

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

*На правах рукописи*

**МЕЛЬНИКОВА Евгения Александровна**  
**РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ МОДЕЛИ**  
**ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО**  
**ПРИМЕНЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕОМЕТРИИ АКТИВАТОРА**  
**НА ПРОЦЕССЫ ТРОМБООБРАЗОВАНИЯ**

1.5.2. - Биофизика

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный                    руководитель:**  
доктор    физико-математических  
наук, член-корреспондент РАН  
Пантелеев Михаил Александрович

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Роль и основные механизмы гемостаза .....	12
1.2 Тромбоцитарный гемостаз.....	13
1.3 Применение микрофлюидных систем для решения фундаментальных и прикладных задач.....	22
1.4 Выбор параметров микрофлюидной системы .....	29
1.5 Субэндотелиальный матрикс.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	41
2.1. Обработка и подготовка данных .....	41
2.2. Методы исследования .....	42
2.2.1 Микрофлюидная модель образования тромба.....	42
2.2.2 Взятие крови .....	44
2.2.3 Микрофлюидные эксперименты .....	44
2.3. Инновации и решение проблем.....	47
2.4. Критическая оценка результатов.....	48
2.5. Достоверность результатов .....	48
ГЛАВА 3. СОЗДАНИЕ МИКРОФЛЮИДНОГО ТЕСТА ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА .....	50
3. 1 Конфигурация системы.....	50
3.2 Выбор антикоагулянта .....	50
3.3 Выбор скорости сдвига .....	52
3.4 Оптимизация системы .....	53
3.5 Оценка воспроизводимости теста .....	55
3.6 Исследование чувствительности теста к гемостатическим нарушениям .	58
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА В МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЕ НА ДИНАМИКУ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОВ .....	62
4.1 Сравнение тромбогенности коллагеновых волокон разной ориентации в условиях потока .....	62
4.2. Исследование первичной адгезии тромбоцитов к коллагену при высокой скорости сдвига .....	69

4.3 Исследование взаимодействия тромбоцитов с фактором фон Виллебранда и его распределения на коллагеновых волокнах .....	74
4.4 Исследование динамики взаимодействия тромбоцитов с активатором и анализ гипотез о наблюдаемых различиях .....	78
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	82
5.1 Итоги выполнения диссертационной работы .....	83
5.2 Перспективы дальнейшей разработки темы .....	86
ВЫВОДЫ .....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность исследования**

Изучение механизмов формирования тромбов и тромбоцитарного звена гемостаза в частности представляют собой важную и актуальную область биомедицинских исследований [1]. Процессы активации, адгезии и агрегации тромбоцитов имеют решающее значение для предотвращения кровотечений при повреждениях сосудов, особенно при высоких скоростях сдвига [2]. Критически важным этапом является взаимодействие тромбоцитов с компонентами внеклеточного матрикса, в частности с коллагеном, который инициирует эти процессы [3]. Исследования, направленные на понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимодействия тромбоцитов с коллагеном, имеют большое значение как для фундаментальных знаний о гемостазе, так и для разработки новых диагностических и терапевтических подходов для нарушений, связанных с патологическим тромбообразованием и кровотечениями.

Представленная работа посвящена созданию интегрального клинического теста для оценки состояния тромбоцитарного звена гемостаза. Эта задача является важной и актуальной, так как на данный момент существует множество тестов функции плазменного свертывания, однако работа тромбоцитарного звена оценивается лишь косвенно и не учитывает влияние потока на процесс образования тромбов, что критически важно для тромбоцитарного звена гемостаза. Также представленная работа направлена на изучение начальных этапов образования тромбов, а именно первичной адгезии тромбоцитов к коллагену субэндотелиального матрикса и влияния ориентации коллагеновых волокон на этот процесс на базе разработанной модели. Этот аспект тромбообразования критически важен для создания и физиологически релевантных тестов микрофлюидных тестов и анализа результатов, так как начальные стадии первичного гемостаза определяют динамику формирования тромбов, в особенности на высоких скоростях сдвига.

Полученные данные обеспечивают более глубокое понимание механизмов первичного гемостаза, взаимодействия тромбоцитов с субэндотелиальным матриксом и того, какие факторы являются решающими для образования тромбов *in vivo* и *in vitro*.

### **Степень разработанности темы**

Широко применяемые в клинической практике тесты в основном сосредоточены на оценке функции отдельных элементов системы гемостаза, таких как количество и активность отдельных факторов или рецепторов, а также активации свертывания “в пробирке” [4]. Однако, реалистичная оценка состояния всей системы невозможна без учета потока [5]. Такие тесты появляются в клинической практике, но пока им недостает стандартизации, адекватных физиологическим реологическим параметрам и геометрии активатора, а также клинически ясной интерпретации результатов.

Известно, что волокна коллагена в стенках сосудов, в особенности артерий и артериол, имеют преимущественную ориентацию. Также известно, что в областях субэндотелиального матрикса, близких к просвету сосуда, содержится большое количество коллагена III типа. Однако роль этих факторов в тромбообразовании на данный момент не изучена. Также, ориентация фибрилл коллагена в микрофлюидных системах, как правило, не соответствует физиологической и редко учитывается при создании моделей тромбоза и анализе результатов, полученных с их помощью.

### **Цель исследования**

Разработка и характеристика экспериментальной микрофлюидной системы тестирования тромбоцитарного гемостаза с артериальными реологическими параметрами и пространственно ограниченным активатором из поперечно ориентированных фибрилл коллагена.

### **Задачи исследования**

1. Оптимизация параметров экспериментальной микрофлюидной системы для создания интегрального теста тромбоцитарного гемостаза;

2. Характеризация метода на образцах здоровых доноров, анализ воспроизводимости результатов и валидация при помощи оценки первичного гемостаза пациентов с иммунной тромбоцитопенической пурпурой и синдромом Вискотта-Олдрича;

3. Анализ влияния ориентации коллагеновых волокон на рост тромбов при различных скоростях сдвига при помощи разработанной экспериментальной системы;

4. Исследование динамики начальных этапов адгезии отдельных тромбоцитов к ориентированным коллагеновым волокнам;

5. Исследование взаимодействия фактора фон Виллебранда с коллагеном и его роли в адгезии тромбоцитов при высоких скоростях сдвига.

### **Научная новизна**

Несмотря на большое число существующих гемостатических тестов, в клинической практике до сих пор отсутствует стандартный инструмент для интегральной оценки первичного гемостаза. Современные методики зачастую не воспроизводят реологических условий кровотока, работают с отдельными компонентами крови и используют сложные, лабораторно-специфичные параметры, не имеющие четкого физического смысла. В отличие от них, разработанная система позволяет использовать цельную кровь, точно контролировать параметры потока, а также изучать динамику формирования тромбов в реальном времени в условиях, максимально приближенных к *in vivo*. Кроме того, в разработанной системе используется локализованная зона с активатором, что делает ее более физиологичной и надежной. Также важным преимуществом метода перед некоторыми проточными системами является использование малого объема крови, что особенно важно для клинического применения. Полученные результаты демонстрируют высокую чувствительность системы к нарушениям функции тромбоцитарного звена гемостаза и указывают на ее перспективность для внедрения в медицинскую практику.

При помощи разработанной системы впервые продемонстрировано влияние ориентации фибрилл коллагена на формирование тромбов и изучен механизм этого явления. Показано, что при высокой скорости сдвига сонаправленные с потоком коллагеновые волокна обеспечивают достаточно продолжительный контакт с активатором, что позволяет тромбоцитам, взаимодействующим с фактором фон Виллебранда, стабильно закрепиться и инициировать образование тромбов. Также впервые показано, что в микрофлюидных системах с коллагеном I типа тромбогенность на высоких скоростях сдвига обеспечивается примесью коллагена III типа, что существенно влияет на интерпретацию многих результатов, полученных таким образом. Представленная диссертация иллюстрирует важность состава и ориентации коллагеновых волокон для тромбообразования и при разработке тест-систем, а также открывает новые перспективы для исследования роли субэндотелиального матрикса в норме и патологии.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Создание стандартизированной микрофлюидной модели тромбоза и внедрение ее в клиническую практику открывает широкие перспективы для исследования фундаментальных проблем гемостаза, его механизмов и особенностей не только при помощи варьирования параметров, применения ингибиторов etc., но и анализа результатов больших выборок пациентов с различными гемостатическими нарушениями в условиях, максимально близких к физиологическим с точки зрения реологии, геометрии канала и активатора. Практическая значимость заключается в создании инструмента, позволяющего проводить интегральную оценку состояния первичного гемостаза у широких групп пациентов с высокой скоростью и эффективностью, используя малый объем крови, наблюдать и анализировать рост тромбов в реальном времени, а также оценивать риски тромбозов и кровотечений. Так, полученные результаты свидетельствуют о том, что для пациентов с иммунной тромбоцитопенией (ИТП), данный тест позволяет оценивать состояние тромбоцитарного звена гемостаза значительно

лучше, чем число тромбоцитов или результаты стандартного цитофлуориметрического анализа функциональной активности тромбоцитов.

Теоретическая значимость исследования влияния ориентации волокон коллагена на формирование тромбов заключается в углублении понимания того, как происходит первичная адгезия тромбоцитов, за счет каких механизмов могут образовываться патологические тромбы *in vivo*, а также физиологического смысла ориентированности фибрилл коллагена в стенках сосудов. Полученные результаты показали, что при высоких скоростях сдвига сонаправленные с потоком фибриллы коллагена куда более тромбогенны, чем волокна других ориентаций, а также то, что адгезию тромбоцитов к поверхности обеспечивают фибриллы коллагена III типа, присутствующие, как правило, в виде примеси в стандартных и широко используемых активаторах. Это наблюдение позволяет предположить, что аксиальная ориентация коллагеновых фибрилл, а также высокое содержание волокон III типа в субэндотелиальном матриксе необходимы для обеспечения эффективного роста тромбов даже при высоких скоростях сдвига. На практике результаты представленной работы важны для создания реалистичных микрофлюидных моделей тромбообразования в условиях потока для фундаментальных и клинических приложений.

### **Методология и методы исследования**

Методика, использованная в этом исследовании, включает комбинацию экспериментов *in vitro* с использованием цельной крови человека, микрофлюидных подходов для иммобилизации коллагена и воссоздания реологических условий сосуда *in vitro*, флуоресцентной, в том числе высокоскоростной микроскопии для отслеживания формирования тромбов и движения отдельных тромбоцитов, а также метода иммунофлуоресцентного окрашивания. Также в ходе работы использовались стандартные методы анализа изображений и статистические подходы. Эти методы позволяют всесторонне исследовать формирование тромбов в норме и патологии, адгезию тромбоцитов, роль фактора фон Виллебранда и

ориентации коллагеновых волокон в процессах адгезии и агрегации тромбоцитов в условиях контролируемого потока крови.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработана микрофлюидная система для оценки состояния тромбоцитарного звена гемостаза. Система обладает чувствительностью к гемостатическим нарушениям, связанным с первичным гемостазом, и позволяет оценивать тяжесть состояния пациентов с ИТП.

2. Выявлена зависимость параметров тромбообразования от ориентации фибрилл коллагена и скорости сдвига. До  $1000 \text{ с}^{-1}$  различия между ориентациями незначительны, но при  $2000 \text{ с}^{-1}$  площадь покрытия резко снижается на фибриллах, перпендикулярных потоку. Для высоты тромбов различия также усиливаются с ростом скорости в пользу сонаправленных с потоком фибрилл.

3. Показано, что различия обусловлены первичной адгезией тромбоцитов при высоких скоростях сдвига. Кинематический анализ продемонстрировал, что устойчивость адгезии зависит от длительности контакта тромбоцита с фактором фон Виллебранда и коллагеном. Продольные фибриллы обеспечивают более длительный контакт при перемещении клеток под действием потока, что объясняет их повышенную тромбогенность.

4. Установлено, что в стандартных препаратах коллагена I типа тромбоцитарная адгезия наблюдается лишь на части фибрилл, представляющих собой примесь коллагена III типа. Именно на них происходит накопление плазменного фактора фон Виллебранда, обеспечивающего адгезию при высоких скоростях сдвига. Это ставит под сомнение данные, накопленные на коллагене I типа, и подчеркивает физиологическую значимость состава сосудистой стенки.

### **Внедрение результатов работы**

Разработанная система внедрена в практику лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева». Данная методика успешно применяется для оценки состояния тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с иммунной тромбоцитопенией, синдромом Вискотта-Олдрича и др.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Надежность полученных результатов строго контролировалась начиная от первых этапов - соответствия образцов крови высоким требованиям к преаналитике, а проводимых экспериментов - подробному протоколу, учитывающему рекомендации ведущих специалистов в области, и вплоть до статистического анализа данных, воспроизводимости экспериментов и проверки результатов на соответствие литературным данным и, в случае пациентов, клиническим заключениям экспертов. Статистический анализ данных проводился с использованием критерия Манна-Уитни, причем достоверным отличием считалась статистическая значимость на уровне не более 0.05, и практически для всех результатов значение  $p$  менее 0.01. Это обеспечило надежность и достоверность выводов, сделанных в результате данного исследования.

Апробация диссертации проведена на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН, протокол № 9 от 16.09.2025 г.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (22-26 июня 2024, г. Бангкок, Таиланд) (2 постера), на международном семинаре Медицинской школы Перельмана Университета Пенсильвании 26 апреля 2023 (доклад), конференции “Системная биология и системная физиология: внутриклеточная сигнализация и регуляция метаболизма” (2-4 декабря 2022, г. Москва, Россия) (постер), (9-11 июня 2025, г. Москва Россия) (доклад).

### **Публикация результатов исследования**

По теме диссертационного исследования опубликовано 6 работ, в том числе 1 статья в российском рецензируемом научном издании, рекомендованном ВАК при Минобрнауки России для публикации результатов диссертационных исследований, 1 статья в международном издании Q1 и 4 тезисов в сборниках трудов международных научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, раздела материалов и методов, результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы включает в себя 3 отечественных и 129 зарубежных библиографических источников. Текст диссертационной работы проиллюстрирован 24 рисунками.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Роль и основные механизмы гемостаза

На сегодняшний день изучение молекулярных механизмов, регулирующих гемостаз в норме и патологии, остается чрезвычайно острой фундаментальной задачей физиологии. Несмотря на многие десятилетия исследований, осложнения, вызванные нарушениями в работе системы гемостаза - кровотечения и тромбозы - остаются ведущими причинами смертности и инвалидности во всем мире [1; 2].

Основная функция системы гемостаза — быстрая остановка кровотечения при повреждении сосудистой стенки. Центральную роль в решении этой задачи играют специфические взаимодействия молекулярных и клеточных компонентов крови с белками субэндотелиального матрикса [3; 4]. Остановка кровотечения происходит за счет работы двух систем - плазменного и тромбоцитарного гемостаза. Тромбоцитарный гемостаз, как правило, относят к первичному; плазменный - ко вторичному [2]. Как следует из названия, задача тромбоцитарного звена в случае повреждения - быстрая остановка кровопотери при помощи тромбоцитарных агрегатов, которая особенно важна в случае больших ран и высоких скоростей потока [10]. В соответствии с классическими представлениями, плазменный гемостаз, в свою очередь, работает более медленно и только при низких скоростях сдвига - в застойных зонах или внутри тромбоцитарного агрегата, но обеспечивает высокую прочность и стабильность тромба [11; 5].

Тромбин является ключевым плазменным ферментом системы гемостаза, выполняющим множество биологически важных функций, таких как активация тромбоцитов и преобразование фибриногена в фибриновую сеть. Генерация тромбина в местах повреждения сосудов является результатом серии реакций вторичного гемостаза [12]. Он запускается на поверхностях при повреждении сосуда в результате воздействия тканевого фактора на кровь.

Тканевой фактор представляет собой мембранный белок, в больших количествах присутствующий в клетках сосудистой стенки. Его связывание с циркулирующим в крови фактором VII запускает свертывание путем преобразования факторов IX и X в их активные формы (IXa и Xa) [13]. Усиление

процесса достигается за счет активации связанного фактора VII факторами VIIa, IXa и Xa. Факторы IXa и Xa могут оставаться связанными с поверхностью, несущей тканевой фактор, а могут диффундировать в кровь и взаимодействовать с поверхностью близлежащих активированных тромбоцитов, которые образуют первичный тромбоцитарный агрегат [4].

В настоящий момент применяется большое количество тестов для оценки эффективности работы плазменного звена гемостаза, некоторые из которых позволяют получить достаточно ясное представление о состоянии системы в целом [14]. Однако для тромбоцитарного звена, ввиду его сложности, чувствительности к внешним факторам и зависимости от потока, таких тестов мало, они достаточно далеки от *in vivo*, не позволяют непосредственно наблюдать формирование тромбов, и, как правило, используют специфичные выходные параметры, не имеющие прямого физиологического смысла [6; 7]. В связи с этим, настоящая работа посвящена исследованию именно тромбоцитарного звена гемостаза.

## 1.2 Тромбоцитарный гемостаз

Тромбоциты - безъядерные клеточные фрагменты, диаметром 2–4 мкм. Их концентрация в крови в среднем составляет 200–400 тысяч на мкл [15]. Основная задача тромбоцитов - перекрытие места повреждения сосуда для остановки кровотечения. В крови они циркулируют в дискоидной форме, однако, активируясь, формируют филоподии и ламеллоподии [16].

Благодаря способности активироваться, меняя свою форму, и связываться белками внеклеточного матрикса, так и друг с другом, тромбоциты способны создавать крупные и достаточно стабильные агрегаты для перекрытия тока крови. К активации тромбоцитов приводит множество воздействий - от механического и температурного до целого ряда биохимических.

Основными этапами формирования тромбоцитарного тромба считаются: 1. первичное прикрепление; 2. адгезия; 3. активация; 4. агрегация [17].

Первый этап происходит благодаря взаимодействию тромбоцитов с обнаженным эндотелиальным матриксом и/или активированным эндотелием [18].

Этот биомеханический этап первичного гемостаза, взаимодействие между тромбоцитами и компонентами сосудистой стенки, в настоящее время рассматривается как ключевое событие, инициирующее образование тромбоцитарных агрегатов [19; 20]. Процесс первичной адгезии осуществляется за счет нескольких рецепторов на поверхности тромбоцита. Поскольку связь между рецептором и лигандом должна образоваться, пока эти молекулы находятся на достаточно малом для взаимодействия расстоянии, вклад разных рецепторов в первичное прикрепление тромбоцитов к стенке сосуда зависит от скорости их движения и определяющей ее сдвиговой скорости потока [21].

Активация тромбоцита, опосредованная агонистами - коллагеном, АДФ, тромбином, тромбоксаном A<sub>2</sub> и др., происходит благодаря активации одной из изоформ фосфолипазы C (PLC), экспрессируемой в тромбоцитах, в результате активации G-белковых рецепторов в ответ на АДФ, АТФ, тромбин, тромбоксан и др., либо благодаря рецептору GPVI, который инициирует активацию фосфолипазы через Syk-зависимый сигнальный каскад. PLC, в свою очередь, гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP<sub>2</sub>), что приводит к появлению инозитол-1,4,5-трифосфата (IP<sub>3</sub>), вторичного мессенджера, приводящего к выходу ионов Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо и повышению его цитозольной концентрации [9], а также к синтезу диацилглицерола (DAG) [22]. Оба события ведут к активации интегринов - внутриклеточный кальций и DAG связываются с CalDAG-GEFI, которая, в свою очередь, активирует Rap1 и Rap2 - ключевые регуляторы активации интегринов в тромбоцитах [23]. Также PLC является ключевым фактором для активации протеинкиназы C (PKC), приводящей как к выбросу гранул, так и дополнительной активации интегринов [24; 25] (рисунок 1).

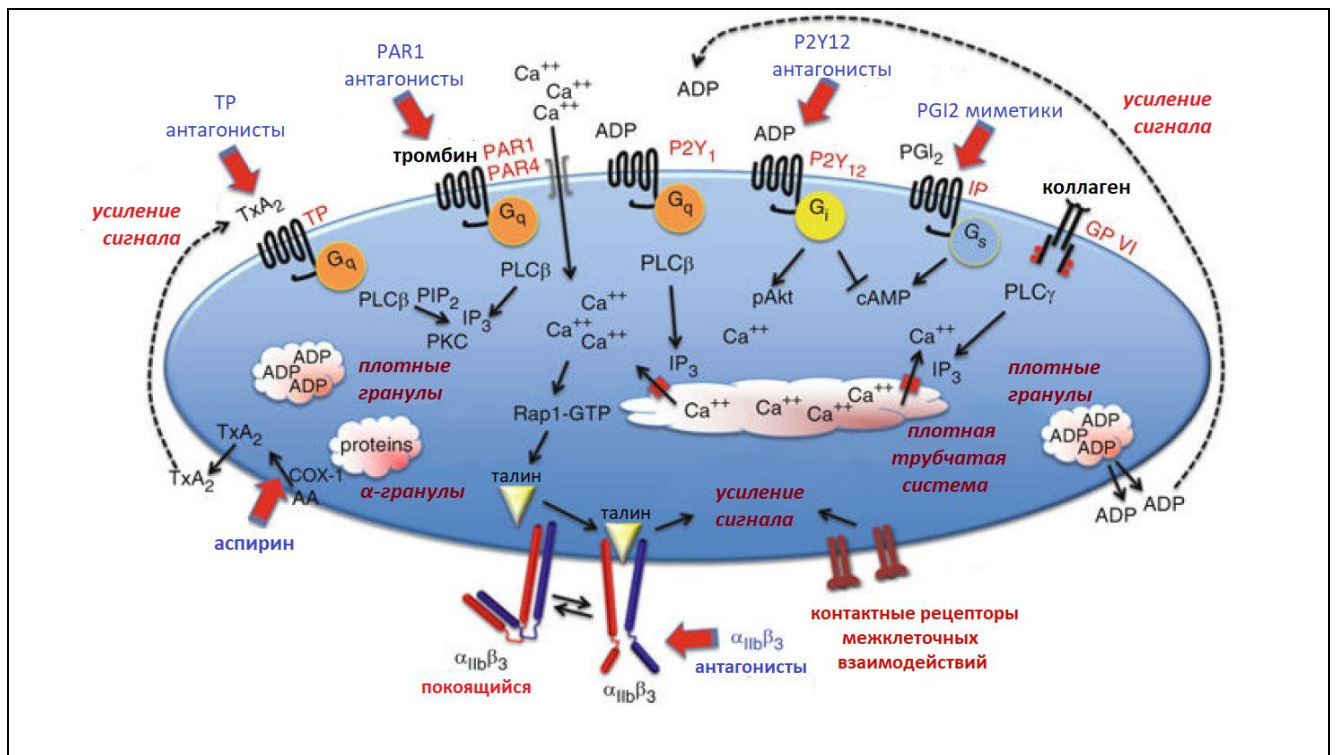


Рисунок 1 - Основные сигнальные пути, участвующие в активации тромбоцита. На мембране схематично изображены рецепторы. В случае G-белковых рецепторов и GPVI (сверху) названия указаны рядом красным, агонисты - черным. Синим обозначены клинически релевантные антагонисты. Снизу на мембране отображены прочие сигнальные пути. Пунктирные стрелки указывают пути обратной связи. Внутри схематично отображены основные сигнальные каскады и их основные мессенджеры. PLC, фосфолипаза C; PKC, протеинкиназа C; IP<sub>3</sub>, инозитол-1,4,5-трифосфат; TxA<sub>2</sub>, тромбоксан A<sub>2</sub>; GP, гликопротеин; IP и TP, рецепторы PGI<sub>2</sub> и TxA<sub>2</sub>. Адаптировано из [14].

Считается, что одним из основных механизмов инициации тромбообразования *in vivo* является взаимодействие тромбоцитов с коллагеном. Коллаген - это фибриллярный белок, образованный конструкциями из мономеров тропоколлагена; каждая представляет собой правую спираль длиной 300 нм с диаметром поперечного сечения 1,5 нм, состоящую из трех левосторонних спиральных полипептидов -  $\alpha$ -цепей коллагена. Альфа цепи, в свою очередь, состоят из аминокислотных последовательностей вида GXY, где G - глицин, а X и Y, как правило, пролин (P) и гидроксипролин (O), хотя на этих местах могут находиться и другие аминокислоты (рисунок 2). Получающаяся таким образом последовательность GPO составляет около 10% структуры коллагенов I и III типов [26]. Тропоколлаген может быть гомотримерным, как в коллагене III типа, состоящем из трех  $\alpha 1$  цепей, или гетеротримером, как в коллагене I, состоящем из

двух  $\alpha 1$  и одной  $\alpha 2$  цепей. Комплексы из пяти молекул тропоколлагена упакованы бок о бок в псевдогексагональном положении, образуя правые микрофибриллы [27].

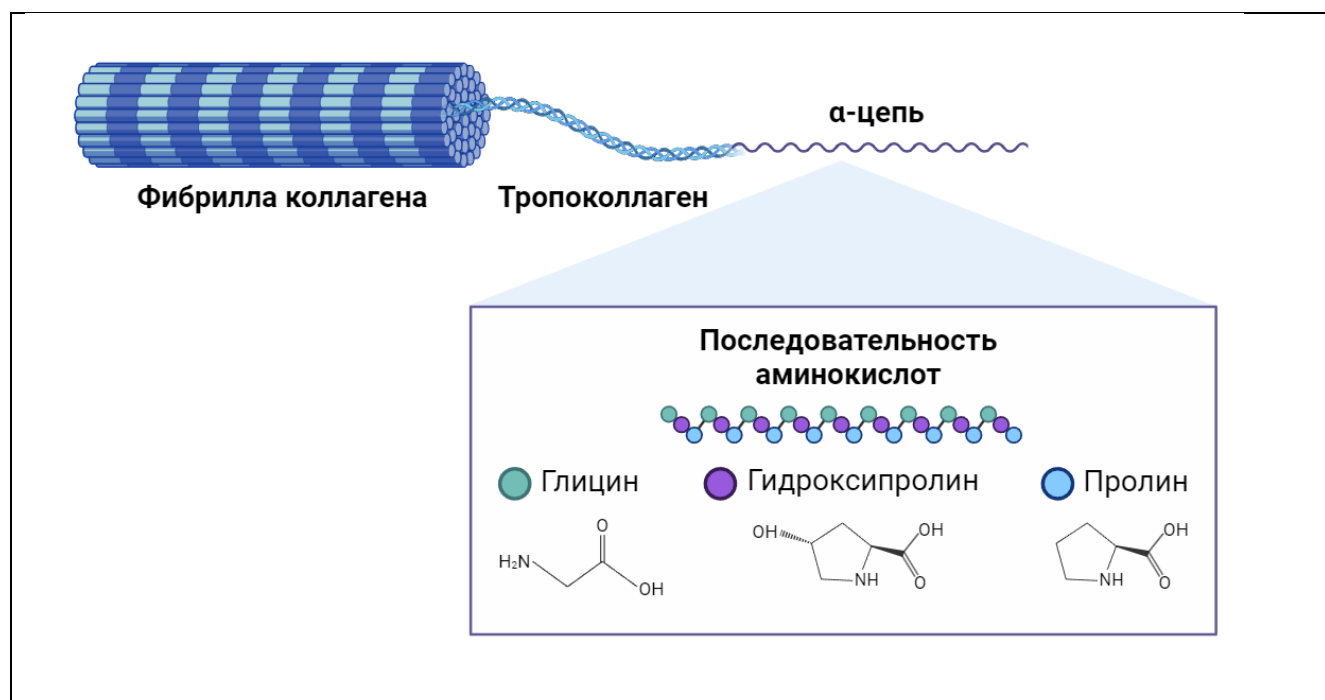


Рисунок 2 - Схематичное изображение структуры коллагена. Указан пример аминокислотной последовательности. Наиболее типичными для фибриллярных коллагенов являются последовательности глицин-пролин-Х и глицин-Х-гидроксипролин, где вместо Х может находиться любая другая аминокислота.

Выделяется более 20 типов коллагена, основными фибриллярными из которых являются I, II, III и V типы [27]. В сосудах коллаген в основном производится клетками гладких мышц, но также эндотелием, фибробластами и макрофагами. Среди коллагенов наиболее распространен коллаген I типа. К примеру, в сухожилиях на его долю приходится около 95% коллагеновых волокон, оставшиеся 5% делят между собой III и V типы [28]. Для стенок сосудов также характерно большое количество коллагена I типа [29] и III типов, с примесью V. Как правило, фибрилл I типа больше во внешней части сосуда, а ближе к просвету доля III типа увеличивается [30]. Считается, что волокна I типа отвечают за растяжение и сопротивление механическим нагрузкам, а III - за эластичность. Чем выше содержание фибрилл III типа, тем гибче сосуд - в связи с этим процентное соотношение волокон разных типов отличается для различных сосудов [106]. Коллаген экспонируется при повреждении стенки сосуда, и, взаимодействуя с

белками на поверхности тромбоцитов, приводит к их активации и, как следствие, формированию тромба.

На поверхности тромбоцита находится несколько коллаген-связывающих белков. На низкой скорости сдвига (менее  $1000 \text{ c}^{-1}$ ) основным рецептором для первичного взаимодействия с коллагеном является гликопротеин VI (GPVI). Этот белок состоит из 319 аминокислот и их остатков и имеет сигнальную часть из 20 аминокислот. Молекулярный вес данного рецептора - 62 кДа. GPVI относится к семейству парных иммуноглобулин подобных рецепторов. [31]. Мембрана тромбоцита несет в среднем 4-6 тысяч этих белков. При активации тромбоцита происходит кластеризация рецепторов, что позволяет увеличить эффективность их взаимодействия с лигандом. Сайтом связывания для GPVI на коллагене является участок, состоящий из двух коллагеновых цепей, ядро которого образовано мотивом OGPOGP. Считается, что максимальная эффективность активации достигается при связывании двух молекул GPVI с последовательностью  $(\text{GPO})_5$  [32]. Запуск внутриклеточной сигнализации в ответ на связывание GPVI с коллагеном приводит к активации интегринов и их последующей кластеризации, что, в свою очередь, усиливает сигнал, создавая петлю положительной обратной связи [33; 34]. Сигнальный путь, запускаемый в ответ на связывание GPVI с коллагеном проходит через активацию рецептора FcR, тирозинкиназы Syk и фосфолипазы  $\text{C}\gamma$  ( $\text{PLC}\gamma 2$ ), что приводит к повышению внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и активации интегринов (рисунок 3) [31].



На тромбоците находятся рецепторы GPIb-V-IX, которые взаимодействуют с ФВ [39]. Современная модель адгезии тромбоцитов к коллагену предполагает, что взаимодействие GPIb с ФВ необходимо для начального обратимого закрепления тромбоцитов, поскольку при высоких скоростях сдвига мгновенная его остановка потребовала бы развития высокого механического напряжения и могла бы привести к повреждению мембраны клетки. Существует мнение, что множество последовательных обратимых связываний GPIb с ФВ позволяет постепенно уменьшать скорость тромбоцита [15; 40] и плавно останавливать его. Также остановку тромбоцита без повреждения клетки можно объяснить рядом демпфирующих механизмов, реализующихся в рамках одной связи GPIb с A1 доменом ФВ: разворачиванием самого фактора Виллебранда, удлинением GPIb, а также подвижностью мембраны тромбоцита [41].

Существует еще один механизм, обеспечивающий успешную адгезию тромбоцитов при высоких скоростях потока. ФВ представляет собой белок, циркулирующий в плазме в виде мультимеров разной длины, причем выделяется фракция крупных мультимеров (порядка 20 - 40 димеров), которая играют важную роль в процессах гемостаза. Такие мультимеры в развернутом состоянии могут достигать длины ~5 мкм. Эндотелий синтезирует еще более крупные мультимеры, которые в развернутом виде могут достигать 100 мкм [42], однако в плазме разрезаются на более короткие и значительно менее тромбогенные металлопротеиназой ADAMTS13. Глобулы ФВ могут разворачиваются под воздействием потока [43; 44; 45], причем чем выше скорость сдвига, тем сильнее разворачиваются мультимеры, что, в свою очередь, улучшает адгезию тромбоцитов [46]. Более того, при очень высоких скоростях сдвига (более  $5000\text{с}^{-1}$ ) в молекуле ФВ могут происходить конформационные изменения, резко улучшающие его адгезионные свойства [47]. Таким образом, с одной стороны, высокие скорости сдвига усложняют стабильное прикрепление тромбоцитов, а с другой - увеличивают скорость их сдвиговой диффузии к поверхности тромба и способствуют лучшему связыванию с ФВ. Поэтому динамика роста тромбов сложным образом зависит от скоростей потока как *in vitro* [48], так и *in vivo* [49].

Взаимодействие с ФВ замедляет тромбоциты и позволяет им катиться вдоль стенки сосуда, что, в свою очередь дает возможность связываться с белками на ее поверхности через другие рецепторы. Также есть данные о том, что взаимодействие GPIIb с ФВ может запускать внутриклеточную сигнализацию в тромбоцитах [50], однако, не приводя к необратимой активации, так как при катении тромбоцитов по ФВ не наблюдается ни стабильной адгезии, ни образования агрегатов [51]. Этот факт хорошо иллюстрирует характер движения тромбоцитов по ФВ - прерывистое, с остановками и “прыжками” на расстояния больше размера клетки [52]. По опубликованным данным, при скорости сдвига  $2000\text{с}^{-1}$  для тромбоцитов, взаимодействующих с ФВ, характерны скорости порядка  $10\text{ мкм/с}$  и остановки на среднее время порядка  $40\text{ мс}$  (рисунок 4, [52]).

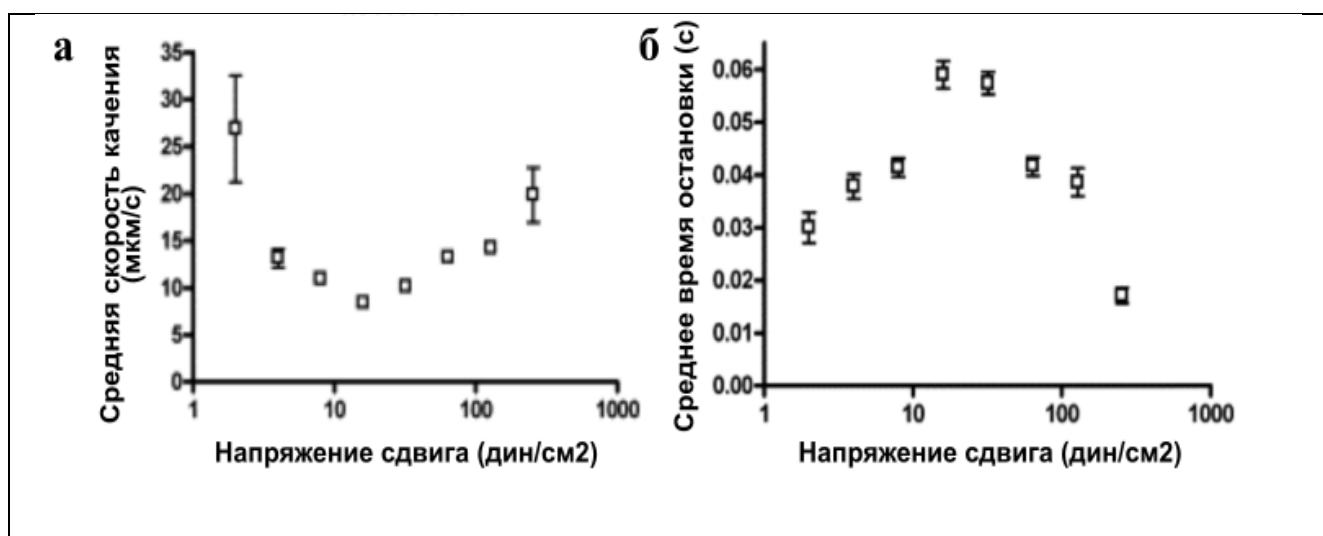


Рисунок 4 - Характеристики движения тромбоцитов при взаимодействии с иммобилизованным A1 доменом фактора фон Виллебранда. Адаптировано из [52].

а. Средняя скорость, зависимость от напряжения сдвига.

б. Среднее время остановки, зависимость от напряжения сдвига.

Сниженная скорость и возможная слабая активация тромбоцита упрощает взаимодействие рецепторов, в особенности GPVI, с их лигандами [36; 53], что приводит к активации интегринов и прочному закреплению тромбоцита. По разным данным для активации тромбоцита через GPVI требуется 10-60 секунд [54; 55].

Важную роль в стабилизации связи тромбоцита с коллагеном играет интегрин  $\alpha 2\beta 1$  (гликопротеин GPIa-IIa). Он присутствует на мембране тромбоцита

в количестве 2-4 тысяч единиц и осуществляет прочное закрепление тромбоцитов после их активации через GPVI [19]. Сайтом связывания на коллагене для него служат последовательности типа GXXGER, самой высокоаффинной из которых является GFOGER, характерная для коллагенов I, II и IV типов - с ней интегрин  $\alpha 2\beta 1$  способен связываться даже в состоянии покоя, хотя и с меньшей аффинностью [56]. Связь  $\alpha 2\beta 1$  с коллагеном усиливается сигналами от GPVI и GPIIb-IX-V, в свою очередь увеличивая их эффективность за счет кластеризации рецепторов [34].

Следующая стадия - формирование тромбоцитарного агрегата - осуществляется также за счет интегринов. Интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  уникален для тромбоцитов и содержится на его мембране в количестве порядка 80 тысяч единиц. Это трансмембранный белок связывается в основном с фибриногеном и ФВ, распознавая последовательность Arg-Gly-Asp (RGD). Тромбоциты связываются между собой благодаря интегрину  $\alpha IIb\beta 3$  посредством так называемых “фибриногеновых мостиков”, а также ФВ. Взаимодействие  $\alpha IIb\beta 3$  с молекулами фибриногена (или ФВ), которые, в свою очередь, связываются с интегринными другими тромбоцитов, позволяет формировать крупные агрегаты, объединяющие множество клеток. Кроме того,  $\alpha IIb\beta 3$  также вносит вклад в упомянутую выше стабильную адгезию первого слоя тромбоцитов, связываясь с ФВ [53]. Также, связь тромбоцитов в агрегате может осуществляться через гликопротеин 1b (GPIIb-V-IX) посредством ФВ [15].

Доступ к коллагену есть только у тромбоцитов первого слоя, присоединившихся непосредственно к нему. Поэтому для активации всех последующих слоев необходимы растворимые активаторы, действующие в пределах тромба [57]. Эти активаторы могут секретироваться/синтезироваться уже активированными тромбоцитами (например, АДФ и тромбоксан A<sub>2</sub>), образовываться в процессе плазменного свертывания (тромбин), либо выделяться поврежденными клетками сосуда (АДФ, АТФ). В неактивированных тромбоцитах находятся альфа-гранулы, плотные гранулы и лизосомы [57]. В гранулах хранятся белковые молекулы (р-селектин, фибриноген, фактор V, ФВ и др. в альфа-

гранулах) и низкомолекулярные компоненты (АДФ, АТФ кальций, серотонин и др. в плотных гранулах), которые играют важную роль в межтромбоцитарных взаимодействиях, а также в работе плазменного звена гемостаза. После активации тромбоцита содержимое его гранул секретируется, вызывая активацию соседних клеток за счет соответствующих GPCR-рецепторов [2].

Несмотря на большой объем накопленных данных, некоторые этапы формирования тромба и их механизмы остаются загадкой для исследователей - например, остановка роста тромба, формирование структуры ядро-оболочка и др. Основная причина - отсутствие физиологичных моделей, позволяющих проводить контролируемые исследования в реальном времени. Существующие *in vivo* модели не позволяют тонко варьировать параметры, что необходимо для изучения механизмов наблюдаемых процессов. *In vitro* модели, в свою очередь, недостаточно близки к условиям в сосуде для адекватного воспроизведения динамики формирования тромба. Одной из причин может являться неучтенная в рамках стандартной проточной камеры роль субэндотелиального матрикса и его структуры в инициации формирования сгустка.

### **1.3 Применение микрофлюидных систем для решения фундаментальных и прикладных задач**

Исследование образования тромбов *in vitro* играет важную роль в области изучения гемостаза и тромбозов. Гемостаз - физиологический процесс, предотвращающий чрезмерное кровотечение при повреждении сосудов, и тромбоз - патологическое образование тромбов в кровеносных сосудах, оказывают существенное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы. Оба процесса в значительной степени включают активацию тромбоцитов, их агрегацию и образование тромбов. Таким образом, изучение этих процессов и роли тромбоцитов в них в контролируемых лабораторных условиях имеет первостепенное значение как для понимания их механизмов, так и для получения клинически важной информации.

Надежная оценка состояния системы гемостаза чрезвычайно важна для

самых разных пациентов, от младенцев до пожилых людей [58]. Стандартные коагулологические тесты предоставляют лишь ограниченную информацию о частях сложной системы, оставляя общую оценку и выводы на усмотрение и опыт медицинского персонала. Такой подход оставляет большое пространство для ошибок, поэтому требуется разработка интегральных тестов, способных максимально точно имитировать условия *in vivo* и напрямую оценивать состояние системы гемостаза. Такие системы должны быть относительно простыми в эксплуатации, использовать небольшое количество крови, позволять осуществлять точный контроль параметров модели и, самое главное, учитывать поток крови, поскольку он имеет решающее значение для многих процессов, определяющих гемостатическую реакцию в живом организме.

Это стало возможным в 1960-х годах с разработкой кольцевых, а затем и плоскопараллельных проточных камер [59]. С тех пор микрофлюидика стала мощным инструментом для изучения гемостаза и тромбоза, позволяя исследовать сложное взаимодействие между кровотоком, активацией тромбоцитов, свертыванием и фибринолизом в хорошо контролируемых и воспроизводимых условиях. Использование микрофлюидных камер для изучения гемостаза и тромбоза активно развивается в последние два десятилетия [60]. Развитие методов микрофабрикации, таких как мягкая литография и микроконтактная печать, позволило точно моделировать микроканалы и создавать микромасштабные структуры с высоким разрешением [61; 62]. Это позволило разработать проточные камеры, способные воспроизводить физиологические скорости сдвига и геометрию кровеносных сосудов, что облегчило исследование адгезии, активации и агрегации тромбоцитов, а также путей свертывания и фибринолиза. Это, в свою очередь, позволило лучше понять многие механизмы нарушений свертывания и тромбообразования [63; 64].

Существует несколько типов микрофлюидных проточных камер, используемых для изучения гемостаза и тромбоза, в том числе плоскопараллельные проточные камеры и микрофлюидные устройства с микроканалами различной формы и размера [65]. Они позволяют исследовать

специфические физиологические состояния, такие как стеноз или бифуркация сосудов, аневризмы и застойные зоны в клапанах вен, а также изучать зависимую от сдвига активацию и агрегацию тромбоцитов [66; 67].

Примером использования плоскопараллельных камер для исследования механизмов патологического гемостаза является работа [68]. Исследователи продемонстрировали способность бесклеточных гомогенатов человеческих атеросклеротических бляшек вызывать адгезию тромбоцитов и образование агрегатов при относительно высоких скоростях сдвига ( $1000 \text{ c}^{-1}$ ) в стандартной проточной камере. Использование микрофлюидного подхода позволило провести сравнительный анализ тромбогенности стандартных активаторов, таких как коллаген 1 типа, и содержимого атеросклеротических бляшек. Позднее было проведено еще более масштабное исследование, в котором анализировалось тромбообразование, индуцируемое в проточных камерах на более чем 50 различных активаторах и их комбинациях, нанесенных при помощи микропечати (рисунок 5, в) [69].

Классическим примером применения микрофлюидных систем для изучения плазменного звена гемостаза является модель, разработанная командой К. Нивса на основе стандартных плоскопараллельных камер [70]. Она представляет собой микрофлюидную систему в форме буквы «Н», в которой вертикальные каналы моделируют сосуд и окружающие ткани, а горизонтальный - повреждение в стенке сосуда (рисунок 5, б). По вертикальным каналам запускается рекальцифицированная цельная кровь и буфер соответственно. Перепад давления между цельной кровью и буфером был рассчитан таким образом, чтобы скорость сдвига в горизонтальном канале составляла  $2200 \text{ c}^{-1}$ . Активатор наносился на стенки горизонтального канала, что позволяло инициировать гемостаз в месте “повреждения”. Такая система позволила оценить сравнительный вклад тромбоцитарной и плазменной составляющих в формирование тромба. Так, время полной окклюзии канала “повреждения” в присутствии только коллагена составляло более 20 минут, в присутствии только ТФ -  $15,8 \pm 2$  минуты, а при их одновременном нанесении -  $7,5 \pm 1,6$  минуты. Ингибирование функции

тромбоцитов клопидогрелем приводило к увеличению времени окклюзии примерно на 50%. Таким образом, предложенная модель, несмотря на свою простоту, позволяет проводить качественную оценку работы системы гемостаза [71].

Возможности сложных микрофлюидных систем для исследования механизмов гемостаза были наглядно продемонстрированы группой под руководством Скотта Л. Даймонда. В работе [63] описано микрофлюидное устройство, которое позволяет измерять проницаемость как тромбоцитарного, так и тромбоцитарно-фибринового агрегата при помощи флуоресцентных меток, контролируя градиент давления и скорость сдвига, при которых раствор с краской прокачивается через тромб, формирующийся на коллагене или коллагене с ТФ (рисунок 5, а). Микрофлюидное устройство было создано с использованием мягкой литографии и имеет несколько входов и выходов, дополнительное сопротивление для обеспечения перепада давления, а также домены для мониторинга и управления давлением. Такая система позволяет исследователям контролировать и изменять ряд параметров, включая гемодинамические — давление и скорость сдвига. Также отличительной особенностью модели является расположение активаторов и тромба относительно объектива микроскопа: в отличие от классических систем, в которых тромбообразование происходит на одной из горизонтальных плоскостей проточной системы, в данной модели рост тромба инициировался на вертикальных стенках и распространялся в горизонтальной плоскости в глубину канала, что позволяло исследователям наблюдать внутреннюю структуру тромба, не делая оптических срезов, как в классических системах *in vitro* [71].

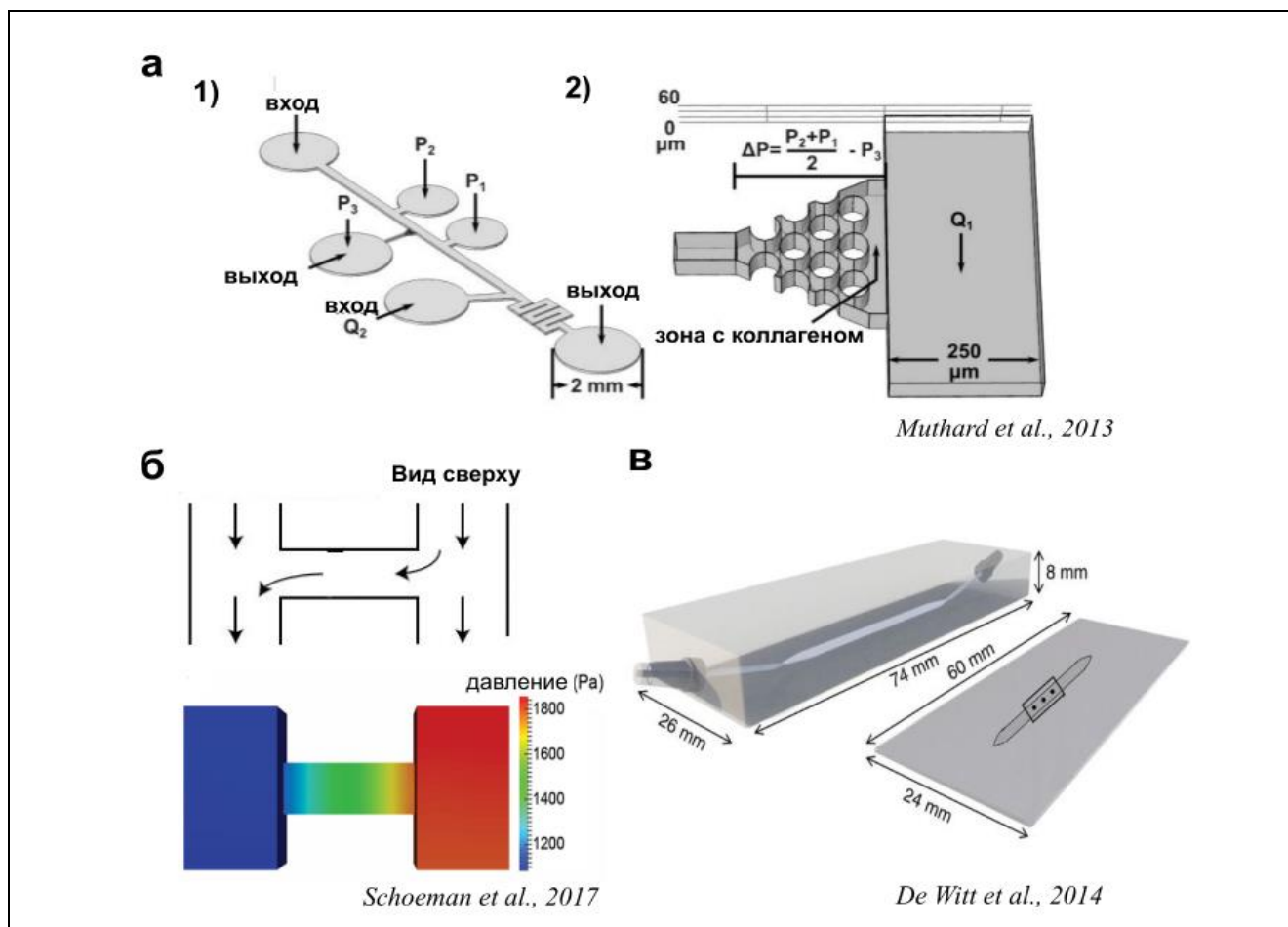


Рисунок 5 - Примеры микрофлюидных систем для исследования гемостаза.

а. Микрофлюидная система с регулируемыми градиентами давления. 1) Постоянный поток  $Q_1$  обеспечивался шприцевым насосом. Наличие датчиков давления ( $P_1$ ,  $P_2$  и  $P_3$ ) и дополнительного входного отверстия  $Q_2$  позволяло поддерживать постоянный градиент давления в зоне образования тромба. 2) Формирование тромба происходило на столбиках из PDMS, покрытых коллагеном. Адаптировано из [63]. б. Модель поврежденного сосуда для изучения гемостаза. Из [70] в. Плоскопараллельная камера для исследования тромбообразования на различных активаторах. Из [68].

Проточные камеры использовались в клинических условиях для изучения гемостатического ответа у пациентов с кровотечениями или тромботическими нарушениями, а также для оценки эффективности антикоагулянтной и антиагрегантной терапии [72]. Возможность отслеживать эти параметры в реальном времени в микрофлюидных проточных камерах позволяет идентифицировать диагностические и прогностические биомаркеры, а также разрабатывать персонализированные стратегии лечения [60; 65]. С дальнейшим развитием технологий микрофабрикации, стандартизацией и учетом большего

количества физиологических условий, микрофлюидные проточные камеры могут значительно улучшить наше понимание гемостаза и тромбоза, что позволит лучше диагностировать и лечить соответствующие заболевания.

Прежде всего, изучение тромбообразования *in vitro* позволяет исследователям анализировать тонкости этого сложного процесса в контролируемой и воспроизводимой среде. Исследования *in vivo*, хотя и информативны, часто включают в себя множество переменных, которые сложно выделять, контролировать и изменять. *In vitro* модели позволяют точно контролировать условия эксперимента, включая выбор скорости потока, геометрии системы, активаторов, ингибиторов и их концентраций, что приводит к более глубокому пониманию механизмов изучаемых процессов. Такая информация также имеет неоценимое значение для оценки эффективности антикоагулянтной терапии, диагностики кровотечений или тромбозов, а также разработки персонализированных стратегий лечения с учетом индивидуальных особенностей пациентов. Основное преимущество микрофлюидных камер заключается в их способности сочетать точность традиционных *in vitro* анализов и физиологичность *in vivo* исследований, поэтому модели на их основе обладают следующими отличительными особенностями:

1. Физиологическая значимость. Микрофлюидные камеры позволяют исследователям имитировать динамические и во многом зависящие от потока процессы, в которых участвуют тромбоциты в кровотоке. Контролируя скорость потока, геометрию камеры и свойства поверхности, микрофлюидные камеры позволяют частично воспроизводить физиологическую среду, обеспечивая получение более клинически значимой информации.
2. Точность и контроль. Точный контроль над такими параметрами, как скорость сдвига, концентрация активатора etc. в микрофлюидных камерах, позволяют исследовать тромбоз и гемостаз в различных условиях, тонко варьируя экспериментальные условия. Исследователи могут систематически изучать широкий спектр состояний, что позволяет проводить комплексные исследования.
3. Визуализация в реальном времени. Микрофлюидные модели тромбоза обычно

включают в себя микроскопию, что позволяет визуализировать взаимодействие тромбоцитов с поверхностями и другими компонентами крови в реальном времени. Прямое наблюдение позволяет изучать процессы образования тромбов в динамике и с высокой точностью.

4. Клиническая значимость. Микрофлюидные модели могут быть адаптированы для клинического применения, позволяя оценить реакцию конкретного пациента на повреждения, антикоагулянтную, антиагрегантную и др. терапию в условиях, максимально приближенных к *in vivo*. Такой персонализированный подход может существенно облегчить оценку рисков при хирургических вмешательствах, диагностику системы гемостаза в лечении тромботических заболеваний, а также предварительную оценку эффективности терапий.

Применение микрофлюидных тестов для изучения влияния лекарственных средств на гемостаз [73; 74], оценки эффективности терапии [59; 76], изучения механизмов возникновения различных патологий [72] и разработки новых диагностических инструментов [72; 69] быстро развивается в последние два десятилетия. В настоящее время такие системы применяются для изучения некоторых патологий системы гемостаза, таких как болезнь Виллебранда [76], тромбастения Гланцмана [62; 69], синдром Германского-Пудлака [69; 77; 78], аномалия Мэя-Хегглина [69], синдром серых тромбоцитов [69], синдром Скотта [79], серповидно-клеточная анемия [80], гемолитико-уремический синдром [80], тяжелые иммунодефициты [69; 81], гемофилия [72], травматическая коагулопатия [82] и др., а также адаптированы для замены рутинных коагуляционных тестов [83; 84]. Однако, несмотря на то, что такие системы обладают большим потенциалом, их использование в клинических условиях все еще крайне ограничено.

Примером использования микрофлюидной системы для изучения патологий гемостаза является работа [76]. Авторы использовали простейшую плоскопараллельную проточную камеру (рисунок 6, а) для сравнения образцов крови здоровых доноров и пациентов с недостатком фактора фон Виллебранда и болезнью Виллебранда 1 типа различной степени тяжести. Максимальная площадь покрытия активатора тромбами коррелировала с уровнем ФВ в плазме. Также,

авторами было показано восстановление тромбообразования до уровня здоровых доноров в крови пациентов, получающих лечение (рисунок 6, б).

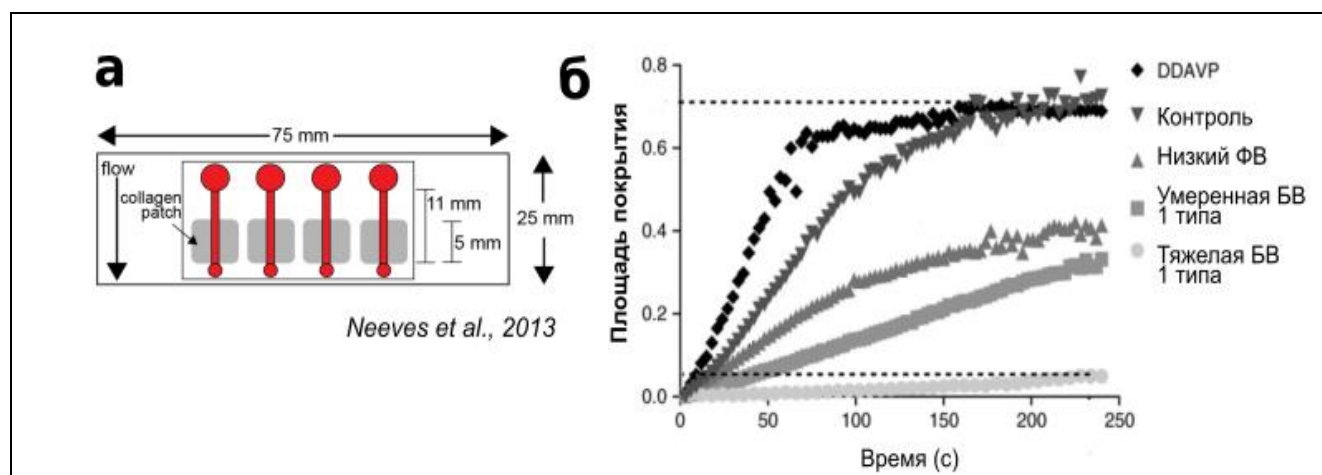


Рисунок 6 - Микрофлюидная система для изучения болезни Виллебранда.

а. Схема проточной камеры. Четыре канала (красные) прямоугольного сечения (высота 50 мкм, ширина 500 мкм) расположены над областями, покрытыми коллагеном 1 типа (серые). Кровь помещалась во входную лунку (большой круг) и выкачивалась через выходную (маленький круг) с постоянной скоростью. Тромбообразование наблюдалось над областью, покрытой коллагеном при помощи эпифлуоресцентной микроскопии.

б. Динамика площади покрытия активатора тромбоцитами для крови (по возрастанию) пациента с тяжелой формой болезни Виллебранда (БВ) 1 типа, болезнью Виллебранда 1 типа, низким ФВ до лечения, здорового донора, низким ФВ после лечения (1-дезамино-8-d-аргинин вазопрессин, DDAVP). Скорость сдвига  $750 \text{ c}^{-1}$ . Воспроизведено из [76].

Несмотря на успехи в применении микрофлюидики для оценки состояния системы гемостаза, большинство микрофлюидных анализов довольно сложны и требовательны с точки зрения материалов, подготовки персонала и оборудования. Более того, эти системы часто уникальны для лаборатории: измеряемые параметры, а также протоколы слишком сложны для воспроизведения в клиниках. Именно поэтому необходима работа по оптимизации и стандартизации таких систем.

#### 1.4 Выбор параметров микрофлюидной системы

Множество опубликованных исследований посвящено применению микрофлюидных систем для изучения плазменного свертывания [85; 86], или одновременной работы обоих звеньев системы гемостаза [63]. Для создания простой и надежной микрофлюидной тест-системы в ходе выполнения

диссертационной работы было принято решение сфокусироваться на анализе тромбоцитарного звена гемостаза, так как создание интегрального теста первичного гемостаза с одной стороны имеет большую клиническую значимость, а с другой позволяют не рассматривать процессы свертывания крови, что в условиях потока сопряжено с рядом технических сложностей. Далее будут рассмотрены основные параметры проточных камер, применяемых для изучения тромбоцитарного гемостаза, а также преимущества и недостатки распространенных подходов.

Материалы проточных камер. Сегодня наиболее распространенными материалами для создания проточных камер являются полидиметилсилоксан (PDMS), пластик и гидрогель. Последний может быть насыщен ингибиторами и активаторами гемостаза, а также обладает механическими свойствами, позволяющими в некоторой степени учитывать сложную реакцию сосудов на механическое воздействие. Также, гидрогель позволяет создавать микрососуды лишь очень ограниченных геометрий. Являясь полезной базой для многопараметрических и углубленных биохимических исследований, этот материал, однако, слишком сложен с точки зрения создания и работы с системой для клинического теста. Пластик дешев и с ним легко работать, поскольку основания камер можно изготовить заранее и хранить практически бесконечно. Однако он сильно проигрывает в биохимических и механических свойствах гидрогелям, накладывает ограничения на геометрию каналов и ее точность, а при работе в микромасштабе требует специального оборудования для производства. PDMS же позволяет легко создавать камеры любой геометрии на основе рельефа, как правило изготавливаемого с помощью фотолитографии. Он также гибок, биохимически нейтрален и проницаем для газов и малых молекул. Благодаря этим свойствам проточные камеры из PDMS очень популярны, и именно на них мы остановимся в дальнейшем.

