

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Свидельская Галина Сергеевна

**Исследование функциональной активности тромбоцитов с
помощью малоуглового светорассеяния**

Специальность 1.3.21. Медицинская физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре медицинской физики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а также в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Научный руководитель	–	Пантелеев Михаил Александрович , доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН
Официальные оппоненты	–	Яковенко Леонид Владимирович – доктор физико-математических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», физический факультет, кафедра биофизики, профессор; Розенфельд Марк Александрович – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, лаборатория термодинамики биосистем, заведующий лабораторией; Сулимов Владимир Борисович – доктор физико-математических наук, доцент, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Научно-исследовательский вычислительный центр, лаборатория вычислительных систем и прикладных технологий программирования, заведующий лабораторией;

Защита диссертации состоится «27» ноября 2025 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.011.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: РФ, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, аудитория 5-19.

E-mail: osminkinala@my.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3552>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Л.А. Осминкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Тромбоциты представляют собой безъядерные дискообразные клеточные фрагменты размером 2–5 мкм со средним объемом 6–10 фемтолитров [1]. Они циркулируют в кровотоке в концентрации 150 – 400 тысяч в микролитре [2]. Эти клетки отвечают за процесс остановки кровотечения – гемостаз [3]. 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 [4].

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. [5]. 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 [6].

Одним из предложенных диагностических методов для оценки функции тромбоцитов является метод малоуглового светорассеяния (Low-Angle light SCattering method, ЛАСКА) [7]. 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 [8]. 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. [9] валидировали метод малоуглового светорассеяния, построив компьютерную модель малоуглового светорассеяния в процессе агрегации, а также проведя 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 [10]. Кроме того, метод малоуглового светорассеяния был использован для характеристики ингибирования тромбоцитов уже используемым в клинике стимулятором растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) [11], NO- и гем-независимым активатором рГЦ [12], а также для детальной характеристики ингибирования АДФ-индуцированной активации тромбоцитов по пути цАМФ/ПКА [13].

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.

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

Задачи исследования:

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.

Объект исследования: тромбоциты здоровых добровольцев и пациентов с болезнью системы кровообращения, крови или новообразованиями. **Предмет исследования:** агрегация и изменение формы тромбоцитов здоровых добровольцев и

пациентов с гематологическими, онкогематологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями с целью разработки и совершенствования диагностических технологий с использованием метода малоуглового светорассеяния.

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.

Достоверность и обоснованность 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.

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.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, из них 6 научных статей в журналах, индексируемых в базах Web of Science (Core Collection), Scopus и РИНЦ.

Структура и объем диссертации

Диссертация представлена на 137 страницах и состоит из введения, четырех глав, посвященных обзору литературы, описанию материалов и методов исследования, изложению результатов и их обсуждению, заключения, основных результатов и выводов,

списка литературы, содержащего 112 наименований. Работа содержит 51 рисунок и 18 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **общей характеристике работы** определяется актуальность избранной темы, степень ее разработанности, цели и задачи, объект исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, апробация результатов.

В **первой главе** представлен обзор литературы по теме диссертации. В разделе **1.1. Тромбоцитарный гемостаз** приведены основные сведения о строении, агонистах и функции тромбоцитов. Описаны нарушения функции тромбоцитов, в частности: наследственные и приобретенные тромбоцитопатии, а также дефекты в тромбоцитарном гемостазе, сопряженные с онкологическими заболеваниями. Раздел **1.2 Методы исследования тромбоцитов** посвящен описанию принципов, устройств и ограничениям методов для диагностики тромбоцитарных дефектов.

Вторая глава посвящена материалам и методам. В разделе **2.1 Приборы и материалы** изложен протокол исследования агрегации тромбоцитов методом ЛАСКА. Приведено описание процедуры забора цельной крови, выделения богатой тромбоцитами плазмы и условия оценки агрегации тромбоцитов с помощью лазерного анализатора частиц ЛАСКА-ТМ. Детально описан протокол измерений динамического светорассеяния для исследования функциональной активности тромбоцитов. В этом разделе также описан протокол исследования активации тромбоцитов с помощью проточной цитометрии. Изложена методика проведения измерений поверхностных маркеров активации тромбоцитов по уровню интенсивности флуоресценции. Затем приведен протокол исследования агрегации тромбоцитов методом световой трансмиссионной агрегометрии.

Раздел **2.2 Методики проведения экспериментов** обращен к детальному описанию протоколов измерений в различных аналитических сериях, а именно при оценке преаналитических и аналитических переменных, оказывающих влияние на результаты исследования агрегации методом малоуглового светорассеяния. В этом же разделе изложена методика оценки агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антиагрегантной терапии методом лазерного малоуглового рассеяния света.

Раздел **2.3 Статистика** описывает статистические методы обработки данных и программное обеспечение. Раздел **2.4 Пациенты и доноры** посвящен характеристике

включенных в исследование здоровых взрослых и здоровых детей.

Глава 3 описывает оригинальные экспериментальные **результаты работы**. В разделе **3.1 Моделирование светорассеяния на одиночном тромбоците** излагаются итоги работы по расчёту диаграмм направленности и индикатрис рассеяния лазерного излучения для тромбоцитов и их агрегатов.

Зависимость интенсивности рассеяния света от угла, рассчитанная по теории Ми (или приближению Фраунгофера), представлена угловой диаграммой (рис. 1). На рис. 1 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 функцией от 0° до 180° . Превалирует рассеяние вперед.

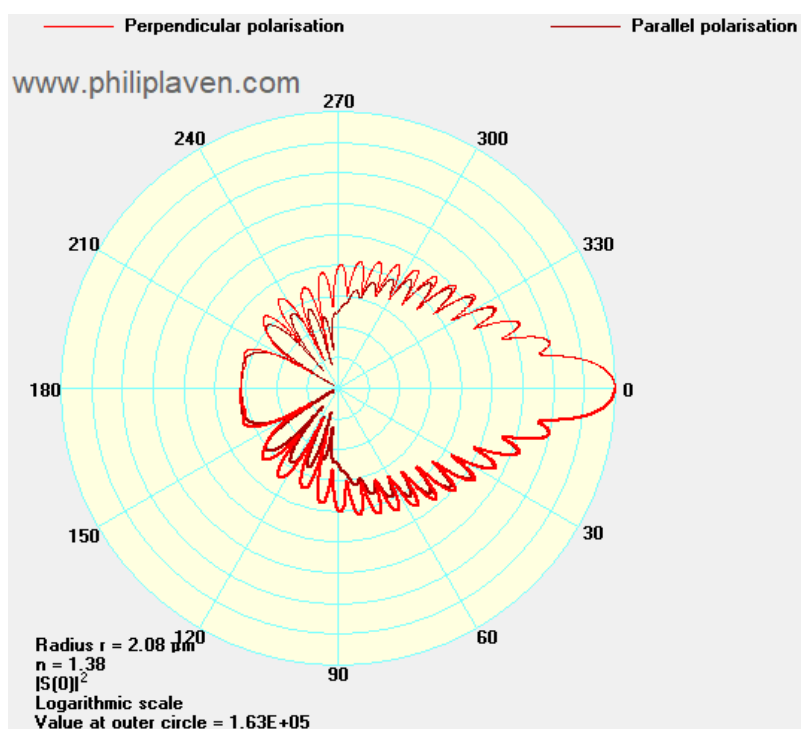


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности светорассеяния от угла в полярных координатах для перпендикулярно (обозначено красным) и параллельно (обозначено бордовым) поляризованного света. Угловое разрешение – 0,1, радиус сферы 2,08 мкм. Показатель преломления объекта -1,38. Показатель преломления среды 1,33

На рис. 2 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. 2 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. Рассеяние вперед превалирует над боковым. На интервале от 0° до 100° функция $S(\theta)$ имеет 20 максимумов для перпендикулярно поляризованного света.

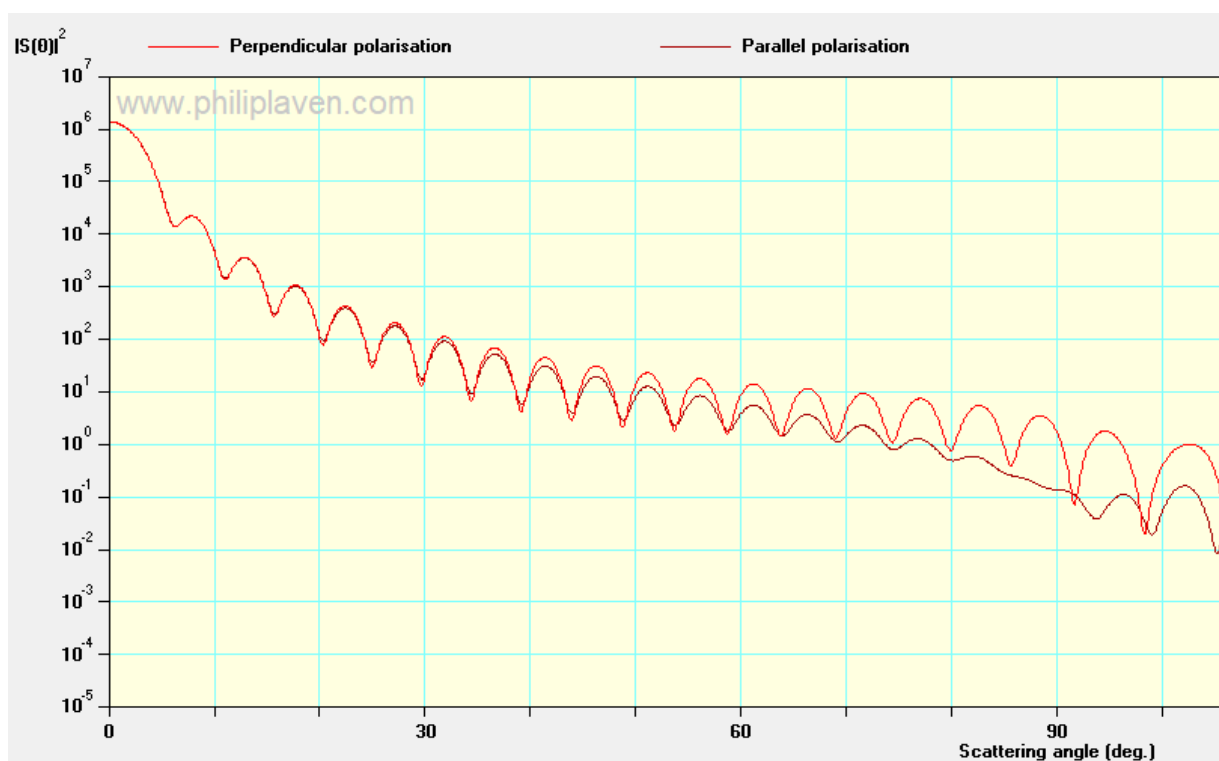


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности светорассеяния от угла в полярных координатах для перпендикулярно (обозначено красным) и параллельно (обозначено бордовым) поляризованного света. Угловое разрешение - 0,1, радиус сферы 3,12 мкм. Показатель преломления объекта -1,38. Показатель преломления среды 1,33

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° .

Раздел 3.2 Определение преаналитических и аналитических факторов, влияющих на исследование функциональной активности тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния посвящен изучению влияния переменных (концентрация бедной тромбоцитами плазмы, соотношение кровь/антикоагулянт, тип антикоагулянта и т.д.) на агрегацию и изменение формы тромбоцитов.

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. Коэффициенты вариации параметров для коллаген–индуцируемой агрегации приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Коэффициенты вариации параметров коллаген-индуцируемой агрегации у трех здоровых добровольцев

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.

