

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени
академика Е.И. Чазова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Муравлев Иван Андреевич
**ПРОКОАГУЛЯНТНЫЕ РЕАКЦИИ АКТИВИРОВАННЫХ
ТРОМБОЦИТОВ. ЭФФЕКТЫ АНТИТРОМБОЦИТАРНЫХ
ПРЕПАРАТОВ**

1.5.4. - «Биохимия (медицинские науки)»

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель
главный научный сотрудник,
доктор медицинских наук,
профессор
Мазуров Алексей Владимирович

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ	
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
2.1. Строение и функции тромбоцитов	12
2.1.1. Образование и клиренс тромбоцитов	13
2.1.2. Строение тромбоцитов.....	14
2.1.2.1. Плазматическая мембрана и рецепторы тромбоцитов	14
2.1.2.2. Внутренние мембранные системы.....	18
2.1.2.2.1. Открытая канальцевая система	18
2.1.2.2.2. Плотная тубулярная система.....	18
2.1.2.3. Органеллы и гранулы.....	19
2.1.2.4. Цитоскелет тромбоцитов	19
2.1.3. Функциональные реакции тромбоцитов	20
2.1.3.1. Адгезия тромбоцитов	20
2.1.3.2. Изменение формы.....	21
2.1.3.3. Реакции высвобождения	21
2.1.3.4. Агрегация тромбоцитов	23
2.2. Тромбоциты, тромбоз и антитромбоцитарные препараты	23
2.2.1. Тромбоциты во внутрисосудистом тромбообразовании	23
2.2.2. Антитромбоцитарные препараты	24
2.2.2.1. Ингибиторы циклооксигеназы	24
2.2.2.2. Антагонисты P2Y ₁₂ рецептора АДФ	25
2.2.3. Антагонисты гликопротеина IIb-IIIa	26
2.2.4. Другие препараты с антитромбоцитарным эффектом	26
2.3. Коагуляционная активность тромбоцитов	28
2.3.1. Коагуляция крови	28
2.3.2. Участие тромбоцитов в коагуляционных реакциях	29
2.3.3. Коагуляционная активность тромбоцитов и антитромбоцитарные препараты	33
2.4. Микрочастицы тромбоцитов	34
2.4.1. Виды мембранных частиц	34
2.4.2. Коагуляционная активность тромбоцитарных микрочастиц.....	36
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
3.1. Реактивы	38
3.2. Доноры и пациенты	39
3.2.1. Здоровые добровольцы и пациенты	39

3.3. Забор крови	40
3.4. Получение отмытых тромбоцитов для теста рекальцификации, теста генерации тромбина и исследования фосфатидилсерина	41
3.5. Агрегация тромбоцитов	41
3.6. Модифицированный тест рекальцификации плазмы	43
3.6.1. Получение субстратной плазмы.....	43
3.6.2. Проведение модифицированного теста рекальцификации плазмы	43
3.7. Тест генерации тромбина	44
3.8. Подбор условий иммобилизации тромбоцитов для теста рекальцификации и теста генерации тромбина	46
3.8.1. Оценка иммобилизации тромбоцитов с помощью световой микроскопии.....	46
3.8.2. Оценка иммобилизации радиоактивно меченых тромбоцитов	46
3.8.2.1 Мечение антител с помощью ¹²⁵ I.....	46
3.8.2.2 Связывание антител с тромбоцитами.....	47
3.8.2.3 Количественная оценка иммобилизации радиоактивно меченых тромбоцитов.....	47
3.9. Определение экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии	47
3.9.1. Подготовка проб для исследования уровня экспонирования фосфатидилсерина на поверхности отмытых тромбоцитов	47
3.9.2. Подготовка проб для исследования уровня экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов в цельной крови	48
3.9.3. Анализ экспонирования фосфатидилсерина.....	49
3.10. Исследование прокоагулянтных свойств мембранных микрочастиц тромбоцитов....	49
3.10.1. Получение микрочастиц	49
3.10.2. Тест рекальцификации плазмы	50
3.10.3. Подсчет количества микрочастиц.....	50
3.11. Статистический анализ полученных данных.....	51
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
4.1. Разработка модифицированного теста рекальцификации плазмы для оценки прокоагулянтных свойств тромбоцитов.....	52
4.1.1. Подбор условий проведения модифицированного теста рекальцификации плазмы	52
4.2. Влияние различных агонистов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов	57
4.2.1. Влияние различных агонистов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина	57
4.2.2. Влияние различных агонистов на способность тромбоцитов ускорять образование тромбина.....	59
4.2.3. Влияние различных агонистов на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина	63

4.3. Влияние антитромбоцитарных препаратов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов	69
4.3.1. Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина	69
4.3.2. Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование тромбина.....	72
4.3.3. Влияние антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина.....	75
4.3.3.1. Влияние антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина в условиях <i>in vitro</i>	75
4.3.3.2. Влияние антитромбоцитарных препаратов, принимаемых пациентами на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина	79
4.4. Исследование прокоагулянтных свойств тромбоцитарных микрочастиц.....	80
4.4.1. Исследования способности тромбоцитарных микрочастиц ускорять образование фибрина	80
4.4.2. Подсчет количества микрочастиц и определение уровня экспонирования фосфатидилсерина.....	82
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	87
5.1. Оценка прокоагулянтных свойств тромбоцитов, активированных различными агонистами	87
5.2 Влияние антитромбоцитарных препаратов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов	90
5.3. Исследование прокоагулянтных свойств тромбоцитарных микрочастиц.....	94
6. ВЫВОДЫ	95
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)

CD – кластер дифференциации (cluster of differentiation, cluster designation)

CTI - ингибитор трипсина из кукурузы (corn trypsin inhibitor)

F – фактор свертывания (factor)

FITC - флуоресцеин изотиоцианат (fluorescein isothiocyanate)

PAR – рецепторы, активируемые протеазами (Protease Activated Receptors)

PPACK – D-пентанил-L-пролил-L-аргинил хлорометилкетон (d-phenylalanyl-l-prolyl-l-arginyl chloromethylketone)

TRAP – пептид, активирующий рецептор тромбина (thrombin receptor activating peptide)

TXA2 – тромбоксан A2 (thromboxane A2)

АДФ – аденозиндифосфат

АТ - антитела

АТФ - аденозинтрифосфат

ГП – гликопротеин

КЦД - кислый цитрат-декстроза

моноАТ - моноклональные антитела

МЧ - микрочастицы

ОКС – острый коронарный синдром

ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма

ПГЕ1 – простагландин E1

ПТС – плотная тубулярная система

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТГТ – тест генерации тромбина

ФВ – фактор фон Виллебранда

ФС – фосфатидилсерин

ЦОГ – циклооксигеназа

ЭТП – эндогенный тромбиновый потенциал

1. ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты инициируют остановку кровотечения (гемостаз) при нарушении целостности сосудов и внутрисосудистое тромбообразование при внутреннем патологическом повреждении сосудистой стенки (чаще всего вследствие развития атеросклероза). Тромбоциты, прикрепляются к зоне повреждения сосуда, активируются и агрегируют, формируя, таким образом, первичный тромбоцитарный тромб. Также тромбоциты участвуют в процессе свертывания крови и ретракции (уплотнения) фибринового сгустка. При активации тромбоцитов мощными агонистами, например, тромбином и/или коллагеном, на их поверхности экспонируются отрицательно заряженные фосфолипиды (в первую очередь фосфатидилсерин (ФС)), с которыми связываются компоненты коагуляционных комплексов. Именно тромбоциты, содержащие экспонированный ФС, способны связывать протромбин, факторы X, IX и другие факторы свертывания крови и поддерживать их активацию. Способность тромбоцитов ускорять свертывание крови (наряду со способностью к адгезии и агрегации) играет ключевую роль в образовании кровоостанавливающей (гемостатической) «пробки» и внутрисосудистых тромбов. Коагуляционные свойства тромбоцитов чаще всего изучают, определяя на их поверхности количество ФС и/или измеряя связывание с тромбоцитами и активацию факторов свертывания. В то же время влияние активированных тромбоцитов непосредственно на образование фибрина (ключевую реакцию свертывания) остается малоизученным [118].

Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний остается актуальной проблемой во всем мире. На долю таких заболеваний в России приходится около половины смертельных случаев [83]. Для профилактики и лечения тромботических сердечно-сосудистых заболеваний, таких как инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, ишемический инсульт и др., используются антитромбоцитарные препараты с различным механизмом действия: ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ), ингибиторы P2Y₁₂ рецептора аденозиндифосфата (АДФ) и ингибиторы гликопротеина (ГП) IIb-IIIa. Эти

препараты используются как по отдельности, так и в сочетании в зависимости от тяжести тромботического события [97][98]. Эффективность таких препаратов чаще всего исследуют по их способности блокировать агрегацию тромбоцитов, однако их влияние на коагуляционные свойства тромбоцитов остается малоисследованными, а полученные результаты порою противоречивы [47][49][100]. Также следует отметить, что в литературе практически отсутствуют работы, в которых исследовались эффекты антитромбоцитарных препаратов непосредственно на тромбоцит-зависимое ускорение образования фибрина (как *in vitro*, так и *in vivo*).

При активации тромбоцитов, от их поверхности отщепляются мембранные микрочастицы (МЧ), которые также, как и сами тромбоциты, обладают прокоагулянтными свойствами за счет экспонирования ФС на своей поверхности. В отличие от МЧ моноцитов и эндотелиальных клеток, тромбоцитарные МЧ не содержат тканевого фактора. Хорошо изучена их способность ускорять образование тромбина в тесте генерации тромбина (ТГТ) и фибрина в тесте рекальцификации [32][36][52][56]. В то же время ранее не проводилось системных работ по сравнению свойств МЧ, продуцируемых тромбоцитами, которые были активированы разными индукторами.

Целью данной работы является исследование способности активированных тромбоцитов ускорять образование фибрина, генерацию тромбина и экспонировать ФС и оценка влияния на эти реакции антитромбоцитарных препаратов.

Задачи исследования:

1. Разработать метод для исследования действия тромбоцитов на образование фибрина и генерацию тромбина.
2. Исследовать способность тромбоцитов, активированных различными индукторами ускорять образование фибрина, генерацию тромбина и экспонировать ФС.

3. Оценить эффекты антитромбоцитарных препаратов с разным механизмом действия на прокоагулянтные реакции тромбоцитов (ускорение образования фибрина, генерацию тромбина и экспонирование ФС).
4. Сравнить прокоагулянтную активность мембранных микрочастиц, продуцируемых тромбоцитами при их активации разными индукторами.

Научная новизна. При изучении прокоагулянтных реакций тромбоцитов впервые получены следующие новые данные:

1. Продемонстрирована способность тромбоцитов, активированных различными индукторами ускорять образование фибрина в тесте рекальцификации плазмы.
2. Выявлены корреляции между эффектами тромбоцитов на образование фибрина, генерацию тромбина и экспонированием на их поверхности ФС.
3. В экспериментах *in vitro* установлено, что антитромбоцитарные препараты (антагонист P2Y₁₂ рецепторов АДФ, тикагрелор, антагонист ГП IIb-IIIa, руциромаб, и активатор аденилатциклазы (простагландин E1 (ПГЕ1)), но не ингибитор ЦОГ аспирин, подавляют прокоагуляционные реакции тромбоцитов – их способность ускорять образование фибрина, генерацию тромбина и экспонировать ФС.
4. Антитромбоцитарные препараты (аспирин в сочетании с тикагрелором) при приеме пациентами с острым коронарным синдромом (ОКС) снижают уровень экспонирования ФС тромбоцитами.
5. Тромбоциты, активированные разными индукторами, продуцируют разное количество МЧ, но с одинаковыми прокоагулянтными свойствами.

Научно-практическая значимость

Для оценки способности тромбоцитов ускорять образование фибрина разработан и апробирован простой и доступный метод, основанный на тесте рекальцификации плазмы. Использование в этом методе иммобилизованных на пластике тромбоцитов позволяет избежать влияние на процесс образования

фибрина агрегации тромбоцитов и участия в этом процессе тромбоцитарных МЧ.

Установленная способность ряда антитромбоцитарных препаратов подавлять прокоагулянтную активность тромбоцитов указывает на то, что эти препараты действуют не только на классические функциональные реакции тромбоцитов (агрегация, адгезия, секреция из гранул), но и на их способность ускорять коагуляционные реакции. Это необходимо учитывать, при оценке как антитромботических свойств этих лекарств, так и риска развития нежелательных геморрагических осложнений при их применении.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан оригинальный метод оценки эффектов тромбоцитов на образование фибрина и генерацию тромбина.
2. Тромбоциты, активированные различными индукторами, ускоряют образование фибрина, генерацию тромбина и усиливают экспонирование ФС
3. Антитромбоцитарные препараты с различным механизмом действия по-разному влияют на прокоагулянтные реакции тромбоцитов (образование фибрина, генерацию тромбина и экспонирование ФС)
4. При активации тромбоцитов различными индукторами, высвобождается разное количество МЧ, но с одинаковыми прокоагулянтными свойствами.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, сформулированных в диссертации

Все научные положения диссертации основаны на изучении достаточного объема материала. В работе использовались современные методы исследования, полностью соответствующие поставленным задачам. Выводы аргументированы достаточным количеством исследуемого материала и вытекают из проведенных автором исследований. Положения и результаты проведенного исследования изложены в диссертации в полном объеме.

Внедрение результатов в практику

Основные результаты исследования, методики по оценке прокоагулянтных свойств тромбоцитов и оценке действия антитромбоцитарных препаратов внедрены в практику лаборатории клеточной адгезии НИИЭК ФГБУ «НМИЦК им. Ак. Е.И. Чазова» и в ФГБУН центре теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН.

Апробация работы.

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании межинститутского семинара ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е. И. Чазова» Минздрава России 20 сентября 2023 г. Диссертация рекомендована к защите.

Результаты работы докладывались на следующих научных конференциях:

- Конгресс Международного сообщества по Тромбозу и Гемостазу. Великобритания, Лондон. 09.07.2022 – 13.07.2022.
- Российский форум по тромбозу и гемостазу (РФТГ) совместно с 11-ой конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии. Москва, Россия. 17.03.2022 – 19.03.2022
- Ежегодная Всероссийская научно-практическая конференция «КАРДИОЛОГИЯ НА МАРШЕ 2021» и 61-я сессия ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. Москва, Россия 07.09.2021 - 09.09.2021
- Российский форум по тромбозу и гемостазу (РФТГ) Совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии. 08.10.2020 – 10.10.2020.
- Ежегодная научно-практическая конференция «Кардиология на марше» и 60-я сессия, посвященная 75-летию ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. Москва, Россия. 9.09.2020 – 11.09.2020.
- Виртуальный конгресс Международного сообщества по Тромбозу и Гемостазу. Карборо, США. 12.07.2020 – 14.07.2020

Личный вклад автора

Автор лично разрабатывал дизайн исследования, анализировал литературу, проводил исследования в рамках данной работы с использованием методов, применяемых для работы с тромбоцитами, анализировал полученные результаты. На основании полученных данных сформулированы выводы.

Публикация материалов исследования

Материалы диссертации отражены в 8 публикациях, в том числе в трех статьях в международных изданиях, входящих в Q1 квартиль по уровню цитирования и 5 тезисных публикациях.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 105 страницах, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов), выводов и библиографического указателя, включающего 128 источников. Работа содержит 18 рисунков и 8 таблиц.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Строение и функции тромбоцитов

Тромбоциты - самые мелкие, безъядерные, клетки крови. Неактивированные тромбоциты имеют форму дисков с диаметром 2-4 мкм, а их содержание в периферической крови составляет $150-350 \times 10^9$ в 1 л. Тромбоциты образуются путем отщепления от мегакариоцитов в костном мозге, циркулируют в крови в течение 7-10 суток и затем разрушаются в селезенке [10,31].

Основная функция тромбоцитов заключается в реализации процессов остановки кровотоков (гемостаза) при нарушении целостности сосудов. В норме внутренняя поверхность сосуда покрыта атромбогенным слоем эндотелиальных клеток. При травме сосудов происходит повреждение эндотелиальной выстилки и обнажение субэндотелиальных структур, которые в отличие от эндотелия высокотромбогенны. Тромбоциты прикрепляются (адгезируют) к компонентам матрикса сосудистой стенки, в первую очередь к коллагеновым волокнам, либо напрямую, либо опосредованно через фактор фон Виллебранда (ФВ), и таким образом происходит их первичное закрепление в области кровотечения [118]. Затем тромбоциты активируются агонистами, появляющимися в зоне повреждения, – это те же коллагеновые компоненты матрикса и также многочисленные растворимые агонисты – тромбин, образующийся в результате активации свертывания крови, АДФ и тромбоксан А₂ (ТХА₂), секретируемые из самих тромбоцитов и некоторые другие. В результате усиливается адгезия тромбоцитов и происходит их агрегация, опосредованная взаимодействием фибриногена и ФВ с активированной формой гликопротеина (ГП) IIb-IIIa. Таким образом происходит образования первичного пристеночного тромбоцитарного тромба. Параллельно адгезии и агрегации тромбоцитов в зоне повреждения происходит активация свертывания крови и образование нитей фибрина. Процесс происходит при участии тромбоцитов, ускоряющих активацию факторов свертывания. Тромбоциты вместе с фибриновыми нитями уже

образуют полноценную гемостатическую пробку, в которой также задерживаются эритроциты и белые клетки крови. Тромбоциты играют ключевую роль в остановке кровотечений прежде всего из артериальных сосудов. В этих сосудах, в отличие от вен, в связи с высокой скоростью кровотока растворимые в плазме факторы свертывания не могут без участия тромбоцитов закрепиться в зоне повреждения и сформировать фибриновые волокна. Известно, что качественные (тромбоцитопатии) или количественные (тромбоцитопении) нарушения тромбоцитов приводят к повышенной кровоточивости именно мелких артериальных сосудов [99].

2.1.1. Образование и клиренс тромбоцитов

Тромбоциты образуются из мегакариоцитов, которые в свою очередь образуются из гемопоэтических стволовых клеток. В процессе мегакариоцитопоэза из таких клеток вначале образуются общие миелоидные предшественники (промиелобласты), которые в дальнейшем могут дифференцироваться на клетки миелоидного, эритроцитарного, моноцитарного и мегакариоцитарного рядов. На последующих этапах клетки-предшественники мегакариоцитов усиленно синтезируют органеллы, белки, мембранные гликопротеины и рецепторы, необходимые для нормального функционирования тромбоцитов. В процессе созревания мегакариоцитов, в них также образуется демаркационная мембранная система, разделяющая цитоплазму на небольшие участки, из которой образуется мембрана будущих тромбоцитов [2][3]. На поверхности зрелых мегакариоцитов образуются выросты, которые затем превращаются в псевдоподии. Эти структуры получили названия протромбоцитов. По мере созревания, на их концевых участках образуются вздутия, в которых с помощью микротрубочек накапливаются тромбоцитарные гранулы и органеллы [4]. Протромбоциты отделяются, продолжая созревать в сосудах, постоянно отщепляя от своих концевых участков отдельные тромбоциты. От одного мегакариоцита может образоваться до 3 тыс. тромбоцитов, пока его оставшееся ядро не будет

деструктировано макрофагами [1]. Молодые тромбоциты, недавно отделившиеся от протромбоцита, называются ретикулярными, т.к. они содержат остаточную рибонуклеиновую кислоту (РНК) из мегакариоцитов, которая впоследствии разрушается по мере их циркуляции в кровотоке (сами безъядерные тромбоциты РНК не синтезируют). Ретикулярные формы представляют фракцию наиболее крупных и наиболее функционально активных тромбоцитов [123].

Тромбоциты в норме циркулируют в кровотоке в течение 7-10 дней. Механизм, запускающий естественную гибель тромбоцитов, остается до конца неизученным. Предполагается, что удаление (клиренс) тромбоцитов макрофагами селезенки и печени тромбоцитов может происходить в результате их десикализации и высвобождения на поверхности соответствующих маркеров, узнаваемых макрофагами [5].

2.1.2. Строение тромбоцитов

2.1.2.1. Плазматическая мембрана и рецепторы тромбоцитов

Плазматическая мембрана тромбоцитов представляет собой бислой липидов, пронизанный белками. Большинство таких белков по своей структуре являются гликопротеинами (ГП), так как содержат в себе углеводородный компонент. Эти белки выполняют ключевую роль в реакциях адгезии и агрегации – главных реакциях в функционировании тромбоцитов. Через такие белки происходит связывание тромбоцитов с их агонистами, затем сигнал передается далее, внутрь тромбоцита с помощью сигнальных молекул, таких как G-белки, или компонентов цитоскелета. На плазматической мембране тромбоцитов присутствуют адгезивные мембранные рецепторы, обеспечивающие непосредственно адгезию и агрегацию тромбоцитов. Функционально наиболее значимые из них ГП IIb-IIIa, Ib-V-IX и VI

ГП IIb-IIIa (кластер дифференциации (CD) 41/61) – главный белок мембран тромбоцитов, составляющий около 20% от всех мембранных белков. ГП IIb-IIIa представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц ГП IIb

(α IIb-интегрин) и ГП IIIa (β 3-интегрин). Около 30% этого белка содержится внутри тромбоцитов, в мембранах α -гранул и ОКС. При активации тромбоцитов внутриклеточный пул этого белка выходит на поверхность. Сигнал от первичных агонистов передается на цитоплазматические участки ГП IIb-IIIa, что приводит к его конформационным перестройкам и образованию им активной формы, способной связываться с лигандами (фибриногеном, ФВ и др.) [84]. Все эти лиганды содержат специфическую последовательность - RDG, распознаваемую ГП IIb-IIIa. Фибриноген кроме RGD последовательности содержит также KQADG последовательность, которая также важна для эффективного связывания этого лиганда с ГП IIb-IIIa [92].

ГП Ib в комплексе с ГП IX и ГП V (ГПb-IX-V) (CD42) является рецептором ФВ. Этот комплекс состоит из четырех трансмембранных белков – ГП Ib α , Ib β , IX и V, из которых ГП Ib α связывается со своим лигандом, ФВ, что обеспечивает прикрепление тромбоцитов к месту повреждения сосуда. Недостаточность этого комплекса приводит к развитию синдрома Бернара-Сулье, при котором тромбоциты не способны адгезировать к сосудистой стенке.

ГПVI является основным сигнальным рецептором для коллагена на мембране тромбоцитов. Его N-концевые домены, связывающие коллаген, достаточно далеко выступают от поверхности тромбоцитов, благодаря высокогликозилированным участкам. С-концевые домены рецептора связаны с гомодимером γ -цепи Fc-рецептора (FcR γ). Этот димер является необходимым для нормальной экспрессии ГПVI. Связывание ГП VI с коллагеном приводит к активации инозитолтрифосфатной системы и открытию кальциевых каналов [85][86]. Также на плазматической мембране экспонированы рецепторы растворимых агонистов тромбоцитов – тромбина, АДФ, тромбоксан A2 (TXA2), адреналина.

Рецепторы тромбоцитов, с которыми связывается тромбин называются Protease Activated Receptors (рецепторы, активируемые протеазами, PAR). Эти

рецепторы относятся к классу 7-трансмембранных белков, пересекающих мембрану 7 раз. Как и другие рецепторы этого типа, PAR рецепторы сопряжены с G-белками и при их активации в них происходит перестройка, в ходе которой гуанозиндифосфат замещается на гуанозинтрифосфат. Это вызывает изменение конформации субъединиц, комплекс Gα-гуанозинтрифосфат диссоциирует, передавая сигнал на последующие системы внутриклеточной активации. Тромбин взаимодействует с PAR рецепторами следующим образом: вначале происходит отщепление N-концевого пептида внеклеточной части рецептора, а затем образующийся новый N-концевой пептид взаимодействует с другим участком трансмембранного белка на внеклеточной части петли, что приводит к изменению конформации рецептора и последующей перестройке G-белков. На тромбоцитах человека встречается 2 типа PAR рецепторов: PAR1 и PAR4, высокоафинный и низкоафинный, соответственно. Также тромбин способен связываться с комплексом GPIIb-V-IX, предположительно усиливая PAR-зависимую активацию тромбоцитов [87].

Исследования PAR-рецепторов привели к разработке синтетических пептидов, которые имитируют действие тромбина. Такие пептиды получили название TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide, пептид, активирующий рецептор тромбина). Их действие обусловлено наличием в молекуле последовательностей, соответствующих новому N-концевому участку. Этот участок связывается с PAR-рецептором независимо от протеолиза последнего [88].

Пуринергические рецепторы можно разделить на два подсемейства: P2Y и P2X рецепторы. P2Y рецепторы связаны с G-белками, а P2X рецепторы представляют собой ионные каналы, регулируемые лигандами. На мембранах тромбоцитов присутствуют три типа рецепторов, которые взаимодействуют с пуриновыми нуклеотидами: P2Y₁, P2Y₁₂ и P2X₁. P2X₁ – ионный канал, который активируется аденозинтрифосфатом (АТФ) и отвечает за быстрый перенос ионов кальция в тромбоциты, однако такой рецептор не является для

них специфичным [87][89]. Рецептор P2Y₁ также присутствует во многих тканях. Он способствует началу обратимой агрегации тромбоцитов и изменению их формы, индуцированной АДФ [90]. При активации этого рецептора сигнал передается с помощью инозитолтрифосфатной системы, что приводит к повышению уровня внутриклеточного кальция. Рецептор P2Y₁₂ присутствует только на тромбоцитах. Он играет ключевую роль в усилении сигнала, индуцированного АДФ (при высвобождении АДФ из плотных гранул) и стабилизации тромбоцитарных агрегатов [87][90]. Известно, что для полноценной/нормальной активации тромбоцитов АДФ необходимы оба рецептора – P2Y₁₂ и P2Y₁. Однако именно рецептор P2Y₁₂ оказался эффективной мишенью для антитромбоцитарной терапии [91].

Рецептор TXA₂ также относится к 7-трансмембранным рецепторам, сопряженным с G-белками. Как и в случае с АДФ, основным источником TXA₂ являются сами тромбоциты. Его синтез индуцируется в результате взаимодействия первичного индуктора с мембранными рецепторами. Повышение концентрации внутриклеточного кальция приводит к появлению свободной арахидоновой кислоты, которая под действием фермента циклооксигеназы превращается в простагландиновые эндоперекиси, а затем с помощью фермента тромбоксансинтазы в TXA₂. TXA₂, высвобождаясь, связывается со своим рецептором на тромбоцитах, усиливая активацию, вызванную первичным индуктором. Ввиду того, что TXA₂ – нестабильное соединение, в экспериментах используют либо экзогенную арахидоновую кислоту, как источник TXA₂, либо его стабильные аналоги [87].

Во внутреннем слое мембраны помимо других фосфолипидов содержится большое количество ФС, отсутствующего на поверхности не активированных тромбоцитов. Такая асимметрия поддерживается флипазами (АТФ-зависимыми транслоказами), которые быстро переносят ФС на внутренний слой против градиента концентрации. При активации тромбоцитов ферменты скрамблазы (Ca²⁺-зависимые, АТФ-независимые) нарушают эту асимметрию, быстро и неспецифично перенося ФС между

слоями мембраны [6], увеличивая таким образом его экспонирование на внешней поверхности мембраны, что способствует ускорению коагуляционных реакций. (Подробнее - см. главу 2.3.2.)

2.1.2.2. Внутренние мембранные системы

2.1.2.2.1. Открытая канальцевая система

Открытая канальцевая система – внутриклеточная сеть мембранных канальцев, пронизывающих внутреннее пространство тромбоцитов. Она образуется путем впячивания плазматической мембраны и идентична ей по своему составу [7][8]. Особенность данной структуры состоит также в том, что она характерна лишь для некоторых млекопитающих, включая человека [9]. При активации тромбоцитов открытая канальцевая система способна сливаться с плазматической мембраной. Это позволяет тромбоцитам распластываться и увеличивать свою функционально активную поверхность за счет липидов и белков, локализованных в ней. Так, например, около трети рецепторов тромбина локализованы именно во внутренних мембранах. Также открытая канальцевая система выполняет транспортную функцию. Она переносит некоторые вещества плазмы крови внутрь тромбоцита, например, фибриноген, что приводит к их накоплению в гранулах [10].

2.1.2.2.2. Плотная тубулярная система

Плотная тубулярная система (ПТС) выполняет функцию хранения внутриклеточного кальция. Она образуется из гладкого эндоплазматического ретикулума и имеет достаточно высокую электронную плотность. В ее мембранах содержатся кальциевые насосы, поддерживающие в цитоплазме низкие концентрации этого иона. При активации тромбоцитов происходит гидролиз мембранного фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата. В ходе реакции образуется инозитол-1,4,5-трифосфат, который диффундирует к мембранам ПТС и стимулирует открытие кальциевых каналов, многократно увеличивая концентрацию внутриклеточного кальция [11].

2.1.2.3. Органеллы и гранулы

Тромбоциты содержат сравнительное небольшое количество органелл. К ним относятся митохондрии, обеспечивающие тромбоциты энергией АТФ, лизосомы, участвующие в фагоцитозе и пероксисомы, содержащие ферменты каталазы. Кроме того, в тромбоцитах содержится два типа секреторных гранул – плотные гранулы и альфа-гранулы. При активации эти гранулы сливаются с плазматической мембранной и открытой канальцевой системой тромбоцитов с помощью SNARE белков и секретируют содержимое в окружающую среду. Плотные гранулы, содержат низкомолекулярные соединения, такие как АТФ, АДФ, серотонин, ионы кальция. Более крупные α -гранулы содержат белковые соединения, которые секретируются во внешнюю среду при активации тромбоцитов. Среди них специфические белки, такие как тромбоцитарный фактор 4 и β -тромбоглобулин, некоторые ростовые факторы, а также белки, участвующие непосредственно в гемостазе и тромбозе (фибриноген ФВ и др.). Кроме того в мембранах α -гранул содержатся мембранные ГП, аналогичные тем, которые экспрессированы на плазматической мембране, и специфический белок Р-селектин (CD62P), появление которого на поверхности служит маркером экзоцитоза этого типа гранул [1][12]. (Подробнее см. главу 2.1.3.3.)

2.1.2.4. Цитоскелет тромбоцитов

Мембранный цитоскелет располагается непосредственно под плазматической мембраной. Его главный компонент – белок спектрин – образует плотную сеть тонких волокон. Эти волокна соединяются между собой с помощью актиновых филаментов, образуя треугольные поры. Также именно с помощью актиновых волокон и с помощью белка филамина осуществляется прикрепление мембранного цитоскелета к ГП Iba плазматической мембраны. Помимо тромбоцитов, подобные структуры встречаются также и у эритроцитов, однако имеют различия [14].

Компоненты актинового цитоскелета тромбоцитов значительно преобладают над другими белками по своей массе. В покоящихся тромбоцитах около 40%

актина представлено линейными филаментами (f-актин). Оставшийся пул представлен комплексом с $\beta 4$ -тимозином и при активации тромбоцитов он также перестраивается в филаменты, участвуя в образовании псевдоподий и распластывании тромбоцитов [13]. В покоящихся тромбоцитах филаменты связаны между собой белками филамином и α -актином, и с ГП Ib α плазматической мембраны, что, как и в случае с мембранным цитоскелетом, обеспечивает прочность цитоскелета и прикрепление его к поверхности.

Тубулиновый цитоскелет представлен одной полый спиралевидной микротрубочкой из белка α - и β -тубулина. Его главная функция – поддержание дискоидной формы тромбоцитов [10].

2.1.3. Функциональные реакции тромбоцитов

Образование тромбоцитарных агрегатов, прикрепленных к поверхности поврежденной сосудистой стенки, и составляющих первичную основу гемостатической пробки при остановке кровотечения представляет собой сложный и многостадийный процесс. В нем выделяют следующие реакции: адгезия, изменение формы, реакции высвобождения и агрегация тромбоцитов.

2.1.3.1. Адгезия тромбоцитов

Адгезией тромбоцитов называется их прикрепление к поверхности поврежденной сосудистой стенки или субстрата. В нормальных условиях тромбоциты не прикрепляются к поверхности эндотелия, однако способны на это при активации эндотелия или самих тромбоцитов. При нарушении эндотелиальной выстилки сосуда, тромбоциты способны взаимодействовать с коллагеном, фибронектином и ламинином, представленным в межклеточном матриксе [71][72]. В условиях быстрого, артериального кровотока обратимая адгезия зависит от взаимодействия тромбоцитов с ФВ. Экспонированный коллаген в месте повреждения сосуда связывается с ФВ, который выставляет A1 домен и может связываться с комплексом ГП Ib-IX-V тромбоцитов. В результате тромбоциты медленнее передвигаются по поврежденному участку и обратимо прикрепляются к стенке сосуда. Затем происходит их активация

матричными белками (в первую очередь коллагеном через ГП VI) и растворимыми агонистами, что приводит к их необратимой адгезии, в том числе с помощью активированного ГП IIb-IIIa, способного взаимодействовать с фибрином/фибриногеном, а также с ФВ, накапливающимся в зоне повреждения [73].

2.1.3.2. Изменение формы

Изменение тромбоцитами их формы с дискоидной на сферическую обусловлено, главным образом, разрушением их тубулинового цитоскелета. Одновременно с этим происходит перестройка актинового цитоскелета с высвобождением белка актина, его полимеризации *de novo* и образование филоподий. Затем тромбоцит начинает образовывать ламеллиподии и расплываться. Эти реакции увеличивает площадь контактной поверхности тромбоцита и прочность его прикрепления к субстрату.

2.1.3.3. Реакции высвобождения

К реакциям высвобождения относятся выброс активированными тромбоцитами различных активных соединений. При изменении формы тромбоцита его гранулы и органеллы концентрируются ближе к его центру, гранулы сливаются с открытой канальцевой системой и высвобождаются во внешнюю среду [75]. К таким соединениям относятся компоненты, содержащиеся в 2 типах гранул (α -гранулы и плотные гранулы), а также лизосомальные ферменты, ТХА2 и растворимые формы мембранных белков.

В плотных гранулах содержатся различные соединения, такие как АТФ, АДФ, а также ионы кальция, калия, серотонин и гистамин. При активации содержимое этих гранул высвобождается из тромбоцитов и происходит усиление активации за счет выброса из гранул эндогенных АДФ, АТФ и серотонина. Кроме того, эти вещества активируют новые покоящиеся тромбоциты, вовлекая их в процесс образования гемостатической пробки. На мембранах плотных гранул присутствуют такие белки, как CD63 и CD107b,

которые экспонируются на поверхности тромбоцитов при экзоцитозе этого типа гранул и могут служить маркерами этого процесса. [1].

α -Гранулы содержат различные белки, выполняющие множество функций: поддержание адгезии и агрегации тромбоцитов (ФВ, фибриноген), регуляция свертывания и фибринолиза (фибриноген, фактор V, плазминоген), активацию лейкоцитов (β -тромбоглобулин), пролиферацию клеток сосудов (факторы роста), а также мобилизацию стволовых клеток (фактор стромальных клеток 1 α). По количеству α -гранулы в 10 раз превосходят плотные и занимают около 10% объема тромбоцита. Кроме того, мембраны α -гранул содержат белки плазматической мембраны тромбоцитов, например, ГП IIb-IIIa, увеличивая их присутствие на мембране при активации тромбоцитов и последующем экзоцитозе гранул. Маркером мембран α -гранул служит специфический для них белок Р-селектин, который участвует во взаимодействии тромбоцитов с белыми клетками крови [1][76][77].

Из лизосом во внешнюю среду секретируются в основном ферменты: протеазы (катепсины и др.) и гликогидролазы (β -глюкуронидаза и др.). В мембране лизосом содержатся белки, CD107a, CD63 и CD107b. Из них CD107a локализуется только в лизосомах (два других белка есть и в плотных гранулах) и поэтому является специфическим маркером лизосомальной секреции [77].

К растворимым формам мембранных белков относятся Р-селектин (CD62P), который помимо мембран α -гранул содержится также в растворимой форме, CD40 лиганд, а также растворимые формы некоторых ГП (ГП Ib, ГП V, ГП VI), которые образуются путем отщепления их внеклеточных участков от мембраны [93].

ТХА2 образуется в тромбоцитах из арахидоновой кислоты под действием фермента ЦОГ. Высвобождаясь, он связывается со своим рецептором на мембране тромбоцита, усиливая его активацию (подробнее см главу 2.1.2.1.)

2.1.3.4. Агрегация тромбоцитов

Агрегация тромбоцитов представляет конечную стадию образования тромбоцитарного тромба, в которой активированный ГП IIb-IIIa связывается с фибриногеном (и с фактором фон Виллебранда при высоких скоростях сдвига), соединяя активированные тромбоциты. Эти белки способны связываться сразу с несколькими тромбоцитами ввиду своей структуры (димерная у фибриногена и мультимерная у ФВ), образуя между ними молекулярные «мостики» [92]. Агрегация тромбоцитов является наиболее часто и просто измеряемой функциональной реакцией тромбоцитов. Золотым стандартом исследования агрегации является турбидиметрический метод, в котором измеряют увеличение светопропускания суспензии тромбоцитов по мере образования агрегатов [24][66]. Используют обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) или суспензию отделенных от плазмы тромбоцитов, в которые добавляют агонисты тромбоцитов (АДФ, адреналин, коллаген, арахидоновая кислота и некоторые другие). По мере образования агрегатов, мутная суспензия становится более прозрачной, что приводит к росту светопропускания, регистрируемому в виде кривой агрегации на приборе.

2.2. Тромбоциты, тромбоз и антитромбоцитарные препараты

2.2.1. Тромбоциты во внутрисосудистом тромбообразовании

При внутреннем, патологическом повреждении сосудов тромбоциты, участвуют в образовании внутрисосудистых тромбов. Также, как и при травме сосудов в этом случае происходит повреждение эндотелия, чаще всего вследствие атеросклеротических и/или воспалительных поражений сосудистой стенки. Несмотря на то, что такое повреждение не вызывает кровотечения, оно приводит к нарушению эндотелиального монослоя и обнажению в просвет сосуда субэндотелиальных структур. Тромбоциты и свертывающая система реагируют на такую ситуацию, точно так же, как и на нарушение целостности сосуда. Тромбоциты, как и в случае образования

гемостатической пробки играют ключевую роль в тромбозе артериальных сосудов с быстрым кровотоком. Они адгезируют к компонентам матрикса, активируются различными агонистами, агрегируют и образуют первичный пристеночный тромбоцитарный тромб, который затем закрепляется нитями фибрина. В тромбы, содержащие нити фибрина, также могут включаться клетки крови – лейкоциты и эритроциты. Такие тромбы способны полностью закупоривать просвет сосуда, что приводит к кислородному голоданию различных тканей и органов (ишемия) и развитию таких опасных состояний как инфаркт миокарда и нестабильная стенокардия (ОКС), ишемический инсульт и тромбозы периферических артерий [26].

Ключевым клиническим доказательством участия тромбоцитов в развитии артериальных тромбозов является эффективность применения антитромбоцитарных препаратов для лечения и профилактики артериальных тромботических патологий, в первую очередь ОКС и ишемического инсульта.

2.2.2. Антитромбоцитарные препараты

По механизму действия антиагреганты классифицируют следующим образом: ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ), антагонисты P2Y₁₂ рецептора АДФ, антагонисты ГП IIb-IIIa, ингибиторы фосфодиэстеразы и захвата аденозина и некоторые другие препараты с антитромбоцитарным эффектом. Зачастую разные группы этих препаратов принимают одновременно с целью усиления антиагрегационного эффекта.

2.2.2.1. Ингибиторы циклооксигеназы

Самым известным и широко применяемым представителем ингибиторов ЦОГ является ацетилсалициловая кислота или аспирин. Оказывая необратимое ингибирующее действие на ЦОГ, она подавляет образование ТХА₂ из арахидоновой кислоты и таким образом препятствует активации тромбоцитов. Аспирин применяется как в острых и подострых тромботических состояниях, часто в составе двойной антитромбоцитарной

терапии вместе с антагонистами P2Y₁₂ рецептора АДФ, так и отдельно для профилактики тромбозов [95].

2.2.2.2. Антагонисты P2Y₁₂ рецептора АДФ

АДФ, играющий ключевую роль в образовании тромба, взаимодействует с двумя рецепторами тромбоцитов: P2Y₁ и P2Y₁₂. Именно P2Y₁₂ обеