

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Свидельская Галина Сергеевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
ТРОМБОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ МАЛОУГЛОВОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ**

1.3.21 Медицинская физика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д.ф.-м.н., профессор РАН

М.А. Пантелеев

Москва – 2025

Оглавление

Общая характеристика работы	6
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1 Тромбоцитарный гемостаз.....	13
1.1.1 Строение тромбоцитов	13
1.1.2 Агонисты тромбоцитов и их рецепторы.....	15
1.1.3 Функциональный ответ тромбоцитов	16
1.1.4 Нарушения функции тромбоцитов	19
1.1.4.1 Приобретенные тромбоцитопатии	22
1.1.4.2. Онкогематология	23
1.1.5. Антиагрегантная терапия.....	24
1.2 Методы исследования тромбоцитов.....	26
1.2.1 Механические методы. Тромбоэластография.....	26
1.2.2 Электрические методы. Импедансная агрегометрия	27
1.2.3 Оптические методы	28
Глава 2. Материалы и методы.....	46
2.1 Приборы и материалы	46
2.1.1 Исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния	46
2.1.2 Исследование активации тромбоцитов методом проточной цитометрии	49
2.1.3 Исследование агрегации тромбоцитов методом световой трансмиссионной агрегометрии	50
2.2 Методики проведения экспериментов	51
2.2.1 Методики проведения экспериментов по изучению влияния преаналитических факторов на результаты исследования.....	51
2.2.2 Методики проведения экспериментов по изучению влияния аналитических переменных на результаты исследования.....	52
2.2.3 Методики оценки агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии методом малоуглового светорассеяния	52
2.3 Статистика	53
2.4 Доноры и пациенты	53

2.4.1 Пациенты с ОКС	54
2.4.2 Пациенты с КГЭ/СКМ	54
2.4.3 Пациенты с онкологическими и гематологическими заболеваниями.....	55
Глава 3. Результаты и их обсуждение	56
3.1 Моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците	56
3.1.1. Расчет индикатрис рассеяния на сферическом объекте размера порядка 2 мкм.....	62
3.1.2. Зависимость интенсивности светорассеяния от количества частиц	64
3.1.3 Динамика индикатрисы рассеяния (экспериментальные данные)	69
3.2 Определение преаналитических и аналитических факторов влияющих на исследование функциональной активности тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния.....	71
3.2.1 Оценка внутриоператорной воспроизводимости	71
3.2.2 Оценка отдаленной воспроизводимости результатов исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния	73
3.2.3 Исследование зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от транспортировки образца.....	75
3.2.4 Зависимость результатов экспериментов от времени между забором крови и началом проведения исследования	78
3.2.5 Зависимость параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от концентрации бедной тромбоцитами плазмы в суспензии	79
3.2.6. Исследование зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от соотношения кровь-цитрат натрия и типа антикоагулянта....	80
3.2.7 Влияние липополисахаридов на тромбоциты.....	82
3.2.8 Влияние монафрама на тромбоциты	84
3.2.9 Оценка агрегационной способности тромбоцитов при воздействии антиагрегантами методом малоуглового светорассеяния	85
3.3 Оценка применимости метода малоуглового светорассеяния для использования в клинической практике	88
3.3.1 Определение референсных интервалов для групп здоровых взрослых и здоровых детей	88
3.3.2 Аprobация на пациенте с афибриногенемией	88

3.3.3 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с тромбастенией Гланцмана	89
3.3.4 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с дефицитом гранул	92
3.3.5 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с геморрагическим синдромом.....	97
3.3.6 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии методом малоуглового светорассеяния.....	98
3.3.7 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/синдромом Казабаха-Меритт методом малоуглового светорассеяния	101
3.3.8 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов онкогематологического профиля методом малоуглового светорассеяния.....	102
3.4 Сопоставление параметров агрегации тромбоцитов, измеренных методом малоуглового светорассеяния с маркерами активации тромбоцитов, исследованными методами проточной цитометрии, а также с параметрами оптической агрегометрии по Борну	103
3.4.1 Корреляция параметров агрегации тромбоцитов, измеренных методом малоуглового светорассеяния с маркерами активации тромбоцитов, исследованными методами проточной цитометрией.....	103
3.4.2 Сопоставление результатов, полученных методом малоуглового светорассеяния и методом агрегации по Борну.....	111
Глава 4. Заключение.....	115
Глава 5. Выводы.....	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	129

Список сокращений и условных обозначений

CD62p – маркер экспрессии Р-селектина альфа гранул тромбоцитов

CRP – collagen related peptide; коллаген-подобный пептид

$\Delta I(1)$ – амплитуда агрегации

$\Delta I(12)$ – амплитуда изменения формы

PAR – protease-activated receptors; рецепторы, активирующиеся протеазой

PAC-1 – моноклональное антитело, распознающее эпитоп на активированной форме гликопротеина IIbIIIa

TRAP – thrombin receptor activating peptides; пептиды активирующие рецептор тромбина

TXA₂ – тромбоксан A₂

V_{ia} – начальная скорость агрегации тромбоцитов

АДФ – аденозиндифосфат

БТП – богатая тромбоцитами плазма

ГП – гликопротеин

ДАТТ – двойная антитромбоцитарная терапия

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КГЭ – Капошиформная гемангиоэндотелиома

ОКС – острый коронарный синдром

СО – среднеквадратичное отклонение

СКМ – синдром Казабаха-Меритт

ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Тромбоциты представляют собой безъядерные дискообразные клеточные фрагменты размером 2–5 мкм со средним объемом 6–10 фемтолитров [Santos-Gallego, Badimon, 2021]. Они циркулируют в кровотоке в концентрации 150 – 400 тысяч в микролитре [Шиффман, 2001]. Эти клетки отвечают за процесс остановки кровотечения – гемостаз [Пантелеев, Свешникова, 2014]. Они прикрепляются к месту повреждения сосуда и формируют гемостатическую «пробку» – агрегат. Тромбоциты играют ключевую роль, как в нормальном гемостазе, так и при патологических состояниях, кровотечениях и тромбозах, которые часто связаны именно с нарушением функции тромбоцитов [Мазуров, 2011].

Контроль функции тромбоцитов является важным диагностическим параметром при сердечно-сосудистых заболеваниях, а также необходим при подборе и мониторинге эффективности терапии антитромбоцитарными препаратами. В настоящее время оценку функции тромбоцитов проводят следующими методами: оптическая агрегометрия, импедансная агрегометрия, метод флуктуации светопропускания, проточные камеры, проточная цитометрия и др [Zeidan и др., 2007]. Тестом «золотого стандарта» является оптическая агрегометрия. Она предоставляет информацию об агрегации и дезагрегации тромбоцитов, однако имеет некоторые ограничения. Метод оптической агрегометрии слабо стандартизован, требует большого количества образца для анализа и трудоемкой процедуры предподготовки пробы [Favaloro, Lippi, Franchini, 2010].

Одним из предложенных диагностических методов для оценки функции тромбоцитов является метод малоуглового светорассеяния (Low-Angle light SCattering method, ЛАСКА) [Mindukshev и др., 2005]. Возможность применения данного метода для оценки функции тромбоцитов была показана недавно, метод несет пока исследовательский характер, в клиническую практику на данный момент не введен. Метод малоуглового светорассеяния, реализованный на приборе

ЛАСКА-ТМ, недостаточно охарактеризован и верифицирован. На сегодняшний день отсутствуют данные о том, как преаналитические и аналитические факторы влияют на результаты исследования функциональной активности тромбоцитов методом лазерного малоуглового светорассеяния. Недостаточно изучена функциональная активность тромбоцитов с использованием этого метода у здоровых добровольцев и пациентов с заболеваниями системы кровообращения, крови и новообразованиями. Кроме того, не установлена взаимосвязь между параметрами функциональной активности тромбоцитов, измеренными методом лазерного малоуглового светорассеяния, и другими методами оценки активации тромбоцитов, такими как световая трансмиссионная агрегометрия.

Степень разработанности темы исследования

В 1998 г. для исследования активации и агрегации тромбоцитов был предложен новый метод оценки динамического светорассеяния [Деркачев и др., 1998]. Этот метод, основанный на явлении лазерной малоугловой дифракции света, имеет ряд преимуществ по сравнению с уже существующими методами оценки функции тромбоцитов. Метод малоуглового светорассеяния работает при низкой концентрации тромбоцитов, что критически важно при тромбоцитопении, методика требует небольшого объема образца (30 мкл по сравнению с 300 мкл в агрегометрии), в качестве среды для измерений используется буфер с известным рН и концентрацией кальция. Метод малоуглового светорассеяния чувствителен к более низкой концентрации АДФ (аденозиндифосфат) по сравнению с методом оптической агрегометрии.

Миндукшев и др. [Mindukshev и др., 2012] валидировали метод малоуглового светорассеяния, построив компьютерную модель малоуглового светорассеяния в процессе агрегации, а также провели исследование агрегации у пациента с тромбастенией Гланцмана. Численно охарактеризована реакция изменения формы тромбоцитов в ответ на АДФ: рассчитаны полумаксимальная эффективная концентрация агониста и коэффициент Хилла. С помощью метода малоуглового

светорассеяния было показано, что секретируемые тромбоцитами АДФ и тромбоксан А₂ играют важную роль при их коллаген-индуцируемой агрегации. Показана возможность применения метода для исследования тромбоцитов мышей. Исследовано влияние температуры на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, и разработан вариант устройства для измерения концентрации внутриклеточного кальция во время агрегации [Mindukshev и др., 2022]. Кроме того, метод малоуглового светорассеяния был использован для характеристики ингибирования тромбоцитов уже используемым в клинике стимулятором растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) [Reiss и др., 2015], NO- и гем-независимым активатором pГЦ [Sharina и др., 2015], а также для детальной характеристики ингибирования АДФ-индуцированной активации тромбоцитов по пути цАМФ/ПКА [Beck и др., 2017].

Однако данных о преаналитических и аналитических факторах, способных повлиять на результаты исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом лазерной малоугловой дифракции, пока мало; данные о применении данного метода в клинической практике остаются ограниченными, несмотря на его значительный потенциал в качестве диагностического инструмента в гематологии, особенно при заболеваниях, связанных с тромбоцитопенией.

Цели и задачи

Целью данной работы является разработка метода малоуглового светорассеяния для оценки функциональной активности тромбоцитов пациентов с гематологическими, онкогематологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Основные задачи диссертационной работы:

1. Продемонстрировать возможность применения метода малоуглового светорассеяния для оценки агрегации и изменения формы тромбоцитов пациентов с гематологическими, онкогематологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

2. Определить преаналитические и аналитические факторы, влияющие на результаты исследования функциональной активности тромбоцитов методом лазерного малоуглового светорассеяния.
3. Оценить функциональную активность тромбоцитов у когорт здоровых добровольцев и пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, системы крови, а также новообразованиями методом лазерного малоуглового светорассеяния.
4. Выявить связь параметров функциональной активности тромбоцитов, определяемых методом лазерного малоуглового светорассеяния, с активационными маркерами тромбоцитов, определяемыми методами проточной цитометрии, а также с параметрами, определяемыми световой трансмиссионной агрегометрией.

Научная новизна

В диссертационной работе впервые показано, что:

1. Интенсивность светопропускания лазерного излучения слабее зависит от размера тромбоцита чем интенсивность светорассеяния на малых углах (10°).
2. Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации значимо снижена в пробах содержащих ацетилсалициловую кислоту и тикагрелор по сравнению с контрольными в исследованиях *in vitro*.
3. Метод малоуглового светорассеяния позволяет выявлять дефекты в агрегации тромбоцитов у пациентов с афибриногенемией.
4. Начальные скорости агрегации тромбоцитов, измеренные у пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/синдромом Казабаха-Меритт и здоровых добровольцев, значимо не отличаются.
5. Метод малоуглового светорассеяния позволяет выявлять снижение агрегации тромбоцитов при длительном приеме антиагрегантов пациентами с острым коронарным синдромом.
6. Параметры агрегационного ответа тромбоцитов связаны с их активационными маркерами.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе работы было выяснено, что параметры агрегации тромбоцитов, исследованные методом лазерного малоуглового светорассеяния, реагируют на влияние двойной антиагрегантной терапии. Данный метод имеет потенциал для контроля эффективности ингибирования функции тромбоцитов в ходе лечения пациентов с острым коронарным синдромом после проведения чрескожного коронарного вмешательства. Полученные данные об агрегации и изменении формы тромбоцитов у пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/синдромом Казабаха-Меритт позволяют рассматривать его как перспективный инструмент для диагностики тромбоцитопений и внедрения данного метода в клиническую практику, а также расширения границ его применения для фундаментальной науки.

Методология и методы исследования

Для моделирования рассеяния энергии лазерного излучения на тромбоците использовали программный пакет Comsol Multiphysics v6.2. Для расчёта светорассеяния согласно теории Ми использовали программу MiePlot v4.6.21. Аналитический расчет функции индикатрисы рассеяния для малых углов проводили с помощью Visual Studio Code v1.85.2 (Microsoft Corporation). Для изучения влияния различных аналитических и преаналитических параметров на активационный ответ тромбоцитов при стимуляции АДФ и коллагеном, а также для оценки функциональной активности тромбоцитов у здоровых детей, здоровых взрослых добровольцев, пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию, и пациентов с онкогематологическими заболеваниями был применен метод лазерного малоуглового светорассеяния. Метод проточной цитометрии применяли для анализа маркеров активации тромбоцитов у здоровых взрослых добровольцев, а также среди здоровых детей и педиатрических пациентов. Для оценки агрегации тромбоцитов у здоровых детей и пациентов с геморрагическим синдромом использовали метод оптической агрегометрии. Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, США).

Положения, выносимые на защиту

1. Для суспензии тромбоцитов в процессе агрегации увеличение интенсивности светопропускания лазерного излучения существенно ниже, чем уменьшение интенсивности светорассеяния на малых углах (10°).
2. Начальная скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов возрастает с увеличением относительного содержания плазмы крови в интервале от 2 до 6%, а в интервале от 6 до 12% выходит на плато, что свидетельствует о влиянии белков плазмы на кинетику агрегации тромбоцитов человека.
3. Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов снижается в три раза при воздействии двойной антиагрегантной терапией по сравнению с контрольным образцом.
4. Начальная скорость агрегации тромбоцитов коррелирует с уровнем активированной формы гликопротеина IIb/IIIa у здоровых взрослых при активации тромбоцитов сильными агонистами ($r=0,83$, $p<0,0001$), однако корреляция между данными параметрами отсутствует в когорте пациентов с острым коронарным синдромом ($r=-0,35$, $p=0,18$), что свидетельствует о том, что метод малоуглового светорассеяния обеспечивает дополнительной информацией независимой от получаемой методом проточной цитометрии.

Личный вклад автора

Все эксперименты направленные на изучение влияния аналитических и преаналитических параметров на агрегацию и изменение формы тромбоцитов, работа на лазерном малоугловом анализаторе, анализ агрегации тромбоцитов у пациентов с сердечно-сосудистыми, онкологическими и/или гематологическими заболеваниями, а также статистическая обработка данных, написание статей и тезисов для конференций по материалам диссертации проводились лично автором, либо при его непосредственном участии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов подтверждаются проведением всех экспериментов в необходимом (не менее трех) количестве независимых повторов, использованием методов

статистической обработки данных, а также публикациями в рецензируемых журналах.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 6 – в журналах, индексируемых международными цитатно-аналитическими базами Scopus; 6 – в журналах, индексируемых международными цитатно-аналитическими базами Web of Science; публикаций в трудах конференций и съездов – 10.

Апробация работы

Результаты работы были представлены автором на конгрессе международного общества по тромбозу и гемостазу (2020), на международном научном форуме «Ломоносов-2020», на Объединенном международном конгрессе «Open Issues on Hemostasis and Thrombosis – 2018» совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, а также на семинарах лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза НМИЦ ДГОИ им. Д.Рогачева (2018 – 2025).

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Тромбоцитарный гемостаз

Тромбоциты – самые мелкие безъядерные форменные элементы крови [Пономаренко, 2023], имеющие форму дисков диаметром 2-4 мкм и толщиной 0,5 мкм [Васильев и др., 2013; Пантелеев, Свешникова, 2014]. У здоровых людей концентрация тромбоцитов в кровотоке составляет 200-400 тысяч в мкл [Мазуров, 2011]. Способность тромбоцитов прилипать к поврежденной стенке сосуда и образовывать агрегаты впервые была описана в 19 веке Биццоццо [Gaetano de, Cerletti, 2002]. Эту способность тромбоциты приобретают в результате активации – довольно сложного процесса, управляемого десятком активаторов, действующих через многочисленные рецепторы.

1.1.1 Строение тромбоцитов

Покоящиеся (неактивированные) тромбоциты имеют форму диска и в основном гладкую поверхность (рис. 1А) [Italiano, 2007]. Активация тромбоцитов в результате действия растворимых агонистов или адгезии к активному субстрату сопровождается быстрым изменением их формы – превращением дисков в частицы сферической формы, образованием выростов и псевдоподий, распластыванием при прикреплении к поверхности [Linden, 2013].

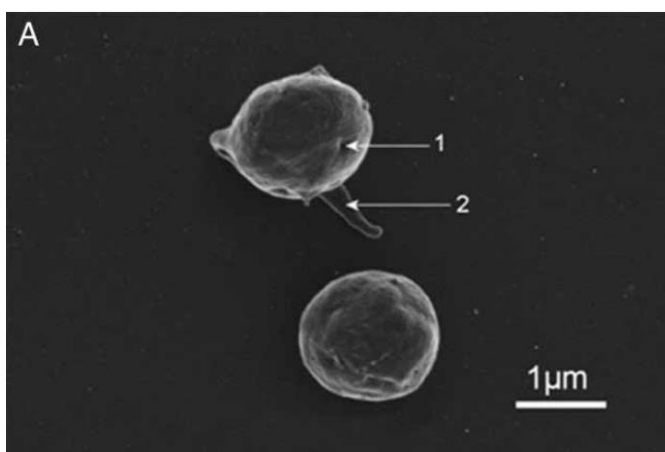


Рисунок 1. Фотография тромбоцитов здорового добровольца, сделанная с помощью сканирующей электронной микроскопии [Swanepoel, Pretorius, 2015]. Тромбоциты имеют сферическую форму. На мембране присутствует несколько небольших пор открытой канальцевой системы (на одну из них указывает стрелка 1). Тромбоциты не взаимодействуют друг с другом. От тела тромбоцита отходит либо одна псевдоподия (указана стрелкой 2), либо же они отсутствуют вовсе. Линейный масштаб – 1 мкм (исходное увеличение $\times 40\,000$).

Плазматическая мембрана тромбоцитов представляет собой классический липидный бислой с включенными в него белками. Большинство мембранных белков являются гликопротеинами (ГП) – содержат углеводородные компоненты. Главные белки плазматической мембраны – ГП IIb/IIIa, ГП Ib-V-IX, ГП IV.

Тромбоциты содержат два типа специализированных секреторных гранул, содержимое которых высвобождается в результате экзоцитоза при активации тромбоцитов [Hartwig, 2006]. Плотные гранулы содержат низкомолекулярные соединения – АДФ и АТФ, серотонин, ионы кальция и некоторые другие. Более крупные α -гранулы содержат белковые соединения (Р-селектин, а также многие белки, присутствующие и на поверхности неактивированных тромбоцитов ГП Ib-V-IX, ГП IIb/IIIa и др). При активации тромбоцитов мембраны гранул сливаются либо непосредственно с плазматической мембраной, либо с мембраной, соединенной с поверхностью открытой канальцевой системы, что приводит к секреции (высвобождению) их содержимого наружу [Gremmel, Frelinger, Michelson, 2016]. Мембраны обоих типов содержат специфические белковые маркеры – CD63, CD107b, локализованные в плотных гранулах, а Р-селектин (CD62P) – в α -гранулах. Появление этих белков на поверхности активированных тромбоцитов ассоциировано с экзоцитозом соответствующих гранулярных структур [Gremmel, Frelinger, Michelson, 2016].

1.1.2 Агонисты тромбоцитов и их рецепторы

Повреждение сосуда и нарушение его эндотелиальной выстилки сопровождается появлением в этом участке сосудистого русла биологически активных соединений, способных активировать тромбоциты. Эти соединения называют агонистами или индукторами, и их действие направлено на стимуляцию протромбогенных реакций тромбоцитов [Мазуров, 2011]. Для всех агонистов существуют специфичные рецепторы на поверхности тромбоцитов, взаимодействие с которыми приводит к генерации активационного сигнала и передаче его внутрь клетки. Функциональными проявлениями активации тромбоцитов является изменение их формы, адгезия, агрегация, экзоцитоз гранул, синтез ТХА₂, стимуляция прокоагулянтных реакций [Rubenstein, Yin, 2018].

АДФ служит одним из основных физиологических индукторов активации и агрегации тромбоцитов. При повреждении сосуда источником АДФ служат, в первую очередь, сами тромбоциты [Gachet, Cazenave, 1991; Puri, Colman, 1997]. Активированные тромбоциты секретируют АДФ из плотных гранул, в которых концентрация этого индуктора достигает молярных значений. АДФ, высвобождаемый из тромбоцитов, усиливает их активацию, индуцированную практически всеми известными агонистами [Cattaneo, 2015]. Этот индуктор относится к сравнительно слабым. АДФ способен стимулировать активность пуринаргических рецепторов тромбоцитов. К ним относят G_{aq}-сопряженный P₂Y₁ рецептор, G_{ai}-сопряженный P₂Y₁₂ рецептор и ионотропный рецептор P₂X₁ [Estevez, Du, 2017; Kunapuli и др., 2003]. Рецептор P₂X₁ представляет собой кальциевый канал, его активация стимулирует вход Ca²⁺ в тромбоциты. Рецептор P₂Y₁ обеспечивает инициацию АДФ-индуцированной активации и первичной, обратимой агрегации тромбоцитов, а также изменение их формы. Для усиления активирующего сигнала, как при добавлении к тромбоцитам самого АДФ, так и других индукторов, стимулирующих его секрецию необходим рецептор P₂Y₁₂ [Мазуров, 2011].

Коллаген, главный белок внеклеточного матрикса, также относится к основным физиологическим активаторам тромбоцитов [Пантелеев, Свешникова,

2014]. В здоровых, неповрежденных тканях коллагены, поддерживающие стенку кровеносных сосудов и окружающие ткани, скрыты слоем эндотелиальных клеток и не могут вступать в контакт с циркулирующими тромбоцитами [Meijden van der, Heemskerk, 2019]. Однако при повреждении эндотелия коллагены могут взаимодействовать с клеточными компонентами крови, а также с белками плазмы крови [Farndale, 2006]. Рецепторами коллагена на поверхности тромбоцитов служат гликопротеин VI и $\alpha 2\beta 1$ -интегрин (ГП Ia-IIa) [Мазуров, 2011] [Nuytens и др., 2011].

Тромбин циркулирует в кровотоке в неактивированном состоянии, в виде зимогена – протромбина, который превращается в активный фермент посредством расщепления в молекуле двух пептидных связей. Он является одним из основных активаторов тромбоцитов и главным ферментом системы свёртывания крови, который катализирует основную реакцию этой системы превращения фибриногена в фибрин [Шатурный и др., 2014]. Синтетические пептиды, которые могут выступать лигандами тромбиновых рецепторов называют TRAP пептидами (Thrombin Receptor Activating Peptides) [Michelson и др., 2019]. Рецепторами тромбина являются трансмембранные белки называемые PAR– рецепторами (protease activated receptors) [Пономаренко, 2023]. На тромбоцитах человека имеется два варианта рецептора – PAR1 (высокоаффинный) и PAR4 (низкоаффинный) [Мазуров, 2011].

Активацию тромбоцитов также можно стимулировать адреналином, тромбоксаном A₂, фактором фон Виллебранда, серотонином, вазопрессином и другими веществами.

1.1.3 Функциональный ответ тромбоцитов

Функциональный ответ тромбоцитов на действие агонистов – комплексный процесс, основным результатом которого является образование тромбоцитарных агрегатов в суспензии или на поверхности субстрата [Сироткина и др., 2017]. Однако в этом процессе принято выделять отдельные реакции, такие как адгезия (процесс прикрепления тромбоцитов к поверхности), изменение формы, реакция

высвобождения и непосредственно агрегация тромбоцитов [Пономаренко и др., 2019]. Инициация всех этих процессов происходит в результате связывания агонистов со своими рецепторами, последующего возникновения активирующего сигнала и его распространения внутри тромбоцита с помощью системы вторичных посредников [КЛЫЧЕВА, 2018; Stalker и др., 2012]. Для реализации каждой функциональной реакции требуется активация различных структурных и метаболических систем тромбоцита [Сироткина и др., 2017]. В адгезии тромбоцитов ключевую роль играет взаимодействие специальных мембранных рецепторов с белковыми субстратами; в изменении формы – перестройка цитоскелета; в реакции высвобождения – экзоцитоз гранул и синтез ТХА₂, а в агрегации – связывание активированного ГП IIb/IIIa со своими лигандами – фибриногеном и фактором Виллебранда [Meijden van der, Heemskerk, 2019].

Изменение формы тромбоцитов является следствием перестройки их цитоскелета, индуцированной воздействием растворимых агонистов или иммобилизованных на поверхности адгезивных белков. Превращение дискоидных тромбоцитов в сферические обусловлено, главным образом, разрушением кальциевой тубулиновой микротрубочки, локализованной по периметру диска неактивированного тромбоцита [Hartwig, 2006].

При активации растворимыми или иммобилизованными агонистами из тромбоцитов во внеклеточное пространство высвобождается большое количество как низкомолекулярных, так и белковых соединений. Большинство этих веществ секретируется из специализированных гранул, в которых они сохраняются в покое тромбоцитах [Мазуров, 2011]. Однако некоторые высвобождаемые соединения, в частности ТХА₂, в неактивированных тромбоцитах не содержатся, но при их активации синтезируются заново и затем секретируются, не накапливаясь в гранулах. Кроме того, активация тромбоцитов сопровождается отщеплением с их поверхности ряда мембранных белков, таких как Р-селектин, CD40 лиганд и некоторых других [Michelson и др., 2019].

Агрегация тромбоцитов как в суспензии, так и на поверхности представляет собой конечный и наиболее важный с физиологический и патофизиологической

точки зрения результат активации тромбоцитов. Именно тромбоцитарные агрегаты составляют основу пристеночного тромба при нарушении целостности сосуда или его внутреннем повреждении (рис. 2) [Savage, Cattaneo, Ruggeri, 2001].

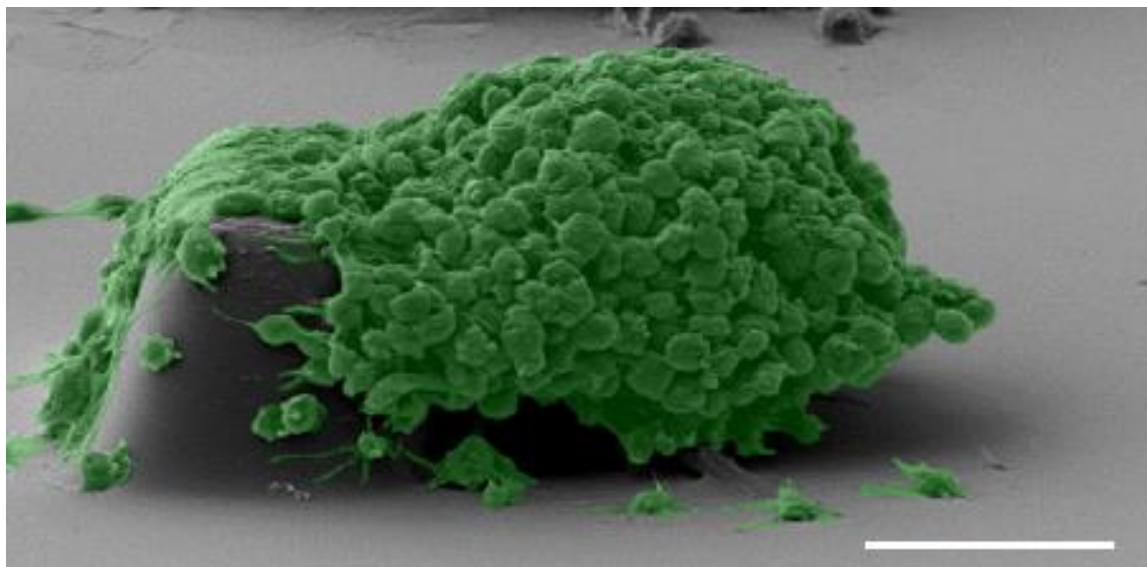


Рисунок 2. Микрофотография тромбоцитарного агрегата, полученная с помощью сканирующей электронной микроскопии. Агрегат образован на блоке и столбике (масштабная линейка, 10 мкм) в микрофлюидной камере. Образец крови пропусклся через микроканал, содержащий жесткие блоки и гибкие стойки. Эти структуры были изготовлены из полидиметилсилоксана, а коллаген и VWF были адсорбированы для поддержки адгезии тромбоцитов и активации. Микрофотография воспроизведена из [Ting и др., 2019].

Агрегация, как и другие функциональные реакции тромбоцитов, запускается в результате воздействия на них низкомолекулярных (АДФ, ТХА₂, адреналин и др.) или белковых (коллаген, фактор Виллебранда и др.) агонистов [Jarvis, 2004]. Связывание агонистов со своими рецепторами стимулирует активацию тромбоцитов и, как следствие, изменение конформации ГП IIb/IIIa и приобретение им способности к связыванию фибриногена и фактора Виллебранда. Эти белки образуют молекулярные связи между активированными тромбоцитами, что и приводит непосредственно к их «склеиванию» и формированию агрегатов. Связывание ГП IIb/IIIa с фибриногеном – необходимое условие для обеспечения

агонист-индуцированной агрегации [Полохов, 2023; Savage, Cattaneo, Ruggeri, 2001].

Коллективом под руководством Gupta [Gupta и др., 2021] была разработана модель для описания динамики агрегации тромбоцитов. Процесс агрегации моделировался следующим образом: неактивированные тромбоциты, плывущие в вязком сдвиговом потоке, налипали на активированные тромбоциты, осажденные на стенке кровеносного сосуда. Эта модель использует крупнозернистую молекулярную динамику для тромбоцитов на микроуровне и динамику диссипативных частиц для сдвигового потока на макроуровне. В условиях относительно низкого сдвига агрегация опосредуется фибриногеном через рецепторы $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Параметры симуляции были следующими: длина связи (длина связи ГП IIb/3a-фибриноген-ГП IIb/3a) составила 67,5 нм; сила связи 0,82 пН. Данная модель выявила взаимосвязь между силой рекрутирования и расстоянием между центрами масс двух тромбоцитов путем интеграции межтромбоцитарных взаимодействий на молекулярном уровне во время агрегации в сдвиговых потоках.

Динамику необратимой агрегации тромбоцитов можно описать с помощью кинетического уравнения Смолуховского:

$$\frac{dP_i}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^{i-1} k(j; i-j) P_j P_{i-j} - \sum_{j=1}^{\infty} k(i; j) P_i P_j, \quad (1)$$

где P_i - концентрация агрегата из i мономеров; $k(i; j)$ – константа скорости слипания агрегата из i мономеров с агрегатом из j мономеров [Колесникова и др., 2009].

1.1.4 Нарушения функции тромбоцитов

Тромбоциты человека играют решающую роль как в нормальном гемостазе, так и в патологическом кровотечении и тромбозе [Panissia и др., 2015]. Множество кровотечений и тромбозов часто ассоциированы именно с дисфункцией тромбоцитов [Haley, 2020]. Нарушения системы гемостаза, в основе которых лежат

качественный дефект и дисфункция тромбоцитов, называют тромбоцитопатиями [Мазуров, 2011]. В современной классификации тромбоцитопатий выделяют две большие группы – наследственные и приобретенные. К наследственным тромбоцитопатиям относится, например, дефицит или дефект ГП IIb/IIIa, приводящий к нарушению агрегации тромбоцитов (тромбастения Гланцмана); дефицит или дефект комплекса ГП Ib-IX-V, приводящий к нарушению адгезии тромбоцитов (синдром Бернара-Сулье); гиподисфибриногенемия (снижение концентрации и изменение функции циркулирующего фибриногена), нарушение высвобождения и дефицит плотных гранул (болезнь Германского-Пудлака, синдром Чедиака-Хигаси), дефицит α гранул (синдром серых тромбоцитов) и др. [Palma-Barqueros и др., 2021; Tsai, Battinelli, 2021]. Тяжесть геморрагического синдрома может значительно варьироваться в зависимости от качественных и количественных дефектов тромбоцитов [Michelson и др., 2019].

Тромбастения Гланцмана характеризуется геморрагическими проявлениями, при которых отмечается удлинение времени кровотечения, а также полное отсутствие или резкое снижение интенсивности ретракции кровяного сгустка на фоне нормального содержания тромбоцитов в единице объема крови. Это является результатом снижения агрегационной способности тромбоцитов [Дёмина, Кумскова, Пантелеев, 2015]. В основе патогенеза данного заболевания лежит дефицит или дисфункция мембранных белков тромбоцитов – интегрин α IIb β 3 (ГП IIb/IIIa), формирующих на поверхности тромбоцитов гетеродимер – комплекс, связывающий фибриноген, фактор Виллебранда, фибронектин и витронектин. Этот мембранный комплекс является необходимым компонентом заключительного этапа агрегации, активированной физиологическими агонистами. В момент активации, комплекс ГП IIb–IIIa претерпевает конформационные изменения, позволяющие ему присоединять фибриноген и другие белки, способствующие адгезии. Взаимодействие этих белков с ионами кальция служит основой для агрегации тромбоцитов [Кумскова и др., 2015].

Согласно Деминой И.А. [Дёмина, Кумскова, Пантелеев, 2015] **синдром серых тромбоцитов** характеризуется как «патологическое состояние,

сопровожающееся тромбоцитопенией, достаточно мягкими проявлениями кровоточивости и наличием агранулярных тромбоцитов в периферической крови». Изучение органелл серых тромбоцитов с помощью биохимических и электронно-микроскопических техник выявило, что все структуры, за исключением α -гранул, сохраняют свою структуру и количество. Однако, функция тромбоцитов нарушена, что проявляется в снижении агрегации при стимуляции тромбоцитов коллагеном и/или тромбином (Таблица 2).

Синдромы дефицита пула хранения. К ним относятся синдромы Германски–Пудлака и Чедиака–Хигаси. При этих синдромах, в частности наблюдается удлинение времени кровотечения и незначительное нарушение свертываемости крови. Причиной заболевания является дефицит содержимого плотных гранул и/или их самих. Исследования функции тромбоцитов выявляют нарушение агрегации в реакции с АДФ, адреналином, ристоцетином и коллагеном [Дёмина, Кумскова, Пантелеев, 2015].

Таблица 2. Нарушение агрегации тромбоцитов при некоторых наследственных тромбоцитопатиях. Адаптировано из [Дёмина, Кумскова, Пантелеев, 2015]

Диагноз	Нарушение агрегации	Дополнительные признаки, исследования
Тромбастения Гланцмана	Отсутствие ответа на все агонисты, кроме ристоцетина	Проточная цитофлуориметрия – исследование количества и функциональной активности интегрин Pb/IIIa
Дефект секреции, дефицит плотных гранул	Наличие сниженного ответа к нескольким агонистам: АДФ, коллагену, эпинефрину, арахидоновой кислоте	Электронная микроскопия для оценки плотных гранул, проточная цитофлуориметрия

Синдром серых тромбоцитов	Понижение ответа на активацию тромбином и/или коллагеном	Наличие в мазке слабо окрашенных тромбоцитов, электронная микроскопия, проточная цитофлуориметрия
---------------------------------	--	--

1.1.4.1 Приобретенные тромбоцитопатии

Избыточная функция или количество тромбоцитов, или иные нарушения в сердечно-сосудистой системе могут приводить к формированию тромбоцитарных агрегатов внутри сосуда – тромбов [Пантелеев, Свешникова, 2014]. Тромбоцитарные тромбы могут образовываться в самых разных ситуациях и играют центральную роль в таких патологических состояниях, как инфаркты и инсульты [Шиффман, 2001]. Таким образом, они отвечают за львиную долю смертности и инвалидности в современном мире, а противотромбоцитарные препараты, такие как клопидогрел, занимают почетные места в списке наиболее продаваемых лекарств на планете.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является ведущей причиной смерти в Российской Федерации. ИБС – заболевание, вызванное недостаточностью кровоснабжения миокарда и приводящее к нарушениям функции кардиомиоцитов [Дубикайтис, 2017]. Наиболее опасным является период обострения ИБС, клинические варианты которого объединяются термином «острый коронарный синдром» (ОКС). Введение этого термина в практику обусловлено появлением клинической симптоматики, позволяющей диагностировать ишемию и необходимостью проведения экстренных лечебных мероприятий, улучшающих прогноз пациента с ОКС [Аглуллина, 2013]. Острый коронарный синдром в основном обусловлен агрегацией тромбоцитов [Stakos, Tziakas, Stellos, 2012]. В работе Хаспековой и соавторов [Хаспекова и др., 2011] исследовалась световая трансмиссионная АДФ - индуцированная агрегация тромбоцитов у пациентов с ОКС. В первой временной точке агрегацию тромбоцитов анализировали в тех случаях, когда больные уже получили ацетилсалициловую кислоту, но еще не получили клопидогрел, а затем (3-5 и 8-12-е сутки) на фоне сочетанного приема

обоих препаратов. Агрегацию индуцировали 5 и 20 мкМ АДФ. По сравнению с исходным уровнем (1-е сутки, АСК), на 3-5-е сутки, т.е. после реализации действия клопидогрела, агрегация снижалась в среднем на 54 и 40% при ее стимуляции 5 и 20 мкМ АДФ соответственно, затем, на 8-12-е сутки не изменялась.

В последние годы появилось большое количество данных о том, что режимы назначения ДАТТ потенциально могут быть основаны на функциональном тестировании тромбоцитов [Gurbel и др., 2007], [Al-Tamimi и др., 2012]. Тем не менее, в настоящий момент недостаточно данных о значении "фенотипа гиперреактивных тромбоцитов", как фактора риска развития сердечно-сосудистого события, а также недостаточно данных о возможности использования малоуглового светорассеяния для мониторинга антитромбоцитарной терапии, что делает настоящее исследование крайне актуальным [Филькова, 2023].

1.1.4.2. Онкогематология

У пациентов со злокачественными новообразованиями тромбоэмболические и геморрагические осложнения обусловлены дисфункцией системы гемостаза. Современные исследования показали, что онкологические заболевания повышают риск развития тромботических осложнений в 4-7 раз [Под ред. О.А. Рукавицына, С.В. Игнатьева, 2024].

Капошиформная гемангиоэндотелиома (КГЭ) – это редкая, как правило, врожденная сосудистая опухоль [Pati и др., 2021]. КГЭ относится к опухолям промежуточной степени злокачественности. Самым грозным и тяжелым осложнением является присоединение тромбоцитопении и коагулопатии потребления, т. е. развитие синдрома/феномена Казабаха–Мерритт (СКМ), который и определяет высокую летальность (до 30%) при данном гистологическом варианте. Частота встречаемости СКМ неизвестна. У большинства пациентов (72%) опухоль выявлялась с рождения, в половине случаев (59%) гематологические осложнения диагностировались одновременно с выявлением опухоли [Хачатрян и др., 2021]. В тромбоцитах пациентов с СКМ наблюдаются различные изменения функциональной активности относительно здоровых доноров. Изучение

функционального состояния тромбоцитов и выявление причинно-следственной связи различных нарушений при данной патологии важно для разработки комплексных подходов к лечению данного синдрома, выбора и индивидуальной дозировки препаратов [Глуханюк и др., 2016]. Исследование Карр и соавторов [Карр и др., 2022] показало, что у двух обследованных пациентов с КГЭ наблюдались тяжелые нарушения агрегации тромбоцитов в разные моменты течения заболевания.

1.1.5. Антиагрегантная терапия

Антиагреганты – группа фармакологических препаратов, предотвращающих тромбообразование путем торможения агрегации тромбоцитов и подавления их фиксации к внутренней поверхности кровеносных сосудов. Ингибиторы сосудисто-тромбоцитарного гемостаза классифицируют по двум группам:

- 1) Ингибиторы циклооксигеназы;
- 2) Блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов [Под ред. О.А. Рукавицына, С.В. Игнатьева, 2024].