Одной из характеристик любого диагностического метода, определяющей его ценность, является отдаленная (в пределах недели) воспроизводимость полученных при его использовании результатов. Для введения метода ЛАСКА в клиническую практику, а также для исследовательских целей была поставлена задача оценки отдаленной воспроизводимости результатов исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом ЛАСКА. Было обнаружено, что начальная скорость АДФ-индуцированной агрегации V_{ia} (рис. 3А) 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 3Б 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. 3В).

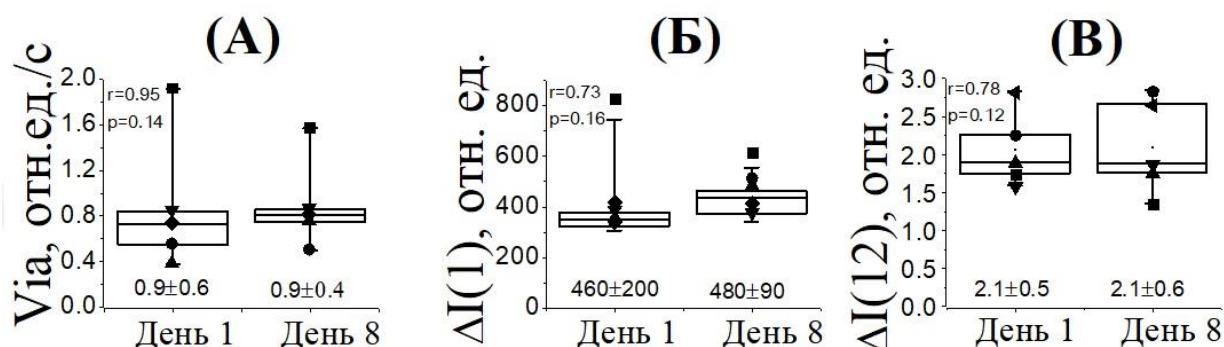


Рисунок 3 – Начальная скорость АДФ-индуцированной агрегации V_{ia} (А), амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ (В) и изменение формы $\Delta I(12)$ (С) стабильны в течение недели ($n=5$). Средние линии — медианы, рамки показывают 25–75 процентиля, полосы ошибок показывают интервалы 5–95 %. На уровне значимости $p=0,05$ все параметры существенно

не изменяются в пределах недели.

Все три параметра не изменились при повторном измерении через неделю (использовался парный t-критерий Стьюдента).

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

Графики зависимости параметров агрегации (начальная скорость агрегации, амплитуда изменения светорассеяния на 1° и 12° от соотношения кровь/цитрат представлены на рис. 4. Начальная скорость агрегации и амплитуда изменения светорассеяния на 1° не зависят от соотношения кровь/цитрат, а амплитуда изменения светорассеяния на 12° достоверно значимо снижена на 18% в пробе, в которой соотношение кровь/цитрат составляет девять к двум. Эти результаты демонстрируют, что недобранные образцы крови не могут быть исследованы в соответствии со стандартным протоколом.

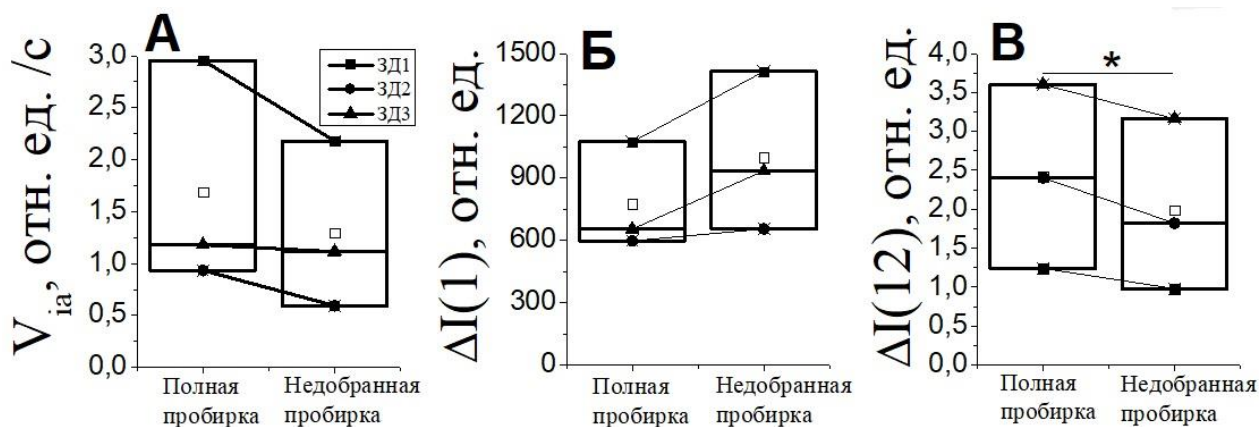


Рисунок 4 – Параметры агрегации (начальная скорость агрегации (А), амплитуда изменения светорассеяния на 1° (Б)) не зависят от соотношения кровь/цитрат, а изменение формы тромбоцитов снижается в пробе, в которой соотношение кровь/цитрат составляет 9/2 (В). ЗД – здоровый донор (n=5). Статистическая значимость отличий оценена парным t-критерием.

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. 5 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% (рис. 5А). 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 (Рис. 5Б), для $\Delta I(12)$ получили слабую зависимость с тенденцией на уменьшение этого параметра с ростом процентного содержания плазмы (Рис. 5В). Эти результаты позволяют предположить, что протокол анализа следует корректировать, если относительное содержание плазмы меньше 6%.

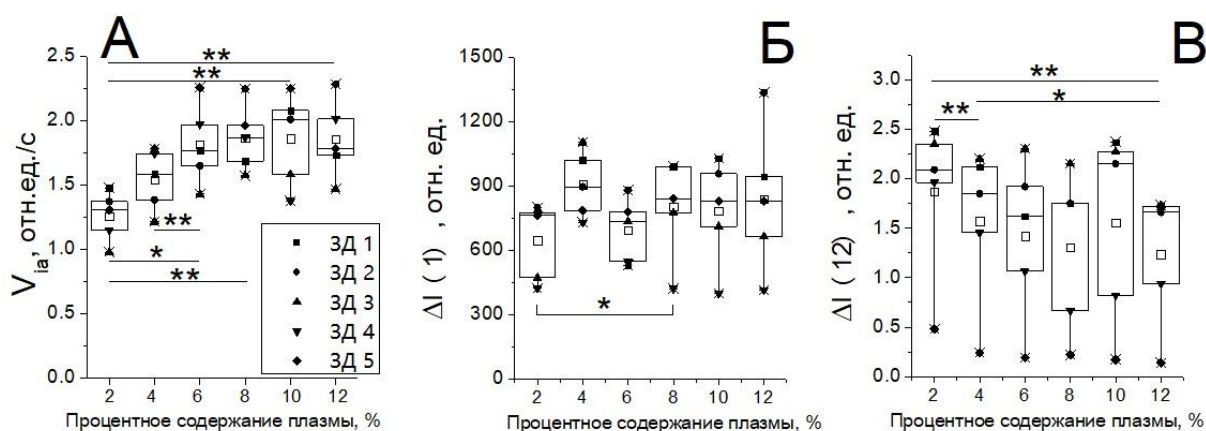


Рисунок 5 – Начальная скорость агрегации V_{ia} (А), амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ (Б) и изменение формы $\Delta I(12)$ (В) зависят от количества плазмы в образце. Статистика такая же, как на рисунке 3. Статистическая значимость показана звездочками: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$. ЗД – здоровый донор ($n=5$).

Исследование влияния аспирина и/или тикагрелора *in vitro* на агрегацию тромбоцитов при стимуляции АДФ показало, что начальная скорость агрегации тромбоцитов одинакова для контрольной пробы и проб, содержащих аспирин (рисунок 6 А). Параметр V_{ia} снижен в 1,7 раза в пробе с тикагрелором по сравнению с контрольной ($0,46 \pm 0,22$ отн.ед./с. и $0,78 \pm 0,30$ отн.ед./с соответственно). Исследования *in vitro* показали значимое снижение $\Delta I(1)$ в пробе, инкубированной со смесью тикагрелора с аспирином (140 ± 140 отн.ед.), а также в пробе, преинкубированной только с тикагрелором (70 ± 30 отн.ед.) по сравнению с контрольной пробой (460 ± 140 отн.ед.) ($p < 0,01$). На рисунке 6 Б показано, что амплитуда агрегации снижена в пробах, содержащих тикагрелор, по сравнению с пробой, содержащей аспирин (500 ± 270 отн.ед.) В данной постановке эксперимента изменение формы тромбоцитов не изменяется при преинкубировании тромбоцитов с

антиагрегантами (рисунок 6 В).

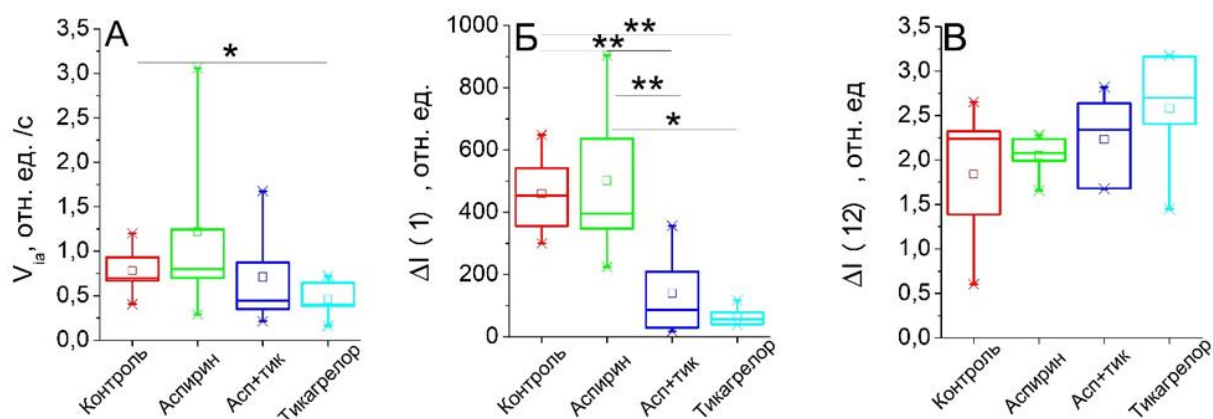


Рисунок 6 – Исследование влияния аспирина и/или тикагрелора на параметры агрегации тромбоцитов методом ЛАСКА при активации 800 нМ АДФ. А – Начальная скорость агрегации. Б – Амплитуда агрегации. В – Амплитуда изменения формы. Статистика как на рисунке 3.

Полученные результаты согласуются с представленными в статье [9], в которой показано, что при преинкубировании тромбоцитов с ингибитором рецептора P2Y₁₂ начальная скорость АДФ-индуцируемой агрегации снижается по сравнению с контрольным образцом.

Раздел 3.3 Оценка применимости метода малоуглового светорассеяния для использования в клинической практике посвящен определению параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов в когортах здоровых добровольцев и пациентов методом малоуглового светорассеяния.

Были проанализировали параметры агрегации и изменения формы тромбоцитов у здоровых взрослых и детей. Начальная скорость агрегации V_{ia} 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).

Мы проанализировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов с использованием метода ЛАСКА у пациентов с дефицитом альфа или плотных гранул (рис.

7). Никаких различий по V_{ia} , $\Delta I(1)$ и $\Delta I(12)$ между пациентами с дефицитом гранул и здоровыми детьми обнаружено не было. Световая трансмиссионная агрегометрия и ЛАСКА продемонстрировали хорошее согласие при оценке агрегации тромбоцитов у пациентов с дефицитом плотных гранул: отклонений в амплитуде АДФ-индуцированной агрегации не выявлено. 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 ЛАСКА, не отклонялись от значений контрольной группы. Как V_{ia} , так и $\Delta I(1)$ были значительно снижены у пациентов с тромбастенией Гланцмана по сравнению с контрольной группой педиатрических добровольцев. При этом изменение формы тромбоцитов при активации у пациентов с тромбастенией Гланцмана было таким же, как и в контрольной группе. У пациентов детского возраста с геморрагическим синдромом не выявлено значимых отклонений в параметрах агрегации и изменения формы тромбоцитов по сравнению с контрольной группой.

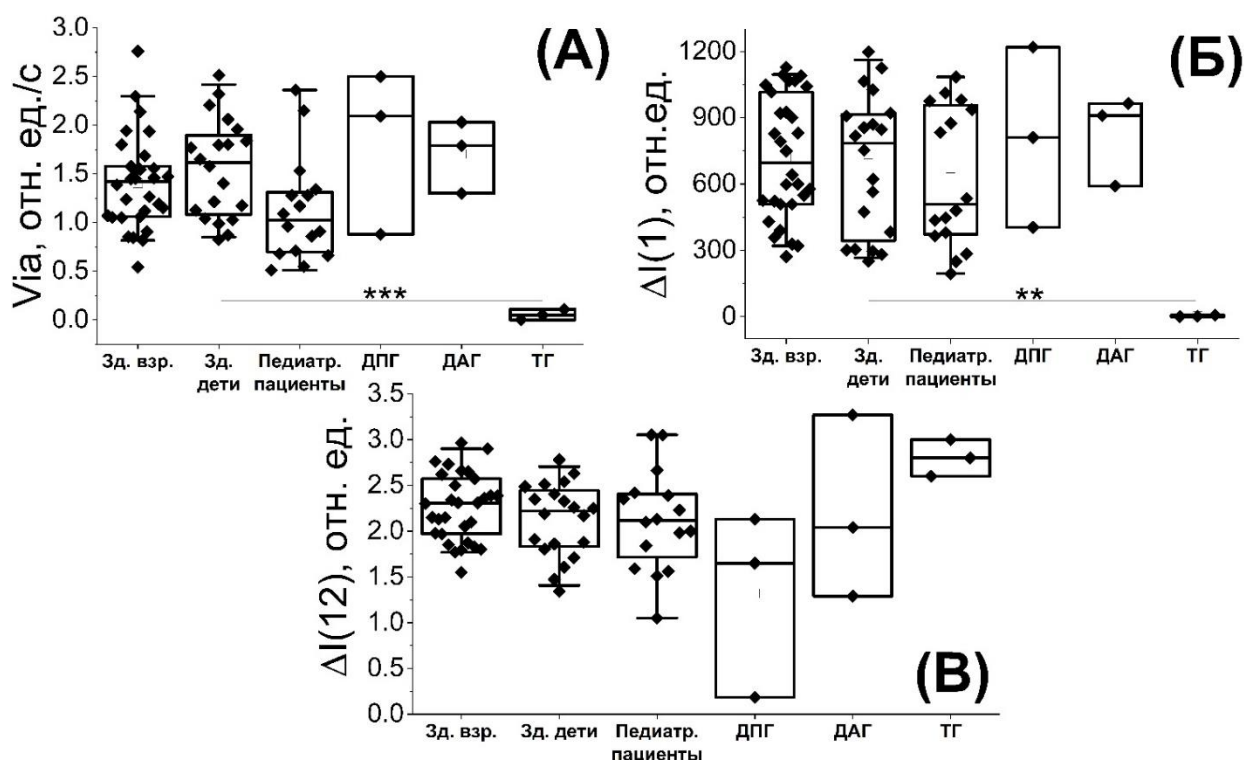


Рисунок 7 – Сравнение параметров АДФ-индуцированной агрегации и изменения формы тромбоцитов у здоровых взрослых (Зд. взр., $n = 30$), здоровых детей (Зд. дети, $n = 20$), пациентов детского возраста с геморрагическим синдромом (педиатр. пациенты, $n = 16$), пациентов детского возраста с дефицитом плотных гранул (ДПГ, $n=3$), пациенты с дефицитом альфа гранул (ДАГ, $n=3$), педиатрические пациенты с тромбастенией 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 3. Для сравнения средних между группами данных использовался метод ANOVA.

Для оценки практической значимости метода в клинической практике, а также в исследовательских целях была поставлена задача об исследовании агрегации тромбоцитов в когорте пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Было проведено исследование агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) на двойной антиагрегантной терапии ДАТТ в течении года наблюдения. На рисунке 8 представлено распределение параметров АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, измеренной методом ЛАСКА у пациентов с ОКС на ДАТТ в динамике. Агрегацию тромбоцитов исследовали методом ЛАСКА в 5 временных точках: день 0 (нагрузочная доза аспирина), день 1 (нагрузочная доза прасутгрела/тикагрелора), а также на 7-й, 30-й и 180-й дни терапии поддерживающей дозой. Выяснили, что V_{ia} значимо снижена на 40% в первый день исследования по сравнению с нулевым днем измерений. Начальная скорость агрегации составила $1,0 \pm 0,7$ (среднее $\pm$ средн. кв. откл.) отн. ед./с в 0-ой день и $0,6 \pm 0,5$ отн. ед./с на 1-ый день измерений (рис. 8А). Было получено, что амплитуда АДФ – индуцированной агрегации снижена в три раза в первый день (130 ± 180 отн. ед., среднее $\pm$ средн. квадратичное отклонение) по сравнению с нулевым днем (410 ± 250 отн. ед.) и оставалась на том же уровне в течение полугода наблюдения ($p < 0,05$) (рисунок 8 Б). Изменение формы при активации тромбоцитов АДФ значимо не изменяется в течение полугода наблюдения ($p > 0,05$) (рисунок 8 В).

