

Федеральное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем  
физико-химической фармакологии РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный  
медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и  
иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской  
Федерации



На правах рукописи

ФИЛЬКОВА Александра Андреевна

**Исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов  
человека и разработка методики диагностики состояния  
тромбоцитарного гемостаза на его основе**

1.5.2. Биофизика

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
доктор физико-математических наук  
А.Н. Свешникова  
кандидат медицинских наук  
С.А. Плясунова

Москва – 2023

## Оглавление

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Введение .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Глава 1. Обзор литературы .....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1 Биофизика гемостаза.....   | 11        |
| 1.1.1 Система гемостаза.....   | 11        |
| 1.1.1.1 Плазменное звено гемостаза .....   | 11        |
| 1.1.1.2 Тромбоцитарное звено гемостаза.....  | 16        |
| 1.1.2 Механизмы активации тромбоцитов.....   | 18        |
| 1.1.2.1 Сильная активация тромбоцитов .....  | 18        |
| 1.1.2.2 Слабая активация тромбоцитов.....  | 20        |
| 1.1.3 Механизмы агрегации тромбоцитов .....  | 21        |
| 1.1.4 Феномен обратимой агрегации тромбоцитов .....  | 22        |
| 1.2 Существующие подходы к клинико-лабораторной диагностике состояния системы гемостаза.....   | 24        |
| 1.2.1 Методы оценки состояния плазменного звена .....  | 24        |
| 1.2.2 Методы оценки состояния тромбоцитарного звена .....  | 27        |
| 1.2.3 Агрегометрия.....  | 30        |
| 1.2.3.1 Диагностика функциональности тромбоцитов методом агрегометрии  | 32        |
| 1.2.3.2 Ответы на различные индукторы агрегации в агрегометрии .....   | 33        |
| 1.2.4 Типичные результаты агрегометрии, наблюдаемые при тромбоцитопатиях.....  | 38        |
| 1.2.5 Вариации агрегометрии.....   | 41        |
| 1.2.6 Агрегометрия как основной метод анализа функциональности тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом при двойной антитромбоцитарной терапии..... | 42        |
| 1.2.7 Оценка кровоточивости пациентов после операции трансуретральной резекции   | 44        |
| <b>Постановка задачи .....</b>   | <b>46</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Глава 2. Материалы и методы.....</b>   | <b>47</b> |
| 2.1 Материалы .....   | 47        |
| 2.2 Пациенты.....   | 47        |
| 2.3 Методы .....  | 48        |
| 2.3.1 Выделение тромбоцитов из цельной крови.....   | 48        |
| 2.3.2 Постановка агрегометрии.....  | 50        |
| 2.3.3 Метод флуктуаций светопропускания.....  | 50        |
| 2.3.4 Проточная цитофлуориметрия .....  | 51        |
| 2.3.5. Измерение концентрации тромбоксана A2 .....  | 52        |
| 2.3.6. Микроскопия агрегатов .....  | 52        |
| 2.3.7 Моделирование в среде CComplex PAtHway SImulator .....  | 52        |
| 2.3.8 Анализ данных .....   | 53        |
| <b>Глава 3. Результаты.....</b>   | <b>54</b> |
| 3.1 Условия наблюдения обратимой агрегации.....   | 54        |
| 3.1.1 Результаты компьютерного моделирования обратимой агрегации.....   | 56        |
| 3.1.2 Зависимость характера агрегации от активации тромбоцитов .....  | 62        |
| 3.1.3 Влияние температуры на агрегацию тромбоцитов.....   | 64        |
| 3.1.4 Зависимость агрегации от концентрации тромбоцитов.....  | 67        |
| 3.1.5 Влияние ионов кальция в суспензии на характер агрегационной кривой  | 68        |
| 3.1.6 Необходимость синтеза тромбоксана A2 для поддержания необратимой агрегации.....                                   | 69        |
| 3.1.7 Влияние физиологической концентрации ионов кальция на активацию тромбоцитов арахидоновой кислотой .....           | 72        |
| 3.1.8 Влияние физиологической концентрации ионов кальция на наполнение кальциевых депо тромбоцита после активации ..... | 72        |
| 3.1.9 Зависимость активации фосфолипазы A2 $\gamma$ при физиологической концентрации ионов кальция .....                | 74        |
| 3.2 Разработка теста обратимой агрегации тромбоцитов .....  | 76        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3 Исследование состояния гемостаза пациентов с тромбоцитопатиями ..                        | 78        |
| 3.4 Исследование состояния гемостаза пациентов с острым коронарным синдромом.....            | 80        |
| 3.5 Исследование состояния гемостаза пациентов после операции трансуретральной резекции..... | 82        |
| <b>Глава 4. Обсуждение .....</b>   | <b>87</b> |
| 4.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертации .....                                  | 90        |
| 4.2 Итоги выполнения диссертационного исследования.....                                      | 91        |
| <b>Выводы.....</b>   | <b>93</b> |
| <b>Практические рекомендации.....</b>  | <b>94</b> |
| <b>Список сокращений и условных обозначений.....</b>   | <b>95</b> |
| <b>Благодарности.....</b>  | <b>97</b> |
| <b>Список литературы.....</b>  | <b>99</b> |

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Гемостаз представляет собой процесс остановки кровотечения в результате повреждения кровеносного сосуда. В системе гемостаза принято выделять три составляющих: вазоконстрикцию – сужение сосуда в месте повреждения, тромбоцитарный гемостаз – формирование тромбоцитами стабильного агрегата, перекрывающего кровопотерю, и плазменный гемостаз – каскад реакций между компонентами плазмы крови, направленный на превращение белка фибриногена в фибрин и его полимеризацию для «желирования» плазмы и укрепления тем самым тромбоцитарного агрегата.

Нарушения в работе системы гемостаза сопровождают многие патологические процессы. Они могут быть обусловлены как наследственными причинами, так и возникать при онкологических, кардиологических, неврологических, метаболических и иммунологических патологиях, а также сопровождать различные виды шока, терминальные состояния, хирургические вмешательства и обширные травмы. Нарушения в работе системы гемостаза характеризуются высокой потенциальной опасностью для пациента, поэтому при любых хирургических вмешательствах проводится обязательная диагностика состояния системы гемостаза.

Для оценки состояния системы гемостаза наряду с тестами на оценку плазменного звена проводятся тесты функциональности тромбоцитов. Они основаны на оценке способности тромбоцитов к формированию стабильного агрегата. Для выполнения данной функции на поверхности тромбоцитов присутствуют специфичные к агонистам рецепторы. Агонисты могут быть нерастворимые, например, коллаген, либо растворимые, такие как тромбин, серотонин, адреналин и АДФ. При взаимодействии агониста со специфичным к нему рецептором запускается внутриклеточная сигнализация внутри тромбоцита – происходит его активация. Это в дальнейшем приводит к активации интегринов, которые используются для соединения двух тромбоцитов в агрегат, перекрывающий место повреждения сосуда. Для поддержания стабильности

агрегата в результате активации тромбоцита также происходит синтез тромбоксана А<sub>2</sub> и секреция содержимого внутриклеточных гранул, которые дополнительно активируют тромбоциты. Таким образом, агрегация тромбоцитов является сложным многоступенчатым процессом, и в современной практике для оценки состояния тромбоцитарного гемостаза исследуются только интегральные характеристики данного процесса.

**Степень её разработанности.** В настоящее время классическим методом оценки состояния тромбоцитарного гемостаза является световая турбидометрическая агрегометрия – метод наблюдения агрегации тромбоцитов в ответ на добавление активатора через изменение светопропускания перемешиваемой суспензии тромбоцитов при образовании агрегатов. Традиционно антикоагулянтом для взятия крови для теста агрегометрии является цитрат натрия, с высокой афинностью связывающий ионы кальция и предотвращающий образование тромбина в результате активации плазменного звена. Однако, это делает систему не физиологичной, так как в плазме крови присутствует 1,1-1,5 мМ свободных ионов кальция. Известно, что ионы кальция необходимы для полноценной активации тромбоцитов, поэтому наблюдение процесса агрегации в их отсутствие не соответствует физиологическому состоянию. Кроме того, данный тест до сих пор имеет существенные недостатки, такие как широкая вариабельность результатов и большая чувствительность к преаналитическим процессам. В связи с этим, наблюдение агрегации тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция может позволить получить более точную информацию о состоянии тромбоцитарного гемостаза. При использовании антикоагулянтов, не связывающих кальций, происходит ослабление образования агрегатов тромбоцитов, и наблюдается феномен обратимой агрегации – спонтанный распад агрегата на отдельные тромбоциты. Изучение феномена обратимой агрегации позволит определить ранее неизвестные механизмы агрегации тромбоцитов, роль ионов кальция в данном процессе, а также даст возможность разработать новый, более чувствительный к определению функциональной активности тромбоцитов, протокол агрегометрии.

Поэтому актуальной задачей является всестороннее исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов.

**Цель и задачи исследования.** Цель диссертационной работы – исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе.

**Задачи:**

1. Подбор условий наблюдения обратимой агрегации тромбоцитов и анализ их влияния на механизмы процесса.
2. Определение последовательности событий и механизмов процесса дезагрегации тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии.
3. Разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на основе феномена обратимой агрегации тромбоцитов.
4. Исследование обратимой агрегации тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом, находящихся на двойной антитромбоцитарной терапии.
5. Исследование корреляции степени обратимой агрегации тромбоцитов с рисками кровотечений во время операции трансуретральной резекции.

**Научная новизна.** Феномен обратимой агрегации тромбоцитов определен как явление в 60х годах XX века [1]. Данное явление наблюдалось в ответ на индуктор агрегации АДФ. Несмотря на многочисленные гипотезы, механизмы явления дезагрегации тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция до сих пор неизвестны.

Одна из теорий предполагает инактивацию тромбоцитарных интегринов (гликопротеин IIb-IIIa) через несколько минут после активации, что приводит к дестабилизации агрегата [2]. Другая гипотеза утверждает, что активатор (АДФ) расщепляется эктонуклеотидазами на поверхности тромбоцитов, что приводит к снижению концентрации активатора и дестабилизации агрегата [3]. Согласно третьей гипотезе, которой придерживается автор данной диссертации, агрегат стабилизируется синтезируемым тромбоксаном A<sub>2</sub>, производство которого по неизвестной причине ингибируется при физиологической концентрации ионов

кальция в среде [4]. В настоящей работе впервые предложен молекулярный механизм, позволяющий объяснить феномен обратимой агрегации. Предполагаются объясняющие все наблюдаемые явления причины дезагрегации тромбоцитов и влияние ионов кальция в суспензии на данный процесс.

Также в данной работе впервые предложен и апробирован метод диагностики агрегационного потенциала тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии.

**Научно-практическое значение** результатом исследования стала разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на основе феномена обратимой агрегации. Параметры нового протокола теста агрегометрии имеют предсказательную способность о рисках кровотечений пациентов во время операции трансуретральной резекции, а также чувствительны к восстановлению функциональной активности тромбоцитов пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии. Выяснение молекулярных механизмов дезагрегации обладает значительным трансляционным потенциалом, так как на основе этих знаний возможна разработка методики подбора персонализированной антитромбоцитарной терапии.

**Методология и методы исследования.** Для исследования феномена обратимой агрегации использовался метод световой турбидометрической агрегометрии. Кроме того, полученные данные были подтверждены методом проточной цитометрии. Исследование формирования агрегатов было проведено с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Для анализа характера агрегационных кривых использовалось компьютерное моделирование в среде COPASI.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Феномен обратимой агрегации тромбоцитов наблюдается в тесте агрегометрии в ответ на активацию АДФ или комбинацией серотонина и адреналина при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии. Снижение концентрации тромбоцитов в суспензии и повышение температуры проведения эксперимента сокращают время дезагрегации тромбоцитов.

2. Необратимость агрегации тромбоцитов в отсутствие физиологической концентрации ионов кальция в суспензии обеспечивается синтезом тромбоксана A<sub>2</sub>, предположительно инициируемым в результате активности фосфолипазы A<sub>2</sub>γ, вызванной опустошением внутриклеточных депо кальция в тромбоцитах.

3. Разработанная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов позволяет выделить группу пациентов с повышенными рисками кровопотери во время операции трансуретральной резекции, а также обладает чувствительностью к восстановлению функциональной активности тромбоцитов в течение года у пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии.

**Личный вклад автора.** Все работы по исследованию механизмов обратимой агрегации тромбоцитов методами агрегометрии, цитометрии и конфокальной микроскопии, обработка и анализ результатов экспериментов, проведенных для выявления механизмов феномена, и обработка и анализ результатов клинических тестов, проведенных пациентам, а также написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились либо лично автором, либо при непосредственном участии автора.

**Достоверность и обоснованность результатов.** Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых методов, таких как световая турбидометрическая агрегометрия, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия. Также достоверность результатов обеспечивалась использованием аттестованных средств измерения, удовлетворительной оценкой погрешности измерений, согласованием полученных результатов с литературными данными, а также согласованием данных, полученных различными методами исследования.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ-2018». Секция «Физика», Москва, Россия, 9-13 апреля 2018, устный доклад; Международная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, Республика Беларусь, 28-30 Июня, 2018;

XIII Международная научная конференция «Современные проблемы биологической физики и химии. БФФХ-2018», г.Севастополь, 18 сентября, 2018; European Congress on Thrombosis and Haemostasis, Марсель, Франция, 23 октября, 2018; XXVI Международная конференция «МАТЕМАТИКА. КОМПЬЮТЕР. ОБРАЗОВАНИЕ», Пущино, Россия, 28 января-02 февраля, 2019; XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019». Секция «Физика», Москва, Россия, 8-12 апреля 2019, 3 устных доклада; Рецепторы и внутриклеточная сигнализация, Пущино, Россия, 20-24 мая 2019; The FEBS congress, Краков, Польша 6-11 июля, 2019; II Объединенный научный форум VI съезд физиологов СНГ, Дагомыс, Россия, 1-6 октября 2019; ECTH, Дублин, 2019; Конференция «Математика. Компьютер. Образование», Дубна, Россия, 2020, 2 доклада; «Математика и математическое моделирование», Саров, Россия, 2020; ISTH 2020; «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем, Минск, 2020, 2 доклада; EUPLAN Congress, Милан, Италия, 2022.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 16 публикаций, из них статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России – 10; публикаций в трудах конференций и съездов – 6.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), результатов (глава 3), обсуждения (глава 4), заключение, выводы, список сокращений и обозначений, благодарности и список цитированной литературы (160 библиографических ссылок). Работа содержит 44 рисунка и 3 таблицы.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Биофизика гемостаза

#### 1.1.1 Система гемостаза

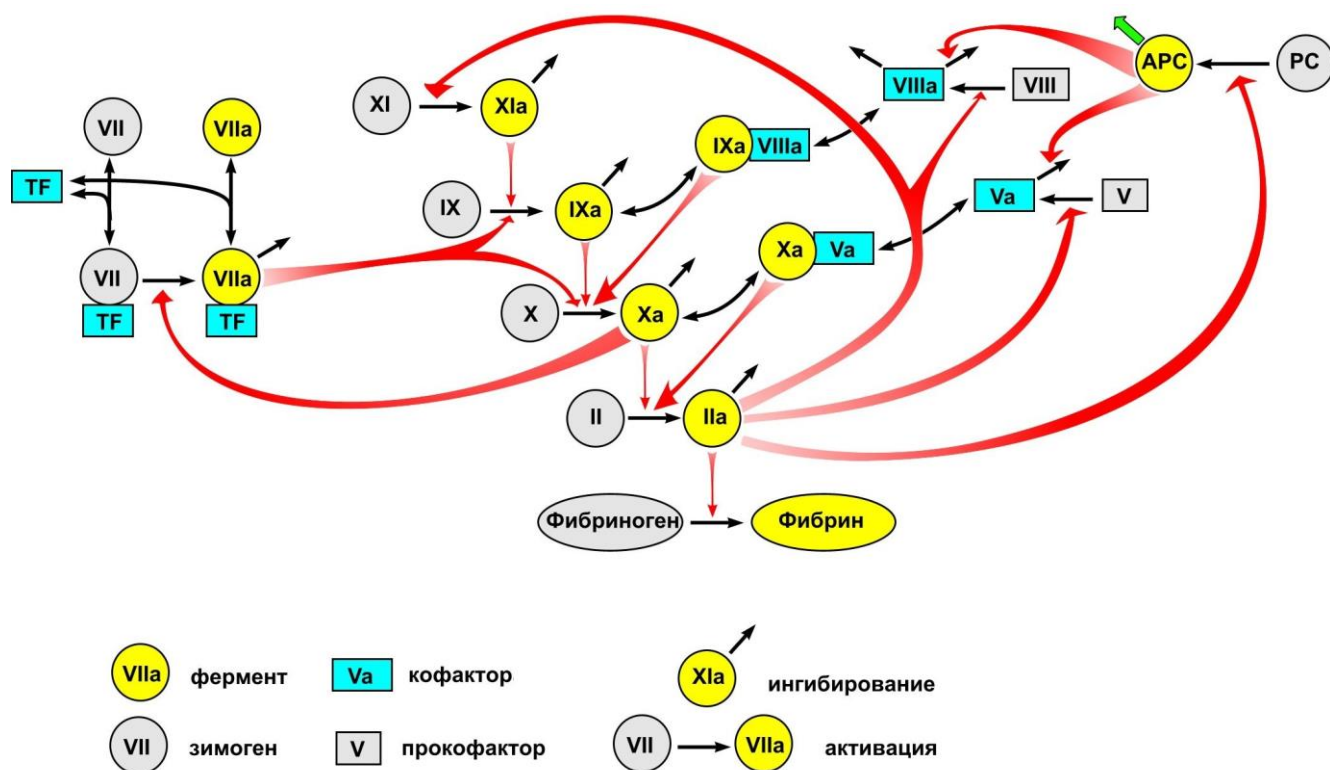
##### 1.1.1.1 Плазменное звено гемостаза

Гемостаз делится на три составляющих: вазоконстрикцию – сужение сосуда в месте повреждения, тромбоцитарный гемостаз – формирование тромбоцитами пробки, перекрывающей путь потере крови, и плазменный гемостаз – каскад реакций, направленный на превращение фибриногена в фибрин и его полимеризацию с образованием фибриновой «сети» [5, 6]. Белки, участвующие в этом каскаде, называются факторами свертывания крови и нумеруются в порядке официального открытия (приставка «а» означает активную форму белка, обычно в организме белки находятся в неактивной форме).

Главная цель плазменного гемостаза заключается в превращении жидкой компоненты крови – плазмы – в гель [5]. Трёхмерная «сеть», создаваемая при полимеризации молекул фибрина, предотвращает протекание жидкой компоненты крови за счет способности удерживания воды, многократно превосходящей ее по массе [6]. Поэтому реакции превращения фибриногена в фибрин, и его последующая полимеризация являются важными частями системы свертывания крови. Для осуществления этих реакций необходима целая система регуляции для того, чтобы свертывание происходило в нужный момент и в нужном месте. Для этого предназначен каскад ферментативных реакций, в основе которого лежат процессы последовательной активации сериновых протеиназ, зацикленные многочисленными петлями положительными и отрицательными обратными связями (Рисунок 1) [5, 6].

За активацию каскада реакций свертывания плазмы крови отвечает в первую очередь фермент «внешняя теназа» – комплекс тканевого фактора (ТФ) и фактора VIIa [7]. Фактор VIIa – сериновая протеиназа, присутствующая в крови в небольшом количестве, и сама по себе обладающая слабой ферментативной

активностью. Чтобы приобрести полную ферментативную активность, фактору VIIa необходим кофактор, в роли которого выступает тканевый фактор [8].



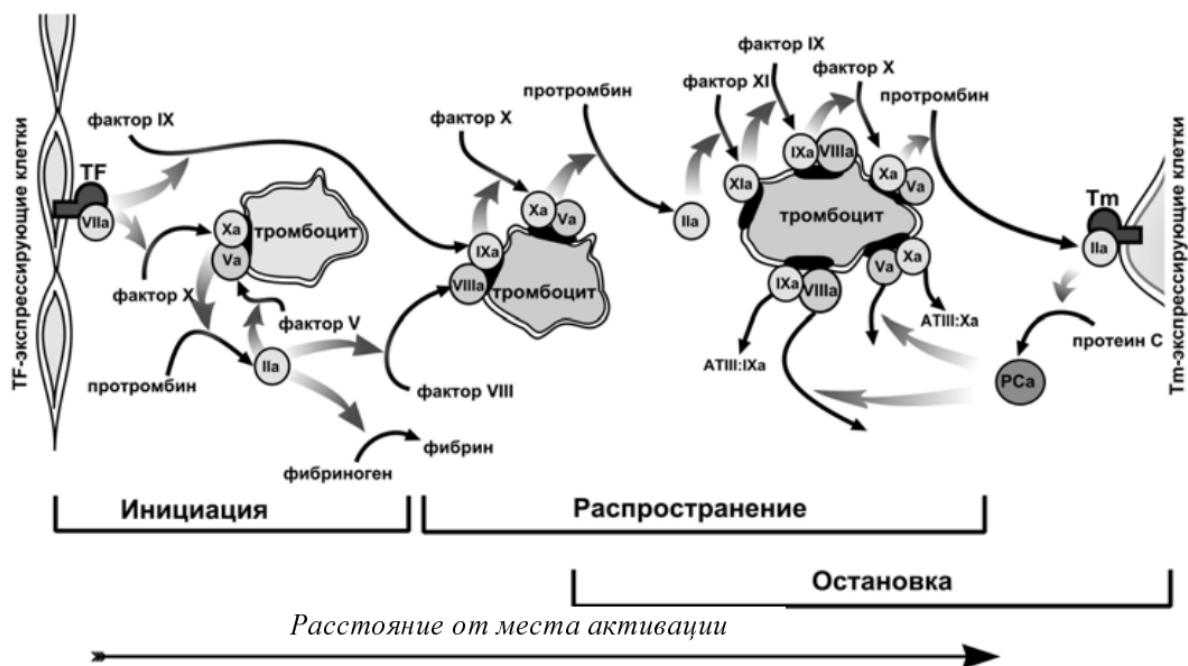
**Рисунок 1** – Основные реакции плазменной системы свертывания крови. Реакции активации белков плазменного звена показаны односторонними черными стрелками. Красные стрелки указывают, под влиянием каких ферментов происходит эта активация. Обратимые реакции указаны двусторонними чёрными стрелками. Воспроизведено из [6]

Тканевый фактор (ТФ) – белок, надежно изолированный от контакта с кровью в мембранах всех клеток организма, кроме клеток крови и эндотелия сосудов [8]. Любое нарушение целостности сосуда или активация сосудистого эндотелия приводит к контакту ТФ с плазмой крови, и он, в комплексе с VIIa, становится способным расщеплять и активировать фактор X, который, в свою очередь, приводит к активации протромбина – зимогена тромбина. Тромбин является финальным и ключевым ферментом, который имеет как прямую функцию в гемостазе, а именно образование фибриновой «сети» и активацию тромбоцитов,

так и регуляторную – активацию других факторов свертывания, обеспечивающих положительные и отрицательные обратные связи и регуляцию работы системы [5, 9].

Кроме пути тканевого фактора, существует еще один путь активации плазменного звена свертывания крови – так называемый путь контактной активации. Основным ферментом контактного пути является фактор XII, способный активироваться при контакте с чужеродными, преимущественно заряженными поверхностями. Фактор XIIa активирован фактор XI, присоединяясь к каскаду свертывания. Показано, что активированные тромбоциты и микровезикулы способны активировать свертывание по контактному пути [10 - 12].

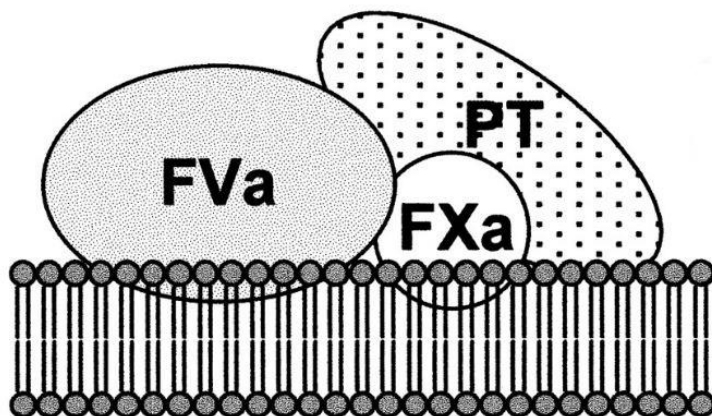
Свертывание крови представляет собой пространственно-неоднородную систему (Рисунок 2). Реакции схемы свертывания происходят на различных участках: связанные с тканевым фактором реакции активации – на поврежденном участке сосуда, реакции ингибирования – на здоровом эндотелии, остальные – на поверхности активированных тромбоцитов и липидных везикул [13, 14].



**Рисунок 2** – Схема реакционно-диффузной модели свертывания. Воспроизведено из [14]

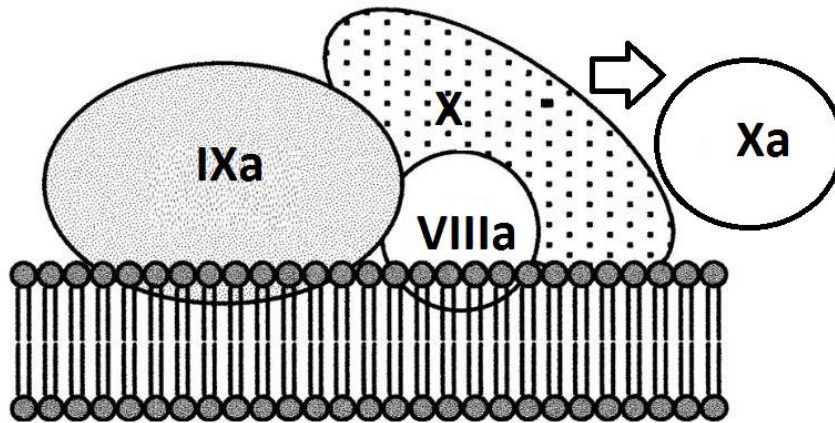
Каскад свертывания можно условно разбить на несколько стадий. Фаза инициации описана выше: свертывание активируется тканевым фактором на поверхности поврежденного сосуда. При сборке комплекса внешней теназы активируется X фактор и в небольшом количестве фактор IX, которые являются слабыми ферментами, быстро ингибируются и не могут диффундировать далеко от активатора. Для эффективной работы этих факторов нужны кофакторы Va и VIIIa, которые получают из своих зимогенов в фазе распространения свертывания с помощью активации тромбином в петлях положительных обратных связей [6, 13, 15]. Фактор Va образует с Xa комплекс протромбиназы, его формирование происходит на фосфолипидной поверхности. В этом процессе также участвуют ионы кальция [16].

Протромбиназа – комплекс из факторов Xa и Va, которые находятся в тесной связи с фосфолипидной мембраной (Рисунок 3). Данный комплекс позволяет увеличить скорость активации протромбина фактором Xa до тромбина до нескольких порядков [5, 11, 17].



**Рисунок 3** – Схематичное изображение комплекса протромбиназы. Комплекс состоит из фактора Xa и его кофактора Va, взаимодействующих с фосфолипидной мембраной в присутствии ионов кальция. Комплекс белков активует протромбин [18, 19]

Комплекс внутренней теназы состоит из сериновой протеиназы фактора IXa, кофактора VIIIa и фосфолипидной мембраны. Комплекс позволяет активировать X фактор вдали от места повреждения (Рисунок 4) [13, 20].



**Рисунок 4** – Комплекс внутренней теназы. Комплекс состоит из фактора IXa и его кофактора VIIIa, взаимодействующих с фосфолипидной мембраной в присутствии ионов кальция. Комплекс белков активирует фактор X [18, 19]

Фактор XII, либо активированный тромбином XI фактор запускают внутренний путь свертывания. Роль XI очень велика для формирования фибринового сгустка на расстоянии от активирующих клеток и создания трёхмерной структуры сгустка. Без фактора XIa не образуется самоподдерживающейся волны тромбина [10].

В фазе распространения свертывания некоторое количество тромбоцитов уже активировано тромбином. Рецепторы к тромбину относятся к классу активируемых протеазами рецепторов (protease-activated receptor, PAR), из которых на тромбоцитах человека присутствуют PAR1 и PAR4. Активация происходит за счет отщепления небольшого ингибиторного фрагмента рецептора, после чего оставшийся пептидный конец связывается с активным сайтом рецептора и активирует его. Для активации данных рецепторов *in vitro* применяют пептиды SFLLRN и AYPGKF – агонисты PAR1 и PAR4 соответственно [21].

Для предотвращения неконтролируемого тромбообразования в крови присутствуют ингибиторы факторов свертывания. Ингибиторы, действующие

посредством прямого связывания – это антитромбин III, ингибирующий тромбин, факторы IXa, Xa и XIa; и ингибитор пути тканевого фактора, связывающий комплекс фактора VIIa и тканевого фактора. Это ингибиторы сериновых протеиназ [22].

При активации тромбин запускает не только положительные, но также и отрицательные петли связи с целью регуляции роста фибринового сгустка. Одним из предполагаемых механизмов такого рода является путь протеина C. Эта реакция медленная, но ускоряется при связывании тромбина с тромбомодулином, трансмембранным белком. После активации протеин C способен разрушить факторы Va и VIIIa [23].

Активация плазменного звена свертывания является важной частью системы гемостаза, однако её цель – укрепить и стабилизировать сгусток, этому соответствуют времена образования сгустка – порядка 10 минут. Первичным ответом системы гемостаза на повреждение с характерными временами свертывания 1-3 минуты считается тромбоцитарное звено [24].

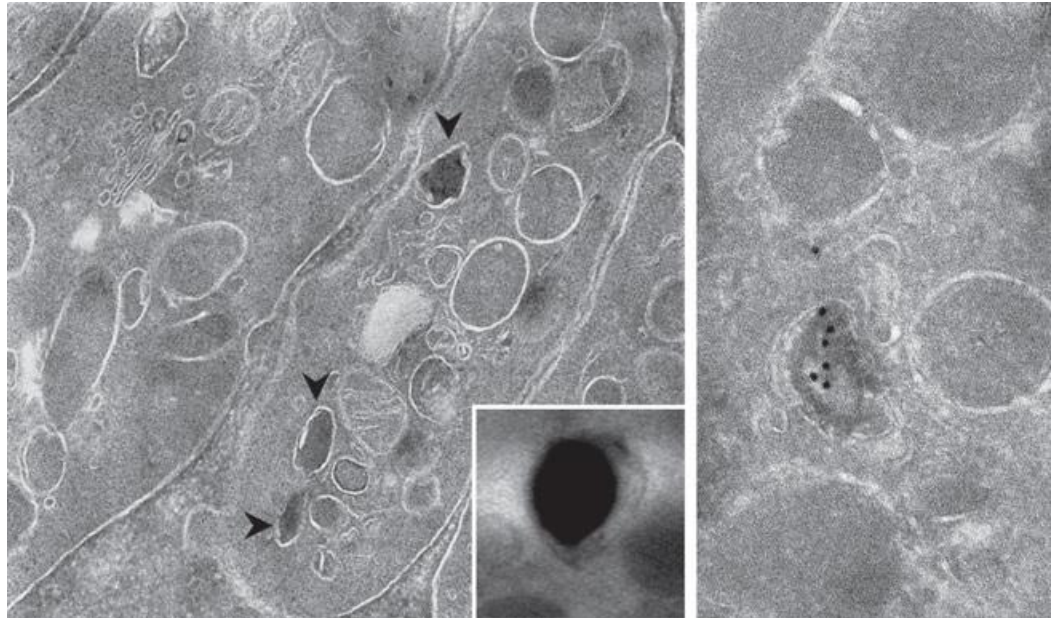
### **1.1.1.2 Тромбоцитарное звено гемостаза**

Тромбоциты – это безъядерные клеточные фрагменты размерами 2-4 мкм в диаметре, которые присутствуют в кровотоке в норме в концентрации 200-400 тыс.кл./мкл [25]. В некоторых публикациях до сих пор встречается определение тромбоцита как клетки, однако это именно фрагменты клеток, генерируемые мегакариоцитами в костном мозге. От одного мегакариоцита может отделиться до 1000 тромбоцитов, обновление которых в кровотоке происходит в среднем каждые 7 дней.

Тромбоциты напоминают двояковыпуклые диски, которые имеют способность проходить через капилляры, не изменяя свою форму [26, 27]. При активации морфология тромбоцитов изменяется за счёт перестроения цитоскелета. Кольцо тубулиновых микротрубочек на периферии неактивированного тромбоцита разрушается при его взаимодействии с активатором [26]. Внутри

тромбоцита есть сеть мембранных каналов, которая при активации предоставляет дополнительную мембранную поверхность и способствует секреции гранул [28].

В цитоплазме тромбоцита содержатся гранулы трёх типов: альфа-гранулы, плотные гранулы и лизосомы (Рисунок 5) [29].



**Рисунок 5** – Основные типы тромбоцитарных гранул: альфа-гранулы, плотные гранулы ( $\delta$ -гранулы) и лизосомы [29]

Самыми многочисленными и крупными (200-500 нм) гранулами являются альфа-гранулы [29], содержащие факторы свертывания (Va и IX), адгезионные белки (тромбоспондин, P-селектин, фибриноген, фибронектин, витронектин), а также медиаторы воспаления и ангиогенеза (тромбоцитарный фактор 4, интерлейкин-8, тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий фактор роста и фактор роста эндотелия сосудов) [30]. Внешняя мембрана гранул содержит P-селектин и интегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Это позволяет тромбоциту усилить свою адгезионную и агрегационную способность после секреции альфа-гранул [28, 30].

Плотных гранул в составе тромбоцита меньше, они содержат АДФ/АТФ, кальций, магний и серотонин [31]. Плотные гранулы играют важную роль в гемостазе в качестве механизма положительной обратной связи, так как вещества, хранящиеся в них, являются дополнительными активаторами тромбоцитов.

Например, высвобождающийся из них АДФ стимулирует рецепторы P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>1</sub> на тромбоцитах [31, 32], серотонин стимулирует H<sub>2</sub> – рецепторы [33], а кальций важен для стабильной работы интегринов  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

В тромбоцитарных лизосомах находятся кислые гидролазы, такие как катепсины, галоктозидаза, арилсульфатаза, кислая фосфатаза, CD63 и LAMP-1/2. Секреция лизосомального содержимого может иметь важные внеклеточные функции, такие как фибринолиз и деградации компонентов внеклеточного матрикса [31, 32].

## **1.1.2 Механизмы активации тромбоцитов**

### **1.1.2.1 Сильная активация тромбоцитов**

Начальным элементом в запуске тромбообразования при повреждении сосуда считается адгезия неактивированных тромбоцитов к ассоциированному с коллагеном межклеточного матрикса или с воспаленным эндотелием белку плазмы крови фактору Виллебранда (фВ) [26, 25]. ФВ – это высокомолекулярные белки, в «развернутом» состоянии содержащие множество сайтов связывания для тромбоцитарных рецепторов-гликопротеинов GPIb (glycoprotein Ib). Процессы необратимой адгезии и агрегации тромбоцитов обеспечиваются трансмембранными гетеродимерными рецепторами- интегринами, состоящими из двух полипептидных цепей и способными образовывать кластеры. Кроме GPIb, за прикрепление тромбоцита к коллагену отвечает рецептор  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 [15, 34]. Предполагается, что тромбоциты необратимо адгезируют к коллагену за счёт данного рецептора, а затем активируются при дополнительном связывании коллагена с рецептором-гликопротеином-VI (GPVI). После активации происходит секреция дополнительных активаторов (АДФ, тромбоксан A<sub>2</sub> и другие) из тромбоцита, которые могут активировать соседние тромбоциты [35]. Активация тромбоцита выражается в изменении морфологии и внутренней структуры.

Активацию тромбоцитов в специализированной литературе принято разделять на слабую и сильную [36]. Под слабой степенью активации подразумевают активацию интегринов, изменение формы тромбоцита и секрецию

его гранул. Сильная степень активации включает в себя, кроме выше перечисленного, еще и появление прокоагулянтной поверхности (тромбоциты предоставляют свою поверхность для ускорения реакций, приводящих к полимеризации фибрина). Такой ответ тромбоцита способны вызвать только коллаген и тромбин [37].

Одним из ключевых белков, приводящих к активации тромбоцитов, является коллаген, представляющий собой фибриллярный белок, входящий в состав соединительной ткани. Он предоставляет соединительной ткани прочность и эластичность. Однако, для того, чтобы тромбоциты могли адгезировать к коллагену, необходимо повреждение эндотелия, благодаря которому данный белок высвобождается и становится доступным для тромбоцитов [38, 39].

Основную роль при активации тромбоцитов играет коллаген I и III типов [37]. На тромбоцитах выделяют три основных рецептора, отвечающих за взаимодействие с коллагеном. В первую очередь это интегрин  $\alpha 2\beta 1$ , отвечающий непосредственно за адгезию тромбоцитов к коллагену [34, 40, 41]. Однако главным сигнальным рецептором для коллагена считается гликопротеин VI. Коллаген при взаимодействии с данным рецептором приводит к повышению концентрации ионов кальция в цитоплазме, секреции гранул, изменению формы [42, 43]. Кроме того, коллаген опосредованно через фактор Виллебранда способен взаимодействовать с гликопротеином Ib-V-IX.

Другой важный активатор тромбоцитов – это тромбин. На тромбоцитах человека находятся два основных рецептора к тромбину, сопряженных с G-белками – PAR1 и PAR4. Отщепление их N-концевого фрагмента приводит к мгновенной активации тромбоцитов [44]. Главным высокоаффинным тромбиновым рецептором считается PAR1. Он активируется низкими концентрациями тромбина около 50-200 пМ, и приводит к мгновенной активации тромбоцитов, а также к их агрегации, выбросу АДФ и АТФ, синтезу тромбоксана A<sub>2</sub>, а также к появлению фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны [37]. PAR4 является низкоаффинным рецептором и вносит вклад в активацию тромбоцитов в случае ингибирования или десенсебилизации PAR1 [16, 45, 46, 47]. Активация

PAR4 приводит к более продолжительному ответу, который может поддерживаться даже при высоких концентрациях тромбина, в отличие от работы PAR1 рецептора, который быстро десенситизируется [21].

### 1.1.2.2 Слабая активация тромбоцитов

Активатор тромбоцитов АДФ представляется считается слабым активатором, так как не приводит к выставлению фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны тромбоцита [48]. АДФ в организме секретируется из плотных гранул тромбоцитов в процессе активации, либо появляется в кровотоке за счет повреждения клеток сосудистого эндотелия [49]. Для активации тромбоцита от АДФ на его мембране должны экспонироваться два специфичных рецептора P2Y1 и P2Y12 [50]. Интересно, что активация тромбоцитов сильными индукторами также приводит к экспонированию дополнительного количества рецепторов P2Y1 и P2Y12 из  $\alpha$ -гранул, что усиливает дальнейшую активацию тромбоцитов [51; 52]. По некоторым данным, активация тромбоцитов АДФ приводит к выбросу около 6% плотных гранул [53] и синтезу тромбоксана A2 [54]. Тромбоциты изменяют свою форму, а также становятся способны к агрегации. Существуют механизмы избавления плазмы крови от АДФ: для этого на поверхности лимфоцитов и клеток эндотелия секретируются АДФазы, которые гидролизуют АДФ до АМФ [55]. Кроме того, в этом процессе принимают участие и эритроциты [56]. Этот процесс предотвращает появление в крови спонтанно активированных тромбоцитов.

В плотных гранулах тромбоцитов содержится почти в два раза больше АТФ, чем АДФ [57]. Основным рецептором к АТФ на поверхности тромбоцита является P2X1, являющийся кальциевым каналом [37]. Даже небольшие концентрации АТФ приводят к быстрой десенситизации этого рецептора, однако, активность быстро восстанавливается в отсутствии АТФ в плазме крови [58]. АТФ играет дополнительную роль при активации тромбоцитов другими агонистами, а так же очень важен в условиях задержки других активаторов [59; 60; 61; 62; 63; 64; 65]. АТФ может приводить к изменению формы тромбоцитов, быстрой и обратимой централизации секреторных гранул, но он не способен вызвать агрегацию

тромбоцитов [37; 59; 66]. Существуют механизмы избавления плазмы крови от АДФ: для этого на поверхности лимфоцитов и клеток эндотелия секретируются АТФазы [55].

Также к слабым активаторам относят тромбоксан А<sub>2</sub> [49]. Его дополнительная функция помимо активации тромбоцитов – стимуляция вазоконстрикции [67]. На тромбоцитах за взаимодействие с тромбоксаном А<sub>2</sub> отвечает ТР-рецептор. При активации тромбоксаном А<sub>2</sub> тромбоциты меняют свою форму, становятся способны к агрегации, повышается уровень внутриклеточных ионов кальция, а также происходит фосфорилирование белков [68]. Тромбоксан А<sub>2</sub> достаточно быстро гидролизует до тромбоксана В<sub>2</sub>, что позволяет ограничить область его распространения [37; 69].

Серотонин также считается слабым агонистом, стимулирующим агрегацию тромбоцитов через 5HT<sub>2A</sub>- рецепторы. В результате активации тромбоцитов серотонином агрегация имеет обратимый характер. В норме серотонин содержится в плотных гранулах тромбоцитов и высвобождается после их сильной активации [33].

Адреналин играет роль потенцирующего агониста, поддерживающего агрегацию в ответ на первичные агонисты: АДФ, коллаген. Это связано с тем, что ответ тромбоцитов на адреналин, после связывания с α<sub>2A</sub>- адренорецепторами, нестабилен и вариабелен. Адреналин относят к категории слабых активаторов [70].

Тромбоциты после активации приобретают способность адгезировать к месту повреждения сосудистой стенки, и соединяться друг с другом в стабильный агрегат, перекрывающий повреждение. Кроме того, они вносят вклад в плазменное свертывание по двум путям — экспонированием прокоагулянтной мембраны и секрецией альфа-гранул.

### **1.1.3 Механизмы агрегации тромбоцитов**

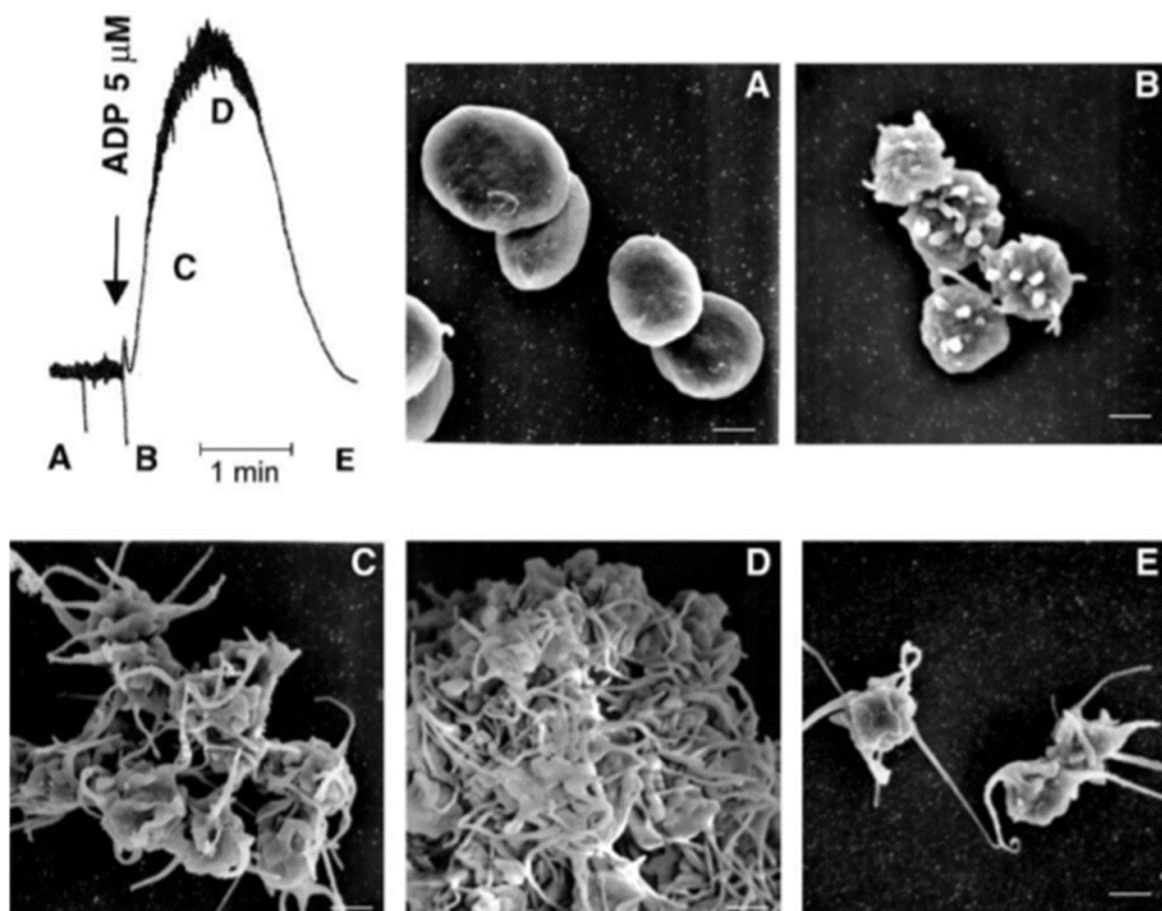
На поверхности тромбоцитов расположены интегрины – класс трансмембранных рецепторов, отвечающих за образование связей между клетками. Известно, что из присутствующих на поверхности тромбоцитов трех семейств

интегринов (с  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - и  $\beta 3$ -цепями) –  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 3$  – в высокоаффинное состояние при активации переходят интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  (GPIIb-IIIa), присутствующие в количестве 100 000 на клетку [71; 72]. В активированном состоянии  $\alpha IIb\beta 3$  связываются с фибриногеном, который в достаточных количествах присутствует в плазме крови. Через мостики  $\alpha IIb\beta 3$ -фибриноген/vWF- $\alpha IIb\beta 3$  тромбоциты могут связываться друг с другом, образуя тромбы – агрегаты, перекрывающие повреждение или весь сосуд [15, 73].

Интересно, что в ответ на такие слабые активаторы, как АДФ, агрегат является неустойчивым и способен самопроизвольно разваливаться на одиночные тромбоциты или агрегаты меньших размеров. Примечательно, что данный эффект наблюдается только при наличии физиологической концентрации ионов кальция в среде [1]. Данный феномен был обнаружен в тесте агрегометрии.

#### **1.1.4 Феномен обратимой агрегации тромбоцитов**

Феномен дестабилизации и спонтанной дезагрегации в суспензии тромбоцитов был обнаружен еще в 60х годах XX века и описан как феномен обратимой агрегации тромбоцитов [1]. Феномен обратимой агрегации тромбоцитов наблюдается *in vitro* в функциональном тесте оценки способности тромбоцитов к агрегации, основанном на изменении светопропускания суспензии тромбоцитов после формирования в ней агрегатов. В данном тесте после активации тромбоциты образуют крупные агрегаты, что повышает общее светопропускание измеряемой суспензии. Напротив, дезагрегация характеризуется постепенным снижением светопропускания суспензии до некоторого начального стационарного уровня светопропускания до момента активации тромбоцитов. С помощью метода световой микроскопии подтверждено, что снижение светопропускания соответствует дезагрегации тромбоцитов (Рисунок 6) [74].



**Рисунок 6** – Снимки суспензии тромбоцитов из кюветы агрегометра в разные моменты времени, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. Рисунок адаптирован из работы [74]

Известно, что феномен обратимой агрегации наблюдается в ответ на слабый активатор АДФ при физиологической концентрации ионов кальция.

Известно, что при обратимой агрегации не происходит вторичной активации тромбоцитов, то есть не происходит секреция гранул со вторичными активаторами и синтез тромбоксана А<sub>2</sub>. Это показано в эксперименте с обратимой агрегацией в ответ на тромбин при ингибировании вторичной активации тромбоцитов [75].

На данный момент существует несколько гипотез, пытающихся объяснить механизмы феномена обратимой агрегации. Согласно одной из них, в ответ на агонисты синтезируется тромбоксан А<sub>2</sub>, который в петле положительной обратной связи поддерживает рецепторы ГП IIb-IIIa в активированном состоянии и не дает

агрегату развалиться. При наличии ионов кальция в среде синтез тромбосана А<sub>2</sub> частично ингибируется, рецепторы не поддерживаются в активированном состоянии, сгусток разваливается на отдельные тромбоциты [4].

Согласно другой теории, у гликопротеина П<sub>b</sub>-П<sub>3a</sub> существует промежуточная конформация, с которой фибриноген может связываться обратимо. За счёт этого при высоких скоростях перемешивания суспензии тромбоцитов связи в агрегатах недостаточно сильны, и агрегат разваливается на одиночные тромбоциты [2].

По третьей теории АДФ перестает поддерживать тромбоциты в активированном состоянии, так как происходит десенситизация рецептора P2Y<sub>1</sub> и частично P2Y<sub>12</sub> [76]. Предполагается, что на мембранах тромбоцитов также присутствуют эктонуклеотидазы, которые расщепляют АДФ, и это приводит к снижению концентрации активатора в суспензии [3].

## **1.2 Существующие подходы к клинико-лабораторной диагностике состояния системы гемостаза**

### **1.2.1 Методы оценки состояния плазменного звена**

Исследования плазменного звена гемостаза выполняют перед плановыми инвазивными операциями — при трансплантациях, удалении опухолей, эндопротезировании на сердце и сосудах. Основными методами оценки плазменного звена являются коагулограмма и тромбоэластография [45].

Коагулограмма проводится, чтобы определить возможность хирургического вмешательства, взвесить риск развития кровотечения и образования тромбов, которые представляют опасность для жизни. Контроль показателей необходим и в послеоперационный период, чтобы не допустить осложнений [77 - 79].

Расшифровка коагулограммы у взрослых:

- АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время) – время, за которое кровь способна свертываться (длительность формирования сгустка). Любое отклонение от нормы может указывать на диссеминированную внутрисосудистую коагуляцию. В таблице с нормами коагулограммы указаны показатели АЧТВ 23-37 секунд;

- фибриноген – это специфический белок, вырабатывающийся в печени. Из него образуются нити фибрина, участвующие в процессе свертывания крови и образования тромба. Норма фибриногена в крови – 2-4 г/л (во время беременности – до 6.5 г/л);
- ТВ (тромбиновое время) – период, в течение которого фибриноген преобразуется в нити фибрина. Показатели нормы – 11-18 секунд;
- протромбиновый индекс (ПТИ) – отношение времени свертывания крови пациента к принятому стандарту. Норма – 97-100% (во время беременности – до 150%);
- время рекальцификации плазмы (ВРП) отражает скорость образования сгустка из фибрина при добавлении в плазму крови ионов кальция. Показатель дает информацию об активности всей свертывающей системы крови. Норма – 60-120 секунд;
- антитромбин III – белок, обеспечивающий функционирование противосвертывающей системы крови. Показатели нормы – 70-115%;
- D-димер – фрагмент белка, который можно обнаружить в крови после растворения тромба. На концентрацию D-димера влияют величина тромба, прием антикоагулянтов, беременность, возраст пациента. Варианты нормы – 33-726 нг/мл.

Показатели гемостазиограммы зависят от ряда факторов (возраста пациента, хронических заболеваний, проводимой медикаментозной терапии и так далее) и могут отклоняться от нормы как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения. Показатели коагулограммы при беременности также меняются [80]. Связано это с гормональной перестройкой, увеличением объема циркулирующей крови и другими факторами. Поэтому оценка показателей проводится на основе соответствия срока (триместра беременности) референсным значениям.

Тромбоэластография (ТЭГ) – интегральный метод регистрации процессов свертывания крови и фибринолиза в цельной крови. Метод применяется в лабораторной практике с 1948 года, однако, несмотря на длительное использование

и значительные преимущества, является распространен менее, чем коагулограмма [81; 82; 83].

Метод тромбоэластографии основан на измерении физической прочности образовавшегося сгустка. Некоторый объем цельной крови помещается в кювету, совершающую вращательные колебания со скоростью 6 колебаний в минуту на  $4,5^\circ$  градуса. В кювету помещается металлический датчик и активируется свертывание добавлением индукторов. При формировании сгустка стержень начинает вращаться вместе со сгустком. Амплитуда отклонения стержня регистрируется как функция времени. На типичной кривой тромбоэластографии выделяют такие параметры, как скорость формирования сгустка, задержка роста сгустка и его объем [84].

Подобно тестам АЧТВ и ПВ, тромбоэластография измеряет только формирование фибринового сгустка, упуская ценную информацию, которую можно извлечь из кинетики образования тромбина. Для учета вклада пространственной генерации тромбина был разработан тест Тромбодинамика.

Для постановки теста Тромбодинамика предварительно подготовленные образцы плазмы крови пациента объемом 120 мкл инкубируют с СТИ (кукурузный трипсин ингибитор – лиофильно высушенный раствор белка-ингибитора контактной активации свертывания) в течение 15 минут. Затем в образец добавляют ионы кальция (лиофильно высушенный раствор соли кальция) для инициации свертывания. Затем образцы помещают в канал измерительной кюветы и вводят специальную вставку – активатор. Данная вставка представляет собой двухканальную гребенку, на нижних торцевых поверхностях которой иммобилизован тканевый фактор. В момент опускания вставки запускается процесс свертывания, и от поверхности с тканевым фактором запускается рост фибринового сгустка. Данный процесс регистрируется прибором методом темного поля в течение 30 мин [85; 86; 87].

На выходе получается серия фотоизображений, показывающая рост фибринового сгустка во времени. Следующие параметры полученных результатов оцениваются автоматически и рассчитываются программой: Tlag – время задержки

начала образования сгустка,  $V$ ,  $V_{st}$  – скорость роста сгустка и средняя скорость роста сгустка (15–25 мин после начала роста),  $T_{sp}$  – время появления спонтанных сгустков в объеме плазмы, изначально не контактирующем со вставкой – активатором,  $V_i$  – средняя скорость роста сгустка, (2–6 минут после начала роста сгустка),  $CS$  – размер фибринового сгустка через 30 мин после начала измерения,  $D$  – плотность сгустка – пропорциональный плотности фибриновой сети.

### 1.2.2 Методы оценки состояния тромбоцитарного звена

Перед плановыми хирургическими операциями, как правило, принято производить оценку только плазменного звена свертывания для определения рисков кровоточивости [88]. Однако во многих случаях необходимо учитывать значимый вклад тромбоцитарного гемостаза в систему свертывания, например, при наследственных заболеваниях, таких как болезнь Бернарда Сулье, болезнь Виллебранда и др., наследственных и приобретенных иммунных тромбоцитопениях, а также при оценке эффективности антитромбоцитарной терапии при кардиологических заболеваниях [89]. Для оценки функциональности тромбоцитов используется ряд клинических общедоступных тестов, таких как агрегометрия, проточная цитометрия, а также ряд более узкоспециализированных коммерческих тестов как VerifyNow, Multiplate analyser и др. Также, в различных лабораториях нередко используются тесты сходные по принципу измерения, но отличающиеся друг от друга модификациями, например, тесты, оценивающие функциональность тромбоцитов по их способности образовывать агрегаты в проточных камерах, или тесты, оценивающие состояние тромбоцитов методом проточной цитометрии [90; 91].

#### Определение функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии.

Для оценки состояния тромбоцитов и их способности к активации используются флуоресцентные краски, специфично связывающиеся интегринами тромбоцита [90, 92]. Для оценки данного связывания используется метод

проточной цитометрии. В цитометре создается поток обжимающей жидкости, которая заключает клетки из суспензии в ламинарный поток, чтобы они по отдельности проходили через источник монохромного излучения. В качестве флуоресцентных красок используются антитела, конъюгированные с флуоресцентными красителями. Когда клетка проходит через луч лазера с определенной длиной волны, происходит возбуждение флуоресцентных молекул, в результате чего они переходят на более высокий энергетический уровень. При возвращении на прежний энергетический уровень испускается квант энергии, регистрируемый прибором. Использование нескольких флуорохромов, имеющих сходные длины волн возбуждения, но разные длины волн эмиссии, позволяет одновременно измерять несколько характеристик клетки [51]. Оптическая система собирает излучение, испущенное флуорофором и, с помощью системы фильтров и зеркал, изолирует излучение с определенной длиной волны. С помощью проточной цитометрии измеряют оптические и флуоресцентные характеристики отдельных клеток, а также ядер, микроорганизмов, хромосом. Помимо использования флуоресцентных меток возможно разделять клетки на популяции по физическим характеристикам, таким как форма и гранулярность [93].

Проточная цитометрия тромбоцитов является неотъемлемой частью лабораторной диагностики для определения классических тромбоцитопатий, таких как синдром Бернара-Сулье, тромбастения Гланцмана. Данный метод представляет собой для выявления в пациента тромбоцитопатии, однозначно связанной с отсутствием или недостатком тромбоцитарных рецепторов. Однако для тромбоцитопатий, которые выявляются только при активации тромбоцитов: синдром Скотта, тромбастения Гланцмана 3-го типа, – метод цитометрии не является показательным, так как этот метод не стандартизован для использования в лабораториях. Выбор параметров, таких как тип активации и флуоресцентные метки, не обоснован фундаментальными данными. С учетом редкости четко определенных тромбоцитопатий, каждая лабораторно-клиническая команда устанавливает свое иммунофенотипирование тромбоцитов [93].

### Определение функциональности тромбоцитов коммерческими тестами.

Для упрощения анализа тромбоцитов без использования лабораторных методов используются такие системы как VerifyNow (ИТС, США) и Plateletworks (Helena Laboratories, США). Основным элементом системы VerifyNow является картридж с шариками, покрытыми фибриногеном, на которые агрегируют активированные тромбоциты. Это вызывает повышение оптического сигнала светопропускания. Система Plateletworks основана на подсчете числа тромбоцитов до и после агрегации. Данный процесс происходит на трубочках, покрытых АДФ или арахидоновой кислотой. Обе системы также могут использоваться для мониторинга антиагрегантной терапии [94 - 97].

Способность тромбоцитов к адгезии и агрегации оценивается с помощью анализатора ИМРАСТ (DiaMed, Швейцария). В этом случае тромбоциты адгезируют на полистероловую подложку. Анализатор измеряет процент покрываемой тромбоцитами площади для определения способности тромбоцитов к адгезии, а также средний размер агрегатов для оценки способности тромбоцитов к агрегации [98]. Анализатор PFA-100 (Siemens, Германия) используется для оценки способности тромбоцитов к агрегации в условиях высоких скоростей сдвига и присутствия активатора [99; 100]. Для этого производится симуляция первичного гемостаза на картриджах, на которые наносится микроскопическое отверстие, покрытое АДФ или адреналином. В условиях высоких скоростей сдвига и присутствия агонистов тромбоциты формируют агрегат, закрывающий это отверстие. Время, за которое это происходит, называется «временем закупоривания апертуры», что является показателем функциональной активности тромбоцитов. Этот анализатор также позволяет определять, чем являются причиной нарушения функциональной активности тромбоцитов – внешними факторами (например, терапией) или дефектами самих тромбоцитов [101; 102].

### Определение способности тромбоцитов к образованию агрегатов в проточных камерах

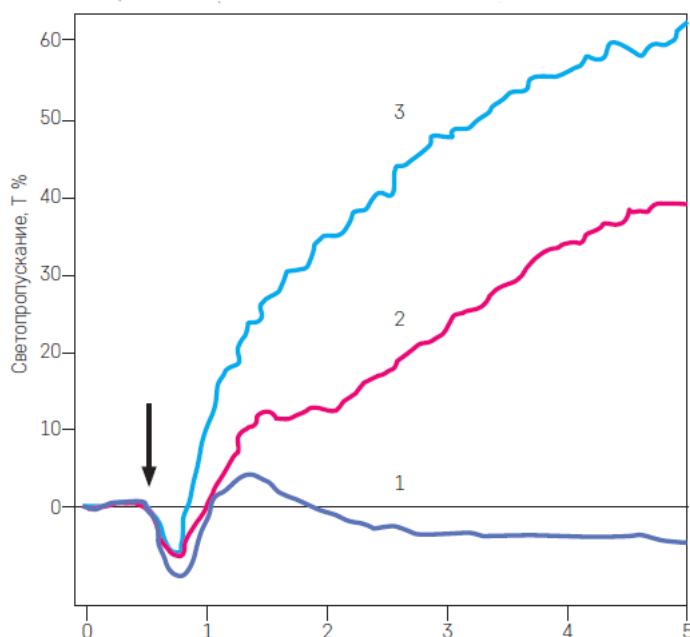
Возможно, наиболее приближенный к *in vivo* способ диагностики функциональности тромбоцитов – проточные камеры [91, 103, 104]. Для имитации

повреждения сосуда на слои полидиметилсилоксана (PDMS) наносятся следующие субстраты в зависимости от поставленной задачи: коллаген, фактор Виллебранда, фибриноген, тканевый фактор или фибронектин. Данный метод позволяет имитировать процесс роста тромба при различных условиях и скоростях сдвига. Данный метод также может быть использован для исследования сигнальных путей  $Ca^{2+}$ , активации интегринов, секреции тромбоцитов. Однако, так как его использование и сборка камер не стандартизованы, в каждой лаборатории их сборка и анализ немного различаются, метод проточных камер до сих пор не включен в рутинную клиническую диагностику [91]. Кроме того, для анализа в нескольких камерах требуется довольно большой объем крови.

Несмотря на большое количество разработанных и внедренных тестов по оценке функциональности тромбоцитов, наиболее широко распространенным тестом, так называемым «золотым стандартом», остается тест агрегометрии.

### 1.2.3 Агрегометрия

Тест агрегометрии заключается в регистрации изменения светопропускания суспензии тромбоцитов после добавления в нее активатора, вызывающего «слипание» тромбоцитов – их агрегацию, и, следовательно, увеличение светопропускания суспензии. Чем быстрее образуются агрегаты, тем успешнее активировались тромбоциты. В большинстве лабораторий тест агрегометрии ставится в богатой тромбоцитами плазме, полученной из цельной крови, взятой в пробирки с цитратом натрия. При этом в среде значительно снижена концентрация свободных ионов кальция, что исключает влияние плазменного звена свертывания крови на работу тромбоцитов. Типичные агрегационные кривые цитратной плазмы имеют необратимый характер, часто – с характерным перегибом, обозначающим момент второй волны активации тромбоцитов (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Характерный агрегационный ответ на активацию АДФ богатой тромбоцитами плазмы, взятой на цитрат. 1- обратимая агрегация на низкие концентрации АДФ, 2- появление второй волны активации, 3- необратимая агрегация. Адаптировано из [105]

Однако в физиологических условиях агрегация тромбоцитов происходит в присутствии 1–2 мМ свободных ионов кальция (концентрация в плазме крови). Чтобы сохранить плазменную концентрацию кальция, но не инициировать свертывание плазмы крови при ее взятии, необходимо использовать другой антикоагулянт, например, гепарин, активирующий антитромбин III, который ингибирует основные ферменты свертывания. Альтернатива гепарину, в некоторых случаях способному активировать тромбоциты, – гирудин, прямой ингибитор тромбина. Альтернативой гепариновой (гирудиновой) плазме является постановка агрегометрии в суспензии отмытых тромбоцитов с добавлением в раствор фибриногена, при этом ионный состав раствора можно легко контролировать. Интересно, что ответ тромбоцитов в присутствии ионов кальция слабее: на слабые индукторы (АДФ, серотонин в комбинации с адреналином) наблюдается обратимая агрегация, как на низкие концентрации АДФ [1].

### 1.2.3.1 Диагностика функциональности тромбоцитов методом агрегометрии

Тест на агрегацию тромбоцитов – широко распространенный и доступный способ оценки функциональности тромбоцитов, но при этом очень важно умение точно трактовать полученные в тесте результаты. Существует несколько разновидностей агрегометрии, которые отличаются по методу регистрации образования тромбоцитарных агрегатов, а также способу подготовки тромбоцитов для эксперимента. Наиболее распространенным методом регистрации агрегации остается турбидиметрический (от англ. turbidity – мутность) метод Борна и О'Брайена, основанный на изменении светопропускания [1]. В агрегометре луч света проходит через кювету с исследуемым образцом (суспензией тромбоцитов) и попадает на регистрирующий фотоэлемент. В начальный момент времени суспензия тромбоцитов, которая с постоянной скоростью перемешивается магнитной мешалкой, содержит одиночные тромбоциты в концентрации от 150 до 400 тыс./мкл. При данных условиях луч света рассеивается; интенсивность света, доходящего до датчика, принимают за нулевой уровень (Рисунок 7). При добавлении к тромбоцитам активатора (в стандартном тесте агрегометрии это АДФ, тромбин, арахидоновая кислота, коллаген, ТХА<sub>2</sub>) происходит образование агрегатов из одиночных тромбоцитов; светопропускающая способность суспензии при этом растет, так как количество светорассеивающих центров уменьшается. За максимальный (100%-й) уровень агрегации тромбоцитов принимают светопропускающую способность раствора без тромбоцитов. Перед выполнением теста необходимо производить калибровку прибора. Для измерения агрегации в богатой тромбоцитами плазме контролем является бедная тромбоцитами плазма; для отмытых тромбоцитов – буферный раствор, в котором они ресуспендированы. Для количественного описания агрегации оценивают такие параметры, как максимальный уровень светопропускания и максимальная скорость агрегации (изменение уровня светопропускания за период времени). С помощью турбидиметрического метода можно также наблюдать изменение формы тромбоцитов по некоторому снижению уровня светопропускания непосредственно

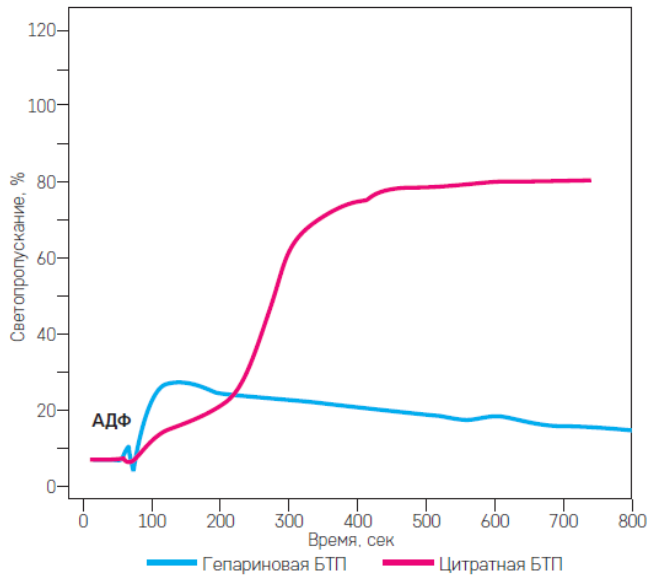
после добавления агониста. Этот эффект хорошо различим для отмытых тромбоцитов при активации АДФ в отсутствие фибриногена. Изменение формы при активации наблюдается в ответ на все агонисты, кроме адреналина [106]. Для регистрации слабых ответов на малые концентрации агонистов или спонтанной активации применяется метод флуктуаций светопропускания (ФСП метод). Относительная дисперсия ФСП пропорциональна среднему количеству тромбоцитов в агрегате. Данный метод, в отличие от турбидиметрического анализа, чувствителен к маленьким агрегатам, состоящим из нескольких тромбоцитов. Используют также импедансный метод, основанный на изменении сопротивления суспензии тромбоцитов при пропускании через нее электрического тока. При опускании в цельную кровь электродов и активации тромбоцитов они «налипают» на поверхность электрода, что имитирует гемостатический сгусток на поверхности сосудистого повреждения. Данный метод считается наиболее приближенным к физиологическим условиям.