Ацетилсалициловая кислота является ингибитором агрегации тромбоцитов. Аспирин необратимо ацетирует и инактивирует циклооксигеназу тромбоцитов, что приводит к ингибированию эндопероксида и синтеза ТХА₂. Аспирин индуцирует и другие эффекты, включая ацетилирование белков плазмы (протромбина и фибриногена). Впечатляющая эффективность аспирина для первичной и вторичной профилактики артериальных сосудистых событий хорошо известна [Michelson и др., 2019].

К блокаторам АДФ-рецепторов тромбоцитов относят тиенопиридины и клопидогрел [Под ред. О.А. Рукавицына, С.В. Игнатьева, 2024]. Производные тиенопиридина (тиклопидин) и клопидогрель, подавляют функцию тромбоцитов, ингибируя связывание АДФ с рецептором P2Y₁₂ [Patrono и др., 2004]. У пациентов, получавших тиенопиридин, агрегация тромбоцитов в ответ на АДФ, коллаген,

адреналин и тромбин, ингибируется в различной степени в зависимости от концентрации агонистов.

Прасугрел — новый представитель тиенопиридинов, так же как и клопидогрел, является пролекарством, активный метаболит которого более быстро, полно и тесно связывается с рецепторами тромбоцитов P2Y₁₂, вызывая более выраженную, чем клопидогрел, ингибицию АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [Голухова, Рябинина, 2013]. Результаты исследования TRITON-TIMI 38 показали, что прасугрел (нагрузочная доза 60 мг, поддерживающая доза 10 мг/сут) эффективно действует у больных с ОКС, у пациентов с высоким и средним риском ОКС, которым проводили ЧКВ, и более эффективен в профилактике ишемических событий [Бокарев, Попова, Козлова, 2009].

Тикагрелор — один из новейших антиагрегантов, применяемых для ингибирования агрегации тромбоцитов путем блокирования рецепторов АДФ подтипа P2Y₁₂. Он принадлежит к классу нетиенопиридинов. Тикагрелор обычно применяют для профилактики и лечения тромбоэмболии у взрослых пациентов с острым коронарным синдромом [Kabil, Abo Dena, El-Sherbiny, 2022].

Двойная антиагрегантная терапия (ДАТТ), которая является комбинацией аспирина и ингибитора P2Y₁₂ рецептора, продемонстрировала снижение частоты повторных ишемических событий [Sinnaeve, Adriaenssens, 2021]. Действующие руководства рекомендуют использование ДАТТ в течение 1 года у всех пациентов с ОКС. Тикагрелор в дозе 60 мг рекомендуется на срок до 3 лет пациентам из группы высокого риска [Sharma и др., 2020]. Чем больше антиагрегантов становится доступным для лечения пациентов с ОКС, тем выше может быть потребность в мониторинге функции тромбоцитов для определения лучшего препарата для конкретного пациента [Orban, Sibbing, 2013].

1.2 Методы исследования тромбоцитов

Для анализа функции тромбоцитов в норме и при патологии, а также для оценки эффективности антитромбоцитарной терапии в настоящее время используется множество методов [Васильев и др., 2013]. Эти методы можно классифицировать на основе принципа их действия. Так, например, тромбоэластограф измеряет физическую плотность сгустка, т.е. принцип действия прибора основан на механическом явлении. Импедансная агрегометрия оценивает импеданс образца при активации свертывания, таким образом, метод в своей основе использует электрическое явление. Турбидиметрический агрегометр регистрирует изменения светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы после активации пробы, т.е. метод относится к оптическим. Проточная цитофлуориметрия также относится к методам, в основе которых лежат оптические явления, а именно светорассеяние и флуоресценция.

1.2.1 Механические методы. Тромбоэластография

Компьютеризированный анализатор коагуляции тромбоэластограф (ТЭГ) представляет собой небольшой прибор, способный обрабатывать две пробы одновременно, прост в настройке. Он подключен к компьютеру (с аналитическим программным обеспечением) через блок аналого-цифрового интерфейса. Коагуляционный профиль отображается на экране в виде контура коагуляции. Диапазон нормальных значений отображается пунктирными линиями. Тромбоэластограмма является одним из двух клинически доступных вязкоупругих тестов, которые характеризуют образование и прочность сгустка крови в динамике. ТЭГ может измерять *in vitro* образование сгустка, время до первоначального образования сгустка, а затем оценивать тромбообразование по фазе ускорения, усиления и ретракции. ТЭГ также может обнаруживать лизис тромба [Wenker и др., 2000]. Образец крови помещают в предварительно нагретую кювету, которая совершает вращательные колебания с небольшой частотой. Кювета движется по дуге $4,45^\circ$, имитируя условия венозного потока крови (рис. 3) [Базаев и др., 2015].

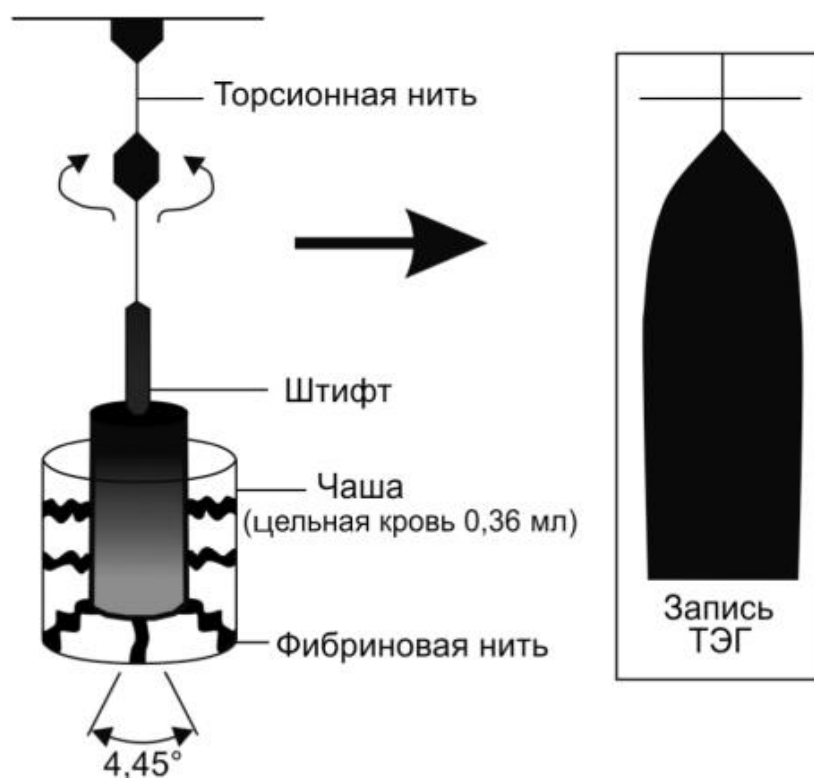


Рисунок 3. Конструкция измерительного модуля классического тромбоэластографа. Заимствовано из [Базаев и др., 2015]

Нормальный тромб проходит довольно быстро фазу ускорения и укрепления. Нити волокон, которые взаимодействуют с активированными тромбоцитами, прикрепляются к поверхности кюветы и подвешенному датчику. Сгусток, образующийся в кювете, передает свое движение на датчик [Wenker и др., 2000]. В приборе «TEG 5000» («Haemonetics») в качестве датчика-преобразователя используется электромеханический преобразователь движения торсионной нити, подключенный к подвешенному стержню [Базаев и др., 2015].

1.2.2 Электрические методы. Импедансная агрегометрия

Импедансная агрегометрия, разработанная в начале 1980-х годов, позволяет изучать агрегацию тромбоцитов в цельной крови без предварительной пробоподготовки. Метод основан на измерении электрического сопротивления между двумя платиновыми электродами, погруженными в перемешиваемую цельную кровь (рис. 4). При добавлении агониста тромбоциты агрегируют и прикрепляются к электродам, вызывая изменения в электрическом импедансе, которые затем преобразуются в детекцию агрегации [Gresele и др., 2019].

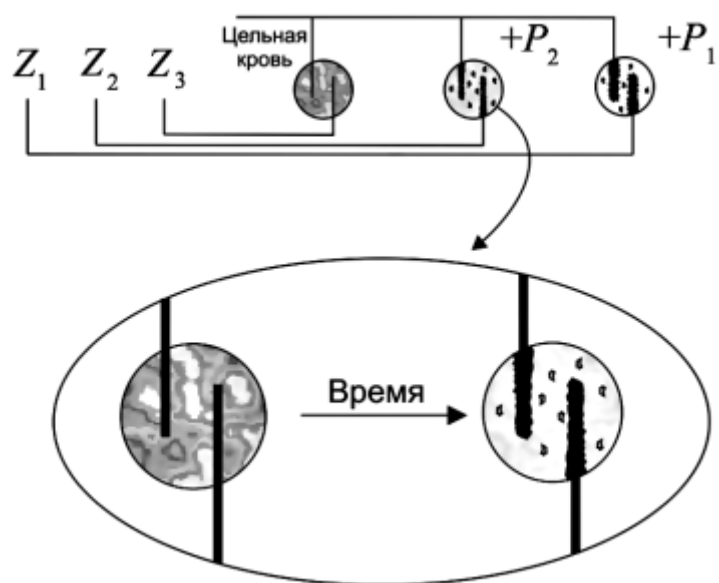


Рисунок 4. Осаждение слоя тромбоцитов на электродах датчика импеданса. Воспроизведено из [Базаев и др., 2015]

Поскольку агрегация происходит не в объёме жидкой среды образца, а на поверхности электродов, методика близка к условиям *in vivo*, т.е. моделируется образование слоя тромбоцитов на поврежденном участке ткани [Базаев и др., 2015]. К преимуществам этого метода относят возможность оценки функции тромбоцитов в липемической крови. Однако, тест не удобен при очень низком количестве тромбоцитов [Rand, Leung, Packham, 2003]. Также к принципиальным недостаткам этого метода относят налипание на электрод не только тромбоцитов, но и белков плазмы [Мазуров, 2011].

1.2.3 Оптические методы

Тромбоцит как оптический объект

В неактивированном состоянии тромбоцит имеет форму диска диаметром 2-4 мкм. Толщина этого диска составляет 0,5 мкм [Обыденный, Киреев, Пантелеев, 2022]. Средний объем тромбоцита равен 8-10 фемтолитров [Bambo, Shiferaw, Melku, 2022]. При активации тромбоцит имеет сфероидную форму. Строгое сравнение фазово-контрастной микроскопии с другими данными показали, что сплюснутый сфероид является наиболее подходящей оптической моделью

тромбоцита. Также показано, что соотношение сторон (диаметр/толщина) варьируется в зависимости от тромбоцита к тромбоциту в широком диапазоне от 2 до 8, для показателя преломления нативных и активированных тромбоцитов как $1,383 \pm 0,003$ и $1,377 \pm 0,007$, соответственно [Москаленский, 2015]. В норме распределение тромбоцитов по объёму имеет вид логнормального в диапазоне 2-15 фл. В количественном исследовании с использованием фазово-контрастной микроскопии показано, что среднее отношение полуосей тромбоцитов уменьшается с 3 до 1,25 после добавления 10 мкмоль/л АДФ.

Метод световой трансмиссионной агрегометрии

В большинстве лабораторий используется фотометрический метод индуцированной агрегации тромбоцитов. Принцип этого метода основан на регистрации изменения светопропускания богатой тромбоцитами плазмы (БТП). После добавления индуктора агрегации и формирования тромбоцитарных агрегатов наблюдается просветление БТП (рис. 5) [Koltai и др., 2017]. Мерой агрегационного процесса является графически регистрируемое падение оптической плотности и увеличение светопропускания плазмы крови [Israels, 2015; Jarvis, 2004].

При направлении пучка света на разбавленную суспензию частиц, одна часть потока рассеивается, а другая – поглощается. Зависимость экстинкции E от светопропускания описывается формулой: $E(x) = \log [1/\text{светопропускание}(x)]$ [Latimer, Wamble, 1982]. Для разбавленного образца крупных частиц оптическая плотность изменяется по закону:

$$E(x) = 0.434 NLR(x), \quad (2)$$

где N – количество частиц в единице объема, L – длина пути света в суспензии, а $R(x)$ – экстинкция в поперечном сечении.

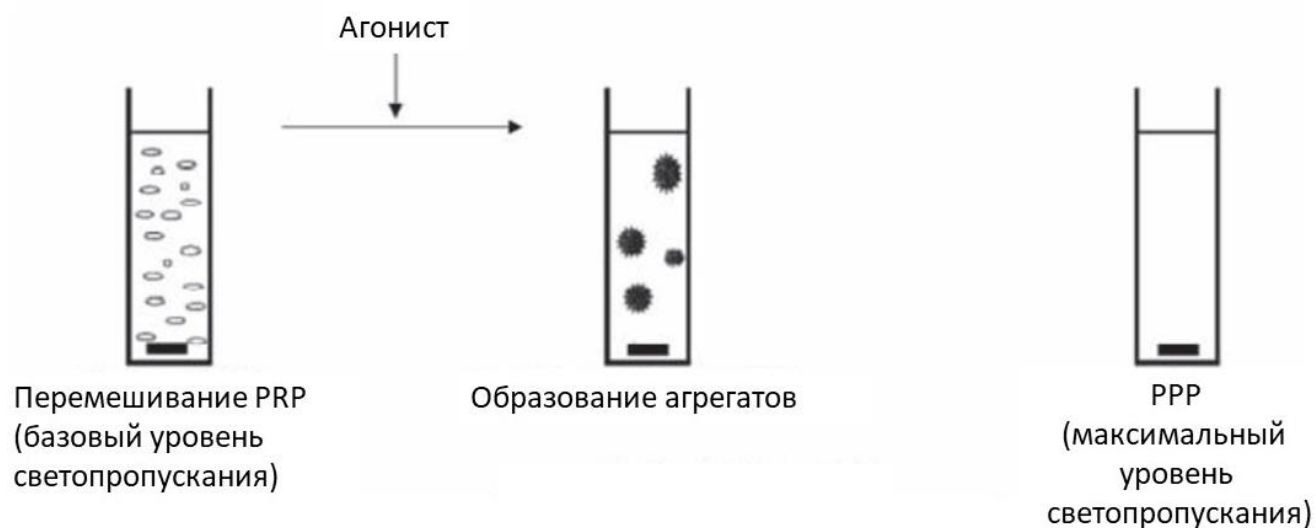


Рисунок 5. Агрегация тромбоцитов, измеренная методом световой трансмиссионной агрегометрии. Перемешивание тромбоцитов в БТП препятствует прохождению света через образец. После добавления агониста индуцируется агрегация и регистрируется увеличение светопропускания. Максимально возможный уровень светопропускания для любого образца — это тот, который наблюдается при использовании аутологичных образцов бедной тромбоцитами плазмы. Адаптировано из [White, Jennings, 1999]

Этот метод обычно называют турбидиметрическим – от английского слова *turbidity* – мутность. Он же часто называется методом Борна или агрегометрией по Борну [Мазуров, 2011]. Одним из недостатков оптической агрегометрии является невозможность ее использования при низких концентрациях тромбоцитов [Femia и др., 2013], чего лишен метод малоуглового светорассеяния. Поэтому при диагностике заболеваний, сопряжённых с тромбоцитопенией, метод лазерной малоугловой дифракции имеет преимущество перед агрегометрией по Борну. Следует отметить, что при оценке агрегации тромбоцитов важно вести контроль переменных, которые могут повлиять на результаты исследований [Michelson и др., 2019].

Метод флуктуаций светопропускания

З.А. Габбасовым был предложен новый метод оптической агрегометрии – метод флуктуаций светопропускания (ФСП-метод) [Gabbasov и др., 1989]. Данный

метод основан на анализе флуктуаций светового потока, проходящего сквозь образец крови [Базаев, Медицинская техника]. В ходе измерений определяется относительная дисперсия ФСП, которая пропорциональна радиусу частиц в анализируемой суспензии [Мазуров, 2011]:

$$\left(\frac{\sigma}{I}\right)^2 = \Theta \frac{\sum_n K_n N_n n R_n}{\sum_n N_n n}, \quad (3)$$

где σ – среднеквадратичное отклонение светопропускания; I – среднее значение светопропускания; Θ – общий объём тромбоцитов и/или агрегатов; K_n – эффективность рассеяния; N_n – количество агрегатов; R_n – радиус агрегатов, состоящий из n тромбоцитов каждый [Базаев и др., 2015]. Одним из достоинств метода является высокая чувствительность к регистрации небольших агрегатов, содержащих несколько тромбоцитов. Другим преимуществом является возможность регистрации спонтанной агрегации тромбоцитов [Мазуров, 2011]. На рис. 6 представлена блок-схема оптического агрегометра на основе ФСП-метода.

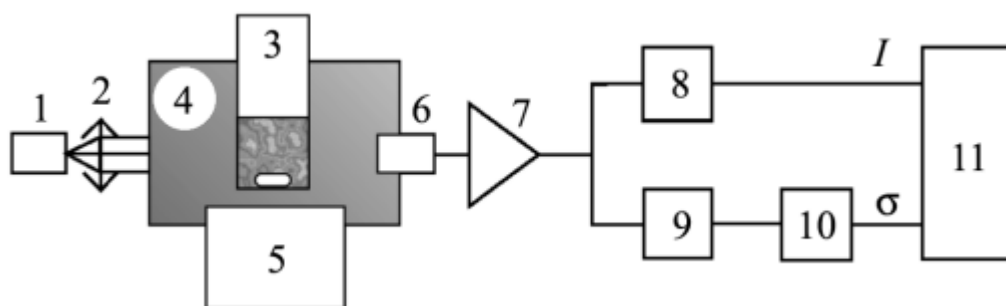


Рисунок 6. Блок-схема оптического агрегометра на основе ФСП-метода. Воспроизведено из [Базаев и др., 2015]

Кювета 3 устанавливается в термостатируемый блок 4. Электромагниты 5 создают магнитное поле, вращая мешалку. Полупроводниковый лазер 1 с коллимирующей линзой 2 дает узкий пучок света, таким образом оптический канал занимает малая часть объёма образца. Интенсивность света, падающего на фотодиод 6, пропорциональна светопропусканию образца. Электрический сигнал с фотодиода попадает в усилитель 7. Это напряжение подается на входы фильтра низких частот 8 и фильтра высоких частот 9. Выходной сигнал фильтра высоких

частот поступает на двухполупериодный выпрямитель 10; выходное напряжение выпрямителя пропорционально σ . Как I , так и σ преобразуются в цифровую форму и обрабатываются встроенным микроконтроллером 11 [Базаев и др., 2015].

Система Verify now

Система VerifyNow представляет собой компактное оптическое устройство, принцип действия которого основан на турбидиметрии. Данным методом измеряется агрегация тромбоцитов в системном картридже, содержащем специфический агонист и шарики, покрытые фибриногеном [Paníccia и др., 2014]. Полистироловые шарики, покрытые фибриногеном, агглютинируют с активированными тромбоцитами, содержащими на своей поверхности активированный рецептор фибриногена – ГП IIb/IIIa [Мазуров, 2011]. С частотой 16 Гц автоматический детектор регистрирует светопоглощение образца. При агглютинации в образце наблюдается увеличение светопропускания. Скорость агглютинации рассчитывается как наклон изменения поглощения за фиксированный интервал времени и измеряется в милливольтках на 10 с (мВ/10 с) [Michelson и др., 2019].

Проточная цитофлуориметрия

Проточная цитометрия – это техника, используемая для быстрой детекции и подсчета микроскопических частиц, таких как клетки, суспендированные в потоке жидкости. Она позволяет проводить мультипараметрический анализ до тысяч частиц в секунду [McKinnon, 2018].

Один или два световых пучка (обычно лазерный пучок) направляются на гидродинамически сфокусированный поток жидкости (рис. 7). Каждая суспендированная частица – от 0,2 до 150 мкм – проходит через пучок и рассеивает свет.

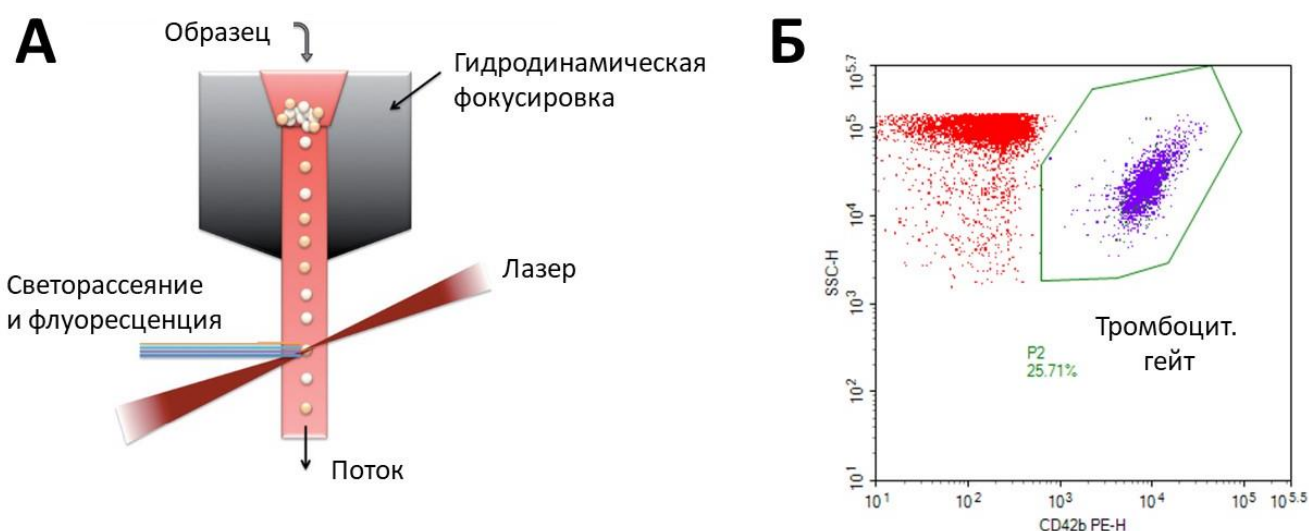


Рисунок 7. А — Принцип работы проточного цитометра. Адаптировано из [Adan и др., 2017]. Б — Выделение популяции тромбоцитов у здорового добровольца по уровню бокового светорассеяния и уровню экспрессии CD42b (маркер гликопротеина Ib, рецептор фактора фон Виллебранда).

Детектор прямого светорассеяния расположен прямо на пути луча лазера, после точки пересечения луча и потока клеток. Детектор бокового светорассеяния расположен под углом 90 градусов к лучу лазера и потоку клеток. Один или более флуоресцентных детекторов используются для регистрации флуоресценции [Givan, 2011], [[Adan и др., 2017]. Флуоресцентный анализ базируется на собственной флуоресценции клеток или флуоресценции связанных с клеткой или введенных в нее флуоресцентных зондов [Волотовский, Пинчук, 2022].

Комбинация рассеянного и флуоресцентного света регистрируется фотоэлектронными умножителями и, анализируя изменения в яркости в каждом датчике, мы получаем информацию о физической и химической структуре каждой индивидуальной частицы [Macey, Macey, 2007]. Прямое светорассеяние коррелирует с объемом клетки, а боковое зависит от внутренней сложности частицы (форма ядра, количество и тип цитоплазматических гранул и поверхность мембраны) [McKinnon, 2018]. Интенсивность флуоресцентного света, исходящего от клетки может быть ассоциирована с присутствием специфических клеточных структур (антигены, нуклеиновая кислота), а также может предоставлять

информацию о жизнеспособности, деятельности фермента, мембранном потенциале или внутриклеточной концентрации ионов [Givan, 2011]. Таким образом, измерение интенсивности флуоресцентного света даст некоторое представление о фенотипе или функции клеток, проходящих через лазерный луч (лучи).

Проточная цитометрия является инструментом для подтверждения диагноза синдрома Бернара-Сулье и тромбоастении Гланцмана [Gresele и др., 2019], а также может использоваться для выявления количественных нарушений рецепторов коллагена (GPVI, $\alpha 2\beta 1$) или тромбина (PAR-1). Этот метод удобен и для измерения агонист-индуцированного ответа тромбоцитов [Israels, 2015; Spurgeon, Naseem, 2020].

Метод проточной цитометрии позволяет выявлять дефицит или дефект секреции гранул тромбоцитов. Высвобождение α -гранул чаще всего оценивают путем измерения поверхностного Р-селектина тромбоцитов (CD62P) [Gresele и др., 2019]. Выброс плотных гранул определяют по появлению на поверхности тромбоцитов белка CD63, а также путем оценки захвата и выброса мепакрина – красителя, селективно связывающегося с адениновыми нуклеотидами в плотных гранулах [Федорова и др., 2018].

Строкотов и соавторы разработали метод характеристики тромбоцитов крови человека с использованием сканирующего проточного цитометра [Strokotov и др., 2011]. Этот метод обеспечил возможностью выявлять активацию тромбоцитов на основе измерения их формы. Помимо прочего, было проведено моделирование индикатрис светорассеяния агрегатами тромбоцитов, что позволило выявить особенности рассеяния света агрегатами, а также предложить возможные подходы для инструментального решения задачи идентификации димеров тромбоцитов [Москаленский, 2015].

Однако существующие методы оценки функции тромбоцитов имеют существенные ограничения и недостатки, такие как низкая чувствительность и специфичность, отсутствие стандартизации, недостаточная способность прогнозировать риски кровотечений и тромбозов [Paníccia и др., 2015].

Анализаторы малоуглового светорассеяния

Теоретические основы светорассеяния

Процесс рассеяния света состоит в перенятии молекулой или частицей энергии у распространяющейся в среде электромагнитной волны и излучении этой энергии в телесный угол, вершиной которого является молекула или частица [Матвеев, 1985]. Малоугловое рассеяние – упругое рассеяние электромагнитного излучения (радиоизлучения, рентгеновского и др.) или пучка частиц (электронов, нейтронов) на неоднородностях поверхности, размеры которых превышают длину волны излучения или дебройлевскую длину волны частицы; при этом углы рассеяния незначительны. Малоугловое рассеяние представляет собой информативный метод для решения биологических задач. С помощью этой техники можно получить информацию о массе, размере, форме и взаимодействии молекул в растворе [Сердюк, Заккаи, Заккаи, 2009]. Помимо этого, метод малоуглового светорассеяния обеспечивает информацией о размере клеток. Угловое распределение рассеянного света характеризуется индикатрисой рассеяния [Маньковский, 2022]. При размере частицы большей длины волны падающего света наблюдается преимущественное рассеяние вперед со многими вторичными максимумами, распределение которых зависит от размеров частиц [Матвеев, 1985]. Количественной мерой рассеяния электромагнитной волны является средняя интенсивность, которую можно выразить через вектор Пойнтинга-Умова, вектор плотности потока энергии электромагнитного поля [Грязнова, Лабутина, Прончатов-Рубцов, 2016]:

$$I = \langle S_n \rangle \quad (4)$$

Рассеяние света можно классифицировать на основании безразмерного параметра α , который определяется как: $\alpha = \pi \cdot d / \lambda$, где d – диаметр частицы, а λ – длина волны падающего излучения. Типы рассеяния в зависимости от значения α :

$\alpha \ll 1$: рэлеевское рассеяние (маленькая частица по сравнению с длиной волны света);

$\alpha \approx 1$: рассеяние Ми (частица примерно того же размера, что и длина волны света); и,

$\alpha \gg 1$: геометрическое рассеяние (частица намного больше длины волны света) [Brar, Verma, 2011].

Хотя первоначально развитая Г. А. Ми (1908) теория относилась только к сферическим частицам, термин «рассеяние Ми» используется и для частиц неправильной формы. В математическом смысле теория Ми сводится к решению уравнений Максвелла с граничными условиями на поверхности сферической частицы произвольного радиуса, характеризуемой диэлектрической и магнитной проницаемостями и электропроводимостью. Решение получается в виде рядов, которые дают полную информацию о рассеянии. Важной особенностью рассеяния Ми является его слабая зависимость от длины волны для частиц, линейные размеры которых много больше длины волны, что существенно отличается от рассеяния Рэлея [Матвеев, 1985].

Динамическое и стационарное рассеяние

В мировой практике для определения характерного линейного размера микро- и наночастиц размеров частиц и молекул используют различные методы, например, методы на основе: центробежного осаждения частиц, электронной и атомно-силовой микроскопии. Среди классических методов, основанных на явлении светорассеяния, можно выделить методы динамического и статического светорассеяния [Бочаров, Марукович, Куксин, 2016]. Динамическое рассеяние света - это явление, которое включает в себя изменения частоты, интенсивности и траектории движения света, прошедшего через среду, где присутствуют движущиеся частицы. В лазерной корреляционной спектроскопии этот метод применяется для определения размеров частиц, находящихся в суспензии [Алиева, 2021]. Метод статического рассеяния света – один из главных количественных способов изучения полимеров в растворе. С его помощью вычисляют молекулярную массу и радиус инерции макромолекул [Бочаров, Марукович, Куксин, 2016].

Кратность и задачи рассеяния

В случае если свет падает на каждую частицу в среде и частица не переизлучает волну, рассеяние считается однократным. Обратно, в случае если рассеянное частицей излучение может быть в свою очередь рассеяно другой частицей – говорят о многократном рассеянии. Оно в каждом из последовательных актов осуществляется по законам однократного рассеяния. Окончательный результат получается суммированием результатов однократных рассеяний с учетом статистических характеристик их следования друг за другом. При этом следует отметить, что наиболее распространёнными методами решения задачи многократного рассеяния света суспензиями больших «мягких» несферических частиц являются метод Монте-Карло, многопоточная теория Кубелки-Мунка и теория многократного рассеяния Тверского [Лопатин и др., 2004].

Несмотря на огромное разнообразие подходов и методов численного решения прямой задачи светорассеяния (нахождение рассеянного поля по известным оптическим характеристикам рассеивателя), Ми-теория, метод разделения переменных и метод Т-матриц позволяют получать наиболее достоверные результаты с высокой точностью для широкого класса частиц различной структуры и формы. Описанные методы выше можно использовать и при решении обратной задачи светорассеяния (выявлении обобщённых параметров, влияющих на характеристики светорассеяния), используя аппроксимационные подходы [Лопатин и др., 2004].

Применение светорассеяния в биологии и медицине

Теория светорассеяния находит широкое распространение в решении задач биологии, химии и медицины. Так, в последнее десятилетие резко возросло использование малоуглового рассеяния для изучения биологических макромолекул в растворах. Описаны функции распределения размеров для коллоидных частиц, полученных посредством способа динамического рассеяния света как для случая поляризованной составляющей, так и для случая деполаризованной составляющей [Куликов, Кошлан, 2015]. Рамирес-Белло и др.

[Ramirez-Bello и др., 2022] использовали рассеяние света для исследования молекулярной массы белков, сосредоточившись на агрегации белков, индуцированной ионами меди и цинка. Методы светорассеяния реализуются и для решения биомедицинских задач, в частности, для получения информации о распределении эритроцитов по размерам в мазке крови. Разработана аналитическая модель дифракции света на мазках крови, а также проведены численные эксперименты для проверки предложенного подхода. Показана возможность расчета среднего диаметра эритроцитов, ширины и асимметрии распределения по размерам на основании анализа углового распределения интенсивности света на дифракционной картине [Nikitin и др., 2024].

Метод малоуглового светорассеяния

Новая техника, основанная на методе малоуглового светорассеяния, регистрирует интенсивность светорассеяния под разными углами в разбавленной суспензии крови [Mindukshev и др., 2005]. Метод оказался высокочувствительным для одновременного детектирования изменения формы и размеров тромбоцитов в течение их активации. В отличие от широко используемых методов, метод светорассеяния может детектировать изменение формы и агрегацию в ответ на наномолярные концентрации внеклеточных нуклеотидов [Mindukshev и др., 2005]. Данные из статьи [Mindukshev и др., 2012] демонстрируют удобство и преимущества этого метода для всестороннего анализа рецепторов тромбоцитов и их функций.

Метод малоуглового светорассеяния регистрирует динамические изменения интенсивности светорассеяния в суспензии тромбоцитов при их активации агонистом. Миндукшев и соавторы продемонстрировали, что метод является высокочувствительным к наномолярным концентрациям агониста (100 нМ АДФ). По графику, полученному на 1° , можно судить об агрегации тромбоцитов, а по данным, полученным на 12° – об изменении формы тромбоцитов (сферизации) в течение активации. Для верификации данного утверждения была построена модель процесса агрегации тромбоцитов, включающая три разные стадии агрегации (рис.

8). Первая стадия описывала изолированные тромбоциты (мономеры), вторая — димеры тромбоцитов, третья — смесь димеров и крупных агрегатов (мультимеры).

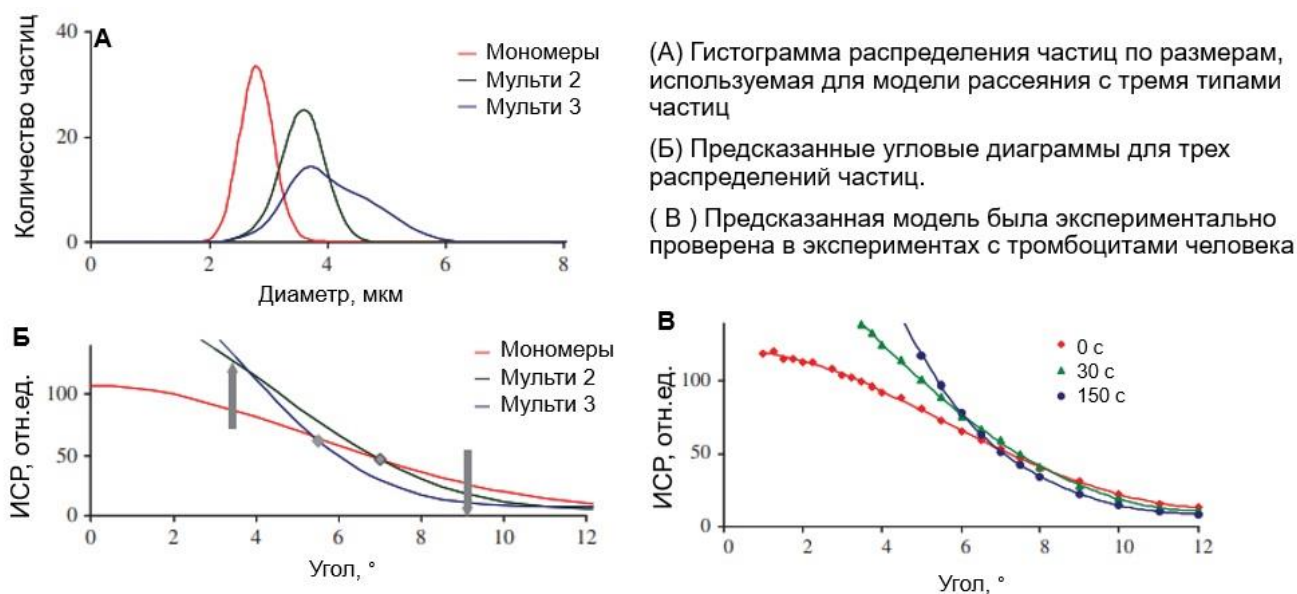


Рисунок 8. Модель малоуглового светорассеяния для измерения агрегации тромбоцитов. (А) Гистограмма распределения частиц по размерам, используемая для модели рассеяния с тремя типами частиц: — мономеры, сферические частицы со средним диаметром 2,8 мкм (среднеквадратичное отклонение (СО) = 10 %); — димеры (мульти 2), 5 % частиц диаметром 2,8 мкм (СО = 10 %) и 95 % с диаметром 3,6 мкм (СО = 10 %); — мультимеры (мульти 3), 5 % частиц диаметром 2,8 мкм (СО = 10 %), 50 % диаметром 3,6 мкм (СО = 10 %) и 45 % диаметром 4,4 мкм (СО = 15 %). (Б) Прогнозируемые угловые диаграммы для трех распределений частиц. При агрегации количество частиц в растворе уменьшается. Стрелки указывают предсказанные направления изменений светорассеяния при агрегации тромбоцитов. (В) Предсказанная модель была экспериментально проверена в суспензии тромбоцитов человека. Угловые диаграммы измерены в диапазоне 1° — 12° в контроле (0 с, красная линия) соответствующему мономерному состоянию в предлагаемой модели (одиночные тромбоциты), а также при стимуляции 600 нМ АДФ через 30 с (зеленая линия), примерно соответствующая димерному состоянию в модели и характеризующая начало агрегатообразования, а 150 с (синяя линия) соответствуют мультимерному состоянию модели, указывающему на максимальную агрегацию. Точки на линиях обозначают экспериментально

полученные данные, которые хорошо согласуются с расчетными кривыми. Воспроизведено из [Mindukshev и др., 2012]

Проведён расчёт зависимости интенсивности светорассеяния от угла рассеивания. Модель предсказывала увеличение интенсивности в диапазоне углов от 1° до $5,5^\circ$, тогда как в интервале от 7° до 12° ожидалось уменьшение интенсивности светорассеяния. Экспериментальные данные были в хорошем соответствии с расчетными кривыми светорассеяния. Как и предсказывает модель, интенсивность рассеянного света увеличивается от 1° до 5° и уменьшается между 9° и 12° в процессе агрегации тромбоцитов, стимулированных АДФ. Изменение интенсивности светорассеяния максимально при 1° , что делает этот угол наиболее подходящим для измерения агрегации. Изменения интенсивности рассеяния, опосредованные изменением формы тромбоцитов, не наблюдаются при 1° . Этот феномен проявляется с увеличением интенсивности светорассеяния в диапазоне 8° - 12° с максимальным изменением при 12° . Поэтому для измерения агрегации тромбоцитов выбран угол рассеяния 1° , а для мониторинга изменения формы тромбоцитов – 12° . [Mindukshev и др., 2012].

Реакции трансформации тромбоцитов были подтверждены также с использованием конфокального микроскопа (рис. 9 б). Первоначальная быстрая реакция (в течение менее 30 с) на АДФ ($0,8 \text{ мкМ}$), измеренная как изменение сигнала светорассеяния при 12° , была вызвана изменением формы тромбоцитов, т. е. трансформацией тромбоцитов из дискоидной в сфероидную форму и образованием псевдоподий (рис. 9 б, фото 1, 2). Начало процесса агрегации регистрировалось по увеличению сигнала светорассеяния при 1° и уменьшению при 12° , что соответствует образованию первых агрегатов тромбоцитов, состоящих из 2–4 тромбоцитов (рис. 9 б, фото 3). Следующий этап агрегации тромбоцитов характеризовался резким увеличением числа тромбоцитов, участвующих в образовании агрегатов (рис. 9 б, фото 4). В ходе этого процесса сигнал светорассеяния при 1° и при 12° существенно не изменялся и оставался на плато примерно 10 мин (рис. 9 а, область между точками три и четыре). Следующий этап

характеризовался началом образования сгустка (рис. 9 б, фото 5) и соответствующий сигнал светорассеяния при 1° увеличивался, а сигнал при 12° уменьшался в течение 3–4 мин (рис. 9 а, область между точками четыре и пять). На последнем этапе все тромбоциты образовали единый сгусток с фибриновыми волокнами на поверхности магнитного стержня (рис. 9б, фото 6), раствор в кювете стал прозрачным и оба сигнала светорассеяния при 1° и при 12° вернулись к базовому уровню (рис. 9 а, область между точками пять и шесть).