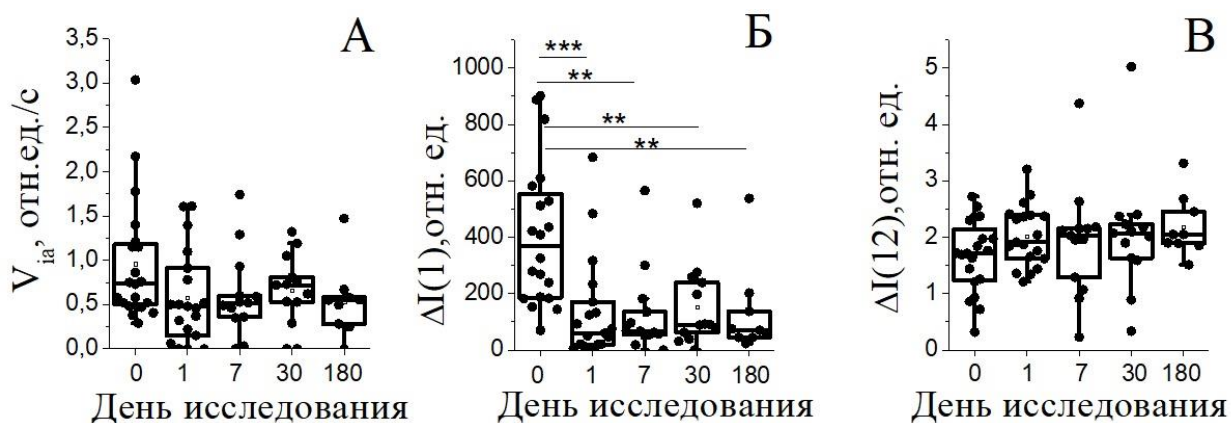


Рисунок 8 – Зависимость параметров АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов измеренной методом ЛАСКА у пациентов с ОКС на ДАТТ от времени. А- Начальная скорость агрегации тромбоцитов значимо не изменяется в течении года наблюдения. Б- Амплитуда АДФ- индуцированной агрегации значимо снижается от 0 дня исследования к

30-му. В- Изменение формы тромбоцитов не зависит от продолжительности приема ДАТТ. Статистика как на рис. 3. Уровень значимости * введен для $p < 0,05$.

Полученные данные находятся в соответствии с результатами, описанными [9]: в этой статье было показано, что через 24 часа после приема клопидогреля (в дозе 600 мг) здоровым добровольцем агрегация в ответ на АДФ снижается.

Предпоследний пункт раздела 3.3 посвящен описанию результатов по оценке агрегационной способности тромбоцитов у пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой (КГЭ)/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 [14], была поставлена задача об исследовании агрегации тромбоцитов методом лазерного малоуглового светорассеяния 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. 9). Однако у нескольких пациентов с КГЭ/СКМ наблюдалось серьезное нарушение агрегации тромбоцитов, вызванной коллагеном. Полученные результаты находятся в согласии с результатами исследования Карр и соавторов [15], где показано, что у двух обследованных пациентов с КГЭ наблюдались тяжелые нарушения агрегации тромбоцитов в разные моменты течения заболевания.

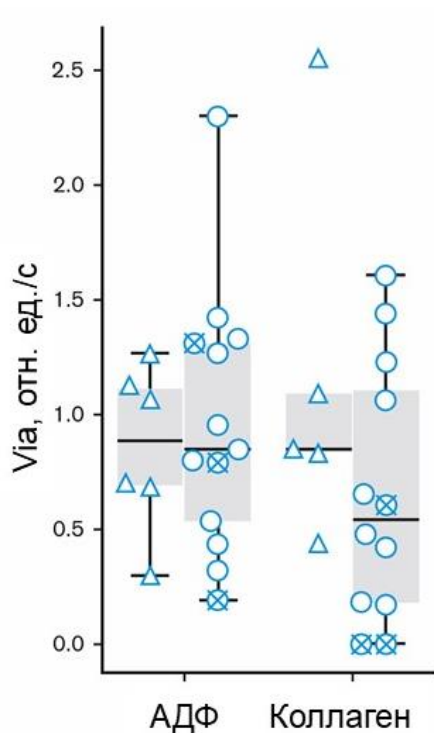


Рисунок 9 – Начальные скорости агрегации тромбоцитов, индуцированные 800 нМ АДФ или 20 мкг/мл коллагена. Анализ тромбоцитов в образцах крови здоровых детей (треугольники) и больных КГЭ/СКМ с (кружки) или без (крестики) гематологического ответа на терапию. Статистическую значимость рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни; * $p < 0,05$.

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.

Раздел 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 посвящен корреляционному анализу маркеров активации и агрегации тромбоцитов. Был проведен корреляционный анализ маркеров активации тромбоцитов (CD62p – экспрессия P-селектина и PAC-1 – активированная форма гликопротеина IIbIIIa) при сильной (смесь CRP+SFLLRN) активации, измеренной методом проточной цитометрии, и агрегации тромбоцитов с АДФ, измеренной методом ЛАСКА. Когорте здоровых добровольцев старше 18 лет были поставлены оба теста. На рис. 8 представлена корреляция параметров агрегации тромбоцитов и маркеров их активации.

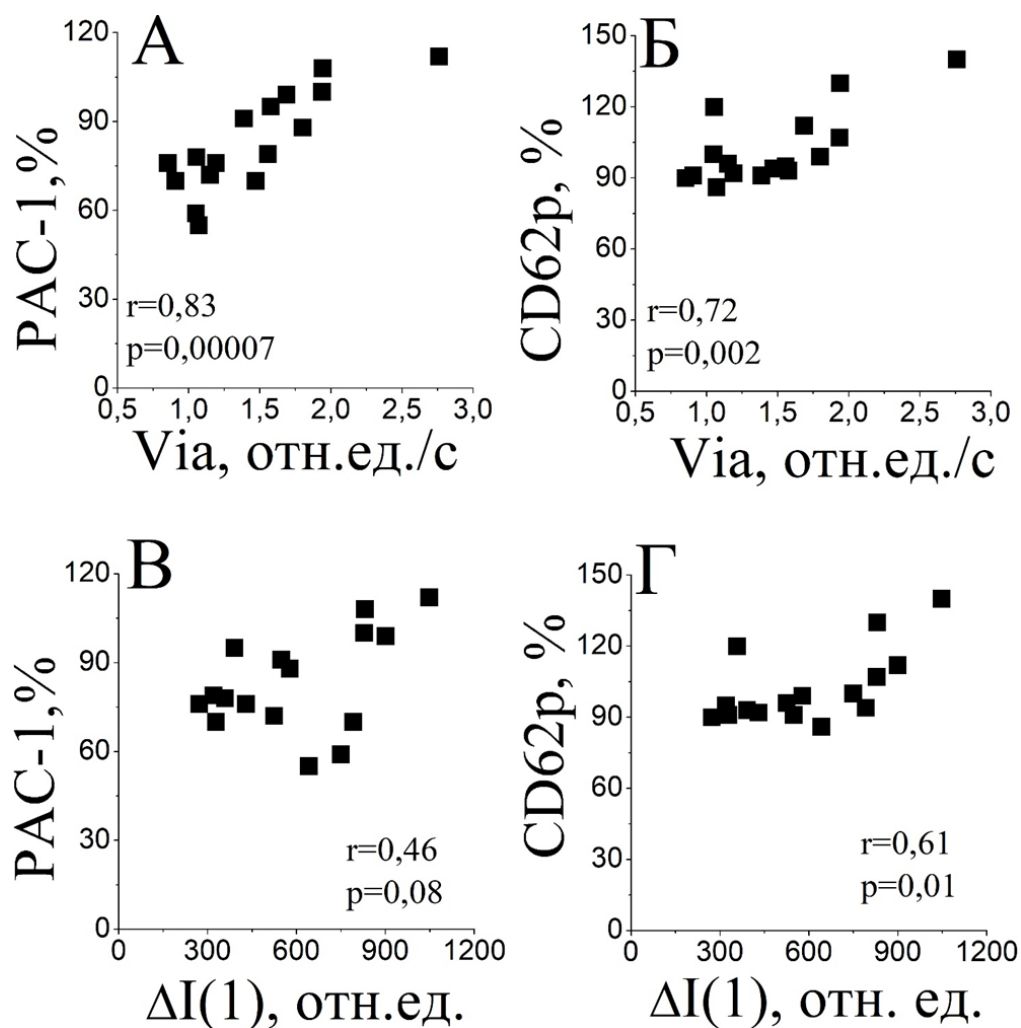


Рисунок 10 – Корреляция между параметрами агрегации и маркерами активации тромбоцитов в группе здоровых взрослых. А – корреляция начальной скорости агрегации тромбоцитов и уровня экспрессии PAC-1; Б – корреляция начальной скорости агрегации тромбоцитов и уровня экспрессии CD62p; В – корреляция амплитуды агрегации тромбоцитов и уровня экспрессии PAC-1; Г – корреляция амплитуды агрегации тромбоцитов и уровня экспрессии CD62p. Для проточной цитометрии тромбоциты активировали смесью коллаген-родственного пептида (CRP) и активирующего PAR-1 пептида SFLLRN.

Рисунок 10А демонстрирует очень сильную положительную корреляцию начальной скорости агрегации и уровня PAC-1 ($r=0,83$, $p=0,00007$). На рис. 10Б представлена сильная корреляция Via с уровнем CD62p ($r=0,72$, $p=0,02$). Амплитуда агрегации умеренно коррелирует с уровнем PAC-1: коэффициент корреляции 0,46, а уровень достоверности 0,08 (рис. 10В). Сильная положительная связь также установлена между амплитудой агрегации и уровнем Р-селектина: $r=0,61$, $p=0,01$ (рис. 10Г).

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. 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 pH и концентрацией кальция.

Корреляция начальной скорости АДФ-индуцированной агрегации, измеренной по ЛАСКА, 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. 11А). 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. 11Б). Эти данные позволяют предположить, что некоторые параметры ЛАСКА предоставляют информацию, аналогичную СТА, в то время как другие предоставляют независимую информацию, что может быть обусловлено разными условиями проведения тестов.

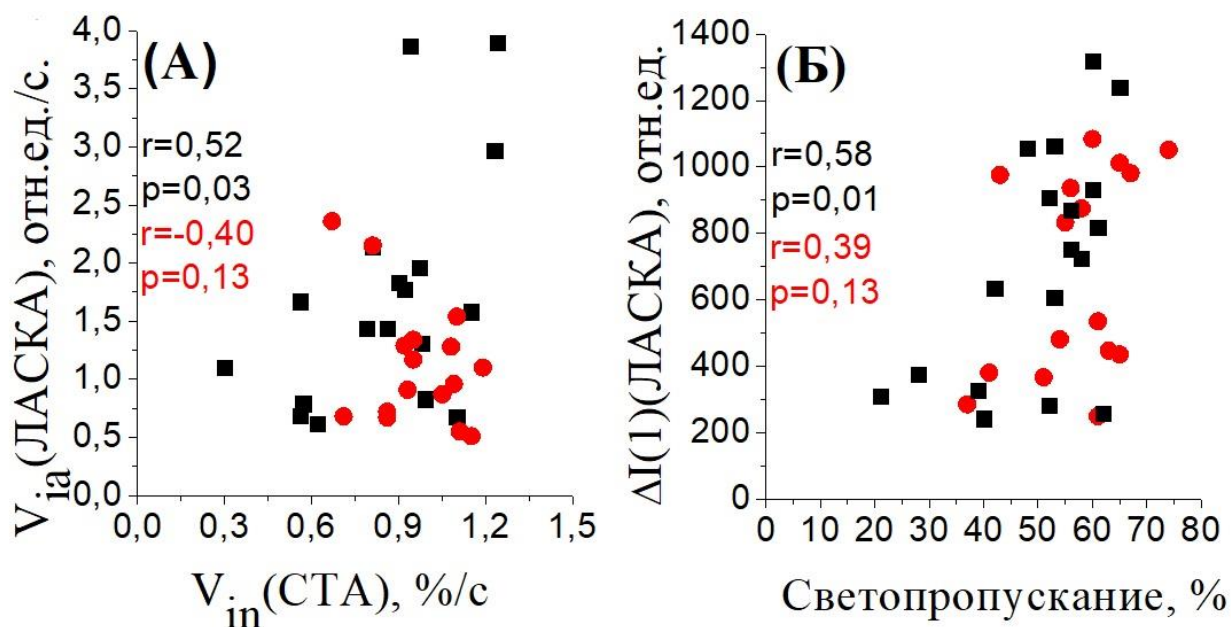


Рисунок 11 – Корреляция параметров, полученных с помощью ЛАСКА и СТА для здоровых детей (черные квадраты, $n = 18$) и детей с геморрагическим синдромом (красные кружки, $n = 16$). График зависимости начальной скорости агрегации, измеренной на малоугловом анализаторе, от начальной скорости агрегации, 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 .

В **Заключении** диссертации излагаются итоги выполненного исследования, выводы, рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И 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 тромбастенией Гланцмана и афибриногенемией, а также действенен в мониторинге эффективности двойной антиагрегантной терапии у пациентов с ОКС.

Список публикаций автора по теме диссертации

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, RSCI:

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. – pp. 717-724. DOI: [10.1007/s12185-024-03859-0](https://doi.org/10.1007/s12185-024-03859-0); EDN: ERXOXK; Импакт-фактор 3,9 (Scopus)/ Объем: 0,90 печ. л./ Вклад соискателя: 0,72 печ.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. – Т. 20, №4. – С. 386-400. DOI: [10.20996/1819-6446-2024-3065](https://doi.org/10.20996/1819-6446-2024-3065); EDN: VLJLAP; Импакт-фактор 1,282 (РИНЦ)/ Объем: 0,38 печ.л./ Вклад соискателя 0,076 печ.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. – pp. 4936-4949. DOI: [10.1182/bloodadvances.2022009590](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022009590); EDN: UZDPXY; Импакт-фактор 11,7 (Scopus)/Объем: 1,57 печ.л./ Вклад соискателя 0,314 печ.л.
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. – С. 191-198. DOI:[10.24287/1726-1708-2021-20-4-191-198](https://doi.org/10.24287/1726-1708-2021-20-4-191-198) EDN: QNWFYS; Импакт-

фактор 0,510 (РИНЦ)/ Объем: 0,90 печ.л./ Вклад соискателя 0,27 печ.л.

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](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69173-x) EDN: PGFZIK; Импакт-фактор 6,7 (Scopus)/ Объем: 1,13 печ.л./ Вклад соискателя 0,339 печ.л.
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](https://doi.org/10.31857/S0320972520100140). EDN: WWCPAX; Импакт-фактор 0,908 (РИНЦ)/ Объем: 1,22 печ.л./ Вклад соискателя 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 (Moscow), 2020.– vol. 85, № 10.– pp. 1267–1276. DOI: [10.1134/S0006297920100144](https://doi.org/10.1134/S0006297920100144) EDN: XZSEJW; Импакт-фактор 3,8 (Scopus)/ Объем: 1,10 печ.л./ Вклад соискателя 0,33 печ.л.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Santos-Gallego C. G., Badimon J. Overview of Aspirin and Platelet Biology. // The American journal of cardiology . –2021. Vol. 144 Suppl 1. – pp. S2–S9.
2. Шиффман Ф. Патопфизиология крови. – Москва: Издательство БИНОМ, 2001. – 448 с.
3. Пантелеев М., Свешникова А. Тромбоциты и гемостаз // Онкогематология. – 2014. – Т. 9. № 2.– С. 65–73.
4. Мазуров А. В. Физиология и патология тромбоцитов.– Москва: Литтерра, 2011.– 456 с.
5. Zeidan A. M. [et al]. Platelet function testing: state of the art. // Expert review of cardiovascular therapy. – 2007. – Vol. 5. no. 5. – pp. 955–967.
6. Favaloro E. J., Lippi G., Franchini M. Contemporary platelet function testing. // Clinical chemistry and laboratory medicine. – 2010. – Vol. 48. no. 5.– pp. 579–598.

7. Mindukshev I. [et al]. 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. – Vol. 19. – pp. 235–246.
8. Деркачев Э. Ф. и др. Способ исследования активации и агрегации тромбоцитов: Патент RU 2108579 C1 6 G01 N 33/49.—1998 // БИ № 10 (II).
9. Mindukshev I. [et al]. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. // Clinical chemistry and laboratory medicine . –2012. – Vol. 50. no. 7. – pp. 1253–1262.
10. Mindukshev I. [et al]. Platelet Hemostasis Reactions at Different Temperatures Correlate with Intracellular Calcium Concentration. // International journal of molecular sciences. –2022. – Vol. 23. no. 18.– pp. 10667
11. Reiss C. [et al]. The sGC stimulator riociguat inhibits platelet function in washed platelets but not in whole blood. // British journal of pharmacology. –2015. – Vol. 172. no. 21. – pp. 5199–5210.
12. Sharina I. G. [et al]. The fibrate gemfibrozil is a NO- and haem-independent activator of soluble guanylyl cyclase: in vitro studies. // British journal of pharmacology. – 2015. – Vol. 172. no. 9. – pp. 2316–2329.
13. Beck F. [et al]. Temporal quantitative phosphoproteomics of ADP stimulation reveals novel central nodes in platelet activation and inhibition. // Blood. – 2017. – Vol. 129. no. 2. – pp. e1–e12.
14. Cattaneo M. [et al]. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. // Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.– 2013. Vol.11. no. 6. – pp. 1183-1189.
15. Kapp F. G. [et al]. Comprehensive Analyses of Coagulation Parameters in Patients with Vascular Anomalies. // Biomolecules. – 2022. – Vol. 12. no. 12. – pp. 1840.