### **1.2.3.2 Ответы на различные индукторы агрегации в агрегометрии**

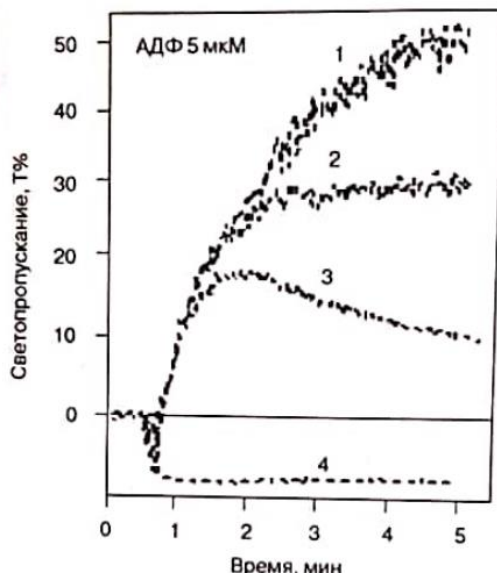
В тесте агрегации для оценки функциональности тромбоцитов одного донора используют сразу несколько агонистов с целью получения полной картины тромбоцитарного ответа. В стандартный набор агонистов для теста входят АДФ, тромбин, адреналин, серотонин, коллаген, ТХА<sub>2</sub>, арахидоновая кислота. Каждый из перечисленных агонистов имеет специализированные рецепторы на мембране тромбоцита.

АДФ – один из основных физиологических индукторов активации – содержится в плотных гранулах, а также выходит из поврежденных эритроцитов и других клеток. Он связывается с пуринергическими рецепторами на тромбоците – P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> и P<sub>2</sub>X<sub>1</sub>, при этом P<sub>2</sub>X<sub>1</sub> мгновенно десенситизируется (считается, что в тесте агрегометрии он не задействован). Специфичным для тромбоцита является ассоциированный с G<sub>i</sub>-белком рецептор P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>; связывание его с АДФ приводит к снижению концентрации АДФ в тромбоците, тем самым усиливая ответ и стабилизируя агрегаты. Одиночная активация данного рецептора приводит к

слабой активации гликопротеина (ГП) IIb/IIIa; изменения формы тромбоцитов в ответ на этот рецептор не происходит [106]. P2Y<sub>12</sub>-индуцированная активация также запускает фосфоинозитидную сигнализацию, что ведет к частичной агрегации тромбоцитов у трансгенных P2Y<sub>1</sub><sup>-/-</sup> мышей. P2Y<sub>1</sub> – рецептор, ассоциированный с G<sub>q</sub>-белком; его активация приводит к запуску кальциевой сигнализации в тромбоците, изменению формы, активации интегринов и частичному выбросу гранул. Эксперименты на трансгенных мышках с увеличенной на 83% концентрацией рецептора P2Y<sub>1</sub> на мембране тромбоцита показали, что при увеличении рецепторов данного типа в ответ на АДФ наблюдается секреция гранул [76]. Это означает, что недостаточная концентрация P2Y<sub>1</sub> может объяснять слабый ответ тромбоцитов на АДФ. Известно, что через некоторое время после активации тромбоцитов АДФ они становятся рефрактерными, что увеличивает риск кровоточивости после операций. Этот эффект связывают с десенситизацией рецептора P2Y<sub>1</sub> после его активации. Интересно, что P2Y<sub>12</sub> при тех же условиях остается функциональным. Выявлено, что оба рецептора после активации уходят внутрь тромбоцита, однако с разным характерным временем и с помощью разных механизмов. В результате часть рецепторов P2Y<sub>12</sub> остается на мембране, что обуславливает его функциональность. Оба типа рецептора играют важную роль в агрегации тромбоцитов [107]. АДФ – слабый активатор, в частности, для индуцирования агрегации АДФ необходимо наличие экзогенного фибриногена. В плазме, взятой на цитрат, наблюдается необратимая двухволновая агрегация, перед которой хорошо различимо изменение формы тромбоцита [108]. В суспензии тромбоцитов в присутствии в среде ионов кальция и в присутствии ингибиторов вторичной активации наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов в ответ на АДФ (Рисунок 8, 9).

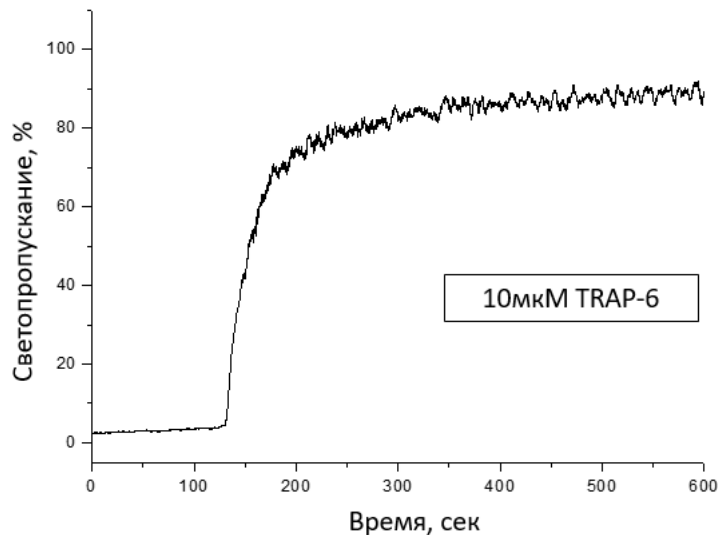


**Рисунок 8** – Агрегация тромбоцитов в ответ на 5 мкМ АДФ (собственные данные). Богатая тромбоцитами плазма получена из цельной крови здоровых доноров путем центрифугирования. Концентрация тромбоцитов доведена до 200 тыс./мкл свободной от тромбоцитов плазмой из того же образца крови; активатор добавлен на 50-й сек эксперимента



**Рисунок 9** – Агрегация тромбоцитов в цитратной плазме в ответ на 5мкМ АДФ. 1- без антиагрегантов, 2- ацетилсалициловая кислота, 3- ацетилсалициловая кислота и клопидогрель, 4- ацетилсалициловая кислота +клопидогрель+ антагонист ГПШб-IIIa. Воспроизведено из [105]

Тромбин – не только ключевой фактор плазменного каскада свертывания, он способен активировать тромбоциты через специальные рецепторы на поверхности: PAR-1 (protease activated receptors – рецепторы, активируемые протеазами), PAR-4, ГП Ib-V-IX. PAR-4 вносит ощутимый вклад в активацию тромбоцитов в условиях ингибирования и десенситизации PAR-1 – главного высокоафинного рецептора. Для эффективной агрегации в ответ на тромбин не требуется наличия экзогенного фибриногена, так как при сильной активации тромбоциты секретируют значительное количество эндогенного белка. Тромбин – сильный активатор, вызывающий необратимую агрегацию с секрецией гранул (Рисунок 10). Тромбин используется для активации только отмытых тромбоцитов, так как в богатой тромбоцитами плазме (БТП) присутствует фибриноген – основная мишень тромбина в плазменном свертывании. При необходимости проведения теста в БТП либо при селективной активации рецепторов тромбина используют TRAP (thrombin receptor activating peptides – пептиды, активирующие рецептор тромбина).

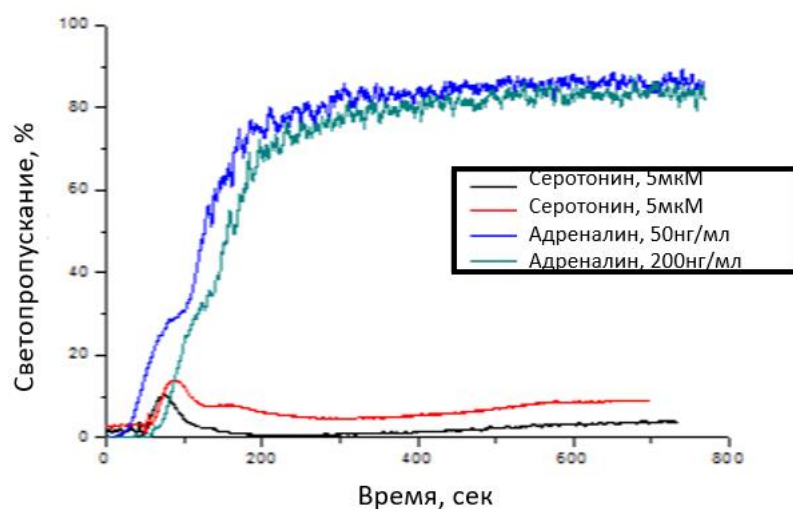


**Рисунок 10** – Агрегация тромбоцитов в цитратной БТП в ответ на 10мкМ TRAP-6

Адреналин относится к слабым индукторам агрегации. Он действует на альфа-2 адренорецептор, ассоциированный с Gz -белком, предположительно вызывающим ингибирование аденилат-циклазы. В цитратной БТП адреналин

вызывает необратимую агрегацию [109], однако в БТП при физиологической концентрацией ионов кальция агрегации не наблюдается. При этом в суспензии отмытых тромбоцитов ответ вариабельный. Адреналин напрямую не изменяет вязкость внешней мембраны, не влияет на концентрацию внутриклеточных ионов кальция, связывание фибриногена или фосфорилирование белков [109]. Однако при добавлении адреналина совместно с другим активатором данные процессы усиливаются. Таким образом, адреналин чаще используют как модулирующий агент, а не самостоятельный активатор.

Серотонин находится в плотных гранулах тромбоцитов и высвобождается из них после активации сильными агонистами. Он специфичен к 5HT<sub>2A</sub>-рецепторам и является слабым агонистом, который поддерживает ответ остальных индукторов агрегации. Самостоятельно способен вызывать обратимую агрегацию (Рисунок 11) [106, 110, 111].



**Рисунок 11** – Агрегация тромбоцитов в цитратной БТП в ответ на 5-20 мкМ серотонина либо 5-20 нг/мл адреналина

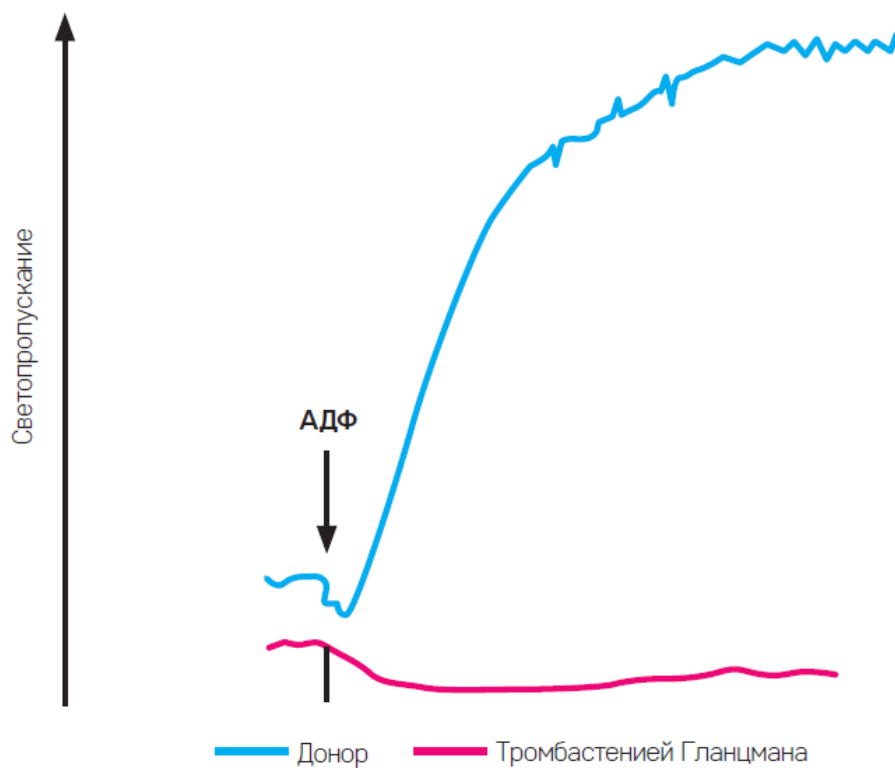
Коллагены всех типов локализованы в разных слоях сосудистой стенки. Рецепторами служат ГП VI и ГП Ib/IIIa. Коллагены I и III типов – сильные активаторы, они стимулируют секрецию гранул и синтез ТХА<sub>2</sub>. Для эффективной агрегации в ответ на коллаген не требуется наличия экзогенного фибриногена [112, 113, 114].

Синтез ТХА2 запускается при кальций-зависимой активации фосфолипазы А2. Его рецептором является ТР-рецептор (Thromboxane Prostanoid – тромбоксановый простаноидный). В связи с тем, что ТХА2 – нестабильное короткоживущее соединение, в экспериментах используют его стабильный аналог – U46619 либо арахидоновую кислоту, которая в тромбоците превращается в ТХА2 под действием циклооксигеназы. Данные агонисты считаются сильными и способны вызывать необратимую агрегацию в отсутствие экзогенного фибриногена [115; 116]. Многообразие путей активации обеспечивает большой запас прочности для реакции активации и последующей агрегации тромбоцитов. Для полноценной оценки функциональности клетки в тесте агрегометрии необходимо видеть всю картину ответов тромбоцита. Важную роль приведенных выше активаторов подтверждают эксперименты по агрегометрии в присутствии ингибиторов рецепторов тромбоцита к ним. У пациентов, принимающих антагонисты P2Y1, P2Y12, ацетилсалициловую кислоту, регистрируют подавление агрегации, изменение необратимой агрегации на обратимую. Эффект ослабления агрегационной способности используется при назначении пациентам комплексного приема лекарств. При этом антагонисты рецептора ГП IIb/IIIa полностью подавляют агрегацию тромбоцитов.

#### **1.2.4 Типичные результаты агрегометрии, наблюдаемые при тромбоцитопатиях**

Тромбастения Гланцмана – это врожденный дефицит или дисфункция гликопротеина IIb/IIIa, аутомно-рецессивное заболевание, которое сопровождается кровотечениями кожи и слизистых оболочек. Агрегационный ответ наблюдается только при добавлении высоких доз ристоцетина (Рисунок 12, 13) [117], что подтверждает ключевую роль ГП IIb/IIIa в агрегации тромбоцитов. Синдром Бернара–Сулье – врожденный дефицит или дефект комплекса гликопротеинов Ib/IX/V тромбоцитов; наследуется как аутомно-рецессивный признак с тяжелыми кровотечениями.

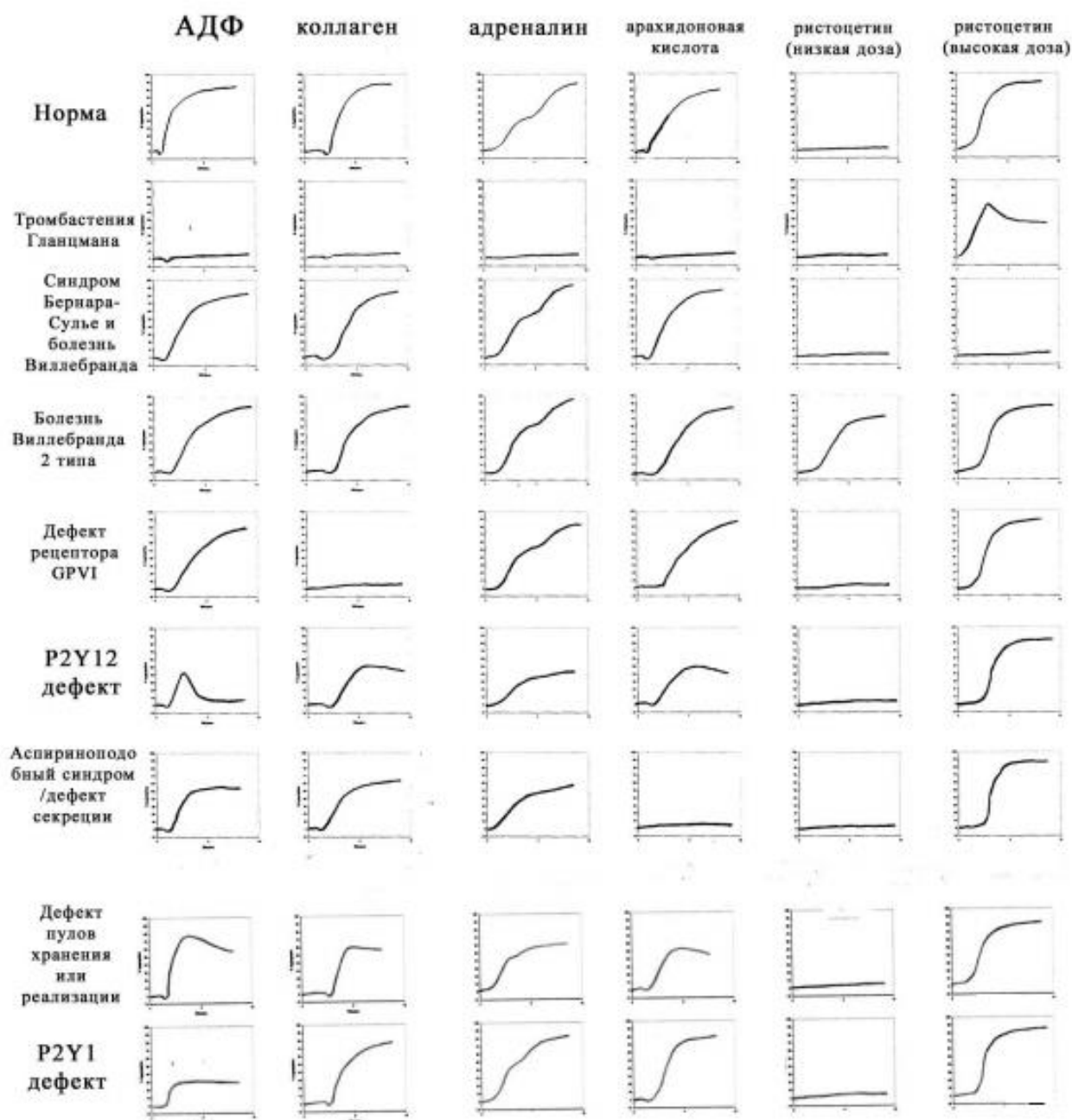
Агрегация тромбоцитов в норме при индукции АДФ, коллагена, адреналина и арахидоновой кислоты, но отсутствует после добавления ристоцетина (Рисунок 13) [117]. Болезнь Виллебранда характеризуется генетическими мутациями, приводящими к количественным и/или качественным изменениям фактора Виллебранда и угнетению реакций тромбоцитов, зависящих от взаимодействий с этим белком. При данном заболевании рекомендуется проведение импедансной агрегометрии с ристоцетином [118].



**Рисунок 12** – Отсутствие агрегационного ответа на АДФ у пациента с тромбастенией Гланцмана -ТГ- по сравнению со здоровым донором -донор (воспроизведено из [105])

Дефекты секреции могут быть обусловлены либо дефицитом тромбоцитарных гранул, либо дефектом в сигнальном пути, регулирующем секрецию и агрегацию тромбоцитов. Дефект плотных гранул наблюдается при синдромах Чедиака–Хигаси, Германского–Пудлака. Агрегационный ответ

снижается в ответ на АДФ, адреналин и коллаген, при этом агрегация с ристоцетином в норме [118]. При дефиците  $\alpha$ -гранул («синдром серых тромбоцитов»), когда  $\alpha$ -гранулы отсутствуют или их число снижено, нарушена коллаген-индуцированная агрегация. При дефекте  $\alpha$ -гранул нарушен белковый состав этих гранул и снижена адреналин-индуцированная агрегация. На Рисунке 13 видно, что при нарушениях секреции гранул необратимая агрегация сменяется на обратимую в ответ на АДФ и арахидоновую кислоту, значит, обратимая агрегация сигнализирует об отсутствии вторичной активации тромбоцитов. Агрегометрия – тест, чувствительный к начальной концентрации тромбоцитов; агрегационный ответ пропорционально возрастает при увеличении концентрации тромбоцитов [119], поэтому при проведении теста у пациентов с тромбоцитозом рекомендуется разбавлять богатую тромбоцитами плазму до стандартных значений. При тромбоцитопении ответ на все индукторы агрегации снижен [120]. При сильном снижении концентрации тромбоцитов (менее 100 тыс. клеток в 1 мкл) агрегационная кривая уже не достоверна; рекомендуется оценивать агрегацию по среднему размеру агрегатов (ФСП метод) с помощью таких агрегометров, как Биола. При исследовании приобретенных тромбоцитопатий у детей 3–14 лет выявлено снижение степени агрегации по сравнению со взрослыми пациентами: в тестах с АДФ снижение наблюдалось у 70% детей; в тестах с адреналином – у 80%. При этом у 60% детей выявили комбинированные нарушения. При использовании в качестве индуктора агрегации ристоцетина показатель степени агрегации был в пределах нормы [121]. У здоровых детей не выявлено различий в агрегации цитратной богатой тромбоцитами плазмы в зависимости от возраста, однако известно только одно подобное сообщение; необходимо провести сравнение с данными из других лабораторий [122].



**Рисунок 13** – Типичные кривые агрегометрии в цитратной плазме в ответ на индукторы агрегации у пациентов с различными заболеваниями. По оси ординат-светопропускание, абсцисс-время. Воспроизведено из [117]

### 1.2.5 Вариации агрегометрии

В большинстве лабораторий агрегометрию смотрят на богатой тромбоцитами плазме, взятой на цитрат. Однако в такой постановке, во-первых, присутствуют белки плазменного звена свертывания крови, которые могут повлиять на активацию тромбоцитов, во-вторых, снижена концентрация ионов

кальция, необходимых для нормального связывания фибриногена с интегринами. Чтобы исключить влияние составляющих плазмы, тромбоциты отмывают от белков плазмы. Наиболее распространены два подхода к отмыванию тромбоцитов: гель-фильтрация и серия последовательных центрифугирований. В первом случае используют метод хроматографии на колонке с сефарозой 2В. Это позволяет полностью очистить тромбоциты от белков плазмы, ассоциированных с ними (фактор Виллебранда, фибриноген, факторы свертывания плазмы и др.), однако практически всегда приводит к небольшой активации тромбоцитов. При втором подходе богатая тромбоцитами плазма центрифугируется при пониженном значении рН (6,5), после этого осадок перемешивается в буферном растворе, содержащем ингибиторы активации тромбоцитов (простациклин, апираза и др.), – этот процесс про исходит 1–2 раза [74]. Однако при отмывании тромбоцитов даже самым щадящим методом их ответ на агрегацию все равно существенно ниже, чем ответ БТП на те же концентрации агониста. По-видимому, процесс отмывания тромбоцитов вне зависимости от используемого протокола влияет на активацию тромбоцитов [74]. Независимо от протокола работы в ответ на АДФ в присутствии ионов кальция в среде наблюдается обратимая агрегация тромбоцитов. При наблюдении суспензии тромбоцитов под микроскопом было подтверждено, что снижение светопропускания соответствует дезагрегации тромбоцитов. Обратимая агрегометрия наблюдается в ответ на такие слабые активаторы, как серотонин, АДФ, либо на комплекс адреналина с серотонином при физиологической концентрации ионов кальция. Считается, что при обратимой агрегации не происходит второй волны активации тромбоцитов, то есть не идет секреция гранул со вторичными активаторами и не происходит синтеза тромбосана.

### **1.2.6 Агрегометрия как основной метод анализа функциональности тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом при двойной антитромбоцитарной терапии**

Двойная антитромбоцитарная терапия (ДАТТ) ацетилсалициловой кислотой

и ингибиторами рецептора P2Y<sub>12</sub> является стандартным лечением для пациентов с острым коронарным синдромом, в основе патогенеза которого лежит атеротромбоз [123].

Атеротромбоз – это состояние, при котором тромб образуется над нестабильной атеросклеротической бляшкой за счет обнажения сильно тромбогенной поверхности, с которой взаимодействуют тромбоциты [124; 125]. В этой модели патогенеза изначально считалось, что тромбоциты демонстрируют нормальную функциональность, образуя тромбы на пораженных участках артерии вследствие тромбогенности эрозивной бляшки и вследствие измененных реологических условий, однако при дальнейшем изучении был выявлен фенотип гиперреактивных тромбоцитов, которые связаны с образованием тромбов даже без наличия атеросклеротической бляшки с эрозивной поверхностью. Понятие "фенотип гиперреактивных тромбоцитов" было введено Jeffrey S. Berger в 2013 году, так стали называть тромбоциты, имеющие повышенную агрегацию тромбоцитов (более 60%) в ответ на адреналин либо комбинацию адреналина с серотонином [126].

Хотя турбидиметрическая агрегометрия является "золотым стандартом" в изучении агрегации тромбоцитов при заболеваниях крови и используется гематологами для оценки риска кровотечений, при этом в кардиологии мониторинг функции тромбоцитов много лет активно обсуждался, но не вошел в рутинную практику. Однако, в последние годы, в связи с появлением различных ингибиторов рецепторов P2Y<sub>12</sub> (клопидогрел, прасугрел, тикагрелор) с различной степенью активности, практикующие врачи стали выбирать различные режимы антитромбоцитарной терапии, которые могли включать в себя как эскалацию, так и деэскалацию ингибиторов P2Y<sub>12</sub> [127; 128]. Традиционно, индивидуальные и альтернативные режимы назначения ДАТТ выбирались в соответствии с клиническими состояниями (стабильная ишемическая болезнь сердца или острый коронарный синдром), стадией заболевания (ранняя или длительная терапия), риском ишемических и геморрагических осложнений. Последние годы появилось большое количество данных о том, что режимы назначения ДАТТ потенциально

могут быть основаны на функциональном тестировании тромбоцитов [127; 129; 130]. Хотя до сих пор рутинное использование анализа функциональности тромбоцитов у пациентов, которые перенесли острое коронарное событие, не рекомендуется, тем не менее в последних рекомендациях по инфаркту миокарда без подъема сегмента ST европейского кардиологического общества указано, что можно рассмотреть выборочное использование данных тестов для деэскалации ДАТТ. При этом упоминаются коммерческие тест системы, такие как VerifyNow P2Y12 и др., в основе которых также лежит LTA [131; 132]. Тем не менее, в настоящий момент недостаточно данных о значении "фенотипа гиперреактивных тромбоцитов", как фактора риска развития сердечно-сосудистого события, недостаточно данных о возможности использования агрегометрии для мониторинга антитромбоцитарной терапии, что делает настоящее исследование крайне актуальным.

Хотя пациенты с острым коронарным синдромом получают антитромбоцитарную терапию, частота вторичных тромботических событий у этих пациентов остается значительной [127, 133]. Слепое увеличение дозы анти-тромбоцитарных препаратов без контроля за состоянием тромбоцитов приведет к кровотечению. Таким образом, необходимо наблюдение за функциональностью тромбоцитов пациента с помощью чувствительного, но при этом быстро осуществимого теста, чтобы иметь возможность корректировать терапию.

### **1.2.7 Оценка кровоточивости пациентов после операции трансуретральной резекции**

Трансуретральная резекция простаты (ТУР) – это эндоскопическая процедура, при которой удаляется часть ткани предстательной железы. Эта процедура используется в течение многих лет и до сих пор является золотым хирургическим стандартом при инфравезикальной обструкции (ИМП), с некоторыми незначительными изменениями. Показаниями к ТУР являются неэффективность медикаментозного лечения, обструктивная нефропатия, образование камней в мочевом пузыре, более двух эпизодов задержки мочи,

абсцесс предстательной железы, трудности с катетеризацией и обструктивная азооспермия [134, 135].

Одним из потенциально опасных состояний во время операции ТУР является обильное кровотечение. Артериальное кровотечение во время операции ТУР может быть более выраженным в случаях инфекции или задержки мочи из-за гиперемии железы. Предварительная антиандрогенная терапия финастеридом или флутамидом может уменьшить кровотечение. Венозное кровотечение обычно возникает из-за повреждения венозных синусоидов. Объем интраоперационного кровотечения может зависеть от размера железы и массы резекции.

Обычно проводится лабораторная оценка стандартных параметров гемостаза у пациентов, подвергающихся плановым хирургическим вмешательствам, и она включает ПВ, АЧТВ и количество тромбоцитов [88]. Тем не менее, в исследовании 150 пациентов, перенесших КТ через четыре часа после стереотаксической биопсии, общая частота кровотечения составила 4,7%, в то время, как только у 1,4% было симптоматическое кровотечение с соответствующими клиническими симптомами. Возникли интенсивные дебаты о том, следует ли проводить рутинные тесты на коагуляцию перед плановыми хирургическими вмешательствами [136] [137]. Что касается плановых нейрохирургических процедур, проф. Дазман и др. изучили медицинские записи 4310 пациентов, уделив особое внимание ПВ и частоте послеоперационных кровотечений [138]. Только у пяти пациентов (0,1%) были неожиданно повышены значения ПВ, и ни у одного из этих пациентов не было послеоперационного кровотечения. Также проф. Бейнон и Вин показали, что параметры тестов гемостаза не имеют предсказательной способности по интраоперационным кровотечениям и степени заживления после операции у пациентов [137]. Интересно, что большая часть показателей гемостаза у больных с геморрагией в дооперационном периоде находилась в пределах нормы.

### **Постановка задачи**

Цель диссертационной работы – исследование феномена обратимой агрегации тромбоцитов человека и разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на его основе.

Были поставлены следующие задачи исследования:

1. Подбор условий наблюдения обратимой агрегации тромбоцитов и анализ их влияния на механизмы процесса.
2. Определение последовательности событий и механизмов процесса дезагрегации тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии.
3. Разработка методики диагностики состояния тромбоцитарного гемостаза на основе феномена обратимой агрегации тромбоцитов.
4. Исследование обратимой агрегации тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом, находящихся на двойной антитромбоцитарной терапии.
5. Исследование корреляции степени обратимой агрегации тромбоцитов с рисками кровотечений во время операции трансуретральной резекции.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Материалы

Реагенты: пробирки вакуумные VACUETTE с цитратом натрия 3,2% (Greiner Bio-One, Кремс-мюнстер, Австрия); HEPES, бычий сывороточный альбумин, NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, глюкоза, цитрат натрия, NaOH, апираза, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, фосфатный буфер (PBS) – всё – Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США; простагландин E1 (PGE1) (MP Biochemicals, Ирвин, США), тромбин (Haematologic Technologies, Колчестер, США), флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ) (Molecular Probes, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Helicon, Москва, Россия, аннексин V конъюгированный с Alexa Fluor 647 (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США), диметилсульфоксид (ДМСО), этиловый спирт – всё- Merck, Германия.

#### Растворы:

1. Буфер Тирод для работы с тромбоцитами, pH 7,4 :

- 150 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 20 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфониевая кислота)

- 5 mM глюкоза
- 0,5% бычий сывороточный альбумин

2. Раствор цитрата натрия 106 mM, pH 5,5

3. Раствор хлорида кальция 100 mM

### 2.2 Пациенты

Пациенты с острым коронарным синдромом (n=11, возраст: 53-75, медиана: 64) 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). До проведения операции пациенты принимали аспирин в дозировке 250мг, после ЧКВ пациентам назначалась двойная антиагрегантная терапия аспирином с ингибитором P2Y<sub>12</sub> рецептора к АДФ: тикагрелором либо прасугрелом.

Пациенты (n=21, возраст: 55-87, медиана: 72) с направлением на операцию трансуретральной резекции наблюдались в отделении урологии ГБУЗ "ГКБ им В.В. Виноградова ДЗМ" (Москва, Россия). До взятия крови пациенты однократно принимали фраксипарин.

Пациент с диагнозом «афибриногенемия» и пациент с нарушениями функциональности фосфолипазы А<sub>2</sub> наблюдались в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Забор крови у пациентов и здоровых доноров производился с разрешения независимого этического комитета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России от 23.06.2020.

## **2.3 Методы**

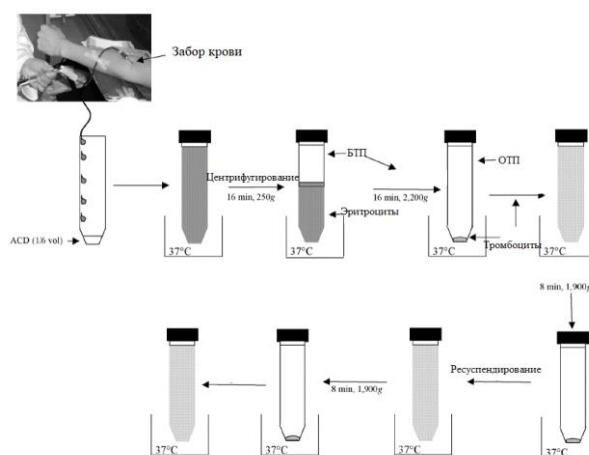
### **2.3.1 Выделение тромбоцитов из цельной крови**

Кровь забиралась в вакуумные пробирки с одним из антикоагулянтов: гирудином, цитратом натрия, литий-гепарином, либо самотеком в пробирки с цитрат декстрозой у здоровых доноров (n=20, возраст: 18-45, медиана: 28). В зависимости от эксперимента из цельной крови выделялась богатая тромбоцитами плазма (БТП) либо тромбоциты. Для получения БТП, плазма выделялась из цельной крови центрифугированием в течение 8 минут на скорости 200g. Богатая тромбоцитами плазма отбиралась пипеткой Пастера. Доведение БТП до стандартизованной концентрации тромбоцитов 200тыс.кл/мкл производилось разбавлением бедной тромбоцитами плазмой, полученной при центрифугировании цельной крови в течение 15 минут на скорости 2000g.

Выделение тромбоцитов из плазмы проводилось по следующему протоколу [74]: центрифугирование цельной крови, взятой самотеком в пробирки с цитрат

декстрозой, в течение 15 минут на скорости 250g для получения БТП (Рисунок 14). Далее плазма инкубировалась в течение 10 минут при температуре +37 °С. После инкубации БТП центрифугировалась на скорости 2200g в течение времени, зависящем от объема плазмы, но не более 15 минут. Далее, осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Tyrode's с добавлением гепарина (10 ед/мл) и простаглицина (0,5 мкМ). После инкубации в течение 10 минут при температуре +37 °С в суспензию тромбоцитов был повторно добавлен простаглицин (0,5 мкМ), и суспензия центрифугировалась еще раз в течение 8 минут на скорости 1900 g. Осадок тромбоцитов ресуспендировался в буфере Tyrode's в присутствии простаглицина (0,5 мкМ), далее проводилась инкубация в течение 10 минут при температуре +37 °С и заключительное центрифугирование в течение 8 минут на скорости 1900 g после повторного добавления простаглицина (0,5 мкМ). Все центрифугирования проводились при температуре +37 °С.

На последнем этапе тромбоциты ресуспендировались в буфере Tyrode's без ионов кальция с АДФазой (0,1 ед/мл) до фиксированной концентрации 200тыс.кл/мкл. Измерения начинались не ранее, чем через 30 минут инкубации финальной суспензии тромбоцитов при температуре +37°С. Хлорид кальция в концентрации 2мМ добавлялся в суспензию тромбоцитов перед измерениями, в которых указано наличие ионов кальция.



**Рисунок 14** – Схема выделения тромбоцитов из плазмы. Адаптировано из [74]

### 2.3.2 Постановка агрегометрии

Агрегация тромбоцитов наблюдалась методом световой турбидометрической агрегометрии на приборах Chrono-Log 490, Biola LA-230 либо Solar AP 2110. Измерения велись при равномерном перемешивании 250мкл суспензии тромбоцитов магнитным якорем со скоростью 800 оборотов в минуту. Тромбоциты активировались различными концентрациями АДФ (1,25 – 40мкМ), либо добавлением смеси серотонина (20мкМ) и адреналина (200нМ), либо пептидом, активирующем рецептор PAR-1 (TRAP-6) в присутствии ингибитора рецептора к АДФ P2Y<sub>12</sub> – ARC-69931MX, либо арахидоновой кислотой в концентрации 1мМ. Перед измерением к суспензии тромбоцитов было добавлено 200мкг/мл фибриногена. Для ингибирования тромбоцитов в суспензию добавлялся аспирин в концентрации 1мМ, далее суспензия инкубировалась в течение 20 минут при температуре +37°C. В экспериментах с ингибированием кальций-независимой фосфолипазы A<sub>2</sub> использовался специфичный к ней антагонист R-BEL в концентрации 2,5мкМ. Концентрация тромбоцитов во всех экспериментах была стандартизирована и равна 200 тыс.кл/мкл. В качестве контроля в экспериментах с БТП использовалась плазма, обедненная тромбоцитами (центрифугирование цельной крови проводилось на скорости 2000g в течение 15 минут), в экспериментах с выделенными тромбоцитами в качестве контроля использовался буфер Tyrode's. Сигнал регистрировался каждые 0,5 секунды для агрегометра Chrono-Log 490 и каждую секунду для агрегометра Biola LA-230. Средний размер агрегатов определялся на приборе Biola LA-230 с помощью метода флуктуаций светопропускания (ФСП), вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале.

### 2.3.3 Метод флуктуаций светопропускания

Метод флуктуаций светопропускания (ФСП) основан на анализе изменений сигнала светопропускания, вызванных изменением числа частиц, проходящих через оптический канал. Далее оценивается относительная дисперсия данных флуктуаций, которая является пропорциональной среднему размеру агрегатов, данный параметр используется для исследования кинетики агрегации. Метод ФСП-

анализа отличается высокой чувствительностью для исследования спонтанной агрегации и агрегации под действием низких концентраций индукторов либо при низких концентрациях частиц в суспензии.

Измеряемый параметр:

$$\left(\frac{\sigma}{I}\right)^2 = \theta \frac{\sum_n K_n^2 N_n n R_n}{\sum_n N_n n}$$

Где  $\sigma$  – среднеквадратичное отклонение светопропускания,  $I$  – среднее значение светопропускания,  $\theta$  – общее число тромбоцитов,  $K$  – эффективность светорассеяния,  $N$  – число тромбоцитов,  $R$  – радиус агрегата из  $n$  тромбоцитов.

Агрегометр Viola LA-230 отличается от обычного турбидиметрического агрегометра наличием фильтра высоких частот и двухполупериодным выпрямителем, что позволяет использовать как стандартный турбидиметрический метод, так и ФСП-метод исследования агрегации тромбоцитов.

### 2.3.4 Проточная цитофлуориметрия

Параметры функционального ответа тромбоцитов (связывание фибриногена с интегринами, высвобождение внутриклеточного кальция из кальциевых депо в цитозоль) анализировали методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра NovoCyte (ACEA Biosciences, США). Для экспериментов по связыванию фибриногена в кювету с БТП или с суспензией тромбоцитов перед измерениями добавляли 0,2 мг/мл фибриногена, связанного с изотиоцианатом флуоресцеина (фибриноген- FITC). Для измерения уровня наполнения внутриклеточных кальциевых депо суспензию тромбоцитов инкубировали в течение 2 часов с 4 нг/мкл FLUO-5N при температуре +37°C в присутствии АДФазы 0,1 ЕД/мл и PGI-1 500 нМ. 10 мкл суспензии тромбоцитов собирали из кюветы агрегометра в разные моменты агрегации, разбавляли в 20 раз буфером Tyrode's, а затем анализировали методом проточной цитометрии.

### **2.3.5. Измерение концентрации тромбоксана A2**

Для определения концентрации синтезированного TXA2 использовали метод иммуноферментного анализа (ELISA). Оптическую плотность (ОП) измеряли спектрофотометрическим методом при длине волны  $450 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ . Концентрацию TXA2 в тестируемых образцах рассчитывали, сравнивая оптическую плотность образцов со стандартной кривой.

### **2.3.6. Микроскопия агрегатов**

Спонтанную дезагрегацию тромбоцитов наблюдали методом темного поля, путем добавления 10 мкл суспензии тромбоцитов из кюветы агрегометра на предметное стекло. Конфокальные изображения агрегатов тромбоцитов были получены с помощью микроскопа Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Йена, Германия), оснащенного микроскопическим объективом  $\times 100$ . Лазер с длиной волны 488 нм использовали для возбуждения антител, связанных с изотиоцианатом флуоресцеина. Изображения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ и плагина для трехмерного просмотра (Национальный институт здравоохранения, Bethesda).

### **2.3.7 Моделирование в среде COmplex PAthway SIMulator**

Математическая модель активации и агрегации тромбоцитов представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений, интегрируемых методом LSODA, программное обеспечение COPASI (COmplex PAthway SIMulator, copasi.org) с открытым исходным кодом с несколькими методами численного исследования систем обыкновенных дифференциальных уравнений. Метод LSODA – численный метод решения системы обыкновенных дифференциальных уравнений с возможностью переключения между явными и неявными методами. Параметры модели подбирались с помощью автоматической аппроксимации экспериментальных данных по методам, представленным в COPASI: метод

эволюционной стратегии, метод роя частиц, случайного подбора, метод Хука и Дживса [139] или Левенберга- Марквардта [140].

### **2.3.8 Анализ данных**

Для оценки агрегационных кривых анализировались следующие параметры: максимум агрегации как максимальное значение светопропускания в кювете с суспензией тромбоцитов; индекс обратимости – отношение светопропускания суспензии тромбоцитов в кювете агрегометра на 600й секунде к максимальному значению светопропускания агрегационной кривой. Достоверность различия результатов оценивалась непараметрическим статистическим критерием Манна-Уитни. Результаты анализировались программным обеспечением OriginPro v.8.5 (Microcal Software; США) и были представлены в виде среднего, по меньшей мере, 3 повторных измерений  $\pm$  стандартное отклонение (SD), если не указано другое.

## Глава 3. Результаты

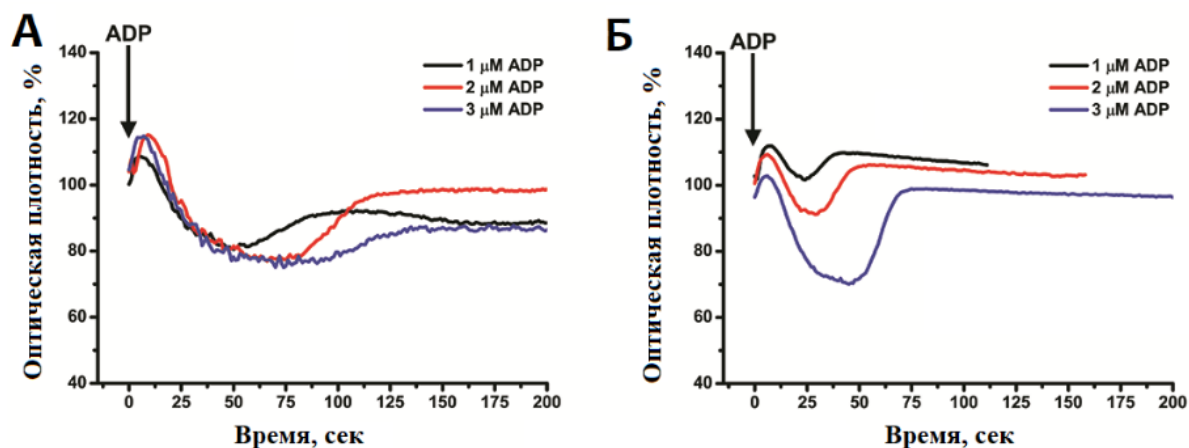
### 3.1 Условия наблюдения обратимой агрегации

В ходе работы были определены условия возникновения обратимой агрегации тромбоцитов. Явление обратимой агрегации тромбоцитов оценивалось по обратимому изменению светопропускания суспензии тромбоцитов или богатой тромбоцитами плазмы в кювете агрегометра.

Сначала были уточнены ранее полученные в литературе данные по наблюдению явления обратимой агрегации в ответ на АДФ. При добавлении АДФ в концентрации от 1 до 3 мкМ в богатой тромбоцитами плазме при физиологической концентрации ионов кальция через 50 секунд после первоначального снижения оптической плотности в ответ на активатор было зарегистрировано повышение оптической плотности образца до первоначального уровня – наблюдался феномен обратимой агрегации тромбоцитов (Рисунок 15, А). Этот феномен также наблюдался в суспензии предварительно отмытых тромбоцитов, ресуспендированных в буферном растворе с 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  (Рисунок 15, Б). Повышение оптической плотности суспензии в течение 10 секунд от момента добавления активатора АДФ объясняется увеличением площади поверхности тромбоцитов относительно неактивированного состояния за счёт образования псевдоподий [1].

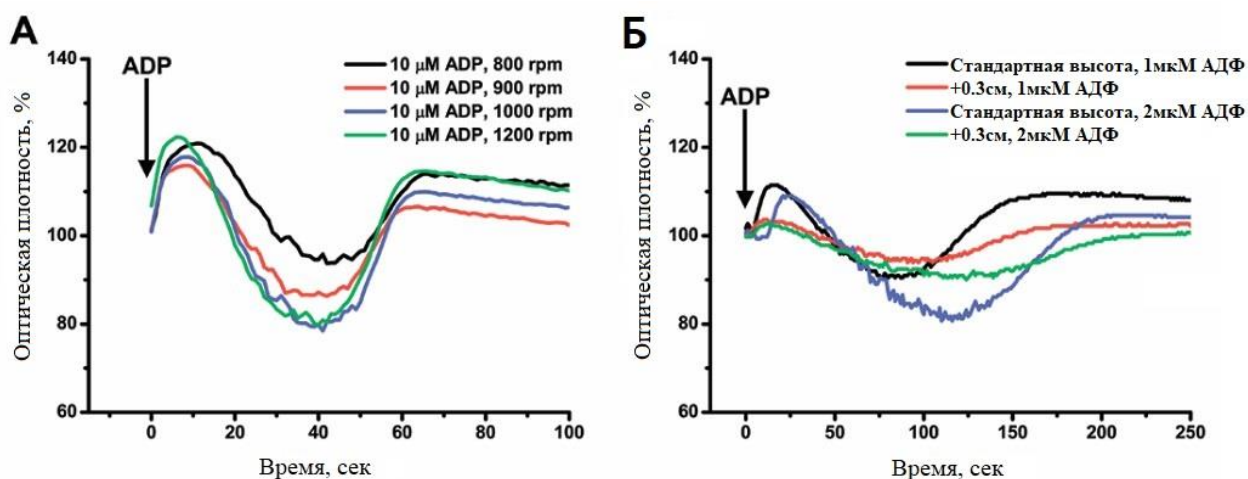
Максимум агрегации (минимум оптической плотности) увеличивался с увеличением концентрации АДФ, при этом также увеличивалось время, требуемое для дезагрегации (Рисунок 15 Б)

Было показано, что характер агрегации не зависит от скорости перемешивания тромбоцитов в кювете в рабочих пределах для агрегометра (800-1200 оборотов в минуту, rpm) (Рисунок 16, А). Также было показано, что уровень установки кюветы в агрегометр, на котором измеряется сигнал светопропускания в кювете с суспензией тромбоцитов, не значительно влияет на агрегацию (Рисунок 16, Б).



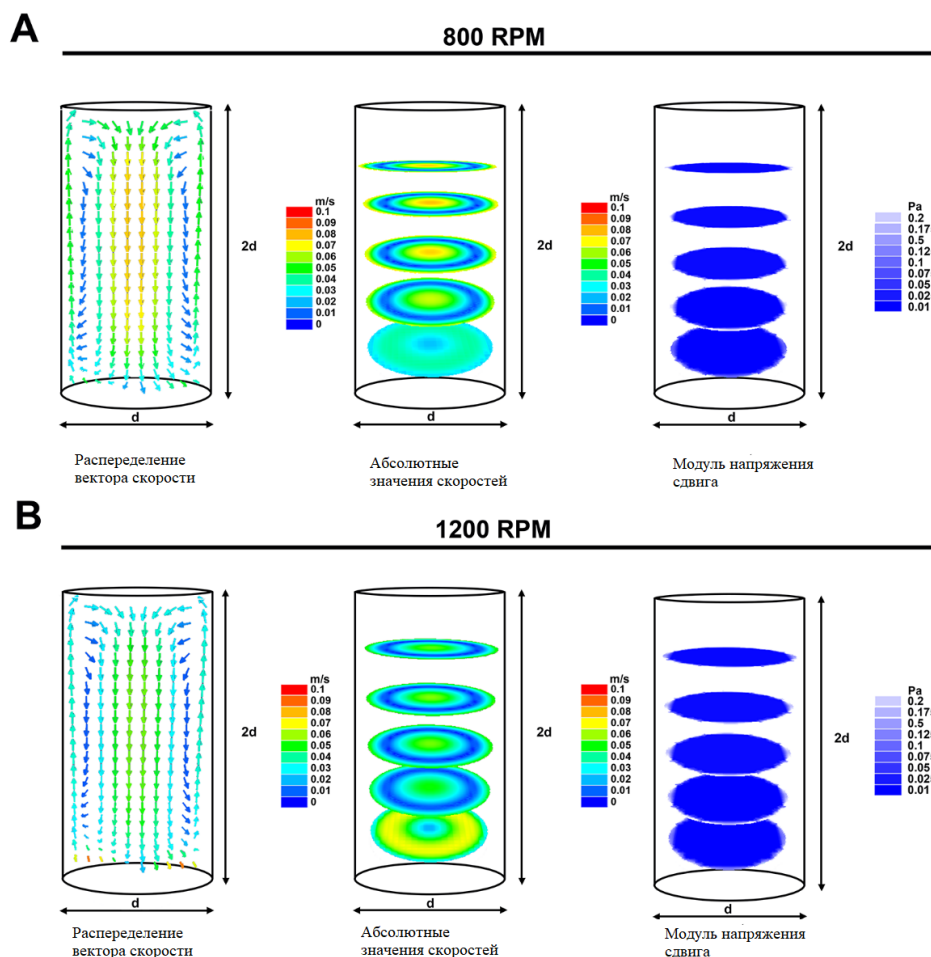
**Рисунок 15** – Характерные агрегационные кривые в ответ на активацию АДФ (1-3мкМ) (А)- в гепаринизированной БТП; (Б)- в суспензии тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция 2мМ и 200мкг/мл фибриногена

В программе FlowVision была разработана вычислительная модель движения потоков жидкости в кювете агрегометра с вращающимся нижним слоем. С помощью неё показано, что в объеме, в котором проводится запись сигнала агрегации тромбоцитов, не возникают турбулентные потоки (Рисунок 17). Данный результат наблюдается в диапазонах вращения мешалки 800-1200 rpm.



**Рисунок 16** – Характерные агрегационные кривые (А)- зависимость агрегации тромбоцитов в гирудиновой БТП от частоты перемешивания суспензии в кювете агрегометра. (Б)- зависимость агрегации тромбоцитов в гирудиновой БТП от уровня, на котором регистрируется образование агрегатов в кювете

Таким образом, механические условия проведения теста агрегометрии не влияют на агрегационный ответ тромбоцитов. Единственная роль создаваемых потоков в кювете – увеличение взаимодействий между тромбоцитами и агрегатами.



**Рисунок 17** – Распределение по объему кюветы агрегометра вектора скорости, абсолютных значений скоростей и модуля напряжения сдвига. Турбулентные потоки не создаются. Рисунок адаптирован из работы [141]

### 3.1.1 Результаты компьютерного моделирования обратимой агрегации

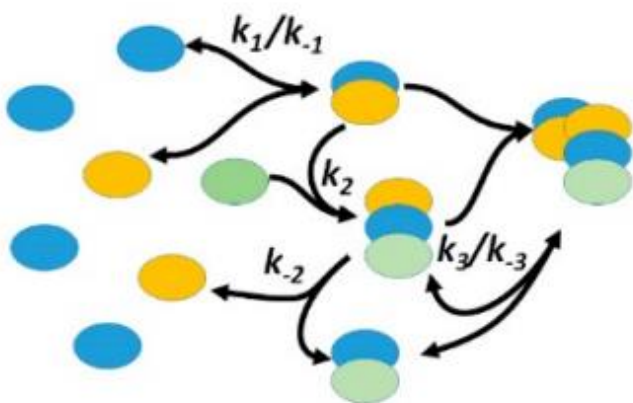
Для получения функциональных параметров из агрегационной кривой была разработана математическая модель обратимой агрегации тромбоцитов [142; 143; 144].

Построенная математическая модель основывается на системе дифференциальных уравнений [144].

Формула (1):

$$\begin{cases} \frac{dp}{dt} = -2k_1 p^2 - k_2 n p + (k_{-1} + k_{-2}) n \\ \frac{dn}{dt} = k_1 p^2 - k_3 n^2 + (k_{-3} - k_{-1}) n \end{cases} ,$$

Где  $p$ - концентрация одиночных тромбоцитов,  $n$ - концентрация агрегатов всех размеров,  $k_1$  –кинетическая константа образования агрегата из 2х одиночных тромбоцитов;  $k_{-1}$  – кинетическая константа распада агрегата на 2 одиночных тромбоцита;  $k_{-2}$ ,  $k_2$  – кинетические константы обратимого присоединения одиночного тромбоцита к агрегату;  $k_{-3}$ ,  $k_3$  – кинетические константы обратимого слияния двух агрегатов в один (Рисунок 18).



**Рисунок 18** – Схема математической модели обратимой агрегации тромбоцитов

В данной модели можно рассчитать средний размер агрегата по формуле:  $s = \frac{p_0 - p}{n}$ , где  $p_0$ - начальная концентрация тромбоцитов.

Модель может описать только обратимую агрегацию тромбоцитов, так как предположение о неизменности вероятностей присоединения тромбоцитов друг к другу и к агрегату не учитывает возможное возникновение вторичной активации

тромбоцитов в ответ на сильные агонисты, что приводит к необратимому характеру агрегации.

В отличие от метода Смолуховского, который требует большое количество неизвестных параметров при решении стохастическими методами и долгое время расчетов при решении детерминистическими, предложенная модель не требует долгих вычислений, так как основана на законах действующих масс.

Данная модель способна описывать обратимую агрегацию тромбоцитов без изменения параметров модели во времени. С биологической точки зрения это означает, что наблюдаемый феномен обратимой агрегации тромбоцитов не предполагает деактивацию интегринов тромбоцитов в процессе агрегации.

Для аппроксимации экспериментальных данных концентрации одиночных тромбоцитов и агрегатов, рассчитываемые моделью, были пересчитаны в концентрацию светорассеивающих частиц по формуле.

Формула (2):

$$Aggregation = 100\% * \exp\left(\frac{p + n - p_0}{p_0}\right)$$

Этот пересчет необходим для соотнесения теоретических данных с экспериментальными, считываемыми с прибора в виде оптической плотности суспензии.

Необходимо отметить, что симуляция агрегационных кривых, рассчитанных на основании данного уравнения, не начинается со стационарного состояния системы. Симуляция запускается при начальных условиях, когда все тромбоциты одиночны и не находятся в агрегатах ( $n=0$ ), и в начальный момент времени ( $t=0$ ) тромбоциты приобретают способность к формированию агрегатов.

Для сравнения численных значений параметров системы между собой были проведены следующие преобразования.

Формула (3):

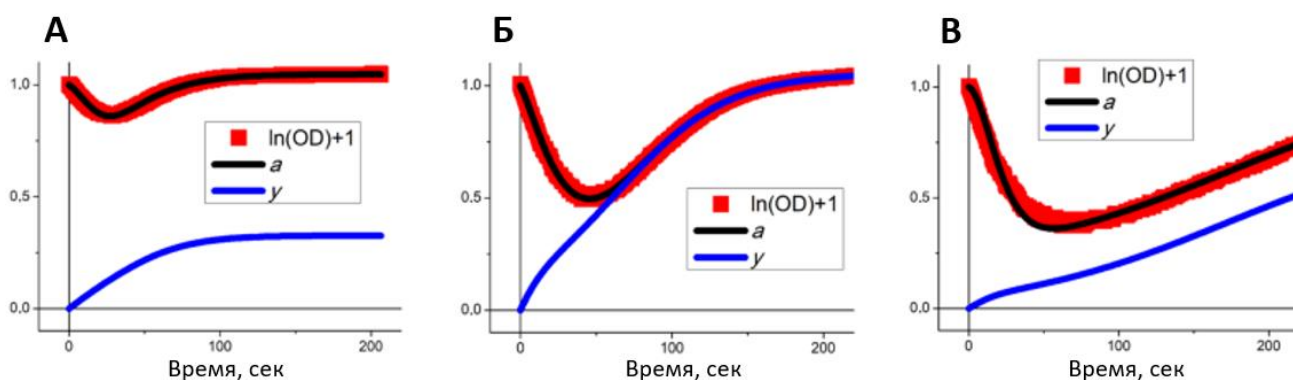
$$\begin{cases} a = \frac{p+n}{p_0} \\ y = \frac{n}{p_0} \end{cases} ,$$

Таким образом, новая переменная «у» имеет размерность концентрации агрегатов, а параметр «а» показывает оптическую плотность суспензии. Тогда система уравнений, описывающая поведение модели, преобразуется в следующий вид:

Формула (4):

$$\begin{cases} \dot{a} = -p_0k_1a^2 + (2k_1 - k_2)p_0ay + (k_{-1} + k_{-2} + k_{-3})y + (k_2 - k_1 - k_3)p_0y^2 \\ \dot{y} = p_0k_1a^2 - 2k_1p_0ay + (k_1 - k_3)p_0y^2 + (-k_{-1} + k_{-3})y \end{cases} .$$

Значения параметров оценивались методом роя частиц [145] на основе экспериментальных данных агрегации тромбоцитов в ответ на добавление АДФ (Рисунок 19). Соответствующие параметры представлены в таблице 1.



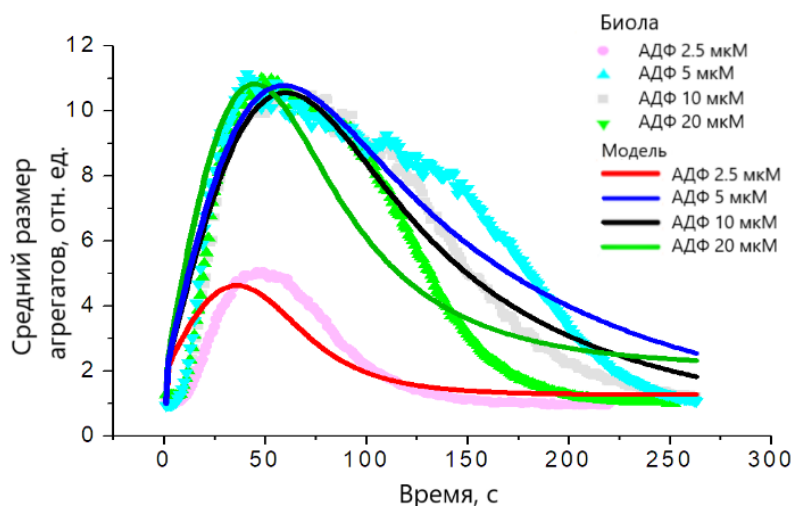
**Рисунок 19** – Аппроксимация экспериментальных данных агрегации отмытых тромбоцитов моделью, активация производилась различными концентрациями АДФ: (А) – 2,5мкМ; (Б) – 5мкМ; (В) – 10мкМ. Голубая кривая отражает изменение переменной «у», отвечающую за концентрацию агрегатов; красная кривая – логарифм оптической плотности экспериментальных значений. Экспериментальные данные – типичные кривые для n=10 экспериментов; черная кривая отражает изменение переменной «а», отвечающей за оптическую плотность суспензии, предсказываемой моделью.

**Таблица 1** – Рассчитанные параметры для аппроксимированных данных на рисунке 19

| <b>Параметр</b>   | <b>2,5 μМ АДФ</b> | <b>5 μМ АДФ</b>       | <b>10 μМ АДФ</b> |
|---|-------------------|-----------------------|------------------|
| <b>Вероятность<br/>тромбоцита<br/>присоединиться к<br/>агрегату, <math>k_1</math>, 1/([ед]*сек)</b>             | 0,004933          | 0,01469               | 0,003955         |
| <b>Вероятность<br/>тромбоцита<br/>отсоединиться от<br/>агрегата, <math>k_{-1}</math>, 1/s</b>                   | 0,5027            | $1,73 \cdot 10^{-11}$ | 0,1995           |
| <b>Вероятность<br/>образования агрегата из<br/>2х агрегатов, <math>k_3</math>,<br/>1/([ед]*сек)</b>             | 0,1042            | 0,02627               | 0,01731          |
| <b>Вероятность<br/>агрегата развалиться на<br/>2 агрегата, <math>k_{-3}</math>, 1/сек</b>                       | 0,0262            | 0,02778               | 0,01329          |
| <b>Вероятность<br/>присоединения<br/>одинокго тромбоцита<br/>к агрегаты, <math>k_2</math>,<br/>1/([ед]*сек)</b> | 0,6757            | 0,1617                | 0,86886          |
| <b>Начальная<br/>концентрация<br/>тромбоцитов, <math>p_0</math>, [ед]</b>                                       | 400               | 405                   | 400              |

Анализ экспериментальных данных показал зависимость всех параметров от концентрации активатора.

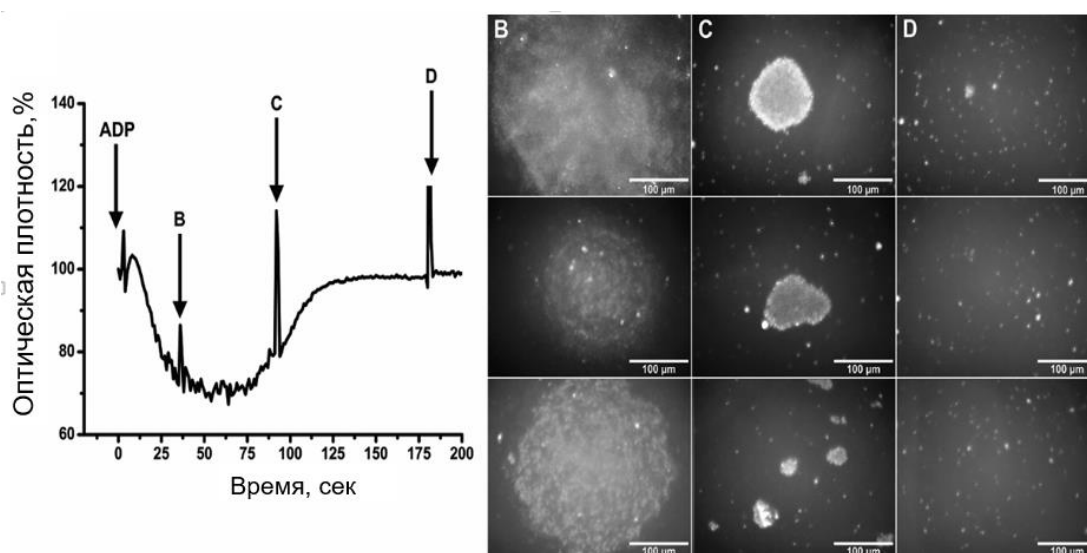
Также на основе экспериментальных данных, полученных с прибора Viola, была проведена аппроксимация кривой среднего размера агрегата (Рисунок 20).



**Рисунок 20** – Средний размер агрегата, рассчитанный моделью на основе аппроксимации экспериментальных данных, и измеряемый прибором Viola с помощью ФСП анализа

Модель верно предсказывает момент образования агрегатов большего размера, что подтверждается данными, полученными с помощью микроскопии тёмного поля (Рисунок 21).

Для точки В в среднем наблюдался 1 агрегат более 500мкм в диаметре и 2-5 средних (100мкм). Для точки С- 1 агрегат среднего размера 100мкм и 2-8 маленьких 20мкм. Для точки D наблюдались только мелкие агрегаты менее 10мкм и одиночные тромбоциты. Представлены типичные результаты для n=3.