Выходные данные. Существует множество параметров, используемых для характеристики тромбообразования, причем группы исследователей из разных лабораторий используют отличные друг от друга, а в некоторых случаях и

уникальные параметры. Это усложняет анализ данных и зачастую делает несопоставимыми результаты, полученные разными командами. Наиболее популярными параметрами являются площадь покрытия поверхности тромбами, площадь под кривой давления, время окклюзии канала, средняя высота и объем тромбов, интенсивность флуоресценции меченых тромбоцитов и время достижения определенного значения фиксированного параметра (такого как давление в системе, площадь покрытия поверхности тромбами etc.). Так как результаты клинического теста желательно должны иметь ясный физический и биологический смысл и быть сопоставимыми с литературными данными, в представленной работе будут использоваться площадь покрытия и высота тромбов.

Антикоагулянты. Чтобы предотвратить свертывание крови после взятия и во время эксперимента, в процессе флеботомии в нее обычно добавляют антикоагулянты. Наиболее часто используемые из них — гепарин, цитрат натрия, ЭДТА и гирудин.

Гепарин представляет собой гликозаминогликан, который ускоряет ингибирование тромбина, а также факторов Ха, IXa, XIa и XIIa антитромбином. Связывание гепарина вызывает конформационные изменения в молекуле антитромбина, что значительно облегчает его взаимодействие с мишенями [87]. Он широко используется в клинической практике и в микрофлюидных проточных камерах - например, для исследования влияния гепарин-индуцированной тромбоцитопении на образование тромбов [73]. Однако есть данные, показывающие, что гепарин влияет на функцию тромбоцитов и, таким образом, может компрометировать результаты тестов [88; 89; 90; 91].

Цитрат натрия действует путем хелатирования ионов кальция и магния, которые крайне важны для активации факторов свертывания крови. Он обычно используется в клинических испытаниях и поэтому широко используется в микрофлюидных проточных камерах [72]. Однако низкая концентрация кальция в плазме может влиять на внутритромбоцитарные запасы кальция и, следовательно, на функцию тромбоцитов [93]. Также, помимо кальция, цитрат натрия связывает и ионы магния, необходимые, помимо прочего, для функционирования интегринов

тромбоцитов, что также нарушает процесс тромбообразования [56]. Для восстановления концентраций ионов проводят рекальцификацию, однако это может приводить к активации каскада свертывания крови.

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) также предотвращает свертывание путем хелатирования кальция в крови. Известно, что она вызывает диссоциацию мембранных комплексов GPIIb-IIIa и поэтому редко используется в поточных системах для изучения тромбоза [94; 95]. Также, ЭДТА вызывает активацию тромбоцитов, усиливающуюся со временем [91], что делает неоправданным ее применение в рассматриваемой модели.

Гирудин является прямым ингибитором тромбина. Связываясь с его активным и фибрин-связывающим сайтом, гирудин эффективно ингибирует тромбин, не изменяя реакцию тромбоцитов на другие агонисты [96]. Также было показано, что гирудин, в отличие от гепарина, сохраняет активность системы комплемента [97]. Недостатком гирудина по сравнению с другими антикоагулянтами является лишь его более высокая стоимость. Ввиду своих многочисленных достоинств гирудин широко используется в микрофлюидных проточных камерах для исследования влияния активаторов и параметров потока на образование тромбов.

Скорость потока. Физиологическая скорость потока в кровеносных сосудах варьируется в зависимости от их размера и местоположения. Например, сдвиговая скорость потока в артериях и артериолах может достигать  $5000 \text{ с}^{-1}$  при средней скорости  $1700 \text{ с}^{-1}$  в здоровых сосудах и  $40000 \text{ с}^{-1}$  при патологических состояниях [98]. Скорость потока в венах обычно колеблется от 10 до  $200 \text{ с}^{-1}$  [99; 100]. Для крупных сосудов человека характерны скорости сдвига до  $500 \text{ с}^{-1}$  [101], однако в условиях стеноза и при повреждениях поток может возрастать в десятки раз [102], что оказывает значительное влияние на механизмы гемостаза.

В микрофлюидных камерах скорость потока можно точно контролировать, чтобы имитировать различные условия и изучать механизмы остановки кровотоков в различных сценариях. Это важно, поскольку некоторые патологии оказывают влияние на гемостаз только при определенных скоростях сдвига [73].

Например, фактор Виллебранда становится решающим для остановки тромбоцитов только при скорости сдвига выше  $1000 \text{ c}^{-1}$  [103]. В связи с этим изменения в работе системы гемостаза пациентов с соответствующими патологиями проявляются только при сравнительно высоких скоростях сдвига. В представленной работе будет рассматриваться диапазон скоростей сдвига от 200 до  $2000 \text{ c}^{-1}$ .

В 2020 году были опубликованы рекомендации комитета по биореологии ISTH - Международного общества по тромбозу и гемостазу - ведущей международной профессиональной организации, занимающейся тромбозами и гемостазом [17]. Целью этой работы было систематизировать применяющиеся по всему миру подходы к микрофлюидному исследованию гемостаза и выработать общие рекомендации для разработки и применения проточных камер.

Далее будут приведены основные положения рекомендаций комитета и даны комментарии о соответствии диссертационного исследования предлагаемым подходам:

1. Источник коллагена: изучение образования тромбов в проточных камерах обычно выполняется с использованием бычьего или лошадиного кислоторастворимого фибриллярного коллагена I и/или III типа. - в представленной работе использовался раствор фибриллярного коллагена I типа из сухожилий лошади. Коллаген был растворен в уксусной кислоте.

2. Нанесение коллагена: исследователям необходимо тщательно выбирать концентрацию фибриллярного коллагена в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл в качестве активатора в проточных системах.

- в разработанной системе применялась концентрация коллагена 200 мкг/мл.

3. Микропечать: исследователям следует знать, что изучение тромбообразования в условиях полного покрытия канала активатором вносит изменение в динамику роста тромбов, поскольку тромбообразование происходит в растворе с растворимыми агонистами (АДФ,  $\text{TxA}_2$ ), высвобождаемыми тромбами выше по потоку. С другой стороны, в слое крови над активатором может содержаться меньшее количество тромбоцитов из-за потребления их тромбами выше по потоку. Использование микропечати, которое ограничивает область

коллагенового покрытия, может помочь избежать таких проблем.

- в представленном исследовании контролировалась однородность покрытия по всей длине активатора. Коллаген наносился микрофлюидным методом, что позволило создать ограниченную область внутри каналов.

4. Исследуемые образцы: потоковые эксперименты обычно проводятся с цельной кровью (...).

- в исследовании использовалась цельная кровь, что позволило исключить проблемы, сопряженные с отмывкой тромбоцитов, восстановлением гематокрита etc.

5. Антикоагулянты: комитет рекомендует использовать прямые ингибиторы тромбина, такие как D-фенилаланил-пролил-аргинилхлорметилкетон (P-Pack; 50 мкМ) или гирудин (100 ЕД/мл).

- в качестве антикоагулянта для проточной системы был выбран гирудин.

6. Устройство потока: комитет рекомендует, чтобы проточные камеры соответствовали геометриям с каналами поперечного сечения с соотношением сторон не более 1/10, чтобы считаться бесконечно широкими, тем самым минимизируя эффекты боковой стенки и позволяя упростить расчеты скорости сдвига. Также рекомендуется избегать острых углов ( $>45^\circ$ ) на входе и выходе, чтобы минимизировать нарушение потока и непреднамеренное образование тромбов.

- в диссертационном исследовании применялись камеры прямоугольного сечения с соотношением сторон 1/20. Входные и выходные отверстия имели угол порядка  $135^\circ$ .

7. Гемодинамические условия: перфузия цельной крови над коллагеном приводит к образованию тромба при физиологических и патологических скоростях сдвига от  $50 \text{ c}^{-1}$  до  $10\,000 \text{ c}^{-1}$  (...).

- в представленной работе применялись скорости сдвига 200, 1000 и  $2000 \text{ c}^{-1}$ .

8. Визуализация и количественная оценка образования тромба: объединение микрофлюидных систем с видеомикроскопией позволяет контролировать различные этапы образования тромба в реальном времени. Для этого требуются

меченые с помощью липофильных красителей (таких как DiOC6) или антитромбоцитарных антител.

- в приведенном исследовании применялась высокоскоростная микросъемка при помощи эпифлуоресцентного микроскопа, что позволило не только контролировать рост тромбов в реальном времени, но и подробно изучить динамику взаимодействия отдельных тромбоцитов с поверхностью. Для мечения клеток использовался краситель DiOC6.

9. Изменчивость размера тромба и его количественной оценки: в то время как образование тромбов после перфузии крови на иммобилизованном коллагене очень воспроизводимо, размер тромба изменчив, - скорее всего, из-за различий между препаратами коллагена и содержанием волокон различных размеров. Мы рекомендуем выполнять количественную оценку по крайней мере в восьми отдельных полях зрения, расположенных в центральной части устройства потока. Размер и объем тромба также уменьшаются вдоль канала, что необходимо учитывать при количественной оценке.

- для измерения высоты тромбов проводилась оценка 10 случайных агрегатов в каждом кадре. Равномерность покрытия поверхности тромбами на протяжении всей зоны активатора контролировалась во всех экспериментах.

10. Влияние ингибиторов (проблемы с количественной оценкой): антиагрегантные агенты, такие как аспирин, блокаторы P2Y<sub>12</sub> или антагонисты  $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub>, могут эффективно подавлять рост тромба. Однако исследователи должны быть осторожны с количественной оценкой при использовании реагентов анти- $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub>, поскольку эти агенты могут привести к образованию монослоя тромбоцитов с общим объемом, приближающимся к объему небольших тромбов.

- в представленном исследовании не применялись ингибиторы тромбообразования.

11. Проблемы с визуализацией: временная динамика образования тромба сложна, поскольку тромбы претерпевают контракцию и могут эмболизироваться в присутствии некоторых ингибиторов. Мы рекомендуем собирать изображения с частотой не реже одного раза в 5 секунд, чтобы зафиксировать события разрыва или повторного образования тромба.

- на стандартном временном масштабе в данном исследовании (5 минут) не происходит существенных изменений структуры и целостности тромбов. Тем не менее, в экспериментах, направленных на исследование динамики тромбообразования, частота съемки превышала 50 кадров в секунду.

12. Контроль явлений, отличных от увеличения размера тромба: как обсуждалось выше, крупные тромбы могут быть разрушены потоком, в то время как более мелкие тромбы могут сливаться вместе и образовывать один большой тромб. При использовании таких параметров, как объем тромба или поверхностная плотность тромбов, следует уделять внимание мониторингу таких событий.

- Объем тромбов не измерялся в представленной работе. Параметры, использованные в исследовании, не зависят от указанных событий.

13. Преаналитические условия: хотя не было проведено масштабных исследований с использованием модели тромбоза *in vitro* для установления подробных преаналитических рекомендаций, можно рекомендовать ряд важных моментов.

а. Статус донора: хотя дизайн исследований обычно не требует взятия крови натощак (в отличие от методов, основанных на светопропускании, показания, основанные на флуоресценции, нечувствительны к хиломикронам), мы рекомендуем просить доноров свести к минимуму употребление продуктов, которые, как было ранее показано, влияют на функцию тромбоцитов, включая алкоголь, сок фиолетового винограда, кофе, какао, шоколад, марихуану и т. д., а также такие виды деятельности, как интенсивные физические упражнения.

- при подготовке проб для исследования учитывались данные рекомендации.

б. Взятие крови: венозная кровь обычно собирается в соответствии с установленными правилами исследования тромбоцитов (включая использование игл 19G и отбрасывание первой порции крови). Хотя вакуумные пробирки разрешены, они потенциально могут давать систематические различия по сравнению со свободно текущей кровью, собранной иглой-бабочкой, прикрепленной к шприцу, из-за повышенных скоростей сдвига.

- хотя для данного исследования применялись вакуумные пробирки, их небольшой

объем (1,6 мл) обеспечивал отсутствие высоких скоростей потока. Для исключения преактивации крови проводился контроль отсутствия сгустков в потоке.

с. Хранение: эксперименты должны быть завершены в течение 4 часов после сбора крови.

- все эксперименты для представленной работы были завершены строго в пределах 2 часов после взятия крови.

Таким образом, задачей диссертационного исследования была разработка простой и надежной тест-системы для оценки первичного гемостаза, которую можно было бы установить в любой лаборатории, оснащенной базовым флуоресцентным микроскопом. В то же время, разработанная система должна удовлетворять всем приведенным выше требованиям, обеспечивать контролируемые условия для исследований и физиологическую значимость полученных результатов.

Предлагаемая модель представляет собой микрофлюидную PDMS камеру с каналами поперечного сечения. В качестве активатора применяется локализованная область с иммобилизованным коллагеном I типа, что позволяет получить как контрольную, так и рабочую область внутри одного канала. Для перфузии используется гирудинированная кровь, как наиболее физиологичная репрезентация тромбоцитарного звена гемостаза. Скорость сдвига -  $1000\text{с}^{-1}$ , что позволяет выявлять нарушения, влияющие как на венозный, так и на артериальный и патологический тромбоз. Основным выходным параметром является площадь покрытия активатора тромбами - однозначно определяемый, физически значимый и воспроизводимый показатель.

В предлагаемой модели роль активатора играют волокна коллагена I типа, ориентированные поперек потока крови. Однако, состав стенки сосуда куда более сложен и гетерогенен, и влияние различных ее компонент и структуры на процесс формирования тромбов все еще не изучено в полном объеме [104].

### 1.5 Субэндотелиальный матрикс

Анализ вклада различных компонент субэндотелиального матрикса в процесс активации тромбоцитов существенно затруднен из-за неоднородности сосудистой стенки с точки зрения молекулярного состава и ориентации фибриллярных компонент [62]. Тромбоциты могут взаимодействовать не только с коллагенами, но и с другими компонентами сосудистой стенки, такими как ламинины, фибронектин, витронектин и другие.

Ламинин, как правило, связан с коллагеном IV типа и другими белками посредством нидогена [105]. Эти белки находятся непосредственно под эндотелием и являются важными структурными элементами субэндотелиального матрикса [106]. Тромбоциты могут связываться с ламинином благодаря интегринам  $\alpha 6 \beta 1$  и  $\alpha 2 \beta 1$  [107].

Фибронектин, также компонент субэндотелиального матрикса, представляет собой гликопротеин и имеет растворимую форму, в которой находится в плазме, и нерастворимую, в которой в основном обнаруживается в тканях [108].

Растворимый фибронектин способен к самопроизвольной сборке в нерастворимые микрофибриллы, запускаемой его взаимодействием с клетками

[109]. К получившимся макромолекулам могут прикрепляться тромбоциты благодаря интегринам  $\alpha 5 \beta 1$  и активированной форме  $\alpha \text{IIb} \beta 3$  [110]. Было показано, что оптимальная адгезия тромбоцитов к фибронектину опосредуется фактором фон Виллебранда [111]. Более того, при определенных условиях наличие обоих субстратов может приводить к образованию тромбов. Однако, было экспериментально показано, что фибронектин способен поддерживать агрегацию тромбоцитов *in vivo* даже в отсутствие основных необходимых для этого молекул - фактора фон Виллебранда и фибриногена [112], однако физиологическая значимость фибронектина для формирования тромбов при нормальных условиях остается спорной [107].

Витронектин является гликопротеином, содержащим последовательность Arg-Gly-Asp (сайт RGD) [113]. Этот белок в больших количествах циркулирует в плазме, а также содержится в альфа гранулах тромбоцитов и внеклеточном

матриксе [114]. Витронектин имеет неактивную форму, в которой он в основном (порядка 98%) находится в плазме - в ней большинство сайтов связывания закрыты для лигандов [115]. В альфа гранулах тромбоцитов и внеклеточном матриксе витронектин находится в активной мультимерной форме и предоставляет сайты связывания для тромбоцитарных интегринов  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  и  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  [116; 34]. Существуют данные как об ингибирующем влиянии связывания с витронектином на тромбоциты [117], так и о его тромбогенном воздействии [118; 119]. Есть данные, свидетельствующие о том, что подобная противоречивость объясняется ингибирующим тромбообразование действием неактивной плазменной формы витронектина и усиливающим его воздействием активной тромбоцитарной [120].

Все же, наиболее тромбогенным белком субэндотелиального матрикса является коллаген [121]. На данный момент известно, что стенки сосудов, особенно артерий, в значительной степени состоят из фибриллярного коллагена, который помогает поддерживать их целостность и обеспечивает гибкость [122; 123; 124]. Более того, коллагеновые волокна в стенках сосудов ориентированы: сразу под эндотелием находится тонкий слой фибрилл, ориентированных по направлению кровотока; однако с продвижением вглубь артериальной стенки ориентация меняется на  $90^\circ$  и следующий, более толстый слой состоит преимущественно из волокон, ориентированных перпендикулярно кровотоку (Рисунок 7, а. б) [125; 126; 127]. Было высказано предположение, что такая пространственная организация может быть важна для противодействия как продольному, так и поперечному механическому напряжению [125].

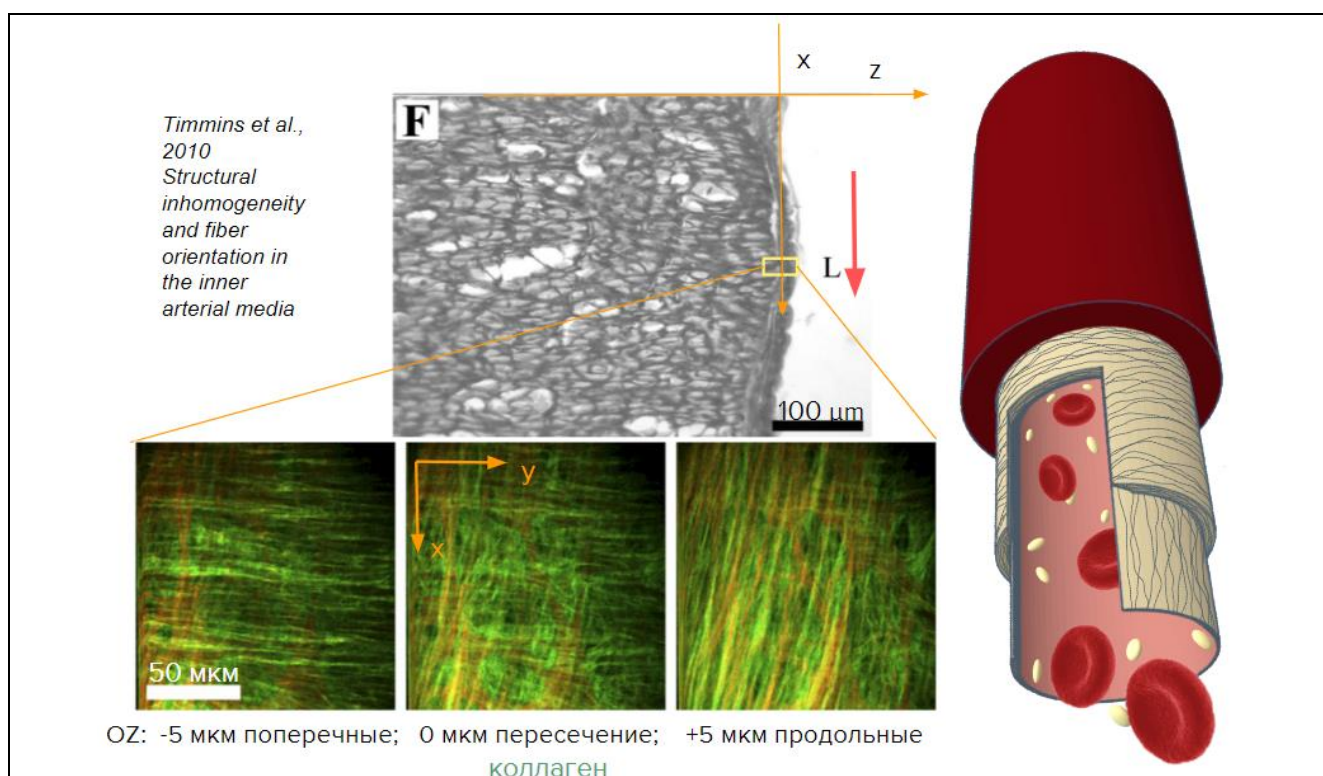


Рисунок 7 - Ориентация волокон коллагена в стенках сосудов.

Слева: строение стенки бычьей сонной артерии. Сверху: гистологический срез, демонстрирующий структуру сосудистой стенки с точки зрения ориентации волокон коллагена. L - просвет сосуда, Красная стрелка показывает направление потока крови. Коллаген окрашен пикросириусом красным [127]. Снизу: комбинированные изображения, полученные методом генерации второй гармоники (коллаген, зеленый) и двухфотонной флуоресцентной микроскопии (эластин, красный) в репрезентативном образце артерии из области между зонами с разной ориентацией волокон и на расстоянии +/- 5  $\mu\text{m}$  от этого положения. Воспроизведено из статьи Timmins et al. [125]

Справа: схематичное изображение ориентации волокон коллагена в крупных сосудах.

Несмотря на большое количество данных о формировании тромбов на коллагене, накопленных благодаря *in vitro* моделям, роль преимущественной ориентации коллагеновых волокон в первичном гемостатическом ответе остается неясной. Поэтому еще одной задачей представленного исследования было использование разработанной микрофлюидной системы для изучения влияния ориентации коллагеновых волокон на динамику формирования тромбоцитарных агрегатов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Обработка и подготовка данных

Успешное выполнение исследования во многом зависело от надлежащего получения и обработки экспериментальных данных. Необработанные данные, полученные в ходе экспериментов, в основном состоящие из флуоресцентных микрофотографий, прошли стадию предварительной обработки. Сюда входили методы улучшения изображения путем снижения шума и вычитания фона для обеспечения точности и надежности последующих анализов. Затем для измерения площади покрытия выбирался порог по интенсивности, позволяющий создать маску, наиболее точно соответствующую изображению. Для повышения точности измерения порог подбирался трижды, после чего результат усреднялся. Так как для клинического применения теста важна стабильность и надежность результатов, была проведена оценка воспроизводимости между разными операторами, а также внутри донора (см. раздел 3.4), которые показали достаточно высокую стабильность теста (вариация между операторами на уровне 5%). Также была создана система автоматической обработки данных с использованием машинного обучения на базе Weka Segmentation [128] для упрощения и автоматизации работы с данными в клинических условиях. Для оценки средней высоты тромбов проводилось измерение высоты 10 тромбов в кадре с использованием пошаговых изображений (z-stack) и усреднение результата. Эти процедуры проводились при помощи открытого программного обеспечения ImageJ [129].

Для оценки статистической достоверности различий между группами результатов применялся критерий Манна-Уитни. Достоверно различными группы считались при  $p < 0.05$ . Для работы с графиками и статистического анализа использовалось программное обеспечение Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1 Микрофлюидная модель образования тромба

Подготовка проточных камер:

В качестве материала для изготовления проточных камер использовался полидиметилсилоксан (PDMS). PDMS, линейный полимер диметилсилоксана, изначально существует в вязком жидком состоянии. При добавлении отвердителя происходят реакции сшивания, превращающие PDMS в твердый эластичный материал. Твердая форма характеризуется рядом выгодных для исследования свойств, включая гидрофобную поверхность, широкий диапазон рабочих температур, химическую стабильность, а также минимальные изменения вязкости и сжимаемости при колебаниях температуры. Также, PDMS оптически прозрачен, что позволяет изучать формирование тромбов и проводить измерения в реальном времени. Кроме того, PDMS обладает высокой биосовместимостью: клетки минимально взаимодействуют с этим материалом, а адгезивные молекулы плазмы крови, такие как фибриноген, практически не взаимодействуют с PDMS. Таким образом, PDMS не вызывает адгезии тромбоцитов и является подходящим материалом для создания микрофлюидной модели тромбоза.

Для создания микрофлюидных камер использовались кремниевые пластины с рельефом, полученным методом стандартной фотолитографии (использовался фоторезист KMPR1050 (MicroChem, Фьоренцуола д'Арда, Италия)). Рельеф был разработан таким образом, чтобы создавать камеры с тремя прямоугольными каналами, каждый из которых имеет высоту 50 мкм, ширину 1 мм и длину 1,2 см. PDMS (силиконовый эластомер SYLGARD 184 (Corning Incorporated, Нью-Йорк, США)) смешивался с отвердителем в соотношении 10:1 и выливался на подготовленный рельеф, ограниченный рамкой из твердого PDMS, до достижения высоты слоя 4-5 мм. Полученная система инкубировалась в течение 15 минут при 150 °C для полимеризации PDMS. После инкубации получившаяся полимерная пластина снималась с рельефа, камеры разделялись при помощи скальпеля. При

помощи панчера для биопсии диаметром 1 мм по краям каналов и в вакуумной зоне создавались отверстия для последующего подключения трубок (рисунок 8, а).

Иммобилизация коллагена:

Раствор нативного коллагена типа I из сухожилий лошади (Chrono-Log Chrono-Par, Пенсильвания, США) перед применением смешивался с 20 мМ уксусной кислотой в соотношении 1:4, что приводило к получению раствора коллагена с концентрацией 0.2 мг/мл. PDMS камера устанавливалась на покровное стекло, очищенное низкотемпературной воздушной плазмой. Раствор коллагена вводился в канал(ы) камеры путем помещения наконечника пипетки объемом 20–200 мкл, заполненного раствором, во входное отверстие на глубину около 1 мм и плавного нажатия на поршень. Поддержание постоянного давления в течение примерно 10 секунд приводило к заполнению канала и выходного отверстия раствором коллагена. Затем камеры инкубировались в течение 1 часа при комнатной температуре во влажной среде с целью избежать высыхания.

Поскольку одной из целей исследования было сравнение тромбогенности различных ориентаций волокон коллагена относительно потока, было применено два основных метода приготовления покровных стекол с активатором. Для создания поперечных волокон один канал камеры заполнялся раствором коллагена с помощью пипетки, для продольных волокон - все три. Для ряда экспериментов неориентированные волокна получались путем помещения капли раствора коллагена объемом 10 мкл на предметное стекло, обработанное плазмой.

После инкубации раствор коллагена плавно забирался из канала(ов) через выходное отверстие с помощью пипетки, затем PDMS отделялся от предметного стекла и утилизировался. Полученная полоска коллагена промывалась 300 мкл MQ (Millipore Corporation, Массачусетс, США) путем помещения капель жидкости над покрытой коллагеном областью на наклонном предметном стекле с помощью пипетки и их скольжению по полоске. Затем предметные стекла сушились на воздухе при комнатной температуре.

На предметное стекло с иммобилизованным коллагеном помещалась новая

PDMS камера с подключенными трубками (рисунок 8, а). Ее положение выбиралось в зависимости от желаемой ориентации волокон относительно кровотока. Для пассивации поверхностей и подготовки установки к экспериментам каналы вручную заполнялись альбуминсодержащим буфером. Буфер содержал 150 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 мМ HEPES, 5 мМ глюкозы и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (реагенты Sigma-Aldrich, Миссури, США), с pH 7.4. Этот этап выполнялся при помощи шприца объемом 2 мл, соединенного с выходной трубкой.

### *2.2.2 Взятие крови*

Исследования проводились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и протоколом, одобренным этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН.

Кровь бралась у здоровых добровольцев, которые подтвердили, что не принимали никаких лекарств, влияющих на функцию тромбоцитов, по крайней мере в течение двух недель.

Первые 2 мл крови брались на слив, чтобы избежать попадания тканевого фактора и других активаторов в образцы. Кровь бралась на гирудин, цитрат натрия или гепарин. На протяжении всей процедуры флеботомии образцы осторожно перемешивались для обеспечения равномерного перемешивания антикоагулянта. Жгут затягивался не более чем на 40 секунд.

### *2.2.3 Микрофлюидные эксперименты*

Динамика роста тромбов:

Для мечения тромбоцитов использовался DiOC<sub>6</sub> (1 мМ в ДМСО), который разводился до концентрации 0,2 мМ в PBS. 1 мкл полученного раствора помещался в пробирку, в которую затем добавлялось 200 мкл цельной крови. Для обеспечения правильного перемешивания образцы плавно пипетировались 15 раз, используя пипетку на 100-1000 мкл. Затем пробирки инкубировали в течение 3 минут. Все эти

манипуляции проводились при комнатной температуре.

Флуоресцентно меченая кровь прокачивалась через канал PDMS камеры при различных скоростях сдвига: 200, 1000 или 2000  $\text{с}^{-1}$ . Для обеспечения постоянного потока выходная трубка подключалась к шприцевому насосу серии NE-1000 (New Era Pump Systems, Inc., Нью-Йорк, США), в то время как входная трубка была погружена в пробирку с кровью.

В течение эксперимента раз в минуту производилась съемка изображений с шагом 2 мкм по вертикальной оси (z-stack) на 40-кратном увеличении для измерения высоты образующихся тромбов. Спустя 5 минут, в конце каждого эксперимента делался эпифлуоресцентный снимок канала на 4-кратном увеличении для измерения площади покрытия поверхности тромбами.

Подсчет концентрации тромбоцитов у поверхности активатора:

В течение эксперимента производилась остановка потока путем пережатия трубки, ведущей к насосу, и съемка изображений с шагом 1 мкм по вертикальной оси (z-stack) на 40-кратном увеличении. Затем проводился подсчет количества клеток в фокусе 1 кадра непосредственно над поверхностью активатора при помощи ПО ImageJ [129]. Контроль с использованием z-stack показал, что глубина резко изображаемого пространства в этом случае составляла 3 мкм. Полученное значение пересчитывалось на объем, исходя из размера области съемки (330x330x3 мкм).

Адгезия тромбоцитов:

Тромбоциты были помечены как указано ранее. Кровь прокачивалась через канал PDMS камеры при скоростях сдвига 1000 и 2000  $\text{с}^{-1}$  в течение 5 минут, все эксперименты проводились при комнатной температуре.

В течение первых 2 минут перфузии производилась высокоскоростная эпифлуоресцентная съемка (порядка 50 кадров в секунду) на 40-кратном или 100-кратном увеличении для изучения динамики отдельных тромбоцитов. После 5 минут перфузии получали эпифлуоресцентные изображения на 4-кратном

увеличении для измерения площади покрытия поверхности тромбами и подсчета их количества.

