

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

*На правах рукописи*

ПОНОМАРЕНКО Евгения Александровна

**Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции  
АДФ методом проточной цитометрии**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук,  
член-корреспондент РАН  
М. А. Пантелеев

Москва – 2023

Оглавление.....	2
Введение .....	5
Глава 1. Обзор литературы .....	14
1 Тромбоциты .....	14
1.1 Образование тромбоцитов.....	14
1.2 Строение тромбоцитов .....	19
1.3 Разрушение тромбоцитов .....	21
1.4 Функции тромбоцитов .....	22
1.4.1 Негемостатические функции тромбоцитов.....	22
1.4.1.1 Тромбоциты и ангиогенез.....	22
1.4.1.2 Тромбоциты и воспаление.....	23
1.4.1.3 Тромбоциты и заживление раны .....	23
1.4.2 Участие тромбоцитов в гемостазе .....	24
1.4.2.1 Адгезия.....	24
1.4.2.2 Активация и секреция гранул .....	25
1.4.2.3 Агрегация .....	28
2 Нарушения функции тромбоцитов .....	29
3 Методы лабораторной диагностики функциональной активности тромбоцитов.....	33
4 Функциональная активность тромбоцитов в детском возрасте .....	38
Глава 2. Материалы и методы.....	41
2.1 Материалы .....	41
2.2 Здоровые взрослые добровольцы и дети .....	41
2.3 Пациенты.....	43
2.4 Взятие крови .....	43
2.5 Исследование кинетики связывания антител.....	43
2.6 Исследование кинетики активации тромбоцитов АДФ .....	44
2.7 Исследование влияния преаналитических параметров на функциональную активность тромбоцитов.....	45
2.8 Тест функциональной активности тромбоцитов .....	45
2.9 Тест функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ.....	45
2.10 Протокол преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ.....	46
2.11 Протокол преактивации тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП ...	46
2.12 Исследование функциональной активности тромбоцитов после инкубации с тиагрелором и ибрутинибом <i>in vitro</i> .....	47

2.13 Проточная цитометрия тромбоцитов.....	47
2.14 Статистическая обработка данных.....	48
Глава 3. Результаты.....	49
3.1 Разработка протокола для исследования ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ методом проточной цитометрии.....	49
3.1.1 Исследование влияния аналитических параметров.....	49
3.1.2 Апробация протокола.....	56
3.1.2.1 Исследование функциональной активности тромбоцитов у здоровых взрослых добровольцев и здоровых детей при стимуляции АДФ.....	56
3.1.2.2 Исследование in vitro влияния тикагрелора на функциональную активность тромбоцитов при стимуляции АДФ.....	58
3.1.2.3 Исследование in vitro влияния ибрутиниба на функциональную активность тромбоцитов при стимуляции АДФ.....	58
3.1.2.4 Исследование функциональной активности тромбоцитов у пациентов на двойной антиагрегантной терапии при стимуляции АДФ.....	61
3.1.2.5 Исследование функциональной активности тромбоцитов у взрослых пациентов и детей с ИТП при стимуляции АДФ.....	63
3.1.3 Исследование влияния преаналитических параметров.....	69
3.2 Исследование возрастных изменений активационного ответа тромбоцитов на различные виды стимуляции у здоровых детей разных возрастных групп.....	72
3.2.1 Сравнение функциональной активности тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев в состоянии покоя.....	72
3.2.2 Сравнение активационного ответа тромбоцитов на разные виды стимуляции.....	73
3.2.3 Сравнение активационного ответа тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых на стимуляцию смесью CRP+SFLLRN.....	74
3.2.4 Сравнение активационного ответа тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев на стимуляцию смесью SFLRRN+AYPGKF+АДФ.....	76
3.2.5 Сравнение активационного ответа тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев на стимуляцию АДФ.....	79
3.3 Исследование влияния преактивации тромбоцитов на их активационный ответ на стимуляцию АДФ.....	81
3.3.1 Исследование влияния преактивации тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП на их активационный ответ на стимуляцию АДФ.....	81

3.3.2 Исследования влияния преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ на активационный ответ на стимуляцию тем же агонистом.....	83
3.3.3 Сравнение функциональной активности тромбоцитов, преактивированных низкой дозой АДФ и плазмой пациентов с ИТП...	85
Глава 4. Обсуждение результатов.....	87
4.1 Итоги выполнения диссертационной работы.....	93
4.2 Перспективы дальнейшего развития темы исследования .....	95
Выводы.....	96
Практические рекомендации.....	97
Список обозначений и сокращений.....	98
Библиографический список.....	100
Благодарности.....	121

## **Введение**

### **Актуальность темы исследования**

Тромбоциты выполняют в организме человека множество разнообразных функций, таких как участие в воспалительном ответе [1], ангиогенез [2], контроль целостности стенки сосуда и заживление ран [3]. Однако их главной функцией является остановка кровотечения – гемостатическая функция. Ее нарушения могут быть вызваны различными заболеваниями [4], возникновением опухолей [5], развитием сепсиса [6], а также приемом лекарственных препаратов [7] или травмой [8]. Последствиями нарушения гемостатической функции тромбоцитов являются развитие тромбозов или кровотечений, которые могут в дальнейшем приводить к летальному исходу. Таким образом, в области изучения тромбоцитарного гемостаза поиск надежного, информативного и стандартизованного метода оценки функциональной активности тромбоцитов является критически важной проблемой.

Существующие в настоящее время методы оценки функции тромбоцитов весьма разнообразны. Наиболее широко в клинической практике используется метод оптической агрегометрии. В этом методе используется множество различных агонистов тромбоцитов, одним из которых является аденозин дифосфат (АДФ) [9]. АДФ – уникальный агонист тромбоцитов. Он имеет на их поверхности два типа рецепторов [10]. Действуя через один тип рецепторов, он усиливает активирующее влияние других агонистов [11], а через другой – может стимулировать тромбоциты самостоятельно [12]. Тем не менее метод оптической агрегометрии обладает рядом недостатков, которых лишен метод проточной цитометрии. Однако в настоящее время нет единого протокола оценки функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии при стимуляции АДФ, в разных командах исследователей существуют собственные разработки протоколов, которые сильно отличаются между собой по множеству разных параметров [13–16].

Агрегация с АДФ применяется в диагностике наследственных тромбоцитопатий, которые манифестируют в детском возрасте [17,18]. Поэтому

исследование функции тромбоцитов у детей является актуальной проблемой. Известно, что гемостатическая функция тромбоцитов претерпевает изменения по мере взросления организма [19,20]. Исследования функциональной активности тромбоцитов новорожденных методом проточной цитометрии показывают ее снижение относительно тромбоцитов взрослых [21–23], однако подобные работы, касающиеся детей более старшего возраста немногочисленны, а их данные противоречивы: сообщают как о гипореактивности [24,25], так и о гиперактивности тромбоцитов детей [26]. Кроме того, нет единого представления относительно того, когда исчезают возрастные различия в функциональной активности тромбоцитов детей и взрослых [24–26]. Таким образом, становится очевидной необходимость исследования отличий функции тромбоцитов детей и взрослых для правильной интерпретации результатов оценки теста функциональной активности тромбоцитов, а также для правильной постановки диагноза в случае ее нарушения.

Одним из недостатков оптической агрегометрии является невозможность ее использования при низких концентрациях тромбоцитов [27], чего лишена проточная цитометрия. Поэтому этот метод можно применять при таких заболеваниях как иммунная тромбоцитопения (ИТП). Известно, что при ИТП в покое тромбоциты экспрессируют ряд маркеров их функциональной активности на более высоком уровне, чем в норме, являясь таким образом преактивированными [28,29]. Существуют литературные данные как о более слабом ответе преактивированных тромбоцитов на стимуляцию АДФ по сравнению с непреактивированными [29], так и об отсутствии отличий в активационном ответе между ними [30]. Таким образом, на сегодняшний день нет ответа на вопрос, как влияет преактивация тромбоцитов на их ответ на стимуляцию.

### **Степень разработанности темы исследования**

Оптическая агрегометрия считается «золотым стандартом» в оценке функциональной активности тромбоцитов при стимуляции различными агонистами, одним из которых является АДФ [9]. Она широко используется в клинической практике [17,18,31], однако требует использования большого объема крови [32,33] и не может быть использована при низких концентрациях

тромбоцитов [27]. Также этот метод не является чувствительным к молекулярным изменениям функциональной активности тромбоцитов. Все эти параметры можно оценить с помощью проточной цитометрии [34], однако метод плохо стандартизован, что затрудняет интерпретацию результатов и сравнение данных между различными группами исследователей. На сегодняшний день существуют исследования, в которых используются разнообразные протоколы оценки функции тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии, которые отличаются по концентрации тромбоцитов [13–15,35,36], панели используемых флуоресцентных маркеров [30,37–39], концентрации агониста [13,14,30,37], последовательности и длительности активации и окраски тромбоцитов [15,16], наличию и типу фиксатора для остановки реакции [13,38–40]. В настоящее время нет единого стандартного протокола оценки функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии при стимуляции АДФ.

Агрегометрия с АДФ используется в диагностике врожденных дефицитов и дефектов P2Y<sub>12</sub> рецептора [17,18], которые проявляются в детском возрасте. Для оптической агрегометрии показано отсутствие различий между тромбоцитами детей и взрослых [41,42]. В то же время методом проточной цитометрии было показано, что тромбоциты новорожденных обладают сниженной функциональной активностью в сравнении с тромбоцитами взрослых [23]. Однако данные касательно детей старше периода новорожденности противоречивы. С одной стороны, есть сообщения о более высоком уровне Р-селектина и уровне связывания PАС-1 тромбоцитов детей в сравнении с тромбоцитами взрослых на разные виды стимуляции, что свидетельствует об их гиперактивности [26]. С другой стороны, сообщают о сниженном активационном ответе тромбоцитов детей по сравнению с тромбоцитами взрослых, то есть об их гипореактивности [24,25]. Также нет четкого представления о том, в каком возрасте исчезают отличия в активности тромбоцитов детей и взрослых. В некоторых исследованиях говорится, что различия сохраняются до 18 лет [24], тогда как в других работах упоминаются отличия между взрослыми и детьми от 2 до 15 лет [25] и от 1 года до 14 лет [26].

Метод проточной цитометрии может использоваться при низких концентрациях тромбоцитов, например, при ИТП. Зачастую у таких пациентов встречаются кровотечения легкой и средней степени [43,44]. Предполагают, что это связано с тем, что их тромбоциты в состоянии покоя экспрессируют ряд маркеров на более высоком, чем в норме уровне, то есть являются преактивированными [28,29,36]. Однако данные касательно влияния преактивации тромбоцитов на их активационный ответ на стимуляцию АДФ противоречивы. С одной стороны, сообщают, что у преактивированных тромбоцитов пациентов с ИТП уровень Р-селектина и уровень связывания PAC-1 в ответ на стимуляцию статистически значимо ниже, чем у здоровых добровольцев [29]. С другой стороны, есть сообщения об отсутствии отличий по этим параметрам между тромбоцитами пациентов с ИТП и здоровыми донорами [30]. Таким образом, данные касательно способности преактивированных тромбоцитов отвечать на действие АДФ противоречивы, а данный вопрос требует дальнейшего изучения.

### **Цель работы**

Цель работы – разработать, провести стандартизацию и дать характеристику метода исследования активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ с помощью проточной цитометрии.

### **Задачи исследования**

1. Разработать метод исследования функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ с помощью проточной цитометрии.
2. Апробировать разработанный метод исследования на образцах крови здоровых добровольцев и кардиологических пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию.
3. Апробировать разработанный метод исследования на образцах крови пациентов с ИТП.
4. Исследовать возрастные изменения активационного ответа тромбоцитов на различные виды стимуляции у здоровых детей разных возрастных

групп. Определить возраст, когда исчезают различия в функциональной активности тромбоцитов детей и взрослых.

5. Исследовать влияние преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ и плазмой пациентов с ИТП на их активационный ответ на стимуляцию АДФ.

### **Научная новизна**

Разработан метод исследования активационного ответа тромбоцитов на активацию АДФ с помощью проточной цитометрии, обладающий высокой чувствительностью к стимуляции и приводящий к минимальному проценту образования агрегатов. Показано, что метод чувствителен к снижению активационного ответа у пациентов на двойной антиагрегантной терапии и к усилению активационного ответа у пациентов с ИТП.

Проведено сравнение функциональной активности тромбоцитов детей разных возрастных групп между собой и со взрослыми добровольцами. Также определен возраст, когда исчезают возрастные отличия в функциональной активности тромбоцитов между детьми и взрослыми.

Показано, что преактивация АДФ вызывает снижение активационного ответа на стимуляцию этим агонистом, преактивация плазмой пациента с ИТП – усиление.

### **Научно-практическое значение**

Пациентам, получающих двойную антиагрегантную терапию, состоящую из аспирина и ингибитора P2Y<sub>12</sub> рецептора, после чрезкожного коронарного вмешательства (ЧКВ) после ишемии миокарда, необходимо регулярно проводить мониторинг эффективности ингибирования функциональной активности тромбоцитов. Это связано с тем, что при недостаточном ингибировании повышается риск образования тромба на стенке и инфаркта миокарда – двух потенциально летальных осложнений. С другой стороны, слишком сильное ингибирование может повышать риск развития кровотечений. Разработанный протокол чувствителен к действию двойной антиагрегантной терапии на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ и потенциально может

использоваться для мониторинга эффективности ингибирования функции тромбоцитов в результате лечения.

Довольно часто наследственные нарушения функциональной активности тромбоцитов манифестируют в детском возрасте. В работе показаны отличия в функциональной активности тромбоцитов детей и взрослых и определен возраст, когда они исчезают. Это позволяет более правильно интерпретировать результаты теста функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии и облегчает диагностику врожденных дефектов их функции.

Данные литературы относительно влияния преактивации тромбоцитов у пациентов с ИТП на их ответ на стимуляцию противоречивы: сообщают как о более высоком активационном ответе по сравнению со здоровыми добровольцами, так и об отсутствии отличий. В работе показано, что преактивация тромбоцитов у пациентов с ИТП приводит к усилению ответа на стимуляцию АДФ, что позволяет предположить, что она не связана с действием агониста. Это, в свою очередь, улучшает наше понимание касательно функциональной активности тромбоцитов пациентов с ИТП. Кроме того, поскольку протокол является чувствительным к изменениям в активационном ответе тромбоцитов на стимуляцию АДФ у пациентов с ИТП, в будущем он потенциально может использоваться для мониторинга эффективности терапии.

### **Методология и методы исследования**

Для анализа влияния различных аналитических и преаналитических параметров на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ, исследования функциональной активности тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев, пациентов на двойной антиагрегантной терапии и пациентов с ИТП, исследования влияния различных видов преактивации тромбоцитов на их функцию использовался метод проточной цитометрии. Для статистического анализа полученных результатов использовалась программа OriginPro 8.0 (OriginLab, США).

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

1. Разработан высокочувствительный к стимуляции АДФ метод исследования функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии, приводящий к низкому проценту образования агрегатов.

2. В покое тромбоциты детей сходны с тромбоцитами взрослых, за исключением детей младшего возраста (от 1 года до 5 лет). При стимуляции тромбоциты детей умеренно гипореактивны (снижен выброс плотных и  $\alpha$ -гранул). Различия в функциональной активности тромбоцитов между детьми и взрослыми сохраняются до 18 лет.

3. Разнонаправленное действие преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ и плазмой пациентов с ИТП на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ позволяет предположить, что преактивация тромбоцитов у пациентов с ИТП связана не с действием агониста, а с действием антитромбоцитарных антител.

### **Личный вклад автора**

Все эксперименты по исследованию влияния аналитических и преаналитических параметров на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ, работа на проточном цитометре, исследование активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ у пациентов на двойной антиагрегантной терапии и пациентов с ИТП, исследование *in vitro* влияния тикагрелора и ибрутиниба на активационный ответ тромбоцитов на АДФ, исследование функциональной активности тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев при различных видах стимуляции, определение условий для преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ и плазмой пациента с ИТП, сравнение влияния разных видов преактивации тромбоцитов на их активационный ответ на стимуляцию АДФ, статистическая обработка данных, написание статей и тезисов для конференций по материалам диссертации проводились лично автором, либо при непосредственном участии автора.

## **Достоверность и обоснованность результатов**

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивалась использованием общепринятых методов, таких как проточная цитометрия, применением методов статистического анализа данных и достаточными объемами выборок. Достоверность результатов также обеспечивалась использованием аттестованных средств измерения, удовлетворительным уровнем погрешности измерений и согласованием полученных результатов с литературными данными.

## **Апробация работы**

Апробация диссертации проведена на совместном расширенном заседании лабораторий клеточного гемостаза и тромбоза, клеточной биологии и трансляционной медицины и клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России 26.09.2023 года, протокол №1.

Результаты работы были представлены на следующих конференциях: European Congress on Thrombosis and Hemostasis 2018 (Марсель, Франция, 24.10.2018-26.10.2018), 4th Euplan Conference (Брюгге, Бельгия, 19.09.2018-21.09.2018), Объединенный международный конгресс «Open Issues in Thrombosis and Hemostasis» совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и реологии (Санкт-Петербург, Россия, 04.10.2018-06.10.2018; 2 доклада), XXVII International Society on Thrombosis and Hemostasis Congress (Мельбурн, Австралия, 06.07.2019-10.07.2019), European Congress on Thrombosis and Hemostasis 2019 (Глазго, Шотландия, 02.10.2019-04.10.2019), V Конгресс гематологов России (виртуальный конгресс, 16.04.2020-18.04.2020), XXVIII International Society on Thrombosis and Hemostasis Congress (виртуальный конгресс, 12.07.2020-14.07.2020), 1<sup>st</sup> SBSP Congress (виртуальный конгресс, 07.12.2020-09.12.2020), XXIX International Society on Thrombosis and Hemostasis Congress (Лондон, Великобритания, 09.07.2022-13.07.2022), XXIV съезд Российского физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия, 11.09.2023-15.09.2023).

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России – 6, из них 6 – в журналах, индексируемых международными цитатно-аналитическими базами Web of Science и Scopus; в иных изданиях – 2; публикаций в трудах конференций и съездов – 11.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста и включает содержание, введение, литературный обзор и постановку задачи исследования (глава 1), описание материалов и методов (глава 2), результаты (глава 3) и их обсуждение (глава 4), заключение, выводы и список использованной литературы (199 библиографических источников, в том числе 195 – иностранных), список сокращений и обозначений и благодарности. Работа содержит 33 рисунка и 3 таблицы.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1 Тромбоциты

#### 1.1 Образование тромбоцитов

Тромбоциты – это мелкие безъядерные форменные элементы крови диаметром 2-4 микрометра [45]. Они циркулируют в крови в течение 7-10 дней, после чего разрушаются в селезенке и печени [46].

Предшественниками тромбоцитов являются гигантские клетки красного костного мозга – мегакариоциты. Они проходят через эндомитоз, процесс многократной репликации ДНК в отсутствие деления ядра и клетки [47,48]. Главный смысл эндомитоза – увеличение числа копий функциональных генов и синтетической активности мегакариоцита. Во время эндомитоза также запускается стадия созревания, при этом цитоплазма мегакариоцитов быстро наполняется органеллами, специфическими тромбоцитарными белками и системами, которые затем войдут в состав тромбоцитов. Во время созревания происходит увеличение размеров мегакариоцитов, и их цитоплазма приобретает уникальные особенности ультраструктуры, такие как плотная тубулярная система, гранулы и демаркационная мембранная система (ДМС), являющаяся самой яркой особенностью строения зрелых мегакариоцитов. Она представляет собой сложную сеть мембранных каналов, состоящих из уплощенных цистерн и трубочек, пронизывающих всю цитоплазму за исключением ее тонкого слоя на периферии. Предполагают, что ДМС образуется из трубчатых инвагинаций плазматической мембраны мегакариоцитов (Рисунок 1) [49]. Функция этой системы на данный момент не установлена. Изначально предполагалось, что она разделяет цитоплазму мегакариоцита на участки, из которых в дальнейшем образуются тромбоциты [50]. Однако данные других экспериментов позволяют предположить, что основной функцией ДМС является хранение резерва мембраны для образования тромбоцитов [51].

Большинство накопленных данных свидетельствуют в пользу теории образования тромбоцитов из протромбоцитов [52]. Термин «протромбоцит» используется для описания длинных (до нескольких миллиметров в длину) тонких удлинений цитоплазмы мегакариоцитов.

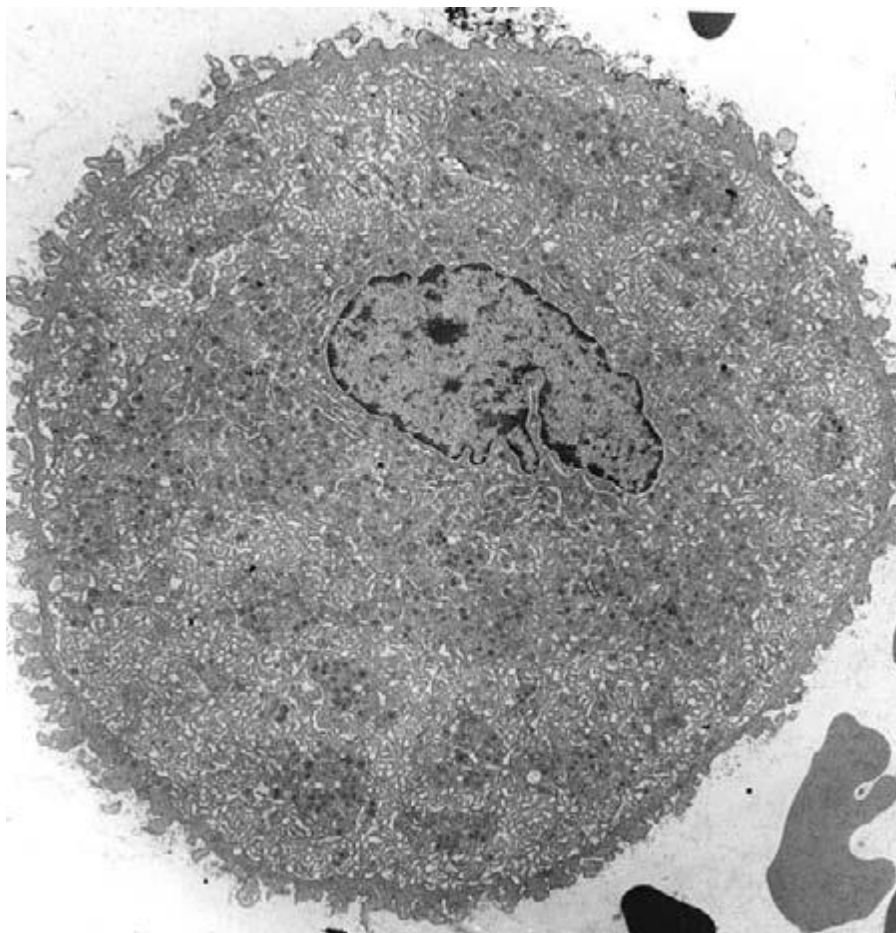


Рисунок 1 – Фотография электронной микроскопии среза через зрелый мегакариоцит, на которой хорошо видна ДМС (из [53])

Эти удлинения характеризуются множественными похожими размерами на тромбоциты расширениями, соединенными цитоплазматическими мостиками. Считается, что они представляют собой промежуточное звено формирования тромбоцитов из мегакариоцитов [54]. Образование протромбоцитов начинается с формирования толстых псевдоподий из мембраны мегакариоцита. Эти псевдоподии далее вытягиваются в виде тонких трубочек диаметром 2-4 микрометра, которые, в свою очередь, проходят через динамический процесс

изгибания и ветвления и образуют уплотнения, расположенные по всей своей длине. В итоге от мегакариоцита остается только обнаженное ядро, окруженное тонким слоем цитоплазмы. Созревание мегакариоцита завершается, когда под действием сократительных сил происходит отделение протромбоцитов (Рисунок 2). Считается, что дальнейшая деструкция цитоплазматических мостиков между похожими на тромбоциты размерами сегментами приводит к высвобождению отдельных тромбоцитов в кровотоки [55].

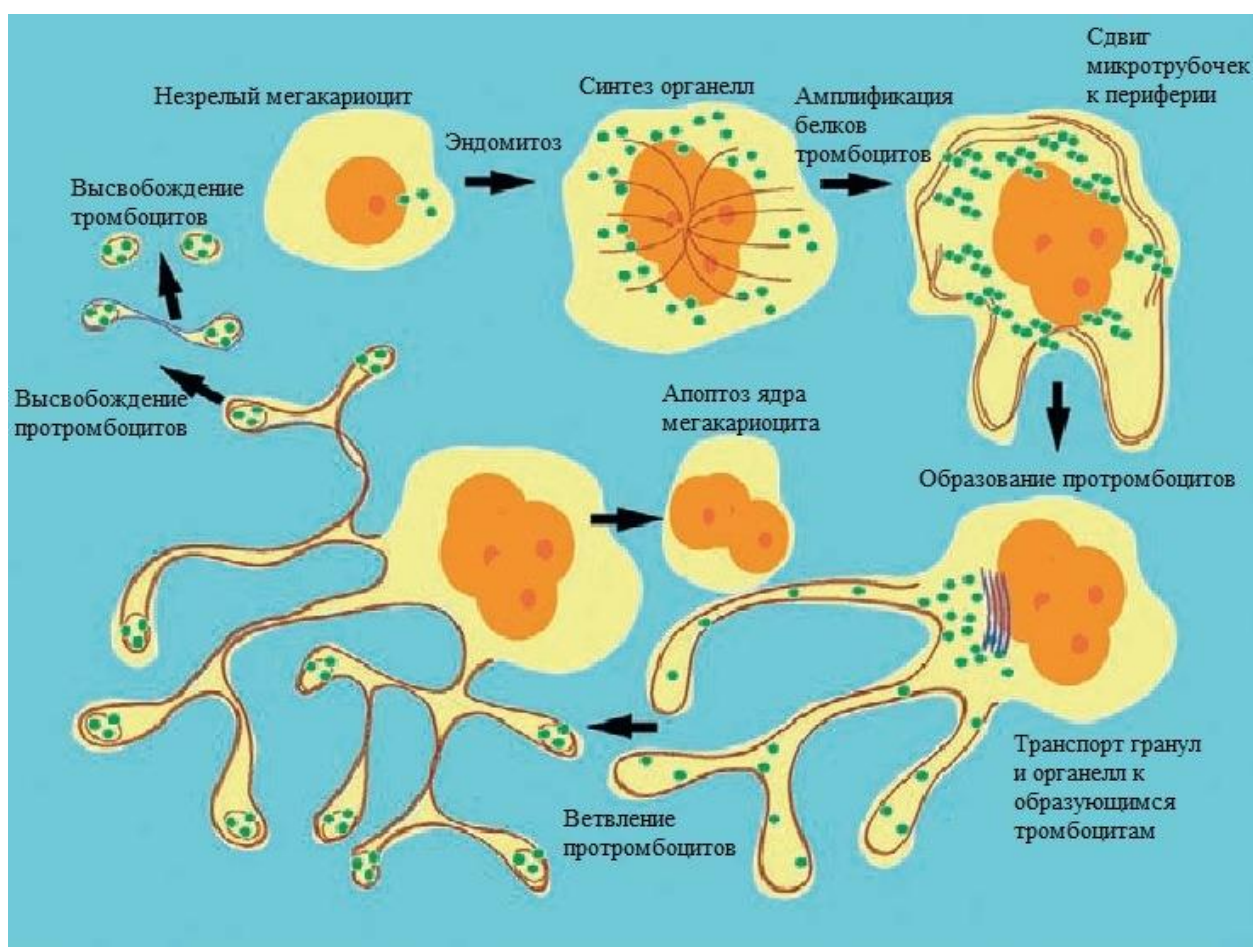


Рисунок 2 – Схема образования протромбоцитов и последующего высвобождения тромбоцитов из мегакариоцита (из [55])

Изменение формы мегакариоцита во время его созревания осуществляется за счет работы белков его цитоскелета [56]: актина и тубулина. Было показано, что действие на мегакариоциты веществ, деполимеризующих микротрубочки, таких как нокодазол и винкристин, блокирует образование протромбоцитов [57,58], что

указывает на зависимость этого процесса от работы микротрубочек. Они представляют собой полимеры, образованные из димеров  $\alpha\beta$ -тубулина. Во время образования протромбоцитов происходит их реорганизация. В незрелых мегакариоцитах микротрубочки собраны в спираль от центра к периферии. Когда начинается образование псевдоподий, микротрубочки периферии собираются в плотные пучки, расположенные непосредственно под плазматической мембраной этих структур [56,59]. Когда псевдоподии начинают удлиняться, микротрубочки образуют плотные тяжи, простирающиеся по своей длине протромбоцитов. Пучки микротрубочек самые плотные ближе к телу мегакариоцита и истончаются к концу протромбоцита. На дистальном конце каждого протромбоцита всегда образуется расширение размером с тромбоцит, содержащее пучок микротрубочек, который проходит под плазматической мембраной и снова соединяется с тяжами микротрубочек протромбоцита, образуя таким образом структуру, похожую на каплю. Поскольку спирали микротрубочек, похожие на те, которые обнаруживаются в тромбоцитах крови, располагаются только на концах протромбоцитов, а не во всех их расширениях, считают, что зрелые тромбоциты образуются только на их концах. Кроме того, тяжи микротрубочек выполняют еще одну важную функцию – «рельсов» для транспорта мембраны, органелл и гранул для образующихся на их концах тромбоцитов [60].

Из одного мегакариоцита образуются тысячи тромбоцитов [61,62]. Анализ данных микроскопии развития протромбоцитов *in vitro* позволил выявить, что количество концов протромбоцитов динамически увеличивается в результате многочисленных изгибов и разветвлений его тела [59]. Этот процесс завершается, когда тело протромбоцита образует острый изгиб, загибающийся затем обратно относительно себя, формируя петлю с микротрубочками внутри. Новая петля затем удлиняется, формируя новое тело протромбоцита, ответвляющееся в сторону от первоначального протромбоцита. В образовании изгибов и разветвлений участвует актиновый цитоскелет. Было показано, что мегакариоциты, на которые действовали веществами, нарушающими формирование актиновых филаментов цитоскелета, цитохалазином или латрункулином, могут образовывать лишь

длинные неразветвленные протромбоциты, имеющие на протяжении своей длины несколько расширений [59]. Механизмы участия актина в изгибании и ветвлении протромбоцитов, а также сигнальные пути, которые управляют этими процессами, пока остаются невыясненными. Существуют данные, согласно которым актиновые филаменты распределены по всему телу протромбоцита, а также накапливаются в его расширениях и в точках ветвления [59,63]. Возможно, что ветвлением и изгибанием протромбоцита управляет моторный белок миозин. Интересно отметить, что ингибирование гена тяжелой цепи-А немышечного миозина у человека приводит к развитию заболевания, называемого аномалией Мея-Хегглина [60,64], которое характеризуется тромбоцитопенией с гигантскими тромбоцитами. Также некоторые исследования указывают, что с актиновыми филаментами мегакариоцитов, образующих протромбоциты, взаимодействует протеинкиназа С (ПКС), а ингибирование ее работы или сигнальных путей интегринов нарушает этот процесс [63]. Тем не менее, роль работы актиновых филаментов в образовании тромбоцитов до конца не выяснена.

Помимо актиновых фиаментов и тубулиновых микротрубочек, в образовании тромбоцитов участвует также мембранный цитоскелет. Данные электронной микроскопии позволили выяснить, что протромбоциты содержат плотный спектринный мембранный цитоскелет, сходный по своей структуре с цитоскелетом тромбоцитов крови [65]. В мегакариоцитах, протромбоцитах и тромбоцитах в основном экспрессируются  $\alpha$ II- и  $\beta$ II-субъединицы спектрина, однако присутствуют также  $\alpha$ I- и  $\beta$ I-субъединицы. Сбор тетрамеров спектрина необходим для образования ДМС и производства протромбоцитов, поскольку экспрессия пептида, разрушающего эти тетрамеры, в мегакариоцитах нарушает оба эти процесса. Кроме того, тетрамеры спектрина участвуют в поддержании формы во время образования тромбоцитов.

*In vivo* протромбоциты простираются в сосудистые синусы красного костного мозга, где они отсоединяются от мегакариоцитов и выходят в кровоток. Относительно недавно было показано, что образование тромбоцитов продолжается в кровотоке и включает в себя еще одно промежуточное звено – претромбоциты

[66]. Термин «претромбоциты» обозначает «гигантские тромбоциты» (3-10 микрон) дискоидной формы, которые сохраняют способность превращаться в похожие на гантелю протромбоциты и расщепляются на отдельные тромбоциты.

## 1.2 Строение тромбоцитов

Внутри тромбоциты содержат мембранную систему, называемую открытой канальцевой системой, соединяющуюся с их поверхностью с помощью небольших отверстий [67,68]. Эта система является источником дополнительного мембранного материала, который необходим для изменения формы на сферическую, образования псевдоподий и распластывания по субстрату при активации[69]. Рядом с открытой канальцевой системой располагается плотная тубулярная система, являющаяся главным внутренним источником кальция, необходимого для изменения формы тромбоцита и секреции гранул (Рисунок 3) [70].

Тромбоциты содержат 2 типа секреторных гранул.  $\alpha$ -гранулы являются самыми многочисленными (50-80 на тромбоцит) [71]. Они содержат белковые соединения: фибриноген, фибронектин, витронектин, тромбоспондин, Р-селектин и многие другие [72]. Второй тип секреторных гранул – плотные гранулы. Они менее многочисленные по сравнению с  $\alpha$ -гранулами (3-8 на тромбоцит) и содержат низкомолекулярные соединения: АДФ, аденозинтрифосфат (АТФ), серотонин и другие[73]. Оба типа гранул выбрасываются при активации.

Кроме того, в состав тромбоцитов входят разнообразные органеллы. Среди них пероксисомы, участвующие в метаболизме липидов и синтезе фактора, активирующего тромбоциты (platelet-activating factor, PAF, [24]), около 7 митохондрий [71], являющихся основным источником энергии для жизнедеятельности тромбоцитов [74], лизосомы, содержащие кислые гидролазы (катепсин, гексозаминидаза,  $\beta$ -галактозидаза, арилсульфатаза,  $\beta$ -глюкуронидаза и кислая фосфатаза) [75], участвующие в фагоцитозе [76] и секреции [77].



Рисунок 3 – Фотографии ультраструктуры тромбоцитов, полученные с помощью электронной микроскопии (из [78])

Наконец, в составе тромбоцитов выделяют 3 элемента цитоскелета: тубулиновые микротрубочки, мембранный цитоскелет и актиновый цитоскелет. Микротрубочки собраны в спираль на периферии мембраны [79,80]. Они состоят из  $\beta$ 1-тубулина, изоформы, являющейся уникальной и характерной только для мегакариоцитов и тромбоцитов. Считается, что именно благодаря этой изоформе микротрубочки обладают гибкостью и могут поддерживать форму тромбоцитов [81,82]. Долгое время считалось, что в спираль свернута одна микротрубочка, однако было показано, что спираль состоит из нескольких коротких динамических микротрубочек, организованных своими плюс- и минус-концами вдоль спирали [83]. Мембранный цитоскелет состоит из спектриновых волокон, расположенных внутри плазматической мембраны тромбоцитов, а актиновый цитоскелет – из актиновых филаментов, расходящихся от центра к периферии [84]. Мембранный цитоскелет необходим для поддержания структуры и целостности плазматической мембраны, тогда как актиновый цитоскелет участвует в регуляции формы тромбоцитов и секреции содержимого их гранул [85,86].

### 1.3 Разрушение тромбоцитов

Существуют разнообразные способы вывода тромбоцитов из кровотока: разрушение в селезенке и других органах, «поглощение» для поддержания целостности сосудистой стенки, образование микровезикул, старение. Однако до сих пор не понятно, какой из способов используется для уничтожения какой фракции тромбоцитов [45]. Существуют несколько предположений о том, как активированные и стареющие тромбоциты выводятся из кровотока. Более раннее представление состоит в том, что такие тромбоциты экспрессируют больше фосфатидилсерина (ФС) на поверхности своей мембраны, в результате чего они подвергаются фагоцитозу в печени и других органах. В пользу этой модели говорят данные о том, что продолжительность жизни тромбоцитов определяется соотношением в цитоплазме про-апоптотических (например, BAX, BAK) и анти-апоптотических белков (например, BCL-2), причем по мере старения тромбоцита этот баланс сдвигается в сторону про-апоптотических белков [87]. Также показано, что воздействие на ингибитор BCL-2 АВТ-737 у мышей приводит к сокращению продолжительности циркуляции тромбоцитов [88]. В этих условиях вызванное апоптозом выставление ФС на поверхность тромбоцитов служит сигналом для клеток, осуществляющих фагоцитоз, к уничтожению таких тромбоцитов.

Второй механизм состоит в потере отрицательно заряженного остатка сиаловых кислот на поверхности стареющих тромбоцитов под действием сиалидаз. Обычно он встречается в комплексе гликопротеинов (ГП) Ib-V-IX, который экспрессируется на поверхности тромбоцитов в большом количестве. Такие десиалирированные тромбоциты затем узнаются асиалогликопротеиновым рецептором 1 печени. Следует отметить, что этот рецептор также сигнализирует клеткам печени о необходимости увеличения синтеза тромбопоэтина, таким образом стимулируя образование новых тромбоцитов [46,89]. Однако связь между десиалирированием и апоптозом до сих пор не выяснена. Еще одним фактором гибели тромбоцитов – напрямую или косвенно – может быть снижение количества РНК в стареющих тромбоцитах [90].

Помимо печени, разрушение тромбоцитов также потенциально может происходить в селезенке и легких [91]. Однако до сих пор не выяснено как тромбоциты распределяются между этими органами и их дальнейшая судьба.

## **1.4 Функции тромбоцитов**

В организме человека тромбоциты выполняют разнообразные функции, среди которых участие в процессах ангиогенеза [2], воспаления [1] и регенерации [3]. Однако самой важной является гемостатическая функция.

### **1.4.1 Негемостатические функции тромбоцитов**

#### **1.4.1.1 Тромбоциты и ангиогенез**

Ангиогенез – это динамичный, многоступенчатый процесс, включающий в себя образование и ветвление микрососудов на основе уже существующего сосудистого русла благодаря пролиферации, миграции и дифференцировке эндотелиальных клеток [92]. Отсутствие тромбоцитов ингибирует ранние стадии ангиогенеза и приводит к формированию меньшего числа сосудов. Кроме того, их участие необходимо для предотвращения кровотечений из новообразованных сосудов. Это указывает на центральную роль, которую играют тромбоциты в процессе ангиогенеза [93].

Клиническое применение исследований ангиогенеза имеет несколько основных направлений [2]. Во-первых, измерение ангиогенной активности различных типов опухолей как на основе прямой оценки плотности сетки микрососудов, так и с помощью количественной оценки про-ангиогенных белков, например, фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), в биологических жидкостях организма, используется для прогнозирования риска возникновения метастазов, рецидива опухоли и смерти от заболевания [94,95]. Вторым направлением является терапевтическое ускорение ангиогенеза с помощью введения про-ангиогенных факторов, например, FGF, для заживления язв[96], а также для восстановления кровоснабжения тканей после ишемической

болезни сердца [97]. Наконец, ингибирование ангиогенеза с помощью препаратов, подавляющих выработку про-ангиогенных факторов, например, интерферона (interferon, IFN) $\alpha$ -2a, способствует регрессии опухолей и увеличению продолжительности жизни пациентов [98,99]. Препараты, подавляющие выработку фактора роста эндотелия сосудов (vessel endothelial growth factor, VEGF) применяются в офтальмологии для терапии заболеваний, связанных с потерей зрения, которые вызваны образованием новых аномально крупных сосудов (неоваскуляризацией) [100,101].

#### **1.4.1.2 Тромбоциты и воспаление**

Известно, что  $\alpha$ -гранулы тромбоцитов содержат широкое разнообразие хемокинов, включая лиганд хемокина 1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1, CXCL1), фактор тромбоцитов 4 (platelet factor 4, PF4, также известный как CXCL4), CXCL5, CXCL7, интерлейкин (interleukin, IL)-8 (CXCL8), CXCL12, воспалительный белок макрофагов (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 $\alpha$  и лиганд хемокина 5 (chemokine (C-C motif) ligand 5, CCL5) [102]. Основное действие этих цитокинов состоит в привлечении лейкоцитов, регуляции их миграции через стенку сосуда в ткани и других провоспалительных функций, таких как фагоцитоз и образование активных форм кислорода [103].

Кроме того, тромбоциты играют важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний, например, ревматоидного артрита [104], системного склероза [105], воспалительных заболеваний кишечника [106] и болезни Альцгеймера [107].

#### **1.4.1.3 Тромбоциты и заживление раны**

На начальном этапе заживления раны активированные тромбоциты выбрасывают содержащиеся в их гранулах факторы роста и цитокины, регулирующие рекрутирование клеток иммунной системы, эндотелиальных клеток и фибробластов [108]. С точки зрения внутриклеточной сигнализации выброс и связывание VEGF с его рецептором на эндотелии (VEGF-R2) запускает мобилизацию ионов кальция и образование оксида азота, который затем

диффундирует через стенки эндотелиальных клеток и вызывает расслабление гладкомышечных клеток сосудов и вазодилатацию [109]. Такой механизм облегчает усиление притока крови к области повреждения, чтобы доставить необходимые вещества (кислород и глюкозу) и удалить продукты распада (углекислый газ, водород и лактат). Приток нейтрофилов нужен, чтобы очистить рану от инородных объектов, а появляющиеся следом лимфоциты и макрофаги секретируют факторы роста, чтобы усилить ангиогенез и производство коллагена фибробластами [110]. На основе этого принципа собственная обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) пациента, активированная и превращенная в тромбоцитарный гель, вводится в место повреждения, чтобы запустить процесс регенерации. Этот метод успешно применяют при лечении язв на ногах при диабете [111], в ортопедической хирургии [112], при тендините и регенерации мышц [113], для регенерации тканей в хирургии глаза и кардиохирургии [3,114] и даже в репродуктологии [115].

#### **1.4.2 Участие тромбоцитов в гемостазе**

Процесс гемостаза очень важен для остановки кровотечения. Во время первой волны происходит накопление тромбоцитов в месте повреждения [116]. Вторая волна – запуск реакций каскада свертывания [117]. Тромбоциты играют ключевую роль во время первой волны за счет адгезии, активации и агрегации. Помимо этого, они также активно участвуют в генерации тромбина, который значительно ускоряет реакции каскада свертывания. Таким образом, тромбоциты активно вовлечены в обе волны гемостаза [118–121].

##### **1.4.2.1 Адгезия**

При повреждении сосудистой стенки белки субэндотелиального матрикса, такие как коллаген, приходят в контакт с компонентами крови. Плазменный фактор Виллебранда (ФВ) связывается с коллагеном. Находящийся на поверхности тромбоцитов GPIIb/IIIa, являясь рецептором ФВ, взаимодействует с ним, что обеспечивает прикрепление тромбоцитов к месту повреждения [122,123]. Тем не

менее, такая адгезия не является стабильной [124]. После этого ГП VI взаимодействует с коллагеном, активируется и передает активационный сигнал внутрь тромбоцитов [122]. Стабильная адгезия к месту повреждения обеспечивается за счет связывания интегринов тромбоцитов с их лигандами на поверхности сосудистой стенки (например, интегрин  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  взаимодействует с фибриногеном/фибрином и фибронектином, интегрин  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$  – с фибронектином и коллагеном, интегрин  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  – с коллагеном) [118].

Кроме того, тромбоксан A<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>) и серотонин, секретируемые тромбоцитами, вызывают вазоконстрикцию, что вносит дополнительный вклад в остановку кровотечения [125].

#### 1.4.2.2 Активация и секреция гранул

Взаимодействие ГП VI с коллагеном вызывает активацию киназ семейства Src (SFK), в основном Lyn и Fyn, сцепленных с его цитоплазматическим доменом, которые затем фосфорилируют иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) цитоплазматического домена  $\gamma$ -цепи Fc-рецептора, нековалентно связанного с ГП VI [77, 78]. Фосфорилирование ITAM приводит к активации Syk киназы, которая затем фосфорилирует такие белки как линкер активированных T-клеток (linker of activated T-cells, LAT) и белок лейкоцитов, содержащий 2 SH-домена весом 76 кДа (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa, SLP-76). Это приводит к формированию сигнального комплекса, состоящего из LAT, SLP-76, тирозинкиназы Брутона (Bruton tyrosine kinase, Btk), белков Gads и  $\gamma\text{2}$ -цепи фосфолипазы C (phospholipase C, PLC-  $\gamma\text{2}$ ) [126]. Далее это приводит к активации PLC-  $\gamma\text{2}$ , которая в свою очередь гидролизует фосфатидилиозитол-4,5-дифосфат (phosphatidylinositol diphosphate, PIP<sub>2</sub>), из которого образуются инозитол 1,4,5-трифосфат (inositol triphosphate, IP<sub>3</sub>), стимулирующий мобилизацию ионов кальция, и диацилглицерол (ДАГ), активирующий ПКС. ПКС участвует в активации тромбоцитов напрямую через регуляцию аффинности рецептора



*Рецепторы тромбина.* Рецепторы тромбина называются рецепторами, активирующимися протеазой (protease-activated receptors, PAR), у человека на тромбоцитах находятся рецепторы PAR1 и PAR4, наиболее активным является PAR1. N-конец рецептора располагается снаружи и имеет сайт, который узнается тромбином и отщепляется. После этого образуется новый N-конец, который, играя роль прикрепленного лиганда, связывается со второй внеклеточной петлей рецептора. Эта связь приводит к конформационным изменениям в рецепторе и передаче сигнала внутрь тромбоцита [70]. Этот уникальный механизм активации является необратимым.

Активированные PAR1 и PAR4 рецепторы сцеплены с G12/13 и Gq-белками. Активация G12/13-белка приводит к активации Rho и Rho киназы, которая фосфорилирует и ингибирует фосфатазу легких цепей миозина, что в свою очередь усиливает фосфорилирование легких цепей миозина и сокращение актиновых волокон. Это приводит к изменению формы тромбоцита и секреции гранул [131]. Также через Gq-белок происходит активация PLC, что в дальнейшем приводит к активации интегринов и секреции гранул (Рисунок 4) [55].

*Рецепторы АДФ.* Рецепторы АДФ относятся к семейству P2-рецепторов, состоящему из двух классов: P2X ионных каналов (P2X1-7) и сцепленных с G-белком P2Y-рецепторов (P2Y1,2,4,6,11-14)[132]. На поверхности тромбоцитов представлены P2Y1 и P2Y12 рецепторы, а также P2X1 ионный канал, активирующийся АТФ [133].

P2Y1-рецептор сцеплен с Gq-белком, его активация приводит к активации  $\beta$ -изоформы PLC и к повышению концентрации ионов кальция внутри тромбоцита. Это, в свою очередь, вызывает активацию PKC, а затем – ГП Пб-Ша [134]. Это приводит к изменению формы тромбоцита и слабой агрегации (Рисунок 4) [135].

P2Y12-рецептор играет важную роль в усилении активационного сигнала под действием различных агонистов[136]. Кроме того, он усиливает агрегацию, инициированную вследствие активации P2Y1-рецептора [137] или другими агентами. Хотя АДФ сам по себе не может запускать секрецию гранул, он может ее усиливать посредством активации P2Y12-рецептора [138].

Этот рецептор сцеплен с Gi-белком [139], Gai2-субъединица которого активирует фосфоинозитид-3-киназу (PI3K) [140]. Ее мишенями являются протеинкиназа B/Akt (protein kinase B, PKB/Akt) и малая ГТФаза RAP1, активность которых поддерживает активное состояние ГП IIb-IIIa [141]. С другой стороны, Gai1-субъединица ингибирует работу аденилатциклазы (АЦ) и снижает уровень циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что само по себе не может приводить к агрегации тромбоцитов, однако усиливает ее (Рисунок 4) [142].

Таким образом, АДФ является уникальным агонистом тромбоцитов благодаря своей двойственной роли: он может как усиливать активирующее действие других агонистов, так и активировать тромбоциты самостоятельно. Это становится возможным благодаря двум типом рецептором на их поверхности.

*Рецептор тромбосана.* Рецептор тромбосана (TR) сцеплен с белками Gq и G12/13. Gq-белок активирует PKC-зависимый путь, способствующий агрегации тромбоцитов, тогда как G12/13-белок регулирует фосфорилирование легких цепей миозина и таким образом участвует в изменении формы тромбоцита (Рисунок ) [70].

В результате активации тромбоцитов их форма меняется с дискоидной на сферическую с образованием множества псевдоподий. Это происходит благодаря реорганизации актинового цитоскелета [143].

Наконец, активация тромбоцитов приводит к переходу ГП IIb-IIIa в активную форму, в результате чего он становится способен связывать растворимый фибриноген плазмы крови [144].

### **1.4.2.3 Агрегация**

Дальнейший рост тромбоцитарного агрегата происходит за счет того, что адгезированные тромбоциты связывают ФВ, с которым также связываются новые тромбоциты, рекрутированные к месту повреждения сосуда. Активация таких тромбоцитов, как уже было сказано выше, обеспечивается за счет АДФ и ТХА2, выброшенных активированными тромбоцитами. Кроме того, активированный ГП

IIb-IIIa связывает фибриноген, который прочно соединяет тромбоциты между собой, подобно «мостику» [117].

## 2 Нарушения функции тромбоцитов

Нарушения тромбоцитарного гемостаза могут быть вызваны снижением количества тромбоцитов (тромбоцитопенией) или же снижением их функциональной активности (тромбоцитопатией).

*Тромбоцитопатии.* Тромбоцитопатии можно разделить на наследственные и приобретенные.

*Наследственные тромбоцитопатии мембранных рецепторов.* Наследственные нарушения количества или работы мембранных рецепторов коллагена (ГП VI)[145] и ФВ (ГП IIb-IX-V) [146] приводят к нарушению адгезии тромбоцитов к субэндотелиальному матриксу. Среди таких нарушений наиболее хорошо изучен синдром Бернара-Сулье – аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутацией в генах, кодирующих ГП IIb или ГП IX. В результате наблюдается дефицит или нарушение работы комплекса ГП IIb-IX-V, что приводит к развитию макротромбоцитопении и кровотечения слизистых оболочек, проявляющееся обычно во младенчестве или детстве [147]. Тромбастения Гланцмана – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, при котором тромбоциты не могут агрегировать вследствие недостатка или нарушения работы ГП IIb-IIIa [148]. Как и при синдроме Бернара-Сулье, при тромбастении Гланцмана отмечается кровотечение слизистых оболочек в период младенчества, однако количество и морфология тромбоцитов остаются нормальными [149].

*Нарушения пула хранения гранул.* При этих нарушениях кровотечения возникают в результате снижения количества гранул, их содержимого или нарушения секреции. Дефицит  $\alpha$ -гранул приводит к развитию синдрома серых тромбоцитов [150]. Этот синдром вызван мутацией в гене NBEAL2, кодирующем белок, участвующий в мобилизации везикул [151]. Дефицит плотных гранул является наиболее распространенным нарушением пула хранения и делится на

дефицит, связанный с альбинизмом (синдром Германски-Пудлака и синдром Чедиака-Хигаси) и не связанный [152].

*Нарушения прокоагулянтной активности.* Плазматическая мембрана активированных тромбоцитов является поверхностью для сбора теназного и протромбиназного комплексов, активирующих фактор свертывания X и протромбин, соответственно [153]. Это становится возможным в результате выхода отрицательно заряженных фосфолипидов на внешний слой мембраны [154]. Нарушение выхода ФС во внешний слой мембраны приводит к развитию редкого заболевания, синдрома Скотта [155].

*Приобретенные тромбоцитопатии.* Приобретенные нарушения функциональной активности тромбоцитов могут быть вызваны приемом лекарств, например, аспирина [156], нарушающего синтез ТХА2 [157], или ибрутиниба [158], который является обратимым ингибитором Vtk. Несмотря на высокую эффективность и хорошую переносимость этого препарата, у большого числа пациентов в качестве побочного эффекта возникают кровотечения, в основном на слизистых оболочках и коже [159].

*Тромбоцитопении.* Тромбоцитопении можно разделить на имеющие иммунную природу и не имеющие.

*Неиммунные тромбоцитопении.* Причинами возникновения тромбоцитопении, не связанной с иммунной системой, могут являться снижение образования тромбоцитов в красном костном мозге, снижение продолжительности жизни тромбоцитов, циркулирующих в кровотоке, или увеличение уничтожения тромбоцитов при спленомегалии.

*Снижение продолжительности жизни тромбоцитов.* Продолжительность жизни тромбоцитов, циркулирующих в кровотоке, может быть снижена из-за сепсиса, диссеминирующего внутрисосудистого свертывания, тромбоцитарной тромбоцитопенической пурпуры, гемолитического уремического синдрома, преэклампсии/эклампсии, синдрома Казабаха-Мерритта и ряда других заболеваний [153]. Тромбоцитопения в этом случае развивается в результате лечения заболевания.

*Снижение образования тромбоцитов.* Снижение образования тромбоцитов может быть вызвано такими заболеваниями, как острый лейкоз и апластическая анемия, а также пересадкой красного костного мозга при возникновении опухолей (карциномы, лимфомы, миеломы) или супрессии его деятельности при химиотерапии, облучении или инфекции (ВИЧ, корь и другие заболевания) [153].

*Увеличение уничтожения тромбоцитов при спленомегалии.* В норме примерно 30% от количества циркулирующих тромбоцитов находится в селезенке [160], однако при спленомегалии (увеличении размеров селезенки) количество разрушающихся в ней тромбоцитов может быть увеличено [161].

*Наследственные тромбоцитопении.* Наследственные тромбоцитопении – группа редких заболеваний, связанных с наследственными нарушениями образования тромбоцитов, вызванных мутациями. Причины таких нарушений могут быть различными. Некоторые, например, синдромы Бернара-Сулье и Вискотта-Олдрича, включают в себя низкую концентрацию тромбоцитов и дефицит определенного белка. При других причиной возникновения кровотечений является неспособность мегакариоцитов образовывать тромбоциты в достаточном количестве. В некоторых случаях низкую концентрацию тромбоцитов сопровождают изменения в морфологии тромбоцитов, увеличение их размера [153]. Существуют разные подходы к классификации наследственных тромбоцитопений. Наиболее часто используют классификацию на основании обнаружения сопутствующих дефектов тромбоцитов, а также на основании их размера, который варьирует при различных заболеваниях. Также встречается классификация на основании способа наследования, однако его не всегда легко определить из-за возникновения спонтанных мутаций *de novo* или рецессивного типа наследования [70].

*Иммунные тромбоцитопении.*

*Аллоиммунная тромбоцитопения.* Аллоиммунная тромбоцитопения является следствием сенсибилизации к аллоантигенам тромбоцитов при переливании тромбоцитов или эритроцитов (пост-трансфузионная пурпура) или сенсибилизации организма матери к чужеродным антигенам плода при беременности,

напоминающей резус-конфликт (неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения) [162].

*Тромбоцитопения, вызванная приемом препаратов.* Существуют различные механизмы возникновения тромбоцитопении, вызванной приемом препаратов. Например, она может быть связана со снижением образования тромбоцитов вследствие применения химиотерапии при лечении рака. Кроме того, некоторые вещества, например, эстрогены, ингибиторы деацетилазы гистонов, антибиотики (линезолид), интерфероны, подавляют образование тромбоцитов из мегакариоцитов [153]. Также при приеме препаратов (нестероидные противовоспалительные препараты, пенициллин, абциксимаб, L-дофа) в организме могут образовываться антитела, которые связываются с гликопротеинами на поверхности тромбоцитов и способствуют их уничтожению иммунной системой [163].

*Иммунная тромбоцитопения.* ИТП - состояние, которое характеризуется снижением концентрации тромбоцитов ниже 100 тысяч в микролитре в присутствии нормального количества эритроцитов и лейкоцитов [164]. Основной причиной развития заболевания является возникновение в организме антител к собственным тромбоцитам [165]. Чаще всего это антитела к GPIIb/IIIa и GPIb [166]. Связывание антител с этими рецепторами приводит к их фагоцитозу в ретикулоэндотелиальной системе (в основном в селезенке). Такая ИТП называется первичной. Вторичная же ИТП является следствием заболевания, при котором происходит повышение производства антител: например, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), гипогаммаглобулинемии [167].

Основной целью при лечении ИТП является подъем концентрации тромбоцитов до «безопасного» уровня, который позволяет предотвратить возникновение кровотечений и минимизировать побочное действие лекарств. Для этого проводят терапию первой (кортикостероиды) и второй (удаление селезенки, ритуксимаб, интерферон) линии, чередуя их с периодами без терапии [55].

Несмотря на низкую концентрацию тромбоцитов, для пациентов с ИТП характерны проявления кровоточивости легкой и средней степени, что позволяет

предположить наличие у них более высокой степени функциональной активности тромбоцитов, чем у здоровых добровольцев [29]. Это предположение подтверждают данные исследований по проточной цитометрии тромбоцитов пациентов с ИТП: в них выше уровень Р-селектина и уровень связывания PАС-1 [36], что указывает на наличие преактивации. Кроме того, было показано, что такие преактивированные тромбоциты хуже отвечают на стимуляцию агонистами [168], в частности арахидоновой кислотой и АДФ, что указывает на ингибирование тромбоксанового пути активации и десенситизацию аденозиновых рецепторов, соответственно [169]. С другой стороны, есть данные о том, что преактивированные по уровню Р-селектина и уровню связывания PАС-1 тромбоциты пациентов с ИТП до начала терапии отвечают на стимуляцию АДФ в различных концентрациях так же хорошо, как тромбоциты здоровых добровольцев, что позволяет предположить отсутствие десенситизации пуриновых рецепторов в таких тромбоцитах [30]. Таким образом, данные касательно способности преактивированных тромбоцитов отвечать на действие агонистов противоречивы, а данный вопрос требует дальнейшего изучения.

### **3 Методы лабораторной диагностики функциональной активности тромбоцитов**

В настоящее время существует множество методов лабораторной диагностики, позволяющих оценивать функциональную активность тромбоцитов [9].

Наиболее широко распространен метод оптической агрегометрии, которая позволяет *in vitro* оценить способность тромбоцитов к агрегации благодаря их соединению друг с другом через GPIIb-IIIa.

В этом методе средой является обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП), в которой в состоянии покоя наблюдается максимальная оптическая плотность, поскольку тромбоциты распределены однородно [170]. При добавлении агониста происходит агрегация тромбоцитов и изменение их формы, за счет чего падает оптическая плотность. В зависимости от применяемых активаторов агрегация

может быть обратимой или необратимой. Разнообразные активаторы помогают идентифицировать множество нарушений функций тромбоцитов.

Часто встречающиеся активаторы в оптической агрегометрии включают АДФ, адреналин, коллаген, арахидоновую кислоту и ристоцетин. Агонисты, которые вызывают агрегацию без секреции гранул, например, АДФ, относятся к слабым агонистам. Соответственно, сильные, например, коллаген, – вызывают как агрегацию, так и секрецию гранул.

Ристоцетин способствует взаимодействию ФВ с комплексом GPIIb/IIIa-V, что позволяет обнаружить не только болезнь Виллебранда, но и нарушения функции тромбоцитов, как, например, синдром Бернара-Сулье [171].

Агрегация с адреналином позволяет определить повышенную активность тромбоцитов, а с коллагеном - выявить недостаточность секреции плотных и  $\alpha$ -гранул. Агрегация с низкими дозами этих агонистов используется при мониторинге лечения аспирином и антагонистами P2Y<sub>12</sub>-рецепторов [55].

Агрегация с АДФ широко используется в клинической практике для диагностики наследственного дефицита или дефекта P2Y<sub>12</sub>-рецептора [17,18], которые приводят к развитию кровотечений различной степени тяжести, а также повышенной кровоточивости после хирургической операции или травмы [172]. Оптическая агрегометрия со стимуляцией АДФ также применяется для оценки функциональной активности тромбоцитов пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) и после ишемии миокарда, которые получают двойную антиагрегантную терапию. В ее состав входят аспирин и ингибитор P2Y<sub>12</sub> рецептора. Недостаточное ингибирование функции тромбоцитов может приводить к таким потенциально летальным осложнениям, как образование тромбов на стенке и инфаркт миокарда. С другой стороны, ее избыточное ингибирование может приводить к развитию кровотечений.

Тем не менее, метод оптической агрегометрии имеет ряд недостатков. Сюда можно отнести длительную пробоподготовку, невозможность использования при низкой концентрации тромбоцитов (например, при ИТП) за счет низкой оптической плотности плазмы [27]. Метод требует взятия большого объема крови,

что затрудняет его использование в педиатрии [32,33]. Кроме того, метод не позволяет оценивать изменения функции тромбоцитов на молекулярном уровне: уровни экспрессии ГП на поверхности, связывание лигандов, секреция гранул [34].

Агрегаты малого размера могут быть обнаружены с использованием лазерного агрегометра. Оценка способностей тромбоцитов к активации и агрегации происходят за счет оценки изменений оптической плотности ОТП и среднего размера агрегата. За счет высокой чувствительности метода, его можно применять для исследования агрегации с низкими концентрациями агонистов [173].

Аналогичный принцип работы, как в оптической агрегометрии, используется в потической многоканальной агрегометрии в 96-луночной планшете (Optimul). В отдельные ячейки добавляют разные концентрации агонистов (АДФ, агонист рецептора тромбина (thrombine receptor activating peptide, TRAP-6), адреналин, арахидоновая кислота и ристоцетин). Затем к ним добавляют ОТП и помещают планшет в считыватель для определения светопропускания плазмы [174]. Этот метод позволяет одновременно проанализировать больше образцов, чем при оптической агрегометрии, и расширить спектр используемых агонистов и их концентраций [175]. Однако, на данный момент, этот метод используется только в специализированных лабораториях из-за плохой стандартизации [174].

В импедансной агрегометрии используют цельную кровь. Таким образом, отпадает необходимость подготовки образцов, а оценка функциональной активности тромбоцитов происходит в более физиологичных условиях. Когда в кровь добавляют агонист, образуются агрегаты, оседающие на электродах агрегометра. Это приводит к возрастанию сопротивления (импеданса) системы, на основании которого оценивают способность тромбоцитов к агрегации [176].

В случаях, когда обращение к лаборатории невозможно, применяют приборы для быстрой оценки способности тромбоцитов к агрегации. К ним относятся системы VerifyNow (ИТС, США) и Plateletworks (Helena Laboratories, США), с аналогичными принципами работы.

В системе VerifyNow используется картридж с покрытыми фибрином шариками, на которые агрегируют тромбоциты при добавлении агониста.

Агрегация пропорциональна количеству активированных GPIIb/IIIa [177] и увеличивает оптический сигнал светопропускания. В системе Plateletworks используются трубочки, покрытые АДФ или арахидоновой кислотой, а геманализатор подсчитывает количество тромбоцитов до и после агрегации [178].

Эти методы просты в использовании и не требуют проводить дополнительные операции с кровью. Они применяются для мониторинга антиагрегантной терапии [178].

Способность тромбоцитов к адгезии при высоких скоростях сдвига и агрегации в присутствии агониста оценивают с помощью анализатора PFA-100 (Siemens, Германия) и анализатора IMPACT (DiaMed, Швейцария). В PFA-100 цельная кровь проходит через капилляр с мембраной на конце, покрытой коллагеном, имеющей микроскопическое отверстие, покрытое агонистом, например, АДФ или адреналином. Время, за которое тромбоциты образуют агрегат, закрывающий отверстие, называется временем закупоривания апертуры, и оно является показателем работы всей системы гемостаза. С помощью анализатора можно установить причины нарушения функциональной активности тромбоцитов, будь то внешние факторы (например, лечение аспирином) или дефекты самих тромбоцитов (например, синдром Бернара-Сулье или тромбастения Гланцмана) [179]. В анализаторе IMPACT вращение конуса создает высокие скорости сдвига, при которых тромбоциты прикрепляются к полистероловой подложке. Прибор сам окрашивает тромбоциты и оценивает площадь поверхности, покрытой агрегатами, а также средний размер агрегата [180].

Скорость сдвига играет важную роль при исследовании функции тромбоцитов с помощью проточных камер [181]. Они изготавливаются из полидиметилсилоксана (PDMS), как субстрат могут быть использованы коллаген I или III типа, фактор Виллебранда, фибриноген, тканевой фактор и фибронектин. Можно задавать нужную скорость сдвига и регулировать рост тромба, регулируя поток жидкости через камеру [182]. Также проточные камеры позволяют изучать пути  $Ca^{2+}$  сигнализации, активации интегринов и секреции тромбоцитов – важные этапы образования тромба [183]. Однако, этот метод пока мало используется в

клинике, в основном из-за недостаточной стандартизации его применения и сборки камер [184].

Проточная цитометрия – это метод анализа клеток и их составляющих с использованием флуоресцентно-меченых антител [185]. В цитометре клетки проходят через поток ламинарный поток жидкости, за счет чего каждая клетка поочередно проходит через источник монохромного света. Меченные красителями антитела связываются с белками как на мембране клетки, так и внутри нее. Антитела, сопряженные с флуоресцентными красителями, способны связываться с определенными белками на клеточной мембране или внутри самой клетки. При прохождении через источник света молекулы флуоресцентного красителя возбуждаются и переходят на более высокий энергетический уровень. При возврате на свой уровень избыток энергии испускается в виде света, который регистрируется оптической системой прибора и затем переводятся в цифровую форму для дальнейшего анализа. Благодаря использованию красителей с разными длинами волн возбуждения («цветами») можно оценивать одновременно несколько параметров клетки (например, уровни экспрессии рецепторов, степень выброса плотных и  $\alpha$ -гранул) [186].

В клинической практике проточная цитометрия тромбоцитов пока используется только для диагностики заболеваний, связанных к дефицитом или дефектом определенного рецептора (ГП Ib - для синдрома Бернара-Сулье, ГП Ib-IIIa – для тромбастении Гланцмана). В остальных ситуациях, когда для постановки диагноза необходимо активировать тромбоциты, использование метода затруднено в виду его плохой стандартизации [9].

В частности, существуют разнообразные работы, посвященные разработке метода оценки активности тромбоцитов методом проточной цитометрии при стимуляции АДФ. Эти протоколы отличаются между собой по множеству разных параметров. Первым заметным отличием между протоколами является концентрация тромбоцитов. Некоторые исследователи окрашивают цельную кровь антителами в соотношении 1:1 [14,35,37], тогда как другие разводят кровь в соотношении 1:18 [13] -1:20 [15]. Далее, описываемые протоколы варьируют в

последовательности действий: сообщают как о последовательной [16], так и о параллельной активации и покраске тромбоцитов антителами [39]. Кроме того, сама панель используемых антител также отличается. Однако среди наиболее используемых можно выделить PAC-1 и антитело к фибриногену, анти-CD62p и анти-CD42b антитела [30,37]. Еще одним важным отличием является концентрация АДФ. В некоторых исследованиях используются 0,5 мкМ и 20 мкМ агониста [30,37], тогда как в других – 0,25 мкМ и 5 мкМ [13], 4,5 мкМ [39], 10 мкМ [16] и даже 30 мкМ [15]. Касательно времени инкубации тромбоцитов с антителами и АДФ, существуют сообщения о 10 минутах инкубации [16], а также о 8 минутах [38], 15 минутах [35] и 20 минутах [15] инкубации. Еще одним важным фактором является температура. Некоторые авторы инкубируют образцы при комнатной температуре [37,39], тогда как другие – при 37°C [15]. Наконец, во многих работах сообщают об использовании 10-15-кратного объема фиксатора для остановки реакции. Наиболее часто используемыми фиксаторами являются раствор параформальдегида (ПФА) [37] или ПФА-содержащий буфер [40] и CellFix [13].

#### **4 Функциональная активность тромбоцитов в детском возрасте**

Известно, что система гемостаза человека не является неизменной с рождения, а претерпевает изменения по мере взросления организма [19,20]. Довольно хорошо изучены различия первичного гемостаза между новорожденными и взрослыми. Показано, что ФВ у новорожденных содержится в более высокой концентрации, а также его активность выше, чем у взрослых [187]. Кроме того, их фибриноген существует в так называемой «фетальной» форме, которая отличается повышенным содержанием сиаловой кислоты и фосфата [188,189]. По мере взросления организма происходят изменения структуры фибриногена, благодаря он переходит во «взрослую» форму [190]. Также было показано, что концентрация ФВ у новорожденных снижается в течение первого года жизни до концентрации, которая встречается у взрослых [191]. Что касается тромбоцитарного гемостаза, известно, что у новорожденных тромбоциты имеют меньший размер, в них меньше плотных гранул в состоянии покоя. При

стимуляции они хуже выбрасывают гранулы обоих типов, у них ниже уровень экспрессии ГП IIb-IIIa, а также они хуже меняют форму, чем тромбоциты взрослых. Все это указывает на более низкую функциональную активность тромбоцитов новорожденных по сравнению с тромбоцитами взрослых [21,22]. У недоношенных новорожденных размер тромбоцитов еще меньше, уровень экспрессии ГП IIb-IIIa в состоянии покоя и при активации еще ниже, еще сильнее снижен процент фосфатидилсерин-положительных (ФС+) тромбоцитов, плотных гранул еще меньше, еще сильнее снижен выброс гранул обоих типов, они еще хуже меняют форму при активации, чем тромбоциты взрослых. Более того, они хуже меняют форму, имеют более низкий уровень экспрессии ГП IIb-IIIa и хуже выбрасывают гранулы обоих типов, чем тромбоциты доношенных новорожденных [23,192].

Однако исследования касательно функциональной активности тромбоцитов детей старше периода новорожденности немногочисленны, а их данные противоречивы. В исследованиях с помощью агрегометрии разницы между тромбоцитами детей и взрослых обнаружено не было. Это позволяет предположить, что референсные интервалы значений параметров, которые используются для взрослых, могут применяться также к детям старше 1 года [41,42]. Исследования активности тромбоцитов детей с помощью проточной цитометрии также немногочисленны. С одной стороны, сообщают о более высоком уровне Р-селектина  $\alpha$ -гранул и более высоком уровне связывания PAC-1 в ответ на различные виды стимуляции в тромбоцитах детей в сравнении с тромбоцитами взрослых [26]. С другой стороны, существуют работы, в которых показано, что в тромбоцитах детей ниже уровни экспрессии ГП IIb-IIIa и ГП Ib, ниже уровень Р-селектина и ниже выброс плотных гранул, чем в тромбоцитах взрослых [24,25]. Кроме того, до сих пор нет четкого представления о возрасте, когда исчезают различия в функциональной активности тромбоцитов детей и взрослых. Есть работы, в которых различия в активности тромбоцитов детей и взрослых сохранялись до 18 лет [24], тогда как в других уровни экспрессии ГП IIb-IIIa и ГП Ib, а также уровень Р-селектина у детей в возрасте от 2 до 15 лет были значимо ниже, чем у взрослых [25]. Также есть работа, в которой сообщается об отличиях

функциональной активности тромбоцитов детей в возрасте от 1 года до 14 лет в сравнении с тромбоцитами взрослых [26].

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Материалы

В работе использовали моноклональное антитело к Р-селектину  $\alpha$ -гранул тромбоцитов (анти-CD62p антитело) и аннексин V, имеющий высокое сродство к фосфатидилсерину мембраны тромбоцитов, сцепленные с флуоресцентным красителем Алекса-647, антитела к GPIIb и IIIa (анти-CD42b и анти-CD61 антитела), сцепленные с фикоэритрином (ФЭ), а также антитело к активированной форме комплекса GPIIb-IIIa (PAC-1), сцепленное с флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) (SONY Biotechnology, США). Коллаген-подобный пептид (collagen-related peptide, CRP) был синтезирован в лаборатории профессора Фарндейла (Кембридж, Англия). АДФ, пептиды, активирующие рецепторы тромбина, SFLLRN и AYPGKF, фибриноген, кальций, ПФА, тикагрелор и ибрутиниб были производства фирмы Sigma-Aldrich (США).

### 2.2 Здоровые взрослые добровольцы и дети

Демографическое распределение здоровых взрослых добровольцев и здоровых детей приведено в таблице 1. В исследование вошли 76 здоровых детей в возрасте от 1 года до 18 лет. Среди них было 16 детей в возрасте от 1 года до 5 лет (медиана возраста 3 года, 8 мальчиков, 8 девочек), 23 ребенка в возрасте от 6 до 10 лет (медиана возраста 8 лет, 13 мальчиков, 10 девочек) и 32 ребенка в возрасте от 11 до 18 лет (медиана возраста 14 лет, 17 мальчиков, 15 девочек). Кроме того, в исследование вошли 70 здоровых взрослых добровольцев в возрасте от 19 до 40 лет (медиана возраста 25 лет, 34 мужчины, 36 женщин). Исследование функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ проводилось на небольшой выборке детей, поэтому их нельзя было распределить по возрастным группам. В эту часть исследования вошли 11 здоровых детей в возрасте от 3 месяцев до 16 лет (медиана возраста 7,4 года, 4 мальчика, 7 девочек). Также было исследовано 22 здоровых взрослых добровольца в возрасте от 19 до 30 лет (медиана возраста 23 года, 9 мужчин, 13 женщин). Протоколы исследований

соответствовали Хельсинкской декларации и были одобрены независимым этическим комитетом ЦТП ФХФ РАН (протокол №1 от 23.12.2019). От всех добровольцев и родителей детей было получено письменное информированное согласие на проведение исследования. Добровольцы и дети не имели тромбоцитопении или кровоточивости любой степени тяжести. Они также не получали антиагрегантную или противовоспалительную терапию, а также не принимали антибиотики за 2 недели до исследования.

Таблица 1. Демографическое распределение здоровых взрослых и здоровых детей

Категория	Размер выборки	Возраст	Медиана возраста	Количество мужчин (М) и женщин (Ж)
Здоровые дети	16	1 год – 5 лет	3 года	8 М, 8 Ж
	23	6 – 10 лет	8 лет	13 М, 10 Ж
	32	11 – 18 лет	14 лет	17 М, 15 Ж
Здоровые дети (тест с АДФ)	11	3 месяца – 16 лет	7,4 года	4 М 7 Ж
Здоровые взрослые добровольцы	70	19 – 40 лет	25 лет	34 М 36 Ж
Здоровые взрослые добровольцы (тест с АДФ)	22	19 – 30 лет	23 года	9 М 13 Ж

### **2.3 Пациенты**

Демографическое распределение пациентов приведено в таблице 2. В исследование вошли 7 взрослых пациентов с хронической ИТП из ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ» (медиана возраста 55 лет, все женщины). Они получали терапию преднизолоном, ромиплостимом или револейдом. Также в исследование вошли 14 детей с хронической ИТП в возрасте от 3 до 17 лет из ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России и Российской детской клинической больницы (медиана возраста 10 лет, 9 мальчиков, 5 девочек). Они получали терапию револейдом, либо ромиплостимом. Помимо этого, в исследование вошли 9 пациентов с острым коронарным синдромом после инфаркта миокарда в возрасте от 55 до 76 лет из ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.В. Виноградова ДЗМ» (медиана возраста 67 лет, 5 мужчин, 4 женщины). Перед исследованием они получали двойную антиагрегантную терапию аспирином и тикагрелором, либо прасутгрелом в течение месяца.

### **2.4 Взятие крови**

Взятие крови осуществляли с помощью пункции локтевой вены в пластиковые вакуумные пробирки S-Monovette объемом 3 мл (SARSTEDT AG & Co, Германия), содержащие 3,2% раствор цитрата натрия в объемном соотношении 1:9. Исследование крови проводили в первые 2 часа после взятия.

### **2.5 Исследование кинетики связывания антител**

Пробирку с кровью центрифугировали в течение 8 минут с ускорением 100g. Полученную таким образом ОТП отбирали в отдельную пробирку и разбавляли буфером в 800 раз. Отбирали 200 мкл разбавленной плазмы и измеряли базовый уровень сигнала в каналах флуоресценции в течение 30 секунд, после чего по тонкой пластиковой трубке впрыскивали 200 мкл раствора антитела, продолжая при этом измерение. Запись вели в течение 12-20 минут. Для антител к CD42b и

CD61 измерения проводили на покоящихся тромбоцитах, для PAC-1 и CD62p – на тромбоцитах, активированных смесью CRP и SFLLRN.

Таблица 2. Демографическое распределение пациентов

Заболевание	Количество пациентов	Возраст	Медиана возраста	Количество мужчин (М) и женщин (Ж)	Терапия
Хроническая ИТП (взрослые)	7	26 – 73 лет	55 лет	0 М 7 Ж	Преднизолон – 2 пациента Ромиплостим – 4 пациента Элтромбопаг – 1 пациент
Хроническая ИТП (дети)	14	3 – 17 лет	10 лет	9 М 5 Ж	Ромиплостим – 8 пациентов Элтромбопаг – 6 пациентов
Острый коронарный синдром	9	55 – 76 лет	67 лет	5 М 4 Ж	Аспирин+тикагрелор – 4 пациента Аспирин+prasugrel – 5 пациентов

## 2.6 Исследование кинетики активации тромбоцитов АДФ

Для получения ОТП пробирку с кровью центрифугировали 8 минут при ускорении 100g. Отбирали плазму и разбавляли ее буфером в 800 раз. К 10 мкл разбавленной плазмы добавляли 10 мкл активирующей смеси, состоящей из 5 мкМ АДФ и 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Инкубировали в течение различных промежутков времени: 1 минута, 2 минуты, 3 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут. После активации добавляли панель антител, состоящую из PAC-1, антитела к CD61 и антитела к CD62p, в которую добавили 5 мкМ АДФ и 2,5 мкМ CaCl<sub>2</sub> для сохранения концентрации агониста. Инкубировали с антителами 2 минуты, после чего разбавляли образцы в 10 раз буфером с 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Таким образом, не было возможным исследовать кинетику активации тромбоцитов АДФ менее 3 минут инкубации с агонистом.

## **2.7 Исследование влияния преаналитических параметров на функциональную активность тромбоцитов**

Оценивали активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ до транспортировки и после транспортировки на общественном транспорте в течение 1 часа. Для исследования влияния времени после взятия крови проводили оценку активационного ответа тромбоцитов через 10 минут, 1 час и 3 часа после взятия крови.

## **2.8 Тест функциональной активности тромбоцитов**

20 мкл цельной крови разводили в 21 раз Хепес-Тиродным буфером (NaCl 150 mM; KCl 2,7 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; HEPES 20 mM; глюкоза 5 mM; бычий сывороточный альбумин (BSA) 0,5%; pH 7,4). 100 мкл разбавленной крови отбирали в отдельную пробирку и нагружали раствором мепакрина (10 мкМ) при 37 °C в течение 30 мин, разбавленную кровь без мепакрина оставляли на это время при комнатной температуре. После этого покоящиеся тромбоциты разбавляли смесью буфера и 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, либо стимулировали смесями агонистов в течение 10 минут. Смесь агонистов №1 состояла из SFLLRN (12,5 мкМ), CRP (1,25 мкг/мл) и 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Смесь агонистов №2 состояла из SFLLRN (80 мкМ) и AYPGKF (80 мкМ), а также 10 мкМ АДФ и 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Активированные и покоящиеся тромбоциты окрашивали смесями антител. Смесь антител №1 состояла из PAC-1-ФИТЦ, CD42b-ФЭ и аннексина V-Алекса-647. Смесь антител №2 состояла из CD61-ФЭ и CD62p-Алекса-647. Пробы окрашивали антителами в течение 10 минут при комнатной температуре. После этого образцы разводили в 96-луночном планшете в 10 раз в буфере, содержащем 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> и анализировали в проточном цитометре.

## **2.9 Тест функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ**

Описание протокола представлено на Рисунке 5. Цельную цитратную кровь разбавляли и нагружали мепакрином как написано выше. После этого покоящиеся тромбоциты разбавляли буфером в соотношении 1:1 (10 мкл + 10 мкл). Затем к

образцу одновременно добавляли 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мкМ АДФ и антитела в соотношении 1:1 (20 мкл + 20 мкл) и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. После этого образцы разводили в 96-луночной планшете в 10 раз в буфере, содержащем 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub> и анализировали в проточном цитометре.

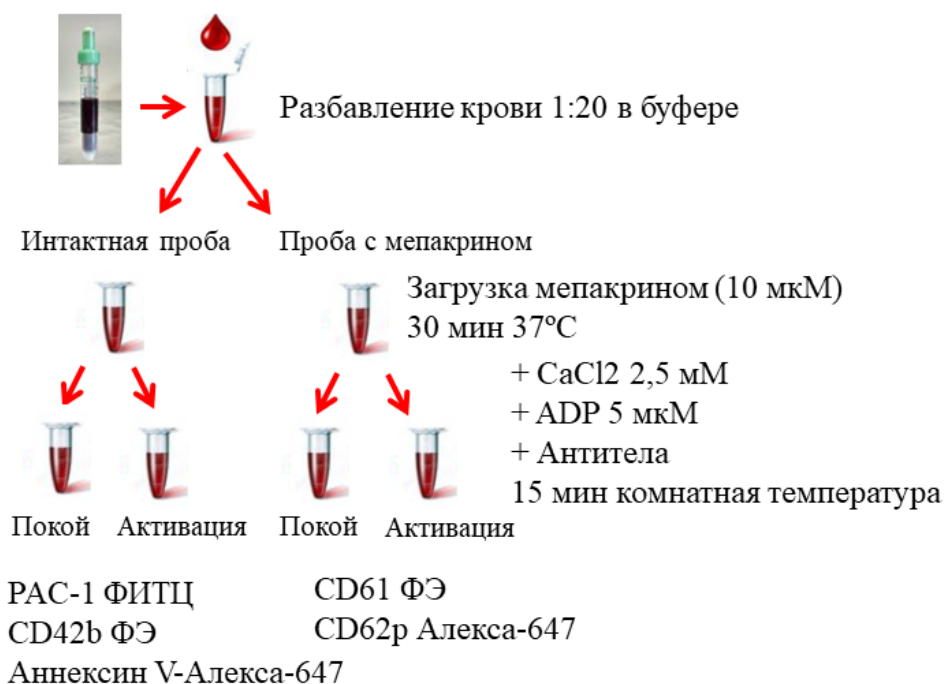


Рисунок 5 – Протокол исследования функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ методом проточной цитометрии

### 2.10 Протокол преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ

Для преактивации тромбоцитов к цельной крови, разбавленной в 21 раз буфером, добавляли 1 мкМ АДФ, после чего образец инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем использовали протокол, описанный выше. Смесь антител состояла из РАС-1-ФИТЦ, CD42b-ФЭ и CD62p-Алекса-647.

### 2.11 Протокол преактивации тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП

Цитратную кровь пациентов с ИТП, не получающих терапию, центрифугировали в течение 8 минут с ускорением 100g. После этого собирали

ОТП и центрифугировали пробирку 15 минут с ускорением 1600g. Затем отбирали получившуюся бедную тромбоцитами плазму в отдельную пробирку и вновь центрифугировали ее в течение 5 минут с ускорением 10000g для получения плазмы без тромбоцитов. После этого плазму пациентов с ИТП замораживали при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для использования плазмы ее размораживали на водяной бане при  $37^{\circ}\text{C}$  и остужали до комнатной температуры. Цельную цитратную кровь центрифугировали 8 минут с ускорением 100g для получения ОТП. Затем ОТП разбавляли в плазме пациента с ИТП для получения финальной концентрации тромбоцитов 50 тысяч тромбоцитов в микролитре (в 1:2-1:4 раз) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После этого 20 мкл образца разбавляли в 21 раз буфером и использовали протокол, описанный выше. Смесь антител состояла из PAC-1-ФИТЦ, CD42b-ФЭ и CD62p-Алекса-647.

### **2.12 Исследование функциональной активности тромбоцитов после инкубации с тиагрелором и ибрутинибом *in vitro***

Тикагрелор в концентрации 8 мкМ добавляли к крови, разбавленной в 21 раз в буфере, нагруженной мепакрином и без него. После этого образец инкубировали 30 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Ибрутиниб в концентрации 1 мкг/мл добавляли к цельной крови и инкубировали 30 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем использовали протокол, описанный выше.

### **2.13 Проточная цитометрия тромбоцитов**

Образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences, Inc., США) при использовании программного обеспечения NovoExpress 1.2.4 (ACEA Biosciences, Inc., США) в течение 15 минут после их разбавления. Тромбоциты определяли в соответствии с типичными для них параметрами прямого (forward scattering, FSC) и бокового (side scattering, SSC) светорассеяния, а также по связыванию CD42b или CD61. Для большинства параметров определяли среднюю интенсивность флуоресценции, за исключением аннексина V, для которого можно было четко отделить положительную

субпопуляцию тромбоцитов, поэтому в этом случае определяли % положительных событий FSC отражал размер тромбоцитов, а SSC – их гранулярность. Индекс дегрануляции плотных гранул определяли, как соотношение интенсивности флуоресценции мепакрина в состоянии покоя к флуоресценции в активированном состоянии. Для большинства тестов функциональной активности тромбоцитов данные представлены как %, который составляет каждый параметр от значений соответствующего параметра, полученных на здоровых добровольцах (в состоянии покоя – для CD42b, CD61, флуоресценции мепакрина, FSC, SSC; в активированном состоянии – для PAC-1, CD62p). Для теста функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ данные представлены в виде средней интенсивности флуоресценции.

#### **2.14 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 8.0 (OriginLab, США). Нормальность распределения данных определяли с помощью теста Шапиро-Уилка. При  $W < 0,05$  считали, что выборка имеет нормальное распределение. Сравнение выборок проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни и парного t-критерия Стьюдента. Корреляцию между данными оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмана. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Глава 3. Результаты

### 3.1 Разработка протокола для исследования ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ методом проточной цитометрии

#### 3.1.1 Исследование влияния аналитических параметров

Для определения условий, позволяющих обнаружить статистически значимый эффект активации тромбоцитов АДФ, был выполнен ряд экспериментов. На Рисунке 6А-В изображена зависимость активации и экстернализации интегринов (связывание PAC-1, уровень экспрессии CD61) и выброса P-селектина от длительности инкубации тромбоцитов с 5 мкМ АДФ в присутствии флуоресцентных красителей. Связывание PAC-1 возрастало в 4,4 раза в течение первых 3 минут инкубации с агонистом, после чего следовало его небольшое снижение (Рисунок 6А). Уровень экспрессии CD61 вырос почти в 2 раза и вышел на насыщение через 3 минуты инкубации с агонистом (Рисунок 6Б). Возрастание уровня экспрессии CD62p было более сильным, но и более постепенным: около 70% уровня CD62p экспрессировалось через 3 минуты инкубации с АДФ, тогда как оставшиеся 30% экспрессировались в течение оставшихся 12 минут (Рисунок 6В). Из полученных результатов можно сделать вывод, что активация тромбоцитов АДФ в основном происходит в течение первых 3 минут инкубации с агонистом.

Далее провели серию экспериментов по определению кинетики связывания антител с рецепторами на поверхности тромбоцитов, чтобы отделить ее от кинетики активации тромбоцитов АДФ. Связывание антител к CD42b, CD61 и CD62p достигало насыщения в течение 5-10 минут инкубации независимо от того, с каким флуоресцентным красителем они были связаны (Рисунок 7А-В). В то же время, кинетики связывания фибриногена и PAC-1 имели линейный характер и не выходили на насыщение даже через 20 минут инкубации (Рисунок 7Г, Д). При сравнении средней интенсивности флуоресценции связывания PAC-1 и фибриногена в различные точки времени (Рисунок 7Е) обнаружили сильную положительную корреляцию между этими двумя параметрами ( $r_s=0,96$ ,  $p<0,05$ ).

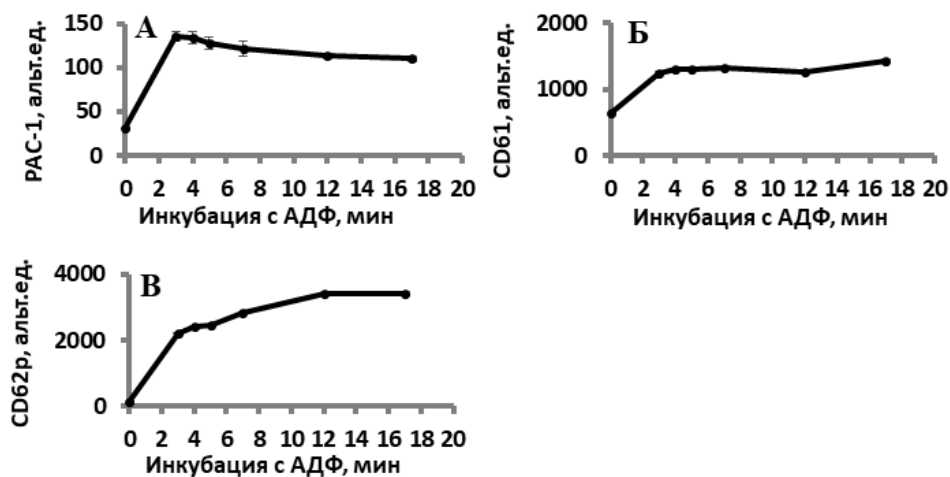


Рисунок 6 – Кинетика активации тромбоцитов 5 мкМ АДФ. А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD61. В. Уровень экспрессии CD62p. Здесь и далее – точки представляют собой усредненные данные по 3 экспериментам, планки погрешности – стандартное отклонение

Затем исследовали влияние длительности активации тромбоцитов и их окрашивания флуоресцентно мечеными антителами, а также последовательности активации и окрашивания (последовательно или одновременно) на активационный ответ тромбоцитов (Рисунок 8А-В). Для активации и окрашивания тромбоцитов использовали три временных промежутка: 2 минуты, 5 минут и 15 минут. Для уровня связывания PAC-1 разницы между протоколами не было обнаружено (Рисунок 8А). Однако для уровней экспрессии CD42b и CD62p последовательные активация и окрашивание тромбоцитов приводили к увеличению параметров в 1,3 и 1,6 раза, соответственно, по сравнению с протоколом, когда активация и окрашивание тромбоцитов проводились одновременно ( $p < 0,05$ , Рисунок 8Б, В, соответственно). Различия в продолжительности активации тромбоцитов при одинаковой продолжительности окрашивания влияли только на уровень экспрессии CD62p, тогда как уровни связывания PAC-1 и CD42b не менялись.

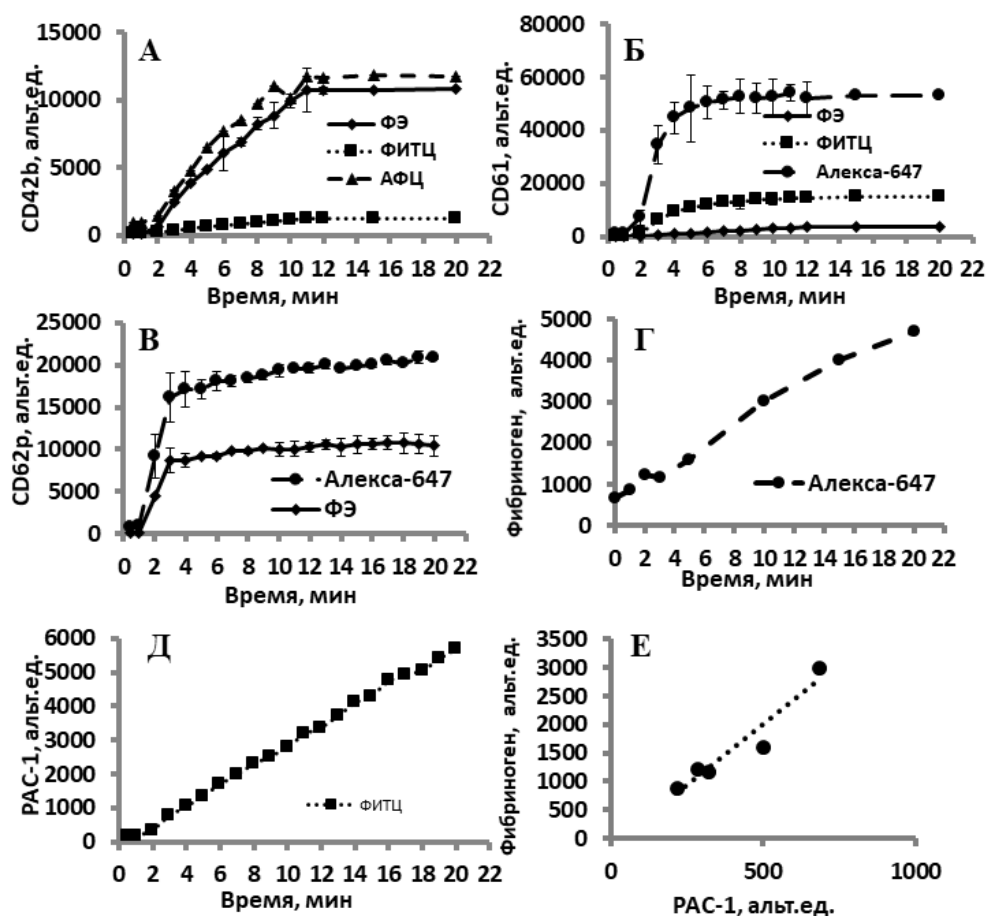


Рисунок 7 – Кинетика окрашивания тромбоцитов антителами, меченными различными флуоресцентными маркерами. А. Уровень экспрессии CD42b. Б. Уровень экспрессии CD61. В. Уровень экспрессии CD62p. Г. Уровень связывания фибриногена. Д. Уровень связывания PAC-1. Е. Корреляция между уровнями связывания фибриногена и PAC-1. ФИТЦ – флуоросцеин изотиоцианат; ФЭ – фикоэритрин; АФЦ – аллофикоцианин

В то же время, большая длительность покраски тромбоцитов антителами при одинаковой длительности их активации АДФ приводила к усилению активационного ответа тромбоцитов по всем параметрам. Таким образом, главным фактором, влияющим на активационный ответ тромбоцитов, была продолжительность их окрашивания антителами, тогда как продолжительность активации имела меньшее влияние. На основании полученных результатов в

дальнейших экспериментах активировали и окрашивали тромбоциты одновременно в течение 15 минут, чтобы выйти на насыщение как для активации АДФ, так и для окрашивания антителами.

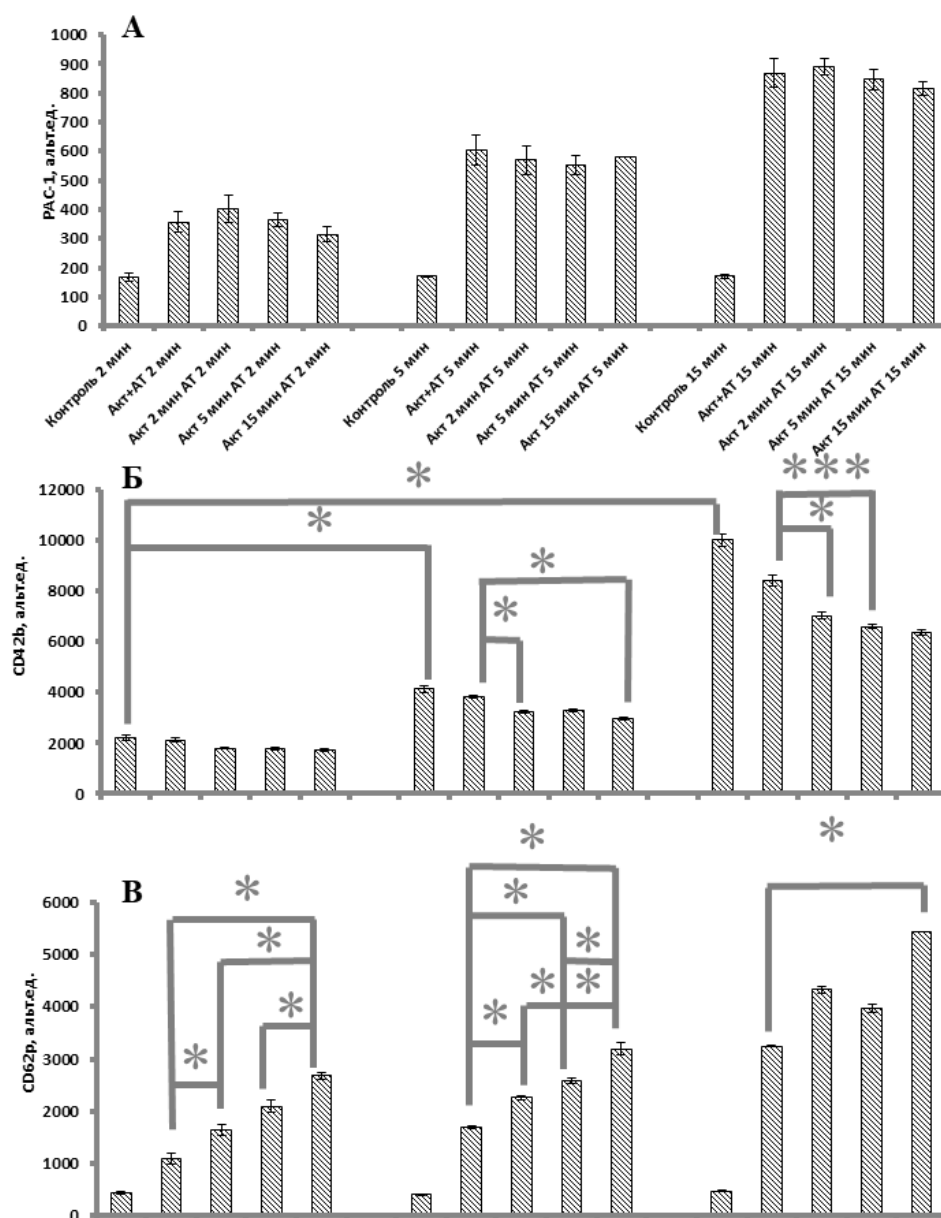


Рисунок 8 – Сравнение последовательной и параллельной активации и покраски тромбоцитов антителами в течение разных промежутков времени (2 мин, 5 мин, 15 мин). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Уровень экспрессии CD62p. Акт – активация, АТ – антитела

Чтобы определить, какую концентрацию АДФ использовать для стимуляции тромбоцитов, исследовали зависимость интенсивности флуоресценции различных маркеров от концентрации агониста (Рисунок 9А-Г). Зависимость уровня связывания PАС-1 от концентрации АДФ представляла собой кривую с минимальной полу эффективной концентрацией ( $EC_{50}$ ) 14 мкМ и не достигала насыщения в диапазоне используемых концентраций агониста (1-20 мкМ) (Рисунок 9А). Кривая для уровня экспрессии CD62p имела сходный характер с  $EC_{50}$  1,7 мкМ. Кривая выходила на насыщение при концентрации АДФ 5 мкМ (Рисунок 9Б). Другие параметры (уровни экспрессии CD42b и CD61) также выходили на насыщение при 5 мкМ агониста и не изменялись значимо при увеличении концентрации АДФ до 20 мкМ (Рисунок 9В, Г, соответственно). Был сделан вывод, что для большинства параметров насыщение наступает при концентрации агониста 5 мкМ, поэтому эта концентрация была использована для стимуляции тромбоцитов.

