускорителем» ферментативных реакций и критически необходимы для быстрого их срабатывания [43].

3. СТРУКТУРА ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ И МЕХАНИЗМЫ ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С МЕМБРАНОЙ

3.1. Витамин К-зависимые белки

Семь факторов свертывания и факторов, участвующих в ингибировании, являются витамин К-зависимыми белками, названными так по причине необходимости витамина К для их правильного биосинтеза и функционирования [44]. В число таких факторов входят VII, IX, X, протромбин (PT), а также белки C, S и Z (рис. 2а).

Факторы VII, IX, X и белок C имеют одинаковое доменное строение (рис. 2а) [8, 45]. За N-концевым Gla-доменом в их составе следуют два EGF-подобных домена и C-концевой протеазный домен. Белок Z отличается тем, что вместо протеазного домена в его состав входит псевдо-каталитический домен, в котором отсутствует каталитическая триада (гистидин и серин заменены на аланин и треонин соответственно) [27]. В состав белка S входят Gla-домен, тромбин-чувствительная область (TSR), четыре EGF-подобных домена и два ламинин G-подобных домена [46]. Протромбин состоит из Gla-домена, двух крингл-доменов и протеазного домена (рис. 2а) [47]. Активные формы перечисленных факторов имеют схожее с неактивными доменное строение, за исключением тромбина [8, 48, 49]. При активации от протромбина отрезается фрагмент-1,2, который содержит Gla-домен и два крингл-домена [49]. Таким образом, тромбин теряет способность связываться с мембраной.

В растворе витамин К-зависимые белки имеют достаточно вытянутую конформацию (рис. 2б). Так, расстояние от Gla-домена до каталитической триады фактора X составляет 95Å, а фактора Ха — 83Å [50].

Молекулярно-динамические исследования показали, что отдельные домены факторов VIIa, X и Ха являются жесткими структурами [50, 51]. Однако Gla-, EGF1- и EGF2-домены демонстрируют высокую подвижность друг относительно друга [50, 51], что делает структуру факторов VIIa, X и Ха гибкой в растворе.

Протромбин в растворе существует в двух конформациях, находящихся в состоянии равновесия. Первая конформация — «закрытая» (70% молекул), в которой протеазный домен взаимодействует с крингл-1-доменом с помощью аминокислотных

остатков Tyr93 и Trp547, не подвержена автоактивации. Вторая конформация — «открытая», в которой протеазный и крингл-1-домены не взаимодействуют и которая подвержена автоактивации [47].

Витамин К-зависимые белки обладают способностью обратимо и зависимо от ионов Ca^{2+} связываться с фосфолипидными мембранами при помощи Gla-доменов, входящих в их состав. Gla-домены разных белков схожи как по аминокислотной последовательности, так и по третичной структуре [52–54], причем высокая степень гомологичности наблюдается не только для различных витамин К-зависимых белков человека, но и между белками различных видов. Так, аминокислотные последовательности Gla-доменов фактора IX человека, мыши, быка и крысы идентичны более чем на 90% [54]. Такая высокая консервативность Gla-доменов свидетельствует о критической значимости этой структуры для функционирования белков. Структуры Gla-доменов фактора VII человека и протромбина быка приведены на рис. 2в. Несмотря на то что белки принадлежат организмам разных видов, структуры очень близки ($\text{RMSD} = 3.31 \text{ Å}$).

В состав Gla-доменов витамин К-зависимых белков входит от 9 до 13 нестандартных аминокислотных остатков, γ -карбоксиглутаматов, которые обладают способностью связывать ионы Ca^{2+} (рис. 2в) [52]. Связывание Ca^{2+} критически важно для поддержания структуры белка и его функционирования, так как в отсутствие ионов Ca^{2+} Gla-домен становится разупорядоченным, теряя сложную третичную структуру и способность к связыванию с мембраной [55–57]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, с Gla-доменом ассоциированы 7–8 ионов Ca^{2+} (рис. 2в) [58–60]. У фактора IX и белка C в присутствии ионов магния три (для фактора IX) или два (для белка C) сайта связывания Ca^{2+} на поверхности Gla-домена заняты Mg^{2+} . Пять сайтов при этом заняты Ca^{2+} [61, 62]. Аналогично в Gla-доме фактора VIIa 3 сайта заняты Mg^{2+} и 4 сайта — Ca^{2+} , причем при высоких концентрациях Ca^{2+} один из сайтов магния оказывается занят кальцием [62].

Согласно молекулярно-динамическим исследованиям, Gla-домены достаточно глубоко встраиваются в фосфолипидный бислой. Гидрофобные аминокислотные остатки, расположенные в нижней части Gla-домена (для фактора VII это Phe4, Leu5, Leu8), проникают ниже уровня фосфатов в полярных головках фосфолипидов [53]. При этом между белком и липидами формируются несколько типов взаимодействий. С ионами Ca^{2+} белка взаимодействуют группы COO^- и фосфаты липидов; положительно-заряженные аминокислотные

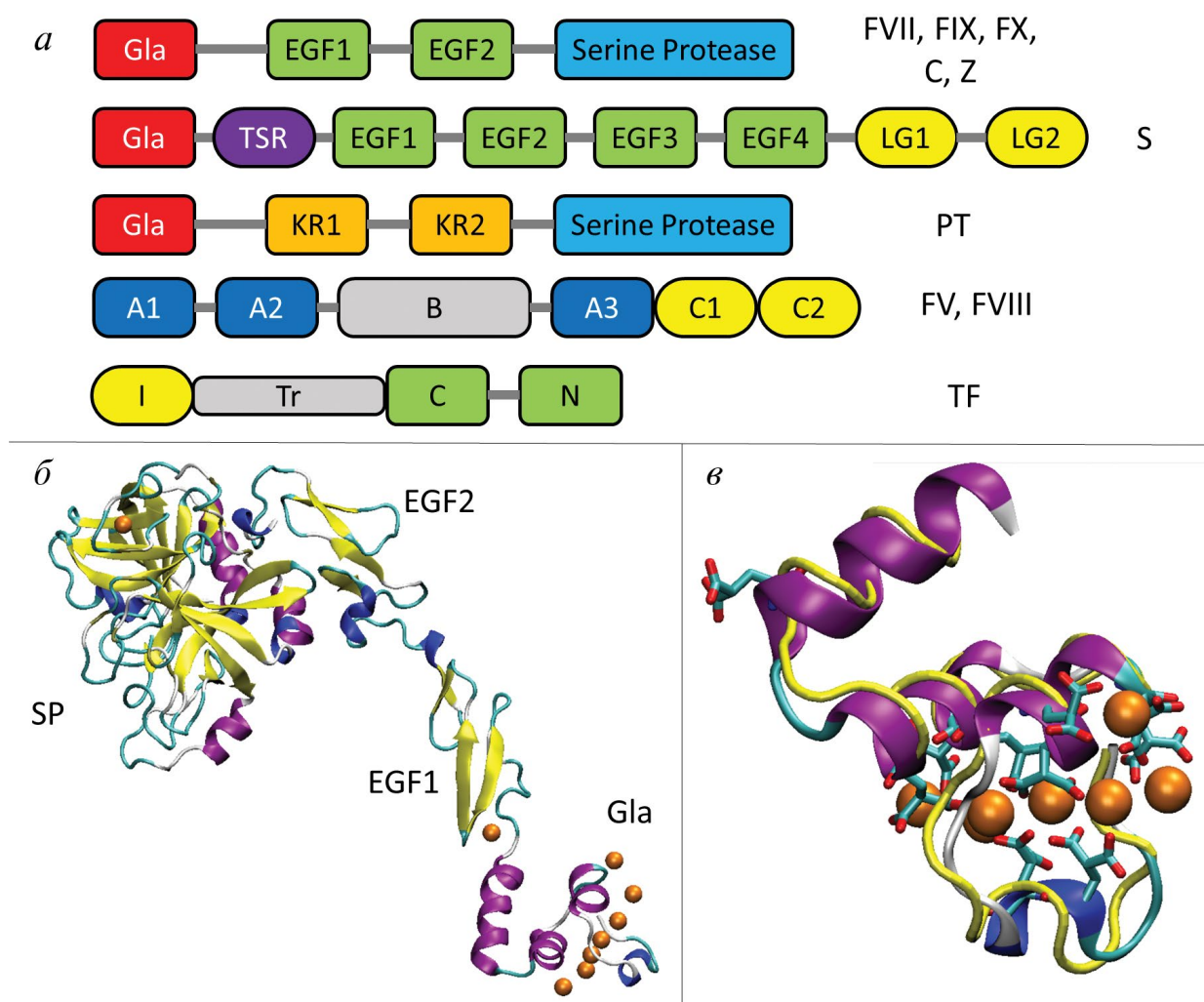


Рис. 2. Структура белков системы свертывания крови.

а – Схема доменного состава отдельных белков. Gla – Gla-домен; EGF1-4 – EGF1-4-домен; Serine Protease – протеазный домен; TSR – тромбин-чувствительная область; LG – ламинин G-подобные домены; KR – крингл-домены; A1-3 – A1-3-домен; C1,2 – C1,2-домен; B – B-домен; I – внутриклеточный домен; Tr – трансмембранный домен; N, C – N- и C-концевые внеклеточные домены.

б – Структура фактора VIIa. Визуализирована в VMD, PDB 1dan [59]. Цвета в соответствии с вторичной структурой белка. Голубой – поворот; желтый – β -лист; фиолетовый – α -спираль; синий – 3_{10} -спираль; белый – нерегулярная структура; рыжий – ионы Ca^{2+} .

в – Gla-домены фактора VIIa человека (цвета в соответствии с вторичной структурой как на панели б, PDB 1dan) и протромбина быка (желтый, PDB 1n12 [58]). Структуры выровнены в VMD, RMSD (среднеквадратичное отклонение между соответствующими атомами основных цепей) = 3.31 Å. У фактора VIIa визуализированы остатки γ -карбоксиглутамата, связанные с ионами Ca^{2+} .

остатки Gla-домена взаимодействуют с группами COO^- и фосфатами липидов [53, 63, 64].

3.2. Факторы V и VIII

Факторы V и VIII после активации тромбином и перехода в формы факторов Va и VIIa являются аллостерическими активаторами (кофакторами) для сериновых протеаз, факторов Xa и IXa соответственно. Эти факторы имеют схожую доменную структуру (рис. 2а): состоят из доменов A1, A2, B, A3, C1 и C2 [65–67].

В плазме крови фактор VIII присутствует в виде гетеродимера из тяжелой (A1-A2-B) и легкой (A3-C1-C2) цепей [67, 68]. Гетеродимер циркулирует в связанном с фактором фон Виллебранда (vWF) состоянии, что удлиняет время его жизни в плазме и предохраняет от протеолитической деградации, причем каждый мономер vWF способен связывать 1 молекулу фактора VIII [66, 69]. В связывании с vWF участвуют C1, C2 и A3 домены фактора VIII [69]. При активации тромбином протеолиз осуществляется в сайтах Arg372, Arg740

и Arg1689, что приводит к вырезанию В домена фактора VIII и диссоциации от vWF [67]. Активная форма фактора VIII, фактор VIIa, является гетеротримером из цепей A1, A2 и A3-C1-C2.

Фактор VIIa является нестабильной молекулой из-за слабых взаимодействий домена A2 с другими доменами и подвержен спонтанной диссоциации с потерей кофакторной активности [70].

Факторы VIII/VIIa связываются с мембраной независимым от Ca^{2+} образом [71] с помощью C1- и C2-доменов [72]. C2-домен является достаточно подвижным относительно остальной структуры фактора VIII. Так, при помощи рентгеноструктурного анализа были обнаружены две конфигурации C2-домена, одна из которых была повернута на $35\text{--}45^\circ$ вокруг центральной оси относительно другой [73]. Предполагается, что переход C2-домена из одной конформации в другую играет роль при связывании с мембраной [73]. В молекулярно-динамическом исследовании было, напротив, показано, что C2-домен встраивается в мембрану, сохраняя примерно один и тот же угол наклона к ней, в то время как C1-домен демонстрирует большой разброс углов наклона к мембране и менее упорядоченную структуру [71]. Такие структурные перестройки доменов C1 и C2 могут быть причиной тех двухступенчатых связывания и диссоциации фактора VIII с наличием быстрой и медленной стадий, которые наблюдаются в эксперименте [74].

Фактор V является одноцепочечным гликопротеином, из которого при активации тромбином в сайтах Arg709, Arg1018 и Arg1545 вырезается В-домен. Образующийся при этом фактор Va является двухцепочечным белком [75]. В плазме фактор V циркулирует в концентрации 20 нМ, а также примерно 20% фактора V содержится в α -гранулах тромбоцита частично в комплексе с белком мультемером [76].

В связывании с мембраной, как и в случае фактора VIII, участвуют домены C1 и C2 фактора V/Va [77, 78]. При этом в мембраносвязанных доменах происходят структурные перестройки [79].

3.3. Трансмембранный белок – тканевый фактор

Тканевый фактор (TF) является интегральным мембранным белком, состоящим из четырех доменов: внутриклеточного (остатки 243–263), трансмембранного (220–242) и двух N-концевых внеклеточных иммуноглобулин-подобных доменов (1–219) [80]. Согласно классическим представлениям, TF экспрессируется клетками организма вне кровеносного сосуда, например, фибробластами адвентициальной оболочки артерий, при

этом формируя так называемую «гемостатическую оболочку» вокруг сосудов [81]. При повреждении эндотелия кровь входит в контакт с этой оболочкой, что запускает процесс свертывания.

Однако согласно более новым данным, молекулы TF всегда присутствуют в кровотоке. Так, в плазме TF существует в виде его растворимой формы, продукта альтернативного сплайсинга asTF, состоящей из 206 аминокислот, из которых 166 те же, что и у полноразмерного белка, но за которыми следует уникальная C-концевая последовательность (остатки 167–206) [82]. AsTF имеет ненулевую прокоагулянтную активность в присутствии фосфолипидов, детектируется в растущих тромбах [82, 83], хотя, по всей видимости, не играет существенной роли в нормальном гемостазе [84, 85]. Повышенные концентрации asTF экспрессируются в клетках опухолей при онкологических заболеваниях, и в этих клетках asTF участвует в путях внутриклеточной сигнализации, связанных с пролиферацией и выживанием (для подробной информации см. [85]).

Полноразмерный трансмембранный TF присутствует на поверхности различных клеток крови. TF экспрессируется активированными нейтрофилами [86–88], активированными моноцитами [89], тромбоцитами, активированными ADP, тромбоксаном A2, коллагеном и тромбином [90–92]. В неактивированных тромбоцитах TF присутствует в альфа-гранулах и в открытой каникулярной системе [92], небольшие концентрации TF, вероятно, присутствуют на их поверхности [91]. TF также присутствует на поверхности фосфолипидных микровезикул в плазме крови, хотя TF-зависимая прокоагулянтная активность таких микровезикул у здоровых доноров была поставлена под сомнение [93].

Поскольку TF постоянно присутствует в крови, интересным кажется вопрос, каким образом кровь сохраняет жидкое состояние, находясь в постоянном контакте с активатором свертывания. Среди возможных причин можно отметить то, что TF на поверхности клеток присутствует в неактивном («encrypted») состоянии, и активация («decryption») необходима для появления прокоагулянтной активности. В активации TF участвуют как мембранные процессы (например, присутствие SM на внешнем слое мембраны приводит к неактивному состоянию TF, а гидролиз SM вызывает его активацию [94]), так и структурные изменения TF [95].

3.4. Кинетика и механизмы связывания факторов свертывания с мембраной

Согласно классическим представлениям, факторы свертывания обладают способностью обратимо связываться с PS-содержащими фосфолипидными мембранами, причем аффинность связывания возрастает с процентным содержанием PS. Подобные данные были получены как с использованием фосфолипидных везикул [96–99], так и липидных нанодисков [100] – бислойных мембранных дисков контролируемого диаметра порядка 10 нм [101, 102]. Несмотря на то что Gla-домены различных витамин К-зависимых белков очень консервативны, их аффинность к мембранам одного состава отличается на порядки [52].

Исследования мембран, содержащих PE, фосфатидилглицерол (PG), PI, PA и CL, показали, что эти липиды также играют роль в связывании витамин К-зависимых белков с мембраной. Так, при увеличении процентного содержания PS в мембране от 20 до 70% (остальные липиды – PC) равновесная константа диссоциации (K_d) фактора X с мембраной монотонно падает. Однако при добавлении в состав мембраны PG, K_d для мембраны состава 20% PS/40% PG/40% PC достигала тех же значений, что и для мембраны состава 50% PS/50% PC [103], то есть PG способствовал лучшему связыванию фактора X с мембраной. Аналогично для всех витамин К-зависимых факторов наблюдалось усиление их связывания при добавлении PE в состав нанодиска, причем усиление было тем заметнее, чем ниже процентное содержание PS [100]. Наличие PE значительно улучшало связывание фактора VIII с мембраной, содержащей 4% PS, и уменьшало до 1% количество PS в мембране, необходимое для детектируемого связывания с ней фактора VIII (в отсутствие PE для связывания с мембраной было необходимо не меньше 8% PS) [104]. Исходя из таких данных, была сформулирована гипотеза ABC (с английского «Anything But Choline», или «что угодно, кроме холина»), согласно которой при связывании факторов с мембраной Gla-домены взаимодействуют не только специфично с полярными группами PS, но и с фосфатами, предоставляемыми всеми типами фосфолипидов. Такой тип связывания наблюдался в молекулярно-динамических исследованиях (см. предыдущие секции). PC, в отличие от PE и других липидов, имеет очень объемную головную группу, которая затрудняет доступ к фосфатам, поэтому связывание с мембранами из 100% PC не наблюдается [103].

Фактор VIIa и белок C имеют достаточно низкую аффинность к PS-содержащим мембранам, однако

значительно лучше связываются с мембранами, содержащими PA [105]. Причиной этого может быть более глубокое погружение Gla-домена фактора VII в мембрану PA/PC по сравнению с PS/PC и большее количество контактов белка с фосфатами в PA/PC [53]. Кроме того, в специфичности к PA, по всей видимости, играет роль положительно-заряженный Lys32, на месте которого у факторов X, IX и протромбина находится γ -карбоксиглутамат [53].

Аффинность некоторых из факторов свертывания к фосфолипидным микровезикулам зависит от размера везикулы. Так, легкая цепь фактора V связывается с везикулами меньшего радиуса с более чем на порядок меньшей K_d по сравнению с везикулами большего радиуса [106]. Одной из причин является более быстрая кинетика связывания с маленькими везикулами из-за диффузионных эффектов [107]. Для протромбина было показано, что K_d связывания растет в 8 раз при росте диаметра везикулы от 27.5 до 330 нм [108]. При этом кинетическая константа связывания уменьшается, но для всех радиусов везикул остается в пределах 25% от значения константы скорости столкновений между частицами, рассчитанной по формуле Смолуховского [108], то есть в этом случае изменение аффинности к мембранам происходит не по причине диффузионных эффектов, а из-за отличий в структуре мембран. Аналогичная зависимость параметров связывания от радиуса кривизны мембраны была предсказана теоретически для факторов X/Xa [109]. В последних исследованиях по связыванию факторов свертывания с мембраной факторы Va и Xa селективно связывались с выпуклыми мембранами радиуса кривизны порядка 10 нм и формировали на них протромбиназу [110].

Интересно, что селективное связывание с мембранами различной топологии демонстрируют не только факторы свертывания. Так, лактадгерин и аннексин A5, белки, часто используемые как маркеры для детекции PS на поверхности клеток [111], обладают такой селективностью. Лактадгерин, присутствующий в молоке и выполняющий ряд функций, среди которых участие в фагоцитозе апоптотических PS-экспрессирующих клеток [112], преимущественно связывается с выпуклыми мембранами большей кривизны [110, 112]. С другой стороны, аннексин A5, который участвует в процессах восстановления мембраны при ее повреждении, лучше связывается с плоскими липидными слоями [110, 113]. Зависимость аффинности к мембране от радиуса кривизны демонстрирует комплекс C5b-7 системы комплемента [114].

Для факторов свертывания характерно неравномерное связывание с поверхностью клеток. На

поверхности активированных эндотелиальных клеток протромбиназа из факторов Va и Xa в основном локализуется на филоподиях, вероятно, из-за большей кривизны их поверхности [110]. На поверхности сильно активированных прокоагулянтных тромбоцитов факторы IXa, X, Va, VIII и протромбин, а также фактор XIII, фибрин/фибриноген и плазминоген концентрируются в так называемых «шапках» — сложных выпуклых структурах, состоящих из мембранных везикул, оргanelл и складок, диаметром в 2 мкм на поверхности тромбоцита (рис. 3) [115–118]. Такое концентрирование факторов на небольшой площади способно привести к значительному ускорению реакций свертывания — до двух порядков [115].

Кинетика связывания факторов свертывания с поверхностью мембраны может быть гораздо сложнее, чем простой одноступенчатый процесс. Так, фактор VIII и фактор IX могут формировать димеры на поверхности мембраны [99, 119]. Димеры фактора Xa формируются как в присутствии растворимой формы PS, C6PS [120], так и на поверхности мембраны [121], причем димеризация фактора Xa происходит одинаково на больших и маленьких везикулах и конкурирует с формированием протромбиназы [122]. Димеризация (или даже мультимеризация) фактора Xa приводит к «гистерезис-подобному» связыванию с мембраной с формированием более плотно связанной фракции белка, которая диссоциирует гораздо медленнее [123]. Предполагается, что такой механизм предохраняет факторы от вымывания потоком из тромба [123]. При связывании с поверхностью нанодисков, изотермы связывания факторов S и Z имели форму сигмoиды, что также может

свидетельствовать о более сложном механизме связывания [105].

Таким образом, связывание факторов свертывания с мембраной является строго регулируемым процессом. В его результате факторы локализуются на мембранах подходящего состава и концентрируются в некоторых их областях, что приводит к значительному ускорению ферментативных реакций системы свертывания крови.

4. ФОРМИРОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ НА МЕМБРАНЕ И ВОПРОСЫ ИХ РЕГУЛЯЦИИ

Три основных ферментативных комплекса, принимающих участие в свертывании крови — внешняя теназа, внутренняя теназа и протромбиназа, очень похожи по основным принципам своего формирования и функционирования. Все эти комплексы состоят из двух субъединиц — фермента и его аллостерического активатора кофактора. При этом изолированный фермент, фактор VIIa, IXa или Xa, демонстрирует пренебрежимо малую активность в растворе и в отсутствие кофактора [124, 125]. Комплексы локализуются на поверхности фосфолипидных мембран, которые существенно ускоряют процесс каталитической активации их субстратов.

4.1. Внешняя теназа: комплекс из фактора VIIa и TF

В комплексе внешней теназы фактор VIIa является активным ферментом, а TF — его кофактором (рис. 4a). Кристаллическая структура комплекса из внеклеточного домена тканевого фактора

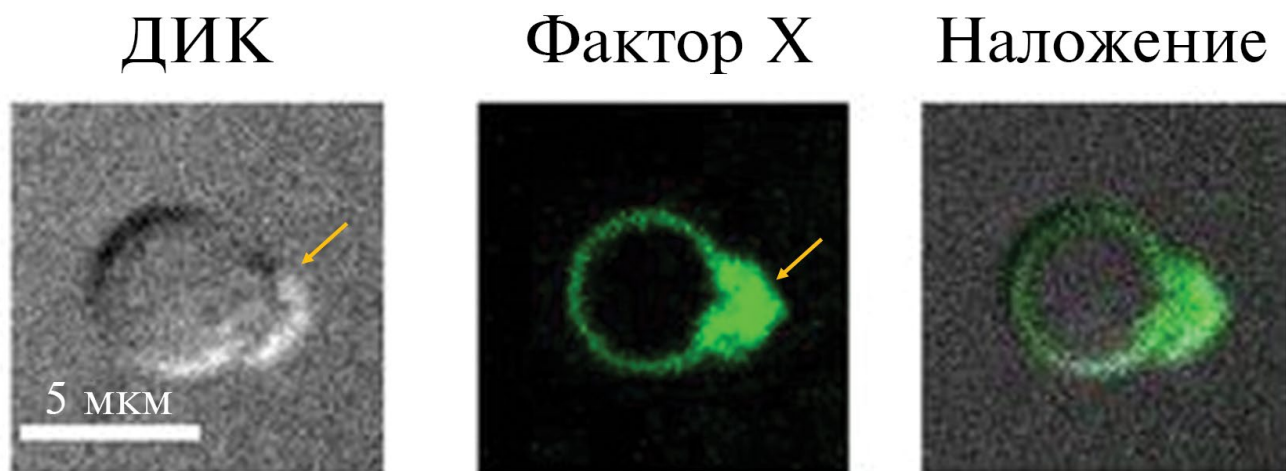


Рис. 3. Концентрирование факторов свертывания в «шапке» тромбоцита. ДИК — изображение, полученное методом дифференциально-интерференционного контраста; в центре (Фактор X) — эпифлуоресцентное изображение в канале фактора X, справа (Наложение) — наложение первых двух изображений. Желтая стрелка отмечает «шапку» [115].

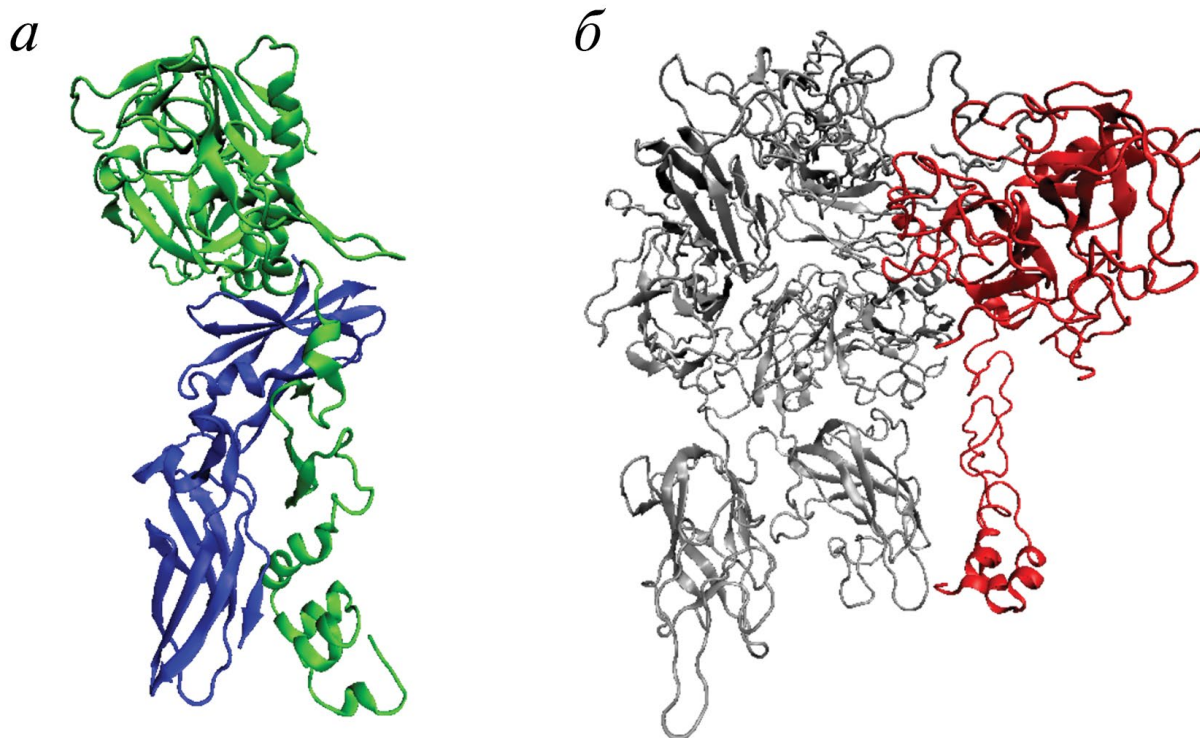


Рис. 4. Структуры ферментативных комплексов. *а* – Внешняя теназа. Зеленый – фактор VIIa; синий – TF. Визуализирована в VMD, PDB 1dan [59]. *б* – Протромбиназа. Серый – фактор Va; красный – фактор Ха. Визуализирована в VMD, PDB 7tpq [13].

и фактора VIIa была получена методом рентгено-структурного анализа [59], а тройного комплекса с фактором X – методом молекулярного докинга [126].

Внешняя теназа образуется при связывании фактора VIIa с TF. TF, являющийся достаточно жесткой молекулой, существенно ограничивает подвижность фактора VIIa, локализуя его активный сайт над мембраной [51]. Оценки K_d для связывания VIIa с мембраносвязанным TF варьируются в пределах 7–56 пМ [101, 127–129], и связывание практически не зависит от состава мембраны [127]. Однако K_d для связывания VIIa с изолированным внеклеточным доменом TF (аминокислоты 1–219) в отсутствие мембраны достигает приблизительно 10 нМ [127, 128, 130], что на 2 порядка превышает K_d для мембраносвязанного TF. Это подчеркивает критическую важность белок-липидных взаимодействий для эффективного формирования ферментативных комплексов свертывания крови.

Механизм формирования внешней теназы может быть сложнее, чем простой одноступенчатый процесс. Так, было предложено, что внешняя теназа формируется по сложному пути, когда фактор VIIa сначала связывается с мембраной, а потом мембраносвязанный VIIa связывается с TF [131]. Более поздние исследования с использованием математического моделирования показали, что

данные [127] по независимости формирования комплекса от состава мембраны можно описать только если исходить из предположения, что TF связывает VIIa напрямую из раствора [109].

На эффективность функционирования внешней теназы большое влияние оказывает состав фосфолипидной мембраны. Скорость активации фактора Ха растет с процентным содержанием PS в двухкомпонентных мембранах (PS/PC) [101, 132]. PE, PI, PA и PG в составе мембраны повышают эффективность активации фактора X и понижают процентное содержание PS, необходимое для максимальной эффективности внешней теназы. Так, добавление в состав мембраны 40% PE понижает до 6% содержание PS, необходимое для максимальной эффективности активации (без PE максимальная эффективность достигалась при 15% PS) [132]. Такой же эффект наблюдался при добавлении PI, PG и CL [132]. С другой стороны, присутствие сфингомиелина (SM) оказывает ингибирующее действие на внешнюю теназу, при этом не влияя на связывание фактора VIIa с TF [94, 132, 133]. В ингибирующем действии SM ключевую роль играют его ОН-группы и более плотная упаковка такой мембраны по сравнению с PS/PC мембранами [133].

Активность внешней теназы зависит от концентрации фосфолипидов в системе. Наблюдаемая каталитическая константа ($k_{кат}$) росла, а константа Михаэлиса (K_m) падала при росте концентрации фосфолипидов, приходящихся на 1 молекулу TF [134, 135]. Предполагается, что причиной такого изменения эффективности является то, что внешняя теназа преимущественно связывает и активирует фактор X, который предварительно связался с мембраной [134]. Похожие данные с таким же выводом относительно предпочтительного пути доставки субстрата были получены ранее [136]. Однако, согласно другим данным, основным путем формирования тройного комплекса является связывание фактора X напрямую из раствора [137], и этот путь доставки способен поддерживать значительные скорости активации фактора X [101]. В нашем исследовании при помощи математического моделирования было показано, что путь доставки фактора X к внешней теназе может зависеть от условий протекания реакции. Так, при поверхностных плотностях TF $< 2.8 \times 10^{-3}$ нмол/см² фактор X связывается с внешней теназой преимущественно с поверхности мембраны, однако при больших поверхностных плотностях TF начинает преобладать доставка из раствора, причем, в соответствии с экспериментальными данными [101], этот путь способен поддерживать сравнимые с мембранным путем скорости активации [138]. Наличие в системе белков, которые способны конкурировать с фактором X за сайты связывания на мембране, «переключает» внешнюю теназу на активацию фактора X из раствора, причем эффект тем сильнее, чем ниже концентрация фактора X и выше аффинность молекулы-конкурента к мембране [138].

4.2. Внутренняя теназа: комплекс из факторов IXa и VIIa

В комплексе внутренней теназы фактор IXa является активным ферментом, а VIIa — его кофактором. В отсутствие фактора VIIa фактор IXa демонстрирует очень низкую каталитическую активность даже относительно простых синтетических субстратов. Вероятная причина этого — наличие в его структуре аутоингибирующей части, 99-петли, которая стерически блокирует доступ к его активному сайту [139, 140]. Связывание с фактором VIIa и X приводит к реорганизации 99-петли и значительному увеличению протеолитической активности [141].

Структура внутренней теназы на поверхности мембраны была получена методом малоуглового рентгеновского рассеяния в сочетании

с компьютерным моделированием [16], а также методом молекулярного докинга [142]. Все домены факторов IXa и VIIa участвуют в формировании этого комплекса, кроме, вероятно, одного из C-доменов.

Скорость активации фактора X внутренней теназой имеет колоколообразную зависимость от концентрации фосфолипидов — реакция ингибируется большой площадью мембраны [15]. Аналогичная форма зависимости была предсказана в модели внешней теназы по причине значительного сокращения поверхностных плотностей фермента и субстрата при больших концентрациях фосфолипидов [138].

Для внутренней теназы, как и для внешней, предпочтительные пути формирования комплекса и доставки к нему субстрата зависят от условий протекания реакции. При малых концентрациях фосфолипидов играет роль связывание факторов IXa и X напрямую из раствора, а при избытке фосфолипидов комплексы формируются из мембраносвязанных факторов [143]. При этом большую роль играет формирование комплекса кофактор—субстрат (VIIa—X) [15, 143].

В случае внутренней теназы поверхность мембраны является эффективным «предохранителем» для фактора VIIa от спонтанной диссоциации. Так, при малых концентрациях липидов (0.5 мкМ) больше 80% фактора VIIa инактивировалось за первые несколько минут реакции, когда меньше 5% фактора X было активировано. С другой стороны, при больших концентрациях липидов (32 мкМ) быстрая инактивация фактора VIIa начинается тогда, когда практически весь доступный фактор X уже активирован [143].

4.3. Протромбиназа: комплекс из факторов Xa и Va

В комплексе протромбиназы фактор Xa является активным ферментом, а Va — его кофактором (рис. 4б). Структура этого комплекса была получена при помощи гомологичного моделирования на основе кристаллической структуры протромбиназы из змеиного яда [144] и при помощи криоэлектронной микроскопии в связанном с нанодиском состоянии [13]. Помимо этого, была получена структура тройного комплекса с субстратом протромбиназы протромбином [13].

При активации протромбина основная цепь белка должна расщепляться в двух местах: в Arg271 и Arg320, после чего образуется двухцепочечный тромбин. При расщеплении только Arg271 образуется неактивный предшественник протромбин-2, а при расщеплении только Arg320 — активный

предшественник мейзотромбин [145]. Открытая форма протромбина активируется преимущественно по пути Arg271 через претромбин-2, а закрытая — через Arg320 и мейзотромбин [146]. Интересно, что в различных условиях протекания реакции протромбин активируется разными способами. Так, в растворе и в отсутствие фактора Va [14, 145], а также на поверхности тромбоцитов [147] активация идет по пути претромбина-2 через разрезание Arg271. С другой стороны, на поверхности синтетических микровезикул [147] и эритроцитов [148] активация идет по пути мейзотромбина и разрезание Arg320. Такие данные позволяют предположить, что топология поверхности и ее липидный состав могут влиять на предпочтительные конформации белков и преобладающий путь активации.

Зависимость скорости активации протромбина от концентрации липидов имеет колоколообразную форму [149]. Для эффективной активации необходимо формирование липидного бислоя, так как мембрана в форме везикул поддерживает реакцию гораздо эффективнее, чем растворимые формы липидов [150, 151]. Увеличение скорости реакции с площадью фосфолипидной поверхности коррелирует с предположениями, что протромбиназа собирается из факторов Va и Xa, которые предварительно связались с мембраной [152], а также активирует мембраносвязанный протромбин [149, 153]. Однако данные результаты по молекулярным механизмам формирования комплексов были получены в условиях избытка фосфолипидной поверхности, поэтому вполне вероятно, что в других условиях протекания реакции пути сборки могут переключиться на факторы Xa и протромбин в растворе, как это было у внешней и внутренней теназы.

Интересно, что зависимость скорости активации протромбина от концентрации протромбиназы также имеет колоколообразную форму, то есть реакция ингибируется высокими концентрациями фермента [149].

Функционирование протромбиназы зависит от состава фосфолипидной поверхности. Так, скорость активации протромбина растет с ростом процентного содержания PS в везикулах из PS/PC [151, 154]. При этом добавление PE сокращает количество PS, нужное для достижения максимальной активности [151, 154, 155], а SM, наоборот, имеет ингибирующее действие [154, 156], причем эффект тем сильнее, чем больше процентное содержание этих липидов.

4.4. Общие вопросы регуляции ферментативных комплексов

Таким образом, у ферментативных комплексов внешней/внутренней теназы и протромбиназы схожие механизмы функционирования. Они имеют качественно идентичную зависимость скорости активации субстратов от концентрации и состава фосфолипидов, предпочтительно активируют мембраносвязанный субстрат в случаях, если нет большого дефицита мембранной поверхности. Однако в случае дефицита фосфолипидов, могут переключиться на субстрат из раствора.

Лактадгерин обладает способностью ингибировать внутреннюю теназу и протромбиназу более чем на 98% их активности [157]. Причиной такого сильного ингибирования может быть не столько нарушение мембранного пути доставки субстрата, сколько сопутствующее нарушение формирования ферментативного комплекса и вытеснение его с мембраны. Интересно, что эффект лактадгериина на внешнюю теназу (которую, по всей видимости, нельзя полностью вытеснить с мембраны, так как TF является интегральным мембранным белком) несколько слабее [157].

Важной особенностью факторов свертывания является зависимость их связывания с мембранами от радиуса кривизны мембран — связывание более сильное и более быстрое с везикулами меньшего радиуса (см. предыдущие секции). Такая зависимость связывания коррелирует с большей эффективностью меньших везикул в реакциях активации фактора X и протромбина внутренней теназой и протромбиназой соответственно [157], и в 50–100 раз большей прокоагулянтной активностью тромбоцитарных микровезикул по сравнению с тромбоцитами [158]. Однако в исследовании при помощи компьютерного моделирования было показано, что зависимость связывания факторов от радиуса фосфолипидных везикул приводит лишь к 25% изменению скорости активации фактора X внешней теназой [109], то есть эффект несколько слабее, чем наблюдается в эксперименте [157]. Таким образом, причины наблюдаемых различий больших и маленьких везикул могут состоять не только в разном связывании факторов свертывания, но и во влиянии на структуру и каталитическую активность комплексов.

Еще одной важной особенностью ферментативных комплексов системы свертывания крови является их функционирование в присутствии потока. В закрытой системе (пробирке) с фиксированными концентрациями всех реагентов функционирование комплексов, по-видимому, не достигает стационарных состояний: скорость

активации субстратов непрерывно меняется с течением времени, в том числе из-за истощения субстрата [138, 143]. Однако в присутствии потока реакция достигает стационарного состояния и постоянной скорости активации субстрата, что было показано как теоретически, так и экспериментально [138, 159, 160]. В условиях потока активированные факторы свертывания аккумулируются на поверхности мембраны [138], и этот процесс может быть усилен за счет двухступенчатого связывания и димеризации.

5. ПРИРОДА, ИСТОЧНИКИ МЕМБРАН, ИХ ОТЛИЧИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Фосфолипидные мембраны, на которых могут идти ферментативные реакции свертывания крови, предоставляются клетками организма и фосфолипидными микровезикулами, причем источники таких мембран отличаются в норме и разнообразных патологических состояниях.

В норме реакции системы свертывания идут на поверхности активированных тромбоцитов [3], причем не все тромбоциты ускоряют ферментативные реакции в равной степени. При активации тромбоцитов формируется две их субпопуляции [161–163]: (1) PS-отрицательные тромбоциты, способные агрегировать из-за наличия на их поверхности активных интегринов $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и способные к контракции; (2) PS-положительные или прокоагулянтные тромбоциты, на поверхности которых собираются комплексы системы свертывания. PS-положительные тромбоциты не могут агрегировать самостоятельно, но могут встраиваться в агрегат с PS-отрицательными тромбоцитами [164]. При этом в формирующемся тромбе прокоагулянтные тромбоциты вытесняются наружу, локализуя фибрин на поверхности тромба [165].

Реакции свертывания также идут на поверхности липидных микровезикул, которые испускаются различными типами клеток в ответ на активацию или апоптоз. В крови здоровых доноров такие везикулы имеют тромбоцитарную, эритроцитарную, гранулоцитарную или эндотелиальную природу и способны поддерживать формирование тромбина по TF-независимому пути, хотя часть этих микровезикул содержат TF на поверхности [166]. Однако везикулы из плазмы здоровых доноров плохо встраивались в растущий тромб и не влияли на его формирование при артериальных скоростях потока [167].

Мембрана для реакций свертывания может также предоставляться эритроцитами: в крови здоровых доноров циркулирует 0.4–0.5% эритроцитов, содержащих PS на внешней стороне мембраны [168].

Интересно, что эритроциты оказываются встроены в структуру растущего тромба [169]. Скорее всего, эритроциты могут вносить вклад в свертывание в патологических ситуациях (когда они повреждены, и доля прокоагулянтных эритроцитов большая); их вклад в норме является недоказанным.

При различных патологических состояниях, связанных с повышенным риском тромбоза, источники и количество любых прокоагулянтных поверхностей на самом деле существенно изменяются. Так, количество циркулирующих прокоагулянтных тромбоцитов значительно выше у пациентов с онкологическими заболеваниями, чем у здоровых доноров и растет с тяжестью заболевания [170, 171]. При этом опухолевые клетки, по-видимому, способны активировать тромбоциты [172]. Количество PS-положительных тромбоцитов также растет у пациентов с сепсисом по сравнению со здоровыми донорами [173], повышенное количество PS-положительных тромбоцитов коррелирует с риском ишемического инсульта [3].

Количество микровезикул, как TF-положительных, так и PS-положительных, растет при большом наборе патологических состояний, среди которых инфекционные заболевания [174], онкология [80], сепсис [173], сердечно-сосудистые заболевания [175]. При онкологических заболеваниях клетки различных опухолей экспрессируют TF, который способен запускать свертывание на их поверхности [176, 177].

6. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ МЕМБРАННЫХ РЕАКЦИЙ

В живом организме мембранные реакции системы свертывания крови являются не единственными реакциями на мембране. Так, как уже было сказано ранее, аннексин A5 и лактадгерин присоединяются к мембранам клеток для выполнения своих функций. Интересно, что мембраносвязывающий домен лактадгерина (C2-домен) является C-доменом того же типа, что и в факторах свертывания V и VIII [178], что дополнительно подчеркивает универсальность таких мембраносвязывающих структур. Помимо этого, реакции внутриклеточной сигнализации [179] и системы комплемента [180] происходят на поверхности мембран.

Как было показано выше, мембраносвязывающие Gla-домены факторов свертывания разных видов организмов обладают высокой степенью идентичности как их аминокислотной последовательности, так и вторичной/третичной структур (см. раздел 3). Эволюционные исследования показали, что, по-видимому, консервативность этих структур еще выше. Так, Gla-домены были

обнаружены в геноме асцидий, у которых, по всей видимости, еще не сформировалась белковая система свертывания крови [181, 182]. При этом в геноме иглобрюхих рыб были обнаружены факторы свертывания, в состав которых уже входили Gla-домены и которые были более чем на 40% идентичны факторам свертывания млекопитающих [181]. Таким образом, мембраносвязывающие домены факторов свертывания эволюционно сформировались одновременно с этой системой, хотя способность связываться с мембраной этих структур остается под вопросом.