Иммуноокрашивание коллагена:

Иммунофлуоресцентный анализ сыграл решающую роль в понимании взаимодействия между тромбоцитами, фактором фон Виллебранда (ФВ) и коллагеновыми волокнами. Одновременное окрашивание на ФВ и коллаген типа III позволило получить представление о распределении фактора Виллебранда на коллагеновых волокнах и его корреляции с адгезией тромбоцитов.

После того как проточные камеры были подготовлены по ранее описанному протоколу, они инкубировались с 0,5% раствором БСА (бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, Миссури, США)). Затем в камеру с помощью пипетки вводилось 10 мкл первичных поликлональных кроличьих антител, специфичных к коллагену III типа (GeneTex, Калифорния, США), смешанных с PBS в соотношении 1:1000. Затем камера инкубировалась в течение 30 минут, чтобы обеспечить связывание антител.

После инкубации первичных антител в камеру добавлялось 10 мкл вторичных козьих анти-кроличьих антител меченых AlexaFluor647 (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США). Эти вторичные антитела специфичны по отношению к первичным антителам кролика и позволяют визуализировать сайты связывания коллагена III типа. После дополнительной 30-минутной инкубации к камере подключались трубки, входная трубка погружалась в пробирку с буфером А или PBS, выходная трубка подключалась к шприцу и антитела вымывались плавным оттягиванием поршня шприца.

После завершения процесса мечения антителами делались светлопольные и эпифлуоресцентные снимки на 100-кратном увеличении. Эти изображения были использованы для сравнения и анализа распределения коллагеновых волокон и мест связывания антител в проточной камере.

Связь между взаимодействием фактора фон Виллебранда с волокнами коллагена и первичной адгезией тромбоцитов:

Для визуализации распределения фактора Виллебранда первичные кроличьи антитела против человеческого фактора Виллебранда смешивались с PBS (соотношение 1:1000) и инкубировались с цельной кровью в течение 30 минут. Затем добавлялись вторичные козы противокроличьи антитела, меченые AlexaFluor568 (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США), смешанные с PBS в соотношении 1:1000. Тем временем в выбранном поле делались светлопольные изображения коллагеновых волокон. Затем тромбоциты метились DiOC6 и кровь прокачивалась через канал PDMS камеры со скоростью  $2000 \text{ c}^{-1}$  в течение 5 минут. В течение первых 2 минут перфузии производилась съемка с частотой 15 кадров в секунду на 100-кратном увеличении в канале DiOC6 для отслеживания динамики отдельных тромбоцитов. После 2 минут перфузии записывались светлопольные и эпифлуоресцентные изображения на 100-кратном увеличении в канале антител для количественной оценки коллагеновых волокон, окрашенных на ФВ, сопоставления их со всеми видимыми фибриллами и изучения их связи с местами адгезии тромбоцитов.

### **2.3. Инновации и решение проблем**

Разработка интегрального микрофлюидного теста, показавшего свою чувствительность как к нарушениям в системе первичного гемостаза, так и к их тяжести, открывает перспективы для решения проблемы адекватной оценки рисков тромбозов и кровотечений у пациентов, а также возможности объективной оценки их состояния без привлечения дополнительных тестов и опытного медицинского персонала. Использование физиологических реологических условий, локализованной зоны активатора, иммунофлуоресцентной съемки и измерения клинически релевантных параметров позволило создать

Также это исследование вносит вклад в изучение гемостаза, проливая свет на роль ориентации коллагеновых волокон в образовании тромба, особенно при высоких скоростях сдвига. Инновационный аспект исследования заключается в

комплексном подходе, который сочетает в себе микрофлюидику, передовые методы микроскопии и иммунофлуоресценцию для выявления основных механизмов взаимодействия тромбоцитов с коллагеновыми волокнами. Результаты исследования устраняют пробелы в понимании механизмов первичной адгезии тромбоцитов в стандартных микрофлюидных системах и указывают на важность ориентации коллагеновых волокон в образовании тромбов как *in vivo*, так и *in vitro*.

#### **2.4. Критическая оценка результатов**

Результаты, полученные в экспериментах, проведенных при различных скоростях сдвига, ясно демонстрируют влияние ориентации коллагеновых волокон на рост тромба и адгезию тромбоцитов. Было обнаружено, что при высоких скоростях сдвига продольные волокна коллагена способствуют стабильной адгезии тромбоцитов, что приводит к увеличению количества формирующихся тромбов. Это открытие имеет значение как для понимания того, как обеспечивается быстрый гемостатический ответ на повреждение в кровеносных сосудах, так и для создания микрофлюидных систем для изучения и диагностики системы тромбоцитарного гемостаза.

Однако важно признать ограничения и проблемы, с которыми пришлось столкнуться в ходе этого исследования. Такие факторы как сложность и гетерогенность биологической системы, неоднородность и присутствие разных типов коллагеновых волокон в стенках сосудов не позволяют однозначно оценить вклад обнаруженных механизмов в формирование тромбов *in vivo*.

Также стоит отметить, что разработанная система не учитывает влияния ингибиторов тромбообразования, синтезируемых эндотелием, на процесс роста тромбов.

#### **2.5. Достоверность результатов**

Чтобы гарантировать надежность результатов, высокие стандарты качества применялись к образцам крови (строгое соблюдение техники взятия и

перемешивания, использование в течение 1.5 часов), проточным камерам (точное следование протоколу, стерильность камеры и растворов, стабильность условий работы), материалам (высокое качество, стабильность источника, соблюдение условий хранения) и проведению эксперимента (фиксация и строгое соблюдение техники перемешивания, перфузии и съемки, а также использование высококлассного оборудования (см. раздел 2.2.3). Эксперименты проводились с надлежащими контролями, большим количеством повторов и доноров обоего пола. До проведения исследования микрофлюидная модель была тщательно отработана, проверена и валидирована (см. разделы 3.1-3.5). Статистический анализ применялся для оценки значимости наблюдаемых различий. Методики, использованные в исследовании, соответствовали последним рекомендациям комитета по биореологии ISTH [17] - ведущей международной организации в исследовании тромбоза и гемостаза (см. раздел 1.5).

## ГЛАВА 3. СОЗДАНИЕ МИКРОФЛЮИДНОГО ТЕСТА ТРОМБОЦИТАРНОГО ГЕМОСТАЗА

### 3.1 Конфигурация системы

Поскольку система для внедрения микрофлюидной модели тромбоза в клиническую практику должна быть доступной, надежной и простой в эксплуатации, было необходимо оптимизировать основные параметры модели для того, чтобы она лучше соответствовала клиническим потребностям. Для визуализации был выбран неинвертированный микроскоп, поскольку эта конфигурация экономически эффективна и доступна в большинстве лабораторий. Микрофлюидная система для работы с неинвертированным микроскопом показана на рисунке 8 в. Для создания области с фибриллярным коллагеном I типа применялся простой и широко используемый протокол микрофлюидной иммобилизации, описанный ранее (рисунок 8 а). Локализация активатора с помощью микрофлюидной системы позволяет создать контрольную зону, где не ожидается роста тромбов (рисунок 8 а, б).

После 5-минутной перфузии цельной крови через каналы прямоугольной формы длиной 12 мм (высота 50 мкм, ширина 1000 мкм) получались флуоресцентные изображения, которые затем бинаризовались (рисунок 8 г) для измерения площади покрытия поверхности активатора тромбами.

### 3.2 Выбор антикоагулянта

Чтобы оценить влияние различных антикоагулянтов на образование тромбов, цельная кровь, взятая на гирудин, цитрат натрия или гепарин прокачивалась над локализованной областью, покрытой коллагеном, при  $1000 \text{ с}^{-1}$  – наиболее универсальной скорости сдвига для подобных анализов, так как она является пограничной между физиологическим и патологическим тромбозом.

Полученные результаты показывают, что тромбы, образующиеся в гирудинированной крови, занимают большую площадь, чем в цитратной или

гепаринизированной крови (рисунок 9 а). Этот результат предполагает, что использование гирудина в качестве стандартного антикоагулянта может повысить чувствительность теста для исследования состояния первичной системы гемостаза, поскольку такой анализ должен быть чувствителен как к протромботическим, так и к геморрагическим состояниям.

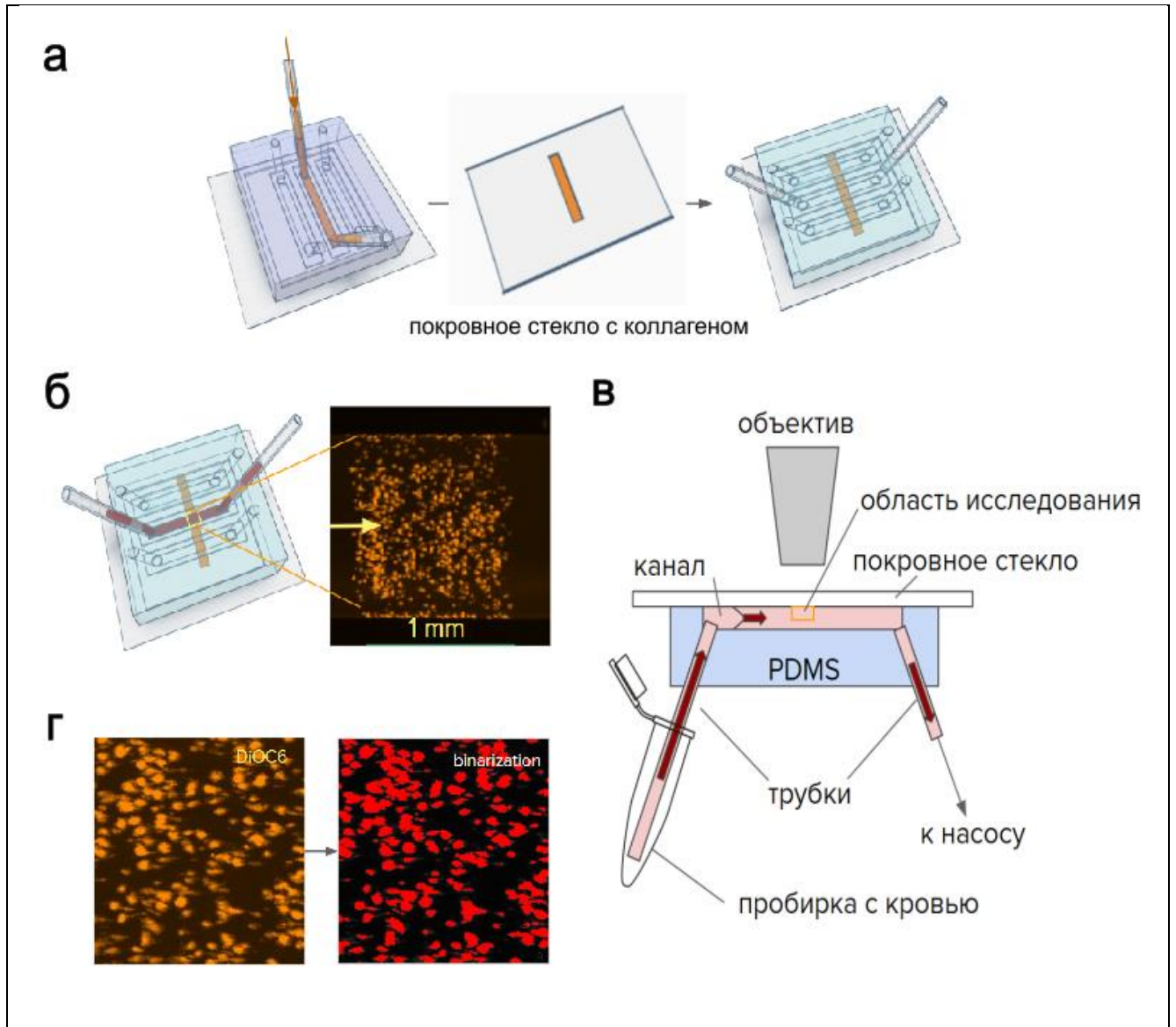


Рисунок 8 - Экспериментальная установка и основные этапы анализа. а. Иммунизация коллагена (показан оранжевым). б. Перфузия крови и пример эпифлуоресцентного изображения. в. Схема эксперимента для неинвертированного микроскопа. г. Обработка изображений: бинаризация для измерения площади покрытия.

### 3.3 Выбор скорости сдвига

Чтобы изучить влияние скорости сдвига на формирование тромба в предлагаемой системе, были проведены эксперименты при скоростях потока, соответствующих 200, 1000 и 2000  $\text{с}^{-1}$ , охватывая широкий диапазон условий, соответствующих здоровым макро- и микрососудам [101]. Полученные результаты показали, что площадь покрытия поверхности тромбами практически идентична при 200 и 1000  $\text{с}^{-1}$  и заметно ниже при 2000  $\text{с}^{-1}$  (рисунок 9 б).

На рисунке 9 в приведены репрезентативные изображения коллагеновых полосок после 5 минут перфузии при 200  $\text{с}^{-1}$  (1, 3) и 1000  $\text{с}^{-1}$  (2, 4) на стандартной полоске шириной 1 мм (1, 2) и широкой полоске 3 мм (3, 4). Жёлтыми рамками показаны области, для которых была измерена площадь покрытия. Распределение площади покрытия вдоль активатора показано как для стандартных (5), так и для широких (6) поперечных полосок при 200  $\text{с}^{-1}$  и 1000  $\text{с}^{-1}$ .

Хотя при скоростях потока 200 и 1000  $\text{с}^{-1}$  наблюдалось значительное покрытие поверхности тромбами (рисунок 9 б), более высокая скорость сдвига обеспечила более пространственно однородные результаты. Эксперименты показали, что распределение покрытия вдоль активатора было равномерным при скорости сдвига 1000  $\text{с}^{-1}$  независимо от длины зоны (рисунок 9 в (2, 4, 5, 6)). Однако при 200  $\text{с}^{-1}$  покрытие не всегда было равномерным (рисунок 9 в (1, 3, 5, 6)), вероятно, из-за неспособности медленного потока компенсировать потерю тромбоцитов, связанную с образованием агрегатов.

Полученные результаты позволили заключить, что работа с гирудинированной кровью, использование локализованной области иммобилизованного коллагена I типа, создающего зону активации и контрольную область (без коллагена) в сочетании со скоростью сдвига 1000  $\text{с}^{-1}$  является оптимальным решением для разработки микрофлюидной модели тромбообразования для клинического использования.

### 3.4 Оптимизация системы

В системе, предназначенной для неинвертированного микроскопа, резервуар с кровью технически сложно интегрировать в PDMS камеру, расположенную под покровным стеклом. Для решения этой проблемы было разработано решение с входной трубкой, соединяющей резервуар с кровью и проточную камеру. Схема эксперимента для неинвертированного микроскопа представлена на рисунке 8 в. В такой установке длина входной трубки, через которую кровь поступает в проточную камеру, представляет собой еще один важный параметр, который может повлиять на результат эксперимента. На рисунке 9 г приведена нормализованная концентрация тромбоцитов над активатором как функция времени для длинных (10 см, черные точки) и коротких (4 см, красные точки) трубок при скоростях сдвига 1000 и 200  $\text{с}^{-1}$ . Для каждой кривой данные нормализованы на значение, полученное через 5 минут на коротких трубках в данном эксперименте. Полученные результаты показывают, что при скорости сдвига 1000  $\text{с}^{-1}$  и длине трубок 10 см концентрация тромбоцитов может достигать стабильного значения на масштабах нескольких минут (рисунок 9, г). Столь длительное повышение концентрации тромбоцитов может влиять на формирование тромбов, как показано на рисунке 9, е. Однако если трубка короткая (менее 5 см), концентрация тромбоцитов обычно стабилизируется в течение первой минуты эксперимента (рисунок 9, г). Этот эффект особенно ярко выражен при более низкой скоростях сдвига (рисунок 9, д). В связи с этим длина трубок фиксируется в качестве еще одного параметра, необходимого для обеспечения стабильности результатов. Для стабилизации концентрации тромбоцитов в области над активатором в течение первой минуты эксперимента длина входной трубки должна быть менее 5 см.

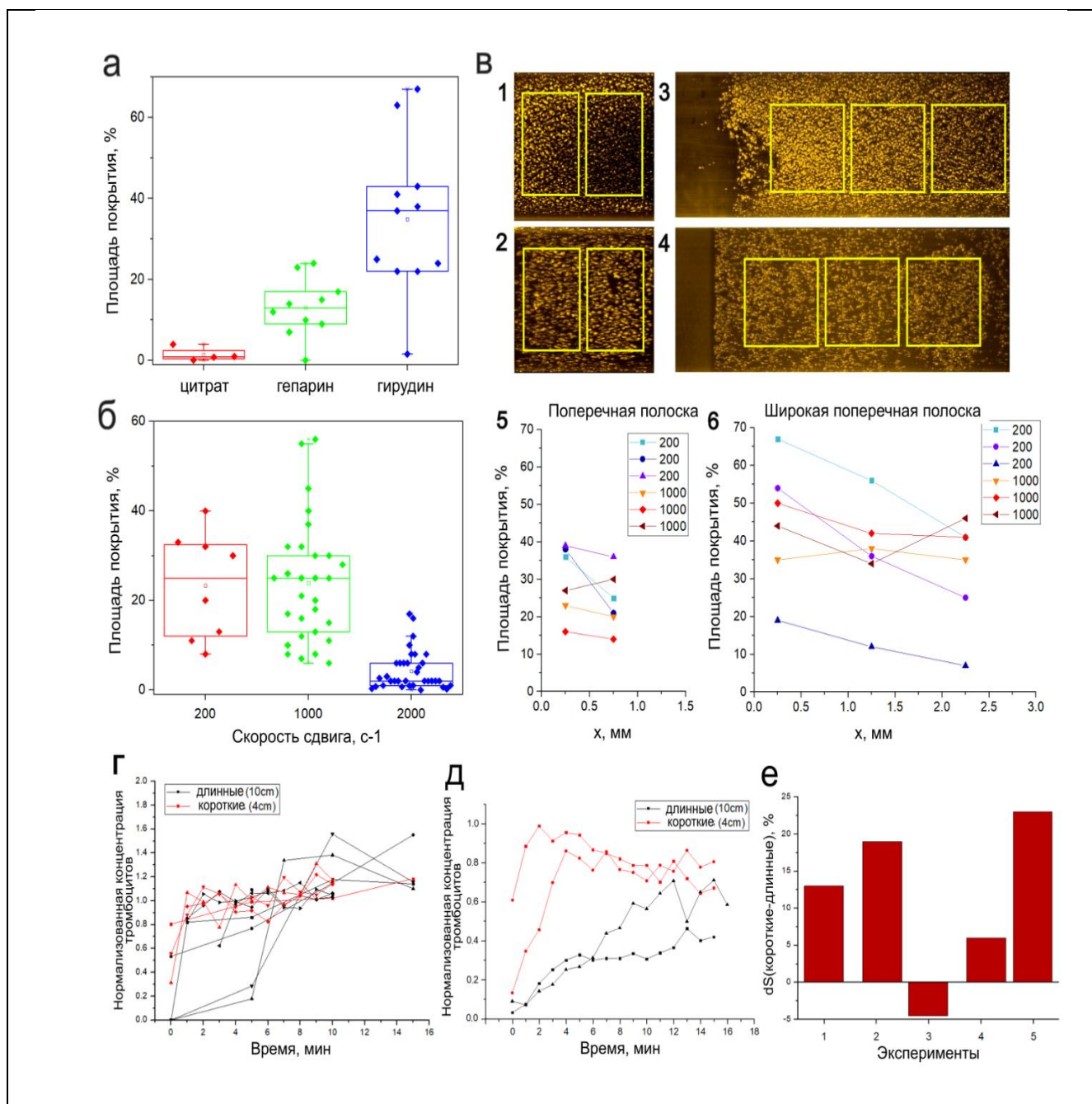


Рисунок 9 - Выбор оптимальных параметров системы. а. Влияние антикоагулянтов на площадь покрытия. Каждая точка соответствует одному эксперименту на цитратной (красный), гепаринизированной (зеленый) или гирудинированной (синий) крови. Прямоугольники ограничивают область 25–75% данных, центральные линии соответствуют медианным значениям. Скорость сдвига  $1000\text{ с}^{-1}$ .  $N = 6$ , 4 донора. б. Влияние скорости сдвига на площадь покрытия. Каждая точка соответствует одному эксперименту, точки отмечены красным для  $200\text{ с}^{-1}$ , зеленым для  $1000\text{ с}^{-1}$  и синим для  $2000\text{ с}^{-1}$ .  $N=35$ , 10 доноров. в. Распределение площади покрытия вдоль поверхности активатора. г, д. Зависимость концентрации тромбоцитов над активатором от времени для  $1000\text{ с}^{-1}$  (г),  $N=13$  и  $200\text{ с}^{-1}$  (д),  $N=4$ . е. Разница в площади покрытия после 5 минут перфузии между парами экспериментов, проведенных с использованием трубок длиной 4 см и 10 см.

### 3.5 Оценка воспроизводимости теста

Поскольку исследование выявило значительную вариативность в полученных значениях площади покрытия, это потребовало дальнейшего углубленного анализа для выяснения масштаба масштаба и факторов, обуславливающих эти колебания. С целью детального изучения данного феномена был проведен микрофлюидный тест с участием 24 здоровых добровольцев. Процедура тестирования соответствовала ранее описанному протоколу, после чего производилось измерение площади покрытия. Для оценки внутрииндивидуальной изменчивости и обеспечения надежности данных у 11 из этих доноров тест был повторен дважды или более раз, причем каждый повторный эксперимент проводился в отдельный день.

Для оценки воспроизводимости были проанализированы результаты, полученные с одним и тем же образцом крови в но в трех различных каналах одной и той же проточной камеры. Анализ показал, что в большинстве случаев коэффициент вариации между результатами, полученными в разных каналах, составлял менее 15% (рисунок 10 в, запуски). Это свидетельствует о согласованности результатов внутри одного эксперимента. Однако различия между результатами, полученными для разных доноров, были более значительны (рисунок 10 в, средние). На рисунке 10 а представлены обобщенные данные по площадям покрытия, сгруппированные по половому признаку доноров. Каждая точка на графике отражает среднее значение, рассчитанное на основе трех экспериментальных запусков, проведенных с кровью одного и того же донора в течение одного дня. Общее количество дней наблюдений для доноров мужского пола составило  $N1 = 20$  дней, с участием 10 доноров. Для доноров женского пола было проведено  $N2 = 35$  дней наблюдений, с участием 14 доноров. Статистический анализ, проведенный с использованием t-критерия, не выявил существенных различий между популяциями доноров мужского и женского пола ( $p = 0,47$ ), что указывает на отсутствие значимого влияния пола на измеряемую площадь покрытия в данном исследовании.

Чтобы оценить согласованность результатов, полученных для одного и того же донора, во времени, для 11 доноров эксперименты были поставлены в разные дни. Результаты представлены на рисунке 10 б (N = 11 доноров, каждая точка соответствует площади покрытия в процентах для 1 донора в конкретный день). Площади покрытия в день 1 и день 2, где день 1 и день 2 - два наиболее отдаленных экспериментальных дня с образцами крови одного и того же донора (день 1 и день 2 были разделены медианой 111 дней; мин-макс - 19-649 дней), коррелируют (корреляция Пирсона,  $r^2 = 0,77$ ,  $p = 0,006$ ) (рисунок 10 б). Для доноров с  $N \geq 3$  повторами в разные дни рассчитывалась средняя площадь покрытия. На рисунке 10 в. приведено сравнение вариаций между результатами, полученными в разных экспериментальных запусках, выполненных в один и тот же день (запуски), с вариациями между результатами, полученными в разные дни (дни). Один цвет соответствует одному донору. Также приведены средние значения площади покрытия и ошибка для соответствующих доноров. Коэффициент вариации между повторами в разные дни был аналогичен коэффициенту вариации между сериями экспериментов, выполненных с использованием одного образца крови (оба были менее 20%). В совокупности, результаты показывают, что площади покрытия для одного и того же донора достаточно стабильны во времени, поэтому наблюдаемая разница в экспериментальных результатах, вероятно, объясняется естественным различием между здоровыми людьми. Важно отметить, что не было обнаружено значимой корреляции между площадью покрытия и количеством тромбоцитов (корреляция Пирсона,  $r^2 = 0,36$ ,  $p = 0,31$ ) (рисунок 10, г). Это говорит о том, что различия в площади покрытия у здоровых доноров, скорее всего, объясняются различием в функции тромбоцитов, а не в их количестве.

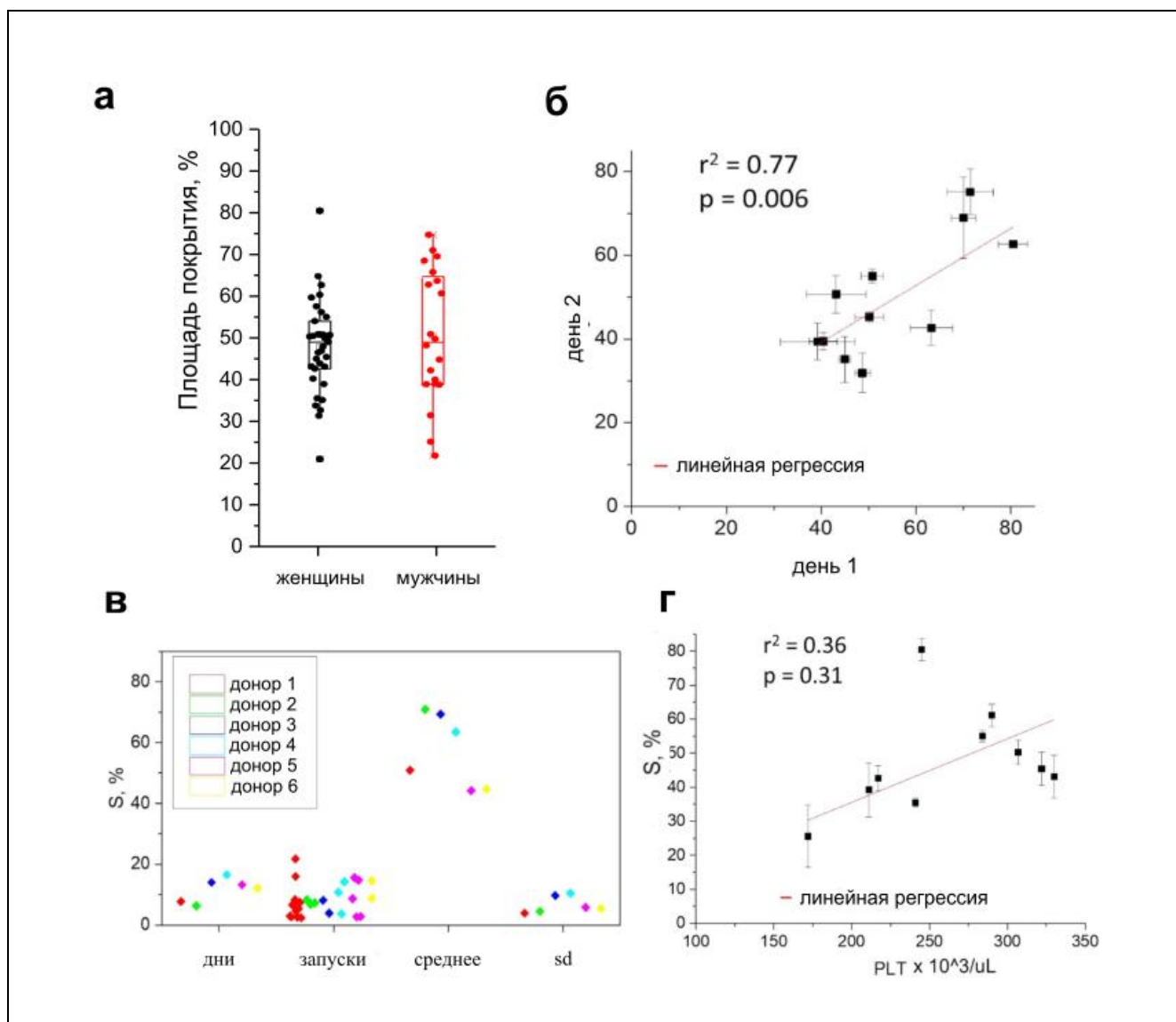


Рисунок 10 - Анализ вариаций и воспроизводимости площади покрытия поверхности тромбами в крови здоровых доноров. а. Сравнение доноров мужского и женского пола. б Корреляция между площадями покрытия, полученными для одного и того же донора в день 1 и день 2, где день 1 и день 2 - два наиболее отдаленных по времени экспериментальных дня для исследований на крови одного и того же донора. N = 11 доноров, каждая точка соответствует площади покрытия (в %) для 1 донора. Покрытия, полученные для одного и того же донора в разные дни, сильно коррелируют (корреляция Пирсона,  $r^2 = 0,77$ ,  $p = 0,006$ ). в. Сравнение вариаций между результатами, полученными в экспериментах, выполненных в один день (запуски) и в разные дни (дни). Один цвет соответствует одному донору. Также приведены средние значения площади покрытия и ошибка для соответствующих доноров. г. Корреляция площади покрытия с количеством тромбоцитов у здоровых доноров, измеренном на счетчике клеток в том же образце крови.

### 3.6 Исследование чувствительности теста к гемостатическим нарушениям

Следующей задачей было проверить, чувствителен ли разработанный микрофлюидный тест к гематологическим отклонениям.

Первую группу составили пациенты с синдромом Вискотта-Олдрича (WAS) – генетическим заболеванием, основным проявлением которого является тромбоцитопения. Площадь покрытия пациентов с WAS значительно отличалась от результатов для здоровых доноров (рисунок 11 а). Интересно, что не наблюдалось корреляции между площадью покрытия и количеством тромбоцитов у пациентов: даже при относительно высоком количестве тромбоцитов (порядка  $100 \times 10^3/\text{мкл}$ ) площади покрытия были очень низкими. Таким образом, снижение площади покрытия может отражать дефекты адгезии/активации тромбоцитов при взаимодействии с коллагеном, а не просто низкое количество тромбоцитов у этих пациентов.

Следующую группу составили 34 пациента с иммунной тромбоцитопенией (ИТП). Чтобы определить, коррелируют ли результаты микрофлюидного анализа с клиническими проявлениями (кровотечениями), тяжесть ИТП была оценена экспертом по шкале кровоточивости (Buchanan score). Не было обнаружено статистически значимой разницы между площадями покрытия для здоровых доноров и пациентов с ИТП 0 степени (без проявлений). Площади покрытия были значительно ниже у пациентов с ИТП 1 степени (рисунок 11, б, слева). Следует отметить, что отличие между количеством тромбоцитов при ИТП 0 и 1 степени было менее значимым (рисунок 11 б, справа). У некоторых пациентов с ИТП 1 и 2 степени наблюдалась тяжелая тромбоцитопения (IV степень,  $\text{PLT} < 25 \times 10^3/\text{мкл}$ ). Для таких пациентов тест показал крайне низкие площади покрытия и наблюдалась склонность к кровотечениям, что могло быть вызвано исключительно критическим недостатком тромбоцитов. Когда пациенты с  $\text{PLT} \leq 25 \times 10^3/\text{мкл}$  были исключены из анализа, площади покрытия для ИТП 1 степени были по-прежнему значительно ниже, чем у здоровых доноров и ИТП 0 степени ( $p < 0,001$ ) (рисунок 11 б, слева,

метка 1\*), но разница между соответствующими уровнями тромбоцитов была гораздо менее значимой ( $p = 0,044$ ), и группы значительно перекрывались (рисунок 11, б, справа). Эти результаты позволяют предположить, что результаты микрофлюидного теста для пациентов с ИТП значительно лучше коррелируют с риском кровотечения, чем количество тромбоцитов, особенно для пациентов без тяжелой тромбоцитопении.

Чтобы проанализировать, могут ли другие тесты улавливать различия между пациентами с тенденцией к кровотечениям и без нее, был проведен цитофлуориметрический анализ для ИТП степеней 1 и 0 и рассчитана матрица корреляции измеренных параметров (рисунок 12). Только площадь покрытия, экспрессия CD42b покоящимися тромбоцитами, остаточное количество плотных гранул после активации тромбоцитов, размер тромбоцитов (FSC) и гранулярность активированных тромбоцитов (SSC) значительно коррелировали с оценкой по шкале кровоточивости (Bu), причем корреляция с площадью покрытия была самой сильной (рисунок 11, в). В целом, ИТП степени 1 характеризовалась более высокой экспрессией CD42b, более высоким остаточным количеством плотных гранул и более крупными тромбоцитами. Тем не менее, разница в площадях покрытия для степеней 0 и 1 была наиболее значимой среди всех этих параметров (рисунок 11, в). Анализ ROC-кривых для ИТП с  $PLT > 25 \times 10^3/\text{мкл}$  показал, что площадь покрытия предсказывала наличие кровотечений лучше, чем PLT и размер тромбоцитов ( $AUC = 0,92$  для площади покрытия,  $0,8$  для размера тромбоцитов и  $0,75$  для PLT) (рисунок 11, г). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что разработанный микрофлюидный тест лучше различает степени ИТП, чем цитофлуориметрический анализ и количество тромбоцитов.

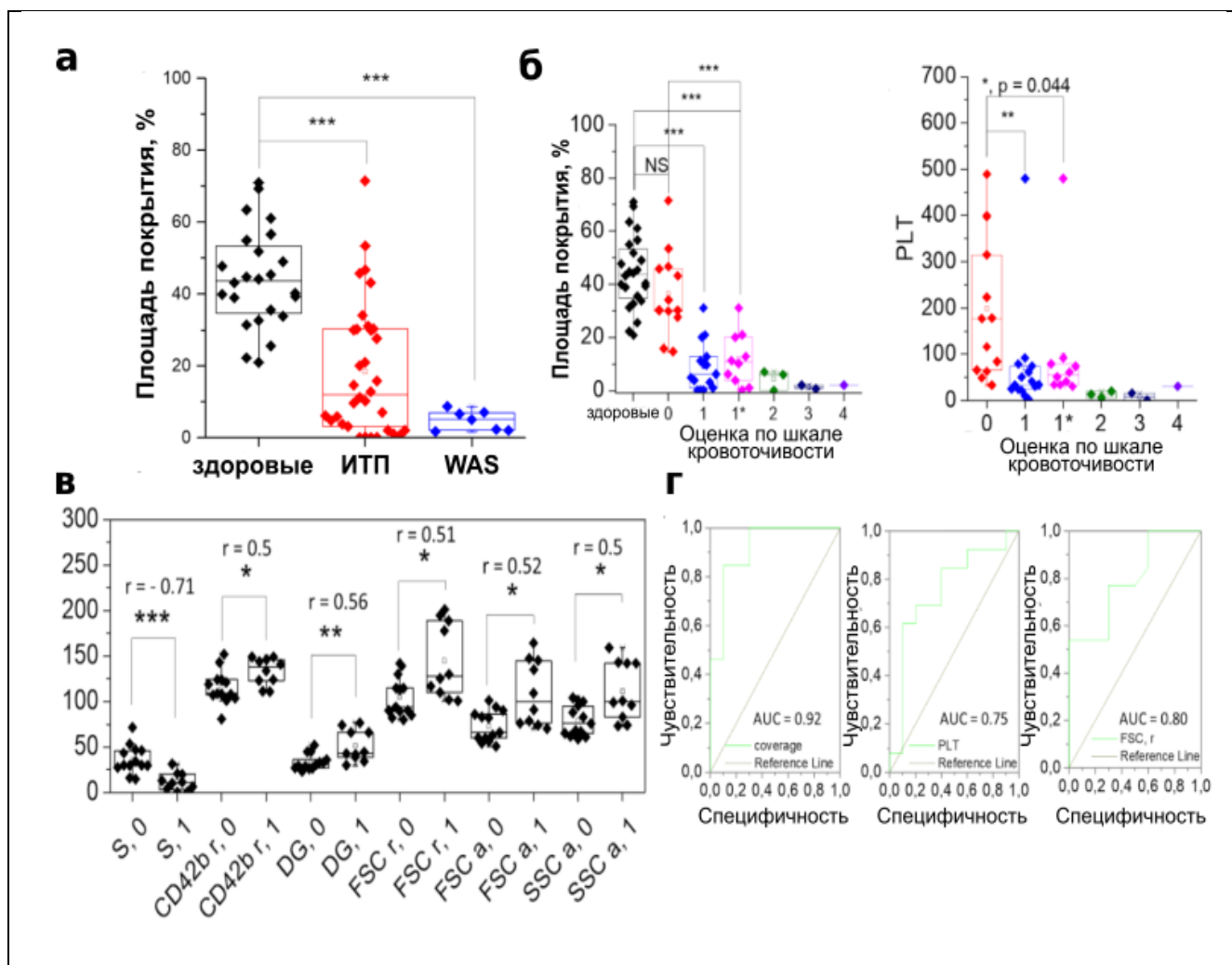


Рисунок 11 - Сравнение здоровых доноров и пациентов. а. Сравнение площадей покрытия, полученных для здоровых доноров и пациентов. Каждая точка соответствует 1 донору или пациенту. б. Параметры здоровых доноров и пациентов с ИТП с различными показателями кровотечения. 1\* - пациенты с показателем кровотечения 1 и без тяжелой тромбоцитопении ( $PLT > 25 \times 10^3/\text{мкл}$ ). 24 здоровых донора, 34 пациента. Слева: площадь покрытия, %; справа: количество тромбоцитов,  $10^3/\text{мкл}$ . в. Цитофлуориметрический анализ. Показаны параметры, которые достоверно коррелировали с показателем по шкале кровотечения (см. матрицу корреляции, рисунок 12). 23 пациента с  $PLT > 25 \times 10^3/\text{мкл}$  и показателями кровотечения 0 (13 пациентов) или 1 (10 пациентов). R - коэффициент корреляции, корреляция Спирмена. S - площадь покрытия; FSC - размер тромбоцитов; SSC - гранулярность тромбоцитов; DG - остаточное количество плотных гранул после активации; r - для покоящихся тромбоцитов, s - для активированных тромбоцитов; 0 или 1 - для оценки кровотечения 0 или 1. г. ROC-кривые для пациентов с ИТП с  $PLT > 25 \times 10^3/\text{мкл}$  и оценкой кровотечения 0 (13 пациентов) или 1 (10 пациентов). Слева - площадь покрытия; в центре - количество тромбоцитов (PLT); справа - размер покоящихся тромбоцитов (FSC). Тест Манна-Уитни, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns - не значимо.

Полная матрица корреляций для всех результатов представлена на рисунке 12. Представленная таблица показывает, что лишь малая часть параметров значимо коррелирует с экспертной оценкой кровотоочивости, причем наиболее сильную связь показывает результат микрофлюидного теста (площадь покрытия, S).

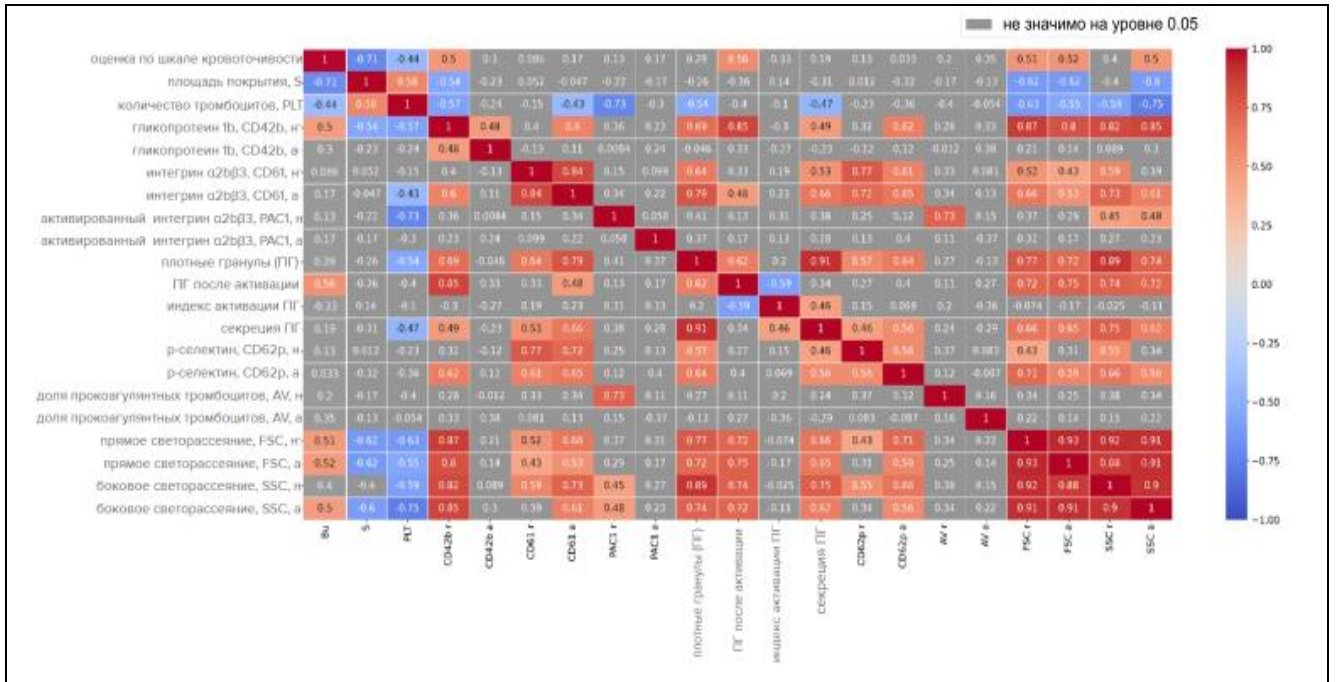


Рисунок 12 - Матрица корреляций для результатов микрофлюидного теста, цитофлуориметрического анализа и измерения количества тромбоцитов для пациентов с ИТП степени 0 и 1 с PLT > 25 x 10<sup>3</sup>/мкл. Bu (Buchanan score) - оценка по шкале кровотоочивости, S - площадь покрытия, PLT - количество тромбоцитов, CD42b - экспрессия GP1ba, CD61 - интегрин β3 (GPІb/IIIa), PAC1 - активная форма GPІb/IIIa, ПГ - количество плотных гранул, CD62p - экспрессия р-селектина, AV - доля прокагулянтных тромбоцитов по аннексину V, FSC - прямое светорассеяние, SSC - боковое светорассеяние. n - покоящиеся тромбоциты, a - активированные тромбоциты.

В разработанной модели в качестве активатора служат фибриллы коллагена, ориентированные поперек потока крови. Однако, хотя такая конфигурация позволяет получать стабильные результаты в тесте роста тромбов, а также обеспечивает локализацию зоны активатора, для стенок крупных сосудов непосредственно под эндотелием характерна продольная ориентация фибрилл. Чтобы изучить, как ориентация фибрилл коллагена влияет на рост тромбов, далее в описанной системе будет исследоваться формирование тромбов на фибриллах разной ориентации.

## ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ОРИЕНТАЦИИ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА В МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЕ НА ДИНАМИКУ ФОРМИРОВАНИЯ ТРОМБОВ

### 4.1 Сравнение тромбогенности коллагеновых волокон разной ориентации в условиях потока

Чтобы выяснить, как ориентация волокон коллагена I типа влияет на образование тромбов, были проведены *in vitro* эксперименты с использованием гирудинированной цельной крови человека и широко используемого препарата нативных коллагеновых волокон. Для иммобилизации коллагена, так же как и для моделирования гемостатического ответа в поврежденном сосуде, использовался микрофлюидный подход. Нанесение раствора коллагена с помощью микрофлюидной камеры позволило иммобилизовать фибриллы, вытянутые вдоль потока, что привело к созданию на поверхности покровного стекла локализованной полосы ориентированных коллагеновых волокон, которая служила активатором для образования тромбов (рисунок 13 а, б). Использовались две ориентации коллагеновых волокон: поперечная (волокна перпендикулярны потоку крови) и продольная (волокна параллельны потоку крови). Ориентация волокон анализировалась при помощи светлопольной микроскопии и программного обеспечения CurveAlign (рисунок 13 в) [130]. Важно отметить, что во всех экспериментах коллагеновые волокна наносились одним и тем же методом. Разница в их ориентации достигалась путем размещения проточной камеры параллельно или перпендикулярно коллагеновым полоскам (за исключением особого случая неориентированных волокон). Замена камеры в процессе подготовки эксперимента, приводящая к высыханию раствора коллагена, не оказала влияния на анализируемые параметры (рисунок 14).

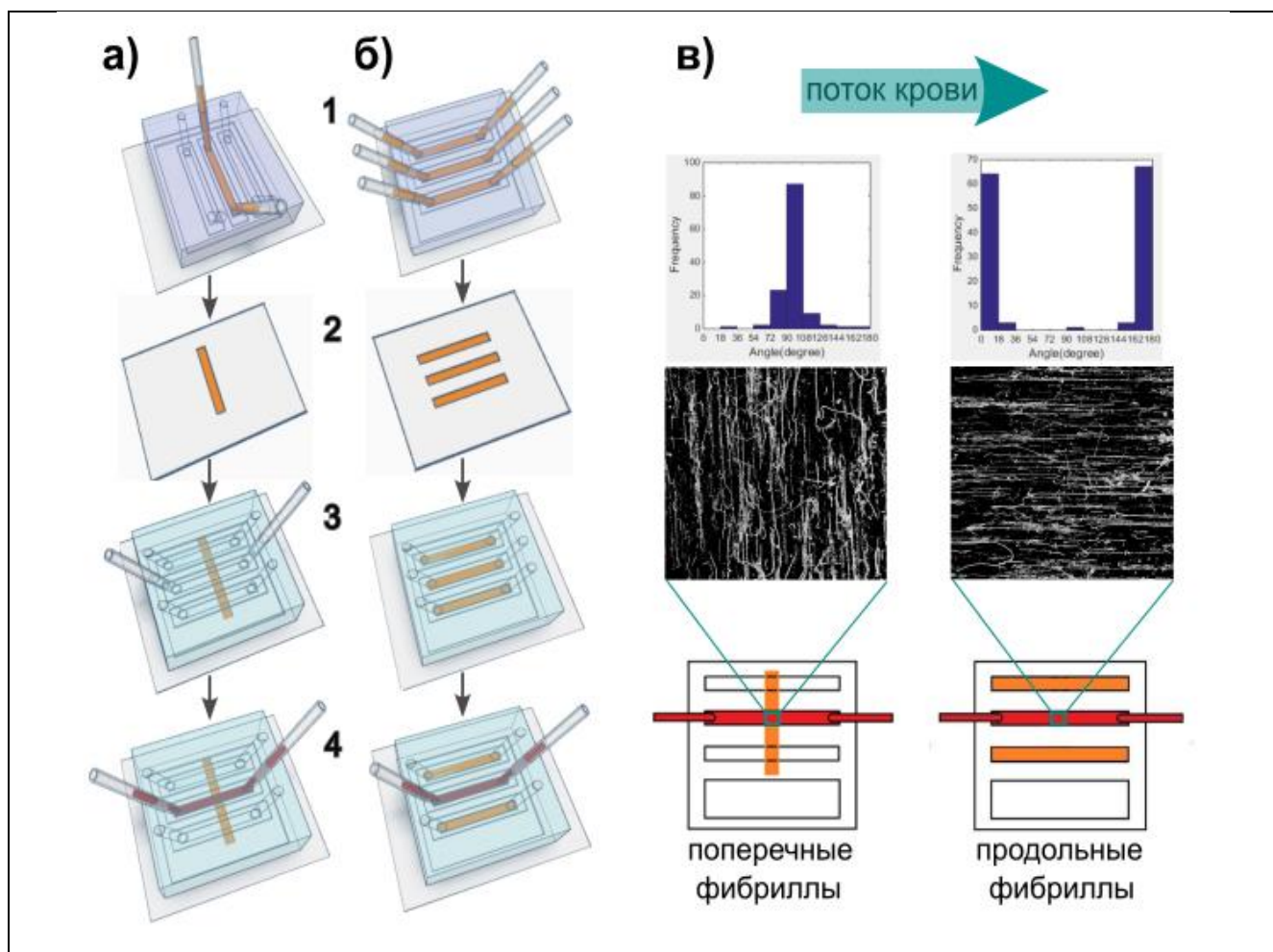


Рисунок 13 - Схема иммобилизации коллагена, характеристика его ориентации и перфузия крови. а. Нанесение поперечных фибрилл. 1. Один канал PDMS камеры инкубировался с раствором коллагена (оранжевый). 2. Покровное стекло высушивалось. 3. Вторая камера устанавливалась на предметное стекло с иммобилизованным коллагеном перпендикулярно полоске коллагена. 4. Кровь (красный) прокачивалась через канал. б. Нанесение продольных фибрилл. 1. Каналы PDMS камеры инкубировались с раствором коллагена. 2. Покровное стекло высушивалось. 3. Новая камера устанавливалась на предметное стекло с иммобилизованным коллагеном, ее каналы в тех же местах, что и у первой. 4. Кровь прокачивалась через канал. в. Коллагеновые фибриллы, увеличение 40х. Изображения получены с использованием светлопольной микроскопии, инвертированы и бинаризованы, а затем проанализированы с помощью Curve Align. В верхних строках представлены гистограммы углов ориентации, внизу — соответствующие бинаризованные изображения коллагеновых волокон; нижний ряд схематически изображает ориентацию коллагеновой полоски (показана оранжевым цветом) относительно экспериментальной камеры для получения продольных (слева) и поперечных (справа) волокон (красным показана кровь).

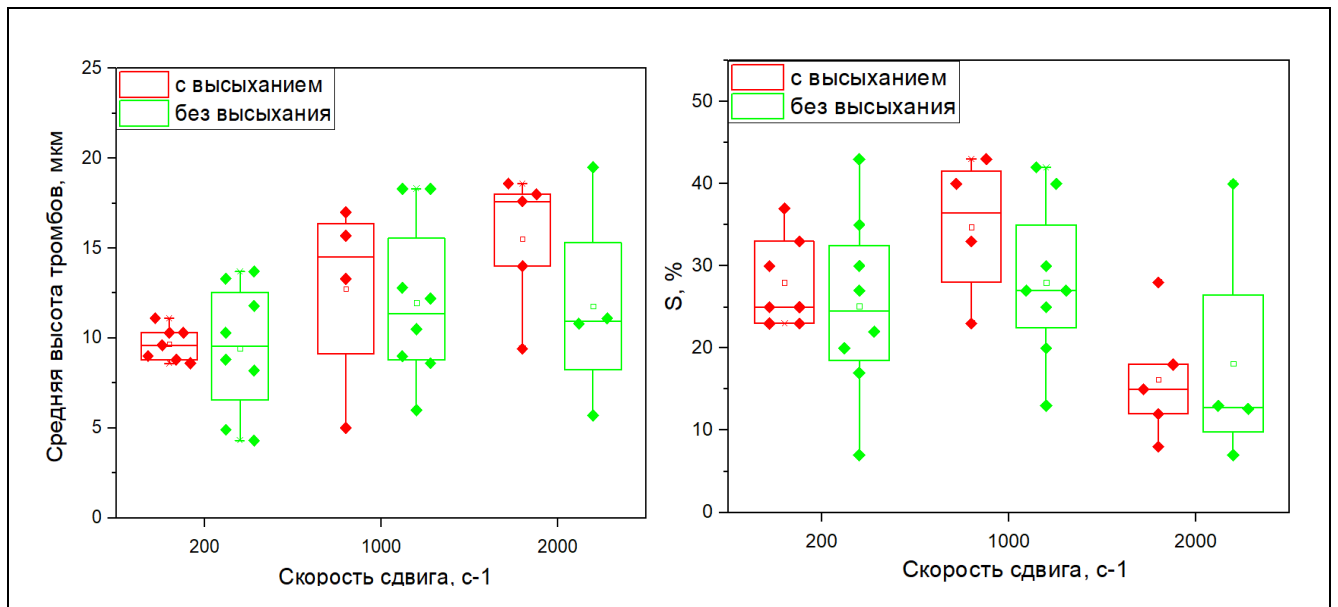


Рисунок 14 - Сравнение протоколов с высушиванием и без высушивания полоски коллагена на примере продольных волокон коллагена. Слева - средняя высота тромбов в зависимости от скорости сдвига, справа - площадь покрытия активатора тромбами в зависимости от скорости сдвига. Приведены данные для протокола с высушиванием полоски коллагена после иммобилизации (красные точки) и без высушивания (зеленые точки). Нет статистически значимых различий.

На рисунке 15 приведены результаты экспериментов, проведенных с применением коллагеновых волокон продольной и поперечной ориентации. На панели а показаны репрезентативные эпифлуоресцентные изображения тромбов, образовавшихся на коллагене. Снимки делались при помощи эпифлуоресцентного микроскопа после 5 минут перфузии гирудинированной цельной крови над областью с фибриллами продольной или поперечной ориентации. Схематическое изображение PDMS камеры дано для обозначения расположения зоны наблюдения и съемки. Эксперименты, проведенные при различных скоростях потока, показали, что рост тромбов на ориентированных коллагеновых фибриллах зависит от скорости сдвига (рисунок 15 (а-в)). Были проанализированы два параметра, которые характеризуют рост тромбов: средняя высота тромбов в микрометрах и площадь покрытия тромбами поверхности ( $S, \%$ ), то есть процент поверхности активатора, покрытой тромбами. Примечательно, что эффект от увеличения скорости сдвига с  $200 \text{ с}^{-1}$  до  $2000 \text{ с}^{-1}$  различался для продольных и поперечных фибрилл коллагена. Средняя высота тромбов незначительно увеличивалась с

ростом скорости сдвига на продольных волокнах и значительно уменьшалась на поперечных (рисунок 15 б), что привело к значимым различиям между ориентации на скорости сдвига  $2000 \text{ с}^{-1}$ . Площадь покрытия показала более сложную зависимость от скорости сдвига: для продольных волокон она незначительно увеличивалась от  $200$  до  $1000 \text{ с}^{-1}$  и несколько уменьшалась при дальнейшем увеличении скорости сдвига до  $2000 \text{ с}^{-1}$ . Однако для поперечных волокон зависимость значительно отличалась: хотя существенной разницы в площади покрытия между  $200$  и  $1000 \text{ с}^{-1}$  не было, наблюдалось резкое ее снижение при переходе на скорость сдвига  $2000 \text{ с}^{-1}$ , что приводило к значительной разнице между ориентациями при высоких скоростях сдвига (рисунок 15 б). Важно отметить, что уменьшение площади покрытия может говорить как об уменьшении количества тромбов, так и их размера. На рисунке 15 в приведены количество тромбов и их относительная площадь. Относительная площадь для оценки среднего размера тромба рассчитывалась как площадь покрытия в данном кадре, деленная на количество тромбов в нем.

Интересно, что динамика роста тромбов на неориентированных коллагеновых волокнах была аналогична динамике роста тромбов на поперечно ориентированных фибриллах (рисунок 16). Это говорит о том, что нанесение коллагена каплей, применяемое во многих экспериментальных моделях, приводит к получению результатов, характерных для поперечной ориентации фибрилл, и при высоких скоростях сдвига может отличаться от результатов, полученных на продольных фибриллах коллагена.

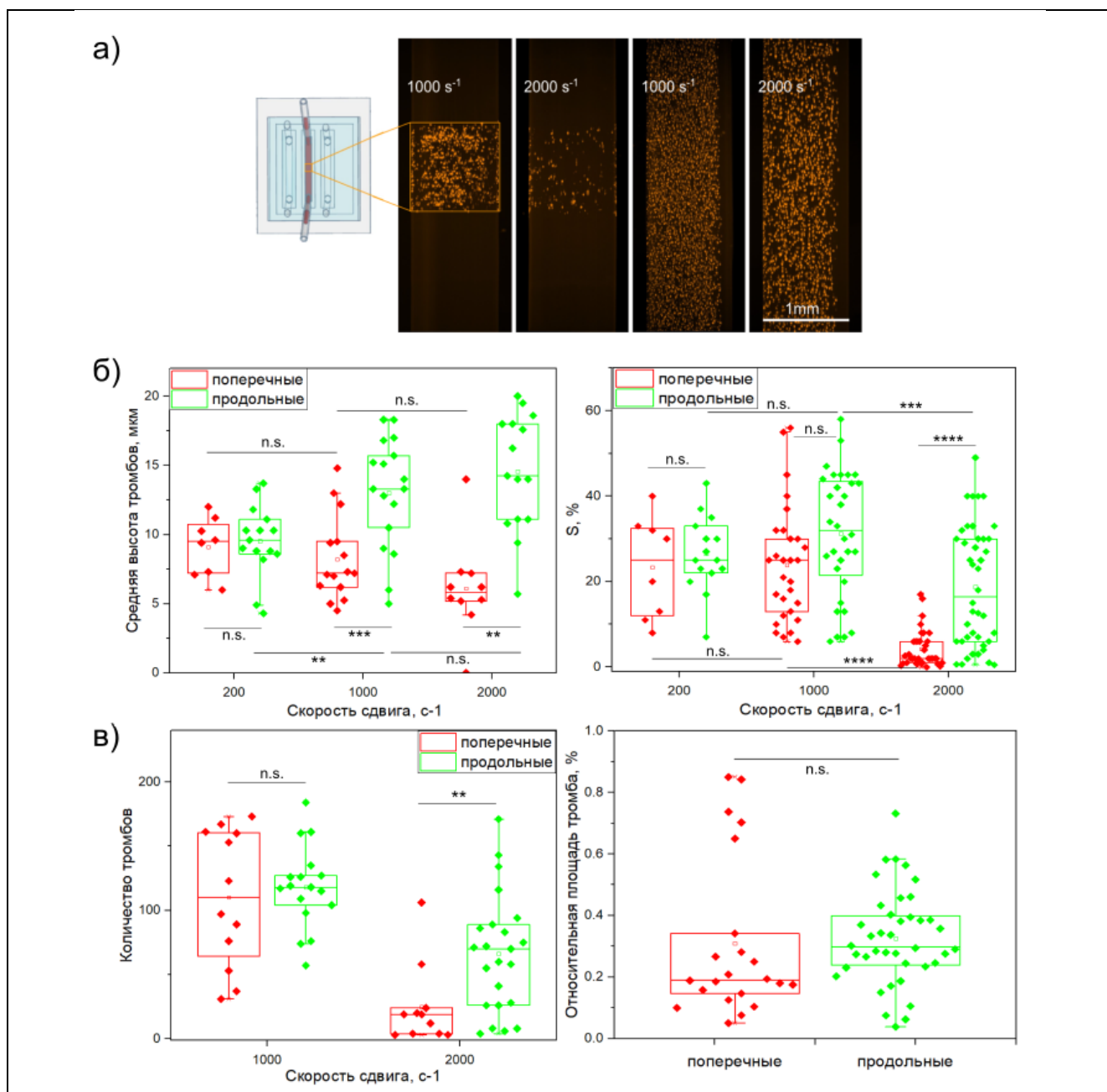


Рисунок 15 - Влияние скорости сдвига и ориентации коллагеновых фибрилл на параметры тромба *in vitro*. а. Пример изображений. Увеличение – 4х; тромбоциты помечены DiOC6. 1 и 2: поперечные фибриллы, 1000 с<sup>-1</sup> и 2000 с<sup>-1</sup>; 3 и 4: продольные фибриллы, 1000 с<sup>-1</sup> и 2000 с<sup>-1</sup>. б. Слева: зависимость средней высоты тромба от скорости сдвига. N=15, 7 доноров. Справа: площадь покрытия (%) после 5 минут перфузии. N=35, 10 доноров. Каждая точка соответствует одному запуску эксперимента. в. Слева: количество тромбов в кадре (330x330 мкм) от скорости сдвига и ориентации фибрилл. Справа: относительная площадь тромба на продольных и поперечных фибриллах. Красным показаны эксперименты, проведенные на поперечных фибриллах; зеленым - на продольных. Средняя линия - медиана, верхняя и нижняя границы - 25-75% данных. р-значения для теста Манна-Уитни: \*\*соответствует p<0.05, \*\*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.001.

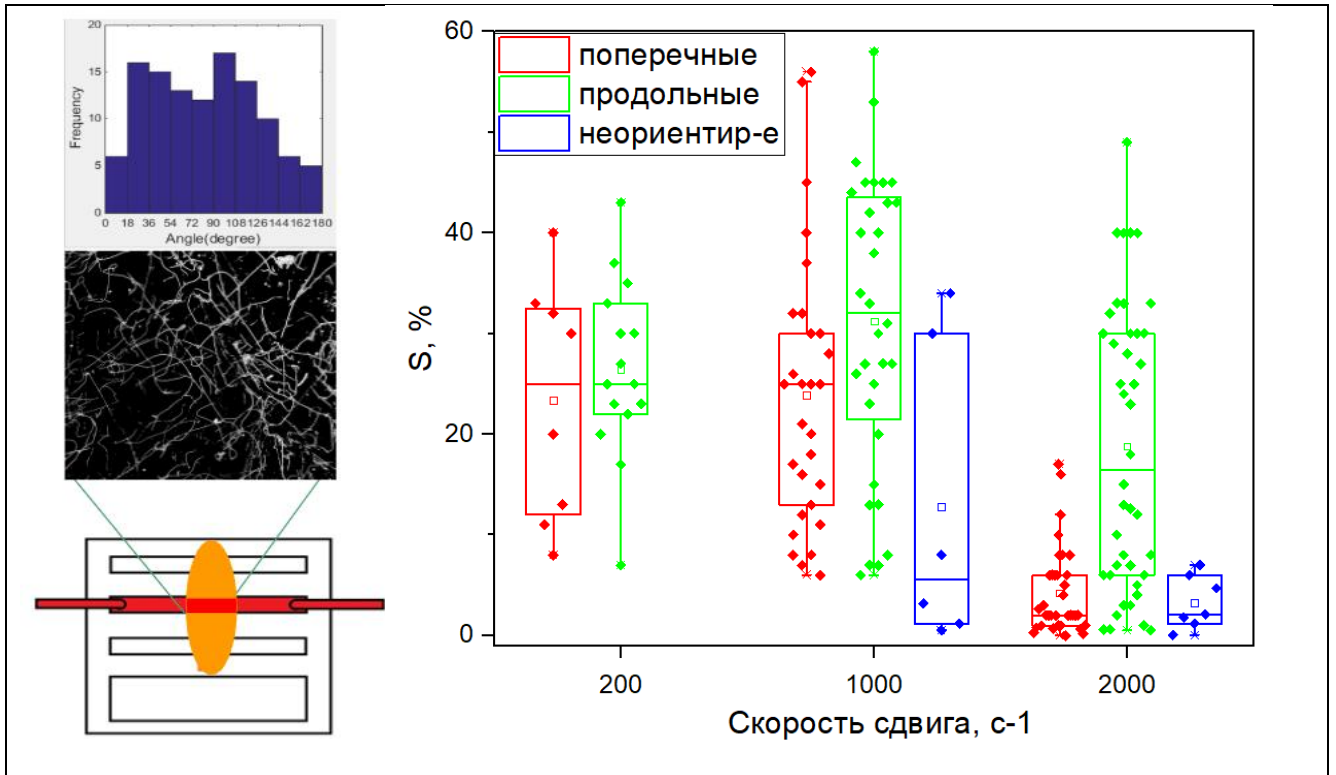


Рисунок 16 - Формирование тромбов на ориентированных и неориентированных фибриллах. Слева: Схема нанесения неориентированных фибрилл (снизу). Коллаген показан оранжевым, ток крови через канал - красным. Репрезентативное изображение фибрилл коллагена (белые) дано по центру, гистограмма распределения волокон по углам - сверху. Справа: Зависимость площади покрытия (%) после 5 минут перфузии от скорости сдвига. Красные точки соответствуют данным, полученным на поперечных коллагеновых волокнах; зеленые - на продольных; синие - на неориентированных. Рамки охватывают данные Q1-Q3, горизонтальная линия отображает медиану. Каждая точка соответствует одному запуску эксперимента (одному каналу).

Чтобы определить, обусловлены ли наблюдаемые эффекты разницей в длине полосок коллагена (по направлению потока) для продольной и поперечной ориентации, было проанализировано, как варьируется локальное покрытие поверхности вдоль канала. Результаты показали, что тромбы равномерно покрывают коллаген (рисунок 17) на обеих ориентациях при  $1000 \text{ c}^{-1}$  и  $2000 \text{ c}^{-1}$ , что указывает на то, что наблюдаемое явление не может быть объяснено разницей в длине покрытой активатором области.

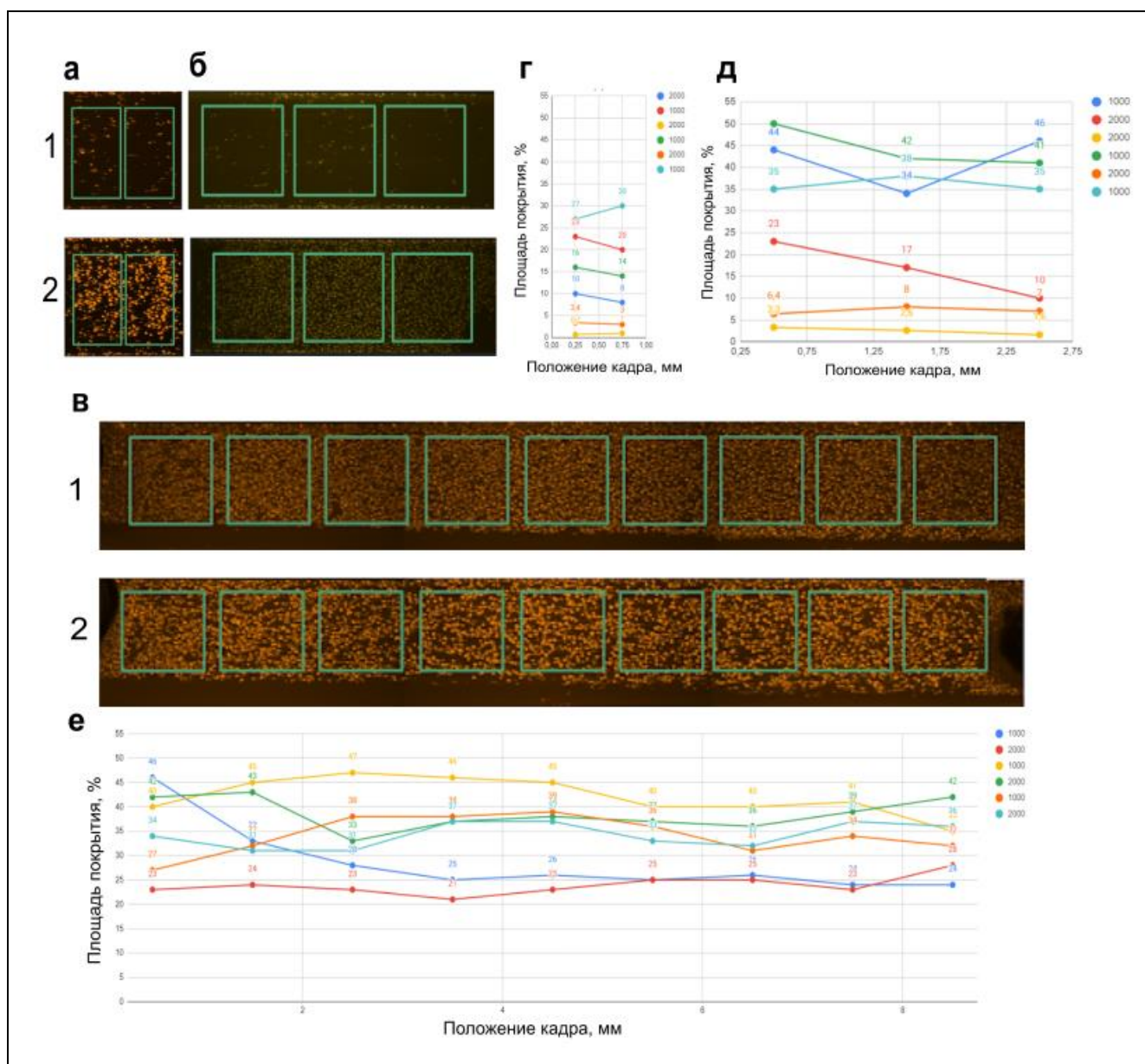


Рисунок 17 - Распределение площади покрытия вдоль полоски коллагена. а-в. Примеры изображений с рамками, показывающими области, где была измерена площадь покрытия. Каждая представленная пара принадлежит к одной серии экспериментов, разница заключается в скорости сдвига. Увеличение - 4х. а. Поперечная полоска, 1х1мм. Размер рамки 0,5х0,75мм. Скорости сдвига: 1) 1000 с<sup>-1</sup>, 2) 2000 с<sup>-1</sup>. б. Широкая поперечная полоска размером 3х1мм. Рамка 0,75х0,75мм. Скорости сдвига: 1) 1000 с<sup>-1</sup>, 2) 2000 с<sup>-1</sup>. в. Продольная коллагеновая полоска. 1х10мм. Скорости сдвига: 1) 1000 с<sup>-1</sup>, 2) 2000 с<sup>-1</sup>. г-е. Площадь покрытия вдоль активатора. Каждая точка представляет собой площадь покрытия, измеренную в одной рамке, как показано на изображениях а-с. Горизонтальная ось показывает расстояние от начала полоски до центра кадра. На легендах отображены скорости сдвига в обратных секундах для каждого эксперимента.

Поскольку при скорости сдвига  $2000 \text{ с}^{-1}$  площади покрытия на продольных волокнах были значительно выше по сравнению с поперечными, было необходимо определить причину наблюдаемого явления. Это могло быть связано как с увеличением количества тромбов, формирующихся на продольных волокнах, так и со значительным увеличением их размеров. Чтобы определить причину, количество тромбов, образовавшихся на обоих типах ориентированных волокон, было сопоставлено: анализ показал, что при  $1000 \text{ с}^{-1}$  количество тромбов, образовавшихся на поперечных и продольных коллагеновых волокнах, было одинаковым. Однако при  $2000 \text{ с}^{-1}$  количество тромбов было значительно выше на продольных фибриллах (рисунок 15 в). Более того, соотношение площади покрытия и количества тромбов было близким для обеих ориентаций ( $p=0,1$ , рисунок 15, в), что позволяет предположить, что разница в покрытии поверхности поперечными и продольными волокнами при  $2000 \text{ с}^{-1}$  возникает в первую очередь из-за различий в количестве тромбов и, вероятно, связана с первыми стадиями тромбообразования. Для проверки этой гипотезы было решено проанализировать первичные стадии адгезии тромбоцитов к ориентированным волокнам при помощи высокоскоростной съемки.

#### **4.2. Исследование первичной адгезии тромбоцитов к коллагену при высокой скорости сдвига**

Для исследования первичной адгезии тромбоцитов при высокой скорости сдвига  $2000 \text{ с}^{-1}$  применялась высокоскоростная флуоресцентная микроскопия, что позволило отслеживать отдельные тромбоциты и анализировать критические параметры их первичной адгезии к ориентированным коллагеновым волокнам.

Анализ динамики отдельных тромбоцитов показал, что большинство клеток прикрепляется к поверхности и перемещаются вдоль нее лишь в течение краткого времени. Такие тромбоциты мы в дальнейшем будем называть «временными». Однако, за время эксперимента нескольким клеткам, как правило, удается прикрепиться стабильно — тромбоциты считались стабильными, если они

прекращали всякое движение и оставались на одном месте до конца эксперимента и не менее 10 секунд. Важно отметить, что большинство таких тромбоцитов инициировали образование тромбов (рисунок 18 б).

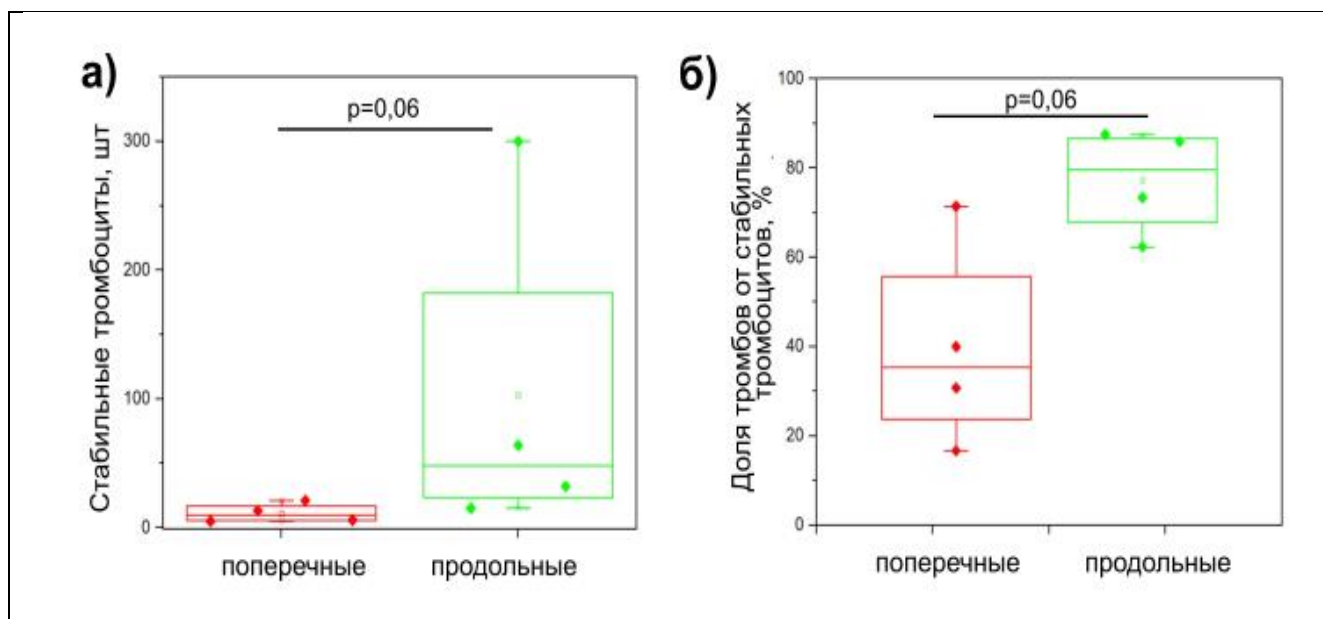


Рисунок 18 - Параметры стабильных тромбоцитов. а. Количество стабильных тромбоцитов. Каждая точка представляет собой среднее количество стабильных тромбоцитов в серии экспериментов на поперечных (красные точки) или продольных (зеленые точки) фибриллах. Каждый эксперимент состоял из нескольких (1, 2 или 3) запусков на поперечных и продольных волокнах.  $p=0,06$ ,  $N=4$ . б. Процент стабильных тромбоцитов, приведших к образованию тромбов в ходе эксперимента. Каждая точка представляет собой среднее количество стабильных тромбоцитов в серии экспериментов, деленное на среднее количество тромбов в той же серии экспериментов, проведенных либо на поперечных (красные точки), либо на продольных (зеленые точки) волокнах коллагена. Каждый эксперимент состоял из нескольких (1, 2 или 3) запусков на поперечных и продольных волокнах.  $p=0,06$ ,  $N=4$ .

Далее для сотен тромбоцитов было измерено время взаимодействия, определенное как период от первоначальной адгезии до открепления от подложки в случае временных тромбоцитов и до прекращения движения в случае стабильных тромбоцитов. Также была определена длина треков, представляющая собой расстояние, пройденное клетками вдоль поверхности (рисунок 19, а) за соответствующее время взаимодействия. Интересно, что оценка этих параметров для стабильных тромбоцитов показала, что стабильной адгезии как правило

предшествовало довольно длительное движение: как длины треков, так и времена взаимодействий стабильных тромбоцитов были относительно высокими - порядка нескольких микрометров и нескольких секунд, соответственно, - значительно выше, чем у временных тромбоцитов (рисунок 19 б). Однако, существенной разницы в обоих параметрах для разной ориентации фибрилл коллагена не наблюдалось - при высокой скорости сдвига все стабильные тромбоциты демонстрировали высокие времена взаимодействий и длину треков независимо от ориентации волокон. Также, на продольных фибриллах количество стабильных тромбоцитов было значительно выше, чем на поперечных (рисунок 18 а), что, в свою очередь, приводило к увеличению количества тромбов (рисунок 15 в). Чтобы выяснить причину наблюдаемых различий, был проведен анализ динамики временных тромбоцитов.

Каждая точка соответствует одному эксперименту, каждый из которых состоял из нескольких запусков, в каждом из которых анализировалось как можно больше тромбоцитов. Точки, соответствующие стабильным тромбоцитам, обозначены красным; временным - черным. В некоторых случаях небольшое количество стабильно прикрепившихся тромбоцитов приводило к увеличению вариаций. Эксперименты проводились парами на обеих ориентациях, то есть каждой точке на поперечных волокнах соответствует точка на продольных, за исключением четвертого эксперимента, в котором на продольных волокнах не было стабильных тромбоцитов. И длины треков, и времена взаимодействий временных тромбоцитов были значительно меньше, чем у стабильных (рисунок 19 б). Этот результат позволяет предположить, что для стабильного закрепления и инициации роста тромба тромбоциту необходимо провести больше времени, перемещаясь по поверхности активатора. Сравнение длин треков и времен взаимодействия временных тромбоцитов для двух ориентаций фибрилл показало, что оба параметра были значительно выше для продольных волокон по сравнению с поперечными (рисунок 19 в). Это указывает на то, что при высокой скорости сдвига тромбоциты, взаимодействующие с продольными волокнами,

перемещаются дальше и дольше контактируют с коллагеном, чем те, что пересекают поперечные волокна. Поскольку как увеличенная длина трека, так и время движения являются предпосылками стабильной адгезии (рисунок 18 б), эти результаты могут объяснить большее количество стабильных тромбоцитов и, как следствие, большее количество тромбов, образующихся на продольных волокнах при  $2000 \text{ c}^{-1}$ .

Что касается механизма, ответственного за более длительное взаимодействие тромбоцитов с продольными волокнами на высокой скорости сдвига, предлагается следующая гипотеза: сила, действующая на клетки со стороны потока в совокупности с ориентацией волокон коллагена по потоку позволяют тромбоцитам перемещаться вдоль фибрилл, не теряя контакта с коллагеном. Чтобы прочно прикрепиться и инициировать образование тромба, тромбоциту необходимо несколько секунд для активации. Продольные коллагеновые волокна служат “рельсами” для движения тромбоцитов после первичной адгезии. Благодаря взаимодействию с молекулами фактора фон Виллебранда, связанными с коллагеном, тромбоциты могут перемещаться по фибриллам на протяжении нескольких секунд, в конечном итоге активируясь - вероятно, за счет взаимодействия гликопротеина VI (GPVI) с коллагеном. Чтобы проверить эту гипотезу, были проведены эксперименты с одновременной иммунофлуоресцентной локализацией связанного с коллагеном фактора фон Виллебранда и адгезии тромбоцитов.

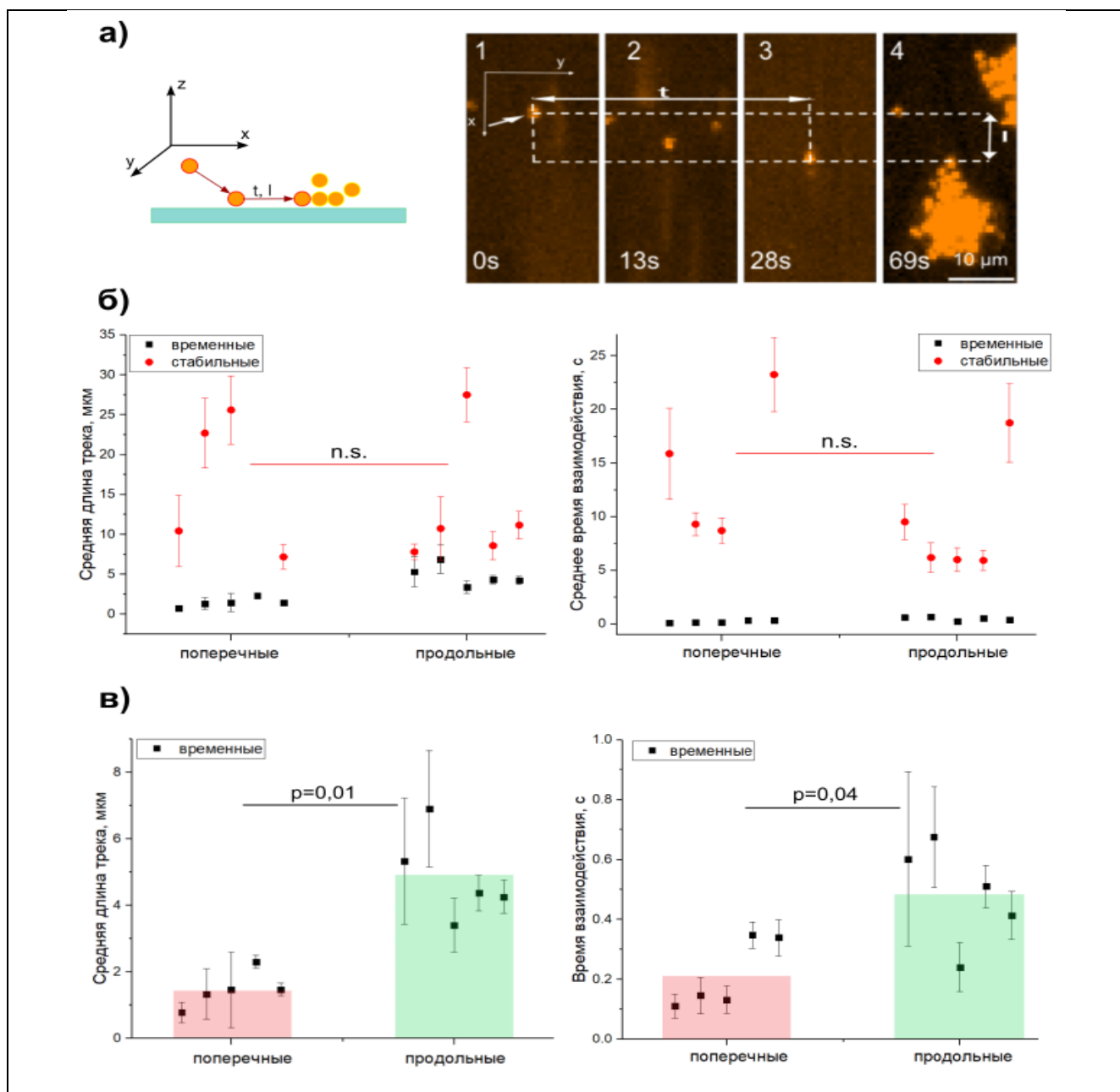


Рисунок 19 - Анализ динамики прикрепления одиночных тромбоцитов с использованием высокоскоростной визуализации. а. (слева) Схема прикрепления тромбоцитов к поверхности, покрытой коллагеном, с указанием изучаемых параметров. (справа). Последовательность эпифлуоресцентных изображений в разные моменты времени: 1) прикрепление тромбоцита, 2) перемещение, 3) стабильная адгезия, 4) образование тромба. Длина трека измеряется как расстояние между положениями тромбоцита 1) и 4), время взаимодействия - как интервал между 1) и 3). б. (слева) Длинны треков временных и стабильных тромбоцитов на поперечных и продольных фибриллах при  $2000 \text{ c}^{-1}$ . (справа) Времена взаимодействия временных и стабильных тромбоцитов на скорости сдвига  $2000 \text{ c}^{-1}$ . в. Данные о временных тромбоцитах из панели б. (слева) Длинны треков временных тромбоцитов на поперечных и продольных фибриллах при  $2000 \text{ c}^{-1}$ . (справа) Времена взаимодействия временных тромбоцитов при  $2000 \text{ c}^{-1}$ .

### 4.3 Исследование взаимодействия тромбоцитов с фактором фон Виллебранда и его распределения на коллагеновых волокнах

Известно, что адгезия тромбоцитов к коллагену при высоких скоростях сдвига происходит благодаря взаимодействию гликопротеина Ib (GPIb) тромбоцитов с фактором фон Виллебранда. Чтобы проверить, обусловлена ли усиленная адгезия тромбоцитов к продольным фибриллам при высокой скорости сдвига различиями во взаимодействии фактора фон Виллебранда с коллагеном, были использованы методы иммунофлуоресценции. Были проведены те же эксперименты, что и для изучения динамики отдельных тромбоцитов, но теперь с одновременным окрашиванием тромбоцитов и мультимеров фактора фон Виллебранда, используя высокое увеличение. Свободная от тромбоцитов плазма или цельная кровь с первичными антителами к ФВ прокачивалась через каналы с поперечными и продольными волокнами для последующего анализа окрашивания с использованием вторичных флуоресцентных антител.

Такая постановка эксперимента позволила изучить динамику адгезии тромбоцитов и одновременно отобразить распределение ФВ на коллагеновых волокнах. Она позволила показать, что в условиях высокой скорости сдвига ( $2000 \text{ c}^{-1}$ ) тромбоциты прикреплялись к ФВ-положительным волокнам коллагена и редко там, где нет сигнала ФВ (рисунок 20 а). Это означает, что иммунофлуоресцентное окрашивание сильно коррелировало с функциональными молекулами ФВ, поддерживающими адгезию тромбоцитов. На продольных волокнах треки тромбоцитов могли быть довольно длинными (рисунок 20 а), причем многие треки перекрывались с волокнами, окрашенными антителами к ФВ, на существенных участках (рисунок 20 б). Это подразумевает, что тромбоциты катились вдоль ФВ-положительных волокон, что, вероятно, объясняет увеличение времени взаимодействия и длины треков, наблюдавшееся для тромбоцитов, взаимодействовавших с продольными волокнами (рисунок 19 в). И, наоборот, на поперечных волокнах треки тромбоцитов были в основном короткими (рисунок 20 а), что указывает на короткие периоды прикрепления. Как и следовало ожидать,

перекрытия треков с сигналом ФВ на существенных участках поперечных волокон не наблюдалось (рисунок 20 б).

Таким образом, ориентация фибрилл коллагена существенно влияет на процесс первичной адгезии: тромбоциты двигались вдоль продольных фибрилл и только кратковременно прикреплялись к поперечным, ненадолго зависая позади них (рисунок 20 в). Тромбоциты, перемещающиеся вдоль фибрилл, часто останавливаются без прочной фиксации, возобновляя движение через короткий период времени.

Сравнение светлопольных и эпифлуоресцентных изображений показало, что только небольшая часть коллагеновых волокон окрашивалась антителами к ФВ. Эти ФВ-положительные волокна обычно были тонкими и едва заметными на светлопольных изображениях (рисунок 20 в). Эти результаты показывают, что только некоторые из иммобилизованных коллагеновых волокон связывали большое количество молекул ФВ и, следовательно, имели множество сайтов связывания GPIIb. Количественная оценка изображений не показала существенной разницы в интенсивности и общем количестве окрашенных волокон между ориентациями коллагена (рисунок 20 г). Это означает, что различия в адгезии тромбоцитов между поперечными и продольными коллагеновыми волокнами не могут быть объяснены различиями во взаимодействии ФВ с коллагеном. В соответствии с приведенными выше данными об адгезии одиночных тромбоцитов, количество тромбоцитов, пытающихся взаимодействовать с волокнами коллагена, одинаково для обеих их ориентаций (рисунок 21), что подтверждает идею о том, что общее количество сайтов связывания GPIIb сопоставимо в обеих постановках.

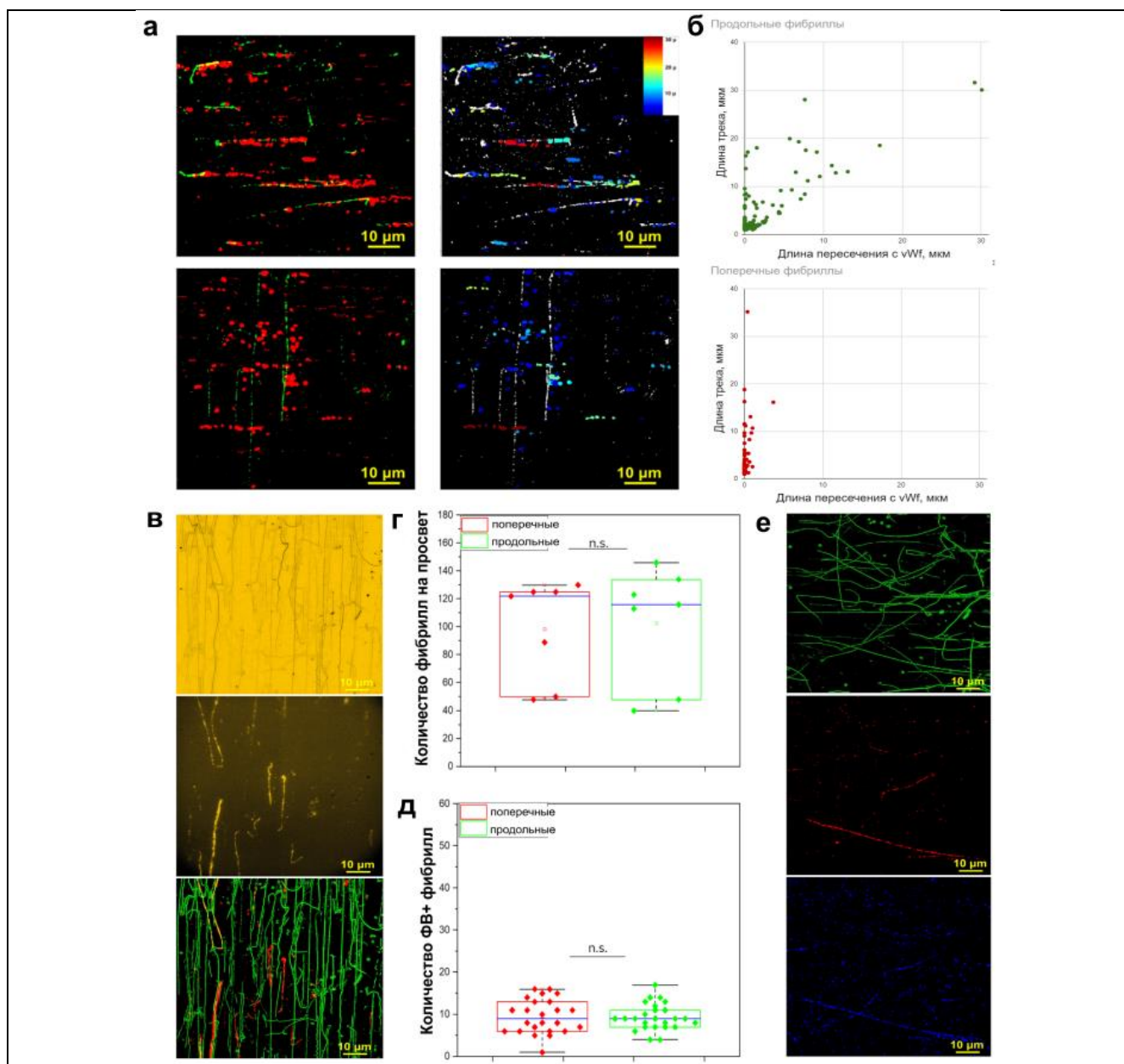


Рисунок 20 - Связывание ФВ с коллагеном и адгезия тромбоцитов. а. Антитела к ФВ (зеленый) и треки всех тромбоцитов, которые взаимодействовали с поверхностью за 80 секунд (красный). Справа: те же изображения; волокна коллагена показаны белым, треки тромбоцитов — цветом. Чем длиннее трек, тем цвет ближе к темно-красному. б. Длина трека от ее части, покрытой ФВ, для продольных (зеленый) и поперечных (красный) фибрилл в репрезентативных экспериментах с панели а. 1 точка = 1 тромбоцит. в. Покрытая коллагеном поверхность: на просвет (сверху), антитела к ФВ (посередине), наложение этих бинаризованных изображений (снизу; коллаген — зеленый, ФВ — красный). Увеличение: 40х. г. Количество фибрилл в области 130x130 мкм в светлпольных и д. эпифлуоресцентных (ФВ) каналах для поперечной (красный) и продольной (зеленый) ориентации фибрилл коллагена. е. Репрезентативные изображения покрытой коллагеном поверхности в: бинаризованном светлом поле (сверху), канале антител к ФВ (в центре), канале антител к коллагену III типа (снизу).

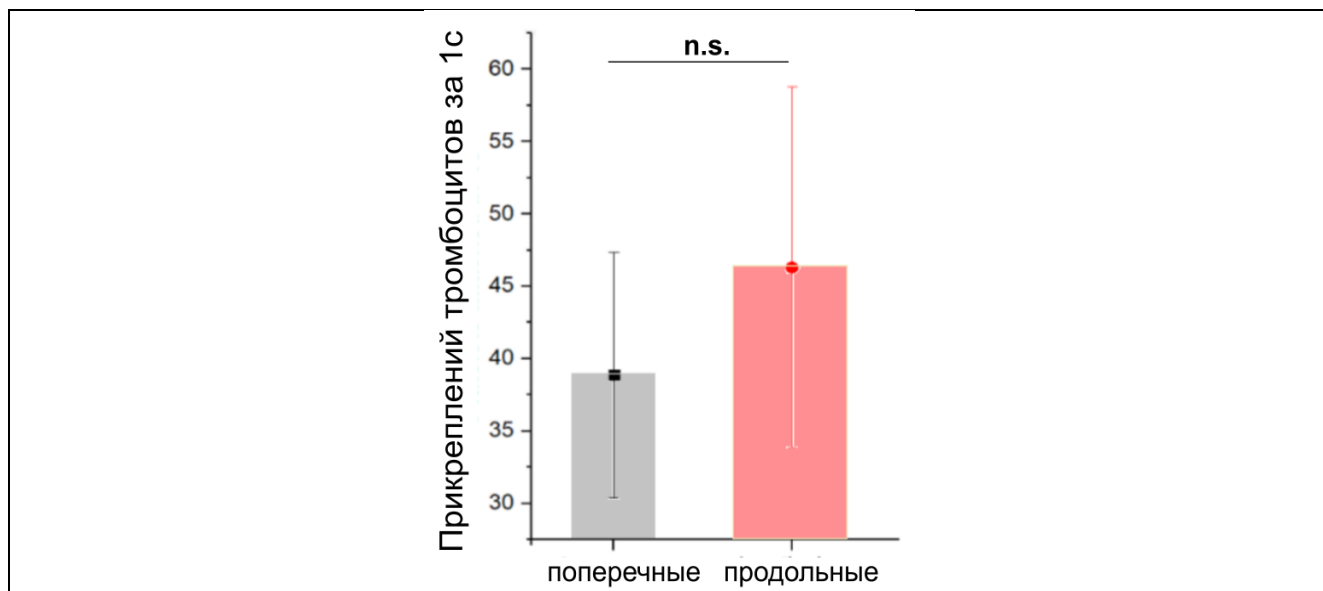


Рисунок 21 - Количество остановившихся на поверхности активатора в кадре (330x330 мкм) тромбоцитов за 1 секунду для поперечных (серый столбец) и продольных (красный столбец) коллагеновых волокон. Нет статистически значимых различий.

Далее было проведено исследование природы волокон, активно связывающих ФВ. Поскольку существуют исследования, показывающие более высокую аффинность ФВ к коллагену III типа [38; 37], был проведен иммунофлуоресцентный анализ, сочетающий окрашивание на фактор фон Виллебранда с антителами к коллагену III типа (рисунок 20 д). Чтобы количественно оценить корреляцию между фибриллами, положительными по ФВ и коллагену III типа, мы разработали алгоритм анализа изображений, который использовал как светлопольные, так и флуоресцентные изображения для интеграции сигналов вдоль видимых волокон. Анализ показал, что примерно 80% волокон, дававших сильный флуоресцентный сигнал в каждом из каналов, были положительными как по фактору Виллебранда, так и по коллагену III типа. Этот результат показывает, что за поддержание стабильной адгезии тромбоцитов при высоких скоростях сдвига отвечает примесь коллагеновых волокон III типа.

#### **4.4 Исследование динамики взаимодействия тромбоцитов с активатором и анализ гипотез о наблюдаемых различиях**

Чтобы глубже понять механизмы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов, были рассмотрены три гипотезы. Основная гипотеза предполагает, что для активации и стабильного прикрепления тромбоциту необходимо поддерживать контакт с коллагеном в течение достаточного времени. В случае взаимодействия с продольными волокнами во время первичной адгезии, тромбоциты могут перемещаться вдоль богатых ФВ фибрилл и, следовательно, иметь больше времени для активации. Это, в свою очередь, приводит к большему количеству стабильных тромбоцитов по сравнению с поперечной ориентацией волокон. Вторая гипотеза предполагает, что тромбоциту необходимо взаимодействовать с достаточным количеством сайтов на коллагене, активирующих GPVI, чтобы достичь стабильной адгезии. В этом случае продольные волокна коллагена будут более тромбогенными из-за больших расстояний, которые тромбоциты (в среднем) проходят вдоль таких фибрилл во время их первичной адгезии и, следовательно, взаимодействуют с большим количеством активирующих сайтов. Наконец, согласно третьей гипотезе, для достижения стабильной адгезии тромбоциту необходимо встретить некий «суперсайт» (например, участок с высокой плотностью сайтов, активирующих GPVI). В этом случае продольные волокна будут более тромбогенными из-за, по-видимому, более высокой вероятности встречи тромбоцитов с такими участками, поскольку (в среднем) тромбоциты перемещаются дальше и, следовательно, «сканируют» большие участки коллагена.

Интересно, что экспериментальные распределения времен взаимодействия временных тромбоцитов на обеих ориентациях фибрилл (рисунок 22 а) показывают резкий спад, приводящий к минимальному количеству тромбоцитов, находящихся в движении более 3-4 секунд. Важно отметить, что то же распределение, построенное для стабильных тромбоцитов, достигает максимума как раз через 3-4 секунды (рисунок 22 в), что подтверждает первую гипотезу, описанную выше: поскольку временные распределения, построенные для двух групп тромбоцитов

(временных и стабильных), имеют минимальное перекрытие, время взаимодействия, по-видимому, является основным фактором, позволяющим тромбоцитам стать стабильными. Интересно, что тот же анализ, проведенный для длины треков тромбоцитов (рисунок 22, б, г), показал значительное перекрытие в распределениях для временных и стабильных тромбоцитов. Это существенно снижает вероятность того, что тромбоцитам нужно пройти достаточно большое расстояние, чтобы активироваться, как предполагает вторая гипотеза.

Примечательно, что анализ средних скоростей тромбоцитов в зависимости от времени взаимодействия, проведенный для временных тромбоцитов, показал явное снижение средней скорости с увеличением времени взаимодействия (рисунок 22 з), подразумевая, что процесс активации тромбоцитов после начала их взаимодействия с коллагеном зависит от времени. Подробные графики зависимости расстояния от времени для одиночных временных тромбоцитов (рисунок 22 д, е) иллюстрируют сложную природу движения тромбоцитов: вместо того, чтобы двигаться с постепенно уменьшающейся с момента первичной адгезии скоростью, они демонстрировали множественные ускорения и замедления, перескакивали некоторые участки и замедлялись на других. Этот прерывистый характер движения тромбоцитов характерен для взаимодействия тромбоцитов с ФВ [52]. Однако тромбоциты, катящиеся по поверхности, покрытой ФВ, демонстрируют постоянную среднюю скорость, а не явное снижение, которое наблюдалось на коллагене (рисунок 22 д, е). Анализ треков отдельных стабильных тромбоцитов (рисунок 22 ё, ж) подтвердил более высокие скорости тромбоцитов на начальных этапах их перемещения, при этом показывая значительное снижение со временем.

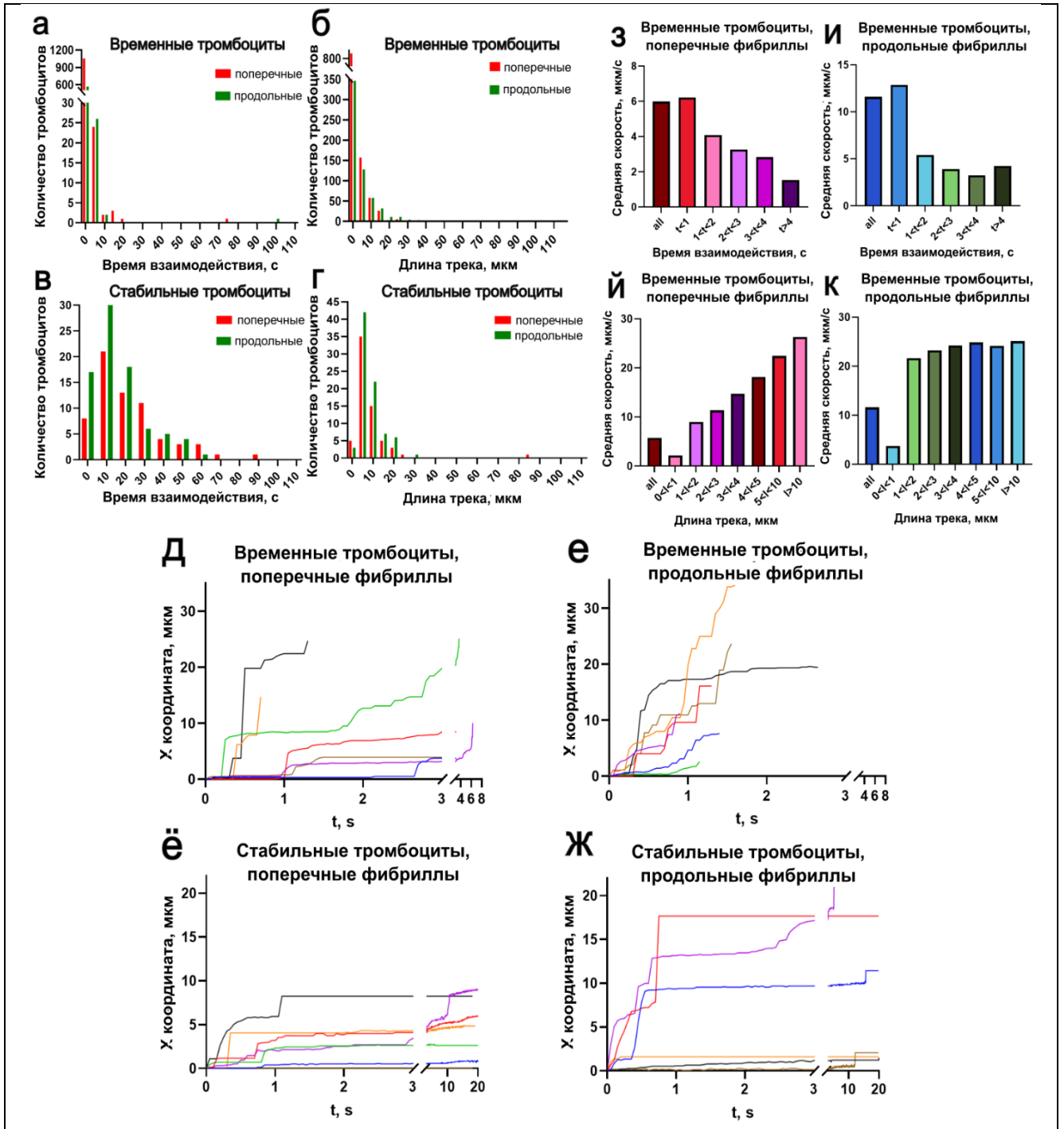


Рисунок 22 - Анализ динамики отдельных тромбоцитов. а-г. Распределения времен взаимодействия (а, в) и длин треков (б, г) отдельных тромбоцитов для временных (а, б) и стабильных (в, г) клеток. Красные столбцы - на поперечных волокнах; зеленые - на продольных. N=10. д-ж. Координаты отдельных тромбоцитов репрезентативного эксперимента как функции времени. Каждая цветная линия соответствует отдельной клетке. д, е: временные тромбоциты; ё, ж: стабильные, взаимодействующие с: д, ё: поперечными волокнами и е, ж: продольными волокнами. з-к. Распределение параметров временных тромбоцитов с интервалом в 1 секунду на поперечных (з) и продольных (и) фибриллах и 1 мкм для длин треков на поперечных (й) и продольных (к) фибриллах.

Таким образом, полученные результаты предлагают следующее объяснение наблюдаемым явлениям: поскольку тромбоцитам требуется некоторое время для активации, а при высоких скоростях сдвига их адгезия обусловлена взаимодействием с ФВ, продольные волокна коллагена III типа, эффективно связывающие ФВ, служат своего рода рельсами, которые способствуют стабильной адгезии: тромбоциты могут катиться вдоль волокна в направлении потока и не терять контакта с коллагеном, таким образом, имея достаточно времени для активации, в отличие от ситуации на поперечных волокнах (рисунок 23).

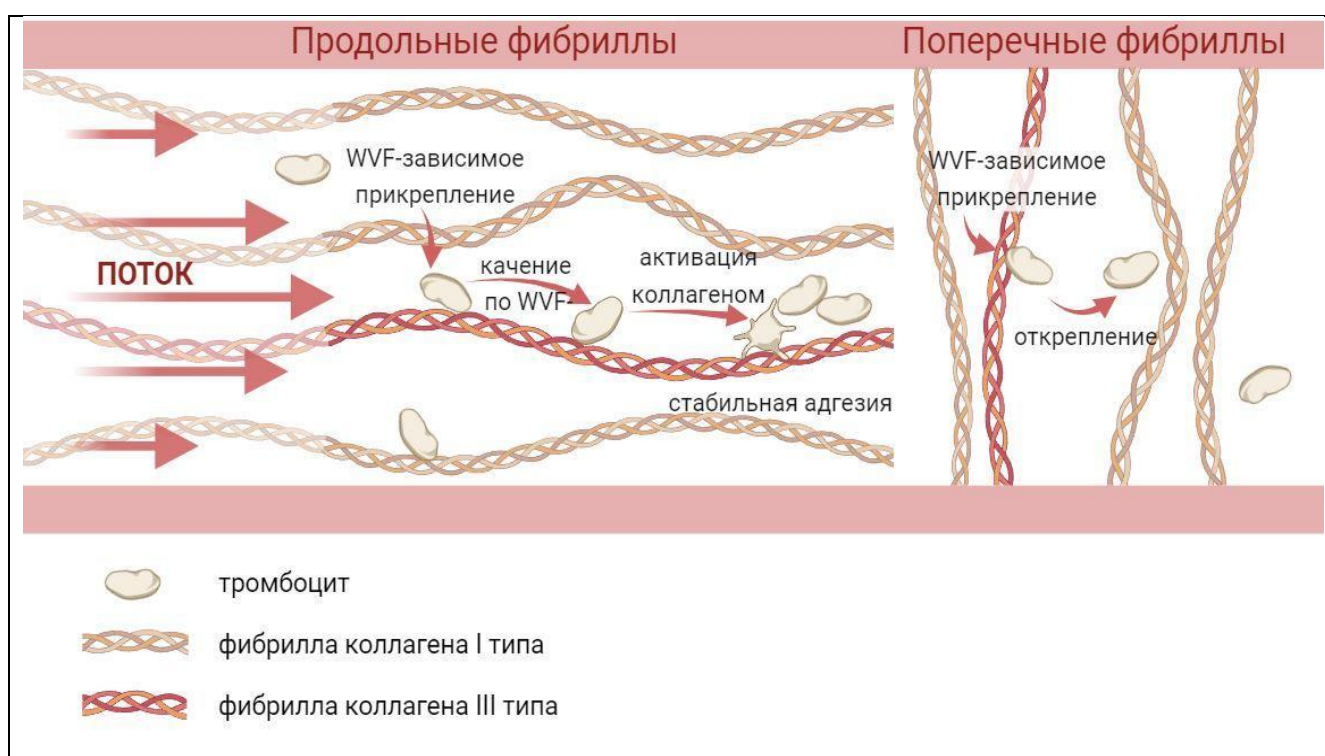


Рисунок 23 - Иллюстрация различий во взаимодействии тромбоцитов с продольными и поперечными волокнами коллагена при высоких скоростях сдвига.

## ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кровотечения и тромбозы – это две крайности одного процесса, связанные с нарушением функционирования сложной системы гемостаза, отвечающей за остановку кровопотери и поддержание целостности сосудистой стенки. Система гемостаза представляет собой многоуровневый механизм, в котором ключевую роль играют тромбоциты – мельчайшие клетки крови, способные быстро реагировать на повреждение сосуда. Их слаженная работа, от адгезии до агрегации и формирования тромба, является залогом успешной остановки кровотечения. Однако, когда в этом процессе возникают нарушения, это может приводить к серьезным жизнеугрожающим патологиям.

В связи со сложностью и многопараметричностью системы гемостаза, а также влиянием на нее многих факторов, таких как геометрия повреждения и состав субэндотелиального матрикса, диагностика нарушений в работе тромбоцитарного звена бывает затруднительной. Стандартные методы не всегда позволяют оценить функциональную активность тромбоцитов в организме и предсказать риск кровотечений или тромбозов. Именно поэтому поиск новых, более точных и информативных подходов к оценке состояния тромбоцитарного звена является актуальной задачей современной медицины.

Настоящая работа посвящена разработке надежной и физиологически релевантной методики, основанной на микрофлюидных технологиях и учитывающей такие факторы как поток и геометрия модели, а также изучению влияния геометрии и состава активатора на формирование тромбов. Задачей работы было создание инструмента, который позволит не просто фиксировать наличие проблемы, но и детально изучать механизмы формирования тромбов на клеточном уровне, имитируя условия, максимально приближенные к физиологическим.

В результате проделанной работы была создана и успешно апробирована система, способная с высокой точностью оценивать состояние тромбоцитарного

звена гемостаза. Также было впервые обнаружено влияние ориентации коллагеновых волокон на процесс формирования тромба и важность этого феномена для *in vitro* моделей тромбообразования. Развитие микрофлюидных технологий и углубление понимания механизмов формирования тромба в норме и патологии важно для развития диагностических инструментов, которые могут помочь своевременно обнаруживать и снижать риски тромбозов и кровотечений. Такие исследования также открывают новые возможности для тестирования лекарственных препаратов и индивидуального подбора доз ингибиторов и активаторов, что также важно для развития персонализированной медицины и улучшения качества жизни.

### **5.1 Итоги выполнения диссертационной работы**

По результатам работы создана и отлажена методика оценки состояния тромбоцитарного звена гемостаза на основе микрофлюидных технологий. Оптимизированы и стандартизованы такие параметры как: конфигурация системы, антикоагулянт, скорость сдвига, метод нанесения активатора и система подачи крови. Тест показал хорошую воспроизводимость для здоровых доноров. Апробация разработанной системы в клинической практике показала ее способность различать образцы крови здоровых доноров и пациентов с нарушениями в системе гемостаза, а также разделять пациентов с разной тяжестью клинических проявлений в случае иммунной тромбоцитопении (ИТП). Выгодными отличиями разработанной системы от существующих является использование локализованной области с активатором, что позволяет получить контрольную зону внутри системы, исключает смывание факторов активации вдоль потока, поглощение тромбоцитов тромбами выше по потоку и формирование агрегатов вне рабочей зоны. Кроме того, реологические параметры подобраны таким образом, что система обеспечивает не просто физиологически релевантные условия формирования тромбов, но и работает на пограничной скорости сдвига, обеспечивающей вовлечение фактора фон Виллебранда в процесс адгезии

тромбоцитов, что позволяет диагностировать как нарушения во взаимодействии тромбоцитов с коллагеном, так и патологии, связанные с функцией и количеством ФВ. Наблюдение формирования тромбов в режиме эпифлуоресценции дает возможность интегральной оценки функции тромбоцитарного звена гемостаза и регистрации площади покрытия активатора тромбами - стабильного и клинически релевантного параметра.

Таким образом, разработанный микрофлюидный тест представляется перспективным для применения в клинике, в том числе для оценки рисков кровотечений у доноров и пациентов с патологиями тромбоцитарного звена свертывания. Стоит отметить, что разработанная система, будучи интегральной, все же дает оценку только состоянию тромбоцитарного гемостаза. Интеграция плазменного звена в предложенную модель представляется перспективным направлением дальнейшей работы.

При помощи описанного подхода было изучено влияние параметров фибрилл коллагена на образование тромбов. Проведенное исследование показало, что ориентация фибрилл существенным образом влияет на формирование тромбов при высоких скоростях сдвига. Это открытие объясняет принципиальные различия в динамике формирования тромбов на коллагене, наблюдаемые исследовательскими группами по всему миру (рисунок 24).

Подробный анализ динамики изучаемых процессов показал, что наблюдаемые изменения связаны с первичными этапами взаимодействия тромбоцитов с волокнами коллагена. Высокоскоростная съемка и последующая обработка движения отдельных клеток показали, что для активации тромбоцитов необходимо их взаимодействие с волокнами коллагена в течение времени порядка нескольких секунд. Именно это обеспечивается сонаправленными с потоком фибриллами коллагена в условиях высоких скоростей сдвига и сил, действующих на тромбоцит со стороны потока. Полученные результаты соотносятся с литературными данными по активации тромбоцитов [131; 132].

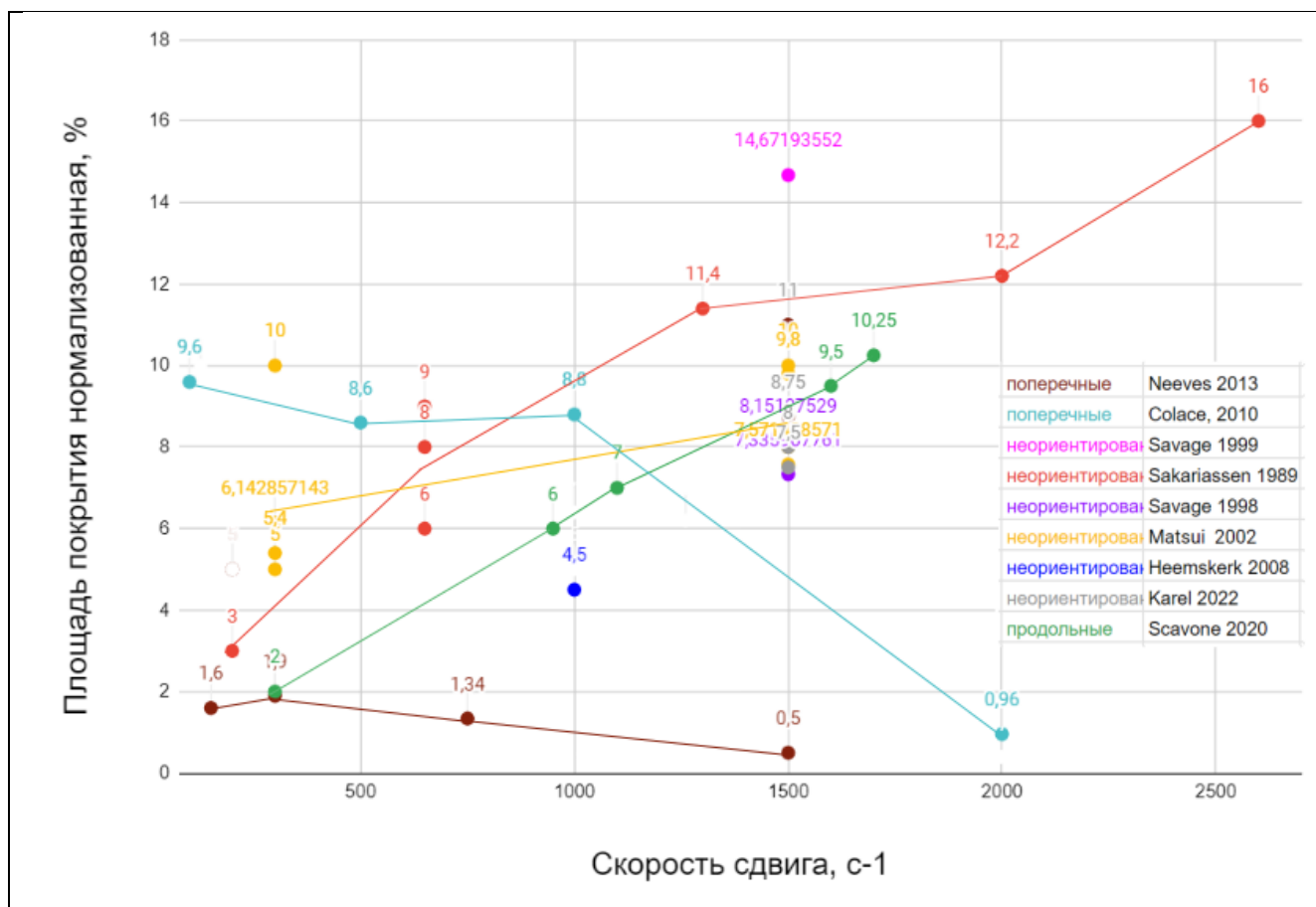


Рисунок 24 - Литературные данные по формированию тромбоцитарных агрегатов *in vitro* на коллагене I типа. Зависимость площади покрытия от скорости сдвига. Параметр - площадь покрытия, нормализованная на время перфузии. Ориентация волокон в эксперименте, а также источник данных отображены в правой части графика. Точки, принадлежащие одному эксперименту, окрашены в один цвет и соединены прямыми (при  $N > 1$ ).

Также было продемонстрировано, что стабильная адгезия тромбоцитов при высокой скорости сдвига обеспечивается фибриллами коллагена III типа, присутствующими в препарате коллагена I типа в качестве примеси. Показано, что эти фибриллы обладают значительно большей аффинностью к фактору фон Виллебранда, необходимому для адгезии клеток в исследуемых условиях.

Полученные результаты демонстрируют критическую важность параметров активатора для микрофлюидных экспериментов *in vitro* и позволяют делать предположения о роли фибрилл коллагена III типа и их ориентации *in vivo* в сосудах в норме и при повреждениях.

## 5.2 Перспективы дальнейшей разработки темы

Разработанный тест может быть использован в клинике для интегральной оценки функции тромбоцитарного звена гемостаза и подбора адекватных доз лекарственных препаратов, диагностики редких форм тромбоцитопатий и тестирования новых антиагрегантных препаратов. Перспективными направлениями являются адаптация системы для изучения взаимодействия тромбоцитов с другими компонентами субэндотелия и включение в модель плазменного звена гемостаза, что позволит производить полную интегральную оценку функционирования системы гемостаза в условиях потока, максимально приближенных к *in vivo*, что создаст ценный клинический инструмент для адекватной оценки и снижения рисков тромбозов и кровотечений. Кроме того, важным вектором дальнейших исследований является создание упрощенной и компактной версии устройства, пригодной для мониторинга состояния гемостаза непосредственно у постели пациента.

Обнаруженный эффект влияния ориентации фибрилл коллагена на формирование тромбов, а также выявленная роль фибрилл коллагена III типа в инициации тромбообразования открывают новые перспективы для *in vivo*-исследований системы гемостаза, подчеркивая физиологическую значимость продольной ориентации волокон и высокого содержания коллагена III типа в субэндотелиальном матриксе сосудов для быстрого запуска гемостатического ответа при высоких скоростях сдвига как в норме, так и при патологии. Полученные результаты также создают основу для дальнейшего развития микрофлюидных моделей гемостаза и подчеркивают критическую важность процедуры иммобилизации коллагена при их разработке и интерпретации экспериментальных данных.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана система для оценки состояния тромбоцитарного звена гемостаза на базе проточной камеры, в которой формирование тромбов в крови, взятой на гирудин, происходит на скорости сдвига  $1000 \text{ с}^{-1}$  в локализованной области, покрытой фибриллами коллагена I типа; при помощи флуоресцентной микроскопии измеряется площадь покрытия активатора тромбами через 5 минут перфузии.

2. Разработанная система различает здоровых доноров и пациентов с иммунной тромбоцитопенией и синдромом Вискотта-Олдрича на уровне  $p < 0.001$ . Более того, для ИТП результаты теста позволяют различать тяжесть состояния пациентов с надежностью (AUC) 0.92 против 0.75 и 0.8 для количества тромбоцитов и теста функциональной активности тромбоцитов соответственно.

3. На базе разработанной системы обнаружена зависимость формирования тромбов от ориентации фибрилл коллагена: с увеличением скорости сдвига продольные волокна становятся в разы более тромбогенными, чем поперечные.

4. Показано, что этот эффект объясняется различиями в начальных этапах тромбообразования: на высоких скоростях сдвига продольные коллагеновые волокна увеличивают время взаимодействия тромбоцитов с активатором, которое должно составлять более 2 секунд для стабильной адгезии.

5. Продемонстрирована неравномерность распределения ФВ по покрытой коллагеном поверхности: малая часть фибрилл, принадлежащая к примеси коллагена III типа, эффективно связывает фактор фон Виллебранда и обеспечивает адгезию тромбоцитов на высокой скорости сдвига.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При исследовании функции тромбоцитарного звена гемостаза критически важно соблюдать преаналитические требования, в особенности – завершение экспериментов в течение 2 часов (оптимально – 1.5 часов) от взятия крови. Результаты, полученные на более поздних временах существенно смещаются в сторону усиления тромбообразования.

2. При применении флуоресцентных красителей необходимо применять минимальные необходимые дозировки во избежание влияния растворителей, таких как диметилсульфоксид, на образцы крови. Также важно стандартизировать как можно более плавное перемешивание образцов.

3. При использовании трубок для подачи крови в проточные камеры необходимо минимизировать их длину, поскольку ее увеличение приводит к увеличению времени нормализации концентрации тромбоцитов в области над активатором.

4. При создании микрофлюидных тестов и анализе их результатов необходимо учитывать ориентацию фибрилл коллагена, так она существенным образом влияет на формирование тромбов. Продольные фибриллы значительно более тромбогенны на высоких скоростях сдвига, что приводит к увеличению площади покрытия активатора тромбами и разброса ее значений ввиду сложности и многофакторности процесса.

5. При анализе данных, полученных на препаратах коллагена I типа, стоит учитывать наличие в них естественной примеси фибрилл III типа и их вкладе в тромбообразование на высоких скоростях сдвига.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- ФВ - фактор фон Виллебранда (VWF)
- ИТП - иммунная тромбоцитопения
- PLC - фосфолипаза С
- АДФ – аденозиндифосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- GPVI - гликопротеин IV
- Syk - тирозинкиназа SYK
- PIP2 - фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
- IP3 - инозитол-1,4,5-трифосфата
- Ca<sup>2+</sup> - ион кальция
- DAG - диацилглицерол
- Ca/DAG-GEFI - кальций-диацилглицерол чувствительный гуанидиновый обменный фактор
- Rap1,2 - малые ГТФазы 1,2
- PKC - протеинкиназа С
- ТхА2 - тромбоксан А2
- PGI2 - простаглицин
- PLC $\gamma$ 2 - фосфолипаза С $\gamma$
- GPIb - гликопротеин Ib
- ADAMTS13 – металлопротеаза, расщепляющая мультимеры ФВ
- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 - гликопротеин IIb/IIIa
- $\alpha$ 2 $\beta$ 1 - гликопротеин Ia-IIa
- GPCR - рецепторы, сопряженные с G-белком
- ТФ - тканевой фактор
- PDMS - полидиметилсилоксан
- ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- R-Pack - D-фенилаланил-пролил-аргинилхлорметилкетон

DiOC6 - 3,3'-дигексилоксакарбоцианин иодид

P2Y12 - хеморецептор аденозиндифосфата

Arg - аргинин

Gly - глицин

Asp - аспарагиновая кислота

MQ - деионизированная вода

ПО - программное обеспечение

БСА - бычий сывороточный альбумин

PBS - фосфатно-буферный солевой раствор

WAS - синдром Вискотта-Олдрича

PLT - количество тромбоцитов в объеме крови

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Gaidai, O. Global cardiovascular diseases death rate prediction / O. Gaidai, Y. Cao, S. Loginov // *Current problems in cardiology*. – 2023. – Т. 48. – № 5. – С. 101622.
2. Пантелеев, М.А., Атауллаханов Ф.И. Свертывание крови: биохимические основы / М.А. Пантелеев, Ф.И. Атауллаханов // *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. – 2008. – Т. 1. – № 1. – С. 50–62.
3. Гемостаз и тромбоз. Пространственная организация биохимических процессов на микроуровне / М.А. Пантелеев, А.М. Шибeko, Д.Ю. Нечипуренко и др. // *Биологические мембраны*. – 2022. – Т. 39. – № 3. – С. 163–171.
4. Dahlbäck, B. Blood coagulation / B. Dahlbäck // *The Lancet*. – 2000. – Т. 355. – № 9215. – С. 1627–1632
5. Lowe, G.D. Virchow's triad revisited: abnormal flow / G.D. Lowe // *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. – 2003. – Т. 33. – № 5–6. – С. 455–457.
6. Favaloro, E.J. Clinical application of the PFA-100® / E.J. Favaloro // *Current Opinion in Hematology*. – 2002. – Т. 9. – № 5. – С. 407–415.
7. The Total Thrombus Formation (T-TAS) platelet (PL) assay, a novel test that evaluates whole blood platelet thrombus formation under physiological conditions / K.L. Zheng, H. Wallen, D. Aradi, и др. // *Platelets*. – 2022. – Т. 33. – № 2. – С. 273–277.
8. Epidemiology of coronary artery disease / J.P. Duggan, A.S. Peters, G.D. Trachiotis и др. // *Surgical Clinics*. – 2022. – Т. 102. – № 3. – С. 499–516.
9. Platelet signaling / T.J. Stalker, D.K. Newman, P. Ma и др. // *Antiplatelet agents*. – 2012. – С. 59–85.
10. Realtime in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse / S. Falati, P. Gross, G. Merrill-Skoloff и др. // *Nature Medicine*. – 2002. – Т. 8. – № 10. – С. 1175–1181.

11. Beltrami, E. The role of membrane patch size and flow in regulating a proteolytic feedback threshold on a membrane: possible application in blood coagulation / E. Beltrami, J. Jesty // *Mathematical Biosciences*. – 2001. – Т. 172. – № 1. – С. 1–13.
12. Furie, B. Molecular and cellular biology of blood coagulation / B.C. Furie, B. Furie // *New England Journal of Medicine*. – 1992. – Т. 326. – № 12. – С. 800–806.
13. Mann K.G. The role of the tissue factor pathway in initiation of coagulation / K.G. Mann, K. Cawthern, S. Butenas // *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. – 1998. – Т. 9. – С. S3–S7.
14. Thrombodynamics – A new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment / A.N. Balandina, I.I. Serebriyskiy, A.V. Poletaev и др. // *PLoS One*. – 2018. – Т. 13. – № 6. – С. e0199900.
15. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // *Онкогематология*. – 2014. – № 2. – С. 65–73.
16. Michelson, A.D. Methods for the measurement of platelet function / A.D. Michelson // *The American Journal of Cardiology*. – 2009. – Т. 103. – № 3. – С. 20A–26A.
17. In vitro flow based systems to study platelet function and thrombus formation: recommendations for standardization: communication from the SSC on Biorheology of the ISTH / P.H. Mangin, E.E. Gardiner, W.S. Nesbitt и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Т. 18. – № 3. – С. 748–752.
18. Coenen, D.M. Platelet interaction with activated endothelium: mechanistic insights from microfluidics / D.M. Coenen, T.G. Mastenbroek, J.M.E.M. Cosemans // *Blood*. – 2017. – Т. 130. – № 26. – С. 2819–2828.
19. Stegner, D. Platelet receptor signaling in thrombus formation / D. Stegner, B. Nieswandt // *Journal of Molecular Medicine*. – 2011. – Т. 89. – С. 109–121.
20. The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization / J.M.E.M. Cosemans, A. Angelillo-Scherrer, N.J. Mattheij и др. // *Cardiovascular Research*. – 2013. – Т. 99. – № 2. – С. 342–352.

21. Ruggeri, Z.M. Platelet adhesion under flow / Z.M. Ruggeri // *Microcirculation*. – 2009. – Т. 16. – №. 1. – С. 58-83.
22. Gibbins, J.M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation / J.M. Gibbins // *Journal of cell science*. – 2004. – Т. 117. – №. 16. – С. 3415-3425.
23. Bergmeier, W. Novel molecules in calcium signaling in platelets / W. Bergmeier, L. Stefanini // *Journal of thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Т. 7. – С. 187-190.
24. Shattil, S.J. The final steps of integrin activation: the end game / S.J. Shattil, C. Kim, M.H. Ginsberg // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2010. – Т. 11. – №. 4. – С. 288-300.
25. Stefanini, L. CalDAG-GEFI and platelet activation / L. Stefanini, W. Bergmeier // *Platelets*. – 2010. – Т. 21. – №. 4. – С. 239-243.
26. Nieswandt, B. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? / B. Nieswandt, S.P. Watson // *Blood*. – 2003. – Т. 102. – №. 2. – С. 449-461.
27. Shoulders, M.D. Collagen structure and stability / M.D. Shoulders, R.T. Raines // *Annual review of biochemistry*. – 2009. – Т. 78. – С. 929-958.
28. Tresoldi, I. Tendon's ultrastructure / I. Tresoldi, F. Oliva, M. Benvenuto // *Muscles, ligaments and tendons journal*. – 2013. – Т. 3. – №. 1. – С. 2.
29. Barnes, M.J. Collagens of normal and diseased blood vessel wall / M.J. Barnes // *Collagen*. – CRC Press, 2018. – С. 275-290.
30. Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen / Chow, M. J., Turcotte, R., Lin, C. P. и др. // *Biophysical journal*. – 2014. – Т. 106. – №. 12. – С. 2684-2692.
31. Moroi, M. Platelet glycoprotein VI: its structure and function / M. Moroi, S.M. Jung // *Thrombosis research*. – 2004. – Т. 114. – №. 4. – С. 221-233.
32. Structural insights into collagen binding by platelet receptor glycoprotein VI / L.J. Feitsma, H.C. Brondijk, G.E. Jarvis и др. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2022. – Т. 139. – №. 20. – С. 3087-3098.
33. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen: a dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to

- fibrous collagen / Y. Miura, T. Takahashi, S.M Jung и др. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Т. 277. – №. 48. – С. 46197-46204.
34. Platelets / A.D. Michelson, M. Cattaneo, A. Frelinger и др. – Academic press, 2019.
35. Weiss, H.J. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate-dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome / H.J. Weiss, V.T. Turitto, H.R. Baumgartner // *The Journal of laboratory and clinical medicine*. – 1978. – Т. 92. – №. 5. – С. 750-764.
36. Savage, B. Specific synergy of multiple substrate–receptor interactions in platelet thrombus formation under flow / B. Savage, F. Almus-Jacobs, Z. M. Ruggeri // *Cell*. – 1998. – Т. 94. – №. 5. – С. 657-666.
37. Implications for collagen I chain registry from the structure of the collagen von Willebrand factor A3 domain complex / T.H.C. Brondijk, D. Bihan, R.W. Farndale и др. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Т. 109. – №. 14. – С. 5253-5258.
38. Moroi, M. A mechanism to safeguard platelet adhesion under high shear flow: von Willebrand factor–glycoprotein Ib and integrin  $\alpha 2\beta 1$ –collagen interactions make complementary, collagen-type-specific contributions to adhesion / M. Moroi, S. M. Jung // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Т. 5. – №. 4. – С. 797-803.
39. Savage, B. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow / B. Savage, M. H. Ginsberg, Z. M. Ruggeri // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 1999. – Т. 94. – №. 8. – С. 2704-2715.
40. Mechanochemistry of von Willebrand factor / S. Lancellotti, M. Sacco, M. Basso и др. // *Biomolecular concepts*. – 2019. – Т. 10. – №. 1. – С. 194-208.
41. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress / A.J. Reininger, H.F. Heijnen, H. Schumann и др.// *Blood*. – 2006. – Т. 107. – №. 9. – С. 3537-3545.

42. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers / S.W. Schneider, S. Nuschele, A. Wixforth // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Т. 104. – №. 19. – С. 7899-7903.
43. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein / R. Fijnheer, C.J. M. Frijns, J. Korteweg и др. // *Thrombosis and haemostasis*. – 1997. – Т. 77. – №. 06. – С. 1081-1085.
44. FitzGerald, G.A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists / G.A. FitzGerald // *American Journal of Cardiology*. – 1991. – Т. 68. – №. 7. – С. B11-B15.
45. Santoro, S.A. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk / S.A. Santoro // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 1999. – Т. 93. – №. 11. – С. 3575-3577.
46. Pivkin, I.V. Blood flow velocity effects and role of activation delay time on growth and form of platelet thrombi / I.V. Pivkin, P.D. Richardson, G. Karniadakis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Т. 103. – №. 46. – С. 17164-17169.
47. A mechanically stabilized receptor–ligand flex-bond important in the vasculature / J. Kim, C.Z. Zhang, X. Zhang и др. // *Nature*. – 2010. – Т. 466. – №. 7309. – С. 992-995.
48. Analysis of morphology of platelet aggregates formed on collagen under laminar blood flow / T. Colace, E. Falls, X.L. Zheng и др. // *Annals of biomedical engineering*. – 2011. – Т. 39. – №. 2. – С. 922-929.
49. Begent, N. Growth rate in vivo of platelet thrombi, produced by iontophoresis of ADP, as a function of mean blood flow velocity / N. Begent, G.V.R. Born // *Nature*. – 1970. – Т. 227. – №. 5261. – С. 926-930.
50. The Roles of Akt1 and Akt2 in GPIb-IX-Mediated Platelet Activation Signaling / H. Yin, A. Stojanovic, N. Hay и др. // *Blood*. – 2007. – Т. 110. – №. 11. – С. 3635.
51. Varga-Szabo, D. Cell adhesion mechanisms in platelets / D. Varga-Szabo, I. Pleines, B. Nieswandt // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2008. – Т. 28. – №. 3. – С. 403-412.

52. GPIIb/IIIa-vWF rolling under shear stress shows differences between type 2B and 2M von Willebrand disease / L.A. Coburn, V.S. Damaraju, S. Dozic и др. // *Biophysical journal*. – 2011. – Т. 100. – №. 2. – С. 304-312.
53. de Groot, P.G. Platelet interaction with the vessel wall / P.G. de Groot, R.T. Urbanus, M. Roest // *Antiplatelet Agents*. – 2012. – С. 87-110.
54. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo / S. Massberg, M. Gawaz, S. Grüner и др. // *The Journal of experimental medicine*. – 2003. – Т. 197. – №. 1. – С. 41-49.
55. Atkinson, B.T. Activation of GPVI by collagen is regulated by  $\alpha 2\beta 1$  and secondary mediators / B.T. Atkinson, G.E. Jarvis, S.P. Watson // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Т. 1. – №. 6. – С. 1278-1287.
56. An activating mutation reveals a second binding mode of the integrin  $\alpha 2$  I domain to the GFOGER motif in collagens / F. Carafoli, S.W. Hamaia, D. Bihan и др. // *PLoS One*. – 2013. – Т. 8. – №. 7. – С. E69833.
57. Stalker, T.J. Shaping the platelet response to vascular injury / T.J. Stalker, J.D. Welsh, L.F. Brass // *Current opinion in hematology*. – 2014. – Т. 21. – №. 5. – С. 410
58. Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis / Z.M. Ruggeri // *Nature medicine*. – 2002. – Т. 8. – №. 11. – С. 1227-1234.
59. Microfluidic technology as an emerging clinical tool to evaluate thrombosis and hemostasis / B.R. Branchford, C.J. Ng, K.B Neeves и др. // *Thrombosis research*. – 2015. – Т. 136. – №. 1. – С. 13-19.
60. Diamond, S.L. Point of care whole blood microfluidics for detecting and managing thrombotic and bleeding risks / S.L. Diamond, J.M. Rossi // *Lab on a Chip*. – 2021. – Т. 21. – №. 19. – С. 3667-3674.
61. Sakariassen, K.S. Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy / K.S. Sakariassen, S.R. Hanson, Y. Cadroy // *Thrombosis research*. – 2001. – Т. 104. – №. 3. – С. 149-174.

62. High-throughput elucidation of thrombus formation reveals sources of platelet function variability / J.P. van Geffen, S.L. Brouns, J. Batista и др. // *Haematologica*. – 2018. – Т. 104. – №. 6. – С. 1256.
63. Muthard, R.W. Side view thrombosis microfluidic device with controllable wall shear rate and transthrombus pressure gradient / R.W. Muthard, S.L. Diamond // *Lab on a Chip*. – 2013. – Т. 13. – №. 10. – С. 1883-1891.
64. In vitro flow-based assay: From simple toward more sophisticated models for mimicking hemostasis and thrombosis / P.H. Mangin, K.B. Neeves, W.A. Lam и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2021. – Т. 19. – №. 2. – С. 582-587.
65. Sources of variability in platelet accumulation on type 1 fibrillar collagen in microfluidic flow assays / K.B. Neeves, A.A. Onasoga, R.R Hansen и др. // *PloS one*. – 2013. – Т. 8. – №. 1. – С. E54680.
66. Microfluidic devices for studies of shear-dependent platelet adhesion / E. Gutierrez, B.G. Petrich, S.J. Shattil и др. // *Lab on a Chip*. – 2008. – Т. 8. – №. 9. – С. 1486-1495.
67. Atherosclerotic geometries exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner / E. Westein, A.D. van der Meer, M.J. Kuijpers и др. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Т. 110. – №. 4. – С. 1357-1362.
68. Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions / J.M. Cosemans, M.J. Kuijpers, C. Lecut и др. // *Atherosclerosis*. – 2005. – Т. 181. – №. 1. – С. 19-27.
69. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation / S.M. de Witt, F. Swieringa, R. Cavill и др. // *Nature communications*. – 2014. – Т. 5. – №. 1. – С. 4257.
70. A microfluidic model of hemostasis sensitive to platelet function and coagulation / R.M. Schoeman, K. Rana, N. Danes и др. // *Cellular and molecular bioengineering*. – 2017. – Т. 10. – С. 3-15.

71. Asadov, A.E. In vitro models of thrombosis and hemostasis / A.E. Asadov, I.K. Chudinov, D.Y. Nechipurenko // *Systems Biology and Physiology Reports*. – 2021. – Т. 1. – №. 2. – С. 23.
72. Microfluidic assay of hemophilic blood clotting: distinct deficits in platelet and fibrin deposition at low factor levels / T.V. Colace, P.F. Fogarty, K.A. Panckeri и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Т. 12. – №. 2. – С. 147-158.
73. Microfluidic thrombosis under multiple shear rates and antiplatelet therapy doses / M. Li, N.A. Hotaling, D.N. Ku и др. // *PloS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 1. – С. e82493.
74. Incidence and consequences of resuming oral anticoagulant therapy following hematuria and risks of ischemic stroke and major bleeding in patients with atrial fibrillation / C.L. Wang, V.C.C. Wu, Y.T. Huang, и др. // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2021. – Т. 51. – С. 58-66.
75. Analysing responses to aspirin and clopidogrel by measuring platelet thrombus formation under arterial flow conditions / K. Hosokawa, T. Ohnishi, H. Sameshima и др. // *Thrombosis and haemostasis*. – 2013. – Т. 109. – №. 01. – С. 102-111.
76. Evaluation of a microfluidic flow assay to screen for von Willebrand disease and low von Willebrand factor levels / M. Lehmann, K. Ashworth, M. Manco-Johnson и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2018. – Т. 16. – №. 1. – С. 104-115.
77. High-throughput microfluidic blood testing to phenotype genetically linked platelet disorders: an aid to diagnosis / D.I. Fernandez, I. Provenzale, M. Canault и др. // *Blood advances*. – 2023. – Т. 7. – №. 20. – С. 6163-6177.
78. A shear gradient-activated microfluidic device for automated monitoring of whole blood haemostasis and platelet function / A. Jain, A. Graveline, A. Waterhouse и др. // *Nature communications*. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 10176.
79. Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling, and protein cleavage / N.J. Mattheij, A. Braun, R. van Kruchten и др. // *Faseb Journal*. – 2016. – Т. 30. – №. 2. – С. 727-737.

80. In vitro modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology / M. Tsai, A. Kita, J. Leach и др. // *The Journal of clinical investigation*. – 2011. – Т. 122. – №. 1.
81. Variable impairment of platelet functions in patients with severe, genetically linked immune deficiencies / M. Nagy, T.G. Mastenbroek, N.J. Mattheij и др. // *Haematologica*. – 2017. – Т. 103. – №. 3. – С. 540.
82. Ex vivo recapitulation of trauma-induced coagulopathy and preliminary assessment of trauma patient platelet function under flow using microfluidic technology / R. Li, H. Elmongy, C. Sims и др. // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. – 2016. – Т. 80. – №. 3. – С. 440-449.
83. A sample-to-result system for blood coagulation tests on a microfluidic disk analyzer / C.H. Lin, C.Y. Liu, C.H. Shih и др. // *Biomicrofluidics*. – 2014. – Т. 8. – №. 5.
84. A cartridge based sensor array platform for multiple coagulation measurements from plasma / O. Cakmak, E. Ermek, N.E. Kilinc и др. // *Lab on a Chip*. – 2014. – Т. 15. – №. 1. – С. 113-120.
85. Thrombin generation and fibrin formation under flow on biomimetic tissue factor-rich surfaces / A.A. Onasoga-Jarvis, T.J. Puls, S.K. O'Brien и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Т. 12. – №. 3. – С. 373-382.
86. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate / F. Shen, C.J. Kastrup, Y. Liu и др. // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2008. – Т. 28. – №. 11. – С. 2035-2041.
87. Gray, E. Heparin and low-molecular-weight heparin / E. Gray, B. Mulloy, T.W. Barrowcliffe // *Thrombosis and haemostasis*. – 2008. – Т. 99. – №. 11. – С. 807-818.
88. Effects of sodium citrate, low molecular weight heparin, and prostaglandin E1 on aggregation, fibrinogen binding, and enumeration of equine platelets / J.K. Kingston, W.M. Bayly, D.C. Sellon и др. // *American Journal of Veterinary Research*. – 2001. – Т. 62. – №. 4. – С. 547-554.

89. Xiao, Z. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor / Z. Xiao, P. Théroux // *Circulation*. – 1998. – Т. 97. – №. 3. – С. 251-256.
90. Heparin modulates integrin function in human platelets / M. Sobel, W.R. Fish, N. Toma и др. // *Journal of vascular surgery*. – 2001. – Т. 33. – №. 3. – С. 587-2A.
91. Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood-various anticoagulants are not equal / J. Golański, T. Pietrucha, Z. Baj и др. // *Thrombosis research*. – 1996. – Т. 83. – №. 3. – С. 199-216.
92. Microfluidic shear assay to distinguish between bacterial adhesion and attachment strength on stiffness-tunable silicone substrates / S. Siddiqui, A. Chandrasekaran, N. Lin и др. // *Langmuir*. – 2019. – Т. 35. – №. 26. – С. 8840-8849.
93. Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets ex vivo / D.J. Schneider, P.B. Tracy, K.G. Mann и др. // *Circulation*. – 1997. – Т. 96. – №. 9. – С. 2877-2883.
94. Pseudothrombocytopenia due to platelet clumping: a case report and brief review of the literature / G.C. Tan, M. Stalling, G. Dennis и др. // *Case reports in hematology*. – 2016. – Т. 2016. – №. 1. – С. 3036476.
95. Alpha IIb beta 3 integrin dissociation induced by EDTA results in morphological changes of the platelet surface-connected canalicular system with differential location of the two separate subunits / C. Gachet, D. Hanau, D. Spehner и др. // *The Journal of cell biology*. – 1993. – Т. 120. – №. 4. – С. 1021-1030.
96. Markwardt, F. Hirudin and derivatives as anticoagulant agents / F. Markwardt // *Thrombosis and haemostasis*. – 1991. – Т. 66. – №. 07. – С. 141-152.
97. Hirudin versus heparin for use in whole blood in vitro biocompatibility models / F. Bexborn, A.E. Engberg, K. Sandholm и др. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2009. – Т. 89. – №. 4. – С. 951-959.

98. Ruggeri, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions / Z.M. Ruggeri // *Journal of thrombosis and haemostasis*. – 2003. – Т. 1. – №. 7. – С. 1335-1342.
99. Sakariassen, K.S. The impact of blood shear rate on arterial thrombus formation / K.S. Sakariassen, L. Orning, V.T. Turitto // *Future science OA*. – 2015. – Т. 1. – №. 4. – С. FSO30.
100. Hosseinzadegan, H. Modeling thrombus formation and growth / H. Hosseinzadegan, D.K. Tafti // *Biotechnology and bioengineering*. – 2017. – Т. 114. – №. 10. – С. 2154-2172.
101. Wall shear rates in human and mouse arteries: Standardization of hemodynamics for in vitro blood flow assays: Communication from the ISTH SSC subcommittee on biorheology / M.A. Pantelev, N. Korin, K.D. Reesink и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2021. – Т. 19. – №. 2. – С. 588-595.
102. Traumatic vessel injuries initiating hemostasis generate high shear conditions / A.A. Yakusheva, K.R. Butov, G.A. Bykov и др. // *Blood advances*. – 2022. – Т. 6. – №. 16. – С. 4834-4846.
103. Platelet adhesion and aggregate formation controlled by immobilised and soluble VWF / M.F. Schneider, M.A. Fallah, C. Mess и др. // *BMC molecular and cell biology*. – 2020. – Т. 21. – С. 1-13.
104. Ruggeri, Z.M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation / Z.M. Ruggeri // *Thrombosis and haemostasis*. – 1997. – Т. 78. – №. 07. – С. 611-616.
105. Dziadek, M. Role of laminin-nidogen complexes in basement membrane formation during embryonic development / M. Dziadek // *Experientia*. – 1995. – Т. 51. – №. 9. – С. 901-913.
106. Voss, B. Localization of collagen types I, III, IV and V, fibronectin and laminin in human arteries by the indirect immunofluorescence method/ B. Voss, J. Rauterberg // *Pathology-Research and Practice*. – 1986. – Т. 181. – №. 5. – С. 568-575.

107. Ruggeri, Z.M. Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis / Z.M. Ruggeri // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2006. – Т. 36. – №. 2. – С. 145-147.
108. Magnusson, M.K. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications / M.K. Magnusson, D.F. Mosher // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 1998. – Т. 18. – №. 9. – С. 1363-1370.
109. Cho, J. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation/ J. Cho, D.F. Mosher // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Т. 4. – №. 7. – С. 1461-1469.
110. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin / S. Beumer, M.J. IJsseldijk, P.G. de Groot и др. – 1994.
111. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib / S. Beumer, H.F. Heijnen, M.J. IJsseldijk и др. – 1995.
112. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen / H. Ni, C.V. Denis, S. Subbarao и др. // *The Journal of clinical investigation*. – 2000. – Т. 106. – №. 3. – С. 385-392.
113. D'Souza, S.E. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif / S.E. D'Souza, M.H. Ginsberg, E.F. Plow и др. // *Trends in biochemical sciences*. – 1991. – Т. 16. – С. 246-250.
114. Preissner, K.T. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling / K.T. Preissner, D. Seiffert // *Thrombosis research*. – 1998. – Т. 89. – №. 1. – С. 1-21.
115. Izumi, M. Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma / M. Izumi, K.M. Yamada, M. Hayashi // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. – 1989. – Т. 990. – №. 2. – С. 101-108.
116. Asch, E. Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation / E. Asch, E. Podack // *The Journal of clinical investigation*. – 1990. – Т. 85. – №. 5. – С. 1372-1378.

117. Asch, E. Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice / E. Asch, E. Podack // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 1999. – Т. 93. – №. 6. – С. 1825-1830.
118. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice / D.T. Eitzman, R.J. Westrick, E.G. Nabel и др. // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2000. – Т. 95. – №. 2. – С. 577-580.
119. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice / S. Konstantinides, K. Schäfer, T. Thinner и др. // *Circulation*. – 2001. – Т. 103. – №. 4. – С. 576-583.
120. Vitronectin stabilizes thrombi and vessel occlusion but plays a dual role in platelet aggregation / A. Reheman, P. Gross, H. Yang и др. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2005. – Т. 3. – №. 5. – С. 875-883.
121. Savage, B. Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow / B. Savage, M.H. Ginsberg, Z.M. Ruggeri // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 1999. – Т. 94. – №. 8. – С. 2704-2715.
122. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis / G.A. Plenz, M.C. Deng, H. Robenek и др. // *Atherosclerosis*. – 2003. – Т. 166. – №. 1. – С. 1-11.
123. Barnes, M.J. Collagens of normal and diseased blood vessel wall / M.J. Barnes // *Collagen*. – CRC Press, 2018. – С. 275-290.
124. Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen / M.J. Chow, R. Turcotte, C.P. Lin и др. // *Biophysical journal*. – 2014. – Т. 106. – №. 12. – С. 2684-2692.
125. Structural inhomogeneity and fiber orientation in the inner arterial media / L.H. Timmins, Q. Wu, A.T. Yeh и др. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2010. – Т. 298. – №. 5. – С. H1537-H1545.
126. Layer-specific distributed collagen fiber orientations in human arteries, from thoracic aorta to common iliac / A.J. Schriebl, P. Regitnig, D.M. Pierce и др. // *Summer*

Bioengineering Conference. – American Society of Mechanical Engineers, 2011. – Т. 54587. – С. 5-6.

127. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues / R. Lattouf, R. Younes, D. Lutomski и др. // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. – 2014. – Т. 62. – №. 10. – С. 751-758.

128. Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification / I. Arganda-Carreras, V. Kaynig, C. Rueden и др. // Bioinformatics. – 2017. – Т. 33. – №. 15. – С. 2424-2426.

129. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis / J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise и др. // Nature methods. – 2012. – Т. 9. – №. 7. – С. 676-682.

130. Liu Y. et al. Methods for quantifying fibrillar collagen alignment //Fibrosis: methods and protocols. – 2017. – С. 429-451.

131. Role of platelet glycoprotein VI and tyrosine kinase Syk in thrombus formation on collagen-like surfaces / N.J. Jooss, I. De Simone, I. Provenzale и др. // International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 11. – С. 2788.

132. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo / S. Massberg, M. Gawaz, S. Grüner и др. // The Journal of experimental medicine. – 2003. – Т. 197. – №. 1. – С. 41-49.