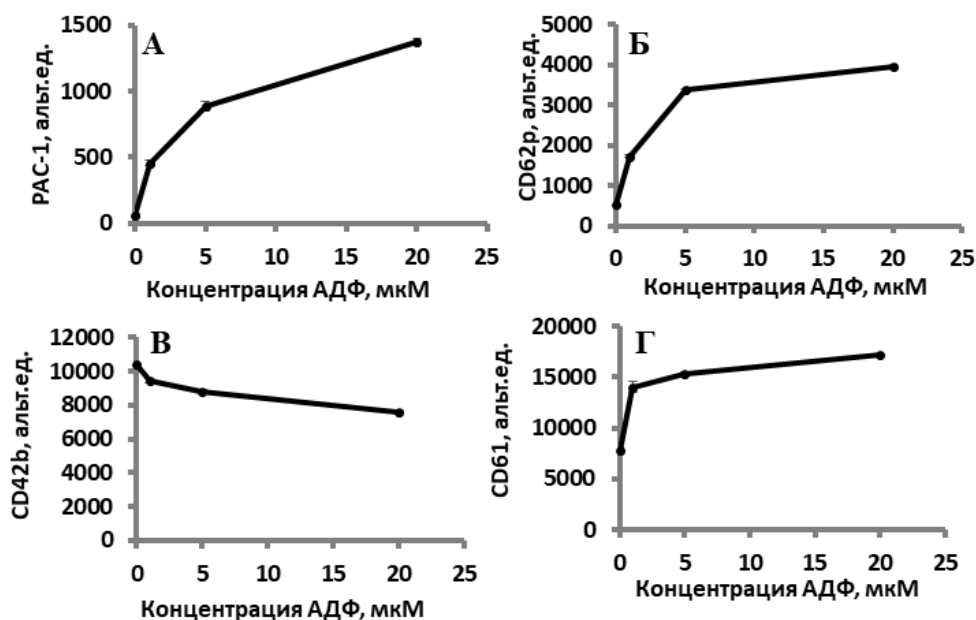


Рисунок 9 – Зависимость параметров функциональной активности тромбоцитов от концентрации АДФ (1 мкМ, 5 мкМ, 20 мкМ). А. Уровень связывания PАС-1. Б. Уровень экспрессии CD62p. В. Уровень экспрессии CD42b. Г. Уровень экспрессии CD61.

Для предотвращения образования агрегатов определили процент их образования для нескольких разбавлений крови, начиная от цельной крови, разбавленной антителами в соотношении 1:1 (и затем дополнительно разбавленной в 100 раз буфером перед измерением в цитометре), до разбавления буфером в соотношении 1:30 перед активацией и покраской антителами. Как видно на Рисунке 10, в цельной крови, разбавленной антителами в соотношении 1:1 и затем разбавленной буфером в 100 раз, 60% тромбоцитов образуют агрегаты. В то же время при использовании других разбавлений крови процент образования агрегатов был в 6 раз меньше и составлял 10% ( $p < 0,05$ ). Поскольку между остальными разбавлениями крови процент образования агрегатов не отличался, в дальнейшем разбавляли кровь буфером в соотношении 1:20 перед активацией и покраской антителами.

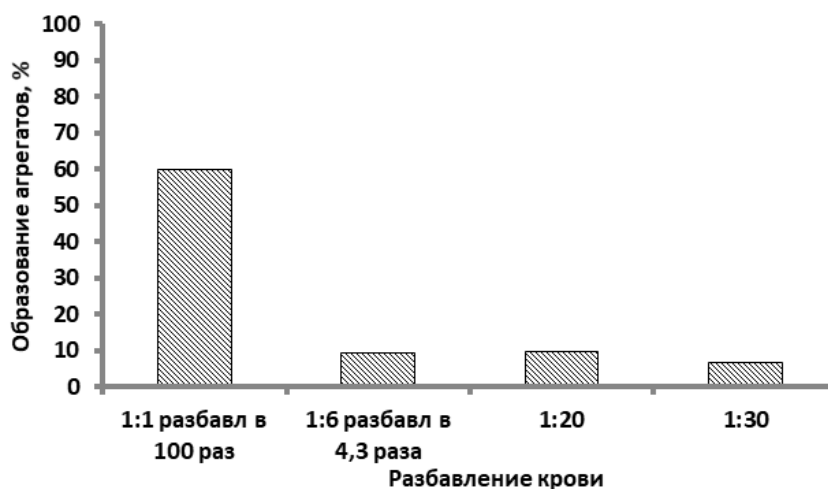


Рисунок 10 – Сравнение процента образования тромбоцитарных агрегатов для разных разбавлений крови (1:1, разбавленный в 100 раз; 1:6, разбавленный в 4,3 раза; 1:20 и 1:30). Разбавл – разбавление

Чтобы оценить влияние добавления экзогенного кальция исследовали функциональную активность тромбоцитов с его добавлением и без него. Единственной обнаруженной разницей было снижение связывания PAC-1 в 2,3

раза после стимуляции ( $p < 0,05$ , Рисунок 11А), тогда как уровни экспрессии CD42b и CD62p не менялись (Рисунок 11Б, В). Хотя добавление экзогенного кальция приводило к некоторому снижению активационного ответа тромбоцитов, в дальнейшем использовали физиологическую концентрацию кальция.

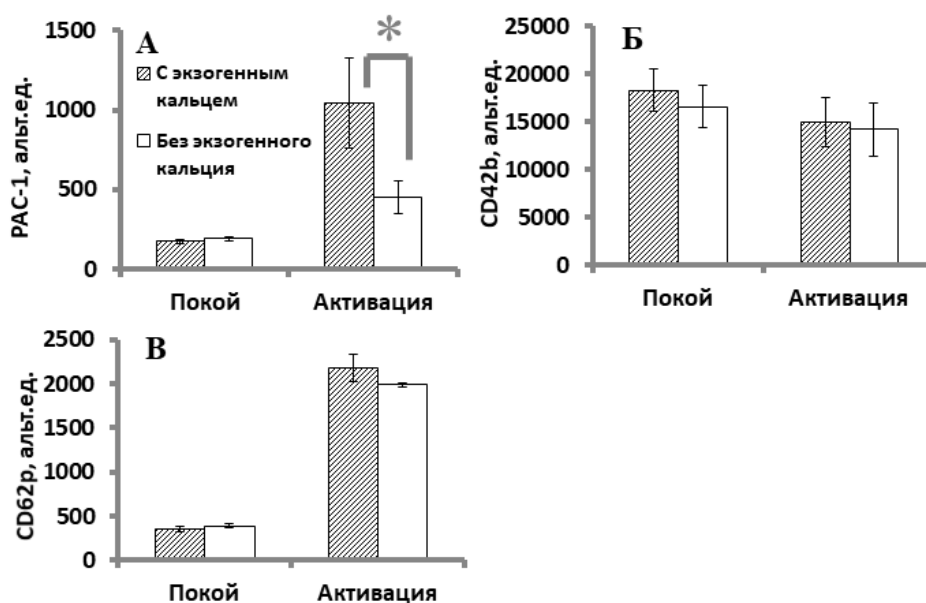


Рисунок 11 – Исследование влияния добавления экзогенного кальция на функциональную активность тромбоцитов в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Уровень экспрессии CD62p

Не было обнаружено никакого влияния 10-кратного разбавления 1% раствором ПФА на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ (Рисунок 12А-В). Следовательно, в рамках данного протокола возможна фиксация тромбоцитов 1% раствором ПФА для тех случаев, когда измерение образцов в проточном цитометре невозможно провести сразу. Однако дальнейшие эксперименты проводились без фиксации тромбоцитов во избежание возможных артефактов.

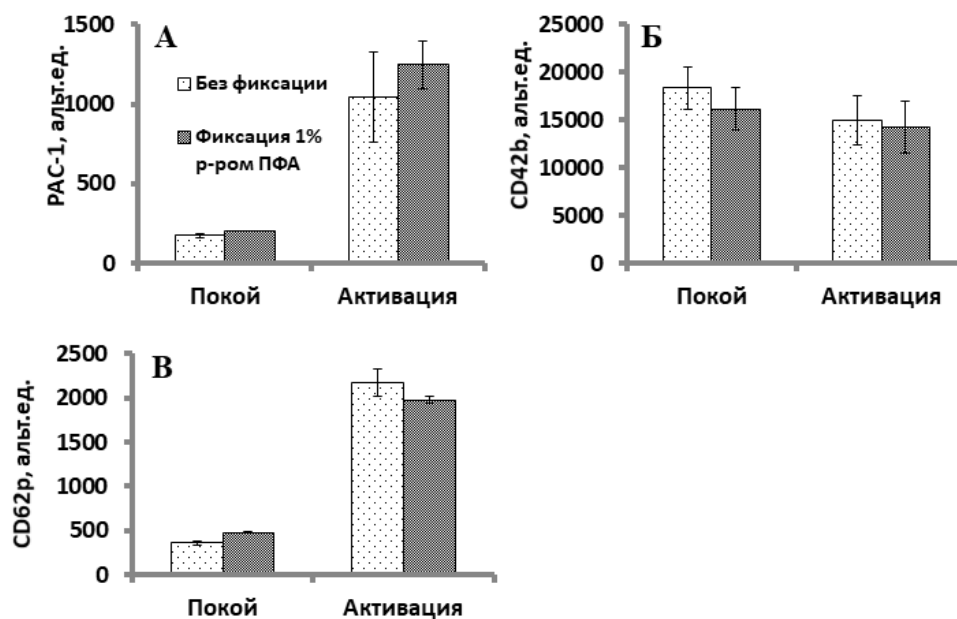


Рисунок 12 – Исследование влияния фиксации в 1% растворе ПФА на параметры функциональной активности тромбоцитов в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Уровень экспрессии CD62p

### 3.1.2 Апробация протокола

#### 3.1.2.1 Исследование функциональной активности тромбоцитов у здоровых взрослых добровольцев и здоровых детей при стимуляции АДФ

Разобравшись с аналитическими параметрами протокола, исследовали функциональную активность тромбоцитов у 22 здоровых взрослых добровольцев в возрасте от 19 до 30 лет и 11 здоровых детей в возрасте от 3 месяцев до 16 лет. Распределение параметров показано на Рисунке 13. Как было показано с помощью теста на нормальность распределения данных в выборке Шапиро-Уилка при доверительном интервале 95%, ни один из параметров не имел нормального распределения. В таблице 3 приведены 1ый квартиль (Q1), медиана и 3ий квартиль (Q3) как для выборки взрослых, так и для детей.

Таблица 3. Q1, Q2 и медиана параметров функциональной активности тромбоцитов здоровых взрослых добровольцев (сверху) и здоровых детей (снизу) в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа).

Параметр	Покой			Активация		
	Q1	Медиана	Q3	Q1	Медиана	Q3
Взрослые						
FSC	112027	117118	129505	113565	119520	131661
SSC	27615	29983	32984	25478	27734	29916
CD42b	9419	10346	11347	7067	7975	8761
CD61	10496	11508	13409	15454	17747	21701
PAC-1	66	74	80	256	324	506
CD62p	242	309	417	926	1254	2857
Фибриноген	3007	3992	5150	39451	78064	113656
Мепакрин	727	808	900	702	753	877
ФС+ тромбоциты, %	0,5	0,7	0,8	0,6	0,9	1,1
Дети						
FSC	90293	100400	129127	91655	102121	131662
SSC	23290	24186	30870	22182	22546	27919
CD42b	9118	10116	11092	7117	7649	8864
CD61	8954	10592	12771	13632	16189	19337
PAC-1	63	72	79	169	319	460
CD62p	221	255	328	1379	1478	1754
Фибриноген	1654	2682	6174	34541	63314	65990
Мепакрин	588	674	851	551	622	743
ФС+ тромбоциты, %	0,3	0,4	0,7	0,3	0,4	0,6

Примечание:

Q1 – первый квартиль

Q3 – третий квартиль

ФС+ - фосфатидилсерин-положительные тромбоциты

FSC и SSC при стимуляции не менялись (Рисунок 13А, Б). Уровень экспрессии CD42b снизился в 1,3 раза, а уровень экспрессии CD61 повысился в 1,5 раза при стимуляции АДФ ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 13В, Г, соответственно). Уровень связывания PAC-1 увеличился в 4,4 раза после стимуляции ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 13Д). Уровень Р-селектина увеличился при стимуляции в 4,1 раза у взрослых и в

5,8 раза - у детей ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 13Е). Связывание фибриногена при стимуляции увеличилось в 19,6 раза у взрослых и в 23,6 раза - у детей (Рисунок 13Ж). Наконец, флуоресценция мепакрина и процент фосфатидилсерин-положительных (ФС+) тромбоцитов не менялись при стимуляции (Рисунок 13З, И). Следовательно, стимуляция АДФ не приводит к выбросу плотных гранул и образованию ФС+ тромбоцитов. Однако она вызывала умеренное увеличение уровней связывания PAC-1 и фибриногена, а также уровня экспрессии CD62p.

### **3.1.2.2 Исследование *in vitro* влияния тикагрелора на функциональную активность тромбоцитов при стимуляции АДФ**

В состоянии покоя тикагрелор не влиял на функциональную активность тромбоцитов, а при стимуляции АДФ полностью ингибировал активационный ответ (Рисунок 14А-Ж). Следовательно, протокол является чувствительным к ингибитору рецептора АДФ тикагрелору.

### **3.1.2.3 Исследование *in vitro* влияния ибрутиниба на функциональную активность тромбоцитов при стимуляции АДФ**

Помимо ингибирования тирозинкиназы Брутона, сообщают о значимом ингибировании ибрутинибом агрегации тромбоцитов с АДФ *in vitro* [193]. Этот результат позволяет предположить у него влияние на пути внутриклеточной сигнализации, идущие от рецепторов АДФ. Поэтому решили исследовать влияние ибрутиниба на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ. Как в состоянии покоя, так и при активации не было обнаружено влияния ибрутиниба на функциональную активность тромбоцитов (Рисунок 15А-Ж), за исключением увеличения уровня экспрессии CD62p в 1,3 раза после стимуляции АДФ ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 15Е). Эти результаты позволяют предположить, что ибрутиниб обладает слабым влиянием на активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ в рамках данного протокола.

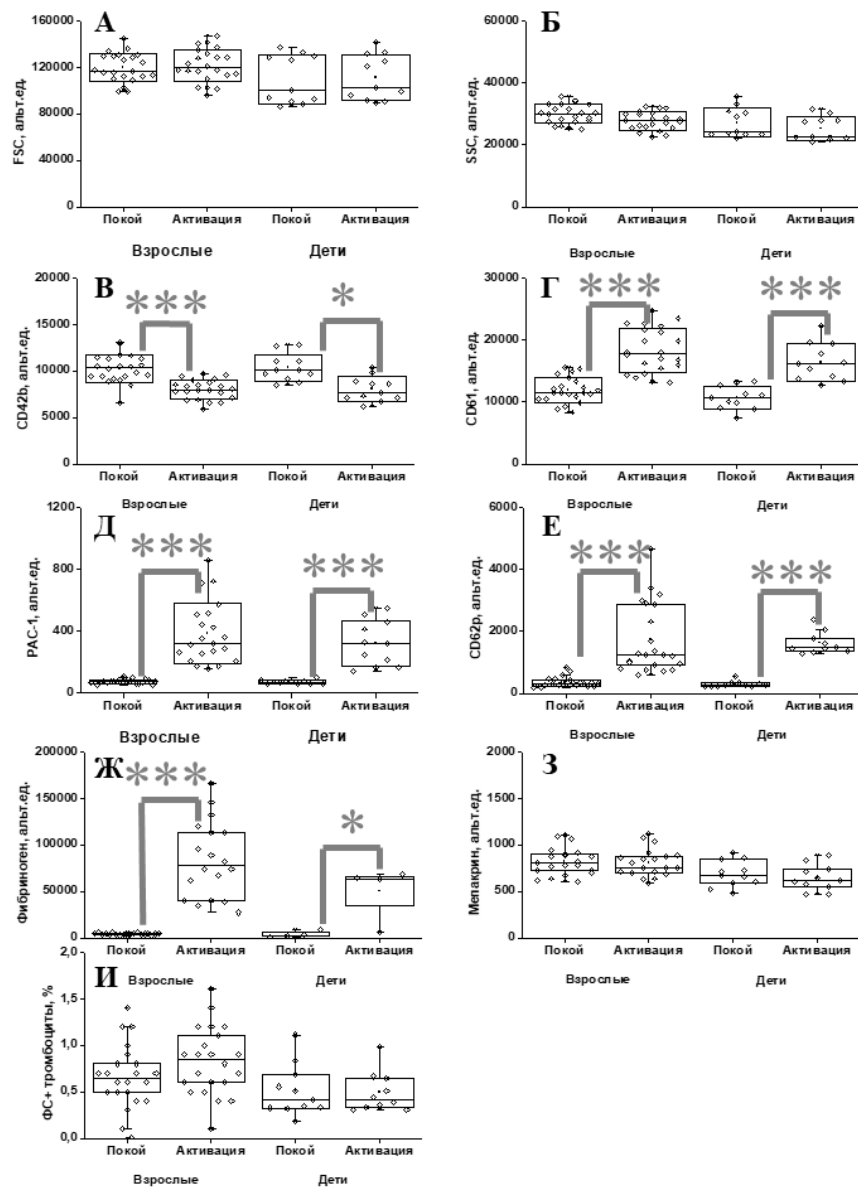


Рисунок 13 – Распределение параметров функциональной активности тромбоцитов здоровых взрослых добровольцев (слева) и здоровых детей в состоянии покоя и при активации 5 мкМ АДФ. А. FSC. Б. SSC. В. Уровень экспрессии CD42b. Г. Уровень экспрессии CD61. Д. Уровень связывания PAC-1. Е. Уровень экспрессии CD62p. Ж. Уровень связывания фибриногена. З. Уровень флуоресценции мепакрина. И. Процент ФС+ тромбоцитов. Здесь и далее каждая точка представляет собой данные одного добровольца, квадраты – средние значения параметров, горизонтальные линии – медианы, ящики – 25-75 перцентили, усы – 5-95% доверительный интервал. \*-p<0,05; \*\*-p<0,005; \*\*\*-p<0,001

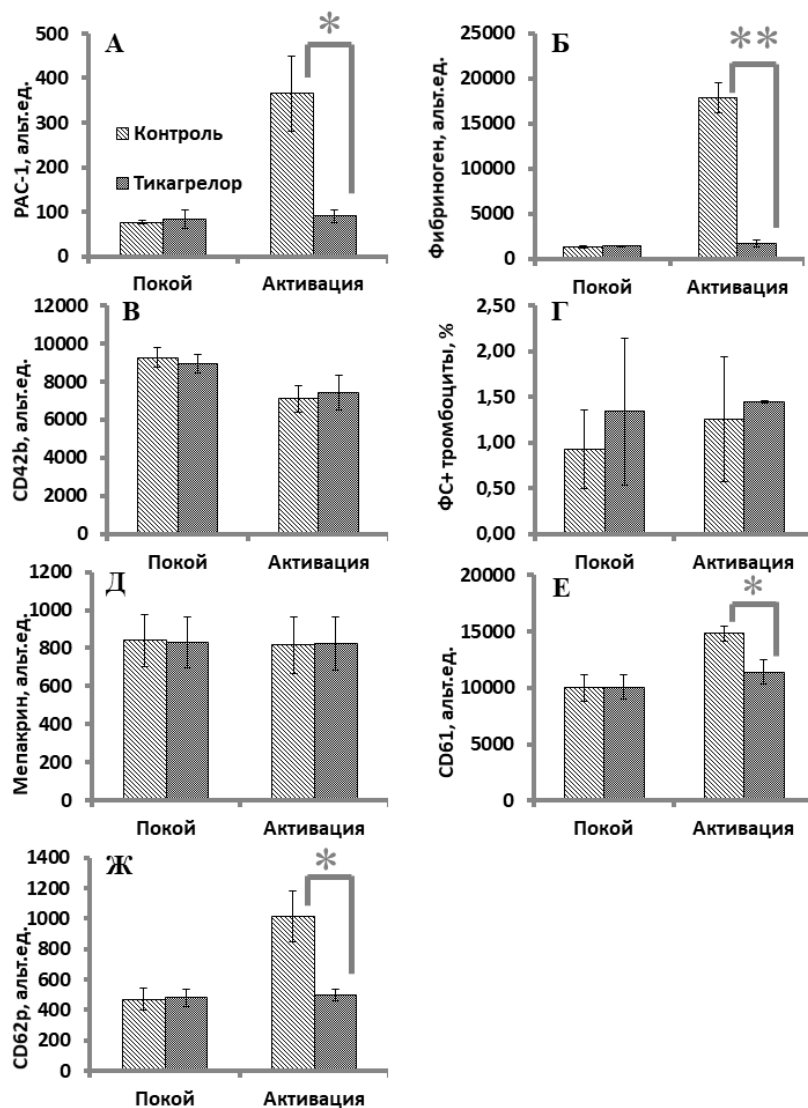


Рисунок 14 – Исследование влияния тикагрелора на параметры функциональной активности тромбоцитов в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень связывания фибриногена. В. Уровень экспрессии CD42b. Г. Процент ФС+ тромбоцитов. Д. Уровень флуоресценции мепакрина. Е. Уровень экспрессии CD61. Ж. Уровень экспрессии CD62p. Статистика как на Рисунке 13

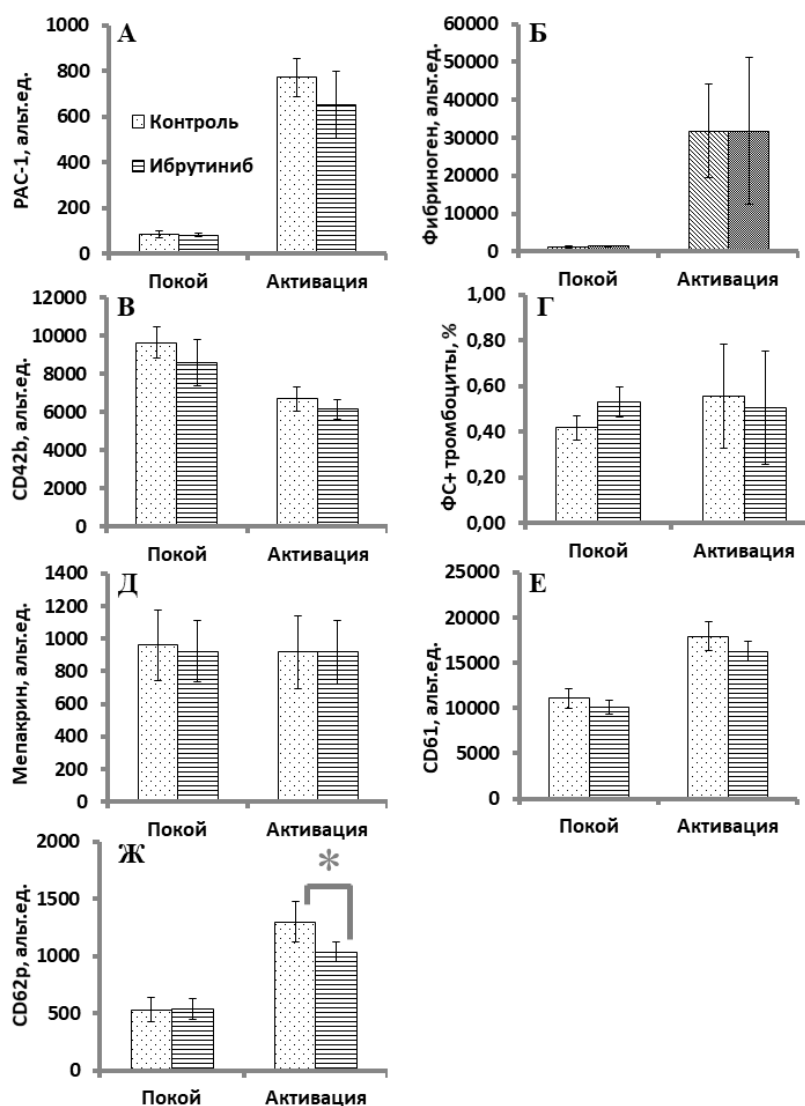


Рисунок 15 – Исследование влияния ибрутиниба на параметры функциональной активности тромбоцитов в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень связывания фибриногена. В. Уровень экспрессии CD42b. Г. Процент FC+ тромбоцитов. Д. Уровень флуоресценции мепакрина. Е. Уровень экспрессии CD61. Ж. Уровень экспрессии CD62p. Статистика как на Рисунке 13

### 3.1.2.4 Исследование функциональной активности тромбоцитов у пациентов на двойной антиагрегантной терапии при стимуляции АДФ

Для оценки чувствительности протокола к антиагрегантной терапии исследовали функциональную активность тромбоцитов у пациентов после ЧКВ через месяц приема двойной антиагрегантной терапии аспирином и тикарелором,

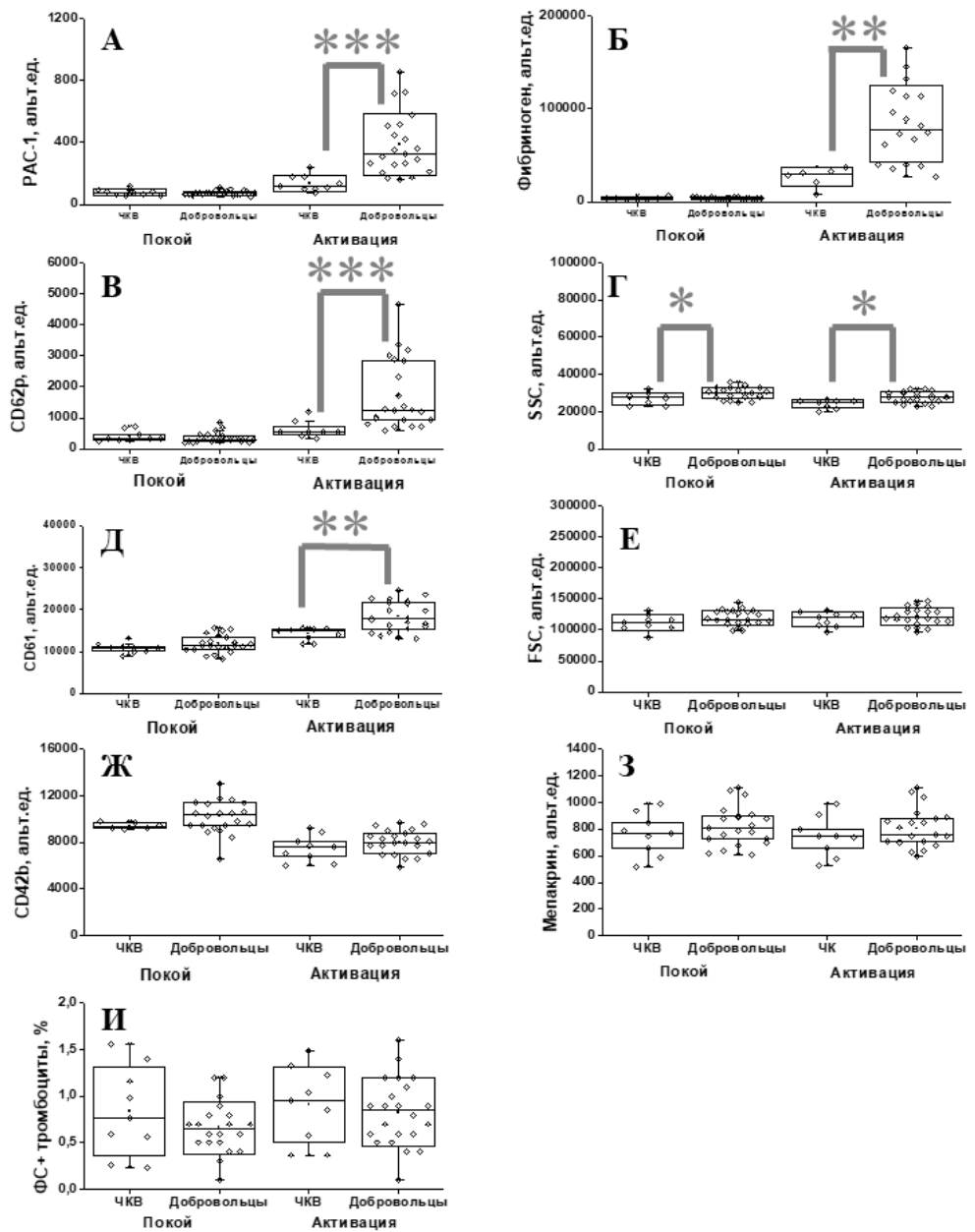


Рисунок 16 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов у пациентов после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), получающих двойную антиагрегантную терапию в течение месяца, и здоровых добровольцев. А. Уровень связывания РАС-1. Б. Уровень связывания фибриногена. В. Уровень экспрессии CD62p. Г. SSC. Д. Уровень экспрессии CD61. Е. FSC. Ж. Уровень экспрессии CD42b. З. Уровень флуоресценции мепакрина. И. Процент ФС+ тромбоцитов. Статистика как на Рисунке 13

либо парасутрелем, и сравнили ее с активностью тромбоцитов здоровых добровольцев (Рисунок 16А-И). В состоянии покоя не было обнаружено отличий по большинству параметров, за исключением снижения SSC в 1,1 раза у пациентов после ЧКВ ( $p < 0,05$ , Рисунок 16Г). После стимуляции АДФ уровни связывания PAC-1 и фибриногена у пациентов были почти в 3 раза ниже, чем у добровольцев ( $p < 0,001$  и  $p < 0,005$ , соответственно) (Рисунок 16А, Б, соответственно). Уровень экспрессии CD62p также был в 2,7 раза ниже у пациентов по сравнению с добровольцами ( $p < 0,001$ , Рисунок 16В). У пациентов после ЧКВ SSC было снижено в 1,1 раза по сравнению со здоровыми добровольцами ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 16Г). Уровень экспрессии CD61 у пациентов был в 1,3 раза ниже по сравнению с добровольцами ( $p < 0,005$ ) (Рисунок 16Д). Не было обнаружено отличий по FSC (Рисунок 16Е), уровню экспрессии CD42b (Рисунок 16Ж), флуоресценции мепакрина (Рисунок 16З) и проценте образования FC<sup>+</sup> тромбоцитов (Рисунок 16И). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что двойная антиагрегантная терапия приводит к значительному снижению ответа на стимуляцию АДФ по таким параметрам, как уровни связывания PAC-1 и фибриногена, а также уровень экспрессии CD62p. Данный протокол потенциально может быть использован для мониторинга ингибирования функциональной активности тромбоцитов у пациентов, получающих двойную антиагрегантную терапию.

### **3.1.2.5 Исследование функциональной активности тромбоцитов у взрослых пациентов и детей с ИТП при стимуляции АДФ**

В состоянии покоя у взрослых пациентов с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) размер тромбоцитов (FSC) был в 1,3 раза выше ( $p < 0,05$ , Рисунок 17А), уровень Р-селектина и уровень связывания PAC-1 были в 1,5 раза выше ( $p < 0,05$ , Рисунок 17Б, В, соответственно), а уровень экспрессии CD42b – в 1,2 раза выше ( $p < 0,05$ , Рисунок 17Д), чем у здоровых добровольцев. После стимуляции АДФ разница в размере тромбоцитов сохранялась ( $p < 0,05$ ). Также у пациентов с ИТП

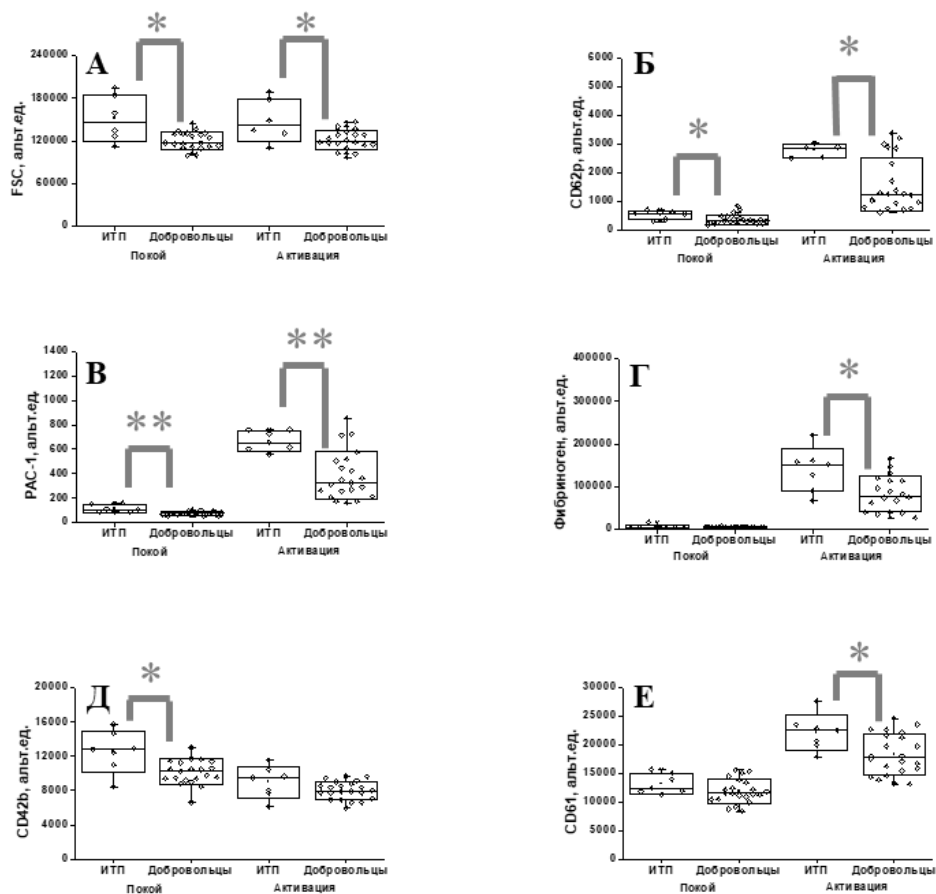


Рисунок 17 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов у пациентов с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) и здоровых добровольцев в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. FSC. Б. Уровень экспрессии CD62p. В. Уровень связывания PAC-1. Г. Уровень связывания фибриногена. Д. Уровень экспрессии CD42b. Е. Уровень экспрессии CD61. Статистика как на Рисунке 13

уровень Р-селектина был в 1,8 раза выше ( $p < 0,05$ ), уровень связывания PAC-1 – в 1,7 раза выше ( $p < 0,05$ ), уровень связывания фибриногена – в 1,7 раз выше ( $p < 0,05$ , Рисунок 17В), а уровень экспрессии CD61 – в 1,2 раза выше ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 17Г), чем у здоровых добровольцев. Не было обнаружено отличий в проценте FC+ тромбоцитов, флуоресценции мепакрина, а также индексе дегрануляции и уровне секреции плотных гранул и SSC (Рисунок 18А-Д, соответственно). Далее уровень связывания PAC-1, уровни экспрессии CD62p и CD42b нормировали на размер

тромбоцитов, представленный как уровень экспрессии CD61 в состоянии покоя (Рисунок 19А-В).

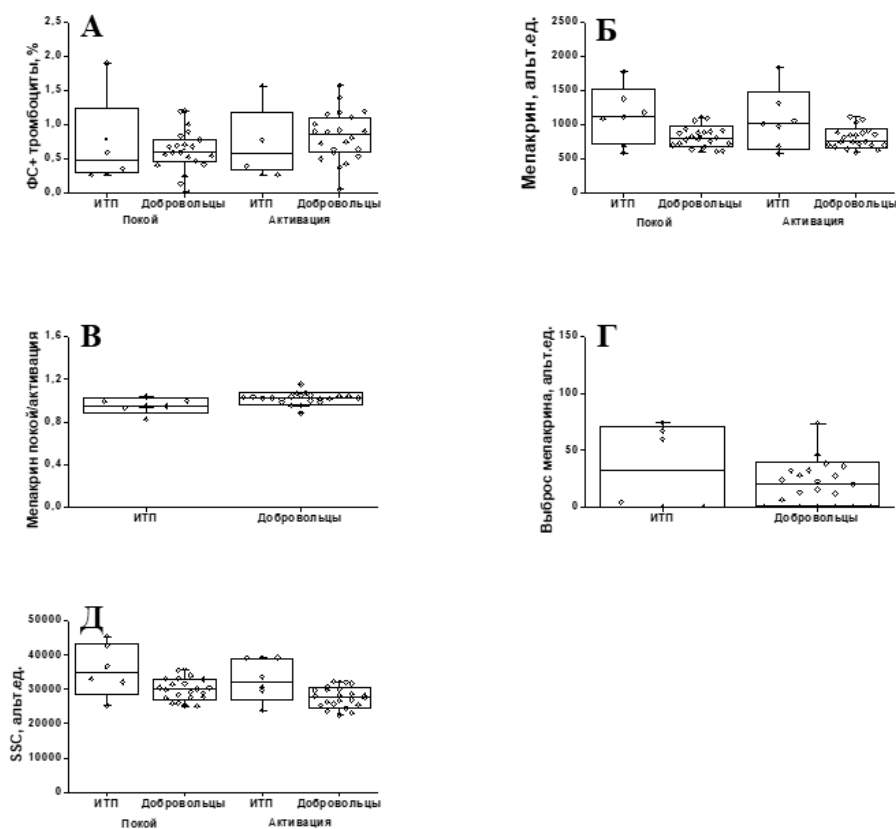


Рисунок 18 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов у пациентов с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) и здоровых добровольцев в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Процент ФС+ тромбоцитов. Б. Уровень флуоресценции мепакрина. В. Индекс дегрануляции плотных гранул. Г. Уровень секреции плотных гранул. Д. SSC. Статистика как на Рисунке 13

После нормирования в состоянии покоя разница в уровне связывания PAC-1 и уровне Р-селектина оставалась статистически значимой ( $p < 0,05$ , Рисунок 19А, Б, соответственно), тогда как различия в уровне экспрессии CD42b обнаружено не было (Рисунок 19В). После стимуляции единственной остававшейся значимой разницей было повышение уровня связывания PAC-1 у пациентов с ИТП. Эти результаты позволяют предположить, что повышенный уровень экспрессии CD42b

был связан с увеличенным размером тромбоцитов пациентов с ИТП, тогда как повышение уровня связывания PAC-1 и уровня экспрессии CD62p было вызвано их преактивацией. Таким образом, данный протокол является чувствительным к преактивации тромбоцитов пациентов с ИТП, и такие тромбоциты имеют повышенный ответ на стимуляцию АДФ по сравнению с тромбоцитами здоровых добровольцев.

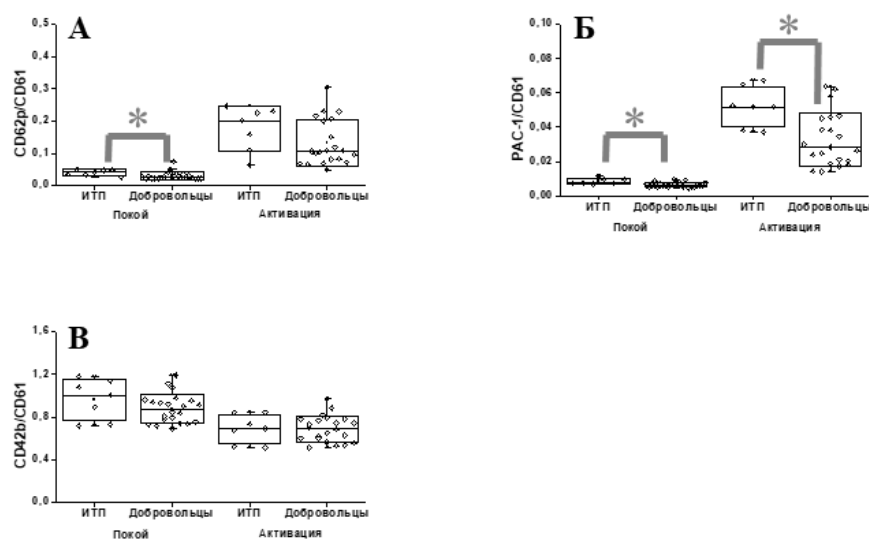


Рисунок 19 – Нормирование некоторых параметров функциональной активности тромбоцитов у пациентов с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) и здоровых добровольцев на размер тромбоцита в состоянии покоя (слева) и при активации (справа). А. Уровень экспрессии CD62p. Б. Уровень связывания PAC-1. В. Уровень экспрессии CD42b. Статистика как на Рисунке 13

Затем исследовали функциональную активность тромбоцитов детей с ИТП и сравнили ее с активностью тромбоцитов здоровых детей (Рисунки 20А-Г, 21А-Ж). Размер тромбоцитов в покое был в 1,3 раза больше у детей с ИТП, чем у здоровых детей ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 20А). Кроме того, тромбоциты детей с ИТП в покое имели в 1,7 раза более высокий уровень связывания PAC-1 ( $p < 0,001$ ) (Рисунок 20В) и в 1,4 раза более высокий уровень Р-селектина ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 20Д), то есть были преактивированы.

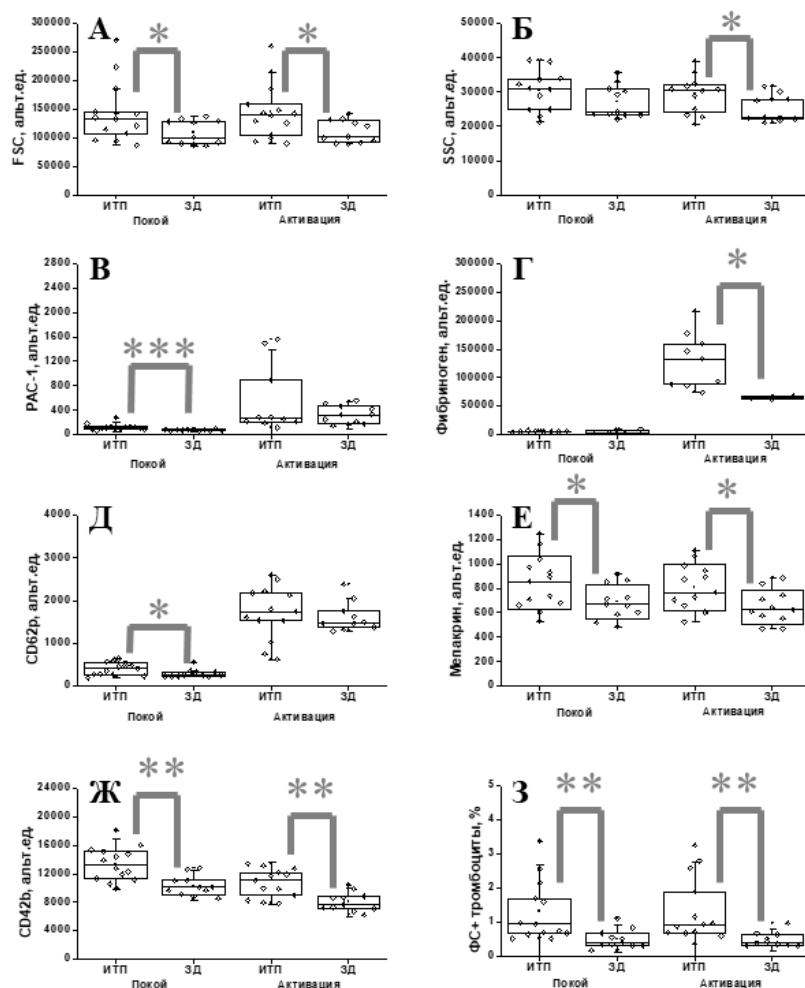


Рисунок 20 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов у детей с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) и здоровых добровольцев в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень экспрессии CD62p. Б. Уровень связывания PAC-1. В. Уровень экспрессии CD42b. Г. Процент FC+ тромбоцитов. Д. Уровень флуоресценции мелакрина. Е. FSC. Ж. SSC. З. Уровень связывания фибриногена. ЗД – здоровые дети. Статистика как на Рисунке 13

В тромбоцитах детей с ИТП в покое было в 1,2 раза больше плотных гранул ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 20Е), уровень экспрессии CD42b был в 1,3 раза выше ( $p < 0,005$ ) (Рисунок 20Ж), а процент FC+ тромбоцитов – в 2,6 раза выше ( $p < 0,005$ ) (Рисунок 20З), чем у здоровых детей. После стимуляции 5 мкМ АДФ SSC тромбоцитов детей с ИТП было в 1,3 раза выше ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 20Б), а уровень связывания фибриногена – в 2 раза выше ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 20Г), чем у здоровых детей. Разница

в размере тромбоцитов, количестве плотных гранул, уровне экспрессии CD42b и проценте FC<sup>+</sup> тромбоцитов оставалась на том же уровне, что и в покое (Рисунок 20А, Е-З, соответственно). Уровень связывания PAC-1 и уровень Р-селектина после стимуляции не отличались между тромбоцитами детей с ИТП и тромбоцитами здоровых детей (Рисунок 20В, Д, соответственно). Отличий в уровне экспрессии CD61, дегрануляции и секреции плотных гранул (Рисунок 21А-В, соответственно) не было обнаружено ни в покое, ни при активации. После нормирования на размер тромбоцитов различия в уровне Р-селектина и уровне связывания PAC-1 в покое и уровне экспрессии CD42b в обоих состояниях оставались значимыми ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 22А-В, соответственно). Эти результаты позволяют предположить, что тромбоциты детей с ИТП преактивированы по уровню Р-селектина, уровню связывания PAC-1 и уровню экспрессии CD42b, и такие преактивированные тромбоциты имеют активационный ответ на стимуляцию АДФ, сходный с ответом тромбоцитов здоровых детей.

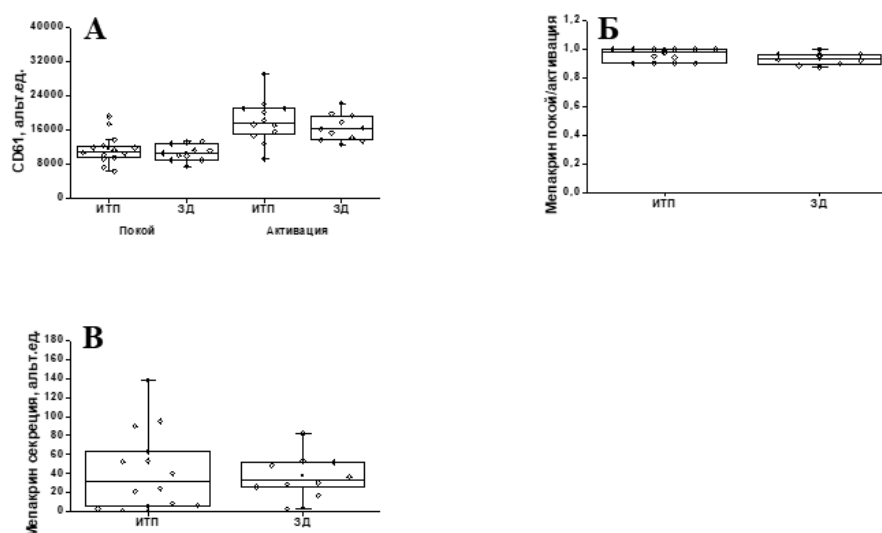


Рисунок 21 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов у детей с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) и здоровых добровольцев в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень экспрессии CD61. Б. Индекс дегрануляции плотных гранул. В. Уровень секреции плотных гранул. Статистика как на Рисунке 13

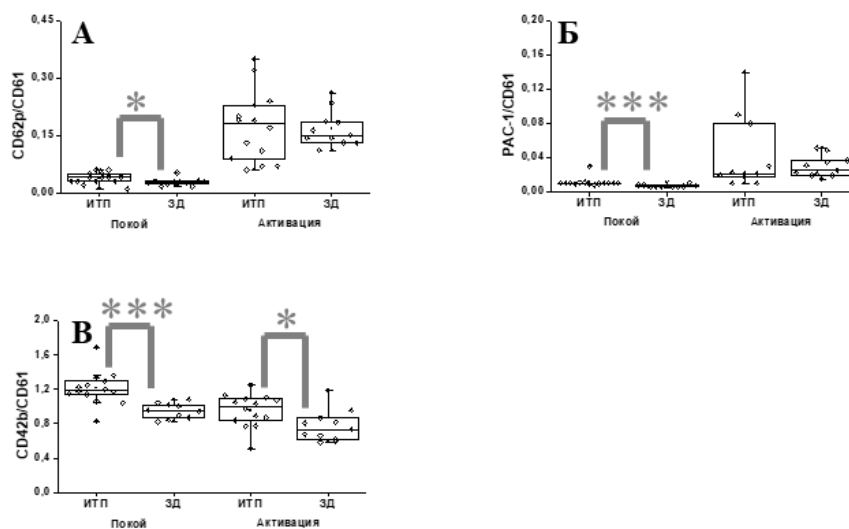


Рисунок 22 – Нормирование некоторых параметров функциональной активности тромбоцитов у детей с иммунной тромбоцитопенией (ИТП) и здоровых детей на размер тромбоцита в состоянии покоя (слева) и при активации (справа). А. Уровень экспрессии CD62p. Б. Уровень связывания PAC-1. В. Уровень экспрессии CD42b. ЗД – здоровые дети. Статистика как на Рисунке 13

### 3.1.3 Исследование влияния преаналитических параметров

Было обнаружено, что транспортировка крови приводит к увеличению уровня связывания PAC-1 в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) и увеличению уровня экспрессии CD62p в 1,8 раза ( $p < 0,01$ ) в состоянии покоя (Рисунок 23А, Е, соответственно). Однако при стимуляции разницы в этих параметрах между образцами до и после транспортировки обнаружено не было. Также не было обнаружено разницы в уровне экспрессии CD42b, проценте FC<sup>+</sup> тромбоцитов, флуоресценции мепакрина и уровне экспрессии CD61 (Рисунок 23Б-Д, соответственно). Хотя увеличение уровня связывания PAC-1 и уровня экспрессии CD62p наблюдались для всех экспериментов, оно не выходило за пределы нормальных значений данных параметров для здоровых добровольцев. Увеличение уровня связывания PAC-1 было значимо ниже такового для пациентов с ИТП ( $p < 0,05$ ), тогда как увеличение уровня экспрессии CD62p не отличалось от такового у пациентов. Эти результаты демонстрируют, что транспортировка крови приводит к преактивации

тромбоцитов по уровню экспрессии CD62p, что может повлиять на оценку функциональной активности тромбоцитов при помощи данного протокола.

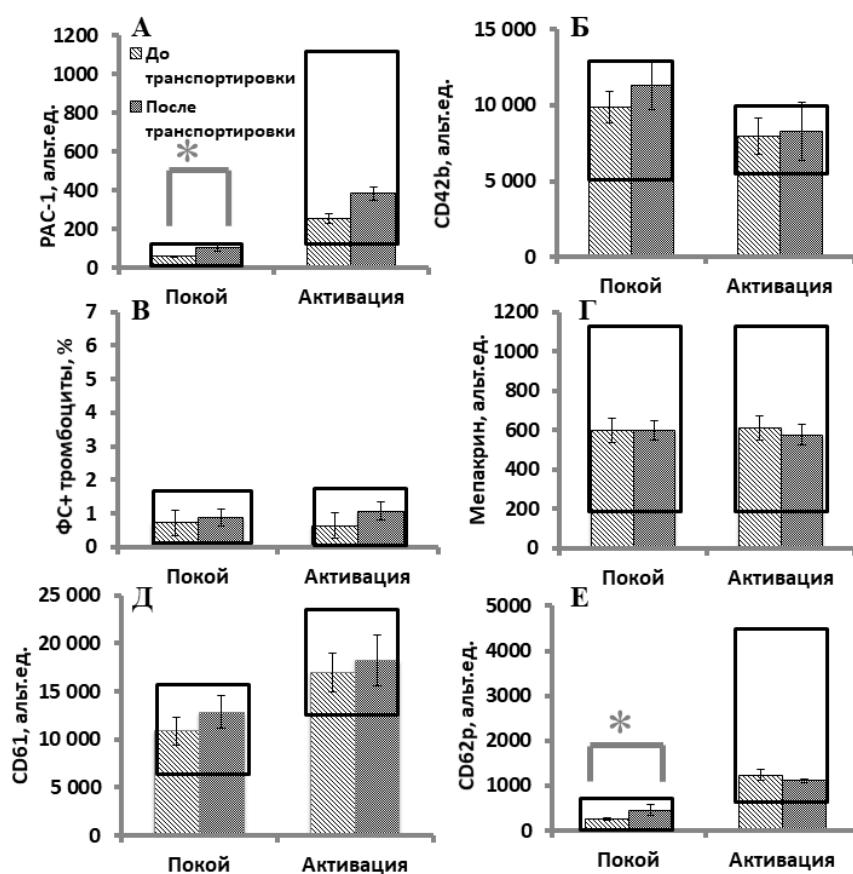


Рисунок 23 – Исследование влияния транспортировки крови на функциональную активность тромбоцитов в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Процент FC+ тромбоцитов. Г. Уровень флуоресценции мепакрина. Д. Уровень экспрессии CD61. Е. Уровень экспрессии CD62p. Здесь и далее черные рамки – референсные интервалы значений параметров, полученные на здоровых добровольцах. Статистика как на Рисунке 13

Что касается времени после взятия крови, в состоянии покоя его влияния на активность тромбоцитов обнаружено не было (Рисунок 24А-Е). После стимуляции АДФ единственным обнаруженным отличием было снижение уровня экспрессии CD42b в 1,3 раза через 1 час ( $p < 0,005$ ) и 3 часа ( $p < 0,05$ ) после взятия крови в

сравнении с измерением через 10 минут после взятия (Рисунок 24Б), что наблюдалось для всех экспериментов. Однако это снижение не выходило за пределы нормальных значений данного параметра для здоровых добровольцев и было значимо меньше, чем у пациентов с ИТП. Эти результаты указывают, что время после взятия крови не влияет на оценку функциональной активности тромбоцитов при помощи данного протокола.

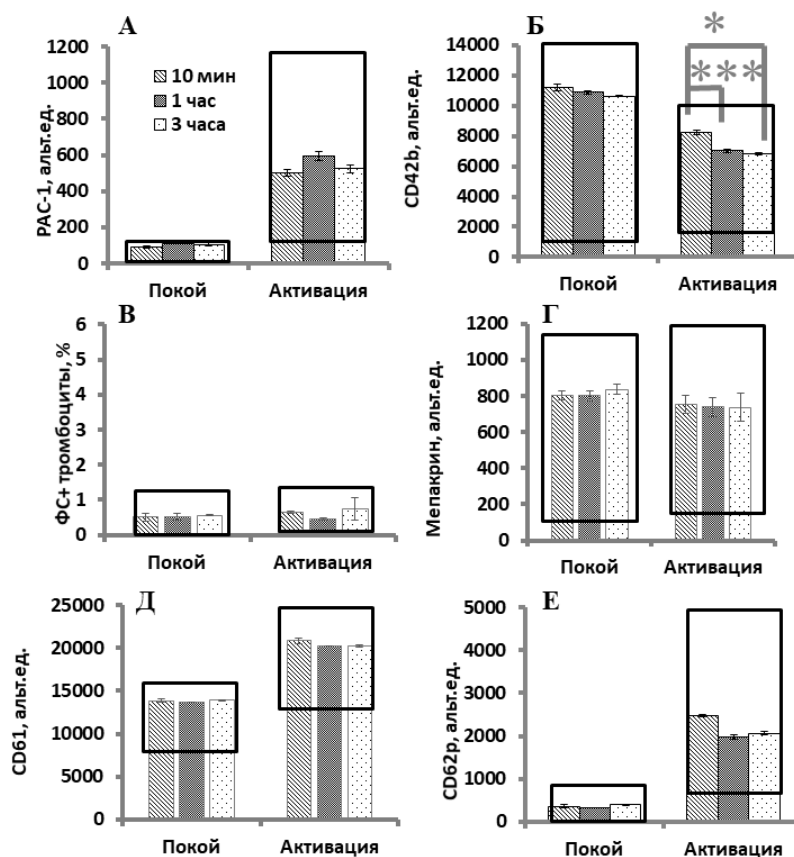


Рисунок 24 – Исследование влияния времени после взятия крови на функциональную активность тромбоцитов в состоянии покоя (слева) и при активации 5 мкМ АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Процент PFA+ тромбоцитов. Г. Уровень флуоресценции мепакрина. Д. Уровень экспрессии CD61. Е. Уровень экспрессии CD62p. Черные рамки – референсные интервалы значений параметров, полученные на здоровых добровольцах. Статистика как на Рисунке 13

## **3.2 Исследование возрастных изменений активационного ответа тромбоцитов на различные виды стимуляции у здоровых детей разных возрастных групп**

### **3.2.1 Сравнение функциональной активности тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев в состоянии покоя**

На рис. 25 показаны распределения параметров функциональной активности тромбоцитов здоровых детей разных возрастных групп (от 1 до 5 лет, от 6 до 10 лет и от 11 до 18 лет) в сравнении с тромбоцитами здоровых взрослых добровольцев. У детей в возрасте от 1 до 5 лет ( $d_{1-5}$ ) размер тромбоцитов был в 1,2 раза меньше, чем у взрослых ( $89 \pm 11,0$  и  $105 \pm 13,4$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Он также был в 1,1 раза меньше, чем у детей в возрасте от 11 до 18 лет ( $d_{11-18}$ ) ( $89 \pm 11,0$  и  $102 \pm 11,3$ , соответственно,  $p < 0,05$ ; Рисунок 25А). Различий в размере тромбоцитов как между остальными группами детей и взрослыми, так и между самими детьми обнаружено не было. Также у детей младшей возрастной группы SSC был в 1,2 раза меньше, чем у взрослых ( $86 \pm 12,2$  и  $100 \pm 12,4$ , соответственно,  $p < 0,05$ ). Других отличий между группами обнаружено не было (Рисунок 25Б). Что касается флуоресценции мепакрина, то единственные отличия были между  $d_{1-5}$  и  $d_{11-18}$  и взрослыми ( $74 \pm 11,9$  и  $85 \pm 18,1$ , соответственно,  $p < 0,05$ ;  $74 \pm 11,9$  и  $85 \pm 18,0$ , соответственно,  $p < 0,05$ ; Рисунок 25В). Процент FC+ тромбоцитов у  $d_{1-5}$  и детей в возрасте от 6 до 10 лет ( $d_{6-10}$ ) был в 2,5 раза выше, чем у взрослых ( $0,76\% \pm 0,61\%$  и  $0,35\% \pm 0,34\%$ , соответственно,  $p < 0,05$ ;  $0,95\% \pm 0,6\%$  и  $0,35\% \pm 0,34\%$ , соответственно,  $p < 0,05$ ; Рисунок 25Г). Отличий в уровне P-селектина, уровне связывания PAC-1, уровнях экспрессии CD42b и CD61 между детьми и взрослыми обнаружено не было (Рисунок 25Д-З, соответственно). Эти данные позволяют предположить, что в состоянии покоя тромбоциты детей не сильно отличаются от тромбоцитов взрослых, поскольку уровни экспрессии основных гликопротеинов и уровень P-селектина у них сходны. Исключения составляют небольшое снижение количества плотных гранул, что видно по снижению флуоресценции мепакрина и SSC, и процент FC+ тромбоцитов. Отличие в количестве плотных гранул наблюдались

только у детей младшей возрастной группы, тогда как отличие в проценте ФС+ тромбоцитов постепенно снижалось с возрастом.

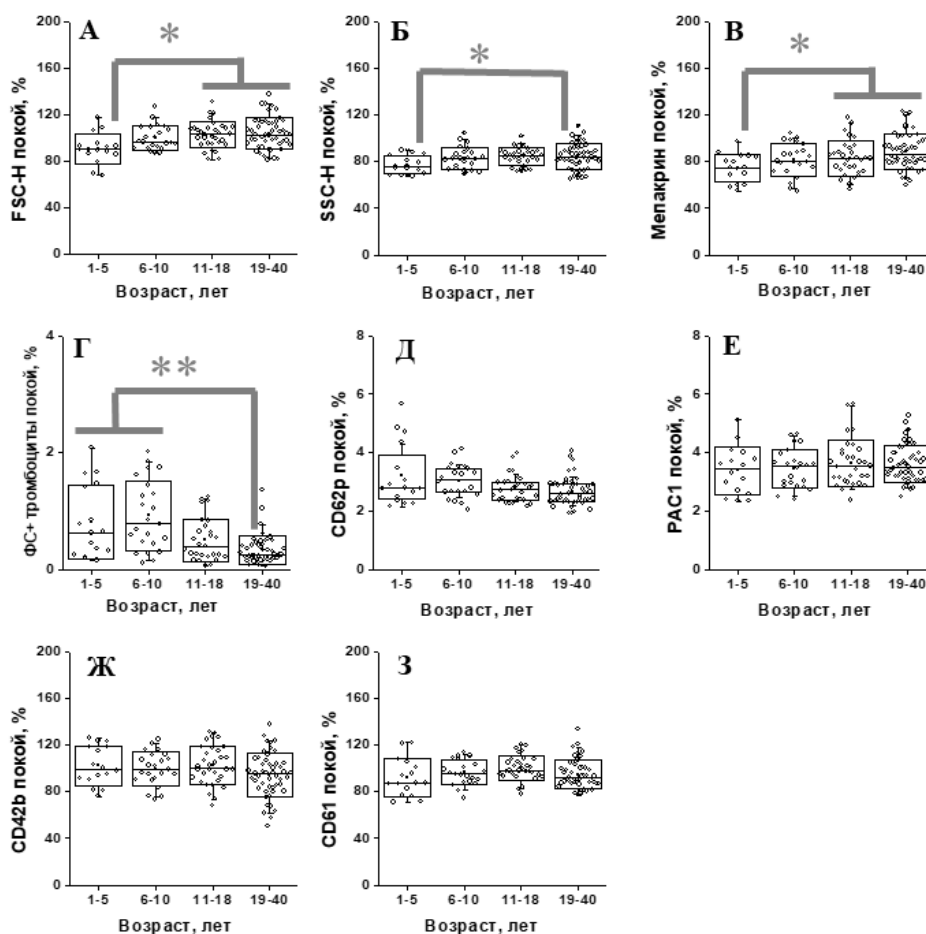


Рисунок 25 – Сравнение параметров функциональной активности тромбоцитов здоровых детей разных возрастных групп (слева) и здоровых взрослых добровольцев (справа) в состоянии покоя. А. FSC. Б. SSC. В. Уровень флуоресценции мепакрина. Г. Процент ФС+ тромбоцитов. Д. Уровень экспрессии CD62p. Е. Уровень связывания PAC-1. Ж. Уровень экспрессии CD42b. З. Уровень экспрессии CD61. Статистика как на Рисунке 13

### 3.2.2 Сравнение активационного ответа тромбоцитов на разные виды стимуляции

Чтобы исследовать состояние различных рецепторов и смоделировать активацию тромбоцитов на различных стадиях образования тромба были использованы несколько типов активации. Было обнаружено, что активация

смесью CRP+SFLLRN и SFLLRN+AYPGKF+АДФ вызывает сопоставимо сильный активационный ответ. Между этими типами стимуляций практически не было обнаружено отличий (Рисунок 26А-Е, З, К), за исключением более высокого в 1,9 раза процента ФС+ тромбоцитов ( $21 \pm 13,6$  и  $11 \pm 10,5$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) и в 1,3 раза более высокого уровня экспрессии CD42b ( $64 \pm 11,9$  и  $53 \pm 11,1$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) после стимуляции смесью CRP+SFLLRN по сравнению со стимуляцией смесью SFLLRN+AYPGKF+АДФ (Рисунок 26Ж, И, соответственно). Стимуляция АДФ вызывала статистически значимо более слабый активационный ответ ( $p < 0,001$ ; Рисунок 26А-К).

### **3.2.3 Сравнение активационного ответа тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых на стимуляцию смесью CRP+SFLLRN**

На рис. 27 показаны распределения параметров функциональной активности тромбоцитов при стимуляции смесью CRP+SFLLRN для здоровых детей разных возрастных групп и здоровых взрослых добровольцев. У  $d_{1-5}$  FSC был в 1,2 раза меньше, чем у взрослых ( $58 \pm 8,4$  и  $72 \pm 9,9$ , соответственно,  $p < 0,005$ ). Также тромбоциты детей младшей возрастной группы были в 1,2 раза меньше по размеру по сравнению с тромбоцитами детей старшей возрастной группы ( $58 \pm 8,4$  и  $67 \pm 10,1$ , соответственно,  $p < 0,05$ ; Рисунок 27А). Однако эти отличия в размере тромбоцитов при стимуляции могли быть связаны с изначально меньшим размером тромбоцитов детей младшей возрастной группы. Для того чтобы это проверить сравнили соотношение FSC в покое и при активации у детей и взрослых (Рисунок 27Б). Не было обнаружено различий между группами, что подтвердило, что активационный ответ тромбоцитов в виде относительного изменения их формы сопоставим у детей и взрослых. Не было обнаружено различий между группами по SSC (Рисунок 27В). Также не было обнаружено отличий в соотношении SSC в состоянии покоя и при активации (Рисунок 27Г).

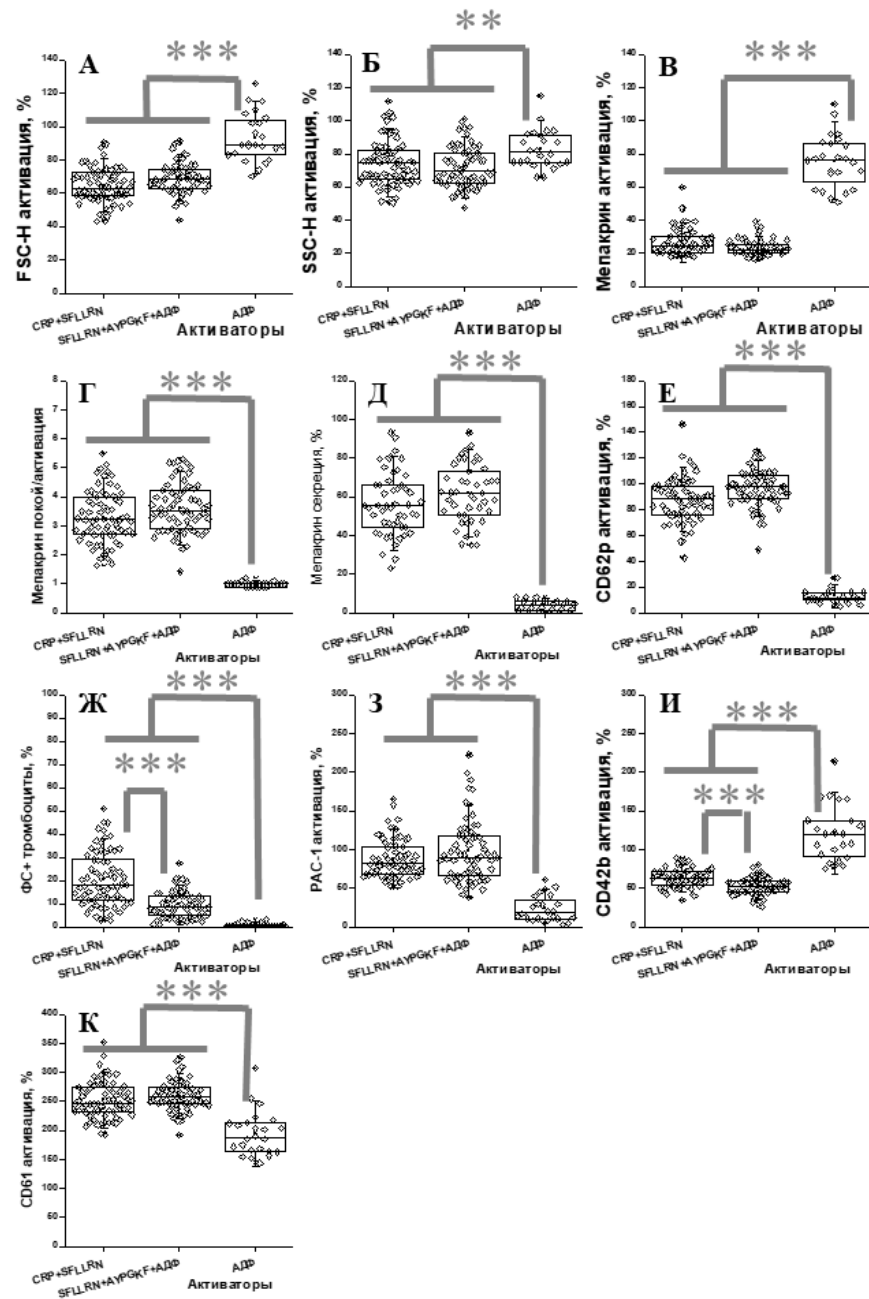


Рисунок 26 – Исследование влияния различных видов активации тромбоцитов (смесь CRP+SfLLRN; смесь SfLLRN+AYPGKF+АДФ, АДФ) на активационный ответ тромбоцитов. А. FSC. Б. SSC. В. Уровень флуоресценции мелапирин. Г. Индекс дегрануляции плотных гранул. Д. Уровень секреции плотных гранул. Е. Уровень экспрессии CD62p. Ж. Процент FC+ тромбоцитов. З. Уровень связывания PAC-1. И. Уровень экспрессии CD42b. К. Уровень экспрессии CD61. Статистика как на Рисунке 13

После стимуляции у детей был ниже выброс плотных гранул, что выражалось в сниженных в 1,1 раза индексе дегрануляции ( $3,0 \pm 0,5$  у  $D_{1-5}$  VS  $3,7 \pm 0,8$  у взрослых,  $p < 0,001$ ;  $3,3 \pm 0,9$  у  $D_{6-10}$ ,  $3,4 \pm 1,0$  у  $D_{11-18}$  и  $3,7 \pm 0,8$  у взрослых,  $p < 0,005$ ; Рисунок 27Е) и уровне секреции ( $49 \pm 8,6$  у  $D_{1-5}$ ,  $57 \pm 16,1$  у  $D_{6-10}$ ,  $58 \pm 19,0$  у  $D_{11-18}$  и  $62 \pm 16,0$  у взрослых,  $p < 0,05$ ; Рисунок 27Ж), однако отличий по уровню флуоресценции мепакрина обнаружено не было (Рисунок 27Д). Уровень Р-селектина в тромбоцитах детей был в 1,2 раза ниже, чем в тромбоцитах взрослых ( $81 \pm 11,1$  у  $D_{1-5}$ ,  $92 \pm 19,1$  у  $D_{6-10}$ ,  $88 \pm 16,4$  у  $D_{11-18}$  и  $102 \pm 15,0$  у взрослых,  $p < 0,005$ ) (Рисунок 27З). Что касается уровня связывания PAC-1, он был в 1,3 раза ниже у  $D_{1-5}$  в сравнении с  $D_{11-18}$  ( $71 \pm 13,1$  и  $82 \pm 21,7$ , соответственно,  $p < 0,05$ ), однако отличий между детьми и взрослыми обнаружено не было (Рисунок 27И). Также не было обнаружено отличий между детьми и взрослыми по уровням экспрессии CD42b и CD61 и проценту FC<sup>+</sup> тромбоцитов (Рисунок 27К-М, соответственно). Эти данные указывают на то, что при стимуляции смесью CRP+SFLLRN тромбоциты детей младшего возраста были меньше по размеру, а также тромбоциты детей всех возрастных групп имели ниже индекс дегрануляции, уровень секреции плотных гранул и уровень Р-селектина в сравнении с тромбоцитами взрослых.

### **3.2.4 Сравнение активационного ответа тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев на стимуляцию смесью SFLRRN+AYPGKF+АДФ**

На Рисунке 28 показаны распределения параметров функциональной активности тромбоцитов при активации смесью SFLRRN+AYPGKF+АДФ у детей разных возрастных групп в сравнении со здоровыми взрослыми добровольцами. После стимуляции у  $D_{1-5}$  FSC был в 1,2 раза меньше, чем у  $D_{11-18}$  ( $62 \pm 9,1$  и  $73 \pm 8,7$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) и взрослых ( $62 \pm 9,1$  и  $73 \pm 9,9$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) (Рисунок 28А). Не было обнаружено отличий в соотношении FSC покоящегося к активированному, SSC и соотношении SSC покоящегося к активированному между детьми и взрослыми (Рисунок 28Б-Г, соответственно).

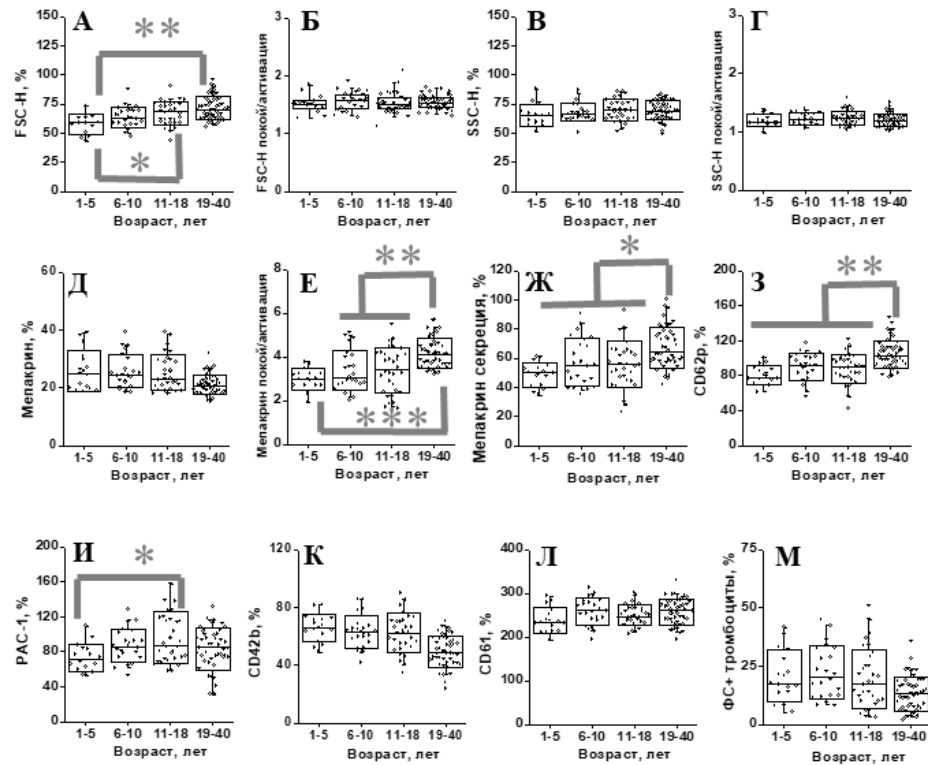


Рисунок 27 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов здоровых детей разных возрастных групп (слева) и здоровых взрослых добровольцев (справа) при активации смесью CRP+SFLLRN. А. FSC. Б. Соотношение FSC в покое и при активации. В. SSC. Г. Соотношение SSC в покое и при активации. Д. Уровень флуоресценции мепакрина. Е. Индекс дегрануляции плотных гранул. Ж. Уровень секреции плотных гранул. З. Уровень экспрессии CD62p. И. Уровень связывания PAC-1. К. Уровень экспрессии CD42b. Л. Уровень экспрессии CD61. М. Процент ФС+ тромбоцитов. Статистика как на Рисунке 13

Хотя не было обнаружено различий по флуоресценции мепакрина между детьми и взрослыми (Рисунок 28Д), в тромбоцитах детей младшей возрастной группы был снижен выброс плотных гранул, что выразилось в сниженных в 1,2 раза индексе дегрануляции ( $3,3 \pm 0,5$  и  $4,0 \pm 0,8$ , соответственно,  $p < 0,05$ ) (Рисунок 28Е) и сниженном в 1,3 раза уровне секреции в сравнении с тромбоцитами взрослых ( $50 \pm 9,7$  и  $64 \pm 15,1$ , соответственно,  $p < 0,001$ ) (Рисунок 28Ж). Также в тромбоцитах детей младшей возрастной группы был снижен выброс  $\alpha$ -гранул, что

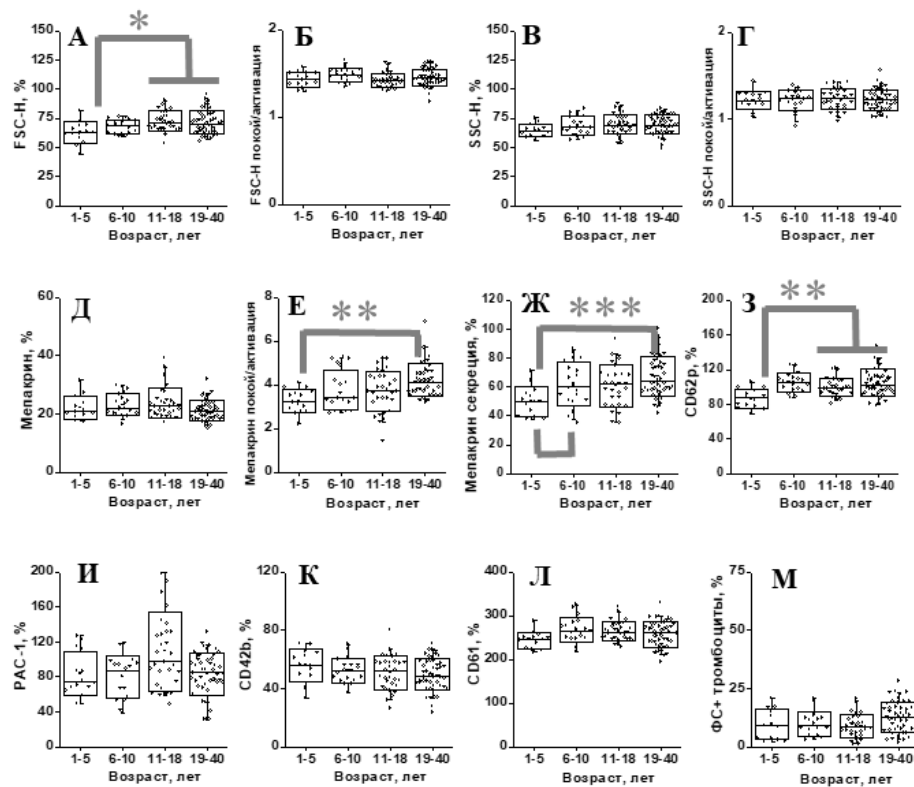


Рисунок 28 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов здоровых детей разных возрастных групп (слева) и здоровых взрослых добровольцев (справа) при активации смесью SFLLRN+AYPGKF+АДФ. А. FSC. Б. Соотношение FSC в покое и при активации. В. SSC. Г. Соотношение SSC в покое и при активации. Д. Уровень флуоресценции мепакрина. Е. Индекс дегрануляции плотных гранул. Ж. Уровень секреции плотных гранул. З. Уровень экспрессии CD62p. И. Уровень связывания PAC-1. К. Уровень экспрессии CD42b. Л. Уровень экспрессии CD61. М. Процент FCs+ тромбоцитов. Статистика как на Рисунке 13

выражалось в более низком уровне Р-селектина по сравнению с тромбоцитами детей более старшего возраста и взрослых ( $86 \pm 10,8$  у  $D_{1-5}$  и  $98 \pm 13,6$  у  $D_{11-18}$ ,  $108 \pm 15,8$  у взрослых,  $p < 0,01$ ; Рисунок 283). Не было обнаружено отличий в уровне связывания PAC-1, уровнях экспрессии CD42b и CD61 и проценте FCs+ тромбоцитов между детьми и взрослыми в ответ на стимуляцию (Рисунок 28И-М, соответственно). Эти данные указывают на то, что после стимуляции смесью

SFLRRN+AYPGKF+АДФ у тромбоцитов детей младшего возраста меньше размер тромбоцитов, ниже индекс дегрануляции и уровень секреции плотных гранул, а также ниже уровень Р-селектина в сравнении с тромбоцитами взрослых.

### **3.2.5 Сравнение активационного ответа тромбоцитов здоровых детей и здоровых взрослых добровольцев на стимуляцию АДФ**

Поскольку выборка детей для данного теста была немногочисленной, не было возможным разделить их на возрастные группы, как было сделано для других видов стимуляции. В рамках протокола, описанного выше, не было обнаружено отличий между группами по FSC, индексу дегрануляции и уровню секреции плотных гранул, уровню Р-селектина, уровнях связывания PAC-1 и фибриногена, а также уровнях экспрессии CD42b и CD61 и проценте FC+ тромбоцитов (Рисунок 29А, Г-Л, соответственно) как в состоянии покоя, так и при активации. Единственными обнаруженными отличиями были в 1,1 раза меньший SSC при активации ( $25201 \pm 3832,3$  и  $27618 \pm 2898,2$ ,  $p < 0,05$ ; Рисунок 29Б) и сниженная в 1,2 раза флуоресценция мепакрина в покое ( $690 \pm 142$  и  $824 \pm 148$ ,  $p < 0,05$ ) и при активации ( $646 \pm 137$  и  $804 \pm 145$ ,  $p < 0,05$ ; Рисунок 29В) у детей в сравнении со взрослыми. Эти данные указывают на то, что при использовании нашего протокола тромбоциты детей мало отличаются от тромбоцитов взрослых в покое и при активации, поскольку они не отличаются по размеру, выбросу гранул обоих типов, уровню основных гликопротеинов и проценту FC+ тромбоцитов. Исключение составляет немного сниженное количество плотных гранул, что видно по флуоресценции мепакрина в обоих состояниях и по SSC при активации.

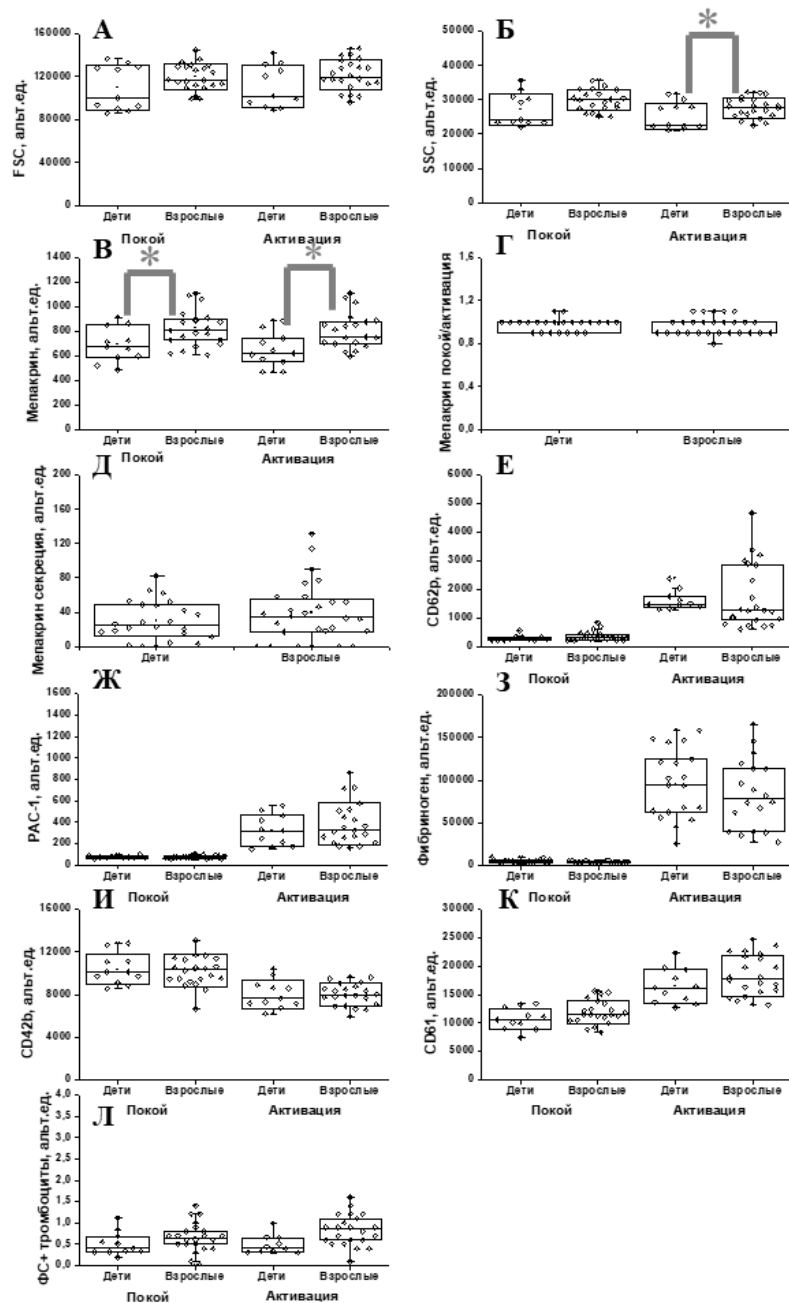


Рисунок 29 – Сравнение функциональной активности тромбоцитов здоровых детей разных возрастных групп (слева) и здоровых взрослых добровольцев (справа) в покое и при активации АДФ. А. FSC. Б. SSC. В. Уровень флуоресценции мепакрина. Г. Индекс дегрануляции плотных гранул. Д. Уровень секреции плотных гранул. Е. Уровень экспрессии CD62p. Ж. Уровень связывания РАС-1. З. Уровень связывания фибриногена. И. Уровень экспрессии CD42b. К. Уровень экспрессии CD61. Л. Процент ФС+ тромбоцитов. Статистика как на Рисунке 13

### **3.3 Исследование влияния преактивации тромбоцитов на их активационный ответ на стимуляцию АДФ**

#### **3.3.1 Исследование влияния преактивации тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП на их активационный ответ на стимуляцию АДФ**

Функциональную активность тромбоцитов, преактивированных плазмой пациентов с ИТП, оценивали в разные периоды времени (30 минут, 1 час и 2 часа инкубации с плазмой). Тромбоциты, инкубированные в собственной плазме добровольца, выступали в качестве контроля. Как видно на Рисунке 30, в состоянии покоя некоторые параметры (процент  $\text{FC}^+$  тромбоцитов и уровень связывания  $\text{PAC-1}$ ) становились преактивированными через 30 минут инкубации в плазме пациентов с ИТП ( $p < 0,05$ ; Рисунок 30А, В, соответственно). Уровень экспрессии  $\text{CD42b}$  же становился преактивированным через 1 час инкубации ( $p < 0,01$ ; Рисунок 30Б). Отличий по остальным параметрам (уровни экспрессии  $\text{CD61}$  и  $\text{CD62p}$ ) не было обнаружено (Рисунок 30Г, Д, соответственно). Преактивированные тромбоциты имели более высокий ответ на стимуляцию АДФ по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ) для большинства параметров, за исключением уровня экспрессии  $\text{CD61}$  и процента  $\text{FC}^+$  тромбоцитов. Таким образом, полученные результаты указывают, что тромбоциты преактивируются через 30 минут инкубации в плазме пациентов с ИТП. При этом такие тромбоциты обладают более высоким активационным ответом по сравнению с контролем.

Также оценивали функциональную активность тромбоцитов, инкубированных в собственной плазме добровольца и в плазме другого здорового добровольца. Как видно на Рисунке 31, в состоянии покоя и при активации не было обнаружено отличий между группами. Следовательно, можно предположить, что преактивация тромбоцитов не связана с их инкубацией в плазме другого добровольца.

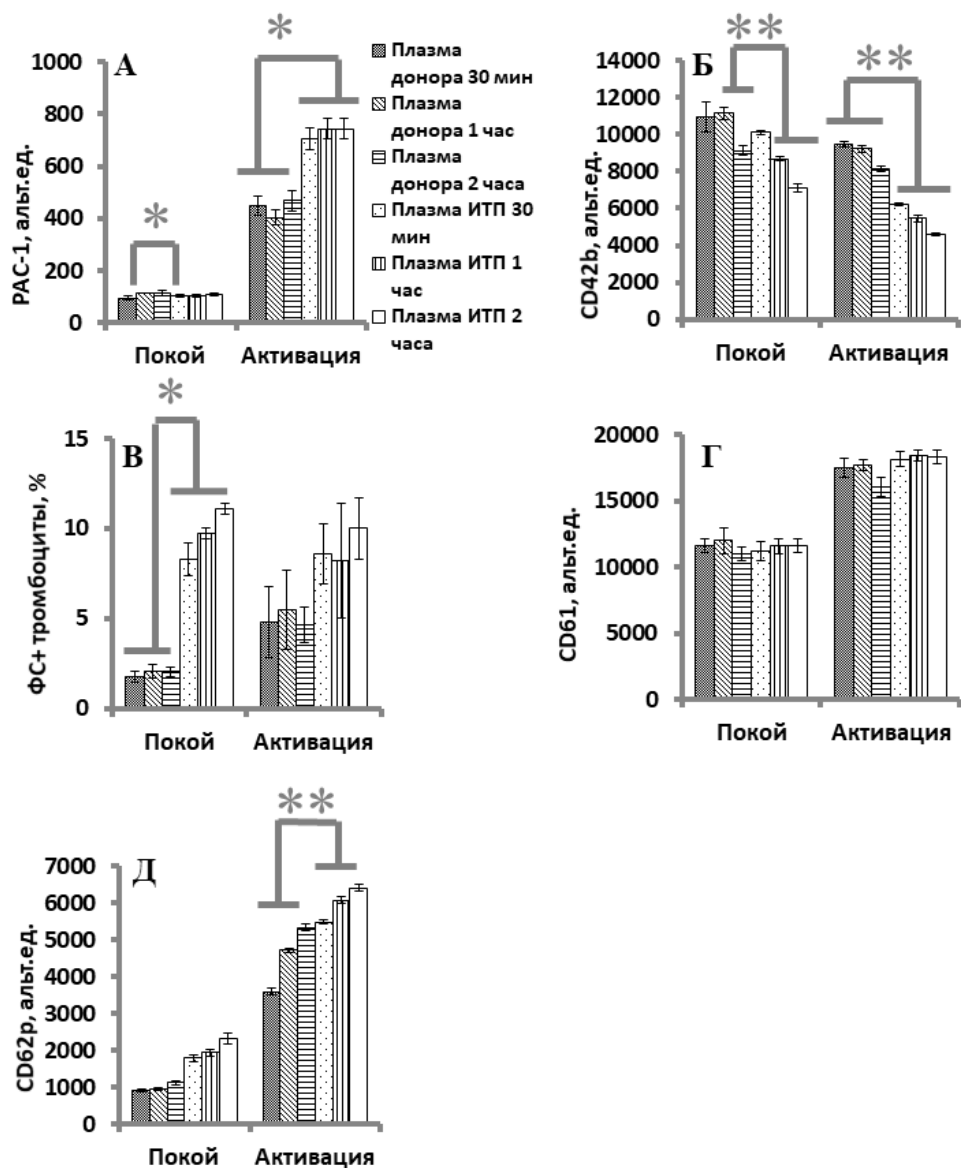


Рисунок 30 – Исследование влияния преактивации тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП на их функциональную активность в покое (слева) и при активации АДФ (справа). А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Процент ФС+ тромбоцитов. Г. Уровень экспрессии CD61. Д. Уровень экспрессии CD62p. Статистика как на Рисунке 13

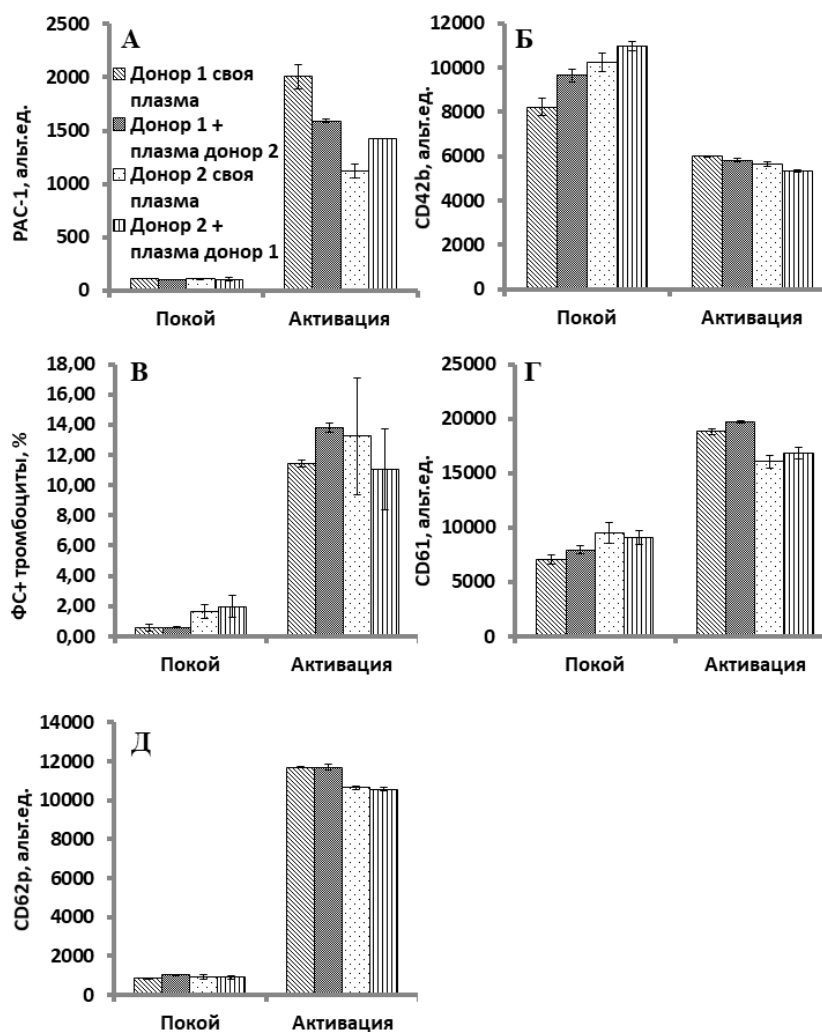


Рисунок 31 – Исследование влияния инкубации тромбоцитов в плазме другого добровольца на их функциональную активность в покое и при стимуляции АДФ. А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Процент ФС+ тромбоцитов. Г. Уровень экспрессии CD61. Д. Уровень экспрессии CD62p. Статистика как на Рисунке 13

### 3.3.2 Исследования влияния преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ на активационный ответ на стимуляцию тем же агонистом

Поскольку 1 мкМ АДФ вызывал статистически значимый, но слабый активационный ответ (Рисунок 3А-Г), эта концентрация агониста была использована для преактивации тромбоцитов. Оценивали функциональную активность тромбоцитов в разные периоды времени (сразу после добавления АДФ,

через 10 минут, 30 минут и 1 час инкубации с агонистом). В качестве контроля выступали тромбоциты без инкубации с низкой дозой АДФ.

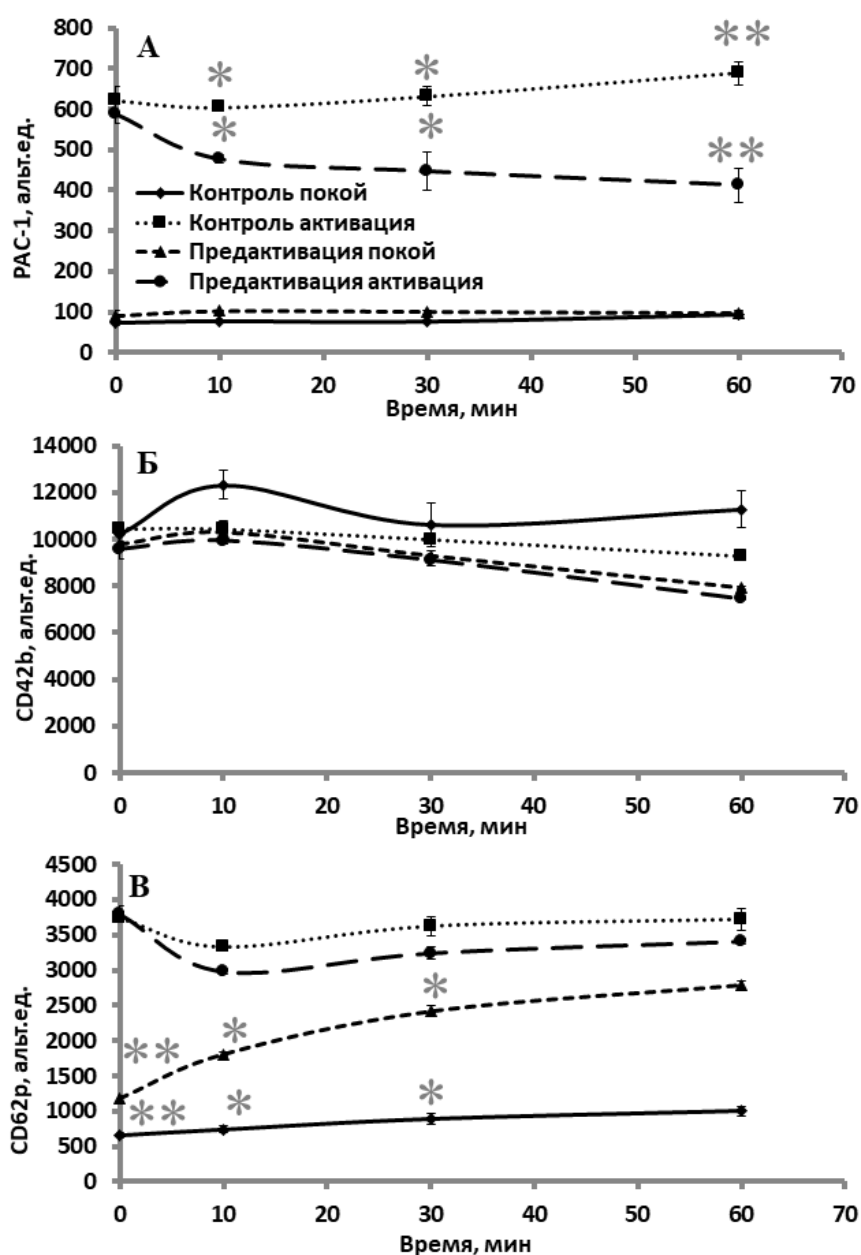


Рисунок 32 – Исследование влияния преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ (1 мкМ) на их функциональную активность в покое и при активации АДФ. Контроль – непреактивированные тромбоциты. А. Уровень связывания PAC-1. Б. Уровень экспрессии CD42b. В. Уровень экспрессии CD62p. Статистика как на Рисунке 13

В состоянии покоя не было обнаружено отличий в уровне связывания PAC-1 и уровне экспрессии CD42b (Рисунок 32А, Б, соответственно). Сразу после добавления агониста уровень экспрессии CD62p в покое был в 1,8 раза выше по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Через 30 минут инкубации эта разница выросла до 2,7 раза и вышла на плато ( $p < 0,05$ ; Рисунок 32В). После стимуляции единственной обнаруженной разницей было снижение уровня связывания PAC-1 в 1,3 раза через 10 мин инкубации ( $p < 0,05$ ). Через 1 час инкубации это снижение стало еще более выраженным, и разница составляла уже 1,6 раза ( $p < 0,01$ ). Эти результаты позволяют предположить, что преактивация тромбоцитов достигает насыщения через 30 минут инкубации с 1 мкМ АДФ. Такие преактивированные тромбоциты имеют сниженный активационный ответ на стимуляцию АДФ по сравнению с непреактивированными тромбоцитами.

### **3.3.3 Сравнение функциональной активности тромбоцитов, преактивированных низкой дозой АДФ и плазмой пациентов с ИТП**

При сравнении двух типов преактивации тромбоцитов было обнаружено, что в состоянии покоя преактивация низкой дозой АДФ вызвала увеличение уровня связывания PAC-1 в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ; Рисунок 33А), тогда как плазма пациентов с ИТП на этот параметр не влияла (Рисунок 33Г). После стимуляции низкая доза АДФ вызывала снижение уровня связывания PAC-1 в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), тогда как плазма пациентов с ИТП приводила к повышению этого параметра в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ). Оба типа преактивации не влияли на уровень экспрессии CD42b в состоянии покоя. После стимуляции низкая доза АДФ вызывала снижение параметра в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ; Рисунок 33Б). Плазма пациентов с ИТП вызывала усиление активационного ответа в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ; Рисунок 33Д). Преактивация низкой дозой АДФ вызвала увеличение уровня экспрессии CD62p в покое в 2,7 раза по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), однако ответ на стимуляцию между преактивированными и непреактивированными тромбоцитами не отличался (Рисунок 33В). Плазма ИТП вызвала увеличение параметра в 2 раза в состоянии покоя в сравнении с контролем ( $p < 0,05$ ). Активационный ответ у

преактивированных тромбоцитов был в 1,5 раза выше ( $p < 0,01$ ) (Рисунок 33Е). Эти результаты указывают, что преактивация тромбоцитов плазмой ИТП сильнее и вызывает усиление активационного ответа на стимуляцию АДФ по сравнению с преактивацией низкой дозой агониста. Преактивация тромбоцитов плазмой пациентов с ИТП сходна с наблюдаемой преактивацией у пациентов с ИТП и имеет сходное влияние на активационный ответ на стимуляцию АДФ.

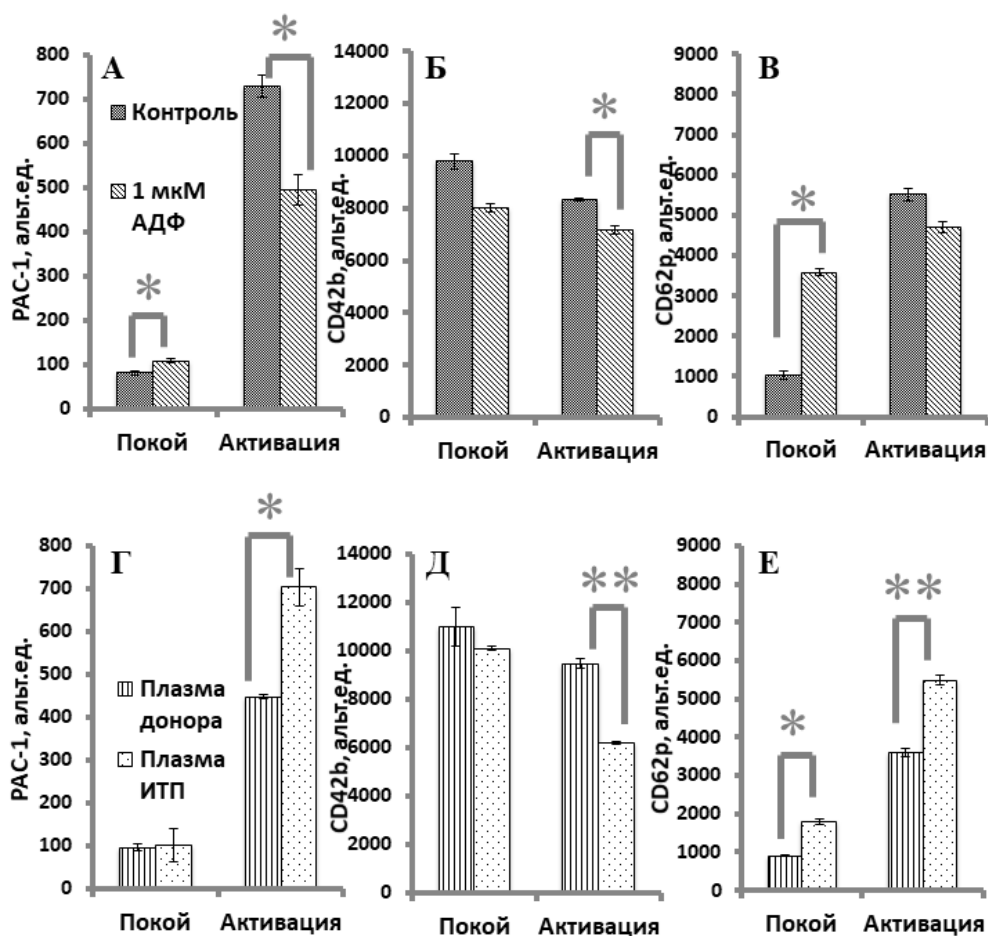


Рисунок 33 – Сравнение влияния преактивации тромбоцитов низкой дозой АДФ (вверху) и плазмой пациентов с ИТП (внизу) на их функциональную активность в покое (слева) и при активации АДФ (справа). Контроль – непреактивированные тромбоциты. А, Г. Уровень связывания PAC-1. Б, Д. Уровень экспрессии CD42b. В, Е. Уровень экспрессии CD62p. Статистика как на Рисунке 13

## Глава 4. Обсуждение результатов

Первым важным разделом данной работы являлась разработка метода исследования функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ с помощью проточной цитометрии. Разработанный в данной работе протокол позволяет всесторонне оценивать активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ с высокой степенью чувствительности и минимальным процентом образования агрегатов. Кроме того, протокол чувствителен к изменениям в активационном ответе тромбоцитов у пациентов на двойной антиагрегантной терапии после ЧКВ в связи с ОКС и, следовательно, потенциально может быть использован для мониторинга эффективности ингибирования активности тромбоцитов у таких пациентов. Также протокол чувствителен к преактивации и изменениям активационного ответа тромбоцитов у пациентов с ИТП.

Подобранные условия для оценки функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ отличаются от данных других исследований [14,35,37]. В этих работах авторы разбавляли цельную цитратную кровь антителами в соотношении 1:1 и использовали низкую (0,5 мкМ) и высокую (20 мкМ) концентрации агониста. Было обнаружено, что разбавление цельной крови антителами в соотношении 1:1 с последующим разбавлением в 100 раз буфером перед измерением в проточном цитометре приводит к высокому проценту образованию агрегатов (60%). Поскольку в работе, посвященной рекомендациям по исследованию функциональной активности тромбоцитов с помощью проточной цитометрии, упоминается, что желательно разбавлять кровь для избегания образования агрегатов [194], в оригинальном цитометрическом протоколе использовалось разбавление 1:12-1:13 [195], и не было обнаружено отличий в проценте образования агрегатов для других разбавлений, кровь разбавляли в соотношении 1:20. Тот факт, что большинство параметров достигали насыщения при активации 5 мкМ АДФ, обусловил выбор данной концентрации агониста для стимуляции. Далее, ряд авторов упоминает использование 15-кратного

разбавления образца в 1% растворе ПФА или в растворе CellFix для остановки активации тромбоцитов [14,35,37]. Было обнаружено, что фиксация тромбоцитов возможна, но не является необходимым условием. В данной работе использованы хорошо охарактеризованные флуоресцентно меченные маркеры [34,194], позволяющие оценить большинство параметров активационного ответа тромбоцитов.

Полученные в этой работы данные о снижении функциональной активности тромбоцитов пациентов на двойной антиагрегантной терапии после ЧКВ согласуются с данными исследования [196], в котором сообщается о снижении уровня Р-селектина и уровня связывания PAC-1 после стимуляции АДФ у пациентов на двойной антиагрегантной терапии.

Данные о том, что тикагрелор ингибировал активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ, согласуются с данными исследования [197], в котором авторы сообщают о снижении уровня Р-селектина и уровня связывания PAC-1 в ответ на активацию агонистом у здоровых добровольцев после приема тикагрелора в сравнении с образцами до приема ингибитора.

Известно, что тромбоциты пациентов с ИТП являются преактивированными, то есть они экспрессируют ряд активационных маркеров на более высоком, чем в норме, уровне. Существует исследование [28], в котором сообщается о более высоком уровне Р-селектина и уровне связывания PAC-1 у пациентов с ИТП в состоянии покоя по сравнению со здоровыми добровольцами. С помощью разработанного в данной работе протокола также были обнаружены повышенные уровень связывания PAC-1 и уровень экспрессии Р-селектина в покое у пациентов с ИТП в сравнении со здоровыми добровольцами. Полученные в этой работе данные о более высоком ответе на стимуляцию АДФ у взрослых пациентов с ИТП, чем у здоровых добровольцев, противоречат данным другого исследования [168], авторы которого сообщают о более низком уровне этих параметров у пациентов с хронической ИТП, чем у здоровых добровольцев. Эти противоречия можно объяснить более высокой концентрацией агониста, использованной в этой работе (5 мкМ в данной работе и 2 мкМ в другом исследовании). С другой стороны,

есть исследование [30], в котором авторы сообщают об отсутствии различий в уровне Р-селектина и уровне связывания PAC-1, что противоречит данным этой работы. Эти различия также можно объяснить разницей в используемых концентрациях агониста (5 мкМ в данной работе, 0,5 мкМ и 20 мкМ в другом исследовании).

Другим важным разделом этой работы является исследование возрастных изменений активационного ответа тромбоцитов на различные виды стимуляции у здоровых детей различных возрастных групп и определение возраста, когда исчезают отличия в функциональной активности тромбоцитов между детьми и взрослыми. В данной работе было показано, что в состоянии покоя тромбоциты детей не имеют статистически значимых отличий от тромбоцитов взрослых, за исключением меньшего размера и сниженного количества плотных гранул и повышенного процента FC<sup>+</sup> тромбоцитов у детей младшей возрастной группы (в возрасте от 1 года до 5 лет). После стимуляции смесями CRP+SFLLRN и SFLLRN+AYPGKF+АДФ в тромбоцитах детей выброс плотных гранул и уровень Р-селектина были ниже, чем в тромбоцитах взрослых. При стимуляции АДФ тромбоциты детей и взрослых не отличались, за исключением сниженного количества плотных гранул у детей.

Полученные данные о сходстве тромбоцитов детей и взрослых в состоянии покоя согласуются с данными исследования [25], в котором сообщается о сходном уровне связывания PAC-1, уровне экспрессии CD42b и уровне Р-селектина, но сниженном уровне экспрессии CD61 в тромбоцитах детей в сравнении с тромбоцитами взрослых. Касательно различий в активационном ответе тромбоцитов на стимуляцию TRAP между детьми и взрослыми мнения разнятся. С одной стороны, сообщают [25] о сниженных уровнях экспрессии CD42b и CD61 и уровне Р-селектина в тромбоцитах детей в сравнении с тромбоцитами взрослых. В данной работе также не был обнаружен сниженный уровень Р-селектина, но были обнаружены сходные уровни экспрессии CD42b и CD61 в тромбоцитах детей после стимуляции смесью SFLLRN+AYPGKF+АДФ в сравнении с тромбоцитами взрослых. С другой стороны, также существует исследование [26], в котором

авторы сообщают о более высоком уровне Р-селектина и уровне связывания PАС-1 у детей, чем у взрослых. Кроме того, существует исследование [24], в котором авторы не обнаружили отличий в уровне экспрессии CD61, уровне Р-селектина и уровне выброса плотных гранул между детьми в возрасте от 1 года до 5 лет, от 6 до 10 лет и от 11 до 18 лет. В этой работе были обнаружены сниженный уровень Р-селектина и уровень выброса плотных гранул и сходный уровень связывания PАС-1 в тромбоцитах детей в сравнении с тромбоцитами взрослых. Аналогичным образом, сообщается о более высоком уровне Р-селектина и уровне связывания PАС-1 у детей в сравнении со взрослыми после стимуляции АДФ [26], тогда как в данной работе тромбоциты детей и взрослых сходны. Эти противоречия можно объяснить различными типами и концентрациями агонистов, а также отличиями в протоколе исследования активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ, между этим исследованием [26] и данной работой. В другом же исследовании сообщается об отсутствии различий в уровне экспрессии CD61, но сниженном выбросе гранул обоих типов у детей в сравнении со взрослыми [24], тогда как в этой работе единственным отличием активационного ответа тромбоцитов детей от тромбоцитов взрослых было сниженное количество плотных гранул. Это расхождение в результатах также объясняется различными протоколами исследования активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ. Как и в исследовании [24], в этой работе дети были разделены на 3 возрастные группы. Группы были сформированы в соответствии с литературными данными о диапазонах нормальных значений параметров для детей разных возрастных групп, используемых в агрегометрии [41,42]. В данной работе впервые показана зависимость отличий в функциональной активности тромбоцитов детей от возраста.

Возраст, когда исчезают отличия в функциональной активности тромбоцитов детей и взрослых, также не определен. В одном исследовании сообщается о более высоком уровне Р-селектина и уровне связывания PАС-1 у детей в возрасте от 1 года до 14 лет [26]. В другом исследовании сообщается о более низких уровнях экспрессии CD42b и CD61 и уровне Р-селектина у детей в возрасте от 2 до 15 лет

[25]. Кроме того, есть исследования, в которых авторы сообщают о сохранении различий в функциональной активности тромбоцитов до 18 лет [24]. Насколько известно, ранее в исследованиях зависимости различий в функциональной активности тромбоцитов детей от возраста не использовался метод проточной цитометрии. В данной работе было показано, что различия в активационном ответе тромбоцитов между детьми и взрослыми сохраняются до 18 лет.

В данной работе было использовано несколько видов стимуляции для того, чтобы имитировать различные стадии образования тромба. Стимуляция смесью CRP+SFLLRN имитирует начальную стадию [126], когда тромбоциты взаимодействуют с субэндотелиальным коллагеном с помощью рецептора GPIIb/IIIa. В результате тромбоциты адгезируют к месту повреждения [198]. Стимуляция смесью SFLLRN+AYPGKF+АДФ имитирует активацию тромбоцитов тромбином, что вызывает изменение их формы и секрецию гранул [128]. Наконец, стимуляция АДФ имитирует последнюю стадию образования тромба, когда тромбоциты секреторируют АДФ для активации других тромбоцитов [128].

Касательно влияния разных типов активации на различия между тромбоцитами детей и взрослых, было обнаружено, что слабая активация АДФ не вызывала статистически значимых отличий в индексе дегрануляции и уровне секреции плотных гранул по сравнению с активациями смесями CRP+SFLLRN и SFLLRN+AYPGKF+АДФ (Рисунок 29Г, Д; Рисунок 27Е, Ж; Рисунок 28Е, Ж, соответственно). Отличия в уровнях Р-селектина между детьми и взрослыми, обнаруженные после стимуляции смесями CRP+SFLLRN и SFLLRN+AYPGKF+АДФ не были статистически значимыми после стимуляции АДФ (Рисунок 27З; Рисунок 28З; Рисунок 29Е). Эти результаты указывают, что в тромбоцитах детей выброс плотных и  $\alpha$ -гранул ниже, чем в тромбоцитах взрослых, независимо от типа активации.

Еще одним важным разделом данной работы является исследование функциональной активности тромбоцитов в преактивированном состоянии. Как уже было сказано ранее, тромбоциты пациентов с ИТП являются преактивированными по таким параметрам, как уровень связывания PAC-1 и

уровень Р-селектина [28]. Предполагают, что это обеспечивает их более высокую по сравнению с тромбоцитами здоровых доноров функциональную активность и снижает степень тяжести кровотечений при низкой концентрации тромбоцитов [43,44]. Данные касательно влияния преактивации тромбоцитов у пациентов с ИТП на их функциональную активность противоречивы. С одной стороны, есть сообщения о сниженном активационном ответе на стимуляцию АДФ у таких преактивированных тромбоцитов в сравнении с тромбоцитами здоровых добровольцев [29]. С другой стороны, сообщают об отсутствии отличий в активационном ответе на стимуляцию АДФ между преактивированными тромбоцитами пациентов с ИТП и тромбоцитами здоровых добровольцев [30].

Снижение активационного ответа преактивированных тромбоцитов у пациентов с ИТП на стимуляцию АДФ может быть связано с десенситизацией аденозиновых рецепторов на их поверхности. Чтобы проверить эту гипотезу сравнили преактивацию тромбоцитов, вызванную действием низкой дозой АДФ и инкубацией тромбоцитов здорового добровольца в плазме пациента с ИТП (Рисунок 25).

Согласно полученным в этой работе данным, инкубация тромбоцитов с 1 мкМ АДФ вызывает их преактивацию по уровню Р-селектина через 30 минут инкубации с агонистом. Стимуляция тромбоцитов 5 мкМ АДФ приводит к статистически значимому снижению активационного ответа по уровню связывания РАС-1 и незначимому снижению ответа по уровню Р-селектина между преактивированными и непреактивированными тромбоцитами. Полученные результаты согласуются с данным литературы, согласно которым наблюдается зависимость между снижением способности тромбоцитов к агрегации и продолжительностью их инкубации с АДФ с последующей стимуляцией тем же агонистом [199]. Однако следует отметить, что в этих работах использовался метод оптической агрегометрии, поэтому они демонстрируют влияние преактивации тромбоцитов АДФ только на их способность к агрегации. С помощью метода проточной цитометрии, использованного в этой работе, можно было оценивать несколько функций тромбоцитов одновременно: способность к адгезии (CD42b),

агрегации (PAC-1 и CD61) и секреции обоих типов гранул (мепакрин и CD62p), а также прокоагулянтную активность (процент FC+ тромбоцитов). Таким образом, в данной работе впервые показано влияние преактивации тромбоцитов на все стороны их функциональной активности.

Инкубация тромбоцитов здорового добровольца в плазме пациента с ИТП также приводила к их статистически значимой преактивации по уровню связывания PAC-1 и проценту FC+ тромбоцитов и незначимой – по уровню P-селектина через 30 минут. Преактивация приводила к усилению активационного ответа тромбоцитов по уровню связывания PAC-1, уровню экспрессии CD42b и уровню P-селектина. Аналогичным образом наблюдали усиление активационного ответа на стимуляцию АДФ в тромбоцитах пациентов с ИТП в сравнении с тромбоцитами здоровых добровольцев. При этом сравнение двух видов преактивации тромбоцитов показывает их разнонаправленное действие: преактивация низкой дозой АДФ вызывает снижение активационного ответа тромбоцитов, тогда как преактивация плазмой пациента с ИТП – его усиление. Следовательно, можно предположить, что преактивация тромбоцитов пациентов с ИТП не вызвана действием АДФ, и в них не происходит десенситизации рецепторов агониста и ингибирования этого пути сигнализации.

#### **4.1 Итоги выполнения диссертационной работы**

В настоящей работе разработан протокол, позволяющий исследовать активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ методом проточной цитометрии. Определена концентрация агониста (5 мкМ), необходимая для стимуляции. Также определены кинетика активации тромбоцитов АДФ, кинетика связывания флуоресцентно меченных антител с рецепторами на поверхности тромбоцитов и последовательность активации и окрашивания тромбоцитов антителами, что обусловило проведения этих процессов одновременно в течение 15 минут. Исследовано влияние разбавления крови на процент образования агрегатов, что позволило остановить выбор на разбавлении крови в соотношении 1:20. Показано, что добавление экзогенного кальция приводит к снижению ответа

по уровню связывания PAC-1, но оно необходимо для создания более физиологических условий. Также показано, что в рамках данного протокола тромбоциты можно фиксировать 1% раствором ПФА для тех ситуаций, когда невозможно сразу же проводить измерения. Анализ влияния преаналитических параметров показал, что оценивать активационный ответ тромбоцитов на стимуляцию АДФ можно в течение 3 часов после взятия крови. Транспортировка крови может приводить к преактивации тромбоцитов по уровню Р-селектина в состоянии покоя, но не влияет на активационный ответ тромбоцитов. Было показано, что протокол чувствителен к изменениям активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ у пациентов на двойной антиагрегантной терапии после ЧКВ после ОКС, что позволяет предположить возможность его использования для мониторинга функциональной активности тромбоцитов у таких пациентов. Протокол также обладает чувствительностью к ингибитору АДФ рецептора тикагрелору. Кроме того, была показана чувствительность протокола к преактивации тромбоцитов у пациентов с ИТП и изменениям активационного ответа тромбоцитов таких пациентов на стимуляцию АДФ.

Другим важным результатом данной работы является сравнение функциональной активности тромбоцитов детей и взрослых разных возрастных групп. Было показано снижение функциональной активности тромбоцитов при стимуляции смесями CRP+SFLLRN и SFLLRN+AYPGKF+АДФ, а также схожий активационный ответ тромбоцитов детей и взрослых на стимуляцию АДФ. Было показано, что различия в функциональной активности тромбоцитов сохраняются до 18 лет. Эти результаты представляют важность для детской гематологии, поскольку наследственные нарушения функциональной активности тромбоцитов зачастую детектируются в детстве[4]. Следовательно, необходимо определить интервалы нормальных значений параметров функциональной активности тромбоцитов детей для правильной интерпретации результатов исследования.

Наконец, было проведено исследование влияния преактивированного состояния тромбоцитов на их функциональную активность. Было определено время инкубации с АДФ и плазмой пациента с ИТП, необходимое для

преактивации тромбоцитов. Также было показано, что преактивация тромбоцитов низкой дозой АДФ приводит к снижению их активационного ответа на стимуляцию тем же агонистом, тогда как преактивация плазмой пациента с ИТП вызывает его повышение. Данные результаты позволили предположить, что преактивация тромбоцитов пациентов с ИТП не вызвана действием АДФ.

Таким образом, в результате данной работы получены новые уникальные данные по исследованию тромбоцитарной функции в нормальном и преактивированном состоянии, которые могут в дальнейшем применяться в диагностике нарушений функциональной активности тромбоцитов.

#### **4.2 Перспективы дальнейшего развития темы исследования**

В перспективе развития темы планируется исследовать функцию тромбоцитов у детей с кровоточивостью неустановленной природы. Планируется провести сравнение активности тромбоцитов у таких пациентов и здоровых детей. Также планируется исследовать наличие корреляции между результатами теста функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии при стимуляции АДФ, степенью кровоточивости пациентов, результатами общего анализа крови и результатами теста агрегации тромбоцитов с АДФ. Это может помочь в диагностике нарушений функции тромбоцитов, вызывающих кровоточивость у таких пациентов. Также дальнейшее исследование изменений активности тромбоцитов у пациентов с кровоточивостью в результате лечения позволит использовать разработанный метод для мониторинга эффективности терапии.

## Выводы

1. Разработан метод исследования функциональной активности тромбоцитов при стимуляции АДФ с помощью проточной цитометрии. Метод обладает высокой чувствительностью, эффективно детектируя активацию интегринов и секрецию  $\alpha$ -гранул при стимуляции агонистом при минимальном проценте образования агрегатов.

2. Разработанный метод исследования чувствителен к снижению активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ почти в 3 раза по уровню активации интегринов и выбросу  $\alpha$ -гранул у пациентов на двойной антиагрегантной терапии в сравнении со здоровыми добровольцами.

3. Разработанный метод исследования чувствителен к усилению активационного ответа тромбоцитов на стимуляцию АДФ в 1,7 раза по уровню активации интегринов и в 1,8 раза по выбросу  $\alpha$ -гранул у пациентов с ИТП в сравнении со здоровыми добровольцами.

4. В состоянии покоя тромбоциты детей сходны с тромбоцитами взрослых за исключением детей младшего возраста (от 1 года до 5 лет), тромбоциты которых имеют меньший размер и меньшее количество плотных гранул, чем тромбоциты детей старшего возраста (от 11 до 18 лет) и взрослых, а также более высокий процент ФС+ тромбоцитов по сравнению со взрослыми. Активационный ответ тромбоцитов детей всех возрастных групп на разные виды стимуляции снижен по выбросу плотных и  $\alpha$ -гранул. Различия в функциональной активности тромбоцитов между детьми и взрослыми исчезают в возрасте 18 лет.

5. Преактивация тромбоцитов низкой дозой АДФ вызывает снижение активационного ответа на стимуляцию 5 мкМ АДФ, тогда как преактивация плазмой пациента с ИТП вызывает его усиление. Это позволяет предположить, что преактивация тромбоцитов у пациентов с ИТП вызвана не действием АДФ, а действием антитромбоцитарных антител на их рецепторы на поверхности тромбоцитов.

## Практические рекомендации

1. Пациентам, получающим двойную антиагрегантную терапию, рекомендуется ежемесячно проводить оценку функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии в ответ на стимуляцию 5 мкМ АДФ, начиная с 30 дня получения терапии для мониторинга эффективности ингибирования функции тромбоцитов.

2. Пациентам с ИТП, получающим терапию, рекомендуется проводить оценку функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии при стимуляции 5 мкМ АДФ для мониторинга эффективности терапии. В качестве контроля рекомендуется проводить оценку функции тромбоцитов до начала лечения. В первые 30 дней после начала лечения оценку активности тромбоцитов рекомендуется проводить на 7 и 28 день получения терапии, далее – ежемесячно при условии наличия положительной динамики лечения.

3. Детям с подозрением на врожденные нарушения функции тромбоцитов рекомендуется проведение оценки функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии при разных видах стимуляции (смесью CRP+SFLLRN, смесью SFLLRN+AYPGKF+АДФ и АДФ) для выявления нарушений функции тромбоцитов. При этом для оценки результатов теста рекомендуется использовать референсные интервалы значений параметров, полученные у детей в возрасте младше 18 лет.

## Список обозначений и сокращений

- Btk – Brutone tirosinekinase; тирозинкиназа Брутона
- CCL – chemokine (C-C motif) ligand; лиганд хемокина
- CRP – collagen related peptide; коллаген-подобный пептид
- CXCL – chemokine (C-X-C motif) ligand; лиганд хемокина
- EC<sub>50</sub> – полу эффективная концентрация
- FGF – fibroblast growth factor; фактор роста фибробластов
- FSC – forward scattering; прямое светорассеяние
- IFN – interferon; интерферон
- IL – interleukin; интерлейкин
- IP3 – inositol triphosphate; инозитол 1,4,5-трифосфат
- ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif; иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина
- LAT – linker of activated T-cells; линкер активированных Т-клеток
- MIP – macrophage inflammatory protein; воспалительный белок макрофагов
- PAF – platelet-activating factor; фактор, активирующий тромбоциты
- PAR – protease-activated receptors; рецепторы, активирующиеся протеазой
- PF4 – platelet factor 4; фактор тромбоцитов 4
- PIP2 – phosphatidylinositol diphosphate; фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат
- PI3K – фосфоинозитид-3-киназа
- PKB/Akt – proteinkinase B/Akt; протеинкиназа B/Akt
- PLC – phospholipase C; фосфолипаза C
- Q1 – первый квартиль
- Q3 – третий квартиль
- SFK – киназы семейства Src
- SLP-76 – SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; белок лейкоцитов, содержащий 2 SH-домена весом 76 кД
- SSC – side scattering; боковое светорассеяние
- TXA2 – thromboxane A2; тромбоксан A2

VEGF – vessel endothelial growth factor; фактор роста эндотелия сосудов  
VEGF-R – vessel endothelial growth factor receptor; рецептор фактора роста эндотелия сосудов  
АДФ – аденозин дифосфат  
Акт – активация  
АТ – антитела  
АТФ – аденозин трифосфат  
АФЦ – аллофикоцианин  
АЦ – аденилатциклаза  
ГП – гликопротеин  
ДАГ – диацилглицерол  
ДМС – демакрационная мембранная система  
ИТП – иммунная тромбоцитопения  
ОКС – острый коронарный синдром  
ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма  
ПКС – протеинкиназа С  
ПФА – параформальдегид  
Разбавл – разбавление  
ТР – рецептор тромбосана  
ФВ – фактор Виллебранда  
ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат  
ФС – фосфатидилсерин  
ФС+ – фосфатидилсерин-положительные тромбоциты  
ФЭ – фикоэритрин  
ХЛЛ – хронический лимфобластный лейкоз  
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат  
ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство

## Библиографический список

1. Thachil J. Platelets in Inflammatory Disorders: A Pathophysiological and Clinical Perspective // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 2015. — Vol. 41 — № 6. — P. 572–581.
2. Yoo S.Y. Angiogenesis and its therapeutic opportunities / S.Y. Yoo, S.M. Kwon // *Mediators of Inflammation*. — 2013. — Vol. 2013. — P. 127–170.
3. Walsh T.G. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis / T.G. Walsh, P. Metharom, M.C. Berndt // *Platelets*. — 2015. — Vol. 26 — № 3. — P. 199–211.
4. Athale U.H. Hemorrhagic complications in pediatric hematologic malignancies / U.H. Athale, A.K.C. Chan // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 2007. — Vol. 33 — № 4. — P. 408–415.
5. Inherited Platelet Disorders: An Updated Overview / V. Palma-Barqueros, N. Revilla, A. Sánchez et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — V. 22 — № 9. — P. 4521.
6. Platelet function in sepsis / A. Yaguchi, F.L.M. Lobo, J.-L. Vincent, O. Pradier // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2004. — Vol. 2 — № 12. — P. 2096–2102.
7. Konkle B.A. Acquired disorders of platelet function // *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. — 2011. — Vol. 2011. — P. 391–396.
8. A prospective study of platelet function in trauma patients / M.T. Ramsey, T.C. Fabian, C.P. Shahan et al. // *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. — 2016. — Vol. 80 — № 5. — P. 726–732.
9. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики / Е.А. Пономаренко, А.А. Игнатова, Д.В. Федорова и соавт. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. — 2019. — Vol. 18 — № 3. — P. 112–119.
10. Rozalski M. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets: potential new targets for antiplatelet therapy / M. Rozalski, M. Nocun, C. Watala // *Acta Biochimica Polonica*. — 2005. — Vol. 52 — № 2. — P. 411–415.

11. P2Y<sub>12</sub> regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries / P. Andre, S.M. Delaney, T. LaRocca et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2003. — Vol. 112 — № 3. — P. 398–406.
12. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome / A. Savoia, S. Kunishima, D. De Rocco et al. // *Human Mutation*. — 2014. — Vol. 35 — № 9. — P. 1033–1045.
13. A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders-A comparison to the gold standard light transmission aggregometry / K. Navred, M. Martin, L. Ekdahl et al. // *PloS One*. — 2019. — Vol. 14 — № 1. — P. e0211130.
14. Effects of eltrombopag on platelet count and platelet activation in Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia / A.J. Gerrits, E.A. Leven, A.L. Frelinger et al. // *Blood*. — 2015. — Vol. 126 — № 11. — P. 1367–1378.
15. Standardization and reference ranges for whole blood platelet function measurements using a flow cytometric platelet activation test / D. Huskens, Y. Sang, J. Konings, L. van der Vorm et al. // *PloS One*. — 2018. — Vol. 13 — № 2. — P. e0192079.
16. Flow cytometry-based platelet function testing is predictive of symptom burden in a cohort of bleeders / N. Boknäs, S. Ramström, L. Faxälv, T.L. Lindahl // *Platelets*. — 2018. — Vol. 29 — № 5. — P. 512–519.
17. Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate / M. Cattaneo, A. Lecchi, A.M. Randi et al. // *Blood*. — 1992. — Vol. 80 — № 11. — P. 2787–2796.
18. Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y<sub>12</sub> receptor of a patient with congenital bleeding / M. Cattaneo, M.L. Zighetti, R. Lombardi et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2003. — Vol. 100 — № 4. — P. 1978–1983.
19. Development of the human coagulation system in the full-term infant / M. Andrew, B. Paes, R. Milner et al. // *Blood*. — 1987. — Vol. 70 — № 1. — P. 165–172.
20. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories / P. Monagle, C. Barnes, V. Ignjatovic et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2006. — Vol. 95 — № 2. — P. 362–372.

21. Mankin P. Impaired platelet--dense granule release in neonates / P. Mankin, J. Maragos, M. Akhand, K.L. Saving // *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. — 2000. — Vol. 22 — № 2. — P. 143–147.
22. Differentiated reactivity of whole blood neonatal platelets to various agonists / T. Pietrucha, T. Wojciechowski, J. Greger et al. // *Platelets*. — 2001. — Vol. 12 — № 2. — P. 99–107.
23. Impaired platelet activity and hypercoagulation in healthy term and moderately preterm newborns during the early neonatal period / E.M. Koltsova, E.N. Balashova, A.A. Ignatova et al. // *Pediatric Research*. — 2019. — Vol. 85 — № 1. — P. 63–71.
24. Age-Dependent Control of Collagen-Dependent Platelet Responses by Thrombospondin-1-Comparative Analysis of Platelets from Neonates, Children, Adolescents, and Adults / K. Herken, M. Glauner, S.C. Robert et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — Vol. 22 — № 9. — P. 4883.
25. Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children / N. Hézard, G. Potron, N. Schlegel et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2003. — Vol. 90 — № 1. — P. 116–123.
26. Platelets from children are hyper-responsive to activation by thrombin receptor activator peptide and adenosine diphosphate compared to platelets from adults / C. Yip, M.D. Linden et al. // *British Journal of Haematology*. — 2015. — Vol. 168 — № 4. — P. 526–532.
27. Effect of platelet count on platelet aggregation measured with impedance aggregometry (Multiplate<sup>TM</sup> analyzer) and with light transmission aggregometry / E.A. Femia, M. Scavone, A. Lecchi, M. Cattaneo // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2013. — Vol. 11 — № 12. — P. 2193–2196.
28. Bleeding tendency and platelet function during treatment with romiplostim in children with severe immune thrombocytopenic purpura / E.V. Suntsova, I.M. Demina, A.A. Ignatova et al. // *International Journal of Hematology*. — 2017. — Vol. 105 — № 6. — P. 841–848.

29. Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia / S. Panzer, L. Höcker, M. Rieger et al. // *European Journal of Haematology*. — 2007. — Vol. 79 — № 3. — P. 198–204.
30. In vivo effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation / B. Psaila, J.B. Bussel, M.D. Linden et al. // *Blood*. — 2012. — V. 119 — № 17. — P. 4066–4072.
31. Platelet aggregation in response to ADP is highly variable in normal donors and patients on anti-platelet medication / E. Dunne, K. Egan, S. McFadden et al. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. — 2016. — Vol. 54 — № 7. — P. 1269–1273.
32. Platelet function tests: a comparative review / R. Paniccia, R. Priora, A.A. Liotta, R. Abbate // *Vascular Health and Risk Management*. — 2015. — Vol. 11. — P. 133–148.
33. Michelson A.D. Platelet function testing in cardiovascular diseases // *Circulation*. — 2004. — Vol. 110 — № 19. — P. e489-493.
34. Michelson A.D. Evaluation of platelet function by flow cytometry // *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. — 2006. — Vol. 35 — № 1–2. — P. 67–82.
35. Platelet Function in ITP, Independent of Platelet Count, Is Consistent Over Time and Is Associated with Both Current and Subsequent Bleeding Severity / A.L. Frelinger, R.F. Grace, A.J. Gerrits et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2018. — Vol. 118 — № 1. — P. 143–151.
36. Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia / B. Psaila, J.B. Bussel, A.L. Frelinger et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2011. — Vol. 9 — № 11. — P. 2302–2310.
37. Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP / A.L. Frelinger, R.F. Grace, A.J. Gerrits et al. // *Blood*. — 2015. — Vol. 126 — № 7. — P. 873–879.
38. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation / S. Sbrana, F. Della Pina, A. Rizza et al. // *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*. — 2008. — Vol. 74 — № 1.

39. Platelet Activation Test in Unprocessed Blood (Pac-t-UB) to Monitor Platelet Concentrates and Whole Blood of Thrombocytopenic Patients / M. Roest, T.C. van Holten, G.-J. Fleurke, J.A. Remijn // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. — 2013. — Vol. 40 — № 2. — P. 117–125.
40. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry / P. Rubak, P.H. Nissen, S.D. Kristensen, A.-M. Hvas // *Platelets*. — 2016. — Vol. 27 — № 1. — P. 66–74.
41. Knöfler R. Strategies in Clinical and Laboratory Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders in Children / R. Knöfler, W. Streif // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. — 2010. — Vol. 37 — № 5. — P. 231–235.
42. Platelet aggregation and adenosine triphosphate release values in children and adults / M. Bonduel, J.P. Frontroth, M. Hepner et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2007. — Vol. 5 — № 8. — P. 1782–1783.
43. Karpatkin S. Heterogeneity of human Platelets / S. Karpatkin, A. Charnatz // *Journal of Clinical Investigation*. — 1969. — V. 48 — № 6. — P. 1073–1082.
44. Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets. VI. Correlation of platelet function with platelet volume // *Blood*. — 1978. — Vol. 51 — № 2. — P. 307–316.
45. van der Meijden P.E.J. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives / P.E.J. van der Meijden, J.W.M. Heemskerk // *Nature Reviews Cardiology*. — 2019. — Vol. 16 — № 3. — P. 166–179.
46. Quach M.E. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage / M.E. Quach, W. Chen, R. Li // *Blood*. — 2018. — Vol. 131 — № 14. — P. 1512–1521.
47. Ebbe S. Biology of megakaryocytes // *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. — 1976. — Vol. 3. — P. 211–229.
48. Therman E. Endomitosis: a reappraisal / E. Therman, G.E. Sarto, P.A. Stubblefield // *Human Genetics*. — 1983. — Vol. 63 — № 1. — P. 13–18.
49. Behnke O. An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet

- surface coat // *Journal of Ultrastructure Research*. — 1968. — Vol. 24 — № 5. — P. 412–433.
50. Shaklai M. Membrane characteristics of cultured endothelial cells: identification of gap junction / M. Shaklai, D. Loskutoff, M. Tavassoli // *Israel Journal of Medical Sciences*. — 1978. — Vol. 14 — № 3. — P. 306–313.
51. Radley J.M. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? / J.M. Radley, C.J. Haller // *Blood*. — 1982. — Vol. 60 — № 1. — P. 213–219.
52. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand / E.M. Cramer, F. Norol, J. Guichard et al. // *Blood*. — 1997. — Vol. 89 — № 7. — P. 2336–2346.
53. Zucker-Franklin D. Atlas of blood cells: Function and pathology. / Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. — 660 p.
54. Becker R.P. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation / R.P. Becker, P.P. De Bruyn // *The American Journal of Anatomy*. — 1976. — Vol. 145 — № 2. — P. 183–205.
55. Michelson A.M. Platelets. — Waltham, MA: Academic Press, 2013. — 1400 p.
56. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes / S.R. Patel, J.L. Richardson, H. Schulze et al. // *Blood*. — 2005. — V. 106 — № 13. — P. 4076–4085.
57. Tablin F. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation / F. Tablin, M. Castro, R.M. Leven // *Journal of Cell Science*. — 1990. — Vol. 97 ( Pt 1). — P. 59–70.
58. Megakaryocyte proplatelet-like process formation in vitro is inhibited by serum prothrombin, a process which is blocked by matrix-bound glycosaminoglycans / P. Hunt, M.M. Hokom, B. Wiemann et al. // *Experimental Hematology*. — 1993. — Vol. 21 — № 2. — P. 372–381.
59. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes / J.E. Italiano, P. Lecine, R.A. Shivdasani, J.H.

- Hartwig // *The Journal of Cell Biology*. — 1999. — Vol. 147 — № 6. — P. 1299–1312.
60. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly / M.J. Kelley, W. Jawien, T.L. Ortel, J.F. Korczak // *Nature Genetics*. — 2000. — Vol. 26 — № 1. — P. 106–108.
61. Harker L.A. Thrombokinetics in man / L.A. Harker, C.A. Finch // *The Journal of Clinical Investigation*. — 1969. — Vol. 48 — № 6. — P. 963–974.
62. The origin of platelet count and volume / E.A. Trowbridge, J.F. Martin, D.N. Slater et al. // *Clinical Physics and Physiological Measurement*. — 1984. — Vol. 5 — № 3. — P. 145–170.
63. Rojnuckarin P. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha / P. Rojnuckarin, K. Kaushansky // *Blood*. — 2001. — Vol. 97 — № 1. — P. 154–161.
64. Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome) / S. Kunishima, T. Kojima, T. Matsushita et al. // *Blood*. — 2001. — Vol. 97 — № 4. — P. 1147–1149.
65. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation / S. Patel-Hett, H. Wang, A.J. Begonja et al. // *Blood*. — 2011. — V. 118 — № 6. — P. 1641–1652.
66. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release / J.N. Thon, A. Montalvo, S. Patel-Hett et al. // *The Journal of Cell Biology*. — 2010. — V. 191 — № 4. — P. 861–874.
67. Behnke O. The morphology of blood platelet membrane systems // *Series Haematologica*. — 1970. — Vol. 3 — № 4. — P. 3–16.
68. White J.G. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system / J.G. White, C.C. Clawson // *The American Journal of Pathology*. — 1980. — V. 101 — № 2. — P. 353–364.

69. Escolar G. The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets / G. Escolar, E. Leistikow, J.G. White // *Blood*. — 1989. — Vol. 74 — № 6. — P. 1983–1988.
70. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update/ P. Gresele, N.S. Kleiman, J.A. Lopez, C.P. Page. — NY: Springer, 2017. — 1458 p.
71. Morgenstern E. Human Platelet Morphology/Ultrastructure / edited by F. von Bruchhausen, U. Walter // *Platelets and Their Factors: Handbook of Experimental Pharmacology*. — Berlin: Springer, 1997. — P. 27–60.
72. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry / D.M. Maynard, H.F.G. Heijnen, M.K. Horne et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2007. — Vol. 5 — № 9. — P. 1945–1955.
73. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes / F.A. Ruiz, C.R. Lea, E. Oldfield, R. Docampo // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2004. — Vol. 279 — № 43. — P. 44250–44257.
74. Garcia-Souza L.F. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology / L.F. Garcia-Souza, M.F. Oliveira // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. — 2014. — Vol. 50. — P. 156–160.
75. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells / M.J. Metzelaar, P.L. Wijngaard, P.J. Peters // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1991. — Vol. 266 — № 5. — P. 3239–3245.
76. Behnke O. Degrading and non-degrading pathways in fluid-phase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets // *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. — 1992. — Vol. 24 — № 2. — P. 169–178.
77. Holmsen H. Thrombin-induced platelet release reaction and platelet lysosomes / H. Holmsen, H.J. Day // *Nature*. — 1968. — Vol. 219 — № 5155. — P. 760–761.

78. The elegant platelet: signals controlling actin assembly / J.H. Hartwig, K. Barkalow, A. Azim, J. Italiano // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1999. — Vol. 82 — № 2. — P. 392–398.
79. White J.G. Influence of taxol on the response of platelets to chilling // *The American Journal of Pathology*. — 1982. — Vol. 108 — № 2. — P. 184–195.
80. White J.G. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape / J.G. White, G.H. Rao // *The American Journal of Pathology*. — 1998. — V. 152 — № 2. — P. 597–609.
81. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets / H.D. Schwer, P. Lecine, S. Tiwari, J.E. Italiano et al. // *Current biology*. — 2001. — Vol. 11 — № 8. — P. 579–586.
82. Mechanisms and implications of platelet discoid shape / J.E. Italiano, W. Bergmeier, S. Tiwari et al. // *Blood*. — 2003. — Vol. 101 — № 12. — P. 4789–4796.
83. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules / S. Patel-Hett, J.L. Richardson, H. Schulze et al. // *Blood*. — 2008. — Vol. 111 — № 9. — P. 4605–4616.
84. Identification of a membrane skeleton in platelets / J.E. Fox, J.K. Boyles, M.C. Berndt et al. // *The Journal of Cell Biology*. — 1988. — Vol. 106 — № 5. — P. 1525–1538.
85. Painter R.G. Centripetal myosin redistribution in thrombin-stimulated platelets. Relationship to platelet Factor 4 secretion / R.G. Painter, M.H. Ginsberg // *Experimental Cell Research*. — 1984. — Vol. 155 — № 1. — P. 198–212.
86. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2003. — Vol. 23 — № 7. — P. 1152–1160.
87. McArthur K. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage / K. McArthur, S. Chappaz, B.T. Kile // *Blood*. — 2018. — Vol. 131 — № 6. — P. 605–610.
88. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span / K.D. Mason, M.R. Carpinelli, J.I. Fletcher et al. // *Cell*. — 2007. — Vol. 128 — № 6. — P. 1173–1186.

89. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond / R. Grozovsky, S. Giannini, H. Falet, K.M. Hoffmeister // *Blood*. — 2015. — Vol. 126 — № 16. — P. 1877–1884.
90. Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation / A.A. Alhasan, O.G. Izuogu, H.H. Al-Balool // *Blood*. — 2016. — Vol. 127 — № 9. — P. e1–e11.
91. Organ distributions of liposome-loaded rat platelets / R. Male, D.G. Moon, J.S. Garvey et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 1993. — Vol. 195 — № 1. — P. 276–281.
92. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine // *Nature*. — 2005. — Vol. 438 — № 7070. — P. 932–936.
93. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage / J. Kisucka, C.E. Butterfield, D.G. Duda et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2006. — Vol. 103 — № 4. — P. 855–860.
94. Prognostic significance of angiogenesis evaluated by CD105 expression compared to CD31 in 905 breast carcinomas: correlation with long-term patient outcome / J.-P. Dales, S. Garcia, L. Andrac et al. // *International Journal of Oncology*. — 2004. — Vol. 24 — № 5. — P. 1197–1204.
95. Angiogenesis-Related Cytokines, RANKL, and Osteoprotegerin in Multiple Myeloma Patients in relation to Clinical Features and Response to Treatment / K. Sfiridaki, C.A. Pappa, G. Tsirakis et al. // *Mediators of Inflammation*. — 2011. — V. 2011. — P. 867576.
96. Basic fibroblast growth factor treatment for non-steroidal anti-inflammatory drug associated gastric ulceration / M.A. Hull, D.J. Cullen, N. Hudson, C.J. Hawkey // *Gut*. — 1995. — Vol. 37 — № 5. — P. 610–612.
97. Angiotensin-1 protects heart against ischemia/reperfusion injury through VE-cadherin dephosphorylation and myocardial integrin- $\beta$ 1/ERK/caspase-9 phosphorylation cascade / S.-W. Lee, J.-Y. Won, H.-Y. Lee et al. // *Molecular Medicine*. — 2011. — Vol. 17 — № 9–10. — P. 1095–1106.

98. Shih T. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies / T. Shih, C. Lindley // *Clinical Therapeutics*. — 2006. — Vol. 28 — № 11. — P. 1779–1802.
99. Gotink K.J. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? / K.J. Gotink, H.M.W. Verheul // *Angiogenesis*. — 2010. — V. 13 — № 1. — C. 1–14.
100. Andreoli C.M. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease / C.M. Andreoli, J.W. Miller // *Current Opinion in Ophthalmology*. — 2007. — Vol. 18 — № 6. — P. 502–508.
101. Jager R.D. Age-related macular degeneration / R.D. Jager, W.F. Mieler, J.W. Miller // *The New England Journal of Medicine*. — 2008. — Vol. 358 — № 24. — P. 2606–2617.
102. Blair P. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates / P. Blair, R. Flaumenhaft // *Blood Reviews*. — 2009. — Vol. 23 — № 4. — P. 177–189.
103. Thomas M.R. The role of platelets in inflammation / M.R. Thomas, R.F. Storey // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2015. — Vol. 114 — № 3. — P. 449–458.
104. Platelet function in rheumatoid arthritis: arthritic and cardiovascular implications / A.Y. Gasparyan, A. Stavropoulos-Kalinoglou, D.P. Mikhailidis et al. // *Rheumatology International*. — 2011. — Vol. 31 — № 2. — P. 153–164.
105. Postlethwaite A.E. Platelet contributions to the pathogenesis of systemic sclerosis / A.E. Postlethwaite, T.M. Chiang // *Current Opinion in Rheumatology*. — 2007. — Vol. 19 — № 6. — P. 574–579.
106. Voudoukis E. Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: A clinical approach / E. Voudoukis, K. Karmiris, I.E. Koutroubakis // *World Journal of Gastroenterology*. — 2014. — V. 20 — № 12. — P. 3180–3190.
107. Coated-platelets correlate with disease progression in Alzheimer disease / C.I. Prodan, E.D. Ross, A.S. Vincent, G.L. Dale // *Journal of Neurology*. — 2007. — Vol. 254 — № 4. — P. 548–549.

108. Werner S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiological Reviews*. — 2003. — Vol. 83 — № 3. — P. 835–870.
109. Pandya N.M. Angiogenesis--a new target for future therapy / N.M. Pandya, N.S. Dhalla, D.D. Santani // *Vascular Pharmacology*. — 2006. — Vol. 44 — № 5. — P. 265–274.
110. Rozman P. Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries / P. Rozman, Z. Bolta // *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Et Adriatica*. — 2007. — Vol. 16 — № 4. — P. 156–165.
111. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers / D.J. Margolis, J. Kantor, J. Santanna et al. // *Diabetes Care*. — 2001. — Vol. 24 — № 3. — P. 483–488.
112. Bhanot S. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery / S. Bhanot, J.C. Alex // *Facial plastic surgery*. — 2002. — Vol. 18 — № 1. — P. 27–33.
113. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices / M. Sánchez, E. Anitua, J. Azofra et al. // *The American Journal of Sports Medicine*. — 2007. — Vol. 35 — № 2. — P. 245–251.
114. Platelets and wound healing / A.T. Nurden, P. Nurden, M. Sanchez et al. // *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. — 2008. — Vol. 13. — P. 3532–3548.
115. Dawood A.S. Current clinical applications of platelet-rich plasma in various gynecological disorders: An appraisal of theory and practice / A.S. Dawood, H.A. Salem // *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. — 2018. — Vol. 45 — № 2. — P. 67–74.
116. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis / Y. Hou, N. Carrim, Y. Wang et al. // *Journal of Biomedical Research*. — 2015. — V. 29 — № 6. — P. 437–444.
117. Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis / Y. Wang, A. Reheman, C.M. Spring et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2014. — Vol. 124 — № 10. — P. 4281–4293.

118. Ni H. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands / H. Ni, J. Freedman // *Transfusion and Apheresis Science*. — 2003. — Vol. 28 — № 3. — P. 257–264.
119. Platelets in thrombosis and hemostasis: old topic with new mechanisms / Y. Wang, M. Andrews, Y. Yang et al. // *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*. — 2012. — Vol. 12 — № 2. — P. 126–132.
120. Maternal anti-platelet  $\beta 3$  integrins impair angiogenesis and cause intracranial hemorrhage / I. Yougbaré, S. Lang, H. Yang et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2015. — Vol. 125 — № 4. — P. 1545–1556.
121. Platelets and platelet alloantigens: Lessons from human patients and animal models of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia / B. Vadasz, P. Chen, I. Yougbaré et al. // *Genes & Diseases*. — 2015. — Vol. 2 — № 2. — P. 173–185.
122. Ruggeri Z.M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1997. — Vol. 78 — № 1. — P. 611–616.
123. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen / H. Ni, C.V. Denis, S. Subbarao et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2000. — Vol. 106 — № 3. — P. 385–392.
124. Ruggeri Z.M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation // *Thrombosis Research*. — 2007. — Vol. 120 — Suppl 1. — P. S5-9.
125. Golino P. How to study the effects of platelet aggregation and thrombosis on coronary vasomotion and their clinical relevance / P. Golino, F. Crea, J.T. Willerson // *Italian Heart Journal*. — 2002. — Vol. 3 — № 4. — P. 220–225.
126. GPVI and integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 signaling in platelets / S.P. Watson, J.M. Auger, O.J.T. McCarty, A.C. Pearce // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2005. — Vol. 3 — № 8. — P. 1752–1762.
127. Differential involvement of tyrosine and serine/threonine kinases in platelet integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 exposure / I. Hers, J. Donath, G. van Willigen, J.W. Akkerman // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 1998. — Vol. 18 — № 3. — P. 404–414.

128. Signaling during platelet adhesion and activation / Z. Li, M.K. Delaney, K.A. O'Brien, X. Du // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2010. — Vol. 30 — № 12. — P. 2341–2349.
129. Clementson K.J. Platelets and primary haemostasis // *Thrombosis Research*. — 2012. — Vol. 129 — № 3. — P. 220–224.
130. Этот загадочный тромбоцит / А.О. Якименко, А.Н. Свешникова, Е.О. Артеменко, М.А. Пантелеев // *Природа*. — 2014. — Vol. 1182 — №2 — P. 3-8.
131. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets / B. Klages, U. Brandt, M.I. Simon et al. // *The Journal of Cell Biology*. — 1999. — Vol. 144 — № 4. — P. 745–754.
132. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // *Cellular and molecular life sciences*. — 2007. — Vol. 64 — № 12. — P. 1471–1483.
133. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. — 2006. — Vol. 46. — P. 277–300.
134. A Gi-dependent pathway is required for activation of the small GTPase Rap1B in human platelets / P. Lova, S. Paganini, F. Sinigaglia et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2002. — Vol. 277 — № 14. — P. 12009–12015.
135. Jin J. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets / J. Jin, J.L. Daniel, S.P. Kunapuli // *The Journal of Biological Chemistry*. — 1998. — Vol. 273 — № 4. — P. 2030–2034.
136. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor / G. Kauffenstein, B. Hechler, J.-P. Cazenave, C. Gachet // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2004. — Vol. 2 — № 11. — P. 1980–1988.
137. The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel / B. Hechler, A. Eckly, P. Ohlmann et al. // *British Journal of Haematology*. — 1998. — Vol. 103 — № 3. — P. 858–866.

138. Platelets from a patient heterozygous for the defect of P2CYC receptors for ADP have a secretion defect despite normal thromboxane A<sub>2</sub> production and normal granule stores: further evidence that some cases of platelet «primary secretion defect» are heterozygous for a defect of P2CYC receptors / M. Cattaneo, A. Lecchi, R. Lombardi et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2000. — Vol. 20 — № 11. — P. E101-106.
139. Impaired activation of murine platelets lacking G $\alpha$ (i<sub>2</sub>) / H.M. Jantzen, D.S. Milstone, L. Gousset et al. // *The Journal of Clinical Investigation*. — 2001. — Vol. 108 — № 3. — P. 477–483.
140. Regulation and roles of PI3K $\beta$ , a major actor in platelet signaling and functions / M.-P. Gratacap, J. Guillermet-Guibert, V. Martin et al. // *Advances in Enzyme Regulation*. — 2011. — Vol. 51 — № 1. — P. 106–116.
141. Identification of P2Y<sub>12</sub>-dependent and -independent mechanisms of glycoprotein VI-mediated Rap1 activation in platelets / M.K. Larson, H. Chen, M.L. Kahn et al. // *Blood*. — 2003. — Vol. 101 — № 4. — P. 1409–1415.
142. Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation / J.L. Daniel, C. Dangelmaier, J. Jin et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 1999. — Vol. 82 — № 4. — P. 1322–1326.
143. Brass L.F. Harnessing the platelet signaling network to produce an optimal hemostatic response / L.F. Brass, M. Tomaiuolo, T.J. Stalker // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. — 2013. — Vol. 27 — № 3. — P. 381–409.
144. Varga-Szabo D. Cell adhesion mechanisms in platelets / D. Varga-Szabo, I. Pleines, B. Nieswandt // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2008. — Vol. 28 — № 3. — P. 403–412.
145. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations / B. Dumont, D. Lasne, C. Rothschild et al. // *Blood*. — 2009. — Vol. 114 — № 9. — P. 1900–1903.
146. Berndt M.C. Bernard-Soulier syndrome / M.C. Berndt, R.K. Andrews // *Haematologica*. — 2011. — Vol. 96 — № 3. — P. 355–359.

147. Almomani M.H. Bernard-Soulier Syndrome / M.H. Almomani, A. Mangla. — Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
148. George J.N. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease / J.N. George, J.P. Caen, A.T. Nurden // *Blood*. — 1990. — Vol. 75 — № 7. — P. 1383–1395.
149. Nurden A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2011. — Vol. 105 — Suppl 1. — P. S13-33.
150. Raccuglia G. Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder // *The American Journal of Medicine*. — 1971. — Vol. 51 — № 6. — P. 818–828.
151. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome / C.A. Albers, A. Cvejic, R. Favier et al. // *Nature Genetics*. — 2011. — Vol. 43 — № 8. — P. 735–737.
152. Gunay-Aygun M. Molecular defects that affect platelet dense granules / M. Gunay-Aygun, M. Huizing, W.A. Gahl // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 2004. — Vol. 30 — № 5. — P. 537–547.
153. Marder V.J. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice — Philadelphia: LWW, 2012. — 1592 p.
154. Zwaal R.F.A. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids / R.F.A. Zwaal, P. Comfurius, E.M. Bevers // *Biochimica Et Biophysica Acta*. — 2004. — Vol. 1636 — № 2–3. — P. 119–128.
155. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity / H.J. Weiss, W.J. Vicic, B.A. Lages, J. Rogers // *The American Journal of Medicine*. — 1979. — Vol. 67 — № 2. — P. 206–213.
156. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug // *The New England Journal of Medicine*. — 1994. — Vol. 330 — № 18. — P. 1287–1294.
157. Smith W.L. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology / W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito // *Annual Review of Biochemistry*. — 2000. — Vol. 69. — P. 145–182.

158. Luu S. Bone Marrow Defects and Platelet Function: A Focus on MDS and CLL / S. Luu, E.E. Gardiner, R.K. Andrews // *Cancers*. — 2018. — Vol. 10 — № 5. — P. 147.
159. Real-world results of ibrutinib in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: data from 95 consecutive patients treated in a compassionate use program. A study from the Swedish Chronic Lymphocytic Leukemia Group / M. Winqvist, A. Asklid, P.O. Andersson et al. // *Haematologica*. — 2016. — Vol. 101 — № 12. — P. 1573–1580.
160. Kinetics and mobilization from the spleen of indium-111-labeled platelets during platelet apheresis / A.D. Heyns, P.N. Badenhorst, M.G. Lötter et al. // *Transfusion*. — 1985. — Vol. 25 — № 3. — P. 215–218.
161. Aster R.H. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of «hypersplenic» thrombocytopenia // *The Journal of Clinical Investigation*. — 1966. — Vol. 45 — № 5. — P. 645–657.
162. Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP / J.B. Bussel, D.J. Kuter, V. Pullarkat et al. // *Blood*. — 2009. — Vol. 113 — № 10. — P. 2161–2171.
163. Aster R.H. Drug-induced immune thrombocytopenia / R.H. Aster, D.W. Bougie // *The New England Journal of Medicine*. — 2007. — Vol. 357 — № 6. — P. 580–587.
164. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia / D. Provan, R. Stasi, A.C. Newland et al. // *Blood*. — 2010. — Vol. 115 — № 2. — P. 168–186.
165. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia / C. Neunert, W. Lim, M. Crowther et al. // *Blood*. — 2011. — Vol. 117 — № 16. — P. 4190–4207.
166. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP / R. McMillan, L. Wang, A. Tomer et al. // *Blood*. — 2004. — Vol. 103 — № 4. — P. 1364–1369.

167. Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients / C. Cunningham-Rundles, C. Bodian // *Clinical Immunology*. — 1999. — Vol. 92 — № 1. — P. 34–48.
168. Monitoring survival and function of transfused platelets in Bernard-Soulier syndrome by flow cytometry and a cone and plate(let) analyzer (Impact-R) / S. Panzer, B. Eichelberger, D. Koren et al. // *Transfusion*. — 2007. — Vol. 47 — № 1. — P. 103–106.
169. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance / A.L. Frelinger, M.I. Furman, M.D. Linden et al. // *Circulation*. — 2006. — Vol. 113 — № 25. — P. 2888–2896.
170. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature*. — 1962. — Vol. 194. — P. 927–929.
171. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease / A. Gadisseur, C. Hermans, Z. Berneman et al. // *Acta Haematologica*. — 2009. — Vol. 121 — № 2–3. — P. 71–84.
172. Cattaneo M. The platelet P2Y<sub>12</sub> receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects // *Blood*. — 2011. — Vol. 117 — № 7. — P. 2102–2112.
173. Филиппова О.И. Методы исследования функциональной активности тромбоцитов (обзор литературы) / О.И. Филиппова, А.В. Колосков, А.А. Столица // *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. — 2012. — Vol. 13 — P. 493-514.
174. Optical multichannel (optimul) platelet aggregometry in 96-well plates as an additional method of platelet reactivity testing / M.V. Chan, P.C.J. Armstrong, F. Papalia et al. // *Platelets*. — 2011. — Vol. 22 — № 7. — P. 485–494.
175. In the presence of strong P2Y<sub>12</sub> receptor blockade, aspirin provides little additional inhibition of platelet aggregation / P.C.J. Armstrong, P.D. Leadbeater, M.V. Chan et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2011. — Vol. 9 — № 3. — P. 552–561.

176. Cardinal D.C. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood / D.C. Cardinal, R.J. Flower // *Journal of Pharmacological Methods*. — 1980. — Vol. 3 — № 2. — P. 135–158.
177. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method / J.W. Smith, S.R. Steinhubl, A.M. Lincoff et al. // *Circulation*. — 1999. — Vol. 99 — № 5. — P. 620–625.
178. Comparison of modified Thrombelastograph and Plateletworks whole blood assays to optical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrel inhibition in elective surgery patients / R.M. Craft, J.J. Chavez, C.C. Snider et al. // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. — 2005. — Vol. 145 — № 6. — P. 309–315.
179. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function / C.P.M. Hayward, P. Harrison, M. Cattaneo et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2006. — Vol. 4 — № 2. — P. 312–319.
180. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions / D. Varon, R. Dardik, B. Shenkman et al. // *Thrombosis Research*. — 1997. — Vol. 85 — № 4. — P. 283–294.
181. 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. — Vol. 104 — № 3. — P. 149–174.
182. Jackson S.P. Dynamics of platelet thrombus formation / S.P. Jackson, W.S. Nesbitt, E. Westein // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. — 2009. — Vol. 7 — Suppl 1. — P. 17–20.
183. Multiple ways to switch platelet integrins on and off / J.M.E.M. Cosemans, B.F. Iserbyt, H. Deckmyn, J.W.M. Heemskerk // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2008. — Vol. 6 — № 8. — P. 1253–1261.
184. Flow chamber-based assays to measure thrombus formation in vitro: requirements for standardization / M. Roest, A. Reininger, J.J. Zwaginga et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. — 2011. — Vol. 9 — № 11. — P. 2322–2324.
185. Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями / О.В.

- Сироткина, Н.А. Боганькова, А.Б. Ласковец и соавт.// Медицинская иммунология. — 2014. — Vol. 12 — № 3. — P. 213–218.
186. Brown M. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology / M. Brown, C. Wittwer // *Clinical Chemistry*. — 2000. — Vol. 46 — № 8 Pt 2. — P. 1221–1229.
187. von Willebrand factor-collagen binding activity is increased in newborns and infants / K.B. Thomas, A.H. Sutor, N. Altinkaya et al. // *Acta Paediatrica*. — 1995. — Vol. 84 — № 6. — P. 697–699.
188. Witt I. Evidence for the existence of foetal fibrinogen / I. Witt, H. Müller, W. Künzer // *Thrombosis Et Diathesis Haemorrhagica*. — 1969. — Vol. 22 — № 1. — P. 101–109.
189. Witt I. Phosphorus and hexose content of human foetal fibrinogen / I. Witt, H. Müller // *Biochimica Et Biophysica Acta*. — 1970. — Vol. 221 — № 2. — P. 402–404.
190. Ignjatovic V. Evidence for age-related differences in human fibrinogen / V. Ignjatovic, A. Ilhan, P. Monagle // *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*. — 2011. — Vol. 22 — № 2. — P. 110–117.
191. Developmental hemostasis: A lifespan from neonates and pregnancy to the young and elderly adult in a European white population / U. Nowak-Göttl, V. Limperger, G. Kenet et al. // *Blood Cells, Molecules & Diseases*. — 2017. — Vol. 67. — P. 2–13.
192. Healthy pediatric platelets are moderately hyporeactive in comparison with adults' platelets / E.A. Ponomarenko, A.A. Ignatova, D.M. Polokhov et al. // *Platelets*. — 2022. — Vol. 33 — № 5. — P. 727–734.
193. Effects of ibrutinib on in vitro platelet aggregation in blood samples from healthy donors and donors with platelet dysfunction / J. Ninomoto, A. Mokatrin, T. Kinoshita et al. // *Hematology*. — 2020. — Vol. 25 — № 1. — P. 112–117.
194. Platelet Function Determined by Flow Cytometry: New Perspectives? / S. Ramström, A.L. Södergren, N. Tynngård, T.L. Lindahl // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. — 2016. — Vol. 42 — № 3. — P. 268–281.

195. Shattil S.J. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry / S.J. Shattil, M. Cunningham, J.A. Hoxie // *Blood*. — 1987. — Vol. 70 — № 1. — P. 307–315.
196. Flow cytometric analysis of platelet function to detect high on-treatment residual platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy / L. Li, D. Huskens, L. Florin et al. // *International Journal of Laboratory Hematology*. — 2022. — Vol. 44 — № 3. — P. e100–e102.
197. Adrenaline Improves Platelet Reactivity in Ticagrelor-Treated Healthy Volunteers / S. Singh, T. Damén, A. Nygren et al. // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2019. — Vol. 119 — № 5. — P. 735–743.
198. Furie B. Mechanisms of thrombus formation / B. Furie, B.C. Furie // *The New England Journal of Medicine*. — 2008. — Vol. 359 — № 9. — P. 938–949.
199. Influence of apyrase on stability of suspensions of washed rabbit platelets / N.G. Ardlie, D.W. Perry, M.A. Packham, J.F. Mustard // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. — 1971. — Vol. 136 — № 4. — P. 1021–1023.

## Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.ф.-м.н. Пантелеву М.А. за помощь в подготовке диссертации, обсуждении результатов и подготовке публикаций. Автор благодарит врачей-гематологов ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева Жаркова П.А. и Федорову Д.В. за помощь, оказанную в работе над диссертацией. Автор также выражает благодарность заведующей отделением иммунологии Щербине А.Ю. за помощь в организации работы и проведении исследований. Автор хотел бы поблагодарить коллектив лабораторий клеточного гемостаза и тромбоза и клеточной биологии и трансляционной медицины за помощь в организации лабораторных измерений функциональной активности тромбоцитов, обсуждении результатов и подготовке публикаций. Автор благодарен коллективу врачей и ординаторов кардиологического отделения ГБУЗ ГКБ имени В.В. Виноградова во главе с Писарюк А.С., а также коллективу врачей и ординаторов Российской детской клинической больницы и ГБУЗ ГКБ имени С.П. Боткина за помощь в организации работы с пациентами и предоставлении материалов для проведения исследований. Автор благодарен всему коллективу врачей, ученых и медицинских сестер ФГБУ НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева за помощь в организации работы и предоставление данных о пациентах. Автор выражает благодарность заведующему отделом научного проектирования и контролируемых клинических исследований Блинову Д.С. за обсуждение результатов и полезные замечания. Автор благодарит заведующую отделом подготовки научно-педагогических кадров Никитину Т.П. за помощь и ценные советы при подготовке диссертации.