Значение мембранозависимых реакций для нормального формирования тромбов используется в клинической практике. Так, некоторые из используемых антикоагулянтов нацелены именно на ингибирование связывания факторов свертывания с мембраной. Например, варфарин является антагонистом витамина К, необходимого для посттрансляционной модификации витамин К-зависимых белков и образования γ -карбоксиглутаматов в их Gla-доменах [183]. Цитрат натрия, известный и часто используемый антикоагулянт, выполняет свои функции за счет связывания ионов Ca^{2+} , что приводит, в том числе, к нарушению укладки Gla-доменов и ингибированию мембранозависимых реакций [184].

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мембраны активированных клеток, липидных везикул выполняют ряд важных функций в системе свертывания крови. Они локализуют и концентрируют факторы свертывания в определенных участках мембран, а также, возможно, влияют на их подвижность и конформацию, что приводит к значительному ускорению ферментативных реакций. Скорость реакций строго регулируется составом мембраны, так как в ней есть как активирующие, так и ингибирующие компоненты. Нарушение такой строгой регуляции, повышенные количества PS или других прокоагулянтных липидов в кровотоке появляются при заболеваниях, связанных с повышенным риском тромбоза.

Исходно мембранные реакции рассматривались как способ увеличить скорости реакций свертывания. Эта роль может быть по-прежнему важна, и концентрирование белков в «шапках» тромбоцитов указывает на это. Однако две другие роли: управление протеканием процесса свертывания в различных регионах тромба и предотвращение размывания потоком, сейчас представляются не менее важными. Дальнейшее

прояснение этих механизмов может привести к существенному пересмотру наших представлений о работе системы свертывания и родственных систем (например, комплемента), а также стимулировать разработку новых подходов диагностики и терапии ее нарушений.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-74-00057.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M., Reitsma P.H. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **93**, 327–358.
2. Бутылин А.А., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. 2007. Пространственная динамика свертывания крови. *Росс. хим. журн.* **51**, 45–50.
3. Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. 2021. Procoagulant platelets: Mechanisms of generation and action. *Hemostaseologie*. **41**, 146–153. doi 10.1055/a-1401-2706
4. Свешникова А., Степанян М., Пантелеев М. 2022. Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы. *Системная биология и физиология*. **1**, 14–23. doi 10.52455/sbpr.01.202101014
5. Podoplelova N.A., Sulimov V.B., Ilin I.S., Tashilova A.S., Panteleev M.A., Ledeneva I.V., Shikhaliyev K.S. 2020. Blood coagulation in the 21st century: Existing knowledge, current strategies for treatment and perspective. *Pediatr. Hematol. Immunopathol.* **19**, 139–157. doi 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157
6. Protty M.B., Jenkins P.V., Collins P.W., O'Donnell V.B. 2022. The role of procoagulant phospholipids on the surface of circulating blood cells in thrombosis and haemostasis. *Open Biol.* **12**, 210318. doi 10.1098/rsob.210318
7. Morrissey J.H. 1996. Plasma factor VIIa: Measurement and potential clinical significance. *Haemostasis*. **26** Suppl 1, 66–71. doi 10.1159/000217243
8. Kovalenko T.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. The mechanisms and kinetics of initiation of blood coagulation by the extrinsic tenase complex. *Biophysics (Oxf)*. **62**, 291–300. doi 10.1134/S0006350917020105

9. Butenas S. 2012. Tissue factor structure and function. *Scientifica (Cairo)*. **2012**, 964862. doi 10.6064/2012/964862
10. Zelaya H., Rothmeier A.S., Ruf W. 2018. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *J. Thromb. Haemost.* **16**, 1941–1952. doi 10.1111/jth.14246
11. Smith S.B., Gailani D. 2008. Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev. Hematol.* **1**, 87–98. doi 10.1586/17474086.1.1.87
12. Lu G., Broze G.J.J., Krishnaswamy S. 2004. Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: Differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J. Biol. Chem.* **279**, 17241–17249. doi 10.1074/jbc.M312827200
13. Ruben E.A., Summers B., Rau M.J., Fitzpatrick J.A.J., Di Cera E. 2022. Cryo-EM structure of the prothrombin-prothrombinase complex. *Blood*. **139**, 3463–3473. doi 10.1182/blood.2022015807
14. Brufatto N., Nesheim M.E. 2003. Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process. *J. Biol. Chem.* **278**, 6755–6764. doi 10.1074/jbc.M206413200
15. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. 2006. Factor VIIIa regulates substrate delivery to the intrinsic factor X-activating complex. *FEBS J.* **273**, 374–387.
16. Childers K.C., Peters S.C., Lollar P., Spencer H.T., Doering C.B., Spiegel P.C. 2022. SAXS analysis of the intrinsic tenase complex bound to a lipid nanodisc highlights intermolecular contacts between factors VIIIa/IXa. *Blood Adv.* **6**, 3240–3254. doi 10.1182/bloodadvances.2021005874
17. Weisel J.W., Litvinov R.I. 2017. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell. Biochem.* **82**, 405–456. doi 10.1007/978-3-319-49674-0_13
18. Chelushkin M.A., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. Activation of the contact pathway of blood coagulation on the circulating microparticles may explain blood plasma coagulation induced by dilution. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **11**, 130–143. doi 10.1134/S1990747817020040
19. Terent'eva V.A., Sveshnikova A.N., Pantelev M.A. 2017. Biophysical mechanisms of contact activation of blood-plasma clotting. *Biophysics (Oxf)*. **62**, 742–753. doi 10.1134/S0006350917050232
20. Wu Y. 2015. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb. J.* **13**, 17. doi 10.1186/s12959-015-0048-y
21. Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A., Novikova A.A., Shmirev I.I., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I. 2011. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation. *Biophys. J.* **101**, 1816–1824. doi 10.1016/j.bpj.2011.08.034
22. Lakshmanan H.H.S., Estonilo A., Reitsma S.E., Melrose A.R., Subramanian J., Zheng T.J., Maddala J., Tucker E.I., Gailani D., McCarty O.J.T., Journey P.L., Puy C. 2022. Revised model of the tissue factor pathway of thrombin generation: Role of the feedback activation of FXI. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 1350–1363. doi 10.1111/jth.15716
23. Shibeko A.M., Lobanova E.S., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I. 2010. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst. Biol.* **4**, 5. doi 10.1186/1752-0509-4-5
24. Amiral J., Seghatchian J. 2018. Revisiting antithrombin in health and disease, congenital deficiencies and genetic variants, and laboratory studies on α and β forms. *Transfus. Apher. Sci.* **57**, 291–297. doi 10.1016/j.transci.2018.04.010
25. Dahlbäck B., Villoutreix B.O. 2005. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1311–1320. doi 10.1161/01.ATV.0000168421.13467.82
26. Adams M. 2012. Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor. *Semin. Thromb. Hemost.* **38**, 129–134. doi 10.1055/s-0032-1301410
27. Almawi W.Y., Al-Shaikh F.S., Melemedjian O.K., Almawi A.W. 2013. Protein Z, an anticoagulant protein with expanding role in reproductive biology. *Reproduction*. **146**, R73–R80. doi 10.1530/REP-13-0072
28. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem. Rev.* **119**, 5607–5774. doi 10.1021/acs.chemrev.8b00538
29. Vance J.E. 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic*. **16**, 1–18. doi https://doi.org/10.1111/tra.12230
30. Jiang Z., Shen T., Huynh H., Fang X., Han Z., Ouyang K. 2022. Cardiolipin regulates mitochondrial ultrastructure and function in mammalian cells. *Genes (Basel)*. **13**, 1889. doi 10.3390/genes13101889
31. Yang Y., Lee M., Fairn G.D. 2018. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J. Biol. Chem.* **293**, 6230–6240. doi 10.1074/jbc.R117.000582
32. Fujimoto T., Parmryd I. 2016. Interleaflet coupling, pinning, and leaflet asymmetry-major players in plasma membrane nanodomain formation. *Front. cell Dev. Biol.* **4**, 155. doi 10.3389/fcell.2016.00155
33. Gupta A., Korte T., Herrmann A., Wohland T. 2020. Plasma membrane asymmetry of lipid organization: Fluorescence lifetime microscopy and correlation spectroscopy analysis. *J. Lipid Res.* **61**, 252–266. doi 10.1194/jlr.D119000364

34. Murate M., Abe M., Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., Kobayashi T. 2015. Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.* **128**, 1627–1638. doi 10.1242/jcs.163105
35. Lorent J.H., Levental K.R., Ganesan L., Rivera-Longworth G., Sezgin E., Doktorova M., Lyman E., Levental I. 2020. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 644–652. doi 10.1038/s41589-020-0529-6
36. Cho W., Stahelin R. V. 2005. Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 119–151. doi 10.1146/annurev.biophys.33.110502.133337
37. Yu J., Boehr D.D. 2023. Regulatory mechanisms triggered by enzyme interactions with lipid membrane surfaces. *Front. Mol. Biosci.* **10**, 1306483. doi 10.3389/fmolb.2023.1306483
38. Igumenova T.I. 2015. Dynamics and membrane interactions of protein kinase C. *Biochemistry.* **54**, 4953–4968. doi 10.1021/acs.biochem.5b00565
39. Velnati S., Centonze S., Girivetto F., Capello D., Biondi R.M., Berton A., Cantello R., Ragnoli B., Malerba M., Graziani A., Baldanzi G. 2021. Identification of key phospholipids that bind and activate atypical PKCs. *Biomedicines.* **9**. doi 10.3390/biomedicines9010045
40. Scott H.L., Heberle F.A., Katsaras J., Barrera F.N. 2019. Phosphatidylserine asymmetry promotes the membrane insertion of a transmembrane helix. *Biophys. J.* **116**, 1495–1506. doi 10.1016/j.bpj.2019.03.003
41. Sakuragi T., Nagata S. 2023. Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **24**, 576–596. doi 10.1038/s41580-023-00604-z
42. Millington-Burgess S.L., Harper M.T. 2022. Maintaining flippase activity in procoagulant platelets is a novel approach to reducing thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 989–995. doi 10.1111/jth.15641
43. Panteleev M.A., Shibeko A.M., Nechipurenko D.Y., Beresneva E.A., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N. 2022. Haemostasis and thrombosis. Spatial organization of the biochemical processes at microscale. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **16**, 107–114. doi 10.1134/S1990747822030084
44. Suttie J.W. 1993. Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* **7**, 445–452. doi 10.1096/fasebj.7.5.8462786
45. Wildhagen K.C.A.A., Lutgens E., Loubele S.T.G.B., ten Cate H., Nicolaes G.A.F. 2011. The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations. *Thromb. Haemost.* **106**, 1034–1045. doi 10.1160/TH11-08-0522
46. Gierula M., Ahnström J. 2020. Anticoagulant protein S – New insights on interactions and functions. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 2801–2811. doi https://doi.org/10.1111/jth.15025
47. Pozzi N., Bystranowska D., Zuo X., Di Cera E. 2016. Structural architecture of prothrombin in solution revealed by single molecule spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **291**, 18107–18116. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738310
48. Stojanovski B.M., Pelc L.A., Di Cera E. 2020. Role of the activation peptide in the mechanism of protein C activation. *Sci. Rep.* **10**, 11079. doi 10.1038/s41598-020-68078-z
49. Davie E.W., Kulman J.D. 2006. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* **32** Suppl 1, 3–15. doi 10.1055/s-2006-939550
50. Venkateswarlu D., Perera L., Darden T., Pedersen L.G. 2002. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys. J.* **82**, 1190–1206. doi 10.1016/S0006-3495(02)75476-3
51. Ohkubo Y.Z., Morrissey J.H., Tajkhorshid E. 2010. Dynamical view of membrane binding and complex formation of human factor VIIa and tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1044–1053. doi 10.1111/j.1538-7836.2010.03826.x
52. McDonald J.F., Shah A.M., Schwalbe R.A., Kisiel W., Dahlback B., Nelsestuen G.L. 1997. Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site. *Biochemistry.* **36**, 5120–5127. doi 10.1021/bi9626160
53. Muller M.P., Morrissey J.H., Tajkhorshid E. 2022. Molecular View into preferential binding of the factor VII Gla domain to phosphatidic acid. *Biochemistry.* **61**, 1694–1703. doi 10.1021/acs.biochem.2c00266
54. Huang M., Furie B.C., Furie B. 2004. Crystal structure of the calcium-stabilized human factor IX Gla domain bound to a conformation-specific anti-factor IX antibody. *J. Biol. Chem.* **279**, 14338–14346. doi 10.1074/jbc.M314011200
55. Brandstetter H., Bauer M., Huber R., Lollar P., Bode W. 1995. X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9796–9800. doi 10.1073/pnas.92.21.9796
56. Soriano-Garcia M., Padmanabhan K., de Vos A.M., Tulinsky A. 1992. The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry.* **31**, 2554–2566. doi 10.1021/bi00124a016
57. Sunnerhagen M., Forsén S., Hoffrén A.M., Drakenberg T., Teleman O., Stenflo J. 1995. Structure of the Ca²⁺-free Gla domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 504–509. doi 10.1038/nsb0695-504
58. Huang M., Rigby A.C., Morelli X., Grant M.A., Huang G., Furie B., Seaton B., Furie B.C. 2003. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 751–756. doi 10.1038/nsb971

59. Banner D.W., D'Arcy A., Chene C., Winkler F.K., Guha A., Konigsberg W.H., Nemerson Y., Kirchhofer D. 1996. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. **380**, 41–46. doi 10.1038/380041a0
60. Mizuno H., Fujimoto Z., Atoda H., Morita T. 2001. Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 7230–7234. doi 10.1073/pnas.131179698
61. Shikamoto Y., Morita T., Fujimoto Z., Mizuno H. 2003. Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 24090–24094. doi 10.1074/jbc.M300650200
62. Vadivel K., Agah S., Messer A.S., Cascio D., Bajaj M.S., Krishnaswamy S., Esmen C.T., Padmanabhan K., Bajaj S.P. 2013. Structural and functional studies of gamma-carboxyglutamic acid domains of factor VIIa and activated protein C: Role of magnesium at physiological calcium. *J. Mol. Biol.* **425**, 1961–1981. doi 10.1016/j.jmb.2013.02.017
63. Ohkubo Y.Z., Tajkhorshid E. 2008. Distinct structural and adhesive roles of Ca²⁺ in membrane binding of blood coagulation factors. *Structure*. **16**, 72–81. doi 10.1016/j.str.2007.10.021
64. Muller M.P., Wang Y., Morrissey J.H., Tajkhorshid E. 2017. Lipid specificity of the membrane binding domain of coagulation factor X. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 2005–2016. doi 10.1111/jth.13788
65. Mohammed B.M., Pelc L.A., Rau M.J., Di Cera E. 2023. Cryo-EM structure of coagulation factor V short. *Blood*. **141**, 3215–3225. doi 10.1182/blood.2022019486
66. Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. 1998. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. **92**, 3983–3996. doi 10.1182/blood.V92.11.3983
67. Childers K.C., Peters S.C., Spiegel Jr. P.C. 2022. Structural insights into blood coagulation factor VIII: Procoagulant complexes, membrane binding, and antibody inhibition. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 1957–1970. doi 10.1111/jth.15793
68. Ngo J.C.K., Huang M., Roth D.A., Furie B.C., Furie B. 2008. Crystal structure of human factor VIII: Implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure*. **16**, 597–606. doi 10.1016/j.str.2008.03.001
69. Fuller J.R., Knockenhauer K.E., Leksa N.C., Peters R.T., Batchelor J.D. 2021. Molecular determinants of the factor VIII/von Willebrand factor complex revealed by BIVV001 cryo-electron microscopy. *Blood*. **137**, 2970–2980. doi https://doi.org/10.1182/blood.2020009197
70. Wakabayashi H., Monaghan M., Fay P.J. 2014. Co-factor activity in factor VIIIa of the blood clotting pathway is stabilized by an interdomain bond between His281 and Ser524 formed in factor VIII. *J. Biol. Chem.* **289**, 14020–14029. doi 10.1074/jbc.M114.550566
71. Madsen J.J., Ohkubo Y.Z., Peters G.H., Faber J.H., Tajkhorshid E., Olsen O.H. 2015. Membrane interaction of the factor VIIIa discoidin domains in atomistic detail. *Biochemistry*. **54**, 6123–6131. doi 10.1021/acs.biochem.5b00417
72. Lü J., Pipe S.W., Miao H., Jacquemin M., Gilbert G.E. 2011. A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood*. **117**, 3181–3189. doi 10.1182/blood-2010-08-301663
73. Smith I.W., d'Aquino A.E., Coyle C.W., Fedanov A., Parker E.T., Denning G., Spencer H.T., Lollar P., Doering C.B., Spiegel P.C. 2020. The 3.2 Å structure of a bioengineered variant of blood coagulation factor VIII indicates two conformations of the C2 domain. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 57–69. https://doi.org/10.1111/jth.14621
74. Bardelle C., Furie B., Furie B.C., Gilbert G.E. 1993. Membrane binding kinetics of factor VIII indicate a complex binding process. *J. Biol. Chem.* **268**, 8815–8824.
75. Mann K.G., Kalafatis M. 2003. Factor V: A combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*. **101**, 20–30. doi 10.1182/blood-2002-01-0290
76. Hayward C.P.M., Fuller N., Zheng S., Adam F., Jeimy S.B., Horwood I., Quinn-Allen M.A., Kane W.H. 2004. Human platelets contain forms of factor V in disulfide-linkage with multimerin. *Thromb. Haemost.* **92**, 1349–1357. doi 10.1160/TH03-02-0123
77. Stoilova-McPhie S., Parmenter C.D.J., Segers K., Villoutreix B.O., Nicolaes G.A.F. 2008. Defining the structure of membrane-bound human blood coagulation factor Va. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 76–82. doi 10.1111/j.1538-7836.2007.02810.x
78. Ohkubo Y.Z., Madsen J.J. 2021. Uncovering membrane-bound models of coagulation factors by combined experimental and computational approaches. *Thromb. Haemost.* **121**, 1122–1137. doi 10.1055/s-0040-1722187
79. Wu S., Lee C.J., Pedersen L.G. 2009. Conformational change path between closed and open forms of C2 domain of coagulation factor V on a two-dimensional free-energy surface. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **79**, 41909. doi 10.1103/PhysRevE.79.041909
80. Kovalenko T., Panteleev M., Sveshnikova A. 2019. The role of tissue factor in metastasising, neoangiogenesis and hemostasis in cancer. *Oncohematology*. **14**, 70–85. doi 10.17650/1818-8346-2019-14-2-70-85
81. Drake T.A., Morrissey J.H., Edgington T.S. 1989. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am. J. Pathol.* **134**, 1087–1097.
82. Bogdanov V.Y., Balasubramanian V., Hathcock J., Vele O., Lieb M., Nemerson Y. 2003. Alternatively spliced human tissue factor: A circulating, soluble,

- thrombogenic protein. *Nat. Med.* **9**, 458–462. doi 10.1038/nm841
83. Bogdanov V.Y., Kirk R.I., Miller C., Hathcock J.J., Vele S., Gazdoui M., Nemerson Y., Taubman M.B. 2006. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 158–167. doi 10.1111/j.1538-7836.2005.01680.x
 84. Sluka S.H.M., Akhmedov A., Vogel J., Unruh D., Bogdanov V.Y., Camici G.G., Lüscher T.F., Ruf W., Tanner F.C. 2014. Alternatively spliced tissue factor is not sufficient for embryonic development. *PLoS One*. **9**, e97793. doi 10.1371/journal.pone.0097793
 85. Matiash K., Lewis C.S., Bogdanov V.Y. 2021. Functional characteristics and regulated expression of alternatively spliced tissue factor: An update. *Cancers (Basel)*. **13**. doi 10.3390/cancers13184652
 86. Maugeri N., Manfredi A.A. 2015. Tissue factor expressed by neutrophils: Another piece in the vascular inflammation puzzle. *Semin. Thromb. Hemost.* **41**, 728–736. doi 10.1055/s-0035-1564043
 87. Maugeri N., Brambilla M., Camera M., Carbone A., Tremoli E., Donati M.B., de Gaetano G., Cerletti C. 2006. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 1323–1330. doi 10.1111/j.1538-7836.2006.01968.x
 88. Rafail S., Ritis K., Schaefer K., Kourtzelis I., Speletas M., Doumas M., Giaglis S., Kambas K., Konstantinides S., Kartalis G. 2008. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNF α involvement. *Thromb. Res.* **122**, 366–375. doi 10.1016/j.thromres.2007.12.018
 89. Peshkova A.D., Le Minh G., Tutwiler V., Andrianova I.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. 2017. Activated monocytes enhance platelet-driven contraction of blood clots via tissue factor expression. *Sci. Rep.* **7**, 5149. doi 10.1038/s41598-017-05601-9
 90. Brambilla M., Becchetti A., Rovati G.E., Cosentino N., Conti M., Canzano P., Giesen P.L.A., Loffreda A., Bonomi A., Cattaneo M., De Candia E., Podda G.M., Trabattoni D., Werba P.J., Campodonico J., Pinna C., Marenzi G., Tremoli E., Camera M. 2023. Cell surface platelet tissue factor expression: Regulation by P2Y(12) and link to residual platelet reactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **43**, 2042–2057. doi 10.1161/ATVBAHA.123.319099
 91. Camera M., Frigerio M., Toschi V., Brambilla M., Rossi F., Cottell D.C., Maderna P., Parolari A., Bonzi R., De Vincenti O., Tremoli E. 2003. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1690–1696. doi 10.1161/01.ATV.0000085629.23209.AA
 92. Müller I., Klocke A., Alex M., Kotzsch M., Luther T., Morgenstern E., Ziesenis S., Zahler S., Preissner K., Engelmann B. 2003. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* **17**, 476–478. doi 10.1096/fj.02-0574fje
 93. Lechner D., Weltermann A. 2008. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb. Res.* **122** Suppl, S47–54. doi 10.1016/S0049-3848(08)70019-7
 94. Wang J., Pendurthi U.R., Rao L.V.M. 2017. Sphingomyelin encrypts tissue factor: ATP-induced activation of A-SMase leads to tissue factor decryption and microvesicle shedding. *Blood Adv.* **1**, 849–862. doi 10.1182/bloodadvances.2016003947
 95. Chen V.M., Hogg P.J. 2013. Encryption and decryption of tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 277–284. <https://doi.org/10.1111/jth.12228>
 96. van Dieijen G., Tans G., van Rijn J., Zwaal R.F., Rosling J. 1981. Simple and rapid method to determine the binding of blood clotting factor X to phospholipid vesicles. *Biochemistry*. **20**, 7096–7101.
 97. Harvey S.B., Stone M.D., Martinez M.B., Nelsestuen G.L. 2003. Mutagenesis of the gamma-carboxyglutamic acid domain of human factor VII to generate maximum enhancement of the membrane contact site. *J. Biol. Chem.* **278**, 8363–8369. doi 10.1074/jbc.M211629200
 98. Cutsforth G.A., Whitaker R.N., Hermans J., Lentz B.R. 1989. A new model to describe extrinsic protein binding to phospholipid membranes of varying composition: Application to human coagulation proteins. *Biochemistry*. **28**, 7453–7461.
 99. Soloveva P.A., Podoplelova N.A., Pantelev M.A. 2024. Binding of coagulation factor IXa to procoagulant platelets revisited: Low affinity and interactions with other factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **720**, 150099. doi 10.1016/j.bbrc.2024.150099
 100. Medfisch S.M., Muehl E.M., Morrissey J.H., Bailey R.C. 2020. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylserine binding synergy of seven coagulation factors revealed using nanodisc arrays on silicon photonic sensors. *Sci. Rep.* **10**, 17407. doi 10.1038/s41598-020-73647-3
 101. Shaw A.W., Pureza V.S., Sligar S.G., Morrissey J.H. 2007. The local phospholipid environment modulates the activation of blood clotting. *J. Biol. Chem.* **282**, 6556–6563.
 102. Wang B., Tieleman D.P. 2024. The structure, self-assembly and dynamics of lipid nanodiscs revealed by computational approaches. *Biophys. Chem.* **309**, 107231. doi 10.1016/j.bpc.2024.107231
 103. Tavoosi N., Davis-Harrison R.L., Pogorelov T.V., Ohkubo Y.Z., Arcario M.J., Clay M.C., Rienstra C.M., Tajkhorshid E., Morrissey J.H. 2011. Molecular determinants of phospholipid synergy in blood clotting. *J. Biol. Chem.* **286**, 23247–23253. doi 10.1074/jbc.M111.251769
 104. Gilbert G.E., Arena A.A. 1995. Phosphatidylethanolamine induces high affinity binding sites for factor VIII

- on membranes containing phosphatidyl-L-serine. *J. Biol. Chem.* **270**, 18500–18505.
https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18500
105. Tavoosi N., Smith S.A., Davis-Harrison R.L., Morrissey J.H. 2013. Factor VII and protein C are phosphatidic acid-binding proteins. *Biochemistry*. **52**, 5545–5552. doi 10.1021/bi4006368
 106. Abbott A.J., Nelsestuen G.L. 1987. Association of a protein with membrane vesicles at the collisional limit: studies with blood coagulation factor Va light chain also suggest major differences between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry*. **26**, 7994–8003.
 107. Abbott A.J., Nelsestuen G.L. 1988. The collisional limit: An important consideration for membrane-associated enzymes and receptors. *FASEB J.* **2**, 2858–2866.
 108. Lu Y., Nelsestuen G.L. 1996. Dynamic features of prothrombin interaction with phospholipid vesicles of different size and composition: Implications for protein--membrane contact. *Biochemistry*. **35**, 8193–8200. doi 10.1021/bi960280o
 109. Kovalenko T.A., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. Substrate delivery mechanism and the role of membrane curvature in factor X activation by extrinsic tenase. *J. Theor. Biol.* **435**, 125–133. doi 10.1016/j.jtbi.2017.09.015
 110. Carman C.V., Nikova D.N., Sakurai Y., Shi J., Novakovic V.A., Rasmussen J.T., Lam W.A., Gilbert G.E. 2023. Membrane curvature and PS localize coagulation proteins to filopodia and retraction fibers of endothelial cells. *Blood Adv.* **7**, 60–72. doi 10.1182/bloodadvances.2021006870
 111. Обыденный С.И. 2023. Преимущество применения лактадгерина для оценки экспонирования фосфатидилсерина в тромбоцитах. *Системная биология и физиология*. **2**, 11–13. edn: MICQKA
 112. Shi J., Heegaard C.W., Rasmussen J.T., Gilbert G.E. 2004. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim. Biophys. Acta*. **1667**, 82–90. doi 10.1016/j.bbamem.2004.09.006
 113. Коваленко Т.А. 2022. Аннексин V: связывающийся с мембраной белок с широчайшим набором функций. *Системная биология и физиология*. **1**, 21–33. edn: KBSOPU
 114. Silversmith R.E., Nelsestuen G.L. 1986. Interaction of complement proteins C5b-6 and C5b-7 with phospholipid vesicles: Effects of phospholipid structural features. *Biochemistry*. **25**, 7717–7725. doi 10.1021/bi00371a065
 115. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., Obyden-nyi S.I., Kireev I.I., Gachet C., Ataulakhanov F.I., Mangin P.H., Pantelev M.A. 2016. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*. **128**, 1745–1755. doi 10.1182/blood-2016-02-696898
 116. Mitchell J.L., Lionikiene A.S., Fraser S.R., Whyte C.S., Booth N.A., Mutch N.J. 2014. Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood*. **124**, 3982–3990. doi 10.1182/blood-2014-06-583070
 117. Whyte C.S., Swieringa F., Mastenbroek T.G., Lionikiene A.S., Lancé M.D., van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M., Mutch N.J. 2015. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood*. **125**, 2568–2578. doi 10.1182/blood-2014-09-599480
 118. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obyden-nyi S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., Kolyadko V.N., Chambost H., Mazurov A. V, Ataulakhanov F.I., Nurden A.T., Alessi M.-C., Pantelev M.A. 2013. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered 'cap' on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J. Biol. Chem.* **288**, 29621–29632. doi 10.1074/jbc.M113.474163
 119. Dalm D., Galaz-Montoya J.G., Miller J.L., Grushin K., Villalobos A., Koyfman A.Y., Schmid M.F., Stoilova-McPhie S. 2015. Dimeric organization of blood coagulation factor VIII bound to lipid nanotubes. *Sci. Rep.* **5**, 11212. doi 10.1038/srep11212
 120. Majumder R., Wang J., Lentz B.R. 2003. Effects of water soluble phosphatidylserine on bovine factor Xa: Functional and structural changes plus dimerization. *Biophys. J.* **84**, 1238–1251. doi 10.1016/S0006-3495(03)74939-X
 121. Koklic T., Majumder R., Weinreb G.E., Lentz B.R. 2009. Factor Xa binding to phosphatidylserine-containing membranes produces an inactive membrane-bound dimer. *Biophys. J.* **97**, 2232–2241. doi 10.1016/j.bpj.2009.07.043
 122. Koklic T., Chattopadhyay R., Majumder R., Lentz B.R. 2015. Factor Xa dimerization competes with prothrombinase complex formation on platelet-like membrane surfaces. *Biochem. J.* **467**, 37–46. doi 10.1042/BJ20141177
 123. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kurasawa J.H., Sarafanov A.G., Chambost H., Vasil'ev S.A., Demina I.A., Ataulakhanov F.I., Alessi M.-C., Pantelev M.A. 2016. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim. Biophys. Acta*. **1858**, 1216–1227. doi 10.1016/j.bbamem.2016.02.008
 124. Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R., Haley P., Krishnaswamy S. 1990. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. **76**, 1–16.
 125. Bom V.J., Bertina R.M. 1990. The contributions of Ca^{2+} , phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem. J.* **265**, 327–336.

126. Norledge B.V., Petrovan R.J., Ruf W., Olson A.J. 2003. The tissue factor/factor VIIa/factor Xa complex: A model built by docking and site-directed mutagenesis. *Proteins*. **53**, 640–648. doi 10.1002/prot.10445
127. Sen P., Neuenschwander P.F., Pendurthi U.R., Rao L.V.M. 2010. Analysis of factor VIIa binding to relipidated tissue factor by surface plasmon resonance. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. **21**, 376–379.
128. Waters E.K., Morrissey J.H. 2006. Restoring full biological activity to the isolated ectodomain of an integral membrane protein. *Biochemistry*. **45**, 3769–3774. doi 10.1021/bi052600m
129. Waxman E., Ross J.B., Laue T.M., Guha A., Thiruvikraman S.V., Lin T.C., Konigsberg W.H., Nemerson Y. 1992. Tissue factor and its extracellular soluble domain: The relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of the complex. *Biochemistry*. **31**, 3998–4003.
130. Ke K., Yuan J., Morrissey J.H. 2014. Tissue factor residues that putatively interact with membrane phospholipids. *PLoS One*. **9**, e88675. doi 10.1371/journal.pone.0088675
131. Stone M.D., Harvey S.B., Martinez M.B., Bach R.R., Nelsestuen G.L. 2005. Large enhancement of functional activity of active site-inhibited factor VIIa due to protein dimerization: Insights into mechanism of assembly/disassembly from tissue factor. *Biochemistry*. **44**, 6321–6330. doi 10.1021/bi050007z
132. Neuenschwander P.F., Bianco-Fisher E., Rezaie A.R., Morrissey J.H. 1995. Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: Enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry*. **34**, 13988–13993. doi 10.1021/bi00043a004
133. Mallik S., Prasad R., Das K., Sen P. 2021. Alcohol functionality in the fatty acid backbone of sphingomyelin guides the inhibition of blood coagulation. *RSC Adv*. **11**, 3390–3398. doi 10.1039/d0ra09218e
134. Hathcock J.J., Rusinova E., Andree H., Nemerson Y. 2006. Phospholipid surfaces regulate the delivery of substrate to tissue factor: VIIa and the removal of product. *Blood Cells. Mol. Dis*. **36**, 194–198.
135. Hathcock J.J., Rusinova E., Gentry R.D., Andree H., Nemerson Y. 2005. Phospholipid regulates the activation of factor X by tissue factor/factor VIIa (TF/VIIa) via substrate and product interactions. *Biochemistry*. **44**, 8187–8197.
136. Krishnaswamy S., Field K.A., Edgington T.S., Morrissey J.H., Mann K.G. 1992. Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J. Biol. Chem*. **267**, 26110–26120.
137. Forman S.D., Nemerson Y. 1986. Membrane-dependent coagulation reaction is independent of the concentration of phospholipid-bound substrate: Fluid phase factor X regulates the extrinsic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 4675–4679.
138. Kovalenko T.A., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. 2023. Different modeling approaches in the simulation of extrinsic coagulation factor X activation: Limitations and areas of applicability. *Int. J. Numer. Method. Biomed. Eng.* **39**, e3689. doi 10.1002/cnm.3689
139. Hopfner K.P., Lang A., Karcher A., Sichler K., Kopetzki E., Brandstetter H., Huber R., Bode W., Engh R.A. 1999. Coagulation factor IXa: The relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure*. **7**, 989–996. doi 10.1016/s0969-2126(99)80125-7
140. Kolkman J.A., Mertens K. 2000. Insertion loop 256–268 in coagulation factor IX restricts enzymatic activity in the absence but not in the presence of factor VIII. *Biochemistry*. **39**, 7398–7405. doi 10.1021/bi992735q
141. Zögg T., Brandstetter H. 2009. Structural basis of the cofactor- and substrate-assisted activation of human coagulation factor IXa. *Structure*. **17**, 1669–1678. doi 10.1016/j.str.2009.10.011
142. Venkateswarlu D. 2014. Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: A computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452**, 408–414. doi 10.1016/j.bbrc.2014.08.078
143. Sveshnikova A.N., Shibeko A.M., Kovalenko T.A., Pantelev M.A. 2024. Kinetics and regulation of coagulation factor X activation by intrinsic tenase on phospholipid membranes. *J. Theor. Biol.* **582**, 111757. doi 10.1016/j.jtbi.2024.111757
144. Pomowski A., Ustok F.I., Huntington J.A. 2014. Homology model of human prothrombinase based on the crystal structure of Pseutarin C. *Biol. Chem.* **395**, 1233–1241. doi 10.1515/hsz-2014-0165
145. Krishnaswamy S. 2013. The transition of prothrombin to thrombin. *J. Thromb. Haemost.* **11** Suppl 1, 265–276. doi 10.1111/jth.12217
146. Chinnaraj M., Chen Z., Pelc L.A., Grese Z., Bystranowska D., Di Cera E., Pozzi N. 2018. Structure of prothrombin in the closed form reveals new details on the mechanism of activation. *Sci. Rep.* **8**, 2945. doi 10.1038/s41598-018-21304-1
147. Haynes L.M., Bouchard B.A., Tracy P.B., Mann K.G. 2012. Prothrombin activation by platelet-associated prothrombinase proceeds through the prethrombin-2 pathway via a concerted mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 38647–38655. doi 10.1074/jbc.M112.407791
148. Whelihan M.F., Zachary V., Orfeo T., Mann K.G. 2012. Prothrombin activation in blood coagulation: The erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*. **120**, 3837–3845. doi 10.1182/blood-2012-05-427856
149. Nesheim M.E., Tracy R.P., Mann K.G. 1984. “Clotspeed”, a mathematical simulation of the functional properties of prothrombinase. *J. Biol. Chem.* **259**, 1447–1453.

150. Stone M.D., Nelsestuen G.L. 2005. Efficacy of soluble phospholipids in the prothrombinase reaction. *Biochemistry*. **44**, 4037–4041. doi 10.1021/bi047655n
151. Smirnov M.D., Ford D.A., Esmon C.T., Esmon N.L. 1999. The effect of membrane composition on the hemostatic balance. *Biochemistry*. **38**, 3591–3598. doi 10.1021/bi982538b
152. Krishnaswamy S., Jones K.C., Mann K.G. 1988. Prothrombinase complex assembly. Kinetic mechanism of enzyme assembly on phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **263**, 3823–3834.
153. Giesen P.L., Willems G.M., Hermens W.T. 1991. Production of thrombin by the prothrombinase complex is regulated by membrane-mediated transport of prothrombin. *J. Biol. Chem.* **266**, 1379–1382.
154. Smeets E.F., Comfurius P., Bevers E.M., Zwaal R.F.A. 1996. Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles. *Thromb. Res.* **81**, 419–426. doi [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(96\)00014-X](https://doi.org/10.1016/0049-3848(96)00014-X)
155. Majumder R., Liang X., Quinn-Allen M.A., Kane W.H., Lentz B.R. 2011. Modulation of prothrombinase assembly and activity by phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.* **286**, 35535–35542. doi 10.1074/jbc.M111.260141
156. Deguchi H., Yegneswaran S., Griffin J.H. 2004. Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *J. Biol. Chem.* **279**, 12036–12042. doi 10.1074/jbc.M302531200
157. Shi J., Gilbert G.E. 2003. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood*. **101**, 2628–2636. doi 10.1182/blood-2002-07-1951
158. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Pantelev M.A., Krymskaya O.V., Ataullakhanov F.I. 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* **97**, 425–434.
159. Haynes L.M., Dubief Y.C., Mann K.G. 2012. Membrane binding events in the initiation and propagation phases of tissue factor-initiated zymogen activation under flow. *J. Biol. Chem.* **287**, 5225–5234. doi 10.1074/jbc.M111.302075
160. Gemmell C.H., Turitto V.T., Nemerson Y. 1988. Flow as a regulator of the activation of factor X by tissue factor. *Blood*. **72**, 1404–1406.
161. Agbani E.O., Poole A.W. 2017. Procoagulant platelets: Generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*. **130**, 2171–2179. doi 10.1182/blood-2017-05-787259
162. Heemskerk J.W.M., Mattheij N.J.A., Cosemans J.M.E.M. 2013. Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 2–16. doi 10.1111/jth.12045
163. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. 2005. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 2545–2553. doi 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x
164. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. 2012. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys. J.* **102**, 2261–2269. doi 10.1016/j.bpj.2012.04.004
165. Nechipurenko D.Y., Receveur N., Yakimenko A.O., Shepelyuk T.O., Yakusheva A.A., Kerimov R.R., Obyednyy S.I., Eckly A., Léon C., Gachet C., Grishchuk E.L., Ataullakhanov F.I., Mangin P.H., Pantelev M.A. 2019. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 37–47. doi 10.1161/ATVBAHA.118.311390
166. Berckmans R.J., Nieuwland R., Böing A.N., Romijn F.P., Hack C.E., Sturk A. 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* **85**, 639–646.
167. Artemenko E.O., Obyednyy S.I., Troyanova K.S., Novichkova G.A., Nechipurenko D.Y., Pantelev M.A. 2024. Adhesive properties of plasma-circulating and platelet-derived microvesicles from healthy individuals. *Thromb. Res.* **233**, 119–126. doi 10.1016/j.thromres.2023.11.018
168. Chabin I.A., Podoplelova N.A., Pantelev M.A. 2022. Red blood cells contribution in blood coagulation. *Pediatr. Hematol. Immunopathol.* **21**, 136–141. doi 10.24287/1726-1708-2022-21-3-136-141
169. Tutwiler V., Mukhitov A.R., Peshkova A.D., Le Minh G., Khismatullin R.R., Vicksman J., Nagaswami C., Litvinov R.I., Weisel J.W. 2018. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci. Rep.* **8**, 17907. doi 10.1038/s41598-018-35849-8
170. Zhao L., Bi Y., Kou J., Shi J., Piao D. 2016. Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 54. doi 10.1186/s13046-016-0328-9
171. Yang C., Ma R., Jiang T., Cao M., Zhao L., Bi Y., Kou J., Shi J., Zou X. 2016. Contributions of phosphatidylserine-positive platelets and leukocytes and microparticles to hypercoagulable state in gastric cancer patients. *Tumour Biol.* **37**, 7881–7891. doi 10.1007/s13277-015-4667-5
172. Bekendam R.H., Ravid K. 2023. Mechanisms of platelet activation in cancer-associated thrombosis: A focus on myeloproliferative neoplasms. *Front. Cell Dev. Biol.* **11**, 1207395. doi 10.3389/fcell.2023.1207395
173. Zhang Y., Meng H., Ma R., He Z., Wu X., Cao M., Yao Z., Zhao L., Li T., Deng R., Dong Z., Tian Y., Bi Y., Kou J., Thatté H.S., Zhou J., Shi J. 2016. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through

- phosphatidylserine exposure. *Shock*. **45**, 299–307. doi 10.1097/SHK.0000000000000509
174. Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S., Böing A.N., Romijn F.P., Westendorp R.G., Hack C.E., Sturk A. 2000. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. **95**, 930–935.
175. Nomura S., Shimizu M. 2015. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J. Intensive Care*. **3**, 2. doi 10.1186/s40560-014-0066-z
176. Ettelaie C., Collier M.E., Featherby S., Benelhaj N.E., Greenman J., Maraveyas A. 2016. Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: Correlation with tissue factor and PAR2 expression. *Thromb. J.* **14**, 2. doi 10.1186/s12959-016-0075-3
177. Berny-Lang M.A., Aslan J.E., Tormoen G.W., Patel I.A., Bock P.E., Gruber A., McCarty O.J.T. 2011. Promotion of experimental thrombus formation by the procoagulant activity of breast cancer cells. *Phys. Biol.* **8**, 15014. doi 10.1088/1478-3975/8/1/015014
178. Lin L., Huai Q., Huang M., Furie B., Furie B.C. 2007. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII. *J. Mol. Biol.* **371**, 717–724. doi 10.1016/j.jmb.2007.05.054
179. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A. V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 2045–2057. doi 10.1111/jth.13442
180. Avdonin P.P., Blinova M.S., Generalova G.A., Emirova K.M., Avdonin P.V. 2024. The role of the complement system in the pathogenesis of infectious forms of hemolytic uremic syndrome. *Biomolecules*. **14**. doi 10.3390/biom14010039
181. Jiang Y., Doolittle R.F. 2003. The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 7527–7532. doi 10.1073/pnas.0932632100
182. Doolittle R.F. 2009. Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **74**, 35–40. doi 10.1101/sqb.2009.74.001
183. Hirsh J., Fuster V., Ansell J., Halperin J.L. 2003. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1633–1652. doi 10.1016/s0735-1097(03)00416-9
184. Mann K.G., Whelihan M.F., Butenas S., Orfeo T. 2007. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2055–2061. doi 10.1111/j.1538-7836.2007.02710.

Membrane-Dependent Reactions of Blood Coagulation: Classical View and State-of-the-Art Concepts

© 2024 г. Т. А. Kovalenko^{1, 2, *}, М. А. Panteleev^{1, 2, 3}

¹Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 119991, Russia

³Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: after-ten@yandex.ru

The complex mechanism called hemostasis evolved in living organisms to prevent blood loss when a blood vessel is damaged. In this process, two closely interconnected systems are distinguished: platelet-vascular and plasmatic hemostasis. Plasmatic hemostasis is a system of proteolytic reactions, in which blood plasma proteins called coagulation factors are involved. A key feature of this system is the localization of enzymatic reactions on the surface of phospholipid membranes, which increases their rate by up to 5 orders of magnitude. This review describes the basic mechanisms of coagulation factors binding to phospholipid membranes, pathways for complex assembly and activation reactions, and discusses the role of membranes in this process, their composition and sources. The binding of coagulation factors to procoagulant membranes leads not only to the acceleration of coagulation reactions, but also to their selective localization in restricted areas and protection from being washed away by the flow. The efficiency of coagulation reactions is regulated by the composition of the outer layer of the membrane, primarily through a special mechanism of mitochondria-dependent necrotic platelet death.

Keywords: coagulation factors, lipids, tenase, prothrombinase