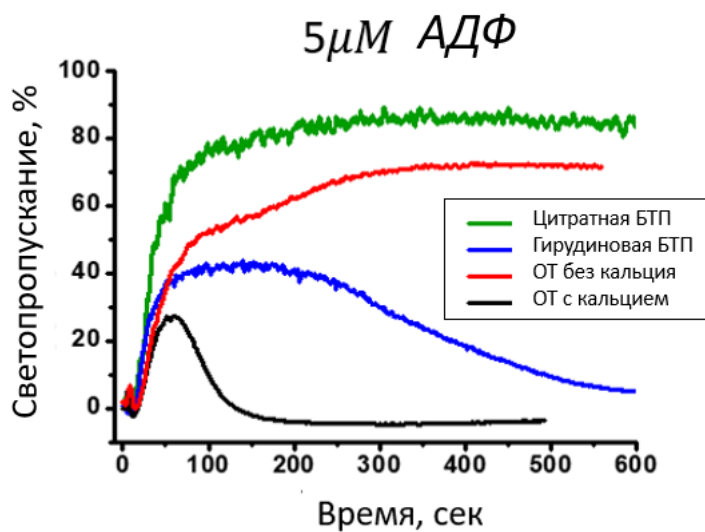
**Рисунок 21** – Наблюдение образования агрегатов в процессе измерения агрегационной кривой. В указанные моменты времени из кюветы без прекращения измерения забиралось 10 мкл суспензии и наблюдалось в микроскопе методом тёмного поля

### 3.1.2 Зависимость характера агрегации от активации тромбоцитов

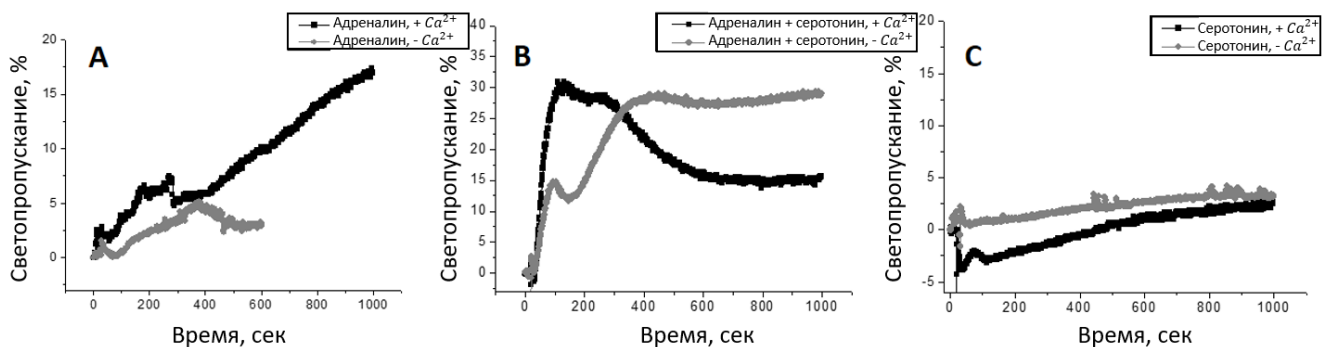
Для определения взаимосвязи между уровнем ионов кальция в суспензии и характером агрегации тромбоцитов в ответ на различные агонисты оценивалось возможное влияние условий эксперимента и типа активации на характер кривой агрегации. В ответ на АДФ в гирудиновой БТП и в суспензии тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция наблюдается кривая обратимой агрегации (Рисунок 22).

Чтобы проверить, не является ли этот эффект специфичным для активации от АДФ, мы использовали другие варианты активации тромбоцитов. Обратимая агрегация наблюдалась также при добавлении в суспензию смеси адреналина с серотонином при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии (Рисунок 23В). При этом при низкой концентрации ионов кальция в суспензии кривая агрегации была необратимой (Рисунок 23В). Активация исключительно адреналином вызывала необратимую агрегацию с низкой скоростью (Рисунок 23А), тогда как серотонин вызывал только изменение формы тромбоцитов без

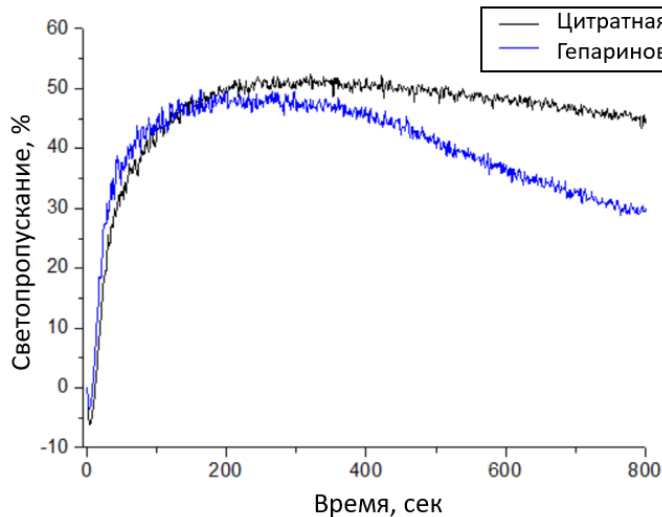
последующей агрегации (Рисунок 23С). Таким образом, обратимая агрегация в ответ на смесь адреналина и серотонина не имеет аддитивный характер. Аналогичная зависимость также наблюдается при TRAP-6-индуцированной агрегации (данные не приведены). В связи с тем, что активация тромбоцитов через PAR-1 способна привести к секреции гранул и выходу из них дополнительного активатора – АДФ, для исключения влияния секреторного АДФ использовался ингибитор рецептора P2Y<sub>12</sub> (ARC-69931MX) (Рисунок 24).



**Рисунок 22** – Агрегация тромбоцитов в цитратной и гирудиновой БТП либо суспензии тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция. Агрегацию индуцировали 5 мкМ АДФ



**Рисунок 23** – Агрегация тромбоцитов в БТП (цитратной БТП- «-» или гирудиновой БТП – «+») в ответ на (А) 200 нМ адреналина; (Б) 20 мкМ серотонина и 200 нМ адреналина; (С) 20 мкМ серотонина



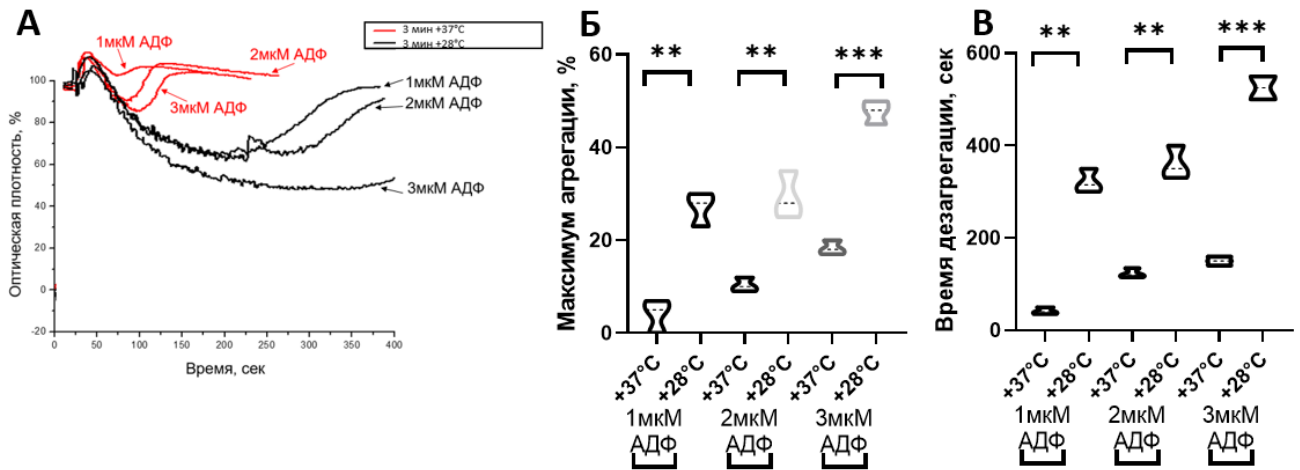
**Рисунок 24** – Агрегация тромбоцитов в ответ на 10 мМ TRAP-6 в присутствии 500 нМ ARC-69931MX в БТП. Типичные результаты из  $n = 10$  различных доноров

### 3.1.3 Влияние температуры на агрегацию тромбоцитов

Для проверки влияния температуры проведения эксперимента на агрегационную активность тромбоцитов был поставлен эксперимент с предварительной инкубацией тромбоцитов при определенной температуре. Богатая тромбоцитами плазма до измерения поддерживалась в течении 3 минут при +37С или +28С, где указано. Далее суспензия тромбоцитов активировалась различными концентрациями АДФ. Максимум агрегации тромбоцитов согласно регистрации оптической плотности суспензии увеличивался при понижении температуры инкубации тромбоцитов с +37 °С до +28 °С (Рисунок 25). При активации суспензии тромбоцитов 1мкМ АДФ наблюдалось среднее значение максимума агрегации 5% при температуре +37°С и 27% при +28 °С. Для активации 2мкМ АДФ 10,3% для +37°С и 29,3% для +28 °С. Для активации 3мкМ АДФ 18,3% и 47,7% соответственно. В среднем, при понижении температуры агрегации средний максимум агрегации снижался в 3 раза.

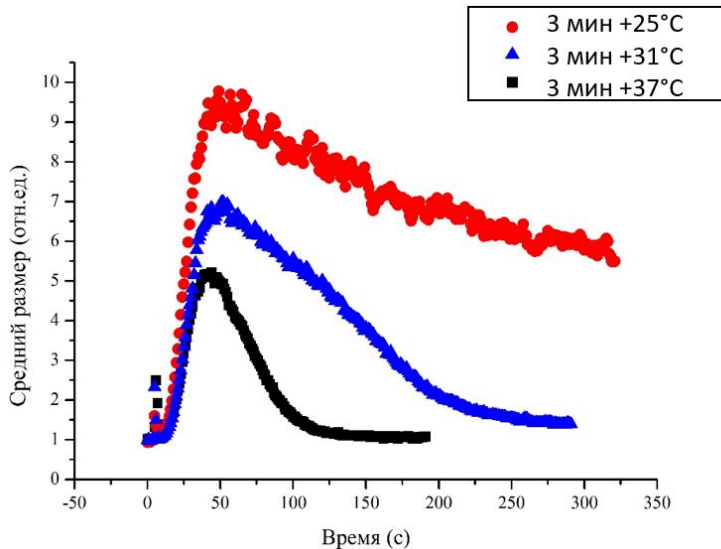
При активации суспензии тромбоцитов 1мкМ АДФ время дезагрегации тромбоцитов составляло 41,7 сек для +37°С и 321,7 сек для +28°С. Для активации

2мкМ АДФ 123,3 сек и 360 сек соответственно. Для активации 3мкМ АДФ 123,3 сек и 360 сек соответственно 150 сек и 370 сек соответственно. В среднем, при понижении температуры время дезагрегации тромбоцитов снижалось в 3 раза.



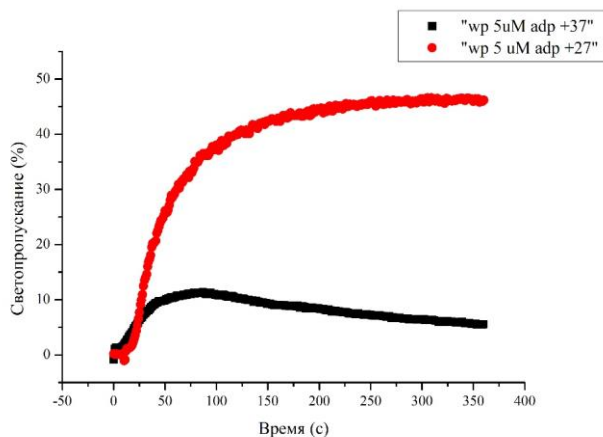
**Рисунок 25** – Влияние температуры проведения эксперимента на характер агрегации тромбоцитов. Перед измерением тромбоциты инкубировались в течение 3 минут при температуре +28 °С (черные кривые) либо +37 °С (красные кривые) в термостате. (А) – Характерные агрегационные кривые в ответ на активацию гирудиновой богатой тромбоцитами плазмы АДФ (1-3мкМ). Измерение проводилось при температуре инкубации. (Б) – Изменение максимума агрегации тромбоцитов при различных температурах инкубации; (В) – Изменение времени дезагрегации тромбоцитов при различных температурах инкубации;

Эффект влияния температуры инкубации тромбоцитов также наблюдался при определении среднего размера агрегата методом флуктуаций светопропускания (Рисунок 26).



**Рисунок 26** – Зависимость среднего размера агрегата от температуры преинкубации. Измерения велись при активации 3мкМ АДФ в гирудиновой БТП, инкубация в течении трёх минут

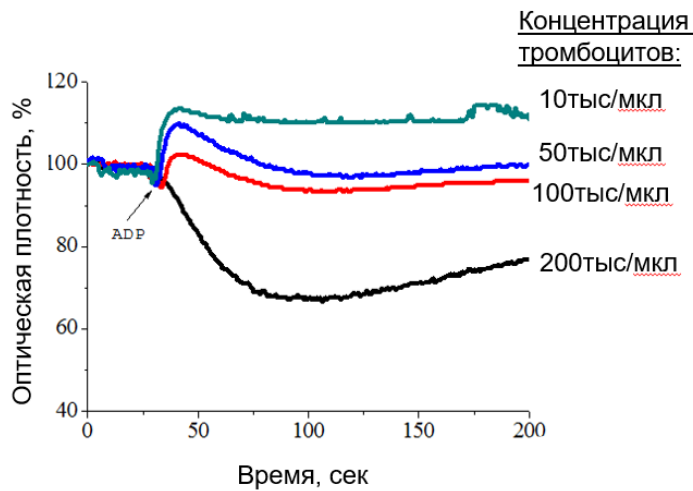
Для исключения влияния плазмы крови на данный эксперимент была также измерена агрегация суспензии тромбоцитов в буфере при различных температурах инкубации при физиологической концентрации ионов кальция (Рисунок 27). Результаты агрегации суспензии тромбоцитов в буфере соответствуют результатам экспериментов с богатой тромбоцитами плазмой.



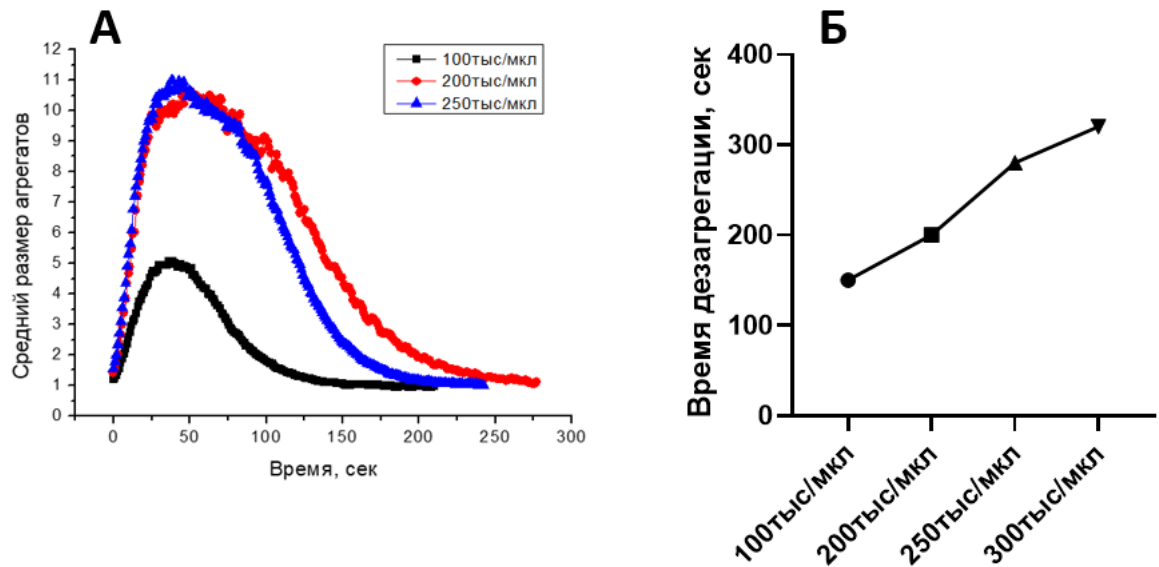
**Рисунок 27** – Зависимость агрегации тромбоцитов в суспензии от температуры предварительной инкубации: +37 °С либо +27 °С в течение 3 минут. Измерения велись при активации тромбоцитов 5мкМ АДФ в суспензии тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция

### 3.1.4 Зависимость агрегации от концентрации тромбоцитов

При уменьшении концентрации тромбоцитов с 200тыс/мкл (физиологическая концентрация) до 10тыс/мкл наблюдается уменьшение агрегации тромбоцитов вплоть до полного исчезновения ответа (Рисунок 28). Также было изучено влияние концентрации тромбоцитов в суспензии на средний размер образовавшегося агрегата с помощью ФСП метода на приборе Viola (Рисунок 29). При уменьшении концентрации тромбоцитов в суспензии с 300тыс/мкл до 100тыс/мкл среднее значение времени дезагрегации уменьшилось в 2 раза: с 320 сек до 150 сек.



**Рисунок 28** – Зависимость агрегации тромбоцитов от начальной концентрации тромбоцитов в суспензии. Измерения проводились в гирудиновой БТП, активация 5мкМ АДФ

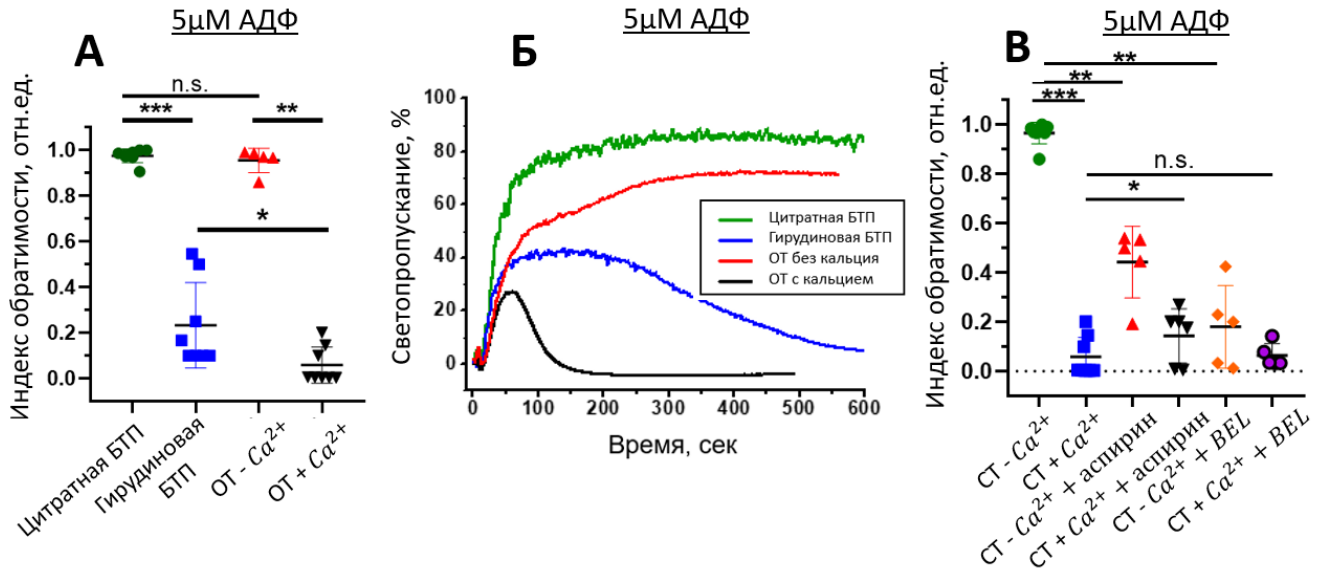


**Рисунок 29** – Зависимость среднего размера образовавшихся агрегатов от начальной концентрации тромбоцитов в суспензии. Измерения проводились в гирудиновой БТП, активация 5мкМ АДФ. Регистрация среднего размера агрегата производилась по ФСП методу на приборе Viola; (А) – характерные кривые среднего размера агрегатов; (А) – зависимость времени дезагрегации от концентрации тромбоцитов

### 3.1.5 Влияние ионов кальция в суспензии на характер агрегационной кривой

Для исключения гипотезы о возникновении обратимой агрегации из-за влияния на тромбоциты антикоагулянта, на который забирается кровь, либо процесса отмывания было произведено сравнение агрегации богатой тромбоцитами плазмы, взятой у одного и того же донора на различные антикоагулянты: гирудин и литий-гепарин (в присутствии кальция), цитрат натрия (отсутствие ионов кальция) и цитрат натрия, рекальцифицированный до проведения измерения, дезагрегация тромбоцитов произошла до свертывания плазмы крови (Рисунок 30 А, Б). Все измерения проводились при стандартизированной концентрации тромбоцитов – 200 тыс/мкл. Характер агрегации тромбоцитов не является следствием выбора антикоагулянта, используемого при взятии крови в пробирках, обратимая агрегация наблюдается

также и в суспензии тромбоцитов с физиологической концентрацией ионов кальция в среде (Рисунок 30 А, Б).

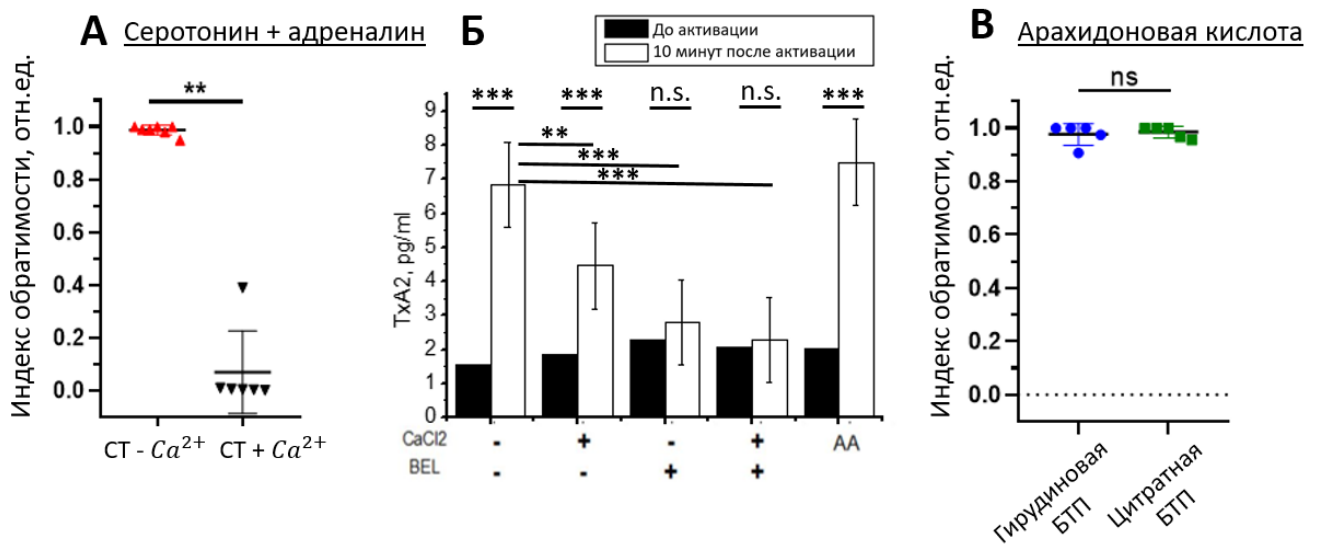


**Рисунок 30** – Зависимость характера кривой агрегации от наличия ионов кальция в суспензии. Агрегацию индуцировали 5 мкМ АДФ (А, Б, В). Индекс необратимости (А, В) представляет собой отношение агрегации на 600-й секунде к максимуму кривой агрегации. (Б) – типичные кривые агрегации в ответ на активатор в суспензии тромбоцитов с ионами кальция или без них. СТ+Са – суспензия тромбоцитов с ионами кальция или БТП с гирудином; СТ-Са – суспензия тромбоцитов без ионов кальция или цитратная БТП. ОТ+Са – суспензия тромбоцитов с ионами кальция в буфере; ОТ-Са – суспензия тромбоцитов без ионов кальция в буфере. Количество опытов: (А, Б)  $n=10$ , (В)  $n=5$ ; n.s. – незначимое отличие; \* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ ; \*\*\* –  $p<0,001$

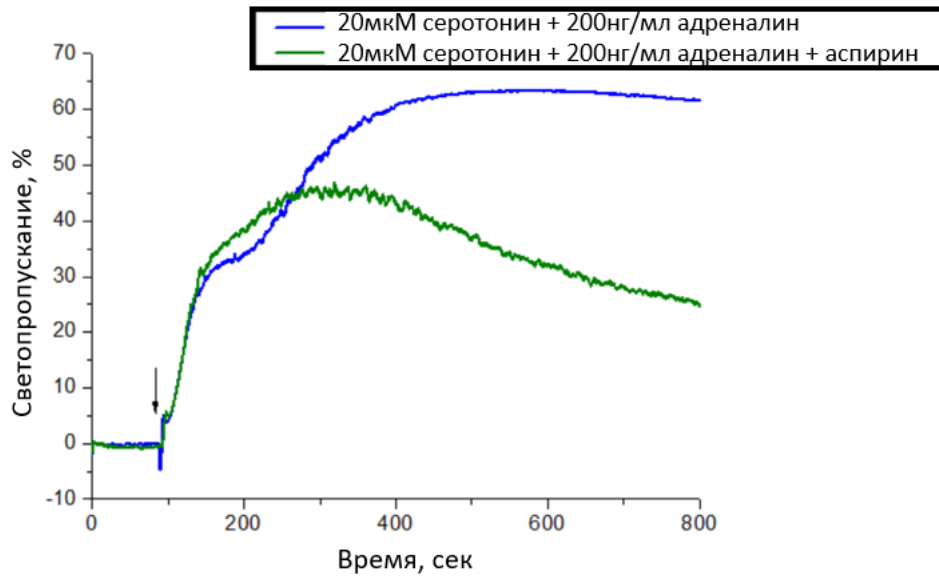
### 3.1.6 Необходимость синтеза тромбоксана А2 для поддержания необратимой агрегации

Для проверки предположения о том, что вторичный путь активации важен для формирования необратимой агрегации [4], был проведен эксперимент в присутствии аспирина – ингибитора фермента циклооксигеназы, отвечающего за формирование ТхА2 (Рисунок 30 В, 32, 33). Тромбоциты, инкубированные с

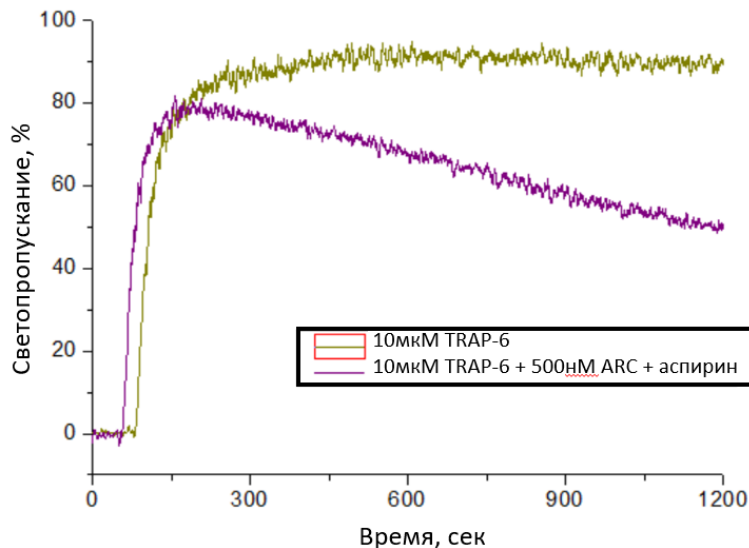
аспирином, показывали обратимую агрегацию, сходно с агрегацией суспензии тромбоцитов в присутствии ионов кальция (Рисунок 30 Б). Прямое измерение концентрации ТхА2 в экспериментальной кювете показало, что в отсутствие ионов кальция в суспензии общая концентрация ТхА2 достигала 5,25 пг/мл, а при физиологической концентрации ионов кальция – 2,25 пг/мл. (Рисунок 31 Б).



**Рисунок 31** – Зависимость характера кривой агрегации и синтеза тромбоксана А2 от наличия ионов кальция в суспензии. Агрегацию индуцировали 20 мкМ серотонина с 200 нМ адреналина (А) или 1,2 мМ арахидоновой кислоты (В). (Б) – Измерение концентрации тромбоксана А2 методом ELISA при различных условиях. Суспензию тромбоцитов брали из кюветы после агрегации в ответ на 10 мкМ АДФ или 1 мМ арахидоновой кислоты (АК). Тромбоциты инкубировали с 2,5 мкМ R-BEL – ингибитором iPLA2 $\gamma$ , где указано. СТ+Са – суспензия тромбоцитов с ионами кальция или БТП с гирудином; СТ-Са – суспензия тромбоцитов без ионов кальция или цитратная БТП. Количество опытов: (А) n=6, (Б) n=5, (В) n=5; n.s. – незначимое отличие; \* – p<0,05; \*\*- p<0,01; \*\*\*- p<0,001



**Рисунок 32** – Агрегация тромбоцитов в ответ на 20 мкМ серотонина и 200 нг/мл адреналина в цитратной БТП в присутствии аспирина или без него. Тромбоциты инкубировались с 1 мМ ацетилсалициловой кислоты в течение 20 мин при +37°C. Черная стрелка указывает момент добавления агониста. Типичные результаты для  $n = 3$  различных доноров



**Рисунок 33** – Агрегация тромбоцитов в ответ на 10 мкМ TRAP-6 в цитратной БТП. Тромбоциты инкубировали с 500 нМ ARC и 1 мМ ацетилсалициловой кислоты в течение 20 мин при +37°C, где указано. Типичные результаты для  $n = 10$  различных доноров

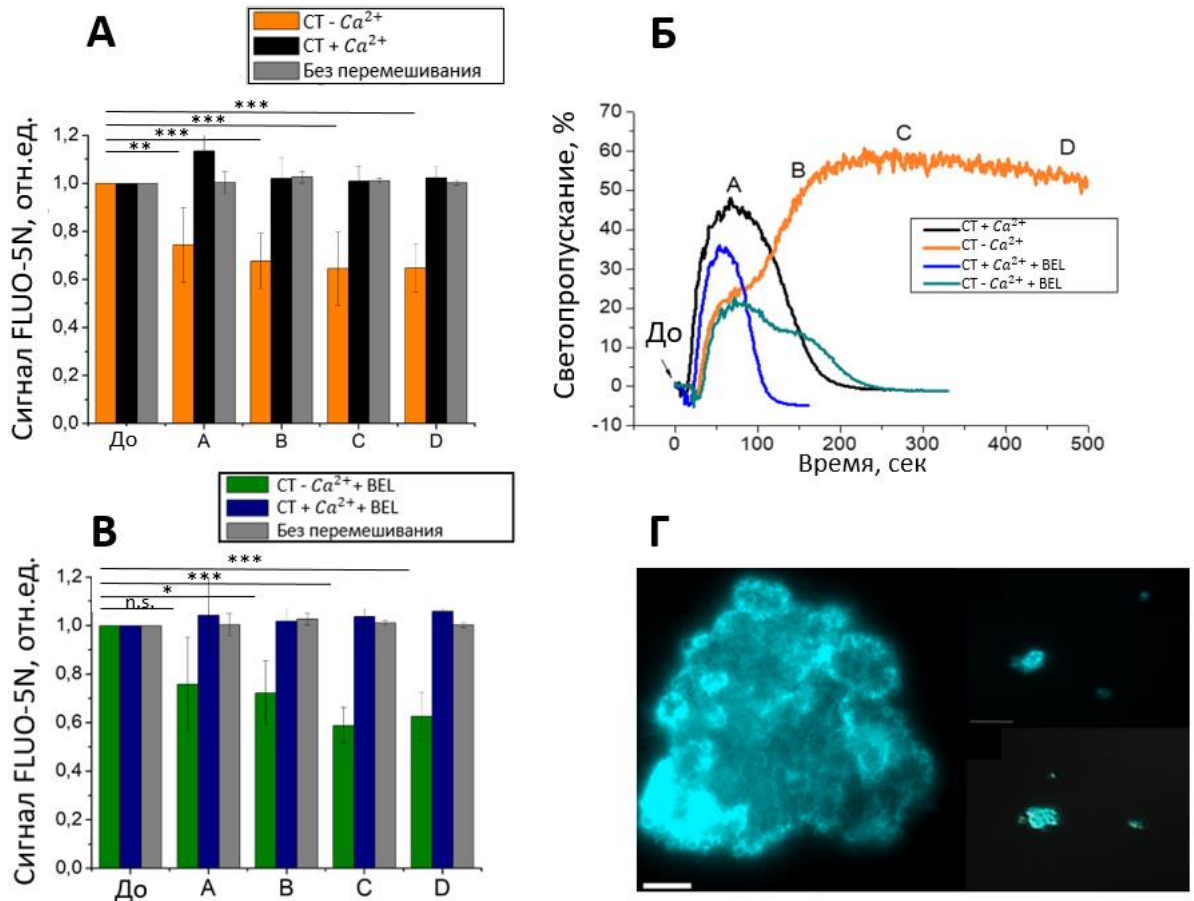
### **3.1.7 Влияние физиологической концентрации ионов кальция на активацию тромбоцитов арахидоновой кислотой**

Были проведены эксперименты по агрегации тромбоцитов в ответ на предшественник тромбосана А<sub>2</sub> – арахидоновую кислоту (АК), чтобы оценить, на какой стадии ионы кальция влияют на синтез ТхА<sub>2</sub> (Рисунок 30 В, 31 В). Влияние ионов кальция в суспензии на необратимый характер агрегации тромбоцитов, вызванной АК, отсутствовало (Рисунок 30 В). Таким образом, можно сделать вывод, что ионы кальция в суспензии влияют на синтез ТхА<sub>2</sub> на стадии продукции АК фосфолипазой А<sub>2</sub>. Был использован специфический ингибитор кальций-независимой фосфолипазы А<sub>2</sub> iPLA<sub>2</sub>γ – R-броменоллактон (R-BEL) для проверки влияния кальций-независимой фосфолипазы iPLA<sub>2</sub>γ на агрегацию тромбоцитов (23) (Рисунок 30 В, 31 Б). Было отмечено, что ингибирование iPLA<sub>2</sub>γ приводит к ослаблению агрегации в ответ на АДФ и обратимости этого процесса (Рисунок 30 В). Концентрация ТхА<sub>2</sub> также значительно снижалась в присутствии BEL (Рисунок 31 Б). Следовательно, явление обратимой агрегации определяется именно наличием физиологической концентрации ионов кальция в суспензии тромбоцитов. Ионы кальция влияют на функциональность iPLA<sub>2</sub>γ и тем самым ингибируют генерацию ТхА<sub>2</sub>.