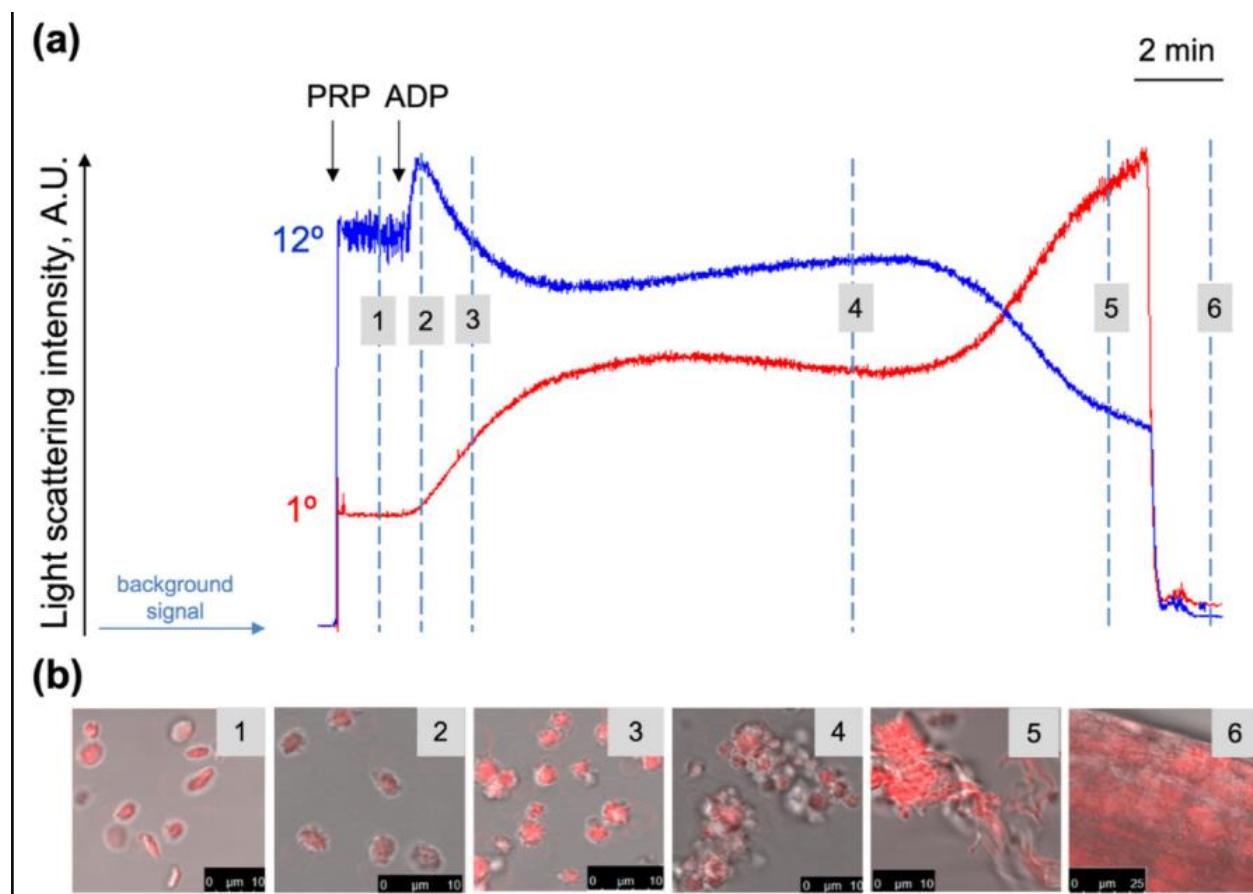


Рисунок 9. Регистрация трансформаций тромбоцитов (изменение формы, агрегация и образование сгустков) методом лазерной дифракции. (а) БТП, разведенную в буфере HEPES (10 тысяч тромбоцитов/мкл), добавляли в кювету при непрерывном перемешивании (1200 об/мин) при 25°C . Через 2 мин инкубации добавляли АДФ (800 нМ) и регистрировали интенсивность светорассеяния для углов рассеяния 1° и 12° . Для лучшей визуализации сигнал светорассеяния при 12° усиливали в 50 раз; (б) на каждом этапе трансформации образец тромбоцитов изымался из кюветы анализатора, фиксировался формальдегидом (2%), а затем окрашивался Nile Red (3 мкг/мл, 10 мин, комнатная температура) для

конфокального микроскопического анализа агрегации тромбоцитов и образования сгустков (фото 1–6). Показаны исходные репрезентативные кривые и фотографии из четырех независимых экспериментов.

На рис. 10 представлена схема установки: лазер (длина волны 670 нм) излучает узкий пучок света на кювету, в которой находится суспензия крови (кювета с магнитной мешалкой находится на термостатируемой подложке). Далее интенсивность светорассеяния на различных углах регистрируется массивом фотодиодов. Фотодиоды находятся под разными углами – от 1° до 12° с шагом в $0,25^\circ$. Мультиканальный 24-битный аналого-цифровой преобразователь конвертирует аналоговый сигнал от фотодиодов, амплифицирует его и затем передает на компьютер, частота регистрации 0,5 Гц. Регистрация и расчет экспериментальных данных выполняются по специальному алгоритму с использованием оригинального программного обеспечения.

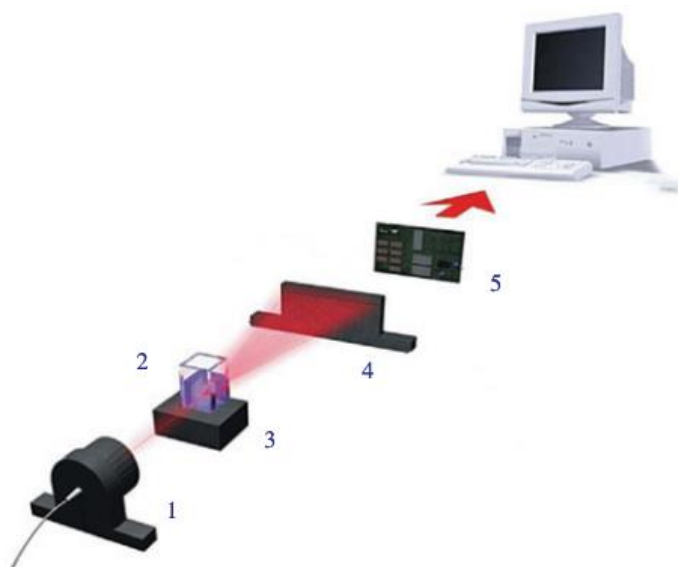


Рисунок 10. Схема установки, регистрирующей малоугловое светорассеяние: 1 – источник света (лазерный диод на 670 нм с коллиматором); 2 – прозрачная кювета с перемешивающим устройством-якорем; 3 – магнитная термостатируемая мешалка; 4 – массив фотодиодов; 5 – аналого-цифровой преобразователь. Рисунок заимствован из [Mindukshev и др., 2012]

Метод малоуглового светорассеяния основан на теориях светорассеяния Фраунгофера и Ми. Теория одночастичного светорассеяния (теория Ми) описывает зависимость интенсивности светорассеяния от отношения размера частицы к длине волны падающего света. Таким образом, для рассеяния неполяризованного света на сферической частице, интенсивность светорассеяния описывается следующим образом:

$$I(\beta) = \frac{I_0}{2k^2a^2} [[S_1(\beta)]^2 + [S_2(\beta)]^2] \quad (5)$$

где I_0 – это интенсивность падающего света, k – волновое число $k=2\pi/\lambda$, a – расстояние от рассеивающего объекта до детектора. $S_1(\beta)$ и $S_2(\beta)$ отражают сложную функцию, описывающую изменение в амплитуде перпендикулярного и параллельно поляризованного света как функцию угла, измеренного в прямом направлении. Когда диаметр частицы больше, чем длина волны падающего света, рассеяние происходит преимущественно в прямом направлении и уравнение принимает вид:

$$I(\beta) = \frac{I_0}{2k^2a^2} x^4 \left[\frac{J_1(x * \sin(\beta))}{(x * \sin(\beta))} \right]^2 \quad (6)$$

$$(S_1)^2 = (S_2)^2 = x^4 \left[\frac{J_1(x*\sin(\beta))}{(x*\sin(\beta))} \right]^2 \quad (7)$$

Здесь x отражает безразмерный параметр формы ($x = \pi d/\lambda$), d - диаметр частицы, а J_1 - Бессель-функция первого порядка. Уравнение 2 отражает Фраунгоферовскую аппроксимацию теории Ми.

Метод малоуглового светорассеяния был использован для характеристики ингибирования тромбоцитов уже используемым в клинике NO-независимым стимулятором растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) риоцигуатом [Reiss и др., 2015], NO- и гем-независимым активатором pГЦ [Beck и др., 2017]. Более новая версия прибора — лазерный анализатор частиц ЛАСКА TMF, позволяет

одновременно регистрировать и светорассеяние, и флуоресценцию. С помощью данного метода было впервые показано, что ускорение агрегации при гипотермических условиях непосредственно связано с увеличением уровня внеклеточного кальция [Mindukshev и др., 2022].

Выводы из литературного обзора

В литературном обзоре рассмотрен объект исследования — тромбоцит, кратко изложено его строение, агонисты тромбоцитов и их рецепторы; функциональный ответ тромбоцитов, а также описаны дисфункции тромбоцитов. Вторая часть литературного обзора посвящена методам исследования тромбоцитов. Методы классифицируются по принципу их действия на механические, электрические, оптические, а также техники, комбинирующие в себе несколько технических узлов. Механические методы (ТЭГ) позволяют оценивать вязкость сгустка в процессе его формирования, что определяет их использование в биомедицинских целях. Оптические (СТА) позволяют получать информацию об агрегации тромбоцитов по светопропусканию, однако метод накладывает ограничения на пороговое значение по концентрации тромбоцитов в пробе. Наличие этого порога исключает проведение исследования на некоторых когортах пациентов. Проточная цитометрия используется для скринингового иммунофенотипирования тромбоцитов, оценке доли молодых и зрелых тромбоцитов, а также в ряде других задач, что делает этот метод перспективным для всесторонней оценки функции тромбоцитов; однако этот метод является сравнительно дорогостоящим и не оценивает непосредственно агрегацию тромбоцитов, поскольку не подразумевает динамический анализ

Важным аспектом в выборе метода для исследования тромбоцитов являлось требование на минимальный объем образца, поскольку ряд задач планируется вести на педиатрических пациентах, забор большого объема крови у которых весьма проблематичен. Исследования показали, что минимальный порог для исследования тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния составляет 10 тыс./мкл, что делает этот метод более перспективными для использования в области фундаментальных исследований и диагностики тромбоцитопатий у детей.

Таким образом, метод малоуглового светорассеяния обладает значительным потенциалом для применения в биомедицине благодаря своей сравнительной дешевизне, возможности проведения анализа в небольшом образце, а также в образце, содержащем сравнительно низкое количество тромбоцитов. Метод может использоваться в качестве диагностического инструмента для тромбоцитопатий, скрининга здорового населения для выявления склонности к тромбозам или кровотечениям, а также для мониторинга антиагрегантной терапии. Все вышеперечисленное открывает перспективы для дальнейшего изучения возможностей данного метода, его границ применения, а также его верификации и апробации.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Приборы и материалы

2.1.1 Исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния

Цельную кровь здоровых добровольцев забирали в 3-мл вакуумные пробирки (S-Monovette, Sarstedt AG&Co., Germany) с 3,2% раствором цитрата натрия (соотношение кровь:цитрат – 9:1). Для получения богатой тромбоцитами плазмы (БТП) кровь центрифугировали 8 мин 100×g. Кровь также забирали в 1,6-мл пробирки (S-Monovette) с 525 антитромбиновыми единицами гирудина / мл крови и центрифугировали 3 мин 100×g. БТП оставляли при комнатной температуре на 30 мин.

Для эксперимента БТП разбавляли до 10 000 тромбоцитов/мкл модифицированным буфером HEPES (140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2,0 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM глюкозы, pH 7,4, все реагенты производства Sigma-Aldrich, США). Для стимуляции тромбоцитов использовали 800 нМ АДФ (Sigma-Aldrich, США) или 0,4 мг/мл коллагена (Технология Стандарт, Россия). Исследования агрегации проводились на лазерном анализаторе частиц ЛАСКА (Biomedical systems, Санкт-Петербург) при температуре в кювете 23 °C и перемешивании 1200 об/мин. Технические характеристики анализатора отражены в таблице 8.

Таблица 8. Технические характеристики прибора ЛАСКА-ТМ.

Характеристика	Диапазон
Размер анализируемых частиц, мкм:	0,1...1000
Источник света – лазерный диод	
Длина волны λ , нм	670
Мощность P, мВт	<10
Кювета – кварц, стекло; рабочий объем, мл	1...3
Задаваемый диапазон оборотов мешалки, об/мин	600-4000

Предел допускаемой относительной погрешности определения размера частиц, %, не более:	
• δ (D10)	± 20
• δ (D50)	± 15
• δ (D90)	± 20

Для расчетов использовалось оригинальное программное обеспечение LaSca_32 (ООО «БиоМедСистемы», Санкт-Петербург, Россия).

Измерение концентрации тромбоцитов проводилось на проточном цитофлуориметре Novocyte (Acea Bioscience, США).

В кварцевую кювету с длиной оптического пути 1 см добавляли 1 мл буфера HEPES, после чего кювету помещали в анализатор частиц ЛАСКА и запускали измерение. На экране компьютера отображались два графика: зависимости интенсивности светорассеяния на 1° и 12° от времени. Если в течение двух минут кривая, отображающая интенсивность светорассеяния на 1° , флуктуировала вблизи нуля с максимальной интенсивностью в 10 отн. ед., то считалось, что кювета чистая и можно проводить измерения. Далее в кювету добавляли БТП в объеме, соответствующем концентрации тромбоцитов 10 тысяч тромбоцитов/мкл. Через две минуты в кювету добавляли активатор и регистрировали кривые светорассеяния в течение 7-10 минут до тех пор, пока кривая светорассеяния на 1° не выходила на плато. Все эксперименты были выполнены минимум на 3 донорах.

На рисунке 11 отражены параметры кривых, регистрируемых прибором. При активации тромбоцитов АДФ оцениваются: начальная скорость агрегации V_{ia} – отношение изменения интенсивности светорассеяния ко времени (за 30 с.) и амплитуда интенсивности светорассеяния ΔI (разница между интенсивностями светорассеяния в начальный момент и в момент максимальной интенсивности светорассеяния) [Mindukshev и др., 2012]. В таком случае производная от сигнала светорассеяния по времени будет характеризовать кинетику образования агрегатов из 2-4 тромбоцитов, в то время как амплитуда интенсивности светорассеяния будет описывать силу ответа на агонист.

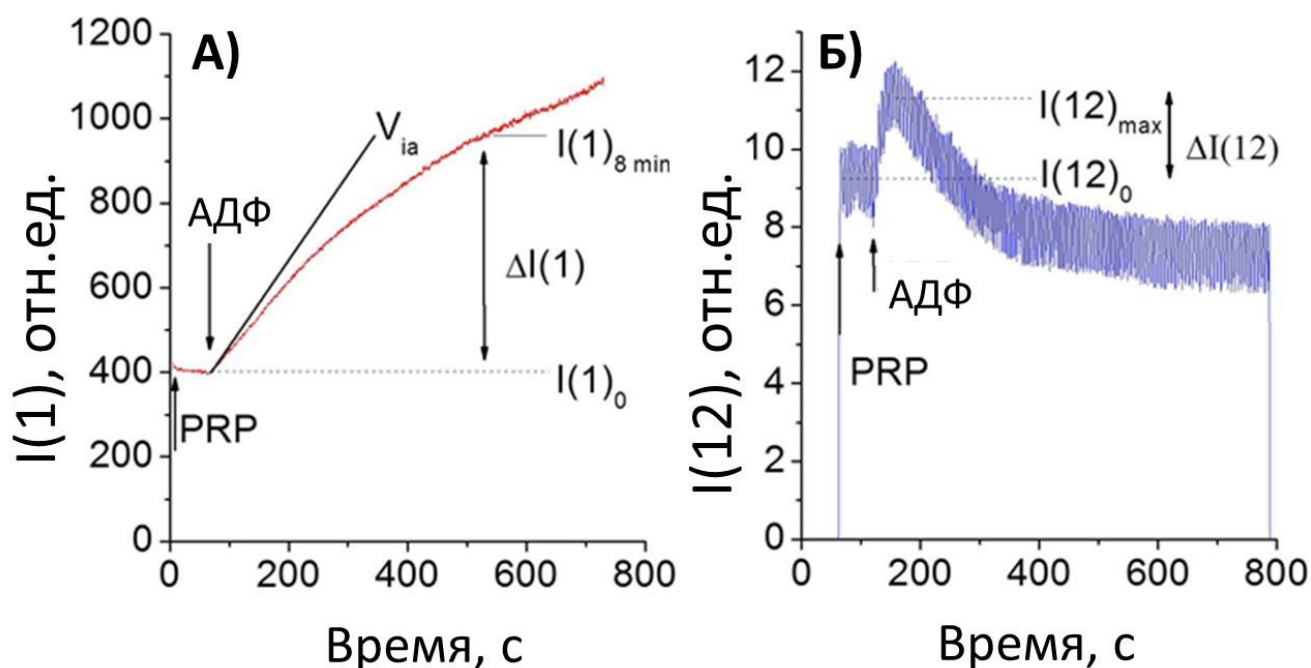


Рисунок 11. Динамика изменения светорассеяния на 1° (А) и 12° (Б) при инициации агрегации АДФ. Рисунок заимствован из [Mindukshev и др., 2012]. После добавления агониста интенсивность светорассеяния начинает увеличиваться (А). Достигнув максимального уровня интенсивность светорассеяния падает (Б).

При инициации агрегации тромбоцитов коллагеном оценивали: максимальную скорость и амплитуду агрегации, а также время свертывания и лаг-фазу. Максимальную скорость агрегации тромбоцитов V_{max} рассчитывали как тангенс угла наклона кривой интенсивности светорассеяния на 1° за 60 с (рис. 12). Амплитуду агрегации $\Delta I(1)$ и изменения формы тромбоцитов $\Delta I(12)$ вычисляли как разность между интенсивностями светорассеяния на базовом уровне и максимальном на 1° и 12° соответственно. Время, за которое интенсивность светорассеяния на 1° увеличивалась на 3% после добавления активатора обозначили лаг-фазой t_{lag} . Время свертывания t_{clot} – временной интервал между моментом инициации агрегации и моментом времени, когда светорассеяние снизилось до 0 отн.ед.

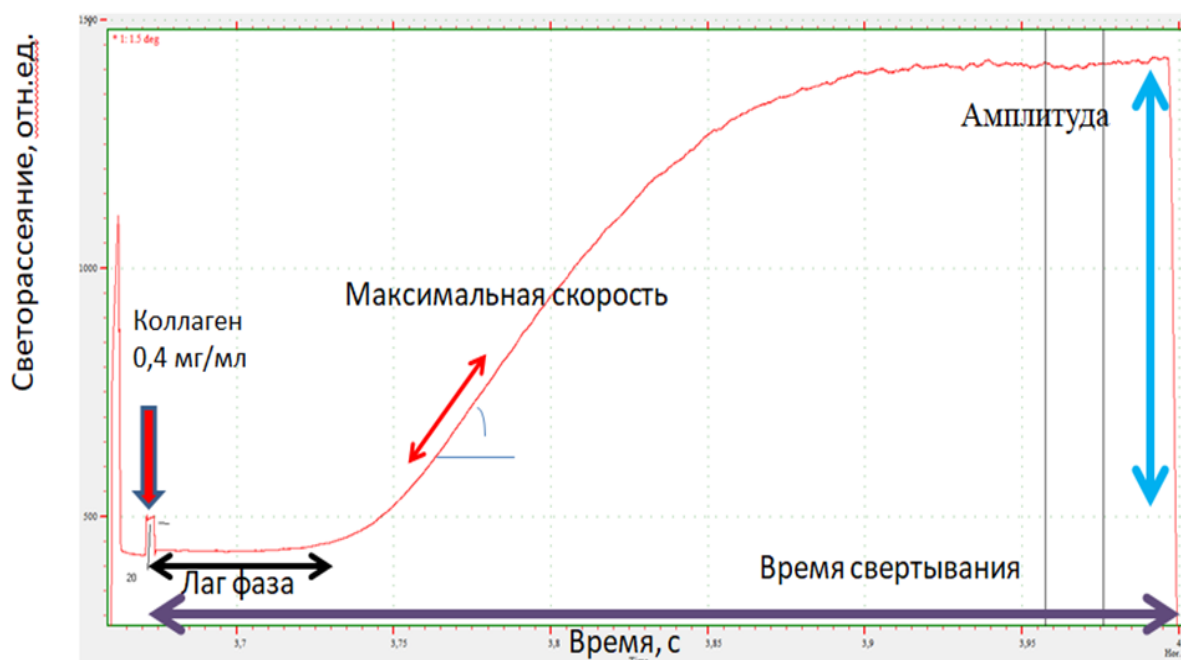


Рисунок 12. Характерный вид зависимости интенсивности светорассеяния от времени при коллаген-индуцируемой агрегации тромбоцитов и характерные параметры. Определяются следующие параметры: максимальная скорость агрегации, амплитуда агрегации, лаг-фаза и время свертывания. Максимальную скорость $V_{\max}$ рассчитывали как тангенс угла наклона кривой интенсивности светорассеяния на 1° в течение 60 секунд. Амплитуда интенсивности светорассеяния представляет собой разницу между базовым и максимальным значениями интенсивности света на 1° . Время, за которое интенсивность светорассеяния на 1° увеличивалась на 3% после добавления активатора обозначили лаг-фазой t_{lag} . Время свертывания t_{clot} – временной интервал между моментом инициации агрегации и моментом времени, когда светорассеяние снизилось до 0 отн.ед.

2.1.2 Исследование активации тромбоцитов методом проточной цитометрии

Подробное описание метода проточной цитометрии для оценки функциональной активности тромбоцитов можно найти в работе [Ponomarenko и др., 2022]. В этом протоколе 20 мкл цельной крови разводили 1:20 в буфере HEPES-Tyode (150 ммоль/л NaCl, 2,7 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л MgCl_2 , 0,4 ммоль/л Na_2HPO_4 , 20 ммоль/л HEPES, 5 ммоль/л глюкозы, 0,5% бычьего сывороточного альбумина, pH 7,4). Для измерения содержания плотных гранул и их функциональной

способности используют мепакрин, являющийся производным акридина. Для активации тромбоцитов использовали смесь агонистов. Она состояла из коллагеноподобного пептида (CRP, 1,25 мкг/мл), TRAP-6, активирующего рецептор тромбина (SFLLRN, 12,5 мкМ) и 2,5 мМ CaCl₂. CRP был любезно предоставлен профессором Р.В. Фарндейлом (Кембриджский университет, Кембридж, Великобритания). Все остальные реагенты были от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). Маркер активации тромбоцитов Р-селектин (CD62P-Alexa647, клон АК4) и экспрессию активированной формы гликопротеина IIb/IIIa (FITC-PAC-1) на поверхности тромбоцитов изучали методом проточной цитофлуориметрии на приборе NovoCyte (ACEA Biosciences, Inc., США) с использованием программного обеспечения NovoExpress v.1.2.4 (ACEA Biosciences, Inc., США). Антитела были получены от компании SONY Biotechnology (Сан-Хосе, Калифорния, США). Средние интенсивности флуоресценции для PAC-1 и CD62p нормализовали по среднему значению указанного параметра для здоровых взрослых добровольцев.

2.1.3 Исследование агрегации тромбоцитов методом световой трансмиссионной агрегометрии

Измерения оптической агрегометрии проводили с помощью агрегометра АЛАТ-2 («Биола», Москва, Россия) в БТП. Количество тромбоцитов в БТП измеряли на гематологическом анализаторе Sysmex KX-21N (Sysmex Corp., Кобе, Япония). БТП готовили центрифугированием образцов цельной крови, забранной в пробирку на цитрат натрия 0,106М (рН 5,5, в соотношении объем крови к антикоагулянту 9:1), при 200×g в течение 10 мин. Объем БТП для исследования составлял 300 мкл. Методология исследования включает в себя инкубацию пробирки для агрегации с образцом БТП при 37 °С в инкубационных ячейках прибора АЛАТ-2. Далее в образец добавлялась магнитная мешалка, образец переносился в измерительную ячейку с запуском тестирования, после чего незамедлительно добавлялся агонист агрегации. В качестве агониста использовали

АДФ в концентрации 5 мкМ. Кривые агрегации регистрировались в течение 10 мин.

2.2 Методики проведения экспериментов

2.2.1 Методики проведения экспериментов по изучению влияния преаналитических факторов на результаты исследования

Для оценки внутриоператорной воспроизводимости была исследована серия из трех последовательных идентичных измерений агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния по методике, описанной в разделе 2.1.1 на трех здоровых добровольцах. Были рассчитаны среднее и стандартное отклонение.

Для оценки отдаленной воспроизводимости результатов исследования здоровые добровольцы были приглашены на исследование агрегации дважды с интервалом в неделю (n=5).

Для оценки воспроизводимости результатов во времени после забора крови измерения проводили сразу, а также через 1, 2 и 3,5 ч после получения БТП (n=6).

Для оценки влияния транспортировки сравнивали результаты, полученные на цельной крови здоровых добровольцев (n=5) до и после транспортировки образца в термостатируемом контейнере в течение двух часов на наземном транспорте.

Для оценки эффекта антикоагулянта в пробирке кровь здоровых добровольцев (n=5) последовательно брали в пробирки с цитратом натрия и гирудином. Параметры агрегации и изменения формы измеряли также в образце с цитратом натрия с добавлением 525 антитромбиновыми единицами гирудина / мл крови перед добавлением БТП в кювету.

Для оценки эффекта бактериальных липополисахаридов (ЛПС) на агрегацию тромбоцитов, ЛПС растворяли в деионизированной воде или натрий-фосфатном

буфере до концентрации 10 мг/мл. Агрегаты ЛПС разрушали ультразвуком в течение 30 циклов по 30 с на льду. После обработки ультразвуком ЛПС замораживали в жидком азоте и хранили при температуре – 80°C. БТП инкубировали с 100 мкг/мл ЛПС или буфером в течение 30 мин +37 °C без перемешивания перед измерениями агрегации и изменения формы тромбоцитов.

2.2.2 Методики проведения экспериментов по изучению влияния аналитических переменных на результаты исследования

Для изучения влияния разведения плазмы в буфере на агрегацию тромбоцитов объем плазмы в кювете варьировали от 2 % до 12 %, при этом количество тромбоцитов оставалось неизменным и равным 10 000 тромбоцитов /мкл (n=5).

Для валидации метода была поставлена серия экспериментов, в которых БТП инкубировали с ингибитором гликопротеина IIb/IIIa монафрамом (5 мг/мл) в течение 30 минут до инициации агрегации (n=3).

Для *in vitro* экспериментов цельная кровь здоровых добровольцев (n=5) была проинкубирована с аспирином (10 мкМ), тикагрелором (7,5 мкМ) или их смесью в течение получаса. Затем исследование агрегации и изменения формы тромбоцитов проводили согласно пункту 2.1.1 изложенному выше.

2.2.3 Методики оценки агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии методом малоуглового светорассеяния

Агрегацию и изменение формы тромбоцитов у пациентов с ОКС оценивали в ходе пяти временных этапов: в день 0 (после приема нагрузочной дозы аспирина), на 1-й день (после приема нагрузочной дозы прасугрела или тикагрелора), а также на 7-й, 30-й и 180-й дни, во время приема поддерживающей дозы терапии. Материал пациентов на ДАТТ поступал в исследовательскую лабораторию в течение часа после взятия образца в больнице. Пробирку с кровью перемещали в

термостатируемом контейнере. Исследования агрегации проводили в соответствии с методикой изложенной выше в пункте 2.1.1. Для оценки значимых динамических изменений в параметрах агрегации был использован критерий Манна-Уитни. Критерий применяли для попарного сравнения значений параметров агрегации измеренных в динамике. Между собой сравнили все попарные изменения.

2.3 Статистика

Для оценки достоверных различий в парных измерениях был использован парный t-критерий Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$). Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовался критерий Манна-Уитни. Корреляцию параметров оценивали коэффициентом Пирсона. Дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони использовался для сравнения средних значений трех или более групп данных. Нормальность распределения данных оценивалась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты обработаны с использованием программного обеспечения OriginPro версии 8.5 (OriginLab Corporation, США) и представлены как среднее значение по крайней мере трех повторных измерений с указанием стандартного отклонения (SD), если не обозначено иначе.

2.4 Доноры и пациенты

В исследование были включены здоровые взрослые ($n = 30$, в возрасте от 21 года до 40 лет) и здоровые дети ($n = 20$, в возрасте от 1 года до 18 лет), а также пациенты с геморрагическим синдромом неясной этиологии ($n=16$). Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (протокол № 2/1–20 от 03.08.2020). Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвующих в исследовании.

В исследование также включены пациенты с дефицитом плотных гранул (ДПГ, $n=3$), пациенты с дефицитом альфа-гранул (ДАГ, $n=3$) и пациентка с афибриногенемией (16 лет, женщина, концентрация фибриногена в плазме 0 г/мл, количество тромбоцитов 279 тысяч клеток/мкл). В исследование были включены три пациента женского пола с тромбастенией Гланцмана (ТГ).

2.4.1 Пациенты с ОКС

В исследование были включены пациенты с острым коронарным синдромом (n=20, возраст: 52-95 лет, медиана: 69 лет), которые наблюдались в отделении реанимации и интенсивной терапии для кардиологических больных ГБУЗ "ГКБ им В.В. Виноградова ДЗМ" (Москва, Россия). В исследование включались только пациенты с инфарктом миокарда/нестабильной стенокардией, которым было проведено чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ). За несколько часов до операции пациенты принимали аспирин в дозировке 250 мг и нагрузочную дозу ингибитора P2Y₁₂ рецептора к АДФ; после ЧКВ пациентам назначалась двойная антиагрегантная терапия аспирином (75 мг) с ингибитором P2Y₁₂ рецептора к АДФ, тикагрелором (90 мг) либо прасугрелом (10 мг). Забор крови у пациентов производился с разрешения независимого этического комитета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России от 23.06.2020.

2.4.2 Пациенты с КГЭ/СКМ

В группу исследования были включены 13 пациентов детского возраста (средний возраст 10 месяцев, преобладал мужской пол 62%), проходившие лечение в НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева. Ключевыми критериями включения были наличие сосудистой опухоли (капошиформной гемангиоэндотелиомы или врожденной гемангиомы) и связанной с ней коагулопатии и тромбоцитопении на момент постановки диагноза. На момент включения пациентов в исследование у пятерых уровень тромбоцитов был ниже 150 тысяч/мкл. Пациенты, получившие переливание тромбоцитов в течение 3 недель до включения в исследование, не были включены в исследование. Возраст и история болезни не были критериями исключения.

Девять здоровых добровольцев детского возраста были привлечены в качестве контрольной группы для этого исследования. Средний возраст здоровых детей составил 7 месяцев (диапазон 0,25–33 месяца), при этом преобладал женский пол (55%). Ни у детей, ни у их родителей в анамнезе не было нарушений функции тромбоцитов или других заболеваний гематологического характера.

Протокол исследования был одобрен независимым этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (номер одобрения 3/1-21; дата: 5 октября 2021 г.). Законные представители всех участников предоставили письменное информированное согласие до регистрации. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

2.4.3 Пациенты с онкологическими и гематологическими заболеваниями

В исследование были включены пациенты со следующими диагнозами: ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (n=1), острый миелоидный лейкоз (n=1), агранулоцитоз (n=1), острый промиелоцитарный лейкоз (n=1), злокачественное новообразование почки (n=2), злокачественное новообразование забрюшинного пространства (n=1).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците

Первой задачей данной работы являлось моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците. Для решения этой задачи были использованы следующие допущения:

- Изначально тромбоцит имеет форму эллипсоида с полуосями 1 мкм, 3 мкм, 3 мкм. Тромбоцит является однородной средой.
- При активации тромбоцит принимает форму шара. Из предположения, что объём клетки при этом остаётся постоянным, следует, что радиус этого шара составит 2,08 мкм.
- После ошаривания тромбоцита из него вырастают филоподии, таким образом, что тромбоцит принимает форму шара с восьмью выростами. Допускается, что форма выростов эллипсоидальная. Радиус тромбоцита в таком состоянии равен 1,67 мкм. Длина большой полуоси эллипсоида составляет 1,8 радиусов шара, две малые полуоси эллипсоида составляют треть от радиуса шара.
- Затем тромбоциты слипаются и образуют агрегат из 6 клеточных фрагментов.

При моделировании использованы следующие параметры:

- Длина волны излучения равна 670 нм.
- Показатель преломления тромбоцита равен 1,38 [Moskalensky и др., 2013]
- Показатель преломления раствора (буфера), в котором он находится такой же, как и у воды и составляет 1,33.

В сотрудничестве с м.н.с. ЦТП ФХФ РАН Быковым Георгием Александровичем с помощью среды Comsol Multiphysics v6.2 решается численно волновое уравнение для электрического поля:

$$\nabla \times (\nabla \times \mathbf{E}) - k^2_0 n^2 \mathbf{E} = 0, \text{ где}$$

E – электрическое поле, В/м, n – показатель преломления, $k_0 = \omega/c_0$ – волновое число раствора, ω – угловая частота падающего излучения, c_0 – скорость света в вакууме.

Решением данного уравнения являются диаграммы направленности излучения в дальнем поле (электрическое поле) представленные на рисунке 13.

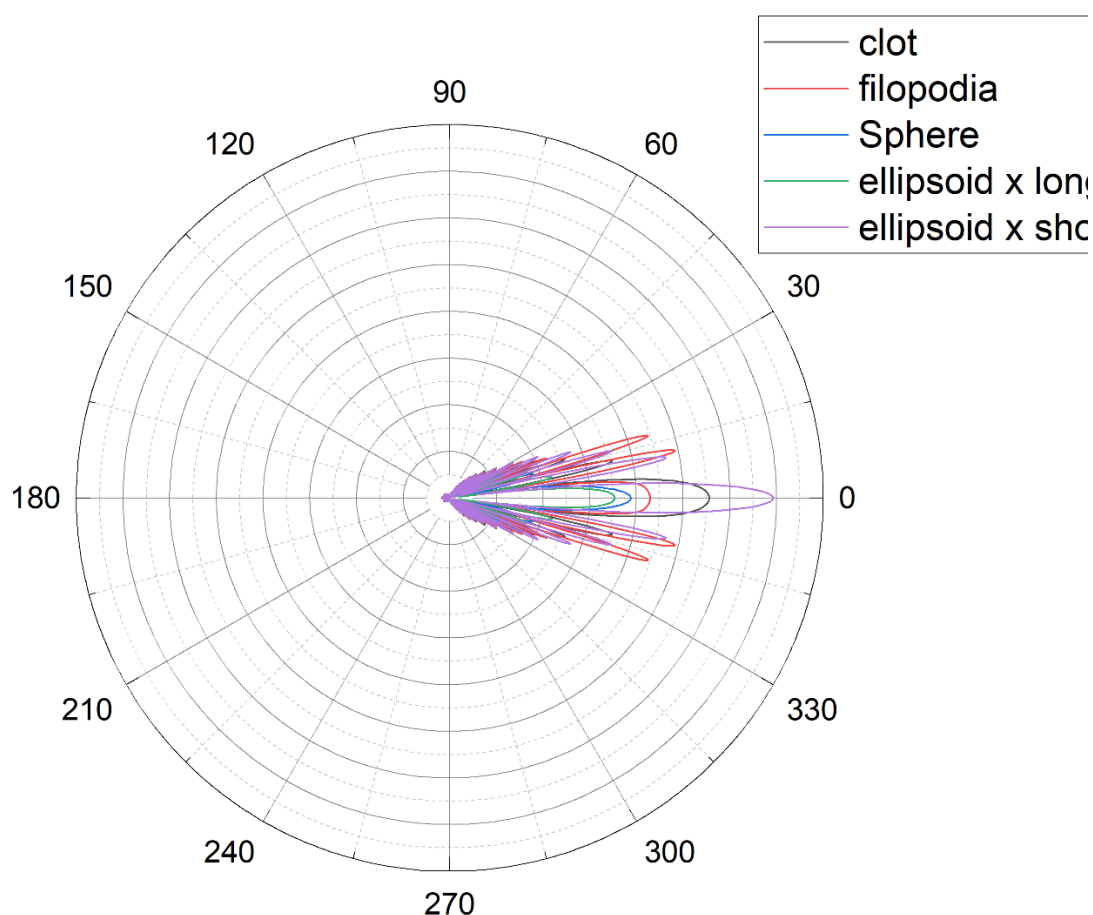


Рисунок 13. Диаграммы направленности дальнего электрического поля для агрегата (черная линия), сферизованного тромбоцита (синяя линия), тромбоцита выпустившего филоподии (красная линия), неактивированного тромбоцита в форме эллипсоида, когда луч света направлен параллельно длинной (зеленая линия) или короткой оси (фиолетовая линия)

На рисунке 14 представлены трехмерные модели тромбоцитов, использованные для получения диаграмм направленности. Чтобы изложенную выше задачу можно

было решить с помощью ограниченных вычислительных мощностей, от соответствующих трёхмерных фигур отрезалась четверть, на неё накладывались условия симметрии, и уже в таком виде решалась задача.

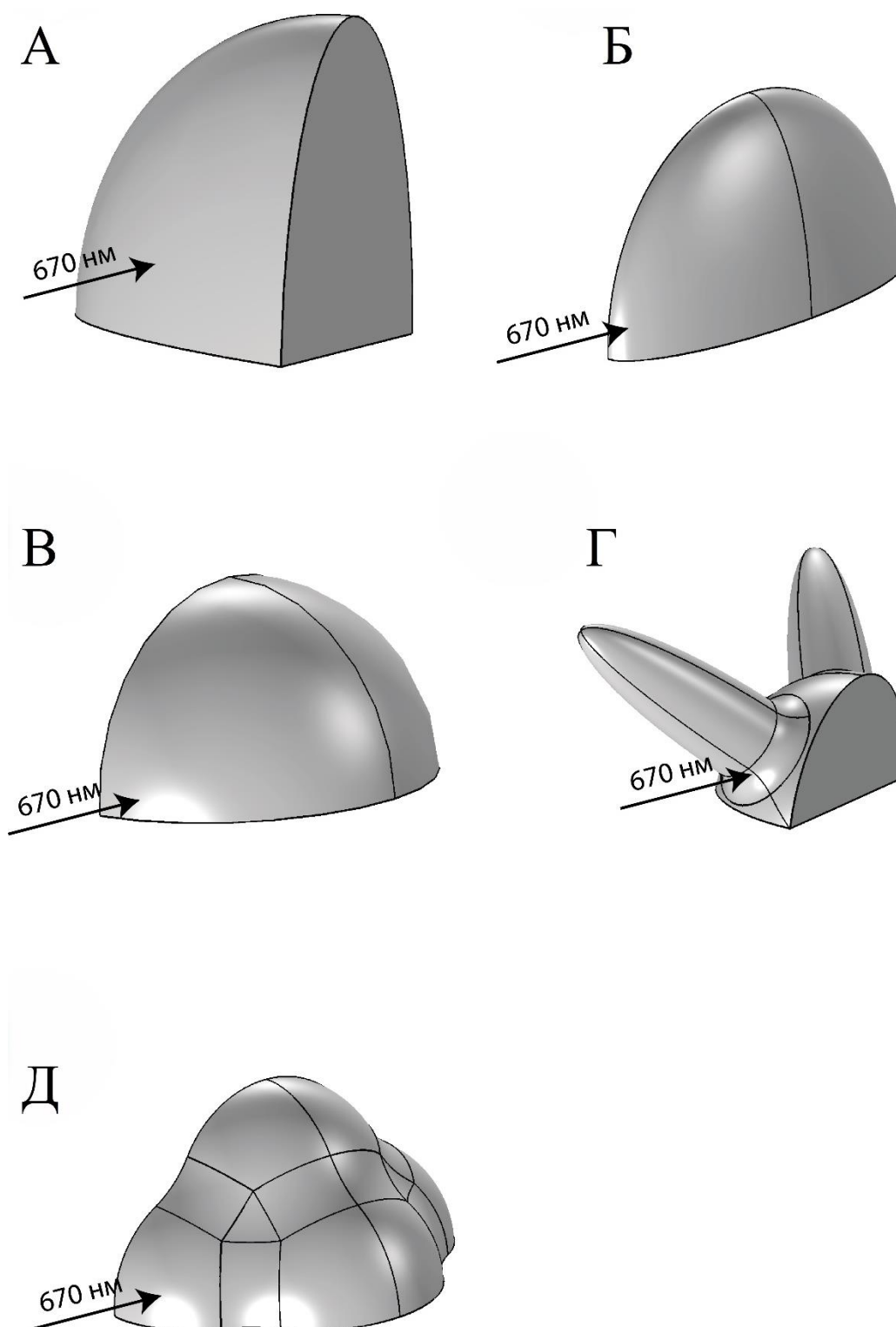


Рисунок 14. Четверти трёхмерных моделей тромбоцита/тромба. Пояснение подписей диаграмм: а) – тромбоцит находится в состоянии покоя, луч света от

источника параллелен короткой оси тромбоцита; б) – тромбоцит находится в состоянии покоя, луч света от источника параллелен длинной оси тромбоцита; в) – тромбоцит начал активацию и стал шаром; г) – тромбоцит, выпустивший филоподии; д) – агрегат из 6 клеток

Для неактивированного тромбоцита максимум проходящего света через частицу приходится на 0° вне зависимости от ориентации клетки по отношению к направлению падающего света (параллельно длинной оси тромбоцита или короткой). На рисунке 15 представлены диаграммы рассеяния в полярных координатах для данного случая. Превалирует рассеяние вперед. Под углами от 90° до 180° свет не рассеивается.

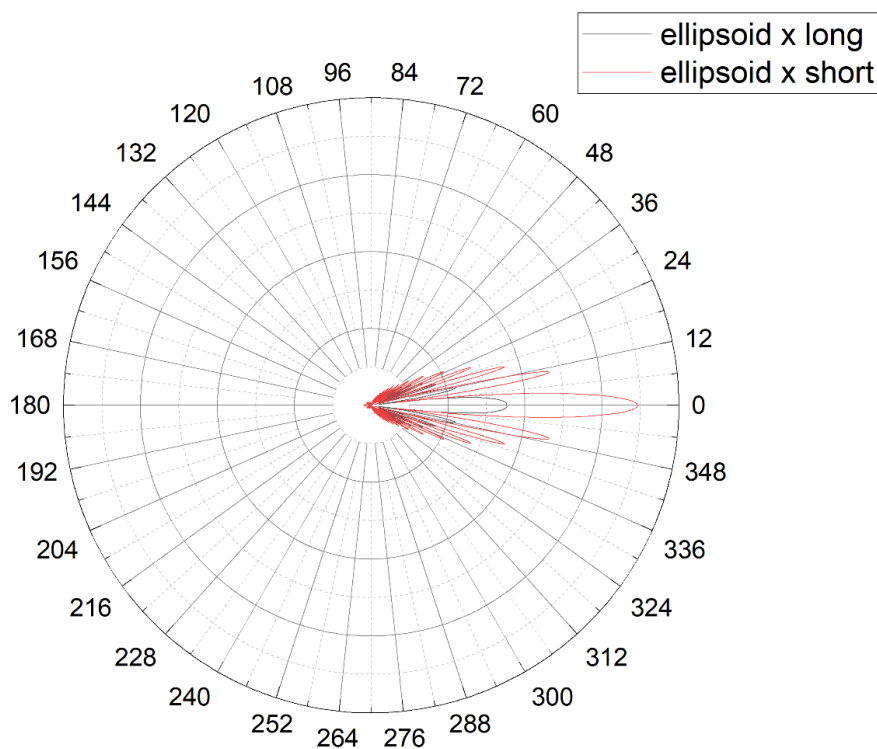


Рисунок 15. Диаграммы направленности излучения для двух ориентаций покоящегося тромбоцита: свет направлен параллельно короткой (серая линия) или длинной (красная линия) оси эллипсоида

На рис. 16 представлены диаграммы рассеяния для тромбоцита, выпустившего филоподии и агрегата из 6 тромбоцитов. В случае активированного

тромбоцита в форме сферы превалирует рассеяние перед, рассеяние назад отсутствует или пренебрежимо мало по сравнению с боковым. Максимум светорассеяния приходится на 0° . В случае тромбоцита выпустившего филоподии максимальный уровень светорассеяния приходится на 12° , а на 0° приходится локальный максимум.

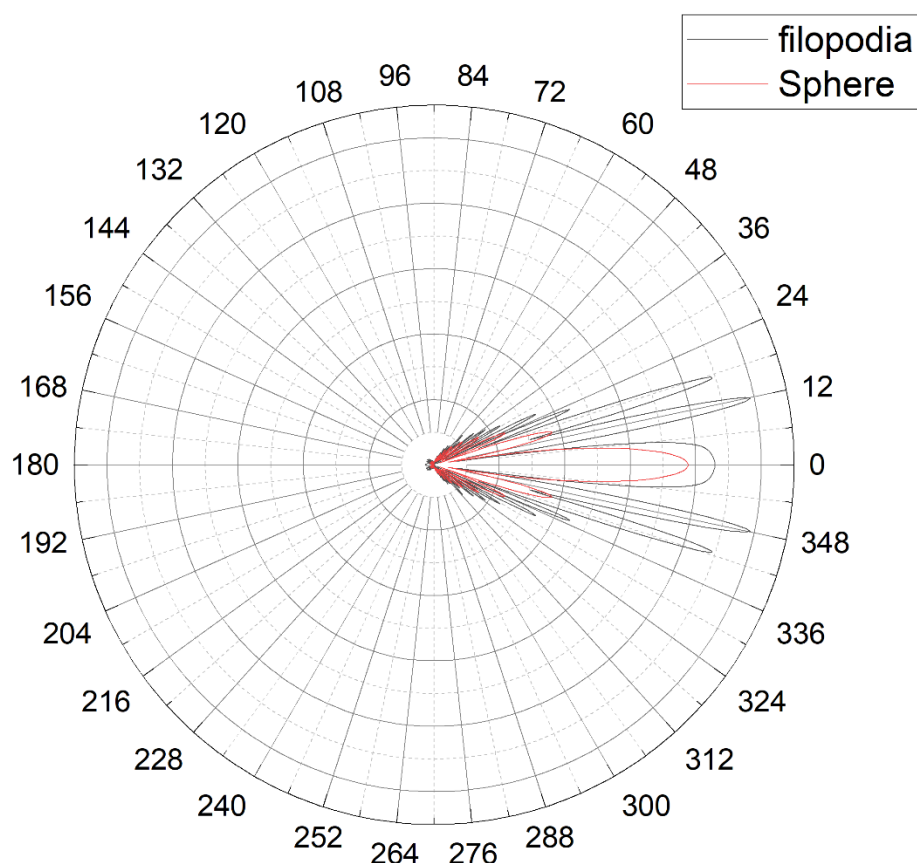


Рисунок 16. Диаграммы направленности излучения для двух активированных состояний тромбоцита: выпустившего филоподии (обозначено черным цветом) или сферизованного (обозначенного красным цветом)

На рисунке 17 представлена диаграмма направленности излучения для агрегата из шести тромбоцитов. Максимальный сигнал светорассеяния приходится на 0° , в интервале от 0 до 6° уровень светорассеяния убывает, а в диапазоне от 6 до 12° функция является возрастающей. Как и в случае с диаграммой направленности излучения для активированного тромбоцита для агрегата превалирует рассеяние

вперед и боковое рассеяние, сигнал светорассеяния в диапазоне от 90 до 180° пренебрежимо мал по сравнению с сигналом на 0°.

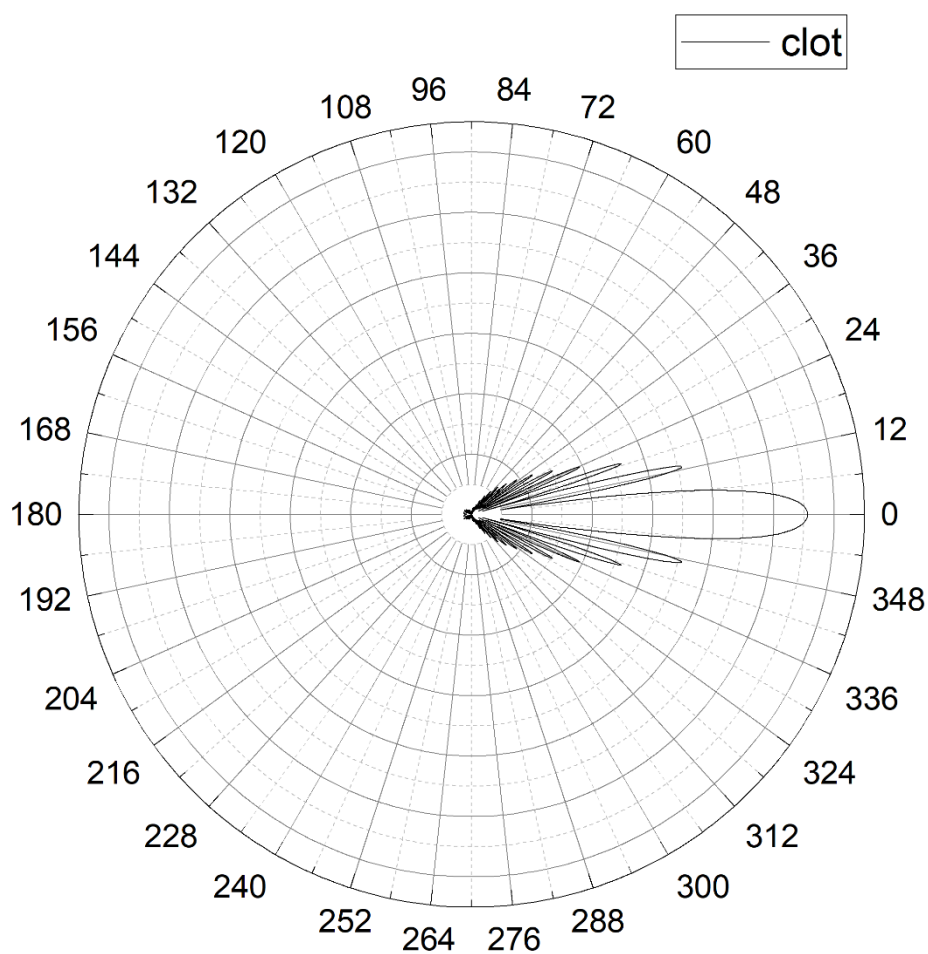


Рисунок 17. Диаграммы направленности излучения для агрегата из тромбоцитов (оксамера). Максимальный уровень светорассеяния приходится на 0°

3.1.1. Расчет индикатрис рассеяния на сферическом объекте размера порядка 2 мкм

Зависимость интенсивности рассеяния света от угла, рассчитанная по теории Ми (или приближению Фраунгофера), представлена угловой диаграммой (рис. 18). Для расчета угловой диаграммы использовалась программа MiePlot v4.6.21 (www.philiplaven.com), которая позволяет рассчитывать полимодальные функции распределения частиц по размерам.

На рис. 18 видно, что максимальная интенсивность светорассеяния приходится на 0° , ближайший локальный максимум – на 12° . Характер кривых для перпендикулярно и параллельно поляризованного света сходный: интенсивность света не является монотонной зависимостью от угла рассеяния, но в целом, является убывающей от 0° до 180° . Превалирует рассеяние вперед.

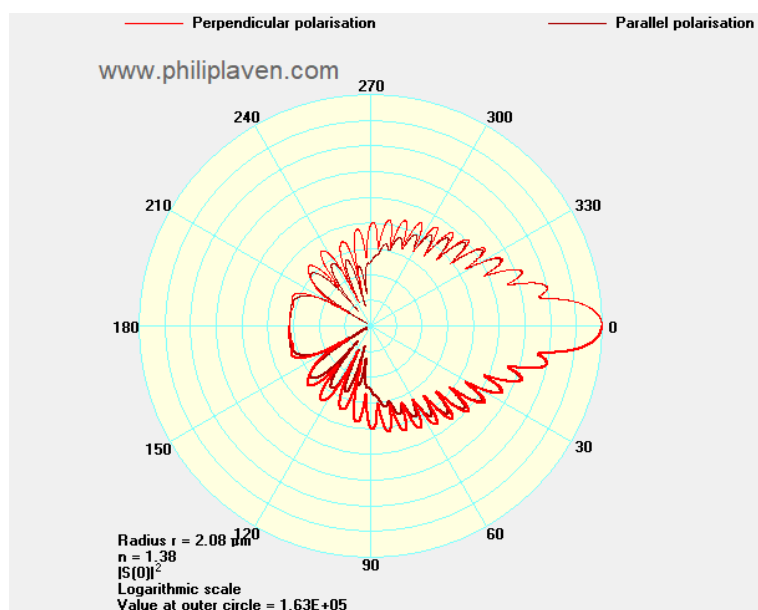


Рисунок 18. Зависимость интенсивности светорассеяния на частице сфероидальной формы от угла в полярных координатах для перпендикулярно (обозначено красным) и параллельно (обозначено бордовым) поляризованного света. Угловое разрешение – 0,1, радиус сферы 2,08 мкм. Показатель преломления объекта – 1,38. Показатель преломления среды 1,33

На рис. 19 приведен график зависимости интенсивности светорассеяния для гексамера из тромбоцитов (агрегат из 6 форменных элементов). Радиус сферы, которая будет покрывать 6 таких тромбоцитов будет равен 3,12 мкм. На рис. 19 видно, что максимальная интенсивность светорассеяния приходится на 0° , ближайший локальный максимум приходится на 8° . Характер кривых для перпендикулярно и параллельно поляризованного света сходный: функция интенсивности рассеяния от угла не является монотонной, но в целом, является убывающей. Превалирует рассеяние вперед. На интервале от 0° до 100° имеет 20 максимумов для перпендикулярно поляризованного света.

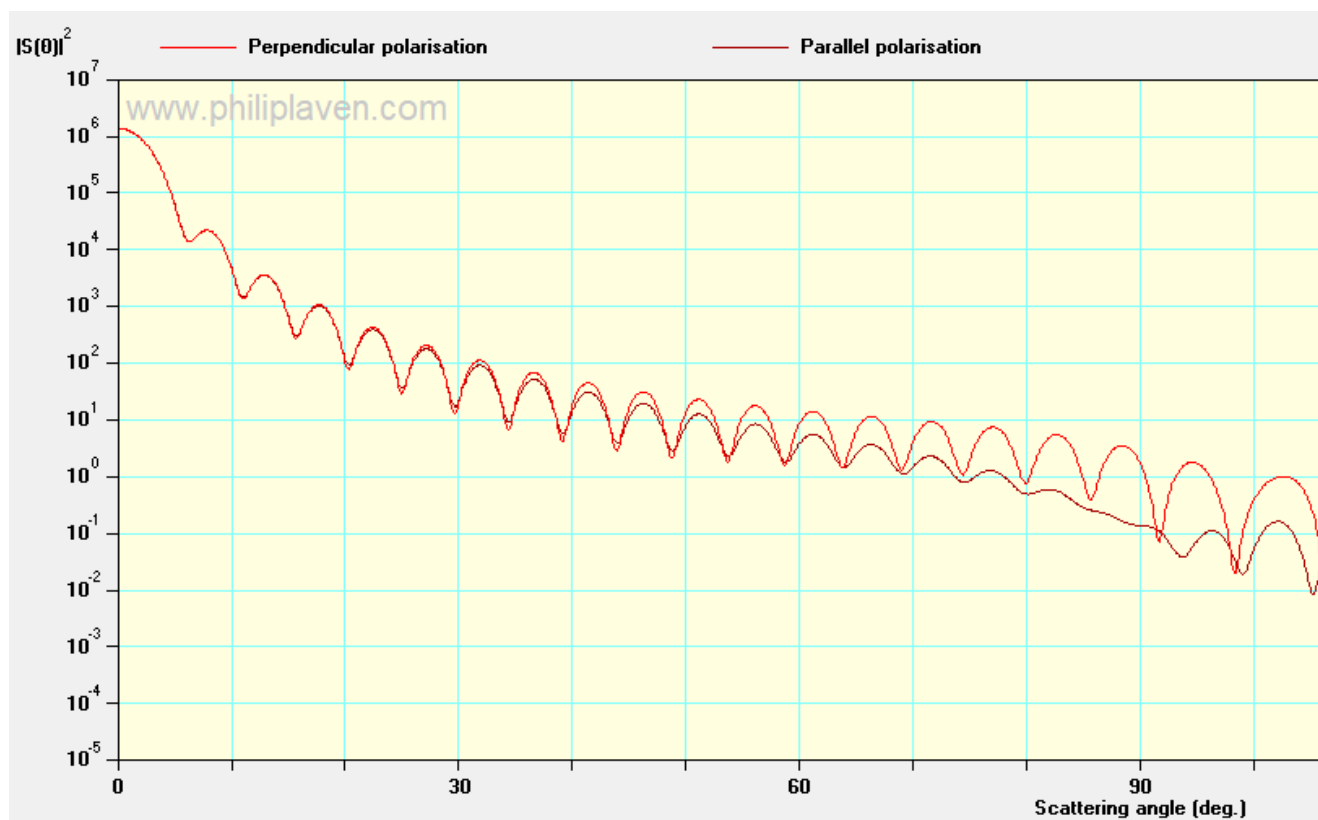


Рисунок 19. Зависимость интенсивности светорассеяния от угла в полярных координатах для перпендикулярно (обозначено красным) и параллельно (обозначено бордовым) поляризованного света для гексамера из тромбоцитов. Угловое разрешение – 0,1, радиус сферы 3,12 мкм. Показатель преломления объекта – 1,38. Показатель преломления среды – 1,33

3.1.2. Зависимость интенсивности светорассеяния от количества частиц

Для выявления зависимости интенсивности светорассеяния от количества частиц на оптическом пути был проведен численный расчет индикатрис рассеяния. Численно интенсивность равна усредненной за период колебаний волны мощности излучения, проходящей через единичную площадку, расположенную перпендикулярно направлению распространения энергии:

$$I = \langle S \rangle_t \quad (8)$$

При мощности лазера P равной 5 мВт и диаметре пучка на выходе d_1 равным 1 мм, интенсивность падающего света I_0 равна

$$I_0 = \frac{P}{S_0} = \frac{5 \text{ мВт}}{0,79 \text{ мм}^2} = 6366 \frac{\text{Вт}}{\text{м}^2} \quad (9)$$

при условии, что площадь пучка S_0 равна $\frac{\pi \cdot (1 \text{ мм})^2}{4} = 0,79 \text{ мм}^2$.

Пусть радиус активированного тромбоцита r_2 равен 1,5 мкм, тогда поперечная площадь тромбоцита S рассчитывается по формуле $\pi \cdot r_2^2$ и составит 7,07 мкм². Положим, что N – концентрация тромбоцитов в единице освещенного объема. Концентрация тромбоцитов в кювете равна 10 000 тромбоцитов/ мкл или 10 000 тромбоцитов в одном кубическом миллиметре. Освещается цилиндр диаметром 1 мм, длиной 10 мм (длина оптического пути). Объем такого цилиндра 0,79 мм³. В данном объеме будет находиться 78 540 тромбоцитов, общей площадью 0,56 мм² (рис.20).

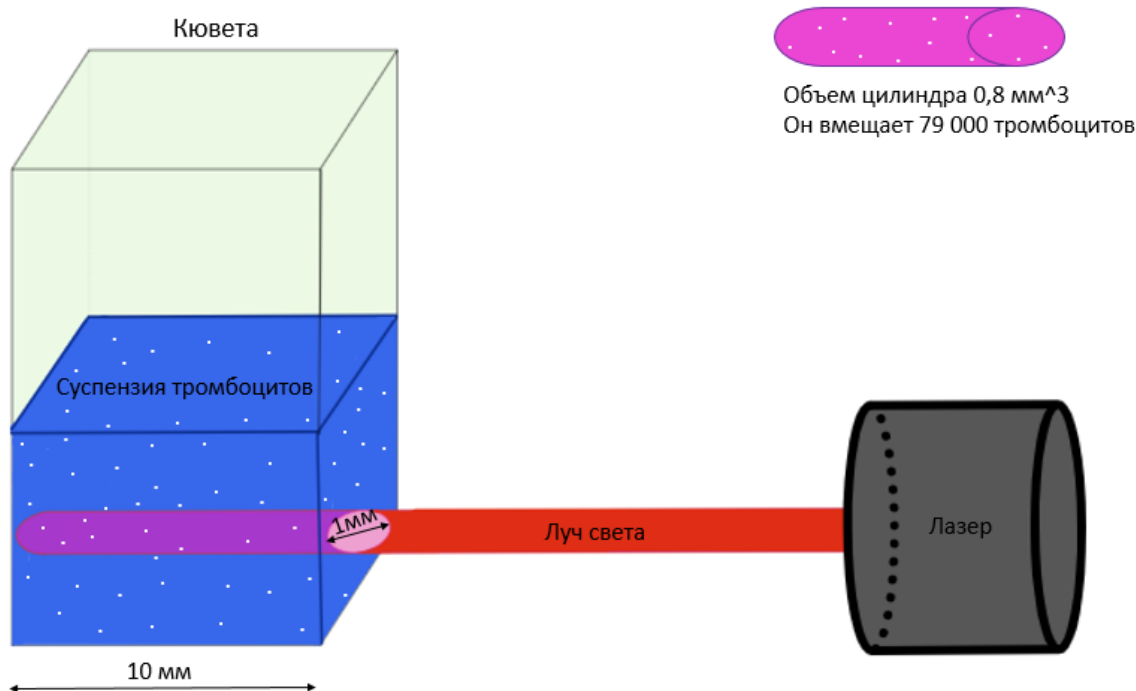


Рисунок 20. Лазер освещает цилиндрический сегмент объемом 0.8 мм^3 , в котором расположено 79 000 одиночных тромбоцитов.

Если I_0 – интенсивность падающего света, тогда интенсивность прошедшего сквозь кювету света I_p будет изменяться по закону:

$$I_p = I_0 * \left(1 - \frac{N * S}{S_0}\right) + N * I(\beta), \quad (10)$$

где первое слагаемое отражает часть света нерассеянного света ($\beta=0$), а второе слагаемое соответствует рассеивающему члену. Интенсивность рассеянного света от каждой частицы $I(\beta)$ равна

$$I(\beta) = \frac{I_0 x^4}{2k^2 a^2} \left(\frac{J_1(x \sin \beta)}{x \sin \beta} \right)^2 \quad (11)$$

где k — волновое число равное $2\pi/\lambda$ (λ — длина волны света), a — расстояние от рассеивающего объекта до детектора, x представляет собой безразмерный параметр размера равный $\pi * d / \lambda$, (d — диаметр частицы), J_1 — сферическая функция Бесселя первого порядка. Формула заимствована из [Mindukshev и др., 2012].

Рассмотрим ряд случаев для расчёта интенсивности светорассеяния при направлении лазерного излучения на измерительную кювету:

1. Буфер в кварцевой кювете

Если рассеивающих объектов нет, т.е. кювета не содержит тромбоцитов, тогда интенсивность падающего света равна интенсивности прошедшего насквозь пучка:

$$I_p = I_0 = 6366 \text{ Вт/м}^2 \quad (12)$$

2. Взвесь активированных тромбоцитов в буфере

Введем переменную γ равную $x \cdot \sin \beta$, тогда сферическая функция Бесселя первого порядка определяется выражением:

$$J_1(\gamma) = \frac{\sin \gamma}{\gamma^2} - \frac{\cos \gamma}{\gamma} \quad (13)$$

Если $\beta = 0$, то $\gamma = 0$ и для $J_1(\gamma)/\gamma$ возникает неопределенность типа $0/0$. По этой причине проведение расчета индикатрисы рассеяния по формуле (1) затруднено с помощью редактора Visual Code. В виду этого интенсивность светорассеяния рассчитывалась для углов от $0,25^\circ$ до $12,5^\circ$ с шагом в $0,25^\circ$. График зависимости интенсивности светорассеяния от угла рассеяния в интервале от 0° до 12° представлен на рисунке 21 (черная кривая). При β равном $0,25^\circ$ интенсивность света составляет около 32 кВт/м^2 . Если $\beta = 1^\circ$, то исходя из расчетов $I_p = 2 \text{ кВт/м}^2$. Значит, интенсивность рассеяния на 0° больше чем на 1° . Также на основании этого графика можно предположить, что при устремлении угла рассеяния к 0° интенсивность светорассеяния устремляется к максимальному значению. С увеличением угла от 1° до 12° интенсивность светорассеяния падает, при этом в интервале от 2° до 12° зависимость слабая.

3. Активированные тромбоциты в агрегате

Если агрегат представляет собой оксамер (агрегат из шести сфер диаметром 3 мкм), то радиус такой сферы будет равен $4,5 \text{ мкм}$, диаметр 9 мкм . Количество таких агрегатов в выделенном объеме составит $13\,090$ штук.

Выполнив подстановку соответствующих параметров в формулу (1) получено, что интенсивность нерассеянного света $I_p(\beta=0,25) = 8400 \text{ Вт/м}^2$. Таким образом, при увеличении размеров рассеивателей в несколько раз интенсивность светорассеяния под углом $0,25^\circ$ снижается в 4 раза.

Исходя из расчетов, $I_p(\beta=1^\circ)$ равна $3385,94 \text{ Вт/м}^2$. Интенсивность светорассеяния на 1° для рассеяния агрегатами из сфер меньше чем на 0° . При увеличении угла в интервале от 1° до 12° интенсивность светорассеяния агрегатами падает (рис. 21, красная кривая), в этом интервале зависимость слабая.

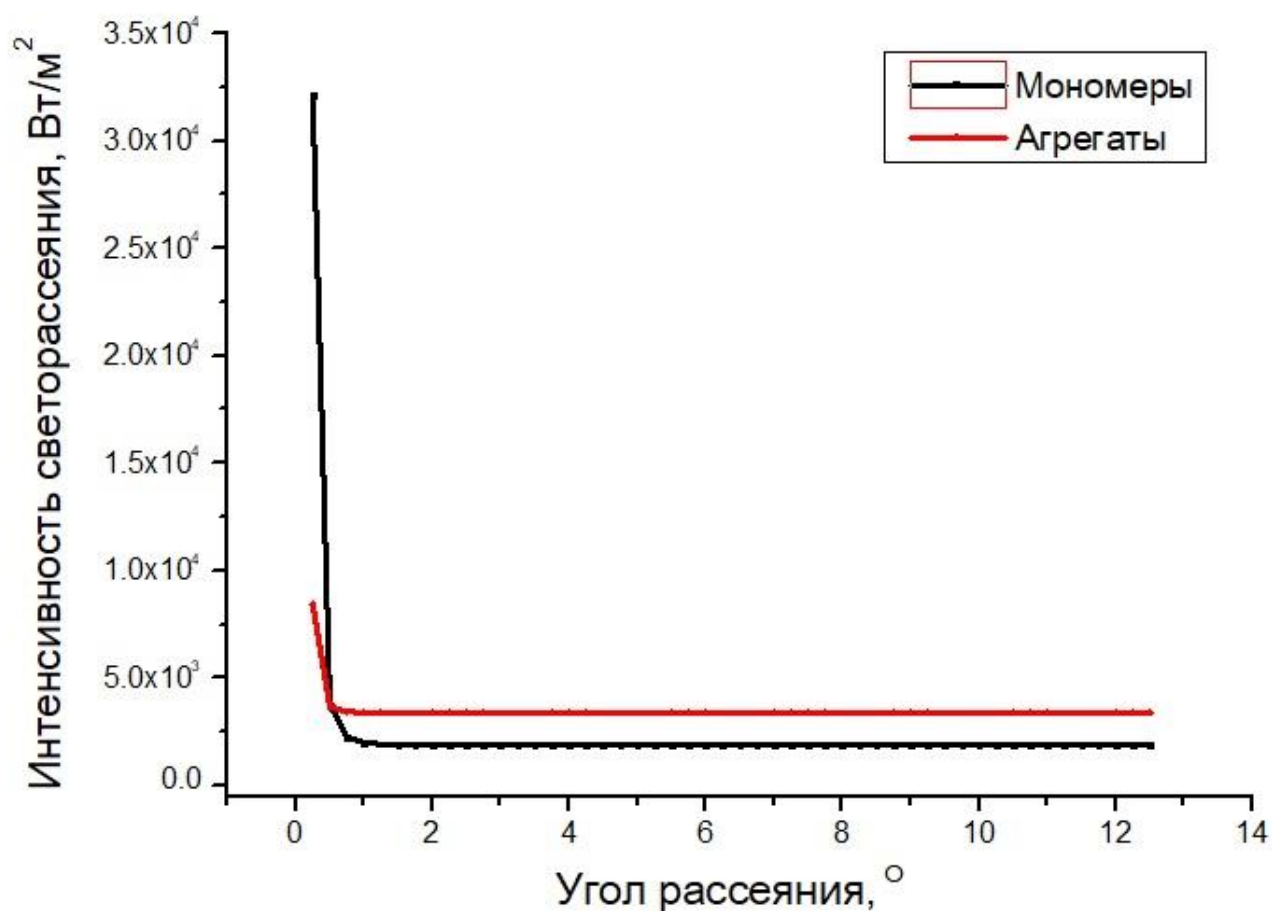


Рисунок 21. Индикатриса рассеяния в среде, содержащей суспензию тромбоцитов (черная кривая) и агрегатов тромбоцитов (красная кривая), рассчитанная аналитически с помощью среды Visual Studio Code v1.85.2 (Microsoft Corporation).

Помимо прочего была проанализирована зависимость интенсивности светорассеяния на одном градусе от концентрации частиц в растворе. В роли частиц выступили одиночные тромбоциты и их агрегаты, оксамеры. Графики

зависимости представлены на рисунке 22. Обнаружили, что интенсивность светорассеяния на 1° линейно убывает с увеличением частиц в кювете вне зависимости от размера частиц (мономеров тромбоцитов или оксамеры).

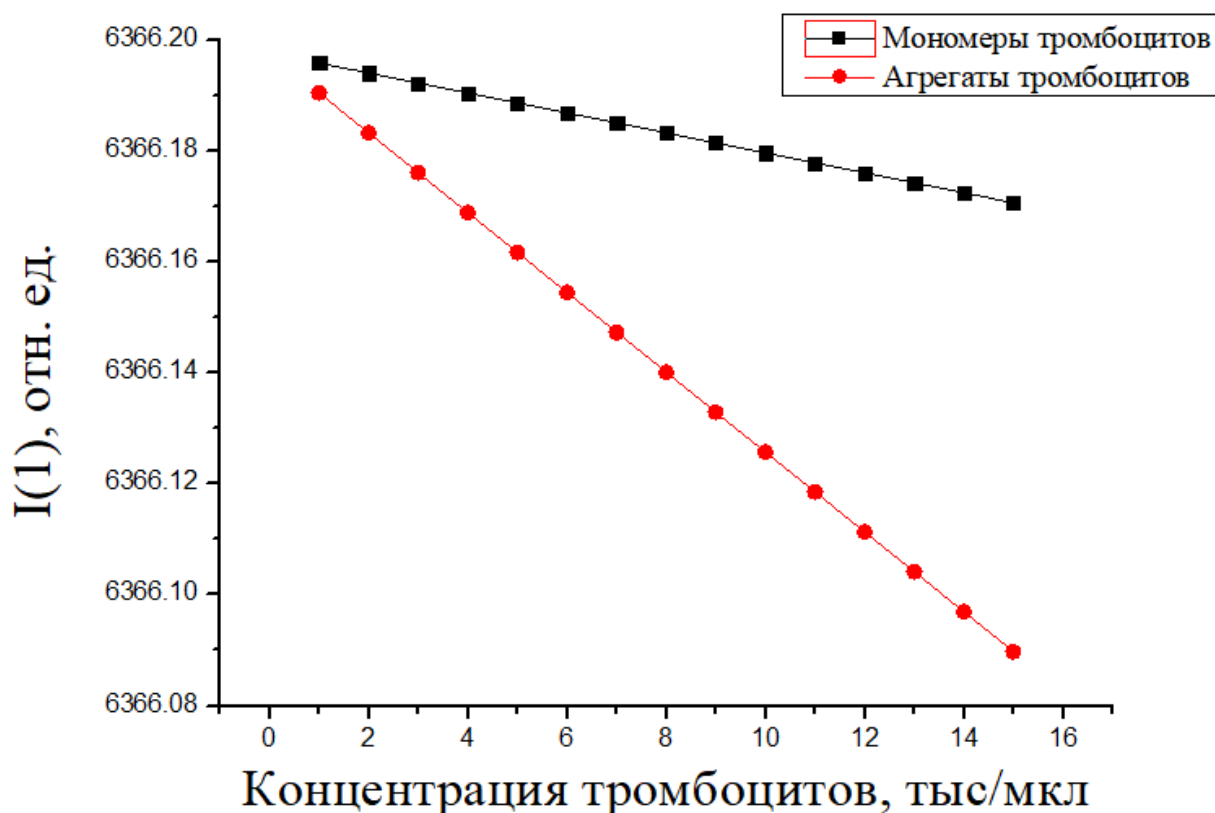


Рисунок 22. Интенсивность светорассеяния на 1° линейно убывает с увеличением концентрации рассеивающих объектов. Черная линия отображает зависимость для тромбоцитов-мономеров, красная – для агрегатов. Индикатриса рассеяния в среде, содержащей суспензию агрегатов тромбоцитов, рассчитана аналитически с помощью среды Visual Studio Code v1.85.2 (Microsoft Corporation).

Таким образом, в ходе моделирования процесса рассеяния лазерного излучения на частице размера порядка микрометра было получено, что рассеяние преимущественно происходит вперед и вбок и имеет центральный максимум на 0° . Зависимости для кривых полученных на 1° и 12° могут предоставлять дополнительную информацию об изменении формы одной частицы (с эллипсоидальной на сфероидальную), а также и об изменении размера частиц (например, при их агрегации).

3.1.3 Динамика индикатрисы рассеяния (экспериментальные данные)

На рис. 23 представлена зависимость интенсивности светорассеяния от угла для разных моментов времени: от момента добавления тромбоцитов в кювету до образования ими крупных агрегатов. Вне зависимости от фазы агрегации интенсивность света нелинейно убывает с увеличением угла от $0,75^\circ$ до 12° . Интенсивность светорассеяния одиночными тромбоцитами (черная кривая) на 1° в 2,4 раза снижена в отличии от сигнала, зарегистрированного от крупных агрегатов тромбоцитов, через 4 минуты после добавления агониста (оливковая кривая). Этот эффект обосновывает выбор сигнала, полученного на 1° , в качестве опорного для анализа агрегации тромбоцитов.

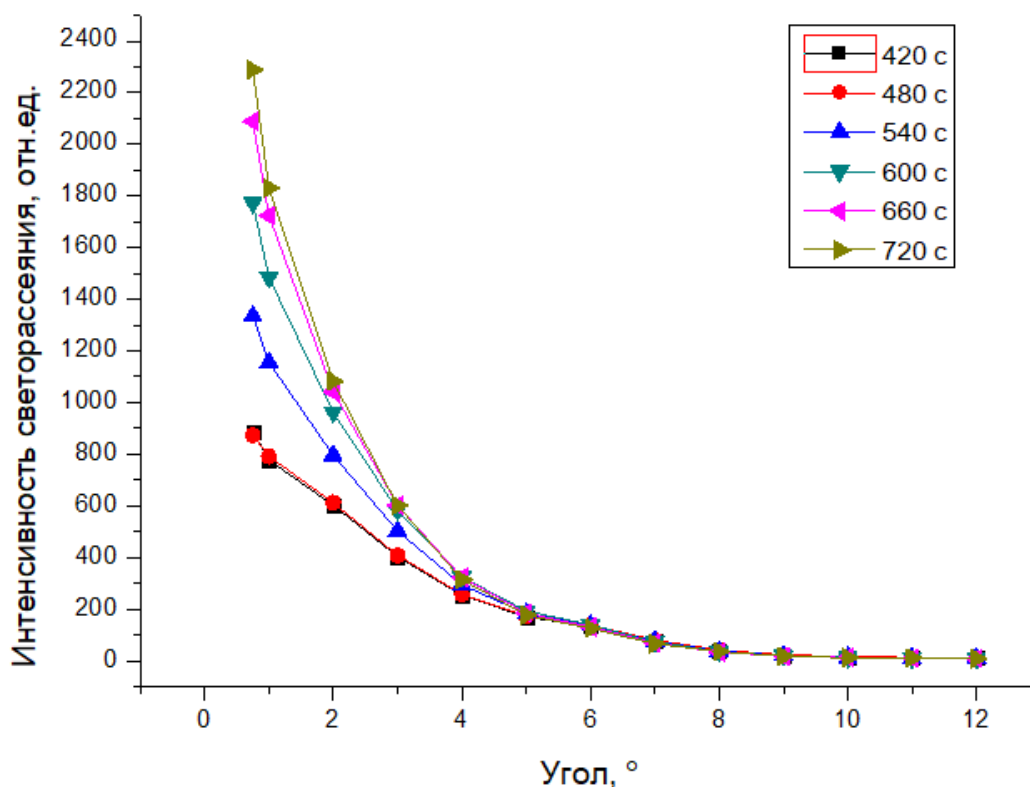


Рисунок 23. График зависимости интенсивности светорассеяния от $0,75^\circ$ до 12° в динамике. Черная кривая (420 с) соответствует моменту времени, когда в кварцевой кювете находятся тромбоциты, разбавленные буфером. Красная кривая (480 с) соответствует моменту времени сразу после стимуляции тромбоцитов 400 нМ АДФ. Синяя кривая (540 с) отражает данные полученные через 1 минуту после

добавления агониста, бирюзовая – через 2 минуты, розовая – через 3 минуты, оливковая – через 4 минуты соответственно. Точки на линиях указывают на экспериментально полученные данные, которые хорошо согласуются с расчетными кривыми.

При более детальном изучении кривых, полученных в интервале от 10 до 12° (рис. 24), оказалось, что в динамике сигнал, полученный на 12°, после добавления агониста возрастает (переход от черной точки к красной), затем убывает до базового значения (синяя точка), а потом снижается еще сильнее (оливковая точка). Это наблюдение обосновывает выбор сигнала, полученного на 12°, в качестве опорного для анализа изменения формы тромбоцитов, мгновенной реакции на агонист, сопровождающейся сферизацией клеточных фрагментов.

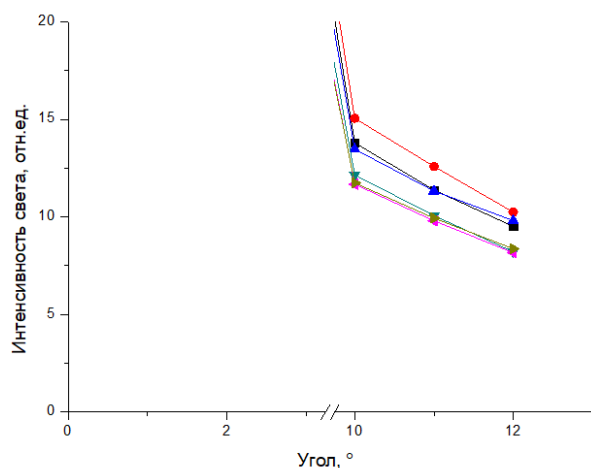


Рисунок 24. График зависимости интенсивности светорассеяния от 0° до 12° в динамике. Черная кривая (420 с) соответствует моменту времени, когда в кварцевой кювете находятся тромбоциты, разбавленные буфером. Красная кривая (480 с) соответствует моменту времени сразу после стимуляции тромбоцитов 400 нМ

АДФ. Синяя кривая (540 с) отражает данные полученные через 1 минуту после добавления агониста, бирюзовая – через 2 минуты, розовая – через 3 минуты, оливковая – через 4 минуты соответственно. Точки на линиях указывают на экспериментально полученные данные, которые хорошо согласуются с расчетными кривыми.

Анализ кривых полученных в интервале от 0 до 12° (рис. 25, те же данные, но в логарифмической шкале) показал, что сигнал инвертируется в динамике:

максимальный уровень интенсивности света на 1° был достигнут через 4 минуты после инициации агрегации (оливковая точка), в то время как значение сигнала на 12° в этой временной точке минимально. Обратно, красная кривая для 1° принимает минимальное значение, а на 12° – максимальное.

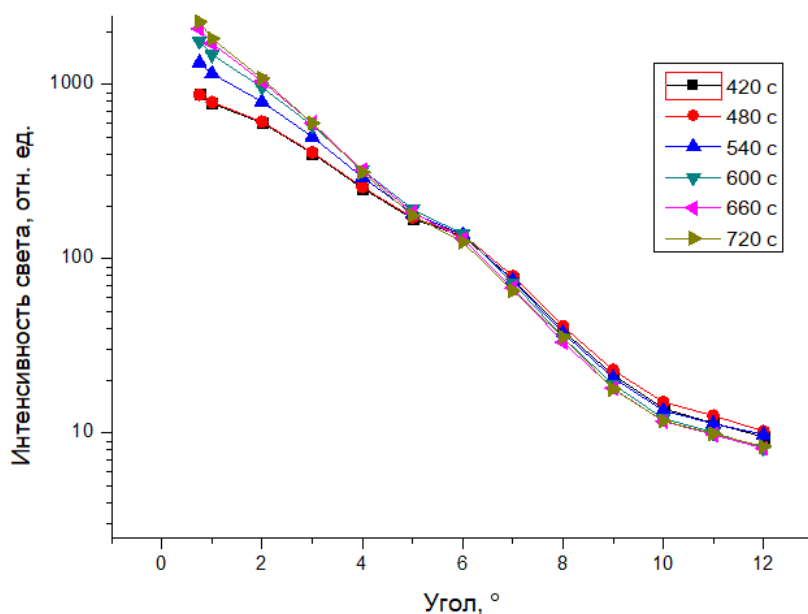


Рисунок 25. График зависимости интенсивности светорассеяния от 0° до 12° в динамике (логарифмическая шкала, основание 10).

3.2 Определение преаналитических и аналитических факторов влияющих на исследование функциональной активности тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния

3.2.1 Оценка внутриоператорной воспроизводимости

Для оценки достоверности различных результатов работы было необходимо дать оценку внутриоператорной воспроизводимости метода. Для этого одним оператором был повторен последовательно один и тот же эксперимент трижды. Было оценено среднее по трем параметрам, среднеквадратичное отклонение SD и коэффициент вариации CV. Коэффициент вариации определяли, как отношение стандартного отклонения к среднему. Коэффициент вариации параметров для АДФ- индуцируемой агрегации составил 4,9 %, 5,1% и 3,6% для V_{ia} , $\Delta I(1)$, $\Delta I(12)$ (Таблица 9). Эти значения намного ниже, чем различия в параметрах между здоровыми донорами или различия между донорами и пациентами (см. ниже). Метод малоуглового светорассеяния сравним по повторяемости с методом СТА,

коэффициент вариации АДФ-индуцированной агрегации у которого также 3,5% [Poletaev и др., 2018].

Таблица 9. Внутриоператорная воспроизводимость. Коэффициенты вариации (CV) параметров АДФ-индуцируемой агрегации при трех повторениях одним оператором.

Измерение	CV (V_{ia}), %	CV ($\Delta I(1)$), %	CV ($\Delta I(12)$), %
Донор 1	5,6	0,7	1,2
Донор 2	2,9	3,6	7,6
Донор 3	6,2	10,9	1,9
Среднее CV	4,9	5,1	3,6

Коэффициенты вариации параметров для коллаген–индуцируемой агрегации приведены в Таблице 10.

Таблица 10. Коэффициенты вариации параметров коллаген-индуцируемой агрегации

Донор	CV(V_{max}), %	CV($I(1)$), %	CV($I(12)$), %	CV (t_{clot}), %	CV(t_{lag}), %
1	3,3	1,6	5,0	3,5	0,9
2	3,8	1,8	0,6	2,0	0,9
3	3,4	2,0	1,1	1,1	1,0

Выяснено, что коэффициент вариации для V_{max} составил 3,5%, для $\Delta I(1)$ – 1,8%, для $\Delta I(12)$ – 2,3%, время свертывания воспроизвелось с точностью в 2,2%, а лаг-фаза варьировалась при повторных измерениях с разбросом в 1%. Таким образом, оценена изменчивость результатов и полученные данные могут быть использованы для практической интерпретации измерений.

3.2.2 Оценка отдаленной воспроизводимости результатов исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния

Одной из характеристик любого диагностического метода, определяющей его ценность, является отдаленная (в пределах недели) воспроизводимость полученных при его использовании результатов. Для введения метода малоуглового светорассеяния в клиническую практику, а также для исследовательских целей была поставлена задача оценки отдаленной воспроизводимости результатов исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов здоровых добровольцев методом малоуглового светорассеяния. Установлено, что начальная скорость АДФ-индуцированной агрегации V_{ia} (рис. 26А) воспроизводится в рамках недели наблюдения: $0,9 \pm 0,6$ отн.ед./с в день 1 и $0,9 \pm 0,4$ отн.ед./с (среднее $\pm$ среднекв. откл.) в день 8. На рисунке 26Б отражено, что амплитуда АДФ – индуцированной агрегации $\Delta I(1)$ остается неизменной от 1-го дня наблюдения 470 ± 200 отн.ед. к восьмому 480 ± 90 отн.ед. Изменение формы тромбоцитов при активации АДФ $\Delta I(12)$ в 1-ый день составило $2,1 \pm 0,5$ отн. ед., а на 8-ой день было равным $2,1 \pm 0,6$ отн.ед. (рис.26В). Таким образом, все три параметра достоверно не изменились при повторном измерении через неделю.

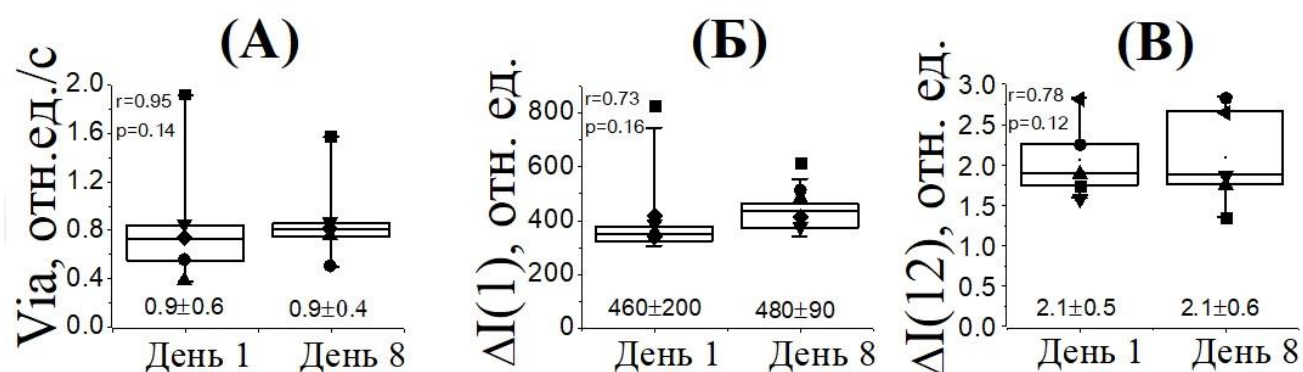


Рисунок 26. Начальная скорость АДФ- индуцированной агрегации V_{ia} (А), амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ (Б) и изменение формы $\Delta I(12)$ (В) стабильны в течение недели ($n=5$). Средние линии — медианы, рамки показывают 25–75 процентиля, полосы ошибок показывают интервалы 5–95 %. На уровне значимости $p=0,05$ все параметры существенно не изменяются в пределах недели.

На рисунке 27 отражены результаты серии экспериментов с отдаленной воспроизводимостью параметров коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов. Начальная скорость агрегации V_{ia} (рис. 27А) воспроизводится в рамках недели наблюдения: $2,3 \pm 2,0$ отн.ед./с в день 1 и $1,7 \pm 0,7$ отн.ед./с (среднее $\pm$ среднекв. откл.). Амплитуда коллаген-индуцированной агрегации $\Delta I(1)$ остается неизменной: в 1-ый день наблюдения она составила 790 ± 140 отн.ед., а на 8-ой день наблюдения была равной 700 ± 250 отн.ед. (рис. 27Б). Изменение формы тромбоцитов при активации коллагеном $\Delta I(12)$ в 1-ый день составило $2,0 \pm 0,5$ отн.ед., а на 8-ой день было равным $2,1 \pm 0,4$ отн.ед. (рис. 27В). Время свертывания составило 900 ± 300 с и 800 ± 300 с соответственно на 1-ый и 8-ой дни исследования (рис. 27Г); а лаг-фаза была равной 90 ± 60 с и 76 ± 18 с (рис. 27Д).

По результатам измерений выявлено, что результаты исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния являются отдаленно воспроизводимыми.

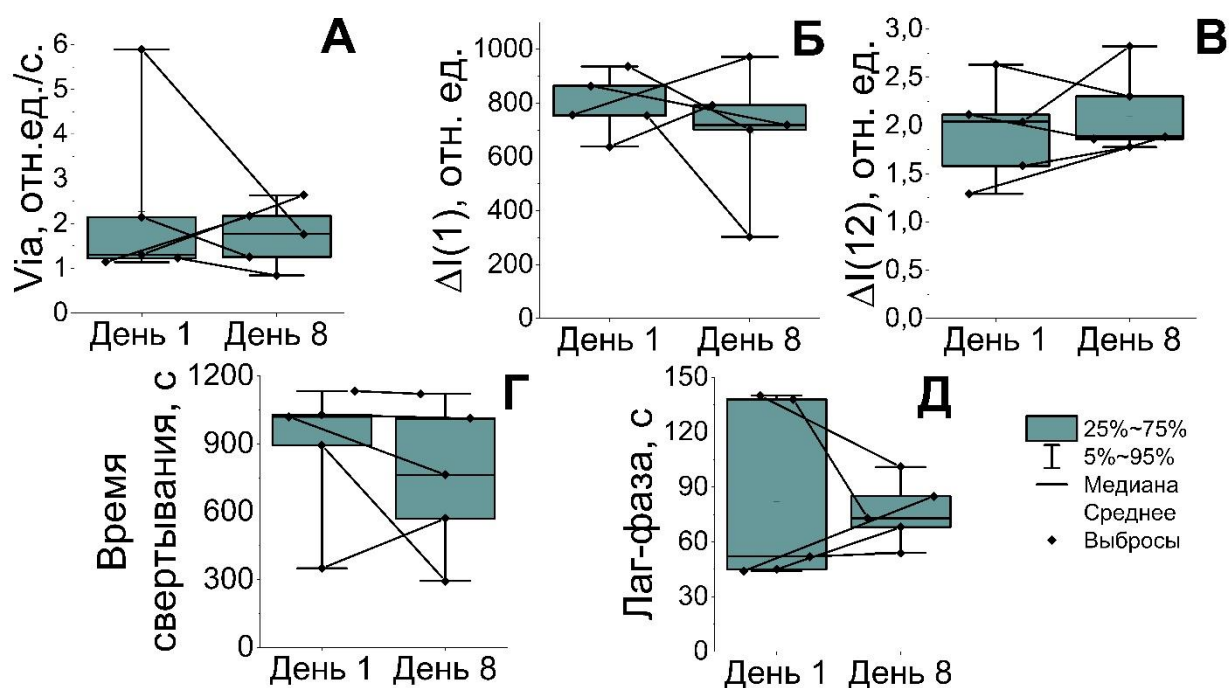


Рисунок 27. Параметры коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов измеренной методом малоуглового светорассеяния стабильны в течение недели ($n=5$). Начальная скорость агрегации (А) тромбоцитов, амплитуда агрегации (Б),

изменение формы (В), время свертывания (Г), а также лаг-фаза (Д) значимо не изменяются за неделю ($p > 0,05$). Статистика как на рис. 26.

Стабильность параметров агрегации тромбоцитов в течение недели обусловлена несколькими факторами, связанными с биологией тромбоцитов и особенностями проведения исследований. В частности, сроком жизни тромбоцитов: тромбоциты имеют относительно короткий срок жизни в кровотоке — около 7-10 дней [Michelson и др., 2019]. В течение этого времени их функциональная активность поддерживается на определенном уровне. Хотя тромбоциты постоянно обновляются (замещаются новыми), общий пул тромбоцитов в крови сохраняет свои усредненные характеристики агрегации.

Эти данные позволят сделать выводы о статистически значимых отличиях в агрегации тромбоцитов, наблюдаемой в динамике, например, при оценке функции тромбоцитов у пациентов на продолжительной терапии антиагрегантами. Помимо этого, данные результаты могут быть полезными в перспективе при оценке агрегации тромбоцитов в образцах, подлежащих длительному хранению, например, тромбоцитарного концентрата, использующегося в трансфузиологии.

3.2.3 Исследование зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от транспортировки образца

Большинство ошибок в лабораторной медицине происходит на пре- и постаналитическом этапе процесса тестирования. Преаналитическая фаза представляет собой этап наибольшего риска, при этом преаналитические ошибки могут оставаться незамеченными до тех пор, пока не будет проведена постаналитическая валидация и интерпретация [De la Salle, 2019]. В настоящее время на преаналитические ошибки приходится до 70% всех ошибок, допущенных в лабораторной диагностике, большая часть которых возникает из-за проблем с подготовкой пациентов, отбором проб, транспортировкой и подготовкой к анализу и хранению [Lipri и др., 2011]. В ходе работы было исследовано влияние транспортировки крови в термостатируемом контейнере на результаты измерения агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния. Было выявлено,

что начальная скорость АДФ-индуцируемой агрегации V_{ia} , измеренная методом малоуглового светорассеяния, составила $1,1 \pm 0,5$ отн. ед. /с (рисунок 28А), а после транспортировки $1,2 \pm 0,8$ отн.ед./с. Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ составила 540 ± 150 отн.ед., а после перевозки 460 ± 180 отн.ед. (рисунок 28 Б). Амплитуда изменения формы $\Delta I(12)$ составила $2,0 \pm 0,6$ отн. ед., а после транспортировки $2,5 \pm 0,7$ отн.ед. (рисунок 28 В). Значимых изменений в измеряемых параметрах АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния до/после транспортировки крови обнаружено не было ($p > 0,05$).

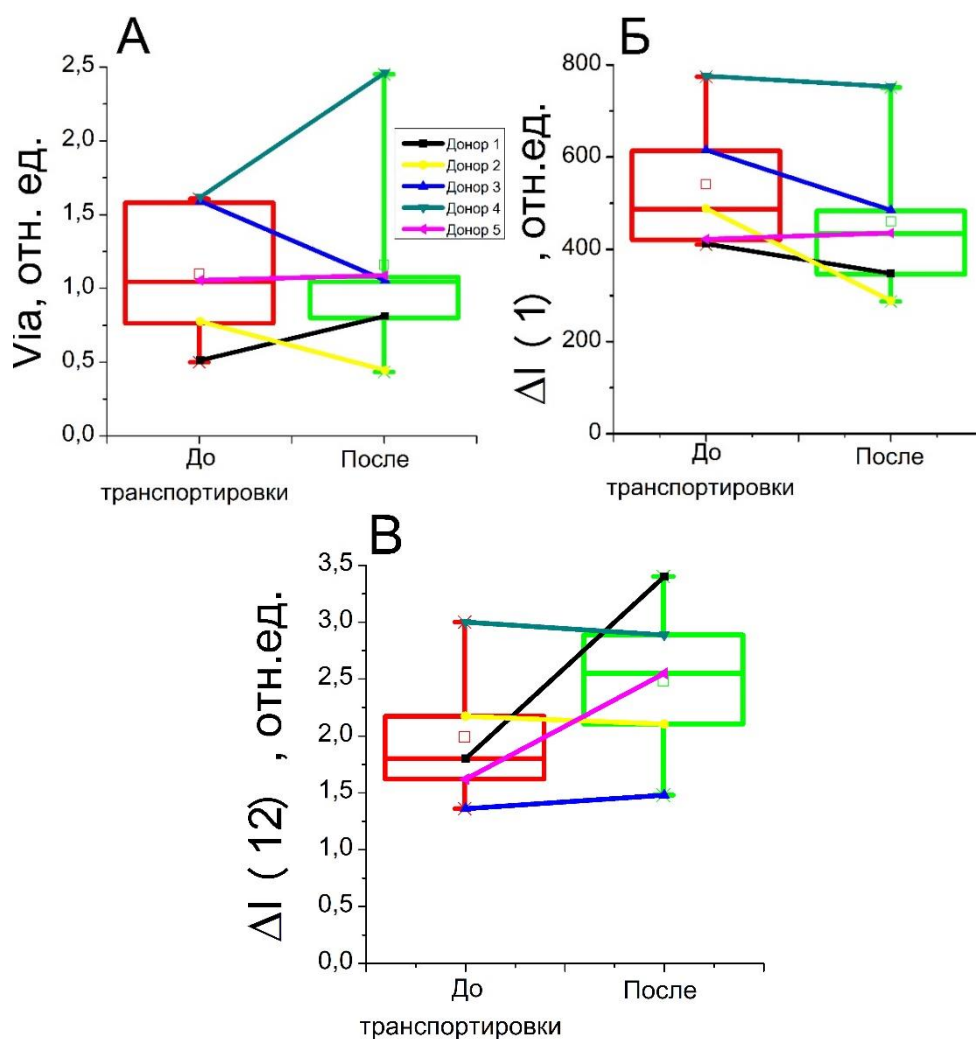


Рисунок 28. Оценка влияния транспортировки крови на результаты исследования АДФ-индуцируемой агрегации методом малоуглового светорассеяния. А – Начальная скорость агрегации тромбоцитов. Б – Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации. В – Изменение формы тромбоцитов. Статистика как на рисунке 27.

Было получено, что начальная скорость коллаген-индуцируемой агрегации V_{ia} , измеренная методом малоуглового светорассеяния, составила $1,7 \pm 1,1$ отн. ед./с (рисунок 29 А), а после транспортировки $2,1 \pm 0,6$ отн.ед./с. Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ составила 750 ± 180 отн.ед., а после перевозки 800 ± 300 отн.ед. (рисунок 29 Б). Амплитуда изменения формы $\Delta I(12)$ составила $2,1 \pm 0,7$ отн. ед., а после транспортировки $2,7 \pm 0,7$ отн.ед. (рисунок 29 В). Время свертывания составило 2800 ± 800 с и 3200 ± 1000 с соответственно до и после транспортировки (рис. 29 Г); а лаг-фаза была равной 74 ± 19 с и 80 ± 40 с (рис. 29 Д). Значимых изменений в измеряемых параметрах коллаген-индуцируемой агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния до/после транспортировки крови обнаружено не было ($p > 0,05$).

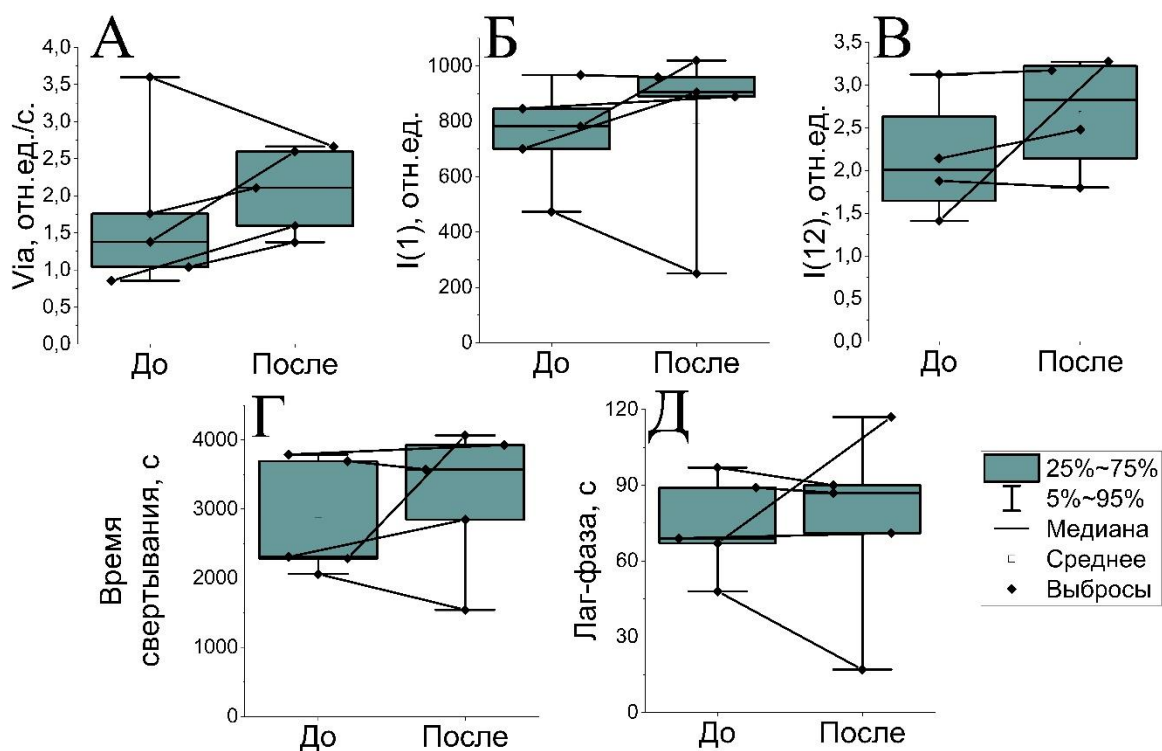


Рисунок 29. Оценка влияния транспортировки крови на результаты исследования коллаген – индуцируемой агрегации методом малоуглового светорассеяния. А – Начальная скорость агрегации тромбоцитов. Б – Амплитуда коллаген – индуцированной агрегации. В – Изменение формы тромбоцитов. Г– время свертывания. Д – лаг-фаза. Статистика как на рисунке 26.

Таким образом, показано, что для исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния образец может быть доставлен из другого диагностического центра при соблюдении температурного режима и пребывании в пути не более двух часов.

3.2.4 Зависимость результатов экспериментов от времени между забором крови и началом проведения исследования

В качестве следующего шага, направленного на минимизацию преаналитических ошибок при повседневном использовании метода малоуглового светорассеяния для оценки функции тромбоцитов, мы исследовали зависимость результатов эксперимента от времени после получения БТП в образцах здоровых доноров. Статистически значимой разницы между результатами анализа за весь период хранения БТП не наблюдалось (рис. 30). Таким образом, для достоверной воспроизводимости можно рекомендовать проводить исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния в течение 3,5 ч после получения БТП.

Полученные результаты находятся в согласии с данными описанными в статье [Stegnar, Knezevic, Bozic-Mijovski, 2010], где было показано, что амплитуда АДФ-индуцированной агрегации измеренная методом СТА не изменяется в течении двух часов с момента получения БТП.

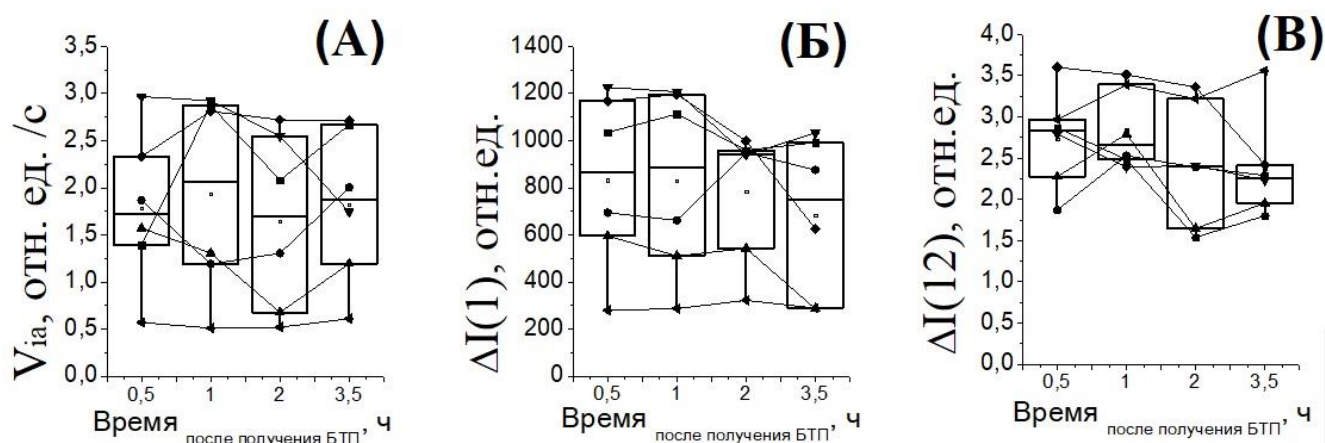


Рисунок 30. Изменение формы и параметры агрегации тромбоцитов не изменяются в течение 3,5 часов с момента получения БТП. Тромбоциты здоровых доноров ($n =$

б) характеризовали с помощью малоуглового светорассеяния после стимуляции 800 нМ АДФ, как описано в разделе «Материалы и методы». (А) Зависимость начальной скорости агрегации от времени, (Б) амплитуда агрегации $\Delta I(1)$; (С) амплитуда изменения формы $\Delta I(12)$. Символ $\square$ отображает средние значения, горизонтальные линии — медианы, прямоугольники — 25–75 перцентилей, полосы ошибок — интервалы 5–95 %. На уровне 0,05 все параметры существенно не изменяются со временем после получения БТП.

3.2.5 Зависимость параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от концентрации бедной тромбоцитами плазмы в суспензии

Концентрация тромбоцитов у пациентов изменяется в широком диапазоне, а концентрация тромбоцитов в кювете является постоянной величиной, поэтому количество плазмы, добавляемой в кювету, варьирует. Для оценки влияния разбавления плазмы на параметры малоуглового светорассеяния, мы провели исследования на пяти здоровых добровольцах. Для каждого добровольца было проведено 6 измерений: количество плазмы в кювете варьировали от 2 до 12 % (с шагом в 2%) при постоянном количестве тромбоцитов. На рис. 31 изображены графики зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от процентного содержания плазмы в кювете. Начальная скорость агрегации практически не меняется в диапазоне относительного объема плазмы от 6 до 12%. Однако есть зависимость линейного характера от этого параметра в диапазоне 2–6%, что может объясняться влиянием низкой концентрации фибриногена. Амплитуда изменения светорассеяния на 1° практически не зависит от процентного содержания плазмы в кювете, для $\Delta I(12)$ получили слабую зависимость с тенденцией на уменьшение этого параметра с ростом процентного содержания плазмы. Эти результаты позволяют предположить, что протокол анализа следует корректировать, если относительное содержание плазмы меньше 6%.

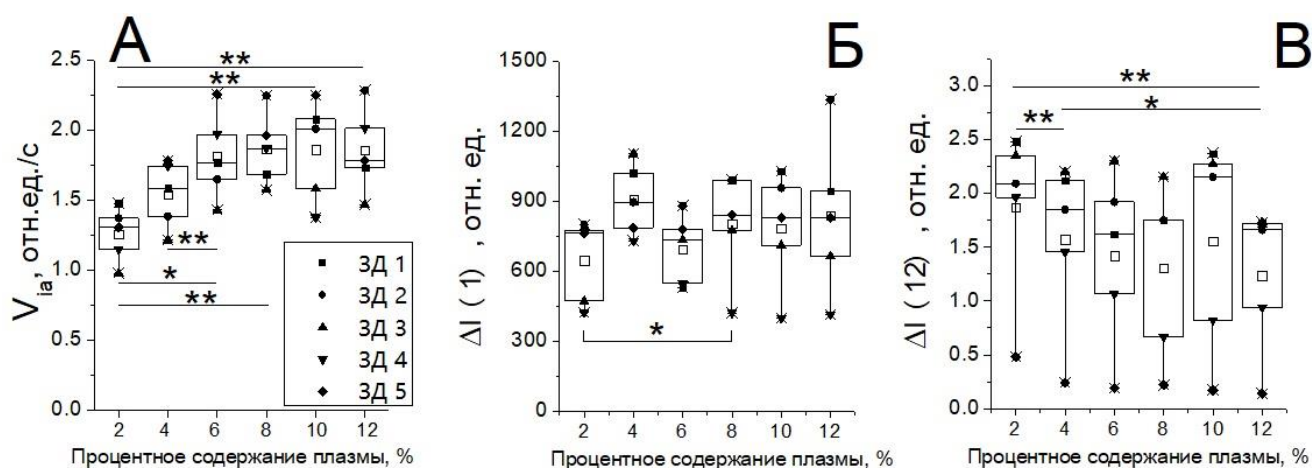


Рисунок 31. Начальная скорость агрегации V_{ia} (А), амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ (Б) и изменение формы $\Delta I(12)$ (В) зависят от количества плазмы в образце. Статистика такая же, как на рисунке 27. Статистическая значимость показана звездочками: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$. ЗД – здоровый донор ($n=5$).

3.2.6. Исследование зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от соотношения кровь-цитрат натрия и типа антикоагулянта

Одной из распространенных преаналитических ошибок является недобор пробирки (особенно часто с такой проблемой сталкиваются при заборе крови у детей). Целый ряд диагностических тестов не работает с пробирками, которые недобраны, поэтому также мы решили исследовать влияние соотношения кровь/антикоагулянт на результаты теста.

Графики зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов (начальная скорость агрегации, амплитуда изменения светорассеяния на 1° и 12°) от соотношения кровь/цитрат натрия представлены на рис. 32. В корректно набранной пробирке соотношение крови к цитрату натрия составляет 9 к 1 по объему, а в пробирке с недобором крови – 9 к 2 соответственно. Начальная скорость агрегации и амплитуда изменения светорассеяния на 1° не зависят от соотношения кровь/цитрат натрия, а амплитуда изменения светорассеяния на 12° достоверно значимо снижена на 18% в пробе, в которой соотношение кровь/цитрат натрия составляет девять к двум. Эти результаты демонстрируют, что недобранные

образцы крови не могут быть исследованы в соответствии со стандартным протоколом.

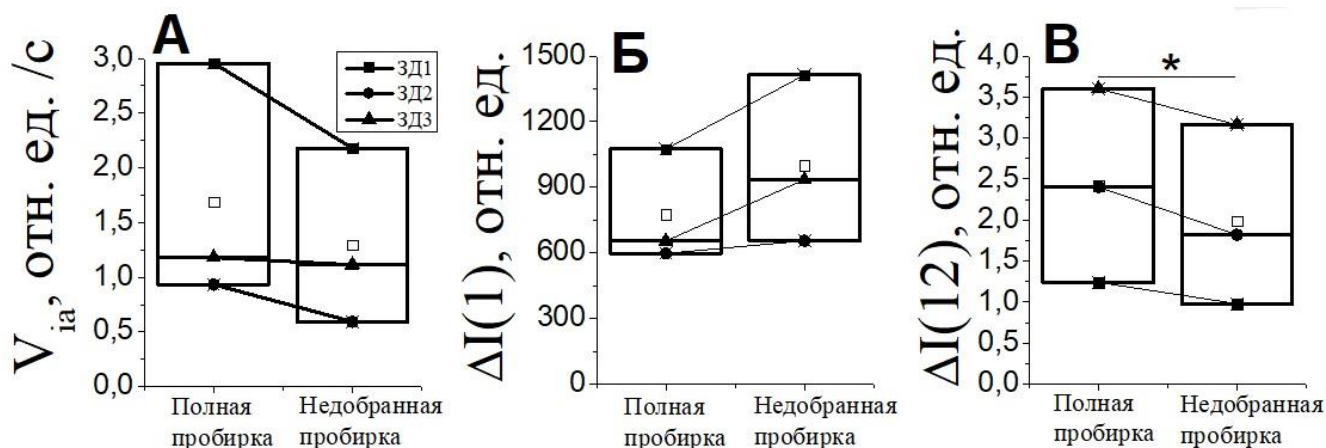


Рисунок 32. Параметры агрегации (начальная скорость агрегации (А), амплитуда изменения светорассеяния на 1° (Б)) не зависят от соотношения кровь/цитрат натрия, а изменение формы (В) зависит. ЗД – здоровый донор (n=5). Статистическая значимость отличий оценена парным t-критерием.

Для фундаментальных и диагностических исследований тромбоцитов забор крови осуществляется в пластиковые пробирки с антикоагулянтом. Цитрат натрия – антикоагулянт, механизм действия которого состоит в хелатировании двухвалентных катионов. Такой тип антикоагулянтов снижает в крови концентрацию ионов кальция (содержание кальция в плазме крови около 2 мМ, а ионизированного – около 1,2 мМ) до уровня, при котором спонтанной активации свёртывающего каскада *in vitro* не происходит [Мазуров, 2011]. Гирудин является антикоагулянтом, который ингибирует как жидкую фазу, так и тромбин, связанный со сгустками. В присутствии такого антикоагулянта тромбоциты сохраняют свою способность к формированию агрегата [Michelson и др., 2019]. В отличие от световой трансмиссионной агрегометрии, исследование малоуглового светорассеяния проводится в стандартизированном буфере с кальцием и, таким образом, позволяет использовать различные антикоагулянты. На рис. 33 представлены графики зависимости параметров агрегации от использованного антикоагулянта. Было выявлено, что параметры АДФ-индуцированной агрегации

значимо не отличаются при проведении исследования из материала, собранного в пробирку с цитратом натрия или гирудином. Это говорит о том, что анализ для этих антикоагулянтов протекает сходным образом, и результаты можно сравнивать рутинно. Несмотря на то, что можно использовать оба антикоагулянта, мы выбрали цитрат натрия для текущих исследований в виду его более широкого применения и возможности использовать одну и ту же пробирку для исследования тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния и другими тестами.

В статье [Mani, Hellis, Lindhoff-Last, 2011] было продемонстрировано, что через 2 часа после забора крови достоверных отличий в результатах исследования агрегации тромбоцитов методом классической агрегометрии на разных антикоагулянтах (цитрат натрия и гирудин) выявлено не было. Данные результаты находятся в согласии с полученными нами.

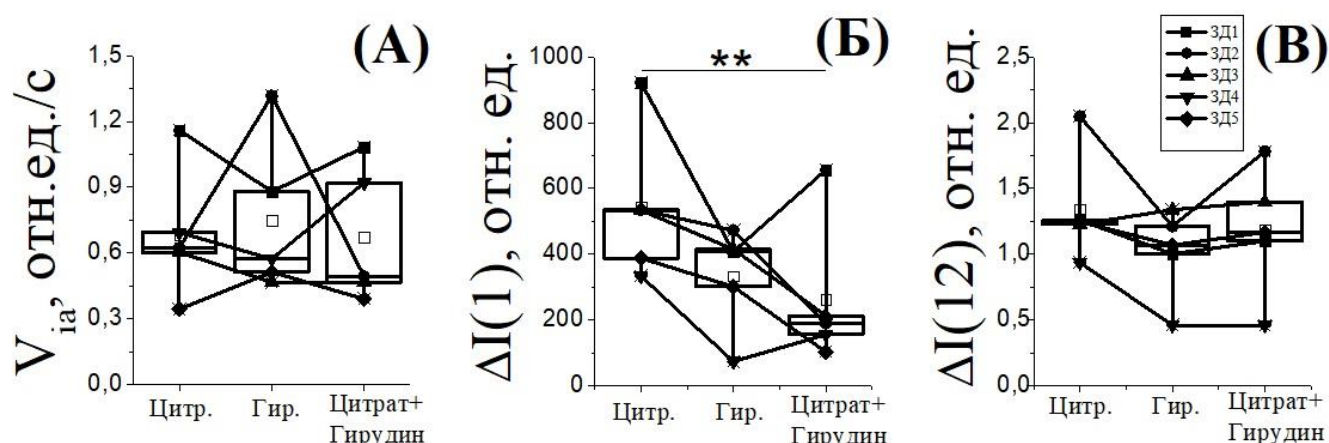


Рисунок 33. Параметры агрегации и изменение формы тромбоцитов не зависят от типа антикоагулянта. Влияние антикоагулянта (пробирка с цитратом натрия, пробирка с гирудином, пробирка с цитратом натрия и 525 ед/мл гирудина) на начальную скорость агрегации V_{ia} (А), амплитуду агрегации $\Delta I(1)$ (Б) и изменение формы $\Delta I(12)$ (В, $n=5$). Статистика такая же, как на рисунке 27.

3.2.7 Влияние липополисахаридов на тромбоциты

Данные о влиянии липополисахаридов на агрегацию тромбоцитов противоречивы: с одной стороны, ЛПС способны усиливать агрегацию отмытых тромбоцитов, стимулируемую тромбином, с другой стороны, ЛПС не влияют на агрегацию в

плазме богатой тромбоцитами [Koessler и др., 2019]. Для того чтобы получить более глубокое понимание эффектов наблюдаемых Koessler и соавторами, было исследовано влияние липополисахаридов на агрегацию тромбоцитов при слабой стимуляции (активации АДФ в концентрациях 50, 500 и 1000 нМ) в разведенной буфером богатой тромбоцитами плазме. Обнаружено, что формирование диагрегатов тромбоцитов активированных АДФ было ослаблено при воздействии ЛПС в концентрации 100 мкг/мл. Начальная скорость агрегации тромбоцитов значительно снижена в пробах с ЛПС по сравнению с контрольными (рис. 34).

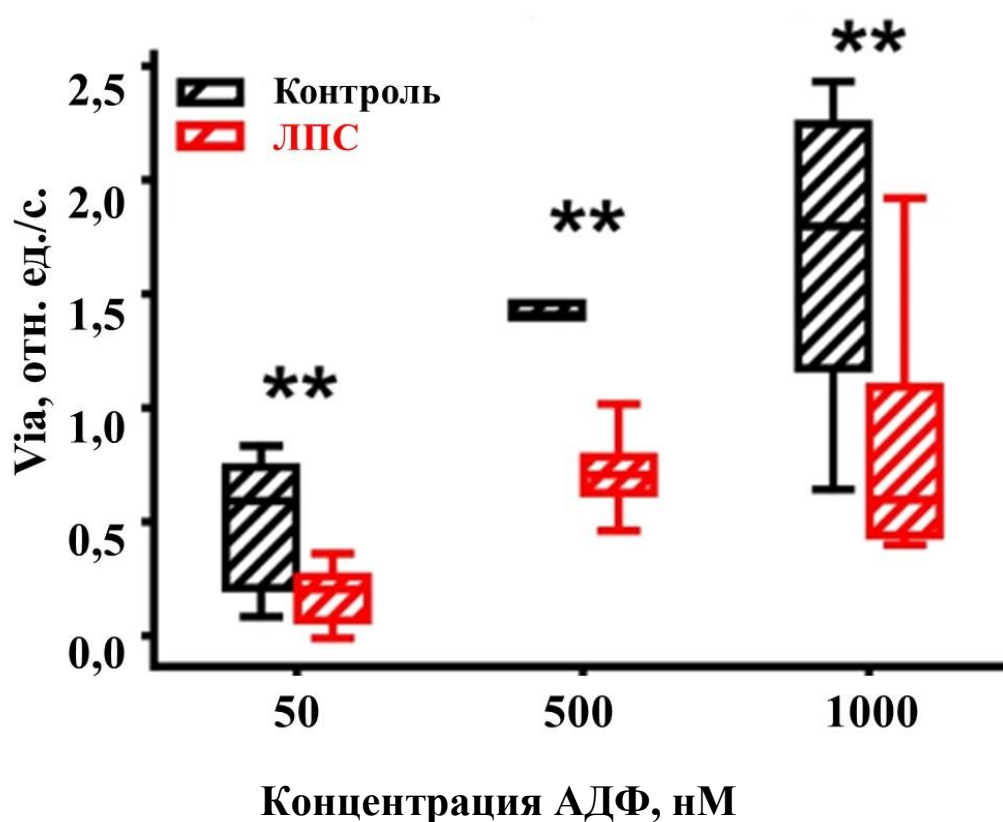


Рисунок 34. Влияние ЛПС на слабую активацию тромбоцитов. Анализ малоуглового светорассеяния выявил ЛПС-индуцированное нарушение образования агрегатов тромбоцитов после активации 50 нМ, 500 нМ и 1 мкМ АДФ по сравнению контрольной пробой, не содержащей липополисахаридов.

Интенсивность светорассеяния на 1° снижена в пробах, содержащих ЛПС по сравнению с контрольными при стимуляции тромбоцитов 50, 500 и 1000 нМ АДФ (рисунок 35).

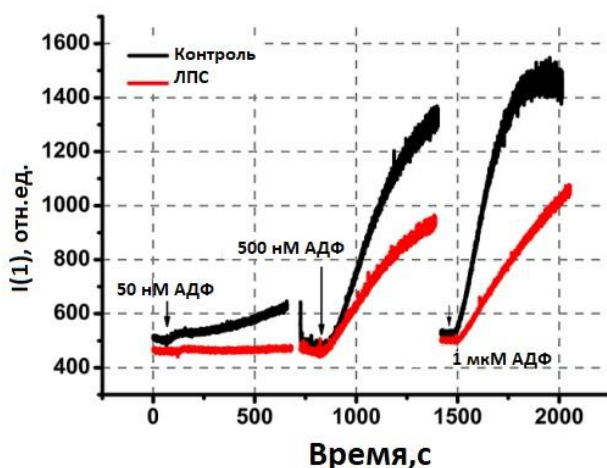


Рисунок 35. Интенсивность светорассеяния на 1° снижена в пробах с ЛПС по сравнению с контрольными при стимуляции всеми протестированными концентрациями АДФ. Стрелкой обозначен момент добавления агониста.

Таким образом, мы заключили, что ЛПС в концентрации 100 мкг/мл способны ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в БТП разведенной буфером. Мы предполагаем, что механизм воздействия ЛПС на агрегацию тромбоцитов вовлекает цАМФ/цГМФ сигнальные пути.

3.2.8 Влияние монафрама на тромбоциты

Для оценки чувствительности метода малоуглового светорассеяния для анализа функции тромбоцитов был использован антиагрегант монафрам. Добавление монафрама, антагониста гликопротеина IIb/IIIa, полностью блокировало агрегацию тромбоцитов (рис. 36А, красная кривая): уровень светорассеяния не изменяется со временем после добавления агониста. Однако преинкубация тромбоцитов с монафрам не влияет на реакцию изменения их формы в ответ на агонист: интенсивность светорассеяния на 12° скачкообразно увеличивается, что свидетельствует об ошаривании тромбоцитов. Эти эксперименты показывают, что метод малоуглового светорассеяния предоставляет дополнительные данные (например, об изменении формы тромбоцитов), которые недоступны в световой трансмиссионной агрегометрии и могут играть важную роль в дифференциальной диагностике.

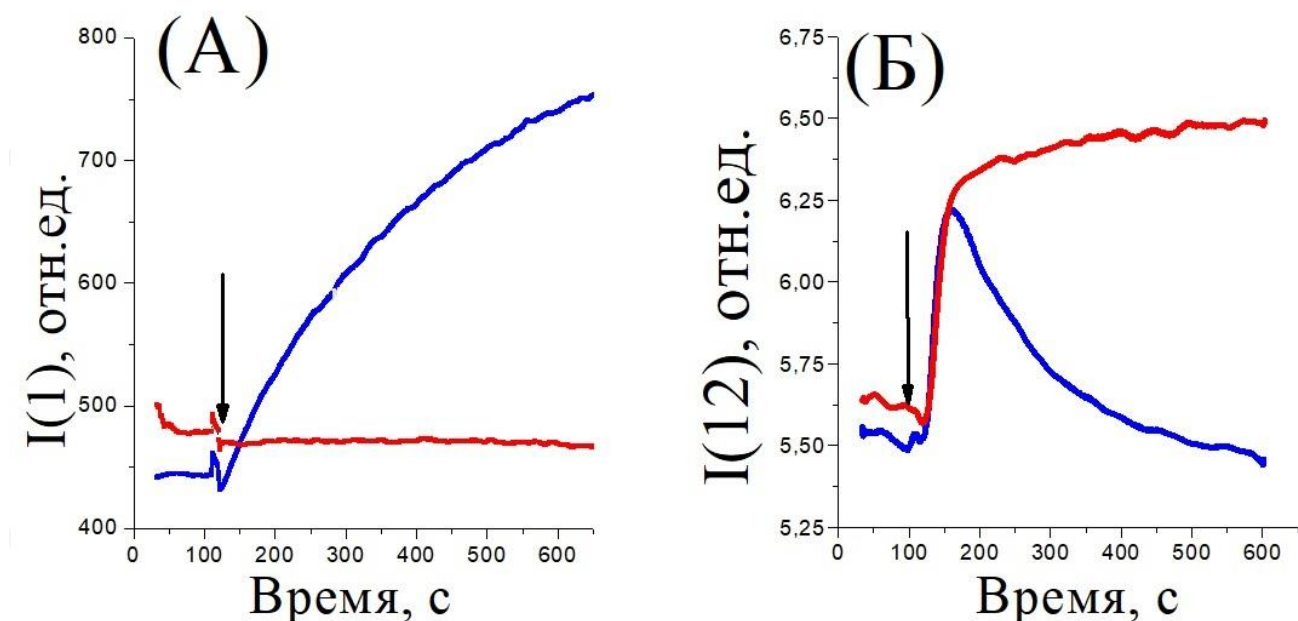


Рисунок 36. Монафрам, антагонист гликопротеина IIb/IIIa (красные кривые), полностью блокировал агрегацию тромбоцитов (А), но не влиял на изменение формы тромбоцитов (Б). БТП инкубировали с 5 мг/мл монафрама в течение 30 мин; синие кривые соответствуют контрольному образцу. Стрелкой показан момент добавления агониста, АДФ. Приведены оригинальные репрезентативные кривые.

3.2.9 Оценка агрегационной способности тромбоцитов при воздействии антиагрегантами методом малоуглового светорассеяния

Было проведено исследование влияния аспирина и/или тикагрелора *in vitro* на агрегацию и изменение формы тромбоцитов здоровых добровольцев при стимуляции АДФ с помощью метода малоуглового светорассеяния. Было показано, что аспирин (в концентрации 10 мкМ) не оказывает достоверно значимого влияния на параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов (рис. 37). Тикагрелор (в концентрации 7,5 мкМ) оказал антиагрегантное действие на агрегацию тромбоцитов, измеренную методом малоуглового светорассеяния: начальная скорость агрегации снижена в 1,7 раза в пробе, содержащей тикагрелор по сравнению с контрольным образцом ($0,46 \pm 0,22$ отн.ед./с. и $0,78 \pm 0,30$ отн.ед./с. соответственно); амплитуда агрегации значимо снижена в 7 раз в пробе, проинкубированной с тикагрелором по сравнению с контрольной пробой (70 ± 30 отн. ед. и 460 ± 140 отн.ед. соответственно, $p < 0,01$). Исследования *in vitro* показали

значимое снижение $\Delta I(1)$ в 3 раза в пробе, инкубированной со смесью тикагрелора с аспирином по сравнению с контрольной пробой (140 ± 140 отн.ед. и 460 ± 140 отн.ед. соответственно, $p < 0,01$). На рисунке 37 Б показано, что амплитуда агрегации снижена в пробах, содержащих тикагрелор, по сравнению с пробой, содержащей аспирин (500 ± 270 отн.ед.) Преинкубирование тромбоцитов с антиагрегантами не влияет на АДФ-индуцированное изменение формы тромбоцитов (рисунок 37 В).

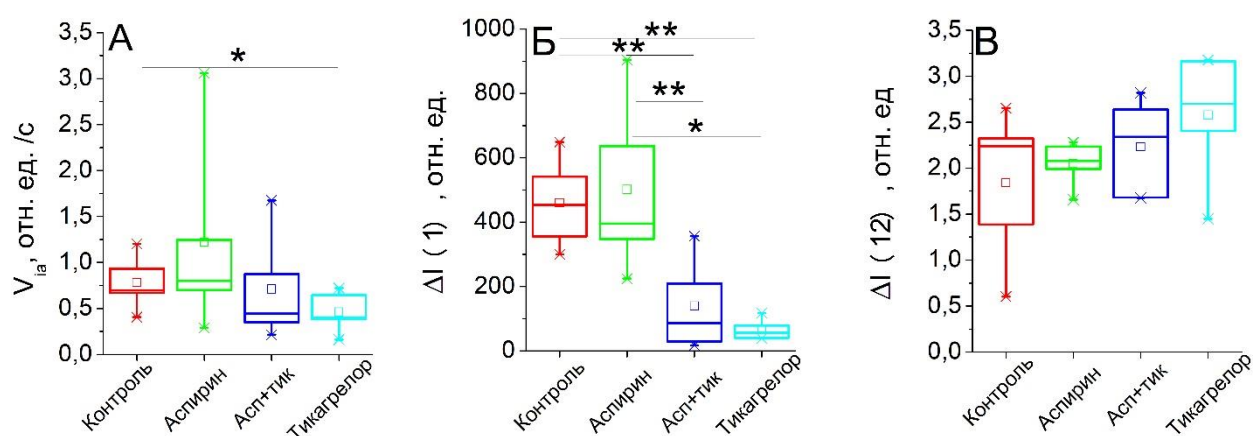


Рисунок 37. Исследование влияния аспирина и/или тикагрелора на параметры агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния при активации 800 нМ АДФ. А - Начальная скорость агрегации. Б - Амплитуда агрегации. В - Амплитуда изменения формы. Статистика как на рисунке 27.

Полученные результаты согласуются с представленными в статье [Mindukshev и др., 2012], в которой показано, что при преинкубировании тромбоцитов с ингибиторами рецепторов P2Y₁₂ начальная скорость АДФ-индуцируемой агрегации снижается по сравнению с контрольным образцом.

Результаты *in vitro* влияния аспирина и/или тикагрелора на агрегацию тромбоцитов при стимуляции коллагеном представлены на рисунке 38. Исследование коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов (инкубированных с аспирином и/или тикагрелором) здоровых добровольцев показало, что преинкубирование суспензии тромбоцитов с аспирином и/или тикагрелором не оказывает эффекта на начальную скорость, амплитуду агрегации

тромбоцитов и лаг-фазу (рис. 38 А, Б, Д соответственно). Данные результаты находятся в согласии с представленными в статье [Mindukshev и др., 2012], где продемонстрировано, что преинкубирование тромбоцитов с ингибитором рецептора P2Y₁₂ не влияет на максимальную скорость коллаген-индуцируемой агрегации. Амплитуда изменения формы тромбоцитов значимо снижена в пробах, содержащих тикагрелор по сравнению с контрольными (рис. 38 В). Время свертывания значимо снижено в пробе с аспирином по сравнению с контрольной пробой (990 ± 210 с и 1130 ± 170 с соответственно, $p < 0,05$, рис. 38 Г). Время свертывания достоверно значимо снижено при коллаген-индуцируемой агрегации в пробе со смесью аспирина и тикагрелора (910 ± 150 с и 1130 ± 170 с соответственно, $p < 0,01$).

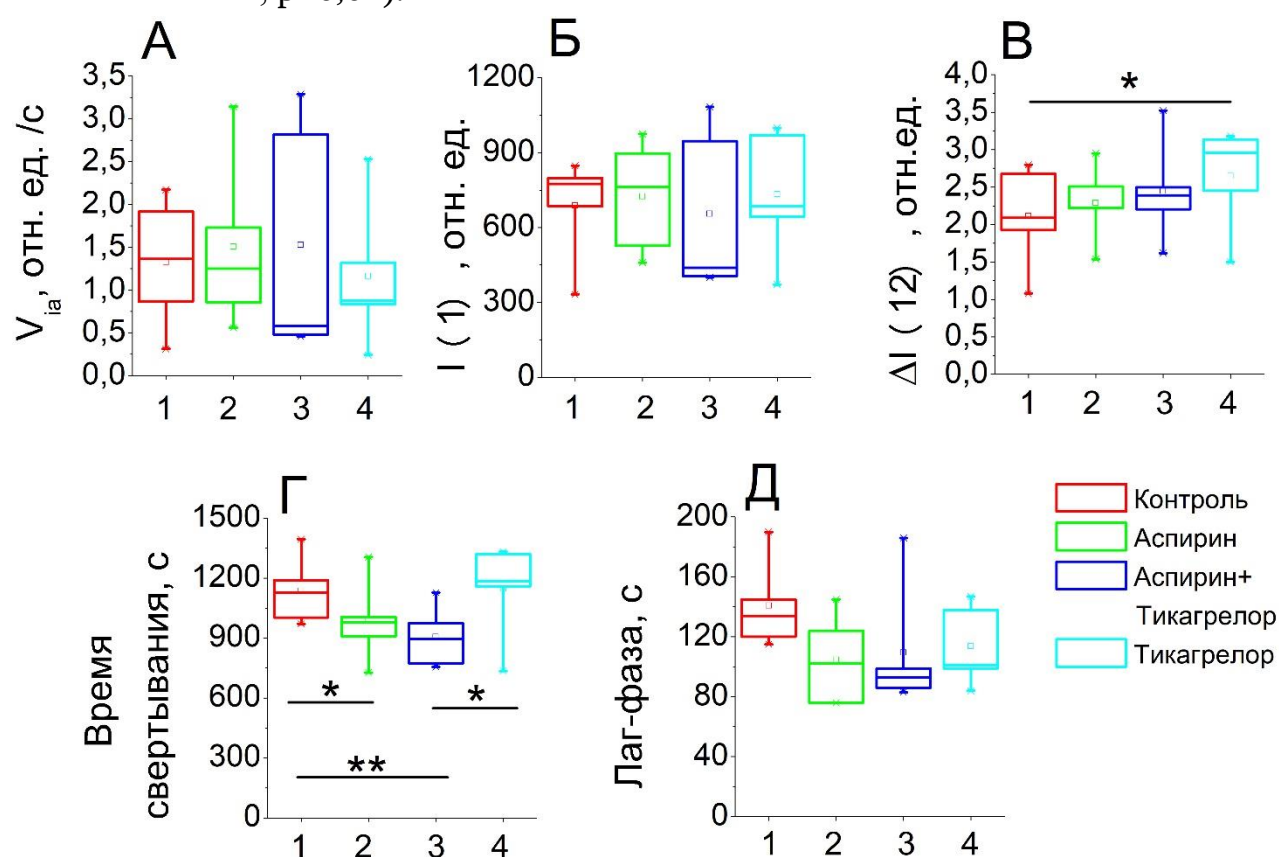


Рисунок 38. Исследование влияния аспирина и/или тикагрелора на параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния при активации 20 мкг/мл коллагена. А - Начальная скорость агрегации. Б - Амплитуда агрегации. В - Амплитуда изменения формы. Г - время свертывания, Д - лаг-фаза. Статистика как на рисунке 27

3.3 Оценка применимости метода малоуглового светорассеяния для использования в клинической практике

3.3.1 Определение референсных интервалов для групп здоровых взрослых и здоровых детей

Важной частью диагностики нарушений функции тромбоцитов остается определение нормальных референсных диапазонов для каждого теста. Североамериканское консенсусное руководство для медицинских лабораторий, выполняющих СТА, рекомендует на местном уровне установить нормальный диапазон максимального уровня агрегации для каждой концентрации агониста [Le Blanc и др., 2020].

Мы проанализировали параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов у здоровых взрослых и детей. Начальная скорость агрегации V_a составляла $1,4 \pm 0,5$ отн. ед./с для здоровых взрослых и $1,6 \pm 0,5$ отн. ед./с (среднее $\pm$ стандартное отклонение) для здоровых детей. Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ составила 720 ± 280 отн. ед. для здоровых взрослых и 700 ± 300 отн. ед. для здоровых детей; амплитуда изменения формы $\Delta I(12)$ составила $2,3 \pm 0,4$ отн.ед. для здоровых взрослых и $2,1 \pm 0,4$ отн.ед. для здоровых детей.

Используя критерий Манна-Уитни было получено, что параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов статистически не различаются для двух групп ($p > 0,05$). Как параметры агрегации, так и изменение формы тромбоцитов в группах взрослых и детей соответствовали распределению Гаусса (при доверительном интервале 95 % по критерию нормальности Колмогорова-Смирнова).

3.3.2 Апробация на пациенте с афибриногенемией

Для апробации метода малоуглового светорассеяния для диагностики тромбоцитарных дефектов была исследована пациентка с диагностированной афибриногенемией (наследственная коагулопатия, характеризующаяся дефицитом фибриногена [Amri и др., 2016]). На рис. 39 представлены графики зависимости интенсивности светорассеяния на 1° и 12° от времени, характеризующие агрегацию и изменение формы тромбоцитов у пациентки с афибриногенемией.

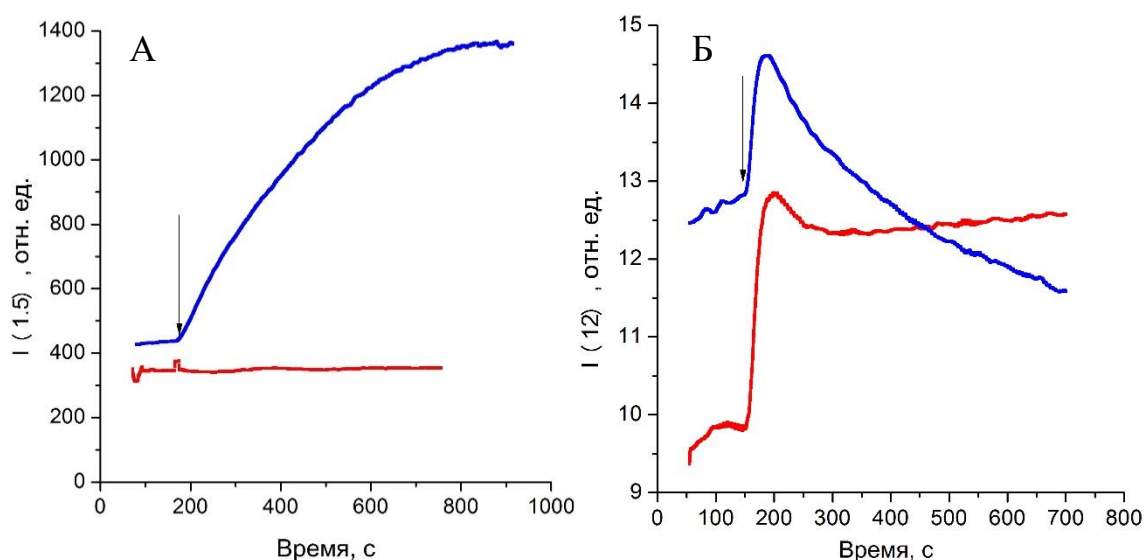


Рисунок 39. Характеристика тромбоцитов больной афибриногенемией методом малоуглового светорассеяния. Показаны оригинальные кривые светорассеяния на 1° (А) и 12° (Б). Стрелкой указан момент добавления АДФ (концентрация 800 нМ). Красные кривые показывают динамику светорассеяния в отсутствие фибриногена, синие кривые – при добавлении в кювету 180 мкг/мл фибриногена.

У пациентки с афибриногенемией АДФ в концентрации 800 нМ не индуцирует агрегацию тромбоцитов, однако инициирует изменение их формы (красные кривые, рис. 39 А и Б соответственно). Результаты по агрегации тромбоцитов в ответ на стимуляцию аденозиндифосфатом находятся в согласии с результатами, полученными методом СТА (0 % агрегации с 5 мкМ АДФ).

Чтобы инициировать агрегацию тромбоцитов у данного пациента *in vitro*, через 2 минуты после добавления богатой тромбоцитами плазмы пациента в кювету был добавлен фибриноген в концентрации 180 мкг/мл. Методом малоуглового светорассеяния было обнаружено, что после добавления фибриногена тромбоциты начали агрегировать (синяя кривая, рис. 39А).

3.3.3 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с тромбастенией Гланцмана

Было исследовано три пациента женского пола в возрасте от 6 до 7 лет с диагностированной тромбастенией Гланцмана (наследственная тромбоцитопатия, характеризующаяся дефицитом или нарушением функции рецептора к

фибриногену гликопротеина IIb/IIIa [Литвицкий, 2014]). Результаты исследований представлены на рис. 40. При добавлении 800 нМ АДФ агрегации тромбоцитов не наблюдали: начальная скорость и амплитуда агрегации равны 0 отн.ед./с и 0 отн. ед. соответственно. При этом изменение формы тромбоцитов при стимуляции АДФ у больных ТГ было таким же, как и в контрольной группе. Данный результат может быть обоснован тем, что дефицит рецептора гликопротеина IIb/IIIa к фибриногену приводит к отсутствию агрегации тромбоцитов в ответ на АДФ.

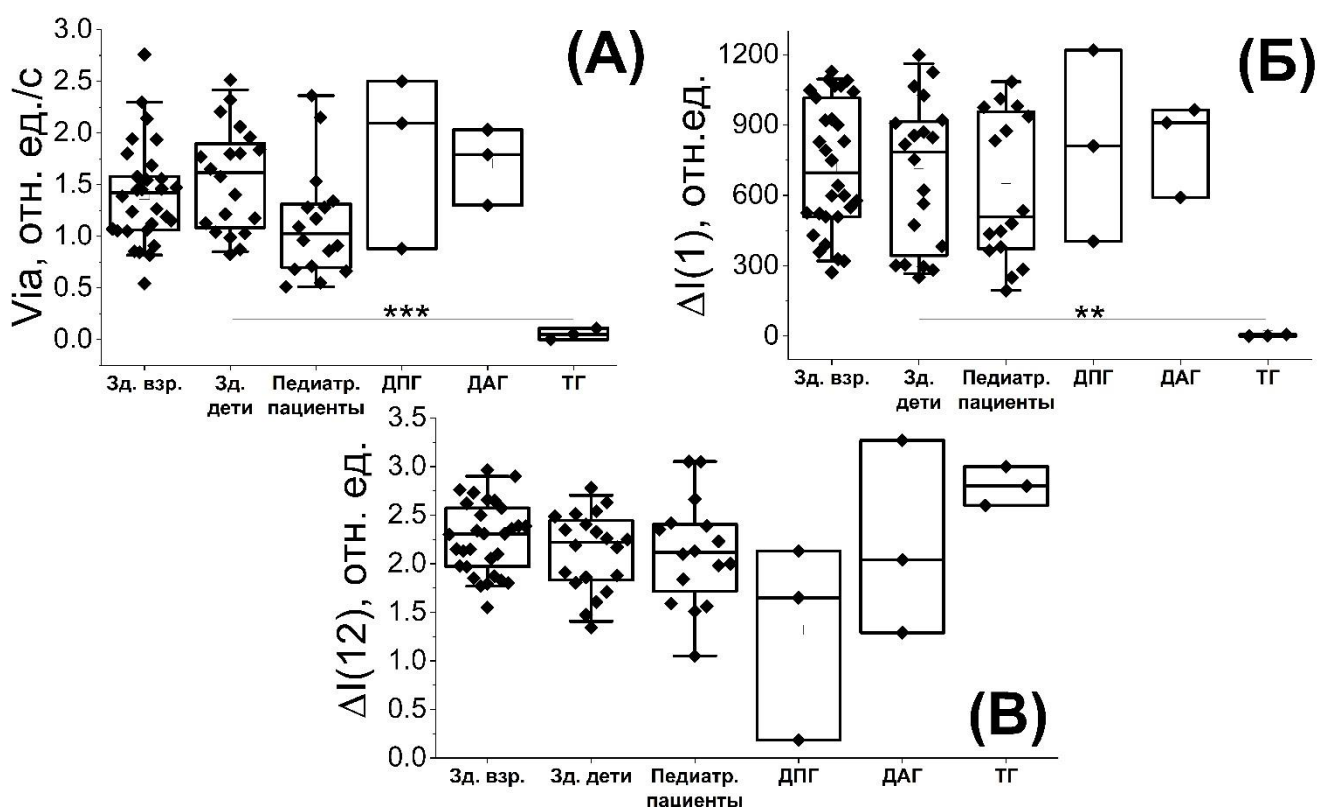


Рисунок 40. Сравнение параметров АДФ-индуцированной агрегации и изменения формы тромбоцитов у здоровых взрослых (Зд. взр., $n = 30$), здоровых детей (Зд. дети, $n = 20$), пациентов детского возраста с геморрагическим синдромом (педиатр. пациенты, $n = 16$), пациентов детского возраста с дефицитом плотных гранул (ДПГ, $n=3$), пациентов с дефицитом альфа гранул (ДАГ, $n=3$), педиатрические пациентов с тромбоастенией Гланцмана (ТГ, $n=3$). Начальная скорость агрегации тромбоцитов (А), амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ (Б) и изменение формы $\Delta I(12)$ (В) для всех групп пациентов, за исключением группы пациентов с ТГ, не отличались от контрольных групп. Статистика такая же, как на рисунке 27. Для сравнения средних между группами данных использовался метод ANOVA.

Данные результаты находятся в согласии с результатами метода СТА, которые приведены в таблице 11.

Таблица 11. Параметры световой трансмиссионной агрегометрии для пациентов с тромбастенией Гланцмана

				Световая трансмиссионная агрегометрия				
Номер пациента	Возраст, лет	Пол	Тромбоц иты, 10^9/л	Агрегация с АДФ (5 мкМ), %	Агрегация с адреналино м, %	Агрегация с коллагеном (2 мг/мл); %	Агрегация с ристоцетином (15 мг/мл), %	Агрегация с TRAP, %
Референсный диапазон								
			204-356	25-65	50-85	50-80	55-90	50-100
1	6	ж	344	0	6	29	6	18
2	7	ж	239	0	0	5	56	НР
3	6	ж	НР	Снижена	НР	Снижена	Снижена	НР

У пациентов с тромбастенией Гланцмана значительно снижена или отсутствует агрегация тромбоцитов с АДФ.

Анализ методом проточной цитометрии выявил значительное снижение или полное отсутствие суммарной фракции рецептора Pb/IIIa на поверхности тромбоцитов у пациентов с тромбастенией Гланцмана. Связывание PAC-1 в активированных тромбоцитах (отражает уровень активации рецептора Pb/IIIa) отсутствует или значительно снижено (Таблица 12).

Таблица 12. Параметры проточной цитометрии для пациентов с тромбастенией Гланцмана

				Проточная цитометрия			
Номер пациента	Возраст, лет	Пол	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	Антиген CD61 в покоящ. тромбоцитах, %	Антиген CD61 в актив. тромбоцитах, %	Связывание РАС1 в покоящихся тромбоцитах, %	Связывание РАС-1 в актив.тромб оцитах, %
Референсный диапазон							
			204-356	66-127	186-316	< 5,5	30-136
1	6	ж	344	25	52	3,9	11
2	7	ж	239	0	6	4	6
3	6	ж	НР	0	0	0	0

3.3.4 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с дефицитом гранул

Мы проанализировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов с использованием метода малоуглового светорассеяния у пациентов с дефицитом плотных или альфа гранул (рис. 36). Различий по V_{ia} , $\Delta I(1)$ и $\Delta I(12)$ между пациентами с дефицитом гранул и здоровыми детьми выявлено не было.

Данные по СТА у пациентов дефицитом плотных гранул и с дефицитом α -гранул тромбоцитов представлены в Таблице 13.

Таблица 13. Параметры световой трансмиссионной агрегометрии для пациентов с дефицитами пула хранения

Световая трансмиссионная агрегометрия							
Номер пациента	Возраст, лет	Пол	Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	Агрегация с АДФ (5 мкМ), %	Агрегация с адреналином, %	Агрегация с коллагеном (2 мг/мл); %	Агрегация с TRAP, %
Референсный диапазон							
			204-356	25-65	50-85	50-80	50-100
Дефицит плотных гранул							
1	5	м	275	41	14	70	66
2	3	ж	159	НР	НР	18	57
3	11 месяцев	м	254	67	15	95	НР
Дефицит альфа гранул							
1	41	м	100	4*	5	57	47*
2	72	м	111	4*	5	59	55
3	7	ж	154	24*	11	73	58*

Примечание: НР- нет результатов.

Обнаружено, что среди трех пациентов с дефицитом плотных гранул у одного повышена агрегация с АДФ, у двух снижена агрегация с адреналином. У пациента 2 агрегация с коллагеном понижена, а у пациента 3 повышена. Агрегация с TRAP у обследованных пациентов в этой когорте находится в референсном диапазоне.

Выявлено, что у всех трех пациентов с дефицитом альфа гранул тромбоцитов, агрегация с АДФ и с адреналином снижена относительно референсного интервала, агрегация с коллагеном не отклоняется от референсного интервала. У одного пациента из трех СТА с TRAP ниже нижней границы референсного интервала на 6%.

Световая трансмиссионная агрегометрия и метод малоуглового светорассеяния продемонстрировали хорошее согласие при оценке агрегации тромбоцитов у пациентов с ДПГ: отклонений в амплитуде АДФ-индуцированной агрегации не выявлено (Таблица 4). Однако результаты, полученные двумя методами для когорты пациентов с дефицитом альфа гранул, оказались противоречивыми: методом оптической агрегометрии выявлено снижение агрегации и дезагрегация тромбоцитов, тогда как результаты исследований, полученные методом малоуглового светорассеяния, не отклонялись от значений контрольной группы.

В таблице 14 приведены результаты исследования функциональной активности тромбоцитов у пациентов с дефицитами плотных или альфа- гранул методом проточной цитометрии.

Таблица 14. Параметры проточной цитометрии для пациентов с дефицитами пула хранения

Проточная цитометрия					
Номер пациента	Флуоресценция мепакрина в поющих тромбоцитах, %	Флуоресценция мепакрина в активированных тромбоцитах, %	Индексы активации	Объем секреции плотных гранул, %	Уровень CD62p в активированных тромбоцитах, %
Референсный диапазон					
	Взрослые: 73-127; Дети: 51-107	Взрослые: 14-34; Дети: 9-42	Взрослые: 2,6-5,9; Дети: 1,7-4,9	Взрослые: 50-100; Дети: 25-84	Взрослые: 72-128; Дети: 56-116
Дефицит плотных гранул					
1	51	22	2,4	30	93
2	26	17	1,6	9	119
3	31	24	1,3	7	105
Дефицит альфа гранул					
1	88	43	2,1	45	49
2	92	41	2,2	51	50
3	79	35	2,2	44	52

В когорте пациентов с дефицитом плотных гранул флуоресценция мепакрина в поющих тромбocyтах значительно ниже референсного интервала или находится на нижней границе референсного интервала. Объем секреции плотных гранул у двух пациентов с этим диагнозом значительно снижен в сравнении с нижней границей референсного интервала.

У пациентов с дефицитом альфа гранул тромбоцитов уровень CD62p в активированных тромбоцитах ниже референсного интервала, что свидетельствует о сниженном уровне Р-селектина альфа-гранул.

Было проведено исследование коллаген-индуцированной агрегации у двух пациентов с диагностированным синдромом Германского-Пудлака (выраженным дефицитом плотных гранул). По результатам проточной цитометрии у обоих пациентов обнаружен выраженный дефицит плотных гранул - 20% от нормы. На рис. 41 представлены данные коллаген-индуцированной агрегации пациента с синдромом Германского-Пудлака в сравнении со здоровым донором.

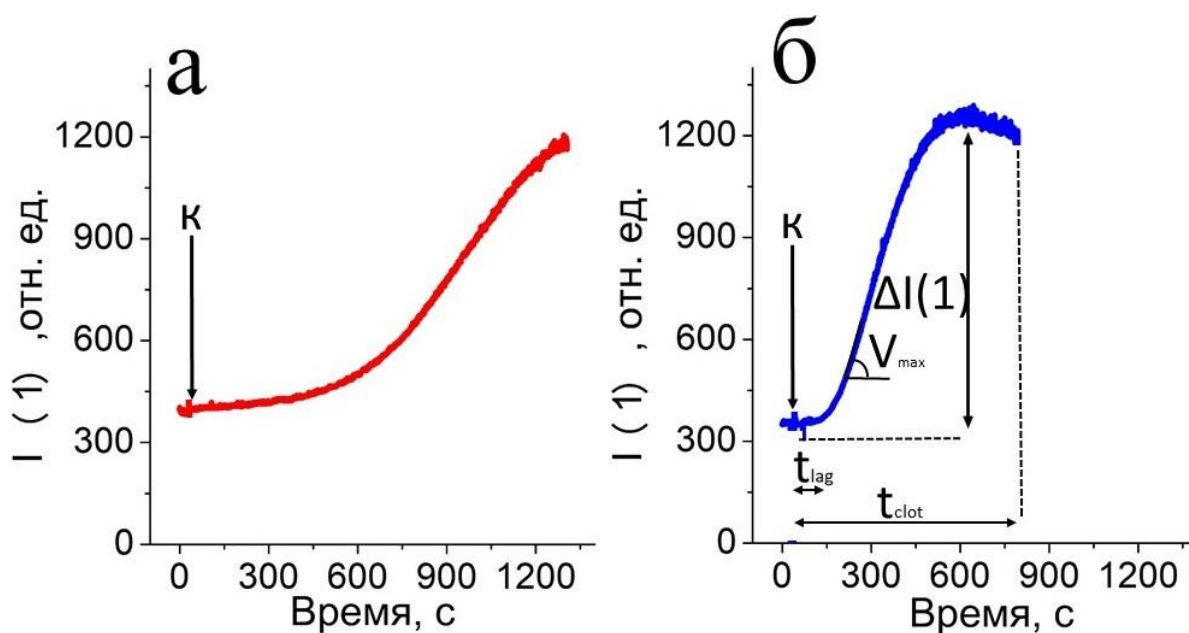


Рисунок 41. Оригинальные кривые интенсивности светорассеяния (сглаживание по 10 точкам), полученные методом малоуглового светорассеяния, для коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов пациента с синдромом Германского-Пудлака (а) в сравнении со здоровым донором (б). Характерные кривые для пациентов с синдромом Германского-Пудлака отличаются от характерных кривых

здоровых добровольцев: увеличены лаг фаза t_{lag} и время свертывания t_{clot} , а также снижена скорость агрегации V_{max} . Стрелкой обозначен момент добавления агониста к- коллагена в концентрации 0,4 мг/мл

Было обнаружено удлинение лаг-фазы у пациента с синдромом Германского-Пудлака в сравнении со здоровым донором, а также наблюдалось снижение скорости и амплитуды агрегации. В табл. 15 приведены параметры агрегации тромбоцитов пациентов с синдромом Германского-Пудлака и здоровых доноров ($n=20$).

Таблица 15. Параметры коллаген-индуцированной агрегации для пациентов с синдромом Германского-Пудлака и здоровых добровольцев

	V_{max} , отн. ед/сек	$\Delta I(1)$, отн. ед	$\Delta I(12)$, отн. ед	Лаг фаза, с	Время свертывания, с
Здоровый доброволец, Среднее $\pm$ стандартное отклонение	2 $\pm$ 1	870 $\pm$ 161	1,6 $\pm$ 1	161 $\pm$ 67	847 $\pm$ 127
Пациент с синдромом Германского Пудлака, девочка	0,9	788	1,75	273	1265
Пациент с синдромом Германского Пудлака, мальчик	0,6	603	2,25	400	1500

Результаты СТА при исследовании пациентов с дефицитом плотных гранул тромбоцитов могут варьировать от недиагностических до свидетельствующих о многочисленных отклонениях, особенно при использовании слабых агонистов [Bourguignon, Tasneem, Hayward, 2022]. В настоящем исследовании метод световой трансмиссионной агрегометрии не выявил отклонений в коллаген-индуцированной

агрегации тромбоцитов у двух обследованных пациентов с синдромом Германского-Пудлака (58% у мальчика и 67% у девочки, референсный интервал 50-80%). В то же время исследование агрегации тромбоцитов с помощью метода малоуглового светорассеяния выявило отклонения в параметрах коллаген-индуцированной агрегации у этих пациентов. Однако небольшая когорта пациентов является ограничением в этом исследовании.

3.3.5 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с геморрагическим синдромом

В ходе исследования были проанализированы параметры агрегации у педиатрических пациентов с геморрагическим синдромом. Параметры СТА для педиатрических пациентов с геморрагическим синдромом отображены в Таблице 16. У пятнадцати из шестнадцати пациентов с геморрагическим синдромом СТА тромбоцитов с АДФ находится в пределах референсного интервала, который при этом не является возраст-зависимым. У четырнадцати из шестнадцати пациентов СТА с коллагеном находится в референсном интервале.

Таблица 16. Параметры световой трансмиссионной агрегометрии для пациентов с геморрагическим синдромом

Номер пациента	Возраст, лет	Пол	Тромбоциты, 10^9/L	Световая трансмиссионная агрегометрия				
				Агрегация с АДФ (5 мкМ), %	Агрегация с адреналином, %	Агрегация с коллагеном (2 мг/мл); %	Агрегация с ристоцетином (15 мг/мл), %	Агрегация с TRAP, %
				Референсный диапазон				
			204-356	25-65	50-85	50-80	55-90	50-100
1	4	м	НР	31	НР	68	НР	62
2	8	м	266	60	68	75	82	80
3	13	м	270	67	73	8	74	73
4	11	м	240	58	66	75	85	71
5	6	м	НР	61	68	78	82	75
6	9	м	326	51	57	71	62	69
7	6	м	НР	54*	79	75	87	58
8	3	ж	341	65	70	69	77	73
9	13	м	141	55	68	74	83	67
10	10	м	НР	56	21	79	86	НР
11	5	ж	353	63	75	83	92	82
12	4	ж	461	65	70	78	84	77
13	5	м	275	41	14	70	75	66
14	16	ж	133	43	32*	74	85	34*
15	6	ж	467	42	9	74	82	73
16	15	м	НР	61	69	77	НР	71

Примечание: НР-нет результатов, * – дезагрегация.

Методом малоуглового светорассеяния были оценены начальная скорость агрегации V_{ia} , амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ и амплитуда изменения формы $\Delta I(12)$ в группе детей с геморрагическим синдромом. В группе педиатрических пациентов параметры V_{ia} , $\Delta I(1)$ и $\Delta I(12)$ не изменены относительно когорты здоровых детей (рис. 40).

3.3.6 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии методом малоуглового светорассеяния

Для оценки практической значимости метода в клинической практике, а также в исследовательских целях была поставлена задача об исследовании когорты пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Было проведено исследование

агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с ОКС на ДАТТ в течении полугода наблюдения. На рисунке 42 представлено распределение параметров АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов измеренной методом малоуглового светорассеяния у пациентов с ОКС на ДАТТ в динамике. Агрегацию тромбоцитов исследовали методом малоуглового светорассеяния в 5 временных точках: день 0 (нагрузочная доза аспирина), день 1 (нагрузочная доза прасугрела/тикагрелора), а также на 7-й, 30-й и 180-й дни терапии поддерживающей дозой. Выяснили, что V_{ia} значительно снижена на 40% в первый день исследования по сравнению с нулевым днем измерений. Начальная скорость агрегации составила $1,0 \pm 0,7$ (среднее $\pm$ среднекв. откл.) отн. ед./с в 0-ой день и $0,6 \pm 0,5$ отн. ед./с на 1-ый день измерений (рис. 42А). Было получено, что амплитуда АДФ – индуцированной агрегации снижена в три раза в первый день (130 ± 180 отн. ед., среднее $\pm$ среднеквадратичное отклонение) по сравнению с нулевым днем (410 ± 250 отн. ед.) и оставалась на том же уровне в течение полугода ($p < 0,05$) (рисунок 42 Б). Изменение формы при активации тромбоцитов АДФ значительно не изменяется в течении полугода наблюдения ($p > 0,05$) (рисунок 42 В). Полученные данные находятся в соответствии с результатами, описанными [Mindukshev и др., 2012]: в этой статье было показано, что через 24 часа после приема клопидогреля (в дозе 600 мг) здоровым добровольцем агрегация в ответ на АДФ снижается.

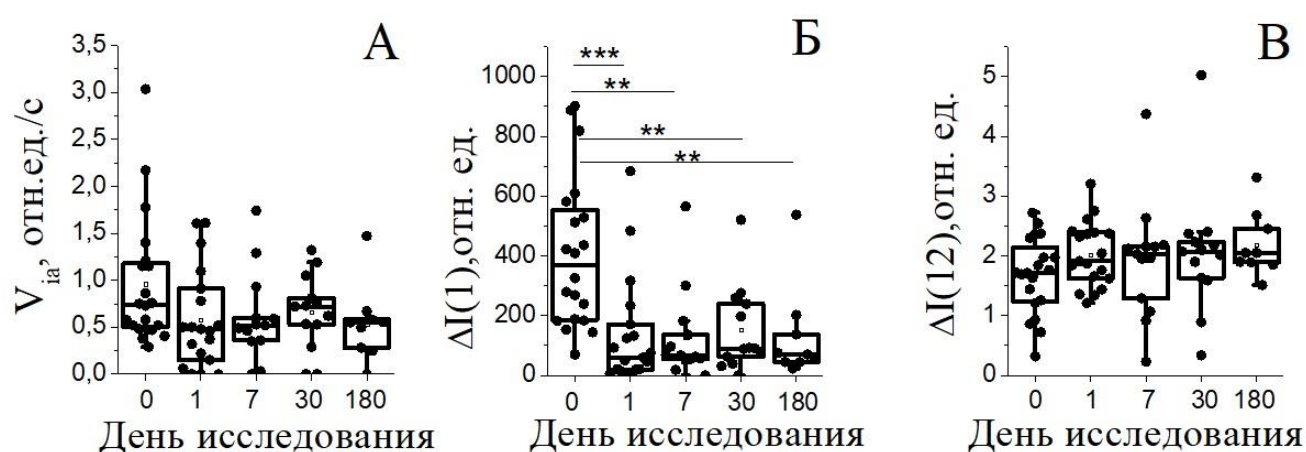


Рисунок 42. Зависимость параметров АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов измеренной методом малоуглового светорассеяния у пациентов с ОКС на ДАТТ от времени. А – Начальная скорость агрегации тромбоцитов значительно

не изменяется в течении полугода наблюдения. Б – Амплитуда АДФ-индуцированной агрегации значимо снижается от 0 дня исследования к 30-му. В – Изменение формы тромбоцитов не зависит от продолжительности приема ДАТТ. Статистика как на рис. 27. Уровень значимости * введен для $p < 0,05$.

На рисунке 43 представлена зависимость параметров коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов с течением времени. Начальная скорость агрегации (рис. 43 А) тромбоцитов, амплитуда агрегации (рис. 43 Б), изменение 8 формы (рис. 43 В), время свертывания (рис. 43 Г), а также лаг-фаза (рис. 43 Д) значимо не изменяется в течении полугода наблюдения пациентов после ОКС.

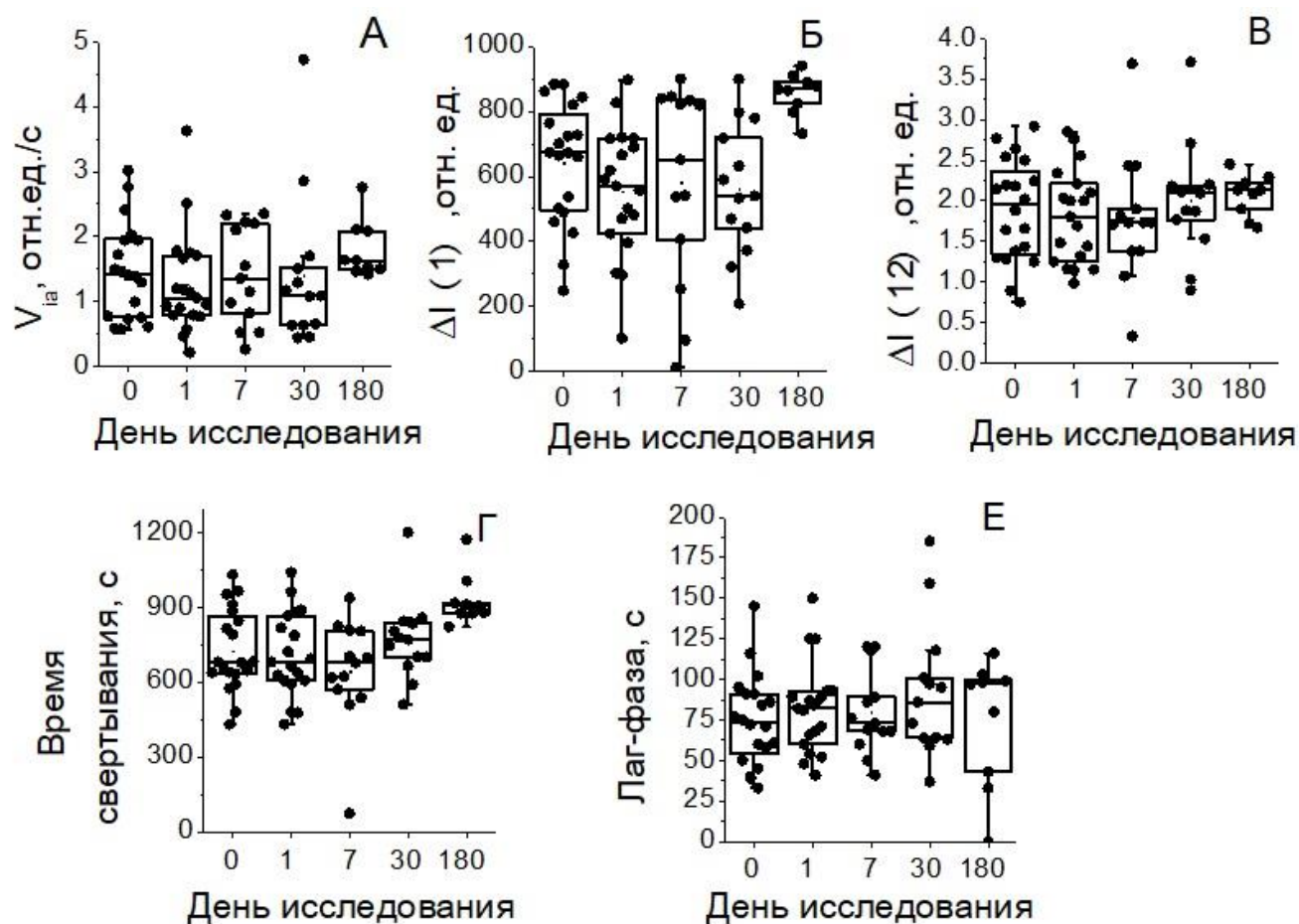


Рисунок 43. Зависимость параметров коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов измеренной методом малоуглового светорассеяния у пациентов с ОКС на ДАТТ от времени. Начальная скорость агрегации (А) тромбоцитов, амплитуда агрегации (Б), изменения формы (В), время свертывания (Г), а также лаг-фаза (Д) стабильны в течении полугода наблюдения пациентов после ОКС.

Статистика как на рис. 27. На уровне значимости 0,05 все параметры существенно не изменяются.

3.3.7 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/синдромом Казабаха-Меритт методом малоуглового светорассеяния

Было обследовано 13 пациентов с КГЭ — редкой сосудистой опухолью с тромбоцитопенией и коагуляционной дисфункцией. Средний возраст вовлеченных в исследование составил 10 месяцев; среднее количество тромбоцитов – 170 (минимум 6; максимум 380) тысяч/мкл. В виду того, что пациентам у которых количество тромбоцитов не находится в референсном интервале не рекомендуется выполнение теста агрегометрии по Борну [Cattaneo и др., 2013], была поставлена задача об исследовании агрегации тромбоцитов методом лазерной малоугловой дифракции света в исследовательских целях. Не было обнаружено существенных различий в начальных скоростях агрегации тромбоцитов при стимуляции АДФ или коллагеном между здоровыми донорами и пациентами с капошиформной гемангиоэндотелиомой (КГЭ)/синдромом Казабаха-Меритт (СКМ) (рис. 44). Однако у нескольких пациентов с КГЭ/СКМ наблюдалось серьезное нарушение агрегации тромбоцитов, вызванной коллагеном.

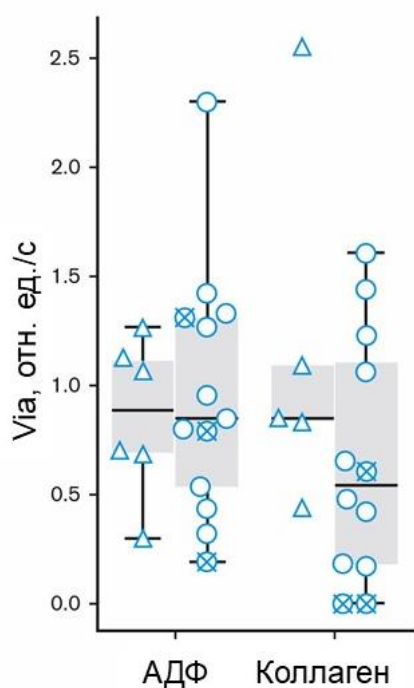


Рисунок 44. Начальные скорости агрегации тромбоцитов, индуцированные 800 нМ АДФ или 20 мкг/мл коллагена. Анализ тромбоцитов в образцах крови здоровых детей (треугольники) и больных КГЭ/СКМ с (кружки) или без (крестики) гематологического ответа на терапию. Статистическую значимость рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни; * $p < 0,05$.

3.3.8 Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов онкогематологического профиля методом малоуглового светорассеяния

Методом лазерной малоугловой дифракции была оценена агрегация тромбоцитов у семи пациентов, находящихся на химиотерапии. Выявлено, что у половины пациентов наблюдалось снижение начальной скорости и амплитуды агрегации тромбоцитов (рис. 45, а, б, пациенты 3, 4, 5). С другой стороны, изменение формы у тромбоцитов доноров 2 и 3 не было нарушено, а у пациента 4 было даже повышено (рис. 45, в), в то время как наблюдалось сниженное изменение формы тромбоцитов у пациентов 1, 5, 6, 7. Проточная цитометрия тромбоцитов выявила сниженный уровень активации интегрина $\alpha\text{IIb}\beta$ в когорте пациентов на химиотерапии в первый день исследования по сравнению с контрольной группой.

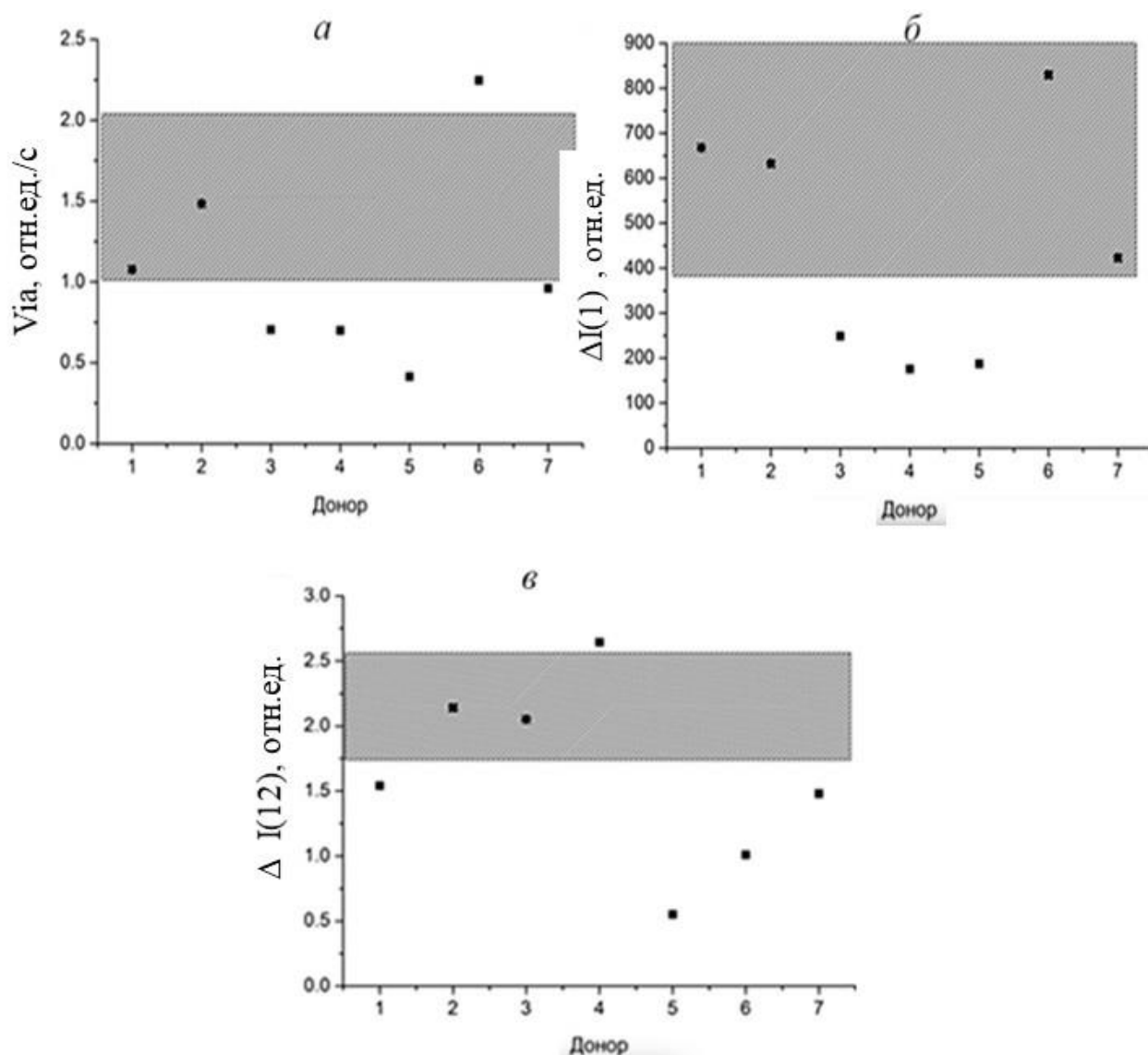


Рисунок 45. Исследование агрегационного ответа тромбоцитов пациентов методом малоуглового светорассеяния. А – Начальная скорость формирования диагрегатов была снижена (или на нижней границе нормы) для всех пациентов, кроме пациентов 2 и 6, у которых, наоборот, наблюдалось повышение начальной скорости формирования диагрегатов тромбоцитов; Б – амплитуда агрегации была снижена у пациентов 3, 4, 5, а также находилась на нижней границе нормы для пациента 7; В – изменение формы тромбоцитов пациентов было снижено у всех пациентов, кроме пациентов 2, 3, 4. Серым фоном обозначены границы референсных интервалов для здоровых доноров

Таким образом, в настоящем исследовании мы показываем, что способность тромбоцитов у некоторых пациентов на химиотерапии образовывать агрегаты и активировать интегрины заметно снижена по сравнению со здоровыми донорами.

3.4 Сопоставление параметров агрегации тромбоцитов, измеренных методом малоуглового светорассеяния с маркерами активации тромбоцитов, исследованными методами проточной цитометрии, а также с параметрами оптической агрегометрии по Борну

3.4.1 Корреляция параметров агрегации тромбоцитов, измеренных методом малоуглового светорассеяния с маркерами активации тромбоцитов, исследованными методами проточной цитометрией

Для улучшения понимания функции тромбоцитов, оценки клинической значимости результатов, полученных с помощью различных методов, и разработки новых диагностических стратегий может быть полезно определение корреляции между параметрами проточной цитометрии тромбоцитов и метода малоуглового светорассеяния для оценки агрегации тромбоцитов.

Поскольку уровень связывания PAC-1 отражает активацию интегрина $\alpha 2b\beta 3$ (рецептора на поверхности тромбоцита, который напрямую опосредуют их агрегацию) ожидали, что корреляция между показателями агрегации и маркером активации гликопротеина IIb/IIIa будет высокой. Также предполагалось наличие сильной корреляции между уровнем экспрессии CD62p и агрегационной активностью тромбоцитов. Это связано с тем, что активация тромбоцитов

сопровождается изменениями, ведущими к усилению их способности к агрегации. Тем не менее, допускали, что степень корреляции может варьироваться в зависимости от условий исследований, агонистов, наличия/отсутствия патологии и методики измерения.

Мы провели корреляционный анализ маркеров активации тромбоцитов (CD62p – экспрессия Р-селектина и PAC-1 – активированная форма гликопротеина IIb/IIIa) после слабой (АДФ) и сильной (смесь CRP+SFLLRN) стимуляции, измеренной методом проточной цитометрии, и агрегации тромбоцитов с АДФ, измеренной методом малоуглового светорассеяния. Корреляция начальной скорости агрегации V_{ia} и связывания PAC-1 была высокой как для активации, индуцированной CRP + SFLLRN (рис.46 А), так и для активации, индуцированной АДФ (рис. 46 Г), у здоровых взрослых. Корреляция начальной скорости агрегации V_{ia} и связывания PAC-1 отсутствовала как для активации, индуцированной CRP + SFLLRN (рис. 42 Б), так и для активации, индуцированной АДФ (рис. 46 Д), у здоровых детей. Очень слабо коррелировали эти же параметры, измеренные в группе педиатрических пациентов с геморрагическим синдромом (рис. 46 В).

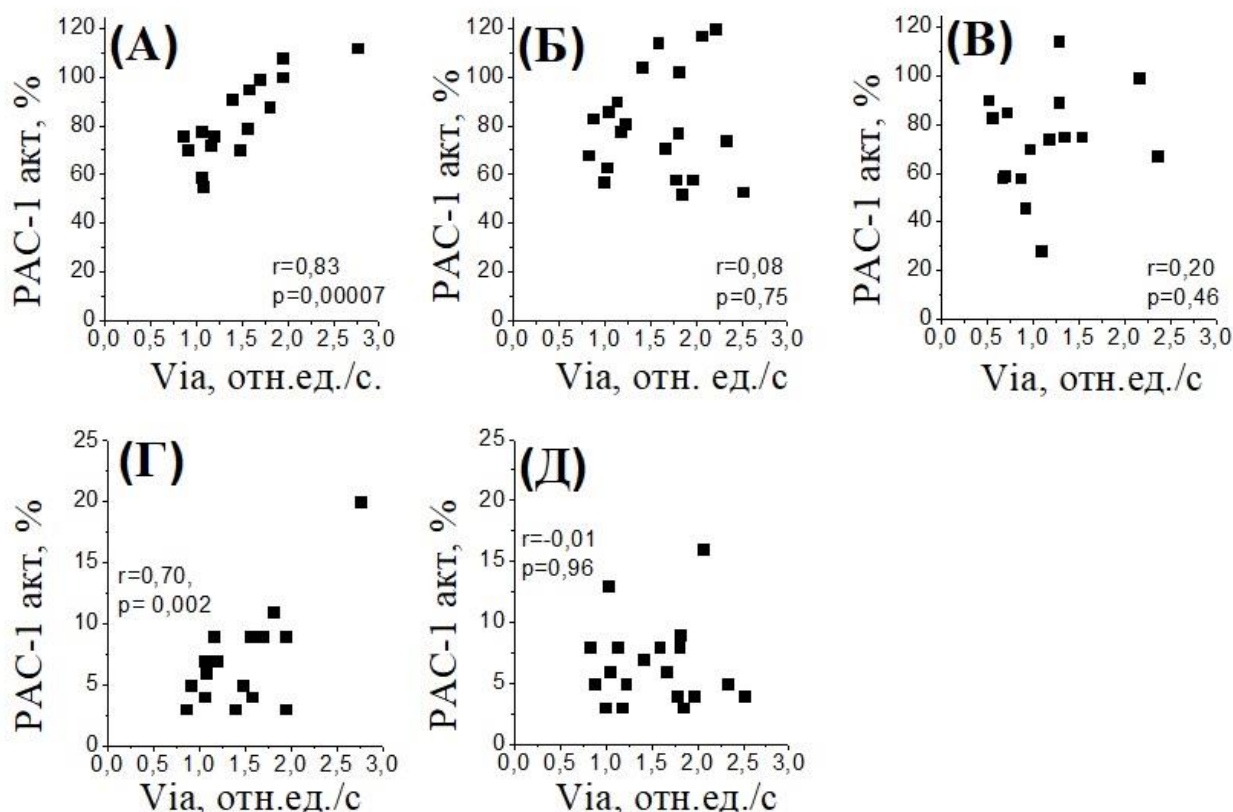


Рисунок 46. Корреляция между начальной скоростью агрегации (V_{ia}) и маркером активации гликопротеина IIb/IIIa (связывание PAC-1) в группе здоровых взрослых (А, Г), здоровых детей (Б, Д) и педиатрических пациентов (В). Типы активации тромбоцитов, используемые для проточной цитометрии, включали: смесь коллаген-родственного пептида (CRP) и активирующего PAR-1 пептида SFLLRN (А, Б, В); АДФ (Г, Д).

Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ слабо коррелировала со связыванием PAC-1 как после сильной, так и после слабой стимуляции (рис. 47 А, 47 Г) у здоровых взрослых. Эти же параметры очень слабо коррелировали между собой в группах здоровых детей и педиатрических пациентов с геморрагическим синдромом (рис. 47 Б, В, Д) вне зависимости от типа активатора.

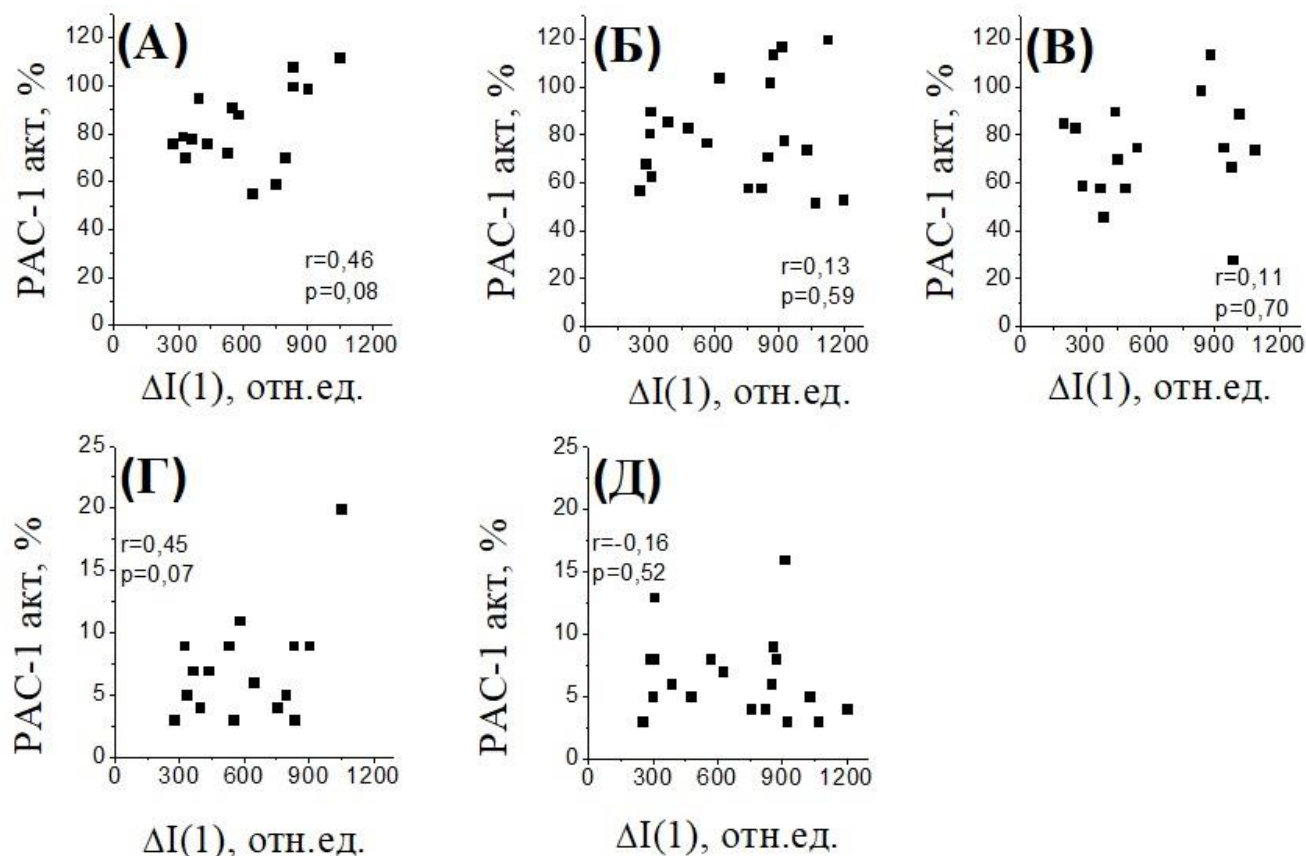


Рисунок 47. Корреляция между амплитудой агрегации $\Delta I(1)$ и маркером активации гликопротеина IIb/IIIa (связывание РАС-1) в группе здоровых взрослых (А, Г), здоровых детей (Б, Д) и педиатрических пациентов (В). Типы активации тромбоцитов, используемые для проточной цитометрии, включали: смесь CRP и SFLLRN (А, Б, В); АДФ (Г, Д).

Корреляции экспрессии V_{ia} , $\Delta I(1)$ и уровня Р-селектина были высокими только при сильной стимуляции тромбоцитов здоровых взрослых (рис. 48 А, Г, 49 А, Г). Отсутствует связь между V_{ia} , $\Delta I(1)$ и уровнем Р-селектина у здоровых детей (рис. 48 Б, 49 Б) при активации SFLLRN. Выявлена слабая положительная корреляция между начальной скоростью агрегации, амплитудой агрегации и уровнем Р-селектина альфа гранул тромбоцитов (рис 48 Д, 49 Д). Обнаружена высокая достоверная корреляция V_{ia} и CD62p в когорте педиатрических пациентов при активации тромбоцитов SFLLRN (рис. 48 В).

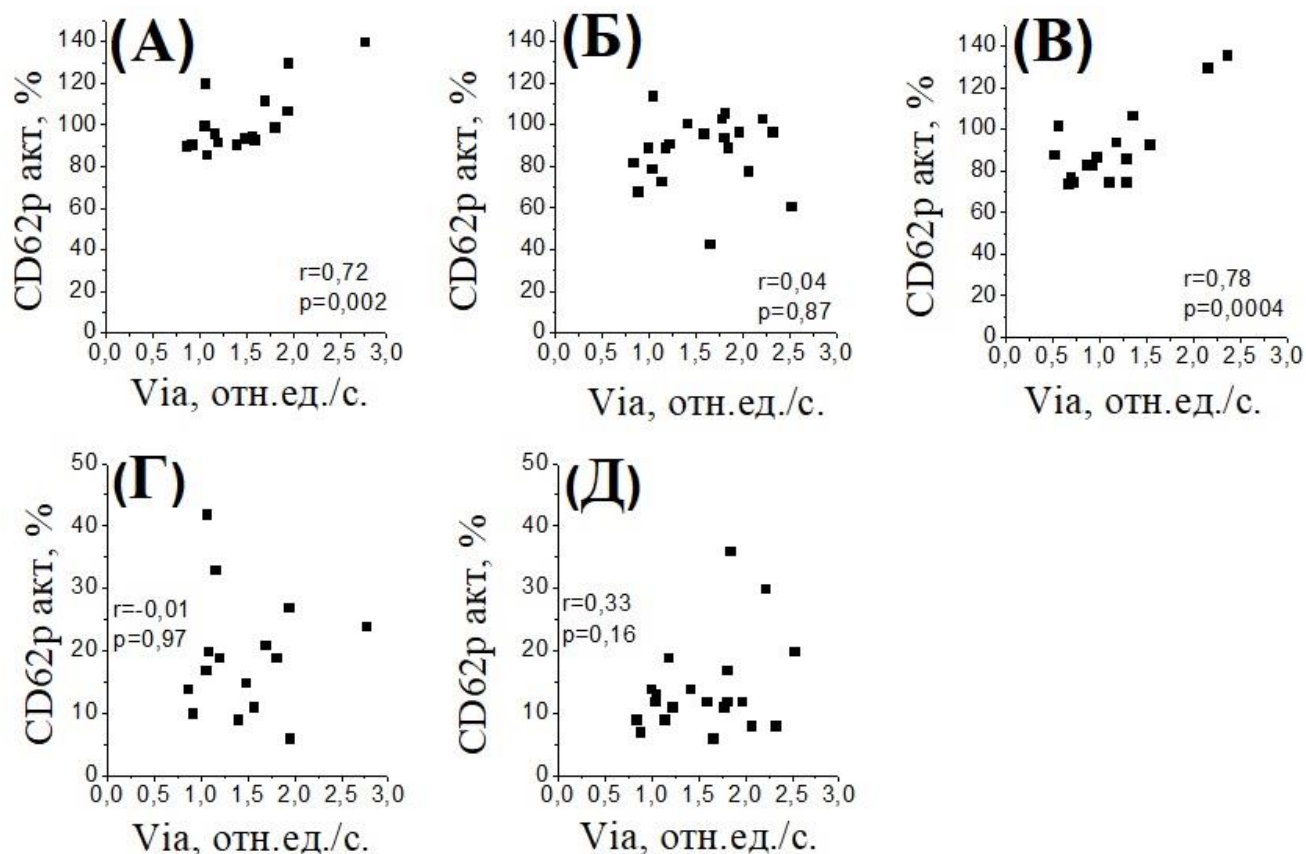


Рисунок 48. Корреляция между начальной скоростью агрегации (Via, отн.ед./с) и маркером экспрессии Р-селектина (связывание CD62p) в группе здоровых взрослых (А, Г), здоровых детей (Б, Д) и педиатрических пациентов (В). Типы активации тромбоцитов, используемые для проточной цитометрии, включали: смесь CRP и SFLLRN (А, Б, В); АДФ (Г, Д).

Связь между $\Delta I(1)$ и CD62p в когорте педиатрических пациентов при активации тромбоцитов SFLLRN положительная слабая (рис. 45 В). Несмотря на то, что оба теста описывают функциональные характеристики тромбоцитов, они предоставляют разную информацию. Поэтому неудивительно, что параметры агрегации и активации тромбоцитов по-разному коррелировали в разных наблюдаемых группах. Стоит отметить, что различий в агрегации тромбоцитов здоровых взрослых и детей обнаружено не было. В то время как уровень CD 62p при активации тромбоцитов в этих когортах достоверно отличен [Ропомаренко и др., 2022]. Возможно наличие корреляции в когорте здоровых взрослых добровольцев и ее отсутствие в когортах детей может быть обусловлено этим наблюдением.

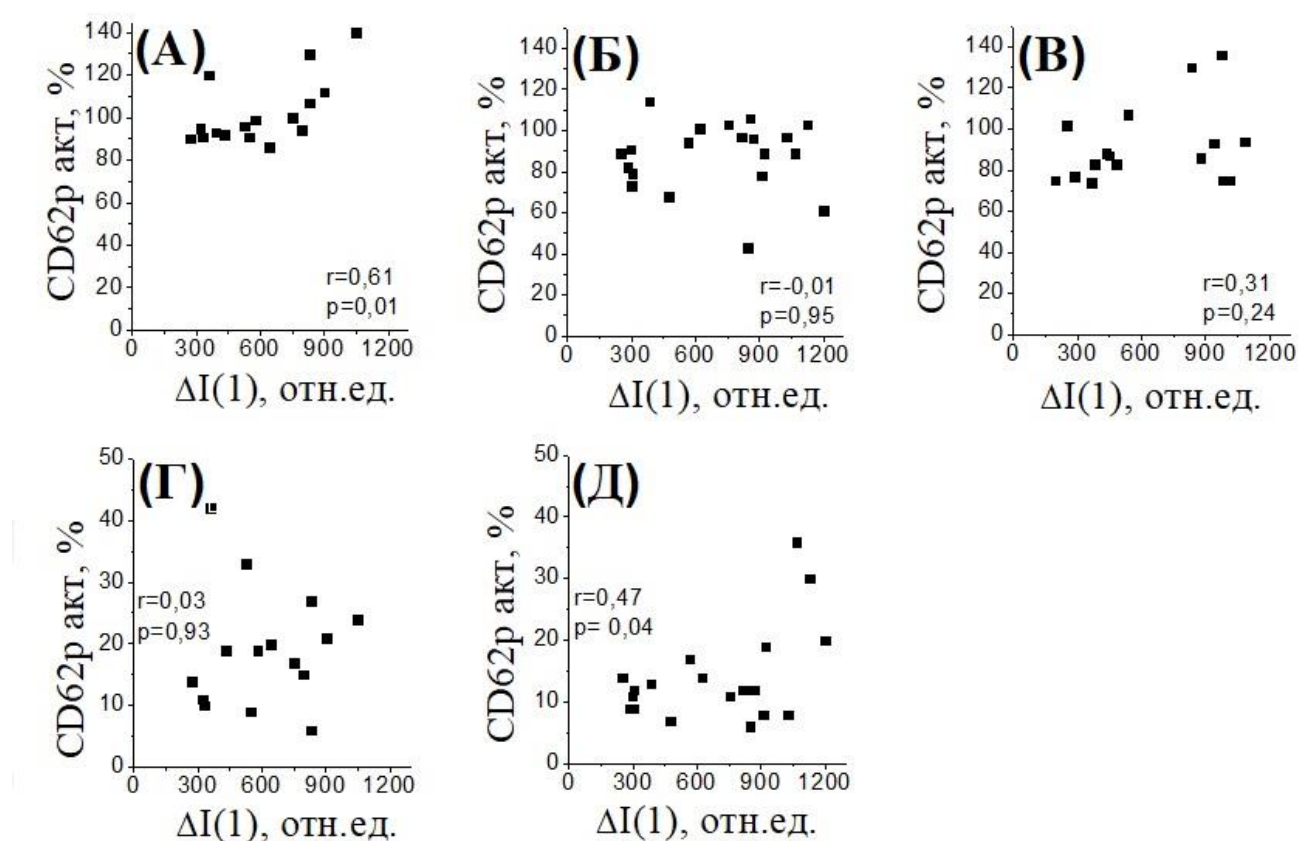


Рисунок 49. Корреляция между амплитудой агрегации $\Delta I(1)$ и маркером экспрессии Р-селектина (связывание CD62p) в группе здоровых взрослых (А, Г), здоровых детей (Б, Д) и педиатрических пациентов (В). Типы активации тромбоцитов, используемые для проточной цитометрии, включали: смесь CRP и SFLLRN (А, Б, В); АДФ (Г, Д).

Не обнаружена корреляция между параметрами агрегации тромбоцитов и маркерами активации тромбоцитов у пациентов с ОКС. На рисунке 50 показано, что начальная скорость агрегации в этой когорте слабо отрицательно коррелирует с уровнем PAC-1: $r = -0,35$, $p = 0,18$ (рис. 50 А). Параметр V_{ia} не связан с уровнем CD62p: $r = -0,10$, $p = 0,72$ (рис. 50 Б). Амплитуда агрегации умеренно коррелирует с уровнем активированной формы интегрина $\alpha 2b\beta 3$: $r = -0,42$, $p = 0,10$ (рис. 50 В). Параметр $I(1)$ не связан с уровнем Р-селектина: $r = -0,11$, $p = 0,68$ (рис. 50 Г).

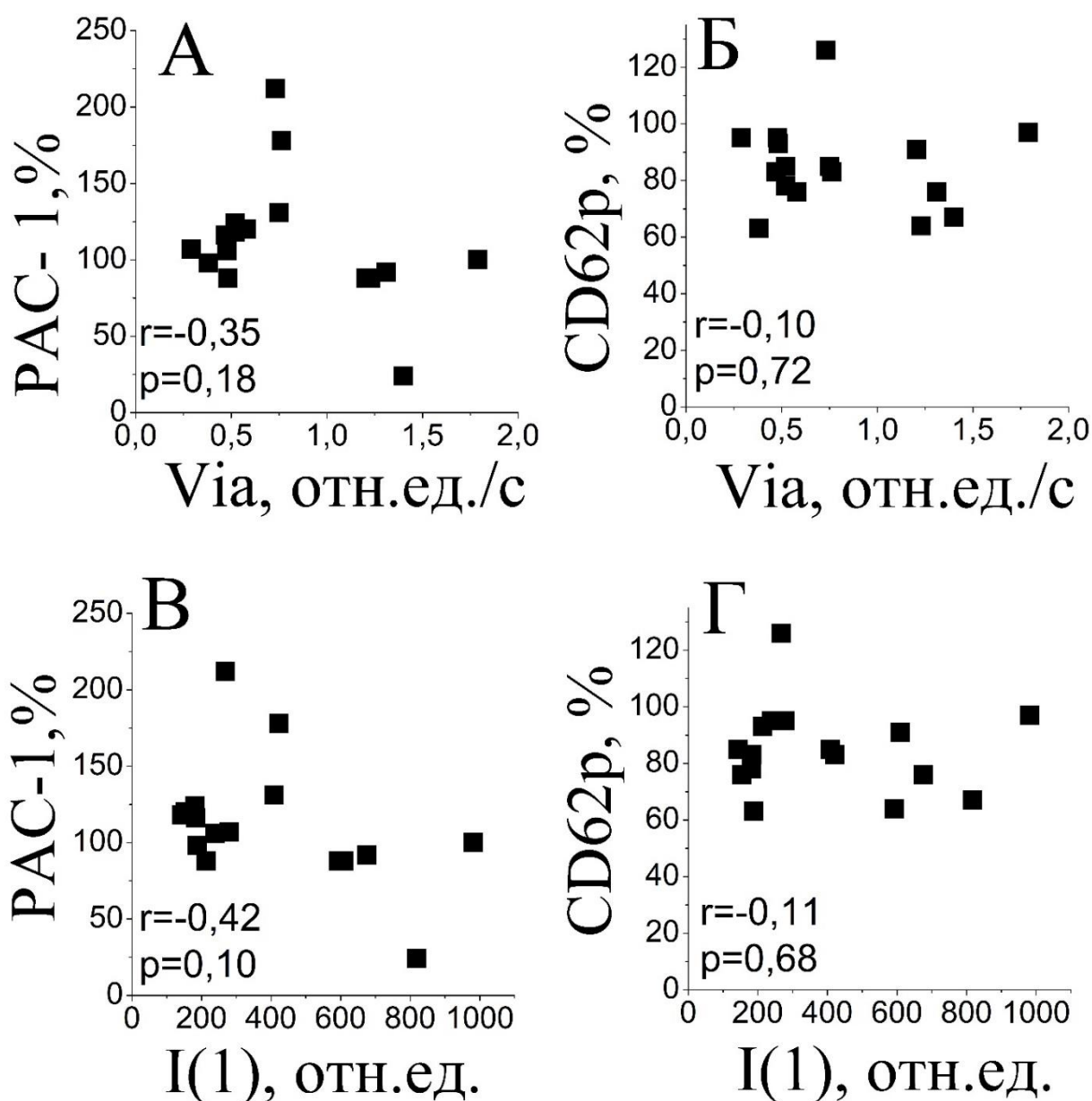


Рисунок 50. Корреляция параметров агрегации измеренной малоуглового светорассеяния и параметров активации тромбоцитов пациентов с ОКС, измеренных методом проточной цитометрии. А - корреляция между начальной скоростью агрегации (Via, отн. ед./с) и уровнем активации интегрин $\alpha 2b\beta 3$ (связывание PAC-1, %), уровнем CD62p (Б). Корреляция между амплитудой агрегации (I(1), отн.ед.) и уровнем активации интегрин $\alpha 2b\beta 3$ (связывание PAC-1, %) (В), уровнем CD62p (Г). Для проточной цитометрии тромбоциты активировали смесью коллаген-родственного пептида (CRP) и активирующего PAR-1 пептида SFLLRN.

Научным коллективом [Бодрова и др., 2024] был проведен корреляционный анализ показателей активности тромбоцитов, измеренных на проточном цитометре и световом трансмиссионном агрегометре, в группах пациентов с ОКС на терапии ацетилсалициловой кислотой и тикагрелором. Было показано, что корреляция между максимальным уровнем светопропускания (Тмакс, %Т) и связыванием антитела PAC-1-FITC (PAC-1, %) при активации тромбоцитов TRAP (последовательность SFLLRN) 10 мкМ является очень слабой. Данный результат находится в согласии с представленным на рисунке 50 (в): как при оценке агрегации методом малоуглового светорассеяния, так и при оценке агрегации методом СТА амплитуда агрегации не соотносится с уровнем связывания PAC-1 у пациентов с ОКС.

3.4.2 Сопоставление результатов, полученных методом малоуглового светорассеяния и методом агрегации по Борну

Для апробации теста была поставлена задача о сопоставлении результатов, полученных при исследовании агрегации тромбоцитов здоровых добровольцев и пациентов методами агрегометрии и малоуглового светорассеяния. Также необходимо было выявить, есть ли корреляция между результатами тестов. Таблица 17 является сравнительной для методов малоуглового светорассеяния и оптической агрегометрии. По сравнению с оптической агрегометрией для метода малоуглового светорассеяния требуется на порядок меньший объем образца, на порядок меньшая концентрация агониста, он чувствителен к более мелким агрегатам. Метод малоуглового светорассеяния в качестве среды использует буфер с известным значением рН и концентрацией кальция.

Таблица 17. Сравнение оптической агрегометрии и метода малоуглового светорассеяния (Адаптировано из [Mindukshev и др., 2005])

	СТА	Метод малоуглового светорассеяния
Минимальное количество тромбоцитов в пробе для анализа, клеток/мкл	100 000	10 000

Минимальный объем пробы необходимый для анализа, мкл	300	30
Размер агрегатов, шт	100	2-3
Буфер	pH-? Ca-?	pH 7.4, 2 mM CaCl ₂
АДФ, нМ	1000-10000	5-1000

Корреляция начальной скорости АДФ-индуцированной агрегации, измеренной методом малоуглового светорассеяния, и начальной скорости агрегации, измеренной световой трансмиссионной агрегометрией – умеренная для группы здоровых детей ($r = 0,52$, $p = 0,029$) и отсутствует в группе педиатрических пациентов ($r = -0,40$, $p = 0,13$) (рис. 51 А). Обнаружена умеренная положительная корреляция между амплитудой изменения светорассеяния на 1° и изменением светопропускания как в группе здоровых детей ($r = 0,58$, $p = 0,011$), так и в группе педиатрических пациентов с геморрагическим синдромом ($r = 0,39$, $p = 0,13$) (рис. 51 Б). Эти данные позволяют предположить, что некоторые параметры метода малоуглового светорассеяния предоставляют информацию, аналогичную СТА, в то время как другие предоставляют независимую информацию, что может быть обусловлено разными условиями проведения тестов.

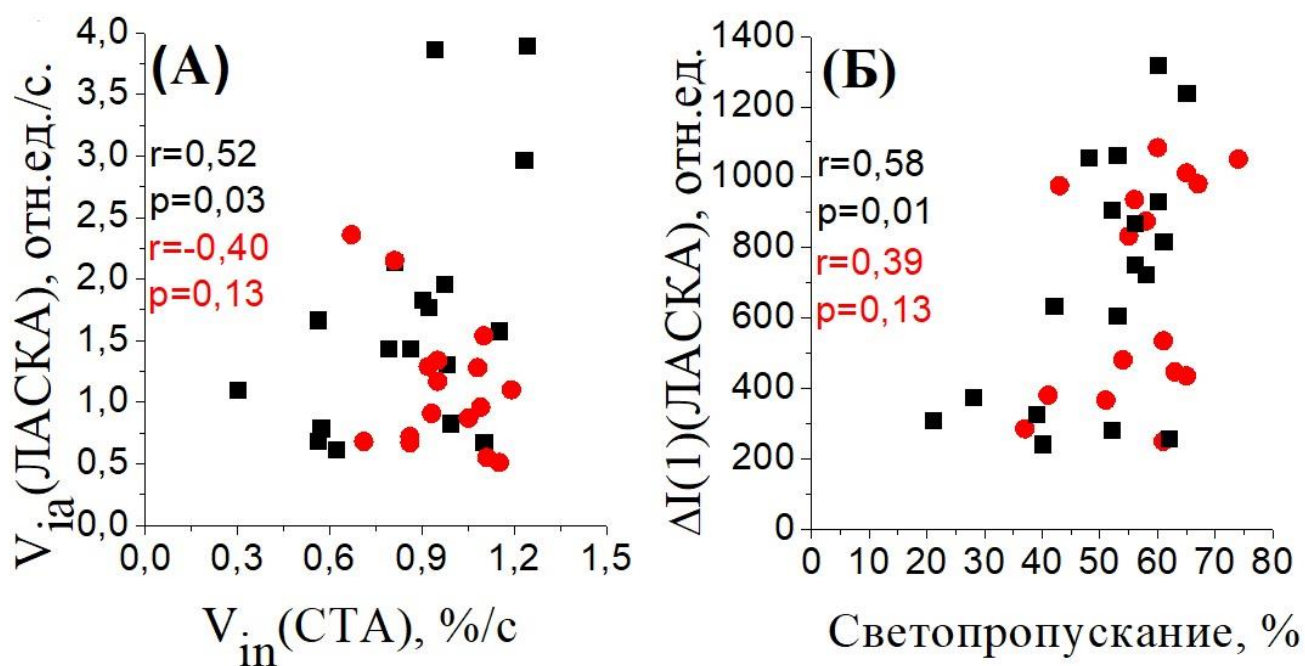


Рисунок 51. Корреляция параметров, полученных с помощью метода малоуглового светорассеяния и СТА для здоровых детей (черные квадраты, $n = 18$) и детей с геморрагическим синдромом (красные кружки, $n = 16$). График зависимости начальной скорости агрегации, измеренной на малоугловом анализаторе, от начальной скорости агрегации, измеренной на агрегометре (А), Б – график зависимости амплитуды изменения светорассеяния, измеренной методом малоуглового светорассеяния, от светопропускания, измеренного классической агрегометрией. Прозрачные кружочки обозначают параметры детей–пациентов ($n=16$), черные квадратики – здоровых детей ($n=18$). Коэффициент корреляции Пирсона обозначен как r , а уровень достоверности как p .

Коэффициенты корреляции параметров коллаген-индуцированной агрегации, полученные при исследовании здоровых доноров ($n=18$) и пациентов ($n=10$) на световом трансмиссионном агрегометре, а также на лазерном малоугловом анализаторе ЛАСКА приведены в таблице 18.

Таблица 18. Коэффициенты корреляции параметров коллаген-индуцированной агрегации, измеренные методом малоуглового светорассеяния и методом оптической агрегометрии

Коэффициент корреляции R	Здоровые	Пациенты
V (ЛАСКА- СТА)	0,87***	0,79**
I (ЛАСКА- СТА)	0,74* ;	0,84**
t_{lag} (ЛАСКА- СТА)	0,94***	0,90 **

Примечание: уровни значимости $p < 0,05$ обозначен *; $p < 0,01$ обозначен **; $p < 0,001$ обозначен ***.

Было получено, что параметры агрегации (V_{max} , $\Delta I(1)$ и t_{lag}), измеренные методом малоуглового светорассеяния сильно положительно коррелируют с параметрами агрегации измеренными методом СТА среди здоровых доноров и

пациентов с кровоточивостью (коэффициенты корреляции Пирсона 0,7-0,8, $p < 0,05$).

Глава 4. Заключение

Настоящее исследование было сосредоточено на разработке метода малоуглового светорассеяния для оценки функциональной активности тромбоцитов пациентов с гематологическими, онкогематологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Было оценено влияние ряда преаналитических и аналитических переменных и сопоставлены результаты, полученные с использованием метода малоуглового светорассеяния с параметрами теста - «золотого стандарта» СТА и проточной цитофлуориметрией.

В результате моделирования рассеяния лазерного излучения на частицах микрометрового размера установлено, что рассеяние происходит преимущественно в переднюю полуплоскость, с выраженным центральным максимумом при 0° . Зависимости рассеяния, наблюдаемые под углами 1° и 12° отражают изменения в угловом распределении рассеянного света, связанные с вариациями формы (эллипсоидальная/сфероидальная) и размера частиц, в том числе при агрегации.

В ходе работы проведена оценка повторяемости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов, исследованных методом малоуглового светорассеяния. Интраиндивидуальные коэффициенты вариации показателей функциональной активности тромбоцитов, определяемых на приборе ЛАСКА-ТМ сопоставимы с оцененными методом световой трансмиссионной агрегометрии и проточной цитофлуориметрией.

В рамках исследований была оценена воспроизводимость результатов (в течение недели наблюдения) исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния. Полученные данные позволят сделать выводы о статистически значимых отличиях в агрегации тромбоцитов, наблюдаемой в динамике, например, при оценке функции тромбоцитов у пациентов на продолжительной терапии антиагрегантами. Помимо этого, эти результаты могут быть полезными в перспективе при оценке агрегации

тромбоцитов в образцах, подлежащих длительному хранению, например, тромбоцитарного концентрата, использующегося в трансфузиологии.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности транспортировки образца на наземном транспорте в термостатируемом контейнере перед проведением анализа агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния.

Установлен рекомендуемый антикоагулянт, время хранения богатой тромбоцитами плазмы, концентрация антикоагулянта по соотношению к крови и другие параметры для оценки агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния.

Подобно световой трансмиссионной агрегометрии и в отличие от проточной цитометрии, метод малоуглового светорассеяния для оценки агрегации тромбоцитов не чувствителен к возрастным различиям между взрослыми и детьми старше 1 года. Было обнаружено, что параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов распределены нормально в группах здоровых добровольцев. В рамках работы была проведена оценка влияния антиагрегантов на агрегацию тромбоцитов методом лазерного светорассеяния. Метод был апробирован на пациентах с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии. На основе проведенных исследований и анализа полученных результатов было обнаружено, что комбинация антиагрегантов (аспирин и тикагрелор) подавляют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, в то время, как только аспирин не оказывает ингибирующего действия на агрегацию тромбоцитов. Результаты, полученные *in vitro* находятся в согласии с результатами, полученными *in vivo*.

Был изучен функциональный ответ тромбоцитов пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/синдромом Казабаха-Меритт. На основании проведенных исследований заключили, что начальные скорости агрегации тромбоцитов, измеренные у пациентов с КГЭ/СКМ и здоровых добровольцев, значимо не отличаются, однако у ряда пациентов коллаген-индуцированная агрегация была снижена. Результаты исследований подтверждают перспективность использования метода малоуглового

светорассеяния для диагностики тромбоцитарных дефектов у пациентов с количеством тромбоцитов ниже референсного значения, т.е. менее 150 тысяч тромбоцитов/мкл. Стоит отметить, что возраст включенных в исследование пациентов с КГЭ/СКМ не превысил 3 лет. Таким образом, в ходе данной работы метод малоуглового светорассеяния по сравнению с оптической агрегометрией продемонстрировал преимущество в анализе агрегации у младенцев и детей в возрасте до 3 лет: для теста требовалось около 1 мл цельной крови, что на порядок меньше объема крови необходимого для анализа агрегации тромбоцитов методом СТА.

Результаты этого исследования выявили положительную корреляцию между агрегацией тромбоцитов, измеренной с помощью метода малоуглового светорассеяния, и маркером активации тромбоцитов (гликопротеин IIb/IIIa), оцененным с помощью проточной цитометрии у здоровых взрослых. Однако в педиатрических группах корреляции между параметрами агрегации и уровнем PАС-1 обнаружено не было. Мы также обнаружили сильную корреляцию между параметрами агрегации и уровнем экспрессии Р-селектина у здоровых добровольцев при сильной активации. Несмотря на то что оба теста описывают функциональные характеристики тромбоцитов, они предоставляют разную информацию. Поэтому неудивительно, что параметры агрегации и активации тромбоцитов по-разному коррелировали в разных наблюдаемых группах.

Глава 5. Выводы

1. Определены преаналитические и аналитические переменные, влияющие на параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов, изученные методом малоуглового светорассеяния. Нарушение соотношения кровь/цитрат натрия при недоборе пробирки приводит к подавлению реакции изменения формы тромбоцитов. Начальная скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов является параметром, зависимым от относительного содержания плазмы в образце: она возрастает в интервале от 2 до 6% относительного содержания плазмы.
2. Оценена функциональная активность тромбоцитов у когорт здоровых добровольцев и пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, системы крови, а также новообразованиями методом лазерного малоуглового светорассеяния. Обнаружено, что параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов в группах пациентов с дефицитами пула хранения не отличаются от измеренных в контрольной группе. Установлено, что амплитуда АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов снижается в три раза при воздействии двойной антиагрегантной терапии у пациентов с ОКС. Не выявлено отличий в начальной скорости агрегации у педиатрических пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/ синдромом Казабаха–Мерритт по сравнению с когортой здоровых добровольцев.
3. Выявлена связь параметров функциональной активности тромбоцитов, определяемых методом лазерного малоуглового светорассеяния, с активационными маркерами тромбоцитов, определяемыми методами проточной цитометрии, а также с параметрами, определяемыми световой трансмиссионной агрегометрией. Начальная скорость агрегации тромбоцитов коррелирует с уровнем активированной формы гликопротеина IIb/IIIa у здоровых взрослых при активации тромбоцитов сильными агонистами (сильная связь $r=0,83$, $p<0,0001$). В группе здоровых детей амплитуда агрегации, измеренная методом оптической агрегометрии,

коррелирует с амплитудой агрегации, измеренной методом малоуглового светорассеяния (умеренная связь $r=0,58$, $p=0,01$).

4. Показано, что метод малоуглового светорассеяния применим для исследования функциональной активности тромбоцитов у пациентов с гематологическими, онкогематологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Он позволяет выявить дефекты в агрегации тромбоцитов у пациентов с тромbastенией Гланцмана и афибриногенемией, а также действенен в мониторинге эффективности двойной антиагрегантоной терапии у пациентов с ОКС.

Итоги выполненного исследования

Практические рекомендации

1. При проведении исследований агрегации тромбоцитов методом лазерной малоугловой дифракции света рекомендуется собирать материал в пробирку содержащую цитрат натрия и разводить богатую тромбоцитами плазму так, чтобы конечная концентрация образца в кювете принадлежала интервалу 6-12%. Исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния следует проводить в течение 2 часов с момента получения богатой тромбоцитами плазмы. При соотношении объема крови к объему цитрату натрия в пробирке отличном от 9 к 1 рекомендуется исключить материал из исследования.
2. При исследовании пациентов рекомендуется сопоставлять полученные результаты с референсными интервалами, которые не являются возраст-зависимыми. Для оценки агрегации тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопенией рекомендуется постановка исследования методом малоуглового светорассеяния.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В рамках дальнейшего изучения данной темы предполагается проведение исследования связи между степенью кровоточивости и параметрами ЛАСКА, что требует большего числа пациентов и здоровых доноров для получения надежных результатов. Мы проанализировали внутриоператорную вариабельность, но не исследовали межоператорную вариабельность, которая могла бы представлять интерес для крупных больниц и исследовательских центров. Несмотря на то, что исследование агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния выглядит очень привлекательным для пациентов с тромбоцитопенией, мы не проводили крупномасштабных исследований с протоколом, приспособленным для работы с образцами с низким количеством тромбоцитов и стандартизацией содержания тромбоцитов/плазме. Однако настоящее исследование дает основу проектам, которые должны стать следующим шагом в использовании метода ЛАСКА в клинической практике и фундаментальных исследований тромбоцитов. Было бы наиболее удобно осуществлять такие проекты с использованием более новых версий устройства, которые совмещают технологии лазерной дифракции и флуоресцентного анализа.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, входящих в Web of Science (Core Collection), Scopus, РИНЦ

1. **Svidelskaya G.S.**, Sorkina, V.P., Ignatova, A.A., Ponomarenko E.A., Poletaev A.V., Seregina E.A., Manuvera V.A., Zharkov P.A., Mindukshev I.V., Gambaryan S., Panteleev M.A. Assay variables and early clinical evaluation of low-angle light scattering for platelet function analysis // International Journal of Hematology , 2024. . – Vol. 120. – P. 717-724. DOI: 10.1007/s12185-024-03859-0 (Scopus SJR = 0.594/ Объем: 0,90 печ. л./ вклад автора 0,72 п.л.)
2. Писарюк А. С., Филькова А. А., Тухсанбоев Ё. С., **Свидельская Г. С.**, Игнатова А. А., Пономаренко Е. А., Мартыанов А. А., Тараканова А. А., Мерай И. А., Пантелеев М. А., Свешникова А. Н., Кобалава Ж. Д.. Нарушения в системе гемостаза у пациентов с инфарктом миокарда без обструкции коронарных артерий // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии, 2024. – Том 20, №4. – с. 386-400. DOI: 10.20996/1819-6446-2024-3065 (Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 1,282/Объем: 0,38 печ.л./ вклад автора 0,076 п.л.)
3. Martyanov A.A., Tesakov I.P., Khachatryan L.A., An O.I., Boldova A.E., Ignatova A.A., Koltsova E.M., Korobkin J.D., Podoplelova N.A., **Svidelskaya G.S.**, Yushkova E., Novichkova G.A., Eble J.A., Panteleev M.A., Kalinin D.V., Sveshnikova A.N.. Platelet functional abnormalities in pediatric patients with kaposiform hemangioendothelioma/Kasabach-Merritt phenomenon //Blood Advances, 2023. – Vol. 7, №17. – P. 4936-4949. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022009590. (Scopus SJR=3.065/Объем: 1.57 печ.л./вклад автора 0.314)
4. Кольцова Е.М., **Свидельская Г.С.**, Шифрин Ю.А., Атауллаханов Ф.И. Молекулярные механизмы нарушения гемостаза в онкологии // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2021. Т. 20, № 4. – Р. 191-198. DOI:10.24287/1726-1708-2021-20-4-191-198 (Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 0,510, Объем: печ.л.=0,90./ вклад автора п.л 0,27)

5. Martyanov A.A., Maiorov A.S, Filkova A.A, Ryabykh A.A, **Svidelskaya G.S.**, Artemenko E.O., Gambaryan S.P., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Effects of bacterial lipopolysaccharides on platelet function: inhibition of weak platelet activation // Scientific Reports, 2020. – Vol. 10, № 1. DOI: 10.1038/s41598-020-69173-x (Scopus SJR=0.900/ Объем: 1,13 печ.л./вклад автора 0,339)
6. Мартьянов А.А., Игнатова А.А., **Свидельская Г.С.**, Пономаренко Е.А., Гамбарян С.П., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Программируемая клеточная смерть и функциональная активность тромбоцитов при онкогематологических заболеваниях // Биохимия, 2020. – Т. 85, № 10. С. 1489 – 1499. DOI: 10.31857/S0320972520100140. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ = 0,908, (Объем: 1,22 печ.л./ вклад автора 0.37 печ.л)

Переводная версия статьи:

Martyanov A. A., Ignatova A. A., **Svidelskaya G. S.**, Ponomarenko E. A., Gambaryan S. P., Sveshnikova A. N., Panteleev M. A.. Programmed Cell Death and Functional Activity of Platelets in Case of Oncohematologic Diseases. //Biochemistry. Biokhimiia, 2020.– V. 85, № 10.–P. 1267–1276. DOI: 10.1134/S0006297920100144 (Scopus SJR=0,661, Объем: 1,10 печ.л., вклад автора 0,33 печ. л)

Публикации в материалах конференций, индексируемых в РИНЦ

1. **Свидельская Г. С.**, Игнатова А. А., Пономаренко Е.А., Миндукшев И. В., Гамбарян С. П., Пантелеев М. А. Взаимосвязь маркеров активации и агрегации тромбоцитов. Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем [Электронный ресурс]: тез. докл. 16-й Междунар. науч. конф., Респ. Беларусь, Минск, 25–27 июня 2024 г. г. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: Г. Г. Мартинович (гл. ред.) [и др.]. – Минск: БГУ, 2024. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – ISBN 978-985-881-648-3. (0,12 печ. л./60%)
2. **Свидельская Г. С.**, Брускова Е. Н., Игнатова А. А., Полетаев А. В., Серегина Е. А., Жарков П. А., Миндукшев И. В., Гамбарян С. П., Пантелеев М. А.

Исследование коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния. ТЕЗИСЫ VII КОНГРЕССА ГЕМАТОЛОГОВ РОССИИ И IV КОНГРЕССА ТРАНСФУЗИОЛОГОВ РОССИИ. Гематология и трансфузиология. 2024;69(2): с. 321 (0,07 печ.л./50%).

3. **Свидельская Г.С.**, Игнатова А.А., Филькова А.А., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Оценка агрегационной способности тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии методом лазерной малоугловой дифракции света. СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ Российского Форума по Тромбозу и Гемостазу 2024, Электронное издание Москва, с. 71-72 (0,09 печ.л./50%)

4. Filkova A., Pisaryuk A., Ignatova A., Martyanov A., Ponomarenko Zh, **Svidelskaya G.**, Balabin F., Tukhsanboev E., Majnunov D., Teterina M., Meray I., Kobalava ZH, Panteleev M., Sveshnikova A. Observation of decreased platelet functional responses to conventional activation over six months period in patients after acute coronary syndrome on dual anti-platelet therapy. Abstract book of the 5th Euplan International Conference, место издания Milan, тезисы, с. 229 (0,10 печ.л./25%)

5. Tesakov I.P., Martyanov A.A., An O.I., Ignatova A.A., **Svidelskaya G.S.**, Korobkin J.J.D, Koltsova E.A., Novichkova G.A., Panteleev M.A., Khachatryan L.A., Sveshnikova A.N. PO-51: Kaposiform hemangioendothelioma is associated with platelet functional abnormalities that persist in patients even after complete blood cell count recovery. Thrombosis Research, Vol. 213-Supplement S35, May, 2022; doi:10.1016/S0049-3848(22)00241-9 (0,07 печ.л., 10%)

6. **Svidelskaya G.S.**, Ignatova A.A., Poletaev A. V., Seregina E.A., Zharkov P.A., Mindukshev I.V., Gambaryan S.P., Panteleev M.A. The diagnosis of platelet defects using low-angle laser light diffraction method. Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, 1st Virtual Conference. издательство Globustar Formaат (Tallinn, Estonia); 7 – 9 December 2020. Abstract book, p. 40. <https://astore.sbpreports.com/articles/1/main.pdf> (0,08 печ. л./75%)

7. **Svidelskaya G.S.**, Ignatova A.A., Poletaev A. V., Seregina E.A., Zharkov P.A., Mindukshev I.V., Gambaryan S.P., Panteleev M.A. Low-angle Light Scattering for the Analysis of the Platelet Functions: Preanalytical Variables and Evaluation in Pediatric Patients. ISTH abstracts. Res Pract Thromb Haemost. 2020; 4 (Suppl. 1):239 (0,06 печ. л., /70%)
8. **Свидельская Г. С.** Метод малоуглового светорассеяния для оценки функции тромбоцитов. XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных "Ломоносов-2020", Москва, Россия, 10-27 ноября 2020 (0,17 печ. л./100%)
9. **Свидельская Г.С.**, Игнатова А.А., Полетаев А.В., Серёгина Е.А., Жарков П.А., Миндукшев И. В., Гамбарян С. П., Пантелеев М. А. Применение метода малоуглового светорассеяния для оценки функции тромбоцитов. Материалы V конгресса гематологов России. Гематология и трансфузиология. 2020. 65(1): 214-21 . (0,05 печ. л./60%)
10. **Svidelskaya G.S.**, Ignatova A.A., Mindukshev I.V., Gambaryan S.P., Panteleev M.A. Evaluation of platelet function using low angle light scattering: characterization, reproducibility, sensitivity and analytical variables. Объединенный международный конгресс «Open Issues on Hemostasis and Thrombosis – 2018» совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, Сборник тезисов конгресса. Санкт-Петербург, Россия, 4-6 октября 2018,– С. 271 (0,07/80%)

Список конференций, на которых были доложены результаты исследования

Пятая международная конференция Eurplan (2022); Международная конференция по тромбозу и гемостазу (2020); Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2020»; Объединенный международный конгресс «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 9-ой

Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (2018).

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность своему научному руководителю, доктору физико-математических наук Пантелееву М.А., за его поддержку в процессе подготовки диссертации, обсуждении полученных результатов и подготовке публикаций. Автор благодарен кафедре медицинской физики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и всему её коллективу за проявленное внимание к научной деятельности. Также автор благодарен всему коллективу врачей, ученых и медицинских сестер ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России за содействие в организации работы и предоставление информации о пациентах. Автор выражает благодарность сотрудникам НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева Игнатовой Анастасии Александровне, Фильковой Александре Андреевне, Серёгиной Елене Александровне, Кузнецовой Софье Алексеевне, Мишиной Надежде Михайловне, Нечипуренко Дмитрию Юрьевичу и Бутову Кириллу Романовичу за личную поддержку и конструктивные обсуждения при выполнении работы. Автор признателен Гарсон Дасгупта Андрею Кумар, Мартьянову Алексею Александровичу, Якушевой Александре Антоновне, Кольцовой Екатерине Михайловне за многолетнее сотрудничество, обсуждения и помощь при выполнении экспериментальных и теоретических исследований. Автор также выражает искреннюю благодарность Гамбаряну Степану Петровичу и Миндукшеву Игорю Викторовичу за конструктивную критику, мотивацию и ценные рекомендации, без которых данная работа не могла быть проведена. Автор хотел бы поблагодарить коллективы лабораторий клеточного гемостаза и тромбоза, клеточной биологии и трансляционной медицины и биофизики за помощь в организации лабораторных измерений функциональной активности тромбоцитов, обсуждении результатов и подготовке публикаций. Автор благодарен коллективу врачей и ординаторов кардиологического отделения ГБУЗ ГKB имени В.В. Виноградова во главе с Писарюк А.С. за помощь в организации работы с пациентами и предоставлении материалов для проведения исследований.

Автор также от всей души хотел бы поблагодарить Филёва Егора Андреевича, Кирдей Ирину Васильевну, Гурилеву Ольгу Евгеньевну и Стахно Анну Павловну за всестороннюю поддержку, терпение и вдохновение.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аглуллина Э. И. Острый коронарный синдром: от диагностики к оптимизации лечения // Вестник современной клинической медицины. 2013. Т. 6. № 5. С. 91–94.
2. Алиева А. А. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В БИОМЕДИЦИНЕ // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмуллы. 2021. № 2 (59). С. 6–15.
3. Базаев И. А. и др. Современные методы измерения параметров свертываемости крови // Медицинская техника. 2015. Т. 3. С. 9–13.
4. Бодрова В. В. и др. Оценка функциональной активности тромбоцитов у здоровых лиц и пациентов, получающих антитромбоцитарную терапию. Возможные несоответствия тестов агрегации и проточной цитометрии // Биомедицинская химия. 2024. Т. 70. № 2. С. 99–108.
5. Бокарев И. Н., Попова Л. В., Козлова Т. В. Тромбозы и противотромботическая терапия в клинической практике. : Мед. информ. агентство, 2009.
6. Бочаров К. В., Марукович Н. И., Куксин А. Ю. Методы статического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворах // М.: МФТИ. 2016.
7. Васильев С. А. и др. Клинико-лабораторная диагностика нарушений функций тромбоцитов // 2013.
8. Волотовский И. Д., Пинчук С. В. Проточная цитометрия. Основы технологии и ее применение в биологии // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2022. Т. 67. № 2. С. 229–242.
9. Глуханюк Е. В. и др. Первый опыт оценки функциональной активности тромбоцитов у больных с синдромом Казабаха-Мерритт // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016. Т. 15. № 4. С. 21–27.
10. Голухова Е. З., Рябинина М. Н. Современные аспекты антиагрегантной терапии // Креативная кардиология. 2013. Т. 1. С. 46–58.
11. Грязнова И. Ю., Лабутина М. С., Прончатов-Рубцов Н. Р. Теория однократного рассеяния волн и ее приложение к задачам акустики природных сред // Учебное пособие. 2016. С. 80.
12. Дёмина И. А., Кумскова М. А., Пантелеев М. А. Тромбоцитопатии // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2015. № 1. С. 54–60.

13. Деркачев Э. Ф. и др. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов: Патент RU 2108579 C1 6 G01 N 33/49.—1998 // БИ № 10 (II).
14. Дубикайтис Т. А. Острый коронарный синдром // Российский семейный врач. 2017. Т. 21. № 1. С. 5–14.
15. КЛЫЧЕВА М. М. Особенности регуляции процессов гемостаза в поздние сроки нормально протекающей беременности // 2018.
16. Колесникова И. В. и др. Определение динамических характеристик тромбоцитов по начальной стадии их агрегации // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Физика. 2009. Т. 4. № 2. С. 69–77.
17. Куликов К. Г., Кошлан Т. В. Определение размеров коллоидных частиц при помощи метода динамического рассеяния света // Журнал технической физики. 2015. Т. 85. № 12. С. 26–32.
18. Кумскова М. А. и др. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2015. Т. 14. № 4. С. 17–24.
19. Литвицкий П. Ф. Патология системы гемостаза // Вопросы современной педиатрии. 2014. Т. 13. № 2. С. 65–76.
20. Лопатин В. Н. и др. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред // 2004.
21. Мазуров А. В. Физиология и патология тромбоцитов. : Литтерра, 2011a.
22. Мазуров А. В. Физиология и патология тромбоцитов. : Литтерра, 2011b.
23. Маньковский В. И. Параметры индикатрис рассеяния света и состав взвеси в зоне апвеллинга на экваторе в Индийском океане // Морской гидрофизический журнал. 2022. Т. 38. № 5 (227). С. 499–511.
24. Матвеев А. Н. Оптика: Учеб. пособие для физ. спец. вузов // М.: Высш. шк. 1985. Т. 351.
25. Москаленский А. Е. Исследование оптических свойств тромбоцитов в нативном и активированном состоянии, а также их агрегатов, с помощью сканирующей проточной цитометрии // 2015.
26. Обыденный С. И., Киреев И. И., Пантелеев М. А. Вклад электронной микроскопии в исследование нарушений морфологии тромбоцитов // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2022. Т. 21. № 3. С. 142–146.

27. Пантелеев М., Свешникова А. Тромбоциты и гемостаз // Онкогематология. 2014. Т. 9. № 2. С. 65–73.
28. Под ред. О.А. Рукавицына, С.В. Игнатьева. Система гемостаза. Теоретические основы и клиническая практика: национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. 944 с.
29. Полохов Д. М. ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ // 2023.
30. Пономаренко Е. А. и др. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики. // 2019. Т. 18. № 3. С. 112–119.
31. Пономаренко Е. А. Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук // 2023.
32. Сердюк И. Н., Заккаи Н., Заккаи Д. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: учебное пособие: в 2 томах // М.: КДУ. 2009. Т. 1. С. 568.
33. Сироткина О. В. и др. Оценка функциональной активности тромбоцитов в препаратах тромбоцитного концентрата-роль микрочастиц, содержащих микроРНК // МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ. , 2017. С. 116–137.
34. Федорова Д. В. и др. Диагностика тромбоцитопатий у детей: корреляции исследования функциональной активности тромбоцитов с клинической картиной и результатами агрегометрии // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2018. Т. 17. № 1. С. 16–22.
35. Филькова А. А. Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе // 2023.
36. Хаспекова С. Г. и др. Агрегация тромбоцитов при приеме ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела и содержание гликопротеина IIb-IIIa у больных с острым коронарным синдромом // Кардиология. 2011. Т. 51. № 7. С. 4–7.
37. Хачатрян Л. А. и др. Капошиформная гемангиоэндотелиома/синдром Казабаха–Мерритт: клиниколабораторная характеристика. Анализ клинических случаев. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021. Т. 20. № 3. С. 74–91.

38. Шатурный В. И. и др. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови // Биомедицинская химия. 2014. Т. 60. № 2. С. 182–200.
39. Шиффман Ф. Патология физиологии крови. Москва: Издательство БИНОМ, 2001. 448 с.
40. Adan A. и др. Flow cytometry: basic principles and applications // Critical Reviews in Biotechnology. 2017. Т. 37. № 2. С. 163–176.
41. Al-Tamimi M. и др. Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: a novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels. // Blood. 2012. Т. 119. № 18. С. 4311–4320.
42. Amri Y. и др. Hypodysfibrinogenemia: A novel abnormal fibrinogen associated with bleeding and thrombotic complications. // Clin Chim Acta. 2016. Т. 460. С. 55–62.
43. Bambo G. M., Shiferaw E., Melku M. A mean platelet volume in inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. // PLoS One. 2022. Т. 17. № 8. С. e0273417.
44. Beck F. и др. Temporal quantitative phosphoproteomics of ADP stimulation reveals novel central nodes in platelet activation and inhibition. // Blood. 2017. Т. 129. № 2. С. e1–e12.
45. Bourguignon A., Tasneem S., Hayward C. P. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. // Crit Rev Clin Lab Sci. 2022. Т. 59. № 6. С. 405–444.
46. Brar S. K., Verma M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2011. Т. 30. № 1. С. 4–17.
47. Cattaneo M. и др. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. // J Thromb Haemost. 2013.
48. Cattaneo M. P2Y12 receptors: structure and function. // J Thromb Haemost. 2015. Т. 13 Suppl 1. С. S10-16.
49. Estevez B., Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. // Physiology (Bethesda). 2017. Т. 32. № 2. С. 162–177.
50. Farndale R. W. Collagen-induced platelet activation. // Blood Cells Mol Dis. 2006. Т. 36. № 2. С. 162–165.
51. Favalaro E. J., Lippi G., Franchini M. Contemporary platelet function testing. // Clin Chem Lab Med. 2010. Т. 48. № 5. С. 579–598.

52. Femia E. A. и др. Effect of platelet count on platelet aggregation measured with impedance aggregometry (Multiplate™ analyzer) and with light transmission aggregometry. // J Thromb Haemost. 2013. Т. 11. № 12. С. 2193–2196.
53. Gabbasov Z. A. и др. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in platelet suspension // Thrombosis research. 1989. Т. 54. № 3. С. 215–223.
54. Gachet C., Cazenave J. P. ADP induced blood platelet activation: a review. // Nouv Rev Fr Hematol (1978). 1991. Т. 33. № 5. С. 347–358.
55. Gaetano G. de, Cerletti C. Platelet adhesion and aggregation and fibrin formation in flowing blood: a historical contribution by Giulio Bizzozzero. // Platelets. 2002. Т. 13. № 2. С. 85–89.
56. Givan A. L. Flow cytometry: an introduction. // Methods Mol Biol. 2011. Т. 699. С. 1–29.
57. Gremmel T., Frelinger A. L. 3rd, Michelson A. D. Platelet Physiology. // Semin Thromb Hemost. 2016. Т. 42. № 3. С. 191–204.
58. Gresele P. и др. Platelet function assays in diagnosis: an update. // Expert Rev Hematol. 2019. Т. 12. № 1. С. 29–46.
59. Gupta P. и др. A multiscale model for multiple platelet aggregation in shear flow. // Biomech Model Mechanobiol. 2021. Т. 20. № 3. С. 1013–1030.
60. Gurbel P. A. и др. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. // J Am Coll Cardiol. 2007. Т. 50. № 19. С. 1822–1834.
61. Haley K. M. Platelet Disorders. // Pediatr Rev. 2020. Т. 41. № 5. С. 224–235.
62. Hartwig J. H. The platelet: form and function. // Semin Hematol. 2006. Т. 43. № 1 Suppl 1. С. S94-100.
63. Israels S. J. Laboratory testing for platelet function disorders. // Int J Lab Hematol. 2015. Т. 37 Suppl 1. С. 18–24.
64. Italiano J. E. The structure and production of blood platelets // Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders: A Clinical Handbook / под ред. P. Gresele и др. : Cambridge University Press, 2007. С. 1–20.
65. Jarvis G. E. Platelet Aggregation // Platelets and Megakaryocytes: Volume 1: Functional Assays / под ред. J. M. Gibbins, M. P. Mahaut-Smith. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. С. 65–76.
66. Kabil M. F., Abo Dena A. S., El-Sherbiny I. M. Ticagrelor. // Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2022. Т. 47. С. 91–111.

67. Kapp F. G. и др. Comprehensive Analyses of Coagulation Parameters in Patients with Vascular Anomalies. // *Biomolecules*. 2022. Т. 12. № 12.
68. Koessler J. и др. The Role of Human Platelet Preparation for Toll-Like Receptors 2 and 4 Related Platelet Responsiveness. // *TH Open*. 2019. Т. 3. № 2. С. e94–e102.
69. Koltai K. и др. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. // *Int J Mol Sci*. 2017. Т. 18. № 8.
70. Kunapuli S. P. и др. Platelet purinergic receptors. // *Curr Opin Pharmacol*. 2003. Т. 3. № 2. С. 175–180.
71. Latimer P., Wamble F. Light scattering by aggregates of large colloidal particles // *Applied Optics*. 1982. Т. 21. № 13. С. 2447–2455.
72. Le Blanc J. и др. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. // *J Clin Med*. 2020. Т. 9. № 8.
73. Linden M. D. Platelet physiology. // *Methods Mol Biol*. 2013. Т. 992. С. 13–30.
74. Macey M. G., Macey M. G. Flow cytometry. : Springer, 2007.
75. Mani H., Hellis M., Lindhoff-Last E. Platelet function testing in hirudin and BAPA anticoagulated blood. // *Clin Chem Lab Med*. 2011. Т. 49. № 3. С. 501–507.
76. McKinnon K. M. Flow Cytometry: An Overview. // *Curr Protoc Immunol*. 2018. Т. 120. С. 5.1.1-5.1.11.
77. Meijden P. E. J. van der, Heemskerk J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. // *Nat Rev Cardiol*. 2019. Т. 16. № 3. С. 166–179.
78. Michelson A. D. и др. Platelets. : Academic press, 2019.
79. Mindukshev I. и др. A new method for studying platelets, based upon the low-angle light scattering technique. 1. Theoretical and experimental foundations of the method // *International Journal of Spectroscopy*. 2005. Т. 19. С. 235–246.
80. Mindukshev I. и др. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. // *Clin Chem Lab Med*. 2012. Т. 50. № 7. С. 1253–1262.
81. Mindukshev I. и др. Platelet Hemostasis Reactions at Different Temperatures Correlate with Intracellular Calcium Concentration. // *Int J Mol Sci*. 2022. Т. 23. № 18.
82. Moskalensky A. E. и др. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering. // *J Biomed Opt*. 2013. Т. 18. № 1. С. 17001.

83. Nikitin S. Y. и др. Possibility of Measuring of Erythrocyte Size Distribution Parameters by Laser Diffractometry of a Blood Smear // Journal of Biomedical Photonics & Engineering. 2024. Т. 10. № 4. С. 50–59.
84. Nuyttens B. P. и др. Platelet adhesion to collagen. // Thromb Res. 2011. Т. 127 Suppl 2. С. S26-29.
85. Palma-Barqueros V. и др. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview. // Int J Mol Sci. 2021. Т. 22. № 9.
86. Paniccia R. и др. Assessment of platelet function: Laboratory and point-of-care methods // World Journal of Translational Medicine. 2014. Т. 3. С. 69–83.
87. Paniccia R. и др. Platelet function tests: a comparative review. // Vasc Health Risk Manag. 2015. Т. 11. С. 133–148.
88. Pati S. и др. Kaposiform Hemangioendothelioma with Kasabach-Merritt Phenomenon. // Indian J Pediatr. 2021. Т. 88. № 11. С. 1142–1144.
89. Patrono C. и др. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. // Chest. 2004. Т. 126. № 3 Suppl. С. 234S-264S.
90. Poletaev A. V. и др. Alterations in the parameters of classic, global, and innovative assays of hemostasis caused by sample transportation via pneumatic tube system // Thrombosis Research. 2018. Т. 170. С. 156–164.
91. Ponomarenko E. A. и др. Healthy pediatric platelets are moderately hyporeactive in comparison with adults' platelets. // Platelets. 2022. Т. 33. № 5. С. 727–734.
92. Puri R. N., Colman R. W. ADP-induced platelet activation. // Crit Rev Biochem Mol Biol. 1997. Т. 32. № 6. С. 437–502.
93. Ramirez-Bello V. и др. Zinc and Copper Ions Induce Aggregation of Human β -Crystallins // Molecules. 2022. Т. 27. № 9.
94. Rand M. L., Leung R., Packham M. A. Platelet function assays. // Transfus Apher Sci. 2003. Т. 28. № 3. С. 307–317.
95. Reiss C. и др. The sGC stimulator riociguat inhibits platelet function in washed platelets but not in whole blood. // Br J Pharmacol. 2015. Т. 172. № 21. С. 5199–5210.
96. Rubenstein D. A., Yin W. Platelet-Activation Mechanisms and Vascular Remodeling. // Compr Physiol. 2018. Т. 8. № 3. С. 1117–1156.
97. Santos-Gallego C. G., Badimon J. Overview of Aspirin and Platelet Biology. // Am J Cardiol. 2021. Т. 144 Suppl 1. С. S2–S9.

98. Savage B., Cattaneo M., Ruggeri Z. M. Mechanisms of platelet aggregation // *Current Opinion in Hematology*. 2001. Т. 8. № 5.
99. Sharina I. G. и др. The fibrinolytic gemfibrozil is a NO- and haem-independent activator of soluble guanylyl cyclase: in vitro studies. // *Br J Pharmacol*. 2015. Т. 172. № 9. С. 2316–2329.
100. Sharma R. и др. Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease. // *Cardiol Ther*. 2020. Т. 9. № 2. С. 349–361.
101. Sinnaeve P. R., Adriaenssens T. Dual Antiplatelet Therapy De-escalation Strategies. // *Am J Cardiol*. 2021. Т. 144 Suppl 1. С. S23–S31.
102. Spurgeon B. E. J., Naseem K. M. Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance. // *Cytometry B Clin Cytom*. 2020. Т. 98. № 1. С. 19–27.
103. Stakos D. A., Tziakas D. N., Stellos K. Mechanisms of platelet activation in acute coronary syndromes. // *Curr Vasc Pharmacol*. 2012. Т. 10. № 5. С. 578–588.
104. Stalker T. J. и др. Platelet Signaling // *Antiplatelet Agents* / под ред. P. Gesele и др. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. С. 59–85.
105. Stegnar M., Knezevic A., Bozic-Mijovski M. The effect of pre-analytical variables on light transmittance aggregometry in citrated platelet-rich plasma from healthy subjects. // *Clin Chem Lab Med*. 2010. Т. 48. № 10. С. 1463–1465.
106. Strokotov D. I. и др. Polarized light-scattering profile-advanced characterization of nonspherical particles with scanning flow cytometry. // *Cytometry A*. 2011. Т. 79. № 7. С. 570–579.
107. Swanepoel A. C., Pretorius E. Ultrastructural analysis of platelets during three phases of pregnancy: a qualitative and quantitative investigation // *Hematology*. 2015. Т. 20. № 1. С. 39–47.
108. Ting L. H. и др. Contractile forces in platelet aggregates under microfluidic shear gradients reflect platelet inhibition and bleeding risk // *Nature communications*. 2019. Т. 10. № 1. С. 1204.
109. Tsai F. D., Battinelli E. M. Inherited Platelet Disorders. // *Hematol Oncol Clin North Am*. 2021. Т. 35. № 6. С. 1069–1084.
110. Wenker O. C. и др. Thromboelastography // *Internet J Anesthesiol*. 2000. Т. 1. № 3.
111. White M. M., Jennings L. K. Platelet protocols: research and clinical laboratory procedures. : Elsevier, 1999.

112. Zeidan A. M. и др. Platelet function testing: state of the art. // Expert Rev Cardiovasc Ther. 2007. Т. 5. № 5. С. 955–967.