### **3.1.8 Влияние физиологической концентрации ионов кальция на наполнение кальциевых депо тромбоцита после активации**

Поскольку iPLA<sub>2</sub>γ активируется опустошением внутриклеточных кальциевых депо (ВКД) [146], была изучена корреляция состояния ВКД с обратимостью кривой агрегации. Был измерен уровень кальция в ВКД в процессе агрегации в суспензии отмытых тромбоцитов, нагруженных красителем FLUO-5N. Значительное снижение уровня кальция во внутриклеточных депо кальция наблюдалось в ответ на АДФ только в бескальциевой суспензии (Рисунок 34). При тех же условиях наблюдается необратимая агрегация (Рисунок 34). Ингибирование iPLA<sub>2</sub>γ не повлияло на наблюдаемое опустошение ВКД (Рисунок 34).

Примечательно, что при агрегации тромбоцитов без перемешивания суспензии ВКД не опустошались даже в отсутствие ионов кальция (Рисунок 34).



**Рисунок 34** – Измерение концентрации ионов кальция во внутриклеточных депо кальция в ответ на 10 мкМ АДФ в суспензии тромбоцитов с 2 мМ ионов кальция или без них. Уровень кальция измеряли методом проточной цитометрии (А, В) в указанные моменты агрегации тромбоцитов (Б). Значения концентрации ионов кальция в ВКД обозначены как сигнал FLUO-5N в определенный момент, деленный на сигнал FLUO-5N до активации тромбоцитов. (Г) Флуоресценция тромбоцитов, нагруженных FLUO-5N, в большом агрегате, сформированном в ответ на 5 мкМ АДФ. 10 мкл суспензии тромбоцитов в момент максимальной агрегации исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии. Масштабная линия соответствует 10 мкм. Типичные результаты для  $n = 5$  разных доноров; n.s. – незначимое отличие; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$

Следовательно, для опустошения ВКД в отсутствие кальция необходимо взаимодействие активированных тромбоцитов друг с другом, вызываемое перемешиванием. Действительно, с помощью флуоресцентной микроскопии крупных агрегатов тромбоцитов, нагруженных FLUO-5N, полученных из кюветы агрегометра, мы показали, что опустошение депо происходит только в центре агрегата, а флуоресценция FLUO-5N наблюдалась только на периферии агрегатов (Рисунок 34).

### **3.1.9 Зависимость активации фосфолипазы A2 $\gamma$ при физиологической концентрации ионов кальция**

Работа фосфолипазы A2 обеспечивает продукцию эйкозаноидов, включая синтез тромбоксана A2 [147]. Проф. Йода и др. [148] показали, что кальций-независимая PLA2 $\gamma$  регулирует агрегацию тромбоцитов у мышей. В настоящей работе мы исследовали, является ли регуляция этой фосфолипазы критической для характера агрегации тромбоцитов человека. Сначала мы показали, что ингибирование iPLA2 $\gamma$  оказывает такое же влияние на кривую агрегации и синтез TxA2, как и аспирин (Рисунок 30 В), что свидетельствует о том, что в ответ на действие таких агонистов, как АДФ, TxA2 преимущественно продуцируется по пути iPLA2 $\gamma$ , а не фосфолипаз A2 других типов. Истощение ВКД также наблюдается в тромбоцитах только в отсутствие внеклеточного кальция (Рисунок 34). Такая зависимость от внеклеточных условий может быть объяснена схемой регуляции iPLA2 опустошением кальциевых депо, предложенной проф.Смани, которую в настоящей работе мы адаптировали для тромбоцитов (Рисунок 35) [149]. Мы предполагаем следующую последовательность событий. Взаимодействие тромбоцитов в агрегатах приводит к их сильной активации за счет сигнализации «снаружи-внутри» от интегринов, что приводит к кальциевой сигнализации и задействованию внутриклеточных депо кальция. В норме, опустошение депо приводит к запуску системы депо-управляемого входа кальция в клетку через депо-управляемые каналы (store-operated channels, SOC). В цитозоле помпы SERCA переносят ионы кальция обратно в хранилища [150], концентрация ионов кальция



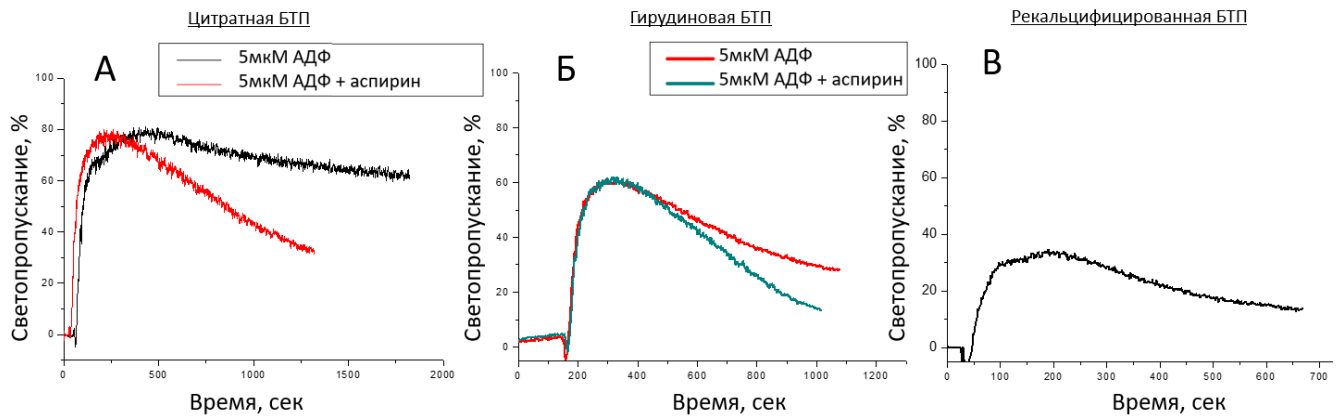
### 3.2 Разработка теста обратимой агрегации тромбоцитов

Таким образом, в первой главе было показано, что агрегация тромбоцитов в присутствии физиологической концентрации ионов кальция обращается из-за отсутствия артефактного опустошения внутриклеточных депо и вызванной им активации  $iPLA2\gamma$ . Т.е. агрегация в присутствии ионов кальция более чувствительна к дефектам тромбоцитарных рецепторов, чем каноническая постановка. Поэтому для более чувствительной оценки функциональности тромбоцитов мы разработали новый протокол теста агрегометрии, проводимый при физиологической концентрации ионов кальция.

Для определения условий проведения новой постановки теста агрегометрии тромбоцитов в ответ на АДФ, были протестированы образцы крови, взятой в пробирки трёх типов: пробирки с цитратом натрия, пробирки с гирудином и пробирки с цитратом натрия с последующей рекальцификацией суспензии. Рекальцификация проводилась при предварительном добавлении в суспензию тромбоцитов гирудина (10 ед/мл), для ингибирования плазменного звена свертывания, и хлорида кальция в концентрации 10мМ [155].

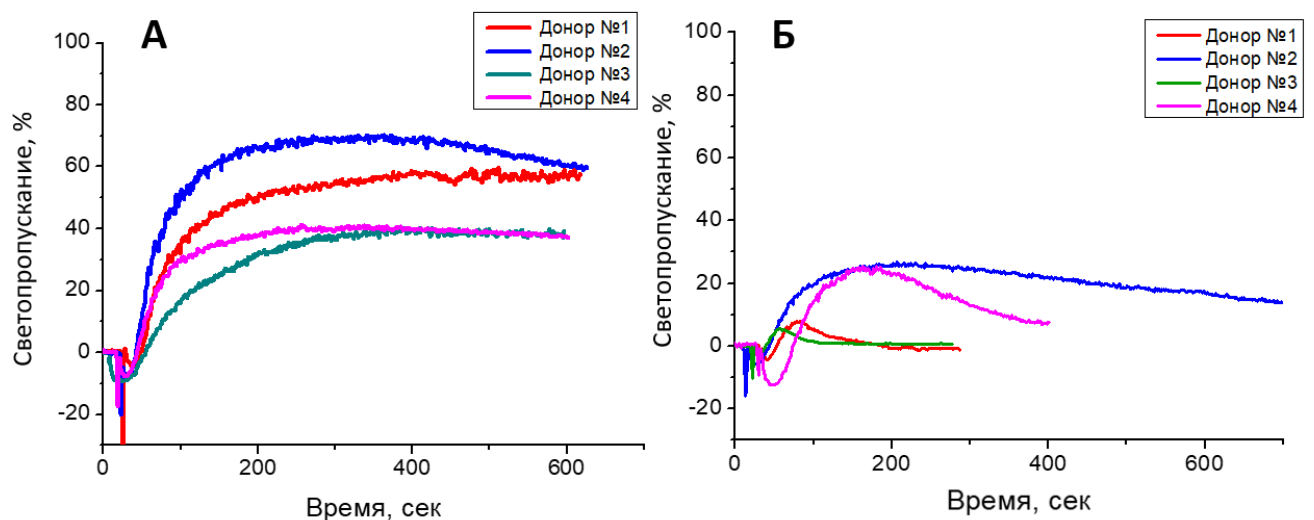
В богатой тромбоцитами плазме, полученной из пробирок с цитратом натрия, наблюдалась необратимая агрегация тромбоцитов, которая становилась обратимой при добавлении аспирина (Рисунок 36 А). В богатой тромбоцитами плазме с ионами кальция в обоих случаях наблюдалась обратимая агрегация тромбоцитов (Рисунок 36 Б, В). Для проведения измерений по новому протоколу агрегометрии был выбран способ взятия крови в пробирки с цитратом натрия с последующей рекальцификацией суспензии.

При подборе концентрации тромбоцитов в исследуемой суспензии учитывался характер кривой агрегации. При измерении агрегации тромбоцитов в ответ на 1 мкМ АДФ в плазме при исходной неразбавленной концентрации тромбоцитов (400 тыс.кл/мкл – 550 тыс.кл/мкл) наблюдалась активация тромбоцитов с высокой степенью агрегации и медленным характером обратимости (Рисунок 37 А).



**Рисунок 36** – Типичные агрегационные кривые тромбоцитов в ответ на 5 мкМ АДФ в цитратной БТП (А), гирудиновой БТП (Б), цитратной БТП с дальнейшей рекальцификацией (В)

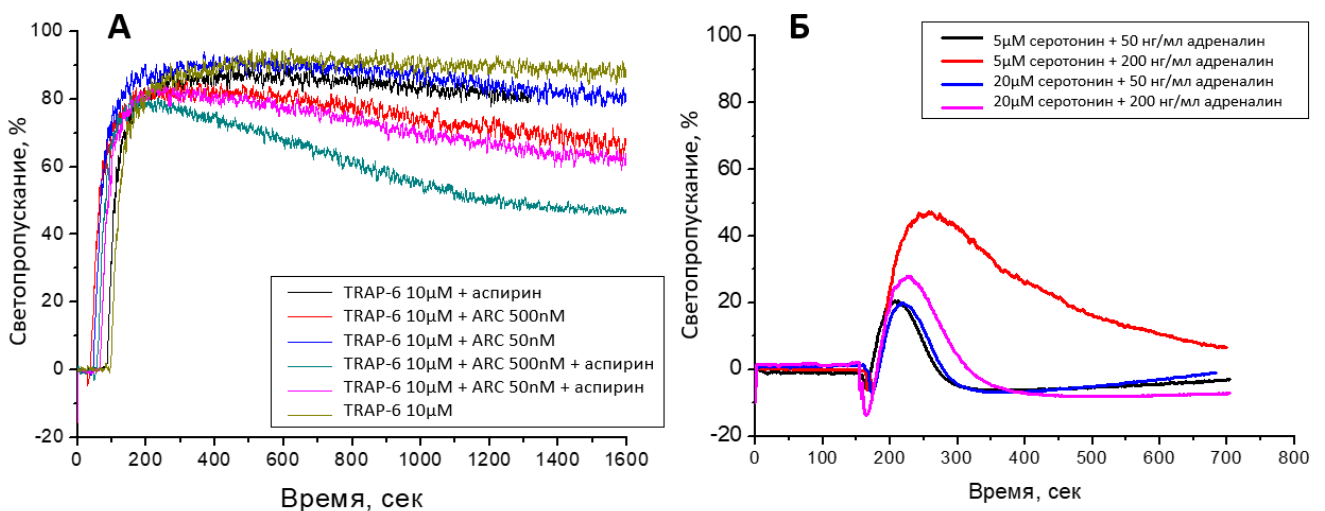
При разбавлении БТП до концентрации тромбоцитов 300тыс.кл/мкл обедненной тромбоцитами плазмой, которая была избавлена от тромбоцитов дополнительным центрифугированием при скорости 2000 g в течение 15 минут, наблюдалось ослабление агрегации (Рисунок 37 Б).



**Рисунок 37** – Типичные агрегационные кривые тромбоцитов в ответ на 3 мкМ АДФ (А) – в рекальцифицированной БТП с неразбавленной концентрацией тромбоцитов: донор 1 -350тыс.кл/мкл; донор 2 -470тыс.кл/мкл; донор 3 -280тыс.кл/мкл; донор 4 -300тыс.кл/мкл; (Б) – с разбавленной концентрацией тромбоцитов до 300тыс.кл/мкл

Для проведения измерений по новому протоколу агрегометрии, чтобы не учитывать эффекты влияния количества тромбоцитов на степень агрегации, был выбран метод доведения концентрации тромбоцитов до измерения до стандартизованного значения: 300тыс.кл/мкл.

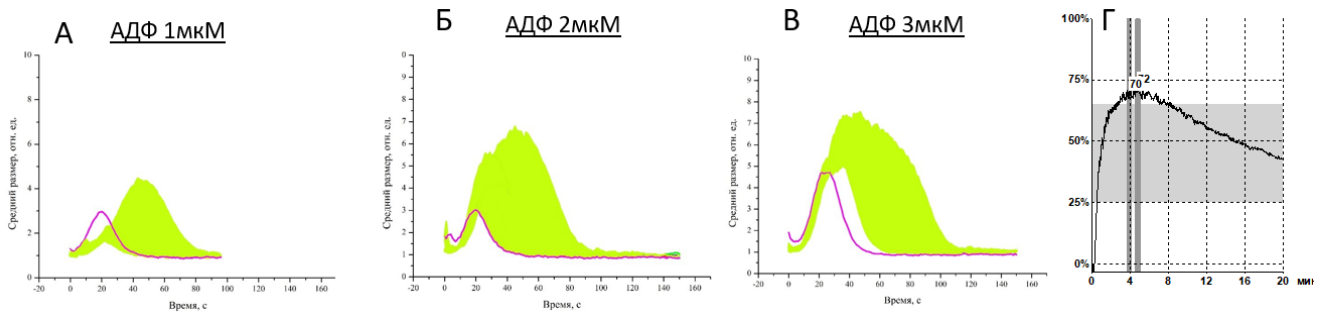
Для оценки ответа тромбоцитов были выбраны следующие активаторы: АДФ в концентрациях 1, 2 и 3мкМ; серотонин (20мкМ) в комбинации с адреналином (200мкМ) (рис 38 Б); TRAP-6 (10мкМ) в присутствии ингибитора рецептора P2Y12 ARC-69931MX, чтобы убрать эффект вторичной активации тромбоцитов от АДФ из секретируемых гранул (Рисунок 38 А)



**Рисунок 38** – Типичные агрегационные кривые тромбоцитов в ответ на (А) 10мкМ TRAP-6 в присутствии ингибитора ARC-69931MX и аспирина, где указано; (Б) различные концентрации серотонина с адреналином

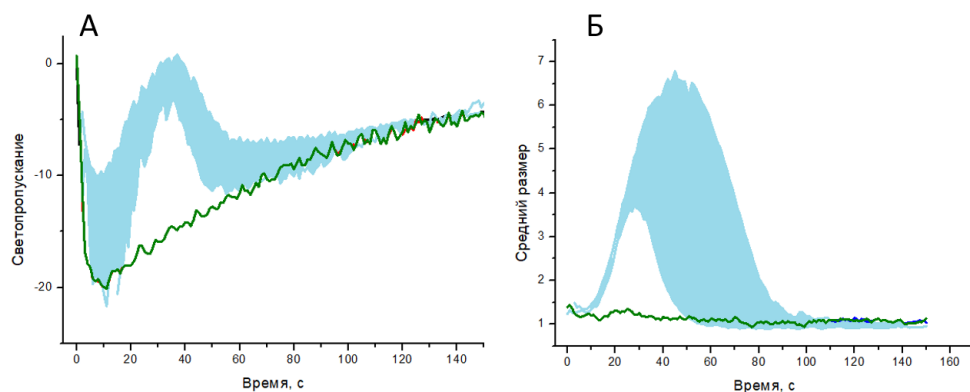
### 3.3 Исследование состояния гемостаза пациентов с тромбоцитопатиями

Тромбоциты пациентки с нарушениями функциональности фосфолипазы A2 имели ослабленную агрегацию в ответ на 5мкМ АДФ в стандартном тесте агрегометрии в цитратной БТП, наблюдалась обратимая агрегация (Рисунок 39 Г). В то же время, в тесте агрегометрии с рекальцифицированной БТП наблюдалась агрегация тромбоцитов на АДФ в диапазоне нормальных значений (Рисунок 39 А-В), что указывает на нормальное функционирование рецепторов P2Y12 и P2Y1, однако на ослабленную вторичную активацию тромбоцитов.



**Рисунок 39** – Агрегационные кривые тромбоцитов (средний размер агрегатов) пациента с дефектом фосфолипазы А2 в ответ на (А) 1мкМ АДФ; (Б) 2мкМ АДФ; (В) 3мкМ АДФ физиологической концентрации ионов кальция в рекальцифицированной БТП. (Г) Агрегационная кривая светопропускания в ответ на 5мкМ АДФ в цитратной БТП. Данные предоставлены Полетаевым А.В. Зеленая область обозначает диапазон нормальных значений здоровых доноров

Ответ тромбоцитов пациента с афибриногемией на 2мкМ АДФ в тесте агрегометрии с рекальцифицированной БТП. Наблюдается только активация тромбоцитов без дальнейшей агрегации (Рисунок 40).



**Рисунок 40** – Агрегационные кривые тромбоцитов: (А) светопропускание и (Б) средний размер агрегатов пациента с афибриногемией в ответ на 2мкМ АДФ в рекальцифицированной суспензии. Голубая область обозначает диапазон нормальных значений здоровых доноров

### 3.4 Исследование состояния гемостаза пациентов с острым коронарным синдромом

Двойная антитромбоцитарная терапия является методом выбора для профилактики повторных тромботических событий (тромбоза стента, рецидива инфаркта миокарда, повторного инфаркта миокарда, нестабильной стенокардии) у пациентов в течение 12 месяцев после ОКС [131]. Однако у 10% пациентов в течение последующих 30 дней ДАТТ возникают повторные ишемические события [156]. Данных об отдаленных эффектах ДАТТ при постоянном приеме на функциональность тромбоцитов мало.

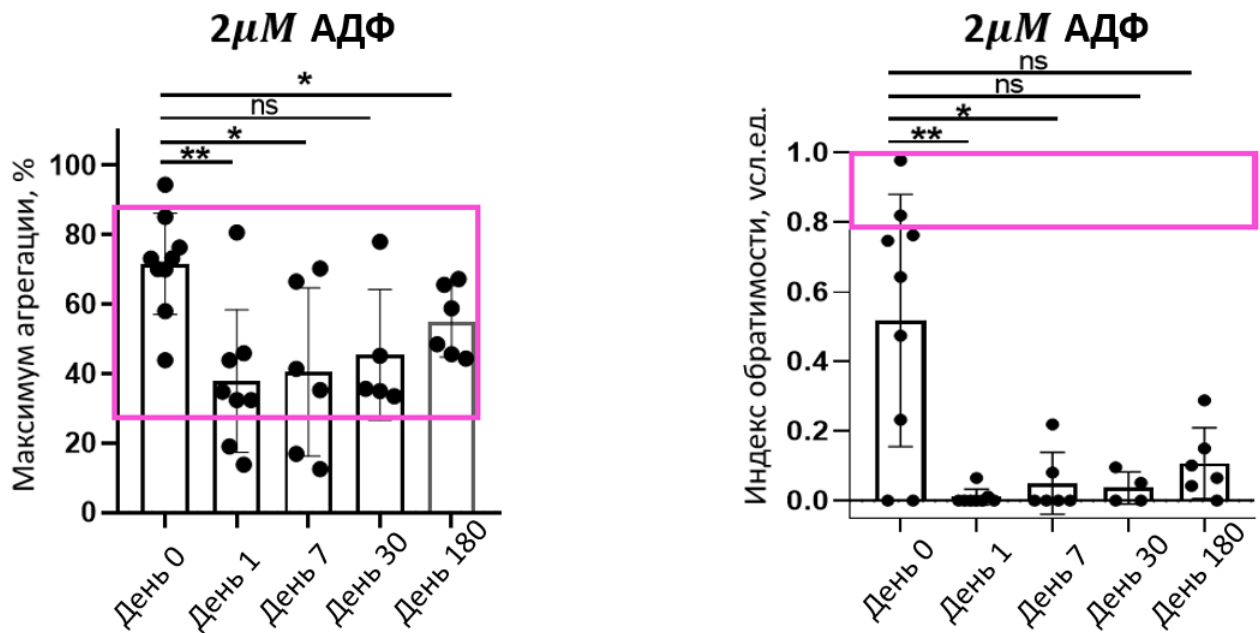
В исследование были включены десять пациентов после чрескожного коронарного вмешательства, получавших ДАТТ из аспирина и ингибитора рецептора P2Y<sub>12</sub>: прасугрела (n = 5) или тикагрелора (n = 6). Функциональность тромбоцитов оценивали в 5 временных точках: день 0 (нагрузочная доза аспирина), день 1 (нагрузочная доза прасугрела/тикагрелора), а также на 7-й, 30-й и 180-й дни терапии поддерживающей дозой. Функциональность тромбоцитов оценивали с помощью обычной агрегометрии светопропускания (LTA) и агрегометрии рассеяния света под малым углом (LA). Функциональные и сигнальные ответы тромбоцитов на обычную активацию (АДФ, TRAP-6 и подобный коллагену пептид, CRP) оценивали с помощью проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Данные о пациентах и результаты лабораторных исследований описаны в таблице 2.

Анализ агрегации тромбоцитов по максимальной интенсивности сигнала показал тенденцию к восстановлению до уровня сигнала нулевого дня, когда пациенты принимали только терапию аспирином (Рисунок 41). Индекс обратимости также имел тенденцию к восстановлению на 180й день, несмотря на воздействие ингибитора рецептора АДФ P2Y<sub>12</sub> (Рисунок 41). Индекс обратимости начиная с 30го дня терапии указывал на тенденцию тромбоцитов к необратимой агрегации и значимо не отличался от показателей индекса обратимости в нулевой день, когда пациент не принимал препаратов, ингибирующих рецептор АДФ

P2Y12. Дезагрегация тромбоцитов имела тенденцию к восстановлению, несмотря на воздействие ингибитора P2Y12.

**Таблица 2 – Характеристики пациентов с ОКС**

| <b>Показатель</b>                                | <b>Тикагрелор<br/>(n=5)</b> | <b>Прасугрел<br/>(n=6)</b> | <b><math>\chi^2</math></b> | <b>p</b> |
|--|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------|
| Возраст на момент госпитализации, лет (Me[ IQR]) | 62(53;75)                   | 64(58;68)                  |                            | 0,92     |
| Мужчины, n(%)                                    | 4 (80)                      | 5 (83,3)                   | 0,02                       | 0,89     |
| ИМТ, кг/м <sup>2</sup> (Me[ IQR] )               | 26(25;29)                   | 29(27;31)                  |                            | 0,36     |
| Гипертоническая болезнь, n(%)                    | 5 (100)                     | 5 (83,3)                   | 0,91                       | 0,34     |
| Курение, n(%)                                    | 0 (0)                       | 3 (50)                     | 3,41                       | 0,06     |
| Сахарный диабет, n(%)                            | 2 (40)                      | 2 (33,3)                   | 0,05                       | 0,82     |
| ХСН, n(%)  | 3 (60)                      | 1 (16,7)                   | 2,21                       | 0,14     |
| ХБП, n(%)  | 1 (20)                      | 0 (0)                      | 1,32                       | 0,25     |
| ИМ в анамнезе, n(%)                              | 2 (40)                      | 0 (0)                      | 2,93                       | 0,09     |
| ЧКВ в анамнезе, n(%)                             | 2 (40)                      | 2 (33,3)                   | 0,05                       | 0,82     |
| АКШ в анамнезе, n(%)                             | 1 (20)                      | 0 (0)                      | 1,32                       | 0,25     |
| Заболевание периферических артерий, n(%)         | 1 (20)                      | 1 (16,7)                   | 0,02                       | 0,89     |
| ОНМК, n(%)                                       | 0 (0)                       | 0 (0)                      |                            |          |
| ХОБЛ, n(%)                                       | 0 (0)                       | 2 (33,3)                   | 2,01                       | 0,15     |
| ЯБЖ, n(%)  | 0 (0)                       | 1 (16,7)                   | 0,92                       | 0,34     |



**Рисунок 41** – Функциональные ответы тромбоцитов. (А) – Максимальная агрегация тромбоцитов в ответ на 2 мкМ АДФ в суспензии тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция. (В) – Индекс обратимости (отношение агрегации на 600-й секунде к максимуму) в ответ на 5 мкМ АДФ в суспензии тромбоцитов в отсутствии ионов кальция; Розовая область обозначает диапазон нормальных значений здоровых доноров. n.s. – незначимое отличие; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\*-  $p < 0,001$

### 3.5 Исследование состояния гемостаза пациентов после операции трансуретральной резекции

В период с сентября 2020 г. по сентябрь 2021 г. 21 пациенту мужского пола (средний возраст 72 года) в отделении урологии Городской клинической больницы им. В.В. Виноградова была проведена операция трансуретральной резекции простаты. Данные о пациентах и результаты лабораторных исследований описаны в таблице 3.

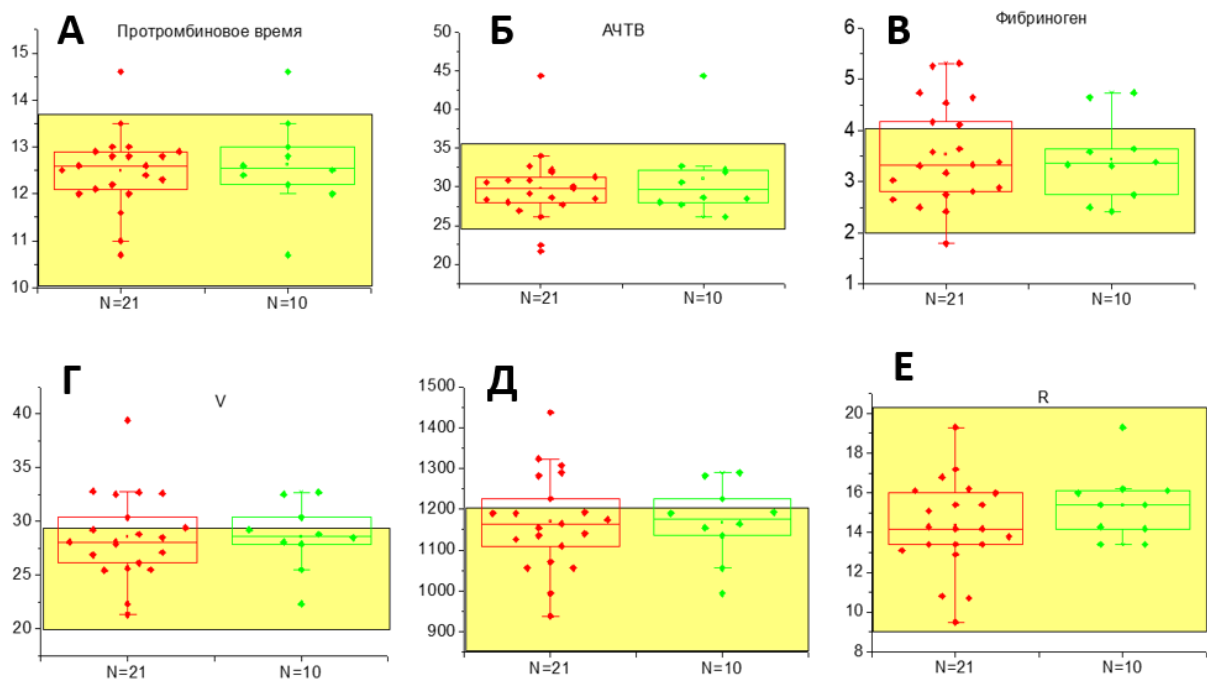
**Таблица 3** – Характеристики пациентов с показанием к проведению операции трансуретральной резекции

|   |                |
|---|----------------|
| <b>Общие характеристики</b>                   |                |
| Количество                                    | 21             |
| Средний возраст, лет                          | 72 (55-87)     |
| Объем простаты, см <sup>3</sup>               | 74 (30-130)    |
| Кол-во пациентов с катетером                  | 12             |
| Пациенты с артериальной гипертензией          | 6              |
| Коронарные заболевания                        | 1              |
| Рак   | 1              |
| Время операции                                | 87 (35-220)    |
| Количество промывной жидкости                 | 45,7 (22-95)   |
| Количество тромбоцитов                        | 265 (153-501)  |
| Количество лейкоцитов                         | 9 (4-15)       |
| Гематокрит                                    | 42 (33,4-50,2) |
| Протромбиновое время                          | 12 (10,7-14,6) |
| Частичное активированное протромбиновое время | 30 (21,6-44,4) |
| Концентрация фибриногена                      | 4 (1,79-5,31)  |
| <b>Осложнения</b>                             |                |
| Переливания крови                             | 1              |
| ОКС   | 1              |
| Смерть  | 1              |
| <b>Показатели гемоглобина</b>                 |                |
| Гемоглобин до операции                        | 139 (114-167)  |
| Гемоглобин после операции                     | 121 (91-147)   |
| Гемоглобин при выписке                        | 116 (85-140)   |
| Снижение гемоглобина                          | 2 (0,4-4,9)    |

У пациентов с показанием к проведению операции трансуретральной резекции в день проведения операции до её начала забиралась кровь для оценки состояния гемостаза модифицированным тестом агрегации в присутствии физиологической концентрации ионов кальция в суспензии. Кровоточивость пациентов во время операции оценивалась как разность между концентрацией гемоглобина в крови пациента до операции и непосредственно после проведения операции.

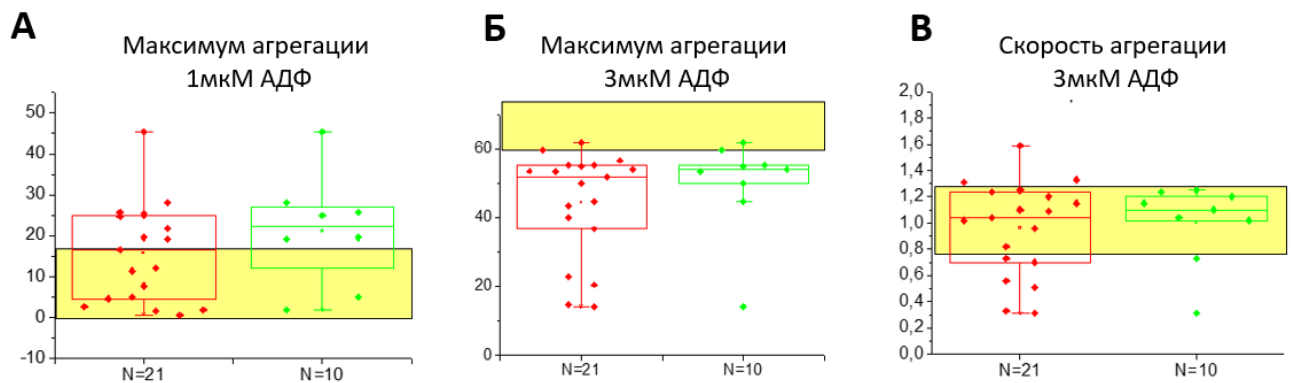
Было проведено три теста на анализ функциональности системы плазменного звена свертывания. Параметры коагулограммы, а также параметры тромбоэластографии были в норме для всей когорты пациентов. В то же время наблюдалось повышение концентрации фибриногена, стационарной скорости роста сгустка и размера сгустка в тесте Тромбодинамика (Рисунок 42).

В связи с тем, что есть данные, указывающие на то, что степень кровоточивости пациента во время операции зависит от хирурга, проводящего операцию [157], то была выделена отдельная группа пациентов (N=10), у которых операцию провел один и тот же хирург (Рисунок 42).

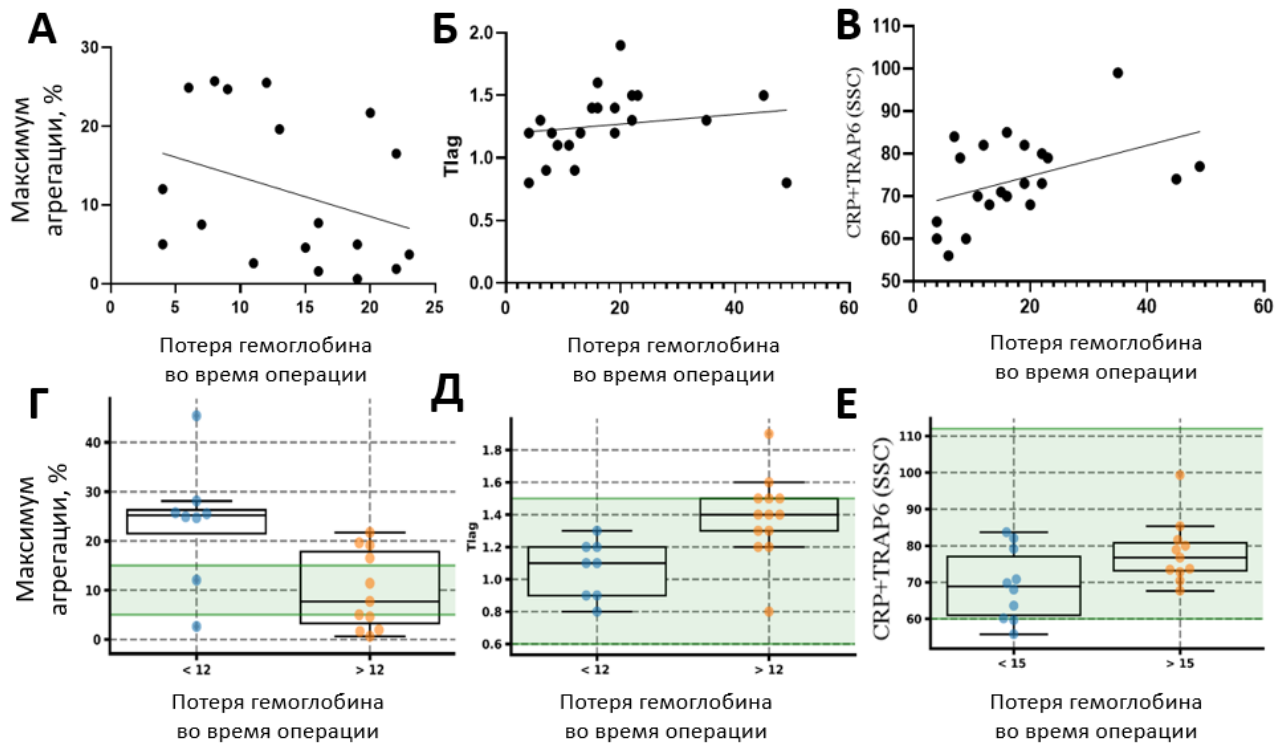


**Рисунок 42** – Результаты клинических тестов у всех пациентов (21 человек) и при выборке по хирургу (10 человек). Результаты теста Коагулограмма: (А) – Протромбиновое время, (Б) – АЧТВ, (В) – концентрация фибриногена. Результаты теста Тромбодинамика: (Г) – стационарная скорость роста фибринового сгустка; (Д) – размер фибринового сгустка. Результаты теста Тромбоэластография: (Е) – время задержки роста сгустка. Желтая область обозначает диапазон нормальных значений здоровых доноров

Максимум агрегации в ответ на 3мкМ АДФ был ниже ответа здоровых доноров, в то время как скорость агрегации была в пределах нормальных значений (Рисунок 43 Б, В). Результаты параметра максимума агрегации в ответ на 1мкМ АДФ у пациентов были распределены в области нормальных значений, а также значимо (коэффициент корреляции Спирмена -0,4) коррелировали с риском кровопотери пациентов во время операции (Рисунок 44).



**Рисунок 43** – Результаты теста агрегометрии по модифицированному протоколу у всех пациентов (21 человек) и при выборке по хирургу (10 человек). Желтая область обозначает диапазон нормальных значений здоровых доноров. (А) – максимальная агрегация в ответ на активацию 1мкМ АДФ, (Б) – максимальная агрегация в ответ на активацию 3мкМ АДФ, (В) – скорость агрегации в ответ на активацию 3мкМ АДФ



**Рисунок 44** – Корреляция параметров гемостаза с кровопотерей во время операции. (А), (Г) – Максимум агрегации в ответ на 1мкМ АДФ. Коэффициент корреляции Спирмена = -0,52,  $p < 0,05$ ; (Б), (Д) – время задержки роста фибринового сгустка. Коэффициент корреляции Спирмена = 0,48,  $p < 0,05$ ; (Е), (В) – гранулярность тромбоцитов после активации от TRAP-6 и CRP. Коэффициент корреляции Спирмена = 0,46,  $p < 0,05$ . Зеленая область обозначает диапазон нормальных значений здоровых доноров

По параметрам, коррелирующим с кровопотерей, можно сделать вывод об объеме кровопотери во время операции. Если повышены параметры свертывания крови (максимальная агрегация на 1мкМ АДФ, лаг тайм, гранулярность после активации CRP + TRAP-6) до операции, то кровопотеря произойдет в меньшем объеме.

## Глава 4. Обсуждение

Агрегометрия светопропускания остается золотым стандартом для быстрой оценки функциональности тромбоцитов. Цитрат натрия является широко используемым антикоагулянтом для тестирования тромбоцитов, но нельзя игнорировать тот факт, что в ответ на слабые агонисты характер кривой агрегации становится обратимым, если используется гирудин. В настоящей работе показано, что это явление в основном определяется уровнем ионов кальция в суспензии и не зависит от антикоагулянтов (Рисунок 30 А, Б). Наши данные подтверждают, что такая разница в агрегации в основном вызвана разным уровнем синтеза ТхА<sub>2</sub> (Рисунок 30 В, 31 Б), который связан с наличием физиологической концентрации ионов кальция в суспензии.

В тромбоцитах, как и в других клетках, продукция эйкозаноидов, включая ТхА<sub>2</sub>, опосредована ферментом PLA<sub>2</sub>, отщепляющим арахидоновую кислоту от мембранных фосфолипидов. Для одной из изоформ, кальций-независимой фосфолипазы iPLA<sub>2</sub> $\gamma$ , проф. Йода и др. [148] показали непосредственное влияние на агрегацию тромбоцитов у мышей. В настоящей работе мы предположили, что данная изоформа является критической для характера агрегации тромбоцитов человека. Мы показали, что ингибирование iPLA<sub>2</sub> $\gamma$  оказывает такое же влияние на кривую агрегации и синтез ТхА<sub>2</sub>, как и аспирин (Рисунок 30 В), что свидетельствует о том, что в ответ на действие слабых агонистов синтез ТхА<sub>2</sub> преимущественно идет по пути активации iPLA<sub>2</sub> $\gamma$ , а не других видов фосфолипаз А<sub>2</sub>.

Далее возникает вопрос, почему iPLA<sub>2</sub> $\gamma$  активируется именно в отсутствие внеклеточного кальция? Известно, что iPLA<sub>2</sub> $\gamma$  регулируется опустошением запасов внутриклеточных кальциевых депо во многих типах клеток [134; 158]. Мы показали, что опустошение ВКД также наблюдаются в тромбоцитах только в среде без ионов кальция (Рисунок 34). Суммарно, эти данные свидетельствуют в пользу следующей схемы регуляции активности iPLA<sub>2</sub> в тромбоцитах (Рисунок 35), аналогичной предложенной ранее проф.

Смани и др. для других клеток [149]. Цепочка событий, приводящая к различному характеру агрегации, может быть следующей. Активация тромбоцитов АДФ и интегринами по пути «снаружи-внутри» приводит к выходу ионов кальция из ВКД и их опустошению, что приводит к активации системы депо-управляемого входа кальция и открытию депо-управляемых каналов плазматической мембраны (SOC), которые позволяют ионам кальция из суспензии проникать в клетку. Поскольку кальциевая помпа SERCA переносит ионы кальция из цитозоля в эндоплазматический ретикулум [150], концентрация кальция в ВКД восстанавливается, что приводит к ингибированию  $iPLA_2\gamma$ . В цитратной БТП этот механизм останавливается в тот момент, когда активируются SOC, потому что ионы кальция не проникают, следовательно,  $iPLA_2\gamma$  остается активированной и продуцирует повышенное количество арахидоновой кислоты, из которой производится  $TxA_2$ , который дополнительно активирует тромбоциты и стабилизирует агрегаты. С другой стороны, когда в среде присутствуют ионы кальция, активация SOC приводит к восполнению ВКД, что останавливает активность  $iPLA_2\gamma$ . В этом случае активация тромбоцитов не поддерживается, и тромбоциты оказываются склонны к дезагрегации из-за малой генерации  $TxA_2$ .

Важнейшей частью описанного выше пути является опустошение ВКД. Известно, что активация АДФ недостаточно сильна, чтобы привести к опустошению ВКД или генерации  $TxA_2$  в одиночных тромбоцитах [151]. Полученные данные демонстрируют важность образования крупных агрегатов для синтеза  $TxA_2$  в ответ на АДФ (Рисунок 34 Г). Это может быть обеспечено  $\alpha IIb\beta_3$ -опосредованной передачей сигналов «снаружи внутрь» [150; 152; 153], которая запускается тесными межтромбоцитарными взаимодействиями внутри агрегатов.

Настоящее исследование имеет несколько ограничений, которые необходимо учитывать. Во-первых, мы используем введенный нами «индекс обратимости» для определения степени дезагрегации тромбоцитов. Данный индекс не полностью характеризует агрегационную кривую, поскольку две

разные кривые, которые достигают пика и заканчиваются на одинаковых уровнях, будут иметь одинаковые индексы. Этот подход может оставить незамеченными некоторые эффекты других путей вторичной активации, такие как влияние цитозольной PLA2. Во-вторых, в настоящей работе единственным указанием на именно изоформу  $\alpha$  фосфолипазы A2 является ингибитор  $\alpha$ -iPLA2 R-BEL. Этот ингибитор специфичен для  $\alpha$ -iPLA2 и в используемой концентрации не должен ингибировать  $\beta$ -iPLA2 или cPLA2. Однако, даже в суспензии тромбоцитов при физиологической концентрации ионов кальция R-BEL слегка ингибировал агрегацию (Рисунок 30 В), что позволяет предположить, что он может влиять на другие фосфолипазы.

Предлагаемый механизм, управляющий различным характером агрегации, согласуется с исследованием проф. Йода и др. [148]. Делеция  $\alpha$ -iPLA2 приводит к значительному снижению уровня агрегации, продукции ТхА2 и АК после стимуляции АДФ, однако для сильных агонистов, таких как тромбин, U46619 или АК, этого не наблюдается. Это свидетельствует о том, что  $\alpha$ -iPLA2 играет преобладающую роль только при слабой активации, тогда как в ответ на сильные агонисты его функция становится незначительной по сравнению с cPLA2. Такое поведение можно объяснить тем, что cPLA2 нуждается в длительном подъеме цитозольного кальция [159, 160], чего не наблюдается при слабой активации.

В литературе упоминаются еще две возможные гипотезы дезагрегации тромбоцитов: эктонуклеотидазная активность [3] и разный уровень активации интегринов [2]. Эктонуклеазы разрушают АДФ в суспензии и за счет этого могут приводить к снижению активации в ответ на АДФ, что может объяснить дезагрегацию тромбоцитов при АДФ-индуцированной агрегации. Однако, мы наблюдали дезагрегацию при PAR1-индуцированной или 5-HT<sub>2A</sub>-индуцированной агрегации. Обратимый характер кривых агрегации в ответ на стимуляцию PAR1 (при ингибировании вторичной активации) наблюдался и в ответ на комбинацию серотонина и адреналина (Рисунок 31 А). Во всех случаях агрегат становился нестабильным в присутствии аспирина (Рисунок 30 В).

Предложенный механизм регуляции фосфолипазы A2 может быть потенциальной мишенью для коррекции повышенного тромбообразования. Как было показано ранее, у мышей, дефицитных по гену PNPLA8, снижена агрегация тромбоцитов и наблюдается удлиненное время хвостового кровотечения [148]. Между тем, для 76-ти известных зарегистрированных мутаций гена PNPLA8 в литературе приведены данные только об аномалиях структуры головного мозга, мышечной и слуховой активности. Несмотря на важную роль iPLA2 $\gamma$  в агрегации тромбоцитов *in vitro*, его вклад *in vivo* может быть незначительным из-за активации sPLA2. Слабая активация тромбоцита от АДФ *in vitro* недостаточна для активации цитозольной PLA2, так как не вызывает длительного подъема цитозольного кальция [160].

Более 80% научных работ и клинических испытаний, в которых световая агрегометрия используется в качестве одного из методов, используют цитрат натрия в качестве антикоагулянта. В настоящем исследовании было показано, что этот подход не удовлетворяет физиологическим условиям и в конечном итоге приводит к различному характеру агрегации. Однако молекулярный механизм, ведущий к таким различиям в характере агрегации, может не быть критичным для функциональности тромбоцитов *in vivo*.

#### **4.1 Перспективы дальнейшего развития темы диссертации**

В перспективе развития темы планируется исследование прокоагулянтных тромбоцитов в составе больших агрегатов как предполагаемых центров дезагрегации тромбоцитов. В связи с тем, что у сильно активированных тромбоцитов снижается способность связываться друг с другом через активированные GPIIb/IIIa и фибриноген и, тем самым, удерживаться в агрегате, необходимо продолжить изучение механизма формирования прокоагулянтных тромбоцитов в присутствии ионов кальция в суспензии и их расположение в агрегате. Предполагается создание компьютерной модели, которая будет учитывать наличие дезагрегационных центров и предсказывать вероятность распада агрегатов различных размеров при различных условиях.

## 4.2 Итоги выполнения диссертационного исследования

В настоящей работе с использованием экспериментальных и теоретических подходов было показано, что феномен обратимой агрегации тромбоцитов связан с деактивацией фосфолипазы A<sub>2</sub>γ при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии. Сделано предположение, что дополнительная активация тромбоцитарных интегринов в агрегатах приводит к опустошению внутриклеточных кальциевых депо, что запускает активацию кальций-независимой фосфолипазы A<sub>2</sub> и синтезу арахидоновой кислоты, что приводит к синтезу тромбоксана и последующей вторичной активации тромбоцитов. В случае присутствия ионов кальция вне клетки, опустошение кальциевых депо приводит к активации депо-управляемых ионных каналов («store-operated calcium channels» – SOC), которые позволяют ионам кальция из суспензии поступать в клетку и восполнять уровень кальция в депо, что приводит к прекращению активации iPLA<sub>2</sub>γ. В крови с цитратом натрия этот механизм не функционирует, так как ионы кальция не присутствуют в суспензии тромбоцитов в достаточном количестве и не восполняют кальциевые депо клетки. iPLA<sub>2</sub>γ остается в активированном состоянии и продуцирует повышенное количество тромбоксана A<sub>2</sub>, который дополнительно активирует тромбоциты и стабилизирует агрегаты.

Другим новым результатом настоящей работы является разработка нового протокола диагностики тромбоцитарного гемостаза, который проводится при физиологической концентрации ионов кальция в суспензии. Постановка этого теста позволяет оценить первоначальный ответ тромбоцитов на добавление индуктора без участия вторичной активации тромбоцитов. Результаты данного исследования позволили показать, что функциональная активность тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом на двойной антитромбоцитарной терапии восстанавливается до предоперационного уровня к 180му дню терапии по результатам теста агрегометрии с физиологической концентрацией ионов кальция в суспензии. Также данный тест показал, что максимальный уровень агрегации тромбоцитов пациентов до операции трансуретральной резекции в ответ на 1мкМ АДФ значимо коррелирует с риском кровопотери во время операции.

Таким образом, в результате данной работы получены новые уникальные данные по механизмам феномена обратимой агрегации тромбоцитов, которые могут применяться для разработки новых подходов к диагностике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

## Выводы

1. Дезагрегация тромбоцитов наблюдается при активации суспензии АДФ или комбинацией адреналина и серотонина, при этом снижение концентрации тромбоцитов в суспензии с 300тыс.кл/мкл до 100тыс.кл/мкл сокращает время дезагрегации в два раза, а при понижении температуры предварительной инкубации тромбоцитов с 37 °С до 28 °С время дезагрегации и максимум светопропускания повышаются в 3 раза.

2. Необратимость агрегации тромбоцитов в отсутствие физиологической концентрации ионов кальция в суспензии обеспечивается синтезом тромбоксана А<sub>2</sub> (6-8 пг/мл в ответ на 5 мкМ АДФ) предположительно инициируемым в результате активности фосфолипазы А<sub>2</sub>γ, вызванной опустошением внутриклеточных депо кальция в тромбоцитах.

3. Разработанная уникальная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов основана на регистрации изменения светопропускания суспензии тромбоцитов, вызванного 1-3 мкМ АДФ, при физиологической концентрации ионов кальция в среде, при температуре проведения измерений +37 °С и стандартизированной концентрации тромбоцитов 300тыс.кл/мкл.

4. Разработанная методика диагностики агрегационной способности тромбоцитов позволяет выделить группу пациентов с повышенным риском кровопотери во время операции трансуретральной резекции по параметру максимальной агрегации тромбоцитов.

5. Предложенные параметры агрегации тромбоцитов (максимальная агрегация и индекс обратимости) являются чувствительными параметрами для определения восстановления функциональности тромбоцитов у пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии в течение 180 дней.

## Практические рекомендации

1. Пациентам с показаниями к проведению операции трансуретральной резекции перед хирургическим вмешательством рекомендуется оценка функциональности тромбоцитов в тесте агрегометрии в присутствии физиологической концентрации ионов кальция в суспензии в ответ на 1мкМ АДФ.
2. Пациентам, находящимся на двойной антиагрегантной терапии на протяжении одного года, рекомендуется проводить оценку функциональности тромбоцитов в тесте агрегометрии в присутствии физиологической концентрации ионов кальция в суспензии в ответ на 1, 2 и 3мкМ АДФ, начиная с 30го дня назначения терапии, для выявления восстановления ответа тромбоцитов и возможной необходимости эскалации терапии.
3. Пациентам, у которых наблюдается обратимый характер кривой агрегации в классическом тесте агрегометрии в суспензии с цитратом натрия, рекомендуется провести оценку функциональности тромбоцитов в тесте агрегометрии в присутствии физиологической концентрации ионов кальция в суспензии в ответ на индукторы, на которые наблюдался обратимый характер в классическом тесте.

**Список сокращений и условных обозначений**

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ;
- ИМП – инфравезикальная обструкция;
- ИБС – ишемическая болезнь сердца;
- CS – размер фибринового сгустка;
- D – плотность фибринового сгустка;
- Tag – задержка роста фибринового сгустка;
- V – скорость роста сгустка;
- V<sub>st</sub> – средняя скорость роста сгустка;
- V<sub>i</sub> – начальная скорость роста сгустка;
- T<sub>sp</sub> – время образования спонтанных сгустков;
- LTA – турбидометрическая агрегометрия;
- CTI (corn trypsin inhibitor) – кукурузный трипсин ингибитор;
- PDMS – полидиметилсилоксана;
- ТФ – тканевый фактор;
- ГП – гликопротеин;
- АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время;
- ТВ – тромбиновое время;
- ПТИ – протромбиновый индекс;
- ВРП – время рекальцификации плазмы;
- ТЭГ – тромбоэластография;
- ТХА<sub>2</sub> – тромбоксан А<sub>2</sub>;
- АДФ – аденозиндифосфат;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АМФ – аденозинмонофосфат;
- ФСП – флуктуации светопропускания;
- ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство;
- ОКС – острый коронарный синдром;
- ДАТТ – двойная антитромбоцитарная терапия;

БТП – богатая тромбоцитами плазма;

ОП – оптическая плотность;

TRAP-6 (thrombin related activated peptide – 6) – агонист PAR1 рецептора;

VEL – специфичный ингибитор кальций-независимой фосфолипазы A2 $\gamma$ ;

ВКД – внутриклеточные кальциевые депо;

iPLA2 $\gamma$  – кальций-независимая фосфолипаза A2 $\gamma$ ;

СТ – суспензия тромбоцитов;

SOC (store-operated channels) – депо-управляемые ионные каналы;

ИМТ – индекс массы тела;

ХСН – хроническая сердечная недостаточность;

ХБП – хроническая болезнь почек;

ИМ – инфаркт миокарда;

АКШ – аортокоронарное шунтирование;

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения;

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких;

ЯБЖ – язвенная болезнь желудка.

## Благодарности

Автор выражает глубокую признательность своим научным руководителям Свешниковой Анастасии Никитичне и Плясуновой Светлане Александровне за поддержку при выполнении работы, помощь при подготовке диссертации и ценные замечания. Автор выражает искреннюю благодарность Свешниковой Анастасии Никитичне за научное руководство, помощь в написании статей и проведении научных исследований, а также за наставления и безграничные возможности для реализации. Автор также выражает искреннюю благодарность Пантелееву Михаилу Александровичу, Атауллаханову Фазоилу Иноятовичу и Пьеру Манжин за конструктивную критику, мотивацию и ценные рекомендации, без которых данная работа не могла быть проведена.

Автор выражает благодарность сотрудникам ЦТП ФХФ РАН Гарсон Дасгупта Андрею Кумар, Свидельской Галине Сергеевне, Мишиной Надежде Михайловне, Якушевой Александре Антоновне и Бутову Кириллу Романовичу за личную поддержку и конструктивные обсуждения при выполнении работы. Автор признателен Балабину Фёдору Алексеевичу, Нечипуренко Дмитрию Юрьевичу, Серёгиной Елене Александровне, Липец Елене Николаевне, Мартьянову Алексею Александровичу, Корнейчук Анне Дмитриевне, Депутатовой Анне Алексеевне, Ан Ольге Ильиничне, Кольцовой Екатерине Михайловне за многолетнее сотрудничество, обсуждения и помощь при выполнении экспериментальных и теоретических исследований.

Автор хотел бы поблагодарить сотрудников и ординаторов ГБУЗ "ГКБ им В.В. Виноградова ДЗМ" Писарюк Александру Сергеевну, Мерай Имада Ахматовича, Беломытцева Сергея Викторовича, Тухсанбоева Ёкуба, Майнунова Далера за конструктивные обсуждения, помощь в организации работы с пациентами и предоставлении материалов для проведения исследований со здоровыми донорами и пациентами.

Автор благодарит Корнилову Елену Сергеевну и Гамбаряна Степана Петровича за ценные замечания по структуре диссертации.

Автор также хотел бы поблагодарить Филькову Ольгу Геннадьевну, Филькова Андрея Михайловича, Филькова Василия Андреевича и Анисову Анну Андреевну за всестороннюю поддержку, терпение и вдохновение.

Автор также благодарит Лыгину Ольгу Вячеславовну, Садовникова Дмитрия Александровича и Алтай, на котором и была написана данная диссертация.

**Список литературы**

1. BORN, G.V.R. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal / G.V.R. BORN // *Nature*. – 1962. – Vol. 194 – № 4832 – P. 927–929.
2. Chen, Y. An integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  intermediate affinity state mediates biomechanical platelet aggregation. / Y. Chen, L.A. Ju, F. Zhou, J. Liao, L. Xue, Q.P. Su, D. Jin, Y. Yuan, H. Lu, S.P. Jackson, C. Zhu // *Nature materials*. – England, 2019. – Vol. 18 – № 7 – P. 760–769.
3. Jones, S. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modulates ADP-evoked aggregation through altered agonist degradation: implications for conditions used to study P2Y receptor activation. / S. Jones, R.J. Evans, M.P. Mahaut-Smith // *British journal of haematology*. – 2011. – Vol. 153 – № 1 – P. 83–91.
4. Ni, R. Effect of Different Doses of Acetylsalicylic Acid on the Antithrombotic Activity of Clopidogrel in a Mouse Arterial Thrombosis Model. / R. Ni, N. Vaezzadeh, J. Zhou, J.I. Weitz, M. Cattaneo, P.L. Gross // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – United States, 2018. – Vol. 38 – № 10 – P. 2338–2344.
5. Tanaka, K.A. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. / K.A. Tanaka, N.S. Key, J.H. Levy // *Anesthesia and analgesia*. – United States, 2009. – Vol. 108 – № 5 – P. 1433–1446.
6. Баландина А.Н. Система свертывания крови и ее регуляция / Баландина А.Н., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И // *Природа*. – 2011. – № 3 – P. 32–38.
7. Hoffman, M. A cell-based model of hemostasis. / M. Hoffman, D.M. Monroe // *Thrombosis and haemostasis*. – Germany, 2001. – Vol. 85 – № 6 – P. 958–965.
8. Carmeliet, P. Tissue factor. / P. Carmeliet, D. Collen // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – Netherlands, 1998. – Vol. 30 – № 6 – P. 661–667.
9. Roberts, H.R. A cell-based model of thrombin generation. / H.R. Roberts, M. Hoffman, D.M. Monroe // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – United

- States, 2006. – Vol. 32 Suppl 1 – P. 32–38.
10. Smith, S.A. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. / S.A. Smith, R.J. Travers, J.H. Morrissey // *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. – England, 2015. – Vol. 50 – № 4 – P. 326–336.
  11. Panteleev, M.A. [Blood coagulation: mechanisms of regulation]. / M.A. Panteleev, I.N. Kotova, A.A. Tokarev, F.I. Ataullakhanov // *Terapevticheskiy arkhiv*. – Russia (Federation), 2008. – Vol. 80 – № 7 – P. 88–91.
  12. Konrath, S. Intrinsic coagulation pathway-mediated thrombin generation in mouse whole blood. / S. Konrath, R.K. Mailer, M. Beerens, H. Englert, M. Frye, P. Kuta, R.J.S. Preston, C. Maas, L.M. Butler, M. Roest, B. de Laat, T. Renné // *Frontiers in cardiovascular medicine*. – Switzerland, 2022. – Vol. 9 – P. 1008410.
  13. Ovanesov, M. V Effect of factor VIII on tissue factor-initiated spatial clot growth / M. V Ovanesov, E.G. Lopatina, E.L. Saenko, N.M. Ananyeva, L.I. Ul'yanova, O.P. Plyushch, A.A. Butilin, F.I. Ataullakhanov // *Thrombosis and haemostasis*. – Laboratory of Physical Biochemistry of Blood, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia., 2003. – Vol. 89 – № 2 – P. 235–242.
  14. БуТЫЛИН А.А., Пантелеев М.А., А.Ф.И.П. динамика свертывания крови // *Р. химический журнал*. 2007. №1. U. <https://cyberleninka.ru/article/n/prostranstvennaya-dinamika-svertyvaniya-krov>. (дата обращения: 15. 02. 2023). Пространственная динамика свертывания крови / А.Ф.И.П. динамика свертывания крови // *Р. химический журнал*. 2007. №1. U. <https://cyberleninka.ru/article/n/prostranstvennaya-dinamika-svertyvaniya-krov>. (дата обращения: 15. 02. 2023). БуТЫЛИН А.А., Пантелеев М.А. // *Российский химический журнал*. – 2007. – Vol. 1.
  15. Heemskerk, J.W.M. Platelet activation and blood coagulation. / J.W.M. Heemskerk, E.M. Bevers, T. Lindhout // *Thrombosis and haemostasis*. – 2002. – Vol. 88 – № 2 – P. 186–193.
  16. Stalker, T.J. Platelet Signaling / T.J. Stalker, D.K. Newman, P. Ma, K.M. Wannemacher, L.F. Brass // *Handbook of experimental pharmacology*. – 2012. – № 210 – P. 59–85.

17. Pantelev, M.A. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion / M.A. Pantelev, N.M. Dashkevich, F.I. Ataulakhanov // *Thrombosis Research*. – 2015. – Vol. 136 – № 4 – P. 699–711.
18. Toschi, V. Inhibitors of propagation of coagulation: factors V and X. / V. Toschi, M. Lettino // *British journal of clinical pharmacology*. – England, 2011. – Vol. 72 – № 4 – P. 563–580.
19. Lam, W. Physiology, Factor V. / W. Lam, L. Moosavi. – Treasure Island (FL), 2022.
20. Ostadal, P. Anti-Xa activity of enoxaparin and nadroparin in patients with acute coronary syndrome / P. Ostadal, D. Alan, J. Vejvoda, J. Segethova, A. Kruger // *Experimental and clinical cardiology*. – Pulsus Group Inc, 2008. – Vol. 13 – № 4 – P. 175–178.
21. Candia, E. De Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history / E. De Candia // *Thrombosis Research*. – 2012. – Vol. 129 – № 3 – P. 250–256.
22. Rezaie, A.R. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. / A.R. Rezaie, H. Giri // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – England, 2020. – Vol. 18 – № 12 – P. 3142–3153.
23. Oto, J. Activated protein C assays: A review. / J. Oto, Á. Fernández-Pardo, M. Miralles, E. Plana, F. España, S. Navarro, P. Medina // *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. – Netherlands, 2020. – Vol. 502 – P. 227–232.
24. Jackson, S.P. The growing complexity of platelet aggregation / S.P. Jackson // *Blood*. – 2007. – Vol. 109 – № 12 – P. 5087–5095.
25. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов / Мазуров А.В. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 p.
26. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Онкогематология*. – 2014. – № 2 – P. 65–73.
27. Якименко, А.О. Этот загадочный тромбоцит / А.О. Якименко, А.Н. Свешникова, Е.О. Артеменко, М.А. Пантелеев // *Природа*. – 2014. – Vol. 1182 – № 2 – P. 3–8.

28. Nispen tot Pannerden, H. van The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular  $\alpha$ -granule subtypes / H. van Nispen tot Pannerden, F. de Haas, W. Geerts, G. Posthuma, S. van Dijk, H.F.G. Heijnen // *Blood*. – 2010. – Vol. 116 – № 7.
29. Heijnen, H. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? / H. Heijnen, P. van der Sluijs // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2015. – Vol. 13 – № 12 – P. 2141–2151.
30. Blair, P. Platelet  $\alpha$ -granules: Basic biology and clinical correlates / P. Blair, R. Flaumenhaft // *Blood Reviews*. – 2009. – Vol. 23 – № 4 – P. 177–189.
31. Rendu, F. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions / F. Rendu, B. Brohard-Bohn // *Platelets*. – 2001. – Vol. 12 – № 5 – P. 261–273.
32. Peters, C.G. Granule exocytosis is required for platelet spreading: Differential sorting of alpha-granules expressing VAMP-7 / C.G. Peters, A.D. Michelson, R. Flaumenhaft // *Blood*. – 2012. – Vol. 120 – № 1 – P. 199–206.
33. Clerck, F. De Effects of serotonin on platelets and blood vessels. / F. De Clerck // *Journal of cardiovascular pharmacology*. – United States, 1991. – Vol. 17 Suppl 5 – P. S1-5.
34. Jung, S.M. Activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha(2)\beta(1)$ : its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. / S.M. Jung, M. Moroi // *Trends in cardiovascular medicine*. – 2000. – Vol. 10 – № 7 – P. 285–292.
35. Nieswandt, B. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? / B. Nieswandt, S.P. Watson // *Blood*. – 2003. – Vol. 102 – № 2 – P. 449–461.
36. Holmsen, H. Signal transducing mechanisms in platelets. / H. Holmsen // *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences*. – China (Republic : 1949- ), 1991. – Vol. 15 – № 3 – P. 147–152.
37. Шатурный, В.И. Активаторы, Рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови / В.И. Шатурный, С.С. Шахиджанов, А.Н. Свешникова, М.А. Пантелеев // *Биомедицинская химия*. – 2014. –

- Vol. 60 – № 2 – P. 182–200.
38. Clemetson, K.J. Snake venom proteins affecting platelets and their applications to anti-thrombotic research. / K.J. Clemetson, Q. Lu, J.M. Clemetson // *Current pharmaceutical design*. – 2007. – Vol. 13 – № 28 – P. 2887–2892.
  39. Clemetson, K.J. Collagen Receptors as Potential Targets for Novel Anti-Platelet Agents / K.J. Clemetson, J.M. Clemetson // *Curr Pharm Des*. – Bentham Science Publishers, 2007. – Vol. 26 – № 13 – P. 2673–2683.
  40. Gardiner, E.E. Platelet Receptor Shedding / E.E. Gardiner, M. Al-Tamimi, R.K. Andrews, M.C. Berndt. – 2012. – № 4 – P. 321–339.
  41. Ni, H. Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V. / H. Ni, V. Ramakrishnan, Z.M. Ruggeri, J.M. Papalia, D.R. Phillips, D.D. Wagner // *Blood*. – 2001. – Vol. 98 – № 2 – P. 368–373.
  42. Topalov, N.N. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. / N.N. Topalov, Y.N. Kotova, S.A. Vasil'ev, M.A. Pantelev // *British journal of haematology*. – 2012. – Vol. 157 – № 1 – P. 105–115.
  43. Gilio, K. Functional divergence of platelet protein kinase C (PKC) isoforms in thrombus formation on collagen. / K. Gilio, M.T. Harper, J.M.E.M. Cosemans, O. Konopatskaya, I.C.A. Munnix, L. Prinzen, M. Leitges, Q. Liu, J.D. Molkenin, J.W.M. Heemskerk, A.W. Poole // *The Journal of biological chemistry*. – 2010. – Vol. 285 – № 30 – P. 23410–23419.
  44. Vu, T.-K.H. Domains specifying thrombin–receptor interaction / T.-K.H. Vu, V.I. Wheaton, D.T. Hung, I. Charo, S.R. Coughlin // *Nature*. – 1991. – Vol. 353 – № 6345 – P. 674–677.
  45. Holmsen, H. Significance of testing platelet functions in vitro. / H. Holmsen // *European journal of clinical investigation*. – 1994. – Vol. 24 Suppl 1 – P. 3–8.
  46. Coughlin, S.R. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology / S.R. Coughlin // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 3 – № 8 – P. 1800–1814.
  47. Woulfe, D.S. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis /

- D.S. Woulfe // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Vol. 3 – № 10 – P. 2193–2200.
48. Kotova, Y.N. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. / Y.N. Kotova, F.I. Ataulakhanov, M.A. Panteleev // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2008. – Vol. 6 – № 9 – P. 1603–1605.
  49. Versteeg, H.H. *New Fundamentals in Hemostasis* / H.H. Versteeg, J.W.M. Heemskerk, M. Levi, P.H. Reitsma // *Physiological Reviews*. – 2013. – Vol. 93 – № 1 – P. 327–358.
  50. Offermanns, S. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. / S. Offermanns, C.F. Toombs, Y.H. Hu, M.I. Simon // *Nature*. – 1997. – Vol. 389 – № 6647 – P. 183–186.
  51. Nurden, P. The evolution of megakaryocytes to platelets. / P. Nurden, C. Poujol, A.T. Nurden // *Bailliere's clinical haematology*. – 1997. – Vol. 10 – № 1 – P. 1–27.
  52. Haberstock-Debic, H. A Clopidogrel-Insensitive Inducible Pool of P2Y12 Receptors Contributes to Thrombus Formation: Inhibition by Elinogrel, a Direct-Acting, Reversible P2Y12 Antagonist / H. Haberstock-Debic, P. Andre, S. Mills, D.R. Phillips, P.B. Conley // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2011. – Vol. 339 – № 1 – P. 54–61.
  53. Lantz, N. A high concentration of ADP induces weak platelet granule secretion independently of aggregation and thromboxane A2 production. / N. Lantz, B. Hechler, C. Ravanat, J.-P. Cazenave, C. Gachet // *Thrombosis and haemostasis*. – 2007. – Vol. 98 – № 5 – P. 1145–1147.
  54. Caterina, R. De Thromboxane-B2 generation during ex-vivo platelet aggregation. / R. De Caterina, D. Giannessi, P. Gazzetti, W. Bernini // *The Journal of nuclear medicine and allied sciences*. – Vol. 28 – № 3 – P. 185–196.
  55. Coade, S.B. Metabolism of adenine nucleotides in human blood. / S.B. Coade, J.D. Pearson // *Circulation research*. – 1989. – Vol. 65 – № 3 – P. 531–537.
  56. Lüthje, J. Demonstration of a novel ecto-enzyme on human erythrocytes, capable

- of degrading ADP and of inhibiting ADP-induced platelet aggregation. / J. Lüthje, A. Schomburg, A. Ogilvie // *European journal of biochemistry*. – 1988. – Vol. 175 – № 2 – P. 285–289.
57. Holmsen, H. Secretory mechanisms. Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline. / H. Holmsen, H.J. Day, C.A. Setkowsky // *The Biochemical journal*. – 1972. – Vol. 129 – № 1 – P. 67–82.
58. Surprenant, A. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. / A. Surprenant, G. Buell, R.A. North // *Trends in neurosciences*. – 1995. – Vol. 18 – № 5 – P. 224–229.
59. Toth-Zsomboki, E. P2X1-mediated ERK2 Activation Amplifies the Collagen-induced Platelet Secretion by Enhancing Myosin Light Chain Kinase Activation / E. Toth-Zsomboki, C. Oury, H. Cornelissen, R. De Vos, J. Vermylen, M.F. Hoylaerts // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278 – № 47 – P. 46661–46667.
60. Oury, C. Overexpression of the platelet P2X1 ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype / C. Oury, M.J.E. Kuijpers, E. Toth-Zsomboki, A. Bonnefoy, S. Danloy, I. Vreys, M.A.H. Feijge, R. De Vos, J. Vermylen, J.W.M. Heemskerk, M.F. Hoylaerts // *Blood*. – 2003. – Vol. 101 – № 10 – P. 3969–3976.
61. Hechler, B. A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. / B. Hechler, N. Lenain, P. Marchese, C. Vial, V. Heim, M. Freund, J.-P. Cazenave, M. Cattaneo, Z.M. Ruggeri, R. Evans, C. Gachet // *The Journal of experimental medicine*. – 2003. – Vol. 198 – № 4 – P. 661–667.
62. Fung, C.Y.E. A major role for P2X1 receptors in the early collagen-evoked intracellular Ca<sup>2+</sup> responses of human platelets. / C.Y.E. Fung, C.A. Brearley, R.W. Farndale, M.P. Mahaut-Smith // *Thrombosis and haemostasis*. – 2005. – Vol. 94 – № 1 – P. 37–40.
63. Erhardt, J.A. P2X1 stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation / J.A. Erhardt, J.R. Toomey, S.A. Douglas, D.G. Johns // *Journal of*

- Thrombosis and Haemostasis. – 2006. – Vol. 4 – № 4 – P. 882–890.
64. Fung, C.Y.E. Primary and secondary agonists can use P2X<sub>1</sub> receptors as a major pathway to increase intracellular Ca<sup>2+</sup> in the human platelet / C.Y.E. Fung, C. Cendana, R.W. Farndale, M.P. Mahaut-Smith // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5 – № 5 – P. 910–917.
  65. Hu, H. The P2X<sub>1</sub> ion channel in platelet function / H. Hu, M.F. Hoylaerts // *Platelets*. – 2010. – Vol. 21 – № 3 – P. 153–166.
  66. Vial, C. Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X<sub>1</sub> receptors supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis / C. Vial, S.J. Pitt, J. Roberts, M.G. Rolf, M.P. Mahaut-Smith, R.J. Evans // *Blood*. – 2003. – Vol. 102 – № 10 – P. 3646–3651.
  67. Ozen, G. Mechanism of thromboxane receptor-induced vasoconstriction in human saphenous vein. / G. Ozen, K. Aljesri, Z. Celik, G. Turkyilmaz, S. Turkyilmaz, O. Teskin, X. Norel, G. Topal // *Prostaglandins & other lipid mediators*. – United States, 2020. – Vol. 151 – P. 106476.
  68. Jennings, L.K. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis / L.K. Jennings // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 102 – № 2 – P. 248–257.
  69. Smith, J.B. Persistence of thromboxane A<sub>2</sub>-like material and platelet release-inducing activity in plasma. / J.B. Smith, C. Ingerman, M.J. Silver // *Journal of Clinical Investigation*. – 1976. – Vol. 58 – № 5 – P. 1119–1122.
  70. Rao, G.H. Epinephrine and platelet function. / G.H. Rao, J.G. White // *The Journal of laboratory and clinical medicine*. – United States, 1997. – Vol. 130 – № 3 – P. 238–239.
  71. Niiya, K. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. / K. Niiya, E. Hodson, R. Bader, V. Byers-Ward, J.A. Koziol, E.F. Plow, Z.M. Ruggeri // *Blood*. – United States, 1987. – Vol. 70 – № 2 – P. 475–483.
  72. Wagner, C.L. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3

- binding to human platelets. / C.L. Wagner, M.A. Mascelli, D.S. Neblock, H.F. Weisman, B.S. Coller, R.E. Jordan // *Blood*. – United States, 1996. – Vol. 88 – № 3 – P. 907–914.
73. Plow, E.F. The biology of glycoprotein IIb-IIIa. / E.F. Plow, T. Byzova // *Coronary artery disease*. – England, 1999. – Vol. 10 – № 8 – P. 547–551.
74. Cazenave, J.-P. Preparation of Washed Platelet Suspensions From Human and Rodent Blood / J.-P. Cazenave, P. Ohlmann, D. Cassel, A. Eckly, B. Hechler, C. Gachet // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2004. – Vol. 272 – P. 13–28.
75. Trumel, C. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. / C. Trumel, B. Payrastra, M. Plantavid, B. Hechler, C. Viala, P. Presek, E.A. Martinson, J.P. Cazenave, H. Chap, C. Gachet // *Blood*. – United States, 1999. – Vol. 94 – № 12 – P. 4156–4165.
76. Baurand, A. Differential regulation and relocalization of the platelet P2Y receptors after activation: a way to avoid loss of hemostatic properties? / A. Baurand, A. Eckly, B. Hechler, G. Kauffenstein, J.-L. Galzi, J.-P. Cazenave, C. Leon, C. Gachet // *Molecular pharmacology*. – United States, 2005. – Vol. 67 – № 3 – P. 721–733.
77. BELL, W.N. The clinical use of a coagulogram. / W.N. BELL // *The Medical clinics of North America*. – United States, 1953. – Vol. 1 – P. 1843–1853.
78. Wang, Y. Retrospective analysis of the predictive effect of coagulogram on the prognosis of intracerebral hemorrhage. / Y. Wang, X. Wang, Y. Kong, F. Li, H. Chen // *Acta neurochirurgica. Supplement*. – Austria, 2011. – Vol. 111 – P. 383–385.
79. GERENDAS, M. The coagulogram; an aid in the evaluation of disorders in blood clotting. / M. GERENDAS // *Therapia Hungarica* (English edition). – Hungary, 1956. – № 1 – P. 3–11.
80. Shkol'niĭ, G.K. [Effect of oxytocin on some indices of the coagulogram in parturients with weak labor activity]. / G.K. Shkol'niĭ, S.M. Klimenko //

- Pediatrica akusherstvo i ginekologiya. – Ukraine, 1967. – Vol. 6 – P. 38–40.
81. Othman, M. Thromboelastography (TEG). / M. Othman, H. Kaur // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – United States, 2017. – Vol. 1646 – P. 533–543.
  82. Burton, A.G. Use of Thromboelastography in Clinical Practice. / A.G. Burton, K.E. Jandrey // *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice.* – United States, 2020. – Vol. 50 – № 6 – P. 1397–1409.
  83. Subramanian, M. Thromboelastography-Guided Resuscitation of the Trauma Patient. / M. Subramanian, L.J. Kaplan, J.W. Cannon // *JAMA surgery.* – United States, 2019. – Vol. 154 – № 12 – P. 1152–1153.
  84. Balandina, A.N. Thrombodynamics-A new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment. / A.N. Balandina, I.I. Serebriyskiy, A. V Poletaev, D.M. Polokhov, M.A. Gracheva, E.M. Koltsova, D.M. Vardanyan, I.A. Taranenko, A.Y. Krylov, E.S. Urnova, K. V Lobastov, A. V Chernyakov, E.M. Shulutko, A.P. Momot, A.M. Shulutko, F.I. Ataulakhanov // *PloS one.* – 2018. – Vol. 13 – № 6 – P. e0199900.
  85. Sinauridze, E.I. Thrombodynamics, a new global coagulation test: Measurement of heparin efficiency. / E.I. Sinauridze, T.A. Vuimo, I.D. Tarandovskiy, R.A. Ovsepyan, S.S. Surov, N.G. Korotina, I.I. Serebriyskiy, M.M. Lutsenko, A.L. Sokolov, F.I. Ataulakhanov // *Talanta.* – Netherlands, 2018. – Vol. 180 – P. 282–291.
  86. Chebotareva, N. Thrombodynamics as a tool for monitoring hemostatic disorders in patients with chronic glomerulonephritis complicated by nephrotic syndrome. / N. Chebotareva, A. Berns, V. McDonnell, E. Sovetnikov, S. Berns, S. Guliaev, A. Solonkina // *Clinical hemorheology and microcirculation.* – Netherlands, 2022. – Vol. 82 – № 2 – P. 141–148.
  87. Seregina, E.A. The hemostasis system in children with hereditary spherocytosis. / E.A. Seregina, A. V Poletaev, E. V Bondar, T.A. Vuimo, F.I. Ataulakhanov, N.S. Smetanina // *Thrombosis research.* – United States, 2019. – Vol. 176 – P. 11–17.
  88. Beynon, R.A. Investigating the effects of lycopene and green tea on the

- metabolome of men at risk of prostate cancer: The ProDiet randomised controlled trial. / R.A. Beynon, R.C. Richmond, D.L. Santos Ferreira, A.R. Ness, M. May, G.D. Smith, E.E. Vincent, C. Adams, M. Ala-Korpela, P. Würtz, S. Soidinsalo, C. Metcalfe, J.L. Donovan, A.J. Lane, R.M. Martin // *International journal of cancer*. – United States, 2019. – Vol. 144 – № 8 – P. 1918–1928.
89. Elwood, P.C. Ischemic heart disease and platelet aggregation. The Caerphilly Collaborative Heart Disease Study. / P.C. Elwood, S. Renaud, D.S. Sharp, A.D. Beswick, J.R. O'Brien, J.W. Yarnell // *Circulation*. – United States, 1991. – Vol. 83 – № 1 – P. 38–44.
90. Ibrahim, S.F. Flow cytometry and cell sorting. / S.F. Ibrahim, G. van den Engh // *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. – Germany, 2007. – Vol. 106 – P. 19–39.
91. Roest, M. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization. / M. Roest, A. Reininger, J.J. Zwaginga, M.R. King, J.W.M. Heemskerk // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – England, 2011. – Vol. 9 – № 11 – P. 2322–2324.
92. Schmit, T. An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. / T. Schmit, M. Klomp, M.N. Khan // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – United States, 2021. – Vol. 2223 – P. 169–182.
93. Е.А. Пономаренко, А.А.И. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики / А.А.И. Е.А. Пономаренко, Д.В. Федорова, П.А. Жарков, М.А. Пантелеев // *Pediatric hematology/oncology and immunopathology*. – 2019. – Vol. 18 – № 3 – P. 112–119.
94. Paniccia, R. Platelet function tests: a comparative review. / R. Paniccia, R. Priora, A.A. Liotta, R. Abbate // *Vascular health and risk management*. – New Zealand, 2015. – Vol. 11 – P. 133–148.
95. Bartoli, F. Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. / F. Bartoli, H.K. Lin, F. Ghomashchi, M.H. Gelb, M.K. Jain, R.

- Apitz-Castro // *The Journal of biological chemistry*. – United States, 1994. – Vol. 269 – № 22 – P. 15625–15630.
96. Anaya, R. Correlation between PlateletWorks(®) and PFA-100(®) for Measuring Platelet Function before Urgent Surgery in Patients with Chronic Antiplatelet Therapy. / R. Anaya, M. Rodriguez, J.M. Gil, N. Vilalta, A. Merchan-Galvis, V. Moral, J. Mateo, M.J. Martinez-Zapata // *Journal of clinical medicine*. – Switzerland, 2021. – Vol. 10 – № 2.
  97. Zhang, Y. Verifynow P2Y(12) PRU-Guided Modification of Clopidogrel for Prevention of Recurrent Ischemic Stroke: A Real-World Prospective Cohort Study. / Y. Zhang, D. Fan, S. Qiao, H. Hu // *Neurology and therapy*. – New Zealand, 2022. – Vol. 11 – № 4 – P. 1749–1766.
  98. Savion, N. Impact--the cone and plate(let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. / N. Savion, D. Varon // *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*. – Switzerland, 2006. – Vol. 35 – № 1–2 – P. 83–88.
  99. Favaloro, E.J. Clinical utility of the PFA-100. / E.J. Favaloro // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – United States, 2008. – Vol. 34 – № 8 – P. 709–733.
  100. Favaloro, E.J. Clinical application of the PFA-100. / E.J. Favaloro // *Current opinion in hematology*. – United States, 2002. – Vol. 9 – № 5 – P. 407–415.
  101. Harrison, P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. / P. Harrison // *British journal of haematology*. – England, 2005. – Vol. 130 – № 1 – P. 3–10.
  102. Hayward, C.P.M. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. / C.P.M. Hayward, P. Harrison, M. Cattaneo, T.L. Ortel, A.K. Rao // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – England, 2006. – Vol. 4 – № 2 – P. 312–319.
  103. Fallon, M.E. In Vitro Flow Chamber Design for the Study of Endothelial Cell (Patho)Physiology. / M.E. Fallon, R. Mathews, M.T. Hinds // *Journal of biomechanical engineering*. – United States, 2022. – Vol. 144 – № 2.
  104. Schoeman, R.M. Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders. / R.M. Schoeman, M.

- Lehmann, K.B. Neeves // *Platelets*. – England, 2017. – Vol. 28 – № 5 – P. 463–471.
105. Мазуров, А.В. Физиология и патология тромбоцитов / А.В. Мазуров. – Литтерра, 2011.
106. Филькова А.А., Пантелеев М.А., С.А.Н. Обратимая агрегация тромбоцитов в присутствии ионов кальция: механизмы и потенциальная значимость / С.А.Н. Филькова А.А., Пантелеев М.А. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2019. – Vol. 18 – № 3 – P. 120–129.
107. Baurand, A. Inhibition of platelet function by administration of MRS2179, a P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist. / A. Baurand, P. Raboisson, M. Freund, C. Léon, J.P. Cazenave, J.J. Bourguignon, C. Gachet // *European journal of pharmacology*. – Netherlands, 2001. – Vol. 412 – № 3 – P. 213–221.
108. Kauffenstein, G. The P2Y<sub>12</sub> receptor induces platelet aggregation through weak activation of the  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. / G. Kauffenstein, W. Bergmeier, A. Eckly, P. Ohlmann, C. Léon, J.P. Cazenave, B. Nieswandt, C. Gachet // *FEBS letters*. – England, 2001. – Vol. 505 – № 2 – P. 281–290.
109. Lanza, F. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. / F. Lanza, A. Beretz, A. Stierlé, D. Hanau, M. Kubina, J. Cazenave // *The American journal of physiology*. – 1988. – Vol. 255 6 Pt 2 – P. H1276-88.
110. Cerrito, F. 5HT<sub>2</sub>-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. / F. Cerrito, M.P. Lazzaro, E. Gaudio, P. Arminio, G. Aloisi // *Life sciences*. – Netherlands, 1993. – Vol. 53 – № 3 – P. 209–215.
111. Abajo, F.J. de Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on platelet function: mechanisms, clinical outcomes and implications for use in elderly patients. / F.J. de Abajo // *Drugs & aging*. – New Zealand, 2011. – Vol. 28 – № 5 – P. 345–367.
112. Shukla, D. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. / D. Shukla, P.G. Spear // *The Journal of clinical investigation*. –

- United States, 2001. – Vol. 108 – № 4 – P. 503–510.
113. Puett, D. Collagen-mediated platelet aggregation. Effects of collagen modification involving the protein and carbohydrate moieties. / D. Puett, B.K. Wasserman, J.D. Ford, L.W. Cunningham // *The Journal of clinical investigation*. – United States, 1973. – Vol. 52 – № 10 – P. 2495–2506.
114. Roberts, D.E. Mechanism of collagen activation in human platelets. / D.E. Roberts, A. McNicol, R. Bose // *The Journal of biological chemistry*. – United States, 2004. – Vol. 279 – № 19 – P. 19421–19430.
115. Hirata, T. Two thromboxane A<sub>2</sub> receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. / T. Hirata, F. Ushikubi, A. Kakizuka, M. Okuma, S. Narumiya // *The Journal of clinical investigation*. – United States, 1996. – Vol. 97 – № 4 – P. 949–956.
116. Paul, B.Z. Molecular mechanism of thromboxane A<sub>2</sub>-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. / B.Z. Paul, J. Jin, S.P. Kunapuli // *The Journal of biological chemistry*. – United States, 1999. – Vol. 274 – № 41 – P. 29108–29114.
117. Столяр М.А., О.И.А. К вопросу определения границ нормальной реакции тромбоцитов в тесте импедансной агрегометрии / О.И.А. Столяр М.А. // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2016. – Vol. 6.
118. Saniabadi, A.R. Platelet aggregation studies in whole human blood. / A.R. Saniabadi, G.D. Lowe, C.D. Forbes, C.R. Prentice, J.C. Barbenel // *Thrombosis research*. – United States, 1983. – Vol. 30 – № 6 – P. 625–632.
119. Coêlho, M.J.D. Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. / M.J.D. Coêlho, T. de C. Monteiro, F.G. Vasquez, K.L.T. Silva, K.S.B. Dos Santos, V.M.A. de Oliveira, F. de O. Cavalcante // *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. – Brazil, 2011. – Vol. 33 – № 2 – P. 110–114.
120. Rocca, B. Wiskott-Aldrich syndrome: report of an autosomal dominant variant. / B. Rocca, A. Bellacosa, R. De Cristofaro, G. Neri, M. Della Ventura, N. Maggiano, C. Rumi, R. Landolfi // *Blood*. – United States, 1996. – Vol. 87 – № 11

- P. 4538–4543.
121. С. А. Ходулева, Л. П. Зайцева, И.П.Р. Некоторые аспекты диагностики тромбоцитопатий у детей / И.П.Р. С. А. Ходулева, Л. П. Зайцева // Проблемы здоровья и экологии. – 2007. – Vol. 4.
  122. Bonduel, M. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults. / M. Bonduel, J.P. Frontroth, M. Hepner, G. Sciuccati, A. Feliú-Torres // Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. – England, 2007. – Vol. 5 – № 8 – P. 1782–1783.
  123. Thachil, J. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 / J. Thachil, N. Tang, S. Gando, A. Falanga, M. Cattaneo, M. Levi, C. Clark, T. Iba // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – John Wiley & Sons, Ltd, 2020. – Vol. 18 – № 5 – P. 1023–1026.
  124. Krishnan, M.N. Coronary heart disease and risk factors in India - on the brink of an epidemic? / M.N. Krishnan // Indian heart journal. – India, 2012. – Vol. 64 – № 4 – P. 364–367.
  125. Ruggeri, Z.M. Platelets in atherothrombosis / Z.M. Ruggeri // Nature Medicine. – 2002. – Vol. 8 – № 11 – P. 1227–1234.
  126. Berger, J.S. Hyperreactive platelet phenotypes: relationship to altered serotonin transporter number, transport kinetics and intrinsic response to adrenergic co-stimulation. / J.S. Berger, R.C. Becker, C. Kuhn, M.J. Helms, T.L. Ortel, R. Williams // Thrombosis and haemostasis. – Germany, 2013. – Vol. 109 – № 1 – P. 85–92.
  127. Gurbel, P.A. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. / P.A. Gurbel, R.C. Becker, K.G. Mann, S.R. Steinhubl, A.D. Michelson // Journal of the American College of Cardiology. – United States, 2007. – Vol. 50 – № 19 – P. 1822–1834.
  128. Jennings, L.K. Role of Platelets in Atherothrombosis / L.K. Jennings // The American Journal of Cardiology. – 2009. – Vol. 103 – № 3, Supplement – P. 4A-10A.
  129. Iwase, E. A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in

- relation to complications in patients with type II diabetes mellitus / E. Iwase, M. Tawata, K. Aida, Y. Ozaki, S. Kume, K. Satoh, R. Qi, T. Onaya // *Metabolism*. – 1998. – Vol. 47 – № 6 – P. 699–705.
130. Al-Tamimi, M. Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: a novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels. / M. Al-Tamimi, C.W. Tan, J. Qiao, G.J. Pennings, A. Javadzadegan, A.S.C. Yong, J.F. Arthur, A.K. Davis, J. Jing, F.-T. Mu, J.R. Hamilton, S.P. Jackson, A. Ludwig, M.C. Berndt, C.M. Ward, L. Kritharides, R.K. Andrews, E.E. Gardiner // *Blood*. – United States, 2012. – Vol. 119 – № 18 – P. 4311–4320.
131. Knuuti, J. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC) / J. Knuuti, W. Wijns, A. Saraste, D. Capodanno, E. Barbato, C. Funck-Brentano, E. Prescott, R.F. Storey, C. Deaton, T. Cuisset, S. Agewall, K. Dickstein, T. Edvardsen, J. Escaned, B.J. Gersh, P. Svitil, M. Gilard, D. Hasdai, R. Hatala, F. Mahfoud, J. Masip, C. Muneretto, M. Valgimigli, S. Achenbach, J.J. Bax, E.S.C.S.D. Group // *European Heart Journal*. – 2019. – Vol. 41 – № 3 – P. 407–477.
132. Collet, J.-P. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. / J.-P. Collet, H. Thiele, E. Barbato, O. Barthélémy, J. Bauersachs, D.L. Bhatt, P. Dendale, M. Dorobantu, T. Edvardsen, T. Folliguet, C.P. Gale, M. Gilard, A. Jobs, P. Jüni, E. Lambrinou, B.S. Lewis, J. Mehilli, E. Meliga, B. Merkely, C. Mueller, M. Roffi, F.H. Rutten, D. Sibbing, G.C.M. Siontis // *European heart journal*. – England, 2021. – Vol. 42 – № 14 – P. 1289–1367.
133. Trip, M.D. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. / M.D. Trip, V.M. Cats, F.J. van Capelle, J. Vreken // *The New England journal of medicine*. – United States, 1990. – Vol. 322 – № 22 – P. 1549–1554.
134. Ramanadham, S. Calcium-independent phospholipases A2 and their roles in

- biological processes and diseases / S. Ramanadham, T. Ali, J.W. Ashley, R.N. Bone, W.D. Hancock, X. Lei // *Journal of lipid research*. – 2015/05/28 – The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015. – Vol. 56 – № 9 – P. 1643–1668.
135. Stormont, G.D. Genetic causes and management of male infertility. / G.D. Stormont, C.M. Deibert // *Translational andrology and urology*. – China, 2021. – Vol. 10 – № 3 – P. 1365–1372.
136. Watts, J.C. Difficulty of establishing preoperative coagulation status / J.C. Watts, D. Joseph // *BJA*. – 2011. – Vol. 106 – № 4.
137. Veen, J.J. van Routine preoperative coagulation tests: an outdated practice? / J.J. van Veen, D.R. Spahn, M. Makris // *British Journal of Anaesthesia*. – Elsevier, 2011. – Vol. 106 – № 1 – P. 1–3.
138. Dützmänn, S. On the value of routine prothrombin time screening in elective neurosurgical procedures. / S. Dützmänn, F. Gessler, G. Marquardt, V. Seifert, C. Senft // *Neurosurgical focus*. – United States, 2012. – Vol. 33 – № 5 – P. E9.
139. Hooke R., J.T.A. “Direct Search” Solution of Numerical and Statistical Problems / J.T.A. Hooke R. // *J. ACM*. – 1961. – Vol. 8:212–229.
140. Zhu, X. Efficient parallel Levenberg-Marquardt model fitting towards real-time automated parametric imaging microscopy. / X. Zhu, D. Zhang // *PloS one*. – United States, 2013. – Vol. 8 – № 10 – P. e76665.
141. Filkova, A.A. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments / A.A. Filkova, A.A. Martyanov, A.K. Garzon Dasgupta, M.A. Pantelev, A.N. Sveshnikova // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9 – № 1 – P. 6217.
142. Filkova, A. Quantitative dynamics of reversible platelet aggregation: mathematical modelling and experiments / A. Filkova, A. Martyanov, A. Dasgupta, M. Pantelev, A. Sveshnikova // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9.
143. Garzon Dasgupta, A.K. Development of a Simple Kinetic Mathematical Model of Aggregation of Particles or Clustering of Receptors / A.K. Garzon Dasgupta, A.A. Martyanov, A.A. Filkova, M.A. Pantelev, A.N. Sveshnikova // *Life*. – 2020. –

Vol. 10 – № 6.

144. Vasilev, G.A. Study of Reversible Platelet Aggregation Model by Nonlinear Dynamics / G.A. Vasilev, A.A. Filkova, A.N. Sveshnikova // *Mathematics*. – 2021. – Vol. 9 – № 7.
145. Kennedy, J. Particle swarm optimization / J. Kennedy, R. Eberhart // *Proceedings of ICNN'95 - International Conference on Neural Networks*. – 1995. – Vol. 4 – P. 1942–1948 vol.4.
146. Smani, T. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. / T. Smani, S.I. Zakharov, P. Csutora, E. Leno, E.S. Trepakova, V.M. Bolotina // *Nature cell biology*. – England, 2004. – Vol. 6 – № 2 – P. 113–120.
147. Soltan-Alinejad, P. Therapeutic Potential of Bee and Scorpion Venom Phospholipase A2 (PLA2): A Narrative Review. / P. Soltan-Alinejad, H. Alipour, D. Meharabani, K. Azizi // *Iranian journal of medical sciences*. – Iran, 2022. – Vol. 47 – № 4 – P. 300–313.
148. Yoda, E. Group VIB calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 $\gamma$ ) regulates platelet activation, hemostasis and thrombosis in mice / E. Yoda, K. Rai, M. Ogawa, Y. Takakura, H. Kuwata, H. Suzuki, Y. Nakatani, M. Murakami, S. Hara // *PloS one*. – Public Library of Science, 2014. – Vol. 9 – № 10 – P. e109409–e109409.
149. Smani, T. Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 is a novel determinant of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. / T. Smani, S.I. Zakharov, E. Leno, P. Csutora, E.S. Trepakova, V.M. Bolotina // *The Journal of biological chemistry*. – United States, 2003. – Vol. 278 – № 14 – P. 11909–11915.
150. Enouf, J. The platelet Ca<sup>2+</sup> transport ATPase system / J. Enouf, R. Bobe, C. Lacabartz-Porret, R. Bredoux, E. Corvazier, T. Kovacs, B. Papp // *Platelets*. – Taylor & Francis, 1997. – Vol. 8 – № 1 – P. 5–14.
151. Schror, K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. / K. Schror // *Seminars in thrombosis and hemostasis*. – United States, 1997. – Vol. 23 – № 4 – P. 349–356.
152. Cho, M.J. The roles of alpha IIb beta 3-mediated outside-in signal transduction,

- thromboxane A<sub>2</sub>, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. / M.J. Cho, J. Liu, T.I. Pestina, S.A. Steward, D.W. Thomas, T.M. Coffman, D. Wang, C.W. Jackson, T.K. Gartner // *Blood*. – United States, 2003. – Vol. 101 – № 7 – P. 2646–2651.
153. Durrant, T.N. Integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$  outside-in signaling / T.N. Durrant, M.T. van den Bosch, I. Hers // *Blood*. – 2017/08/09 – American Society of Hematology, 2017. – Vol. 130 – № 14 – P. 1607–1619.
154. Cummings, B.S. Role of an endoplasmic reticulum Ca(2+)-independent phospholipase A(2) in oxidant-induced renal cell death. / B.S. Cummings, J. McHowat, R.G. Schnellmann // *American journal of physiology. Renal physiology*. – United States, 2002. – Vol. 283 – № 3 – P. F492-8.
155. Rhodes, N.P. Plasma recalcification as a measure of contact phase activation and heparinization efficacy after contact with biomaterials. / N.P. Rhodes, D.F. Williams // *Biomaterials*. – Netherlands, 1994. – Vol. 15 – № 1 – P. 35–37.
156. Valgimigli, M. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European / M. Valgimigli, H. Bueno, R.A. Byrne, J.-P. Collet, F. Costa, A. Jeppsson, P. Jüni, A. Kastrati, P. Kolh, L. Mauri, G. Montalescot, F.-J. Neumann, M. Petricevic, M. Roffi, P.G. Steg, S. Windecker, J.L. Zamorano, G.N. Levine, E.S.C.S.D. Group, E.S.C.C. for Practice Guidelines (CPG), E.S.C.N.C. Societies // *European Heart Journal*. – 2017. – Vol. 39 – № 3 – P. 213–260.
157. Zygouris, D. Total laparoscopic hysterectomy without uterine manipulator. A retrospective study of 1023 cases. / D. Zygouris, N. Chalvatzas, A. Gkoutzioulis, G. Anastasiou, A. Kavallaris // *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. – Ireland, 2020. – Vol. 253 – P. 254–258.
158. Wolf, M.J. Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization. / M.J. Wolf, J. Wang, J. Turk, R.W. Gross // *The*

- Journal of biological chemistry. – United States, 1997. – Vol. 272 – № 3 – P. 1522–1526.
159. Clark, J.D. Cytosolic phospholipase A2. / J.D. Clark, A.R. Schievella, E.A. Nalefski, L.L. Lin // Journal of lipid mediators and cell signalling. – Netherlands, 1995. – Vol. 12 – № 2–3 – P. 83–117.
160. Kramer, R.M. Differential Activation of Cytosolic Phospholipase A2 (cPLA2) by Thrombin and Thrombin Receptor Agonist Peptide in Human Platelets. EVIDENCE FOR ACTIVATION OF cPLA2 INDEPENDENT OF THE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES ERK1/2 \* / R.M. Kramer, E.F. Roberts, P.A. Hyslop, B.G. Utterback, K.Y. Hui, J.A. Jakubowski // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270 – № 24 – P. 14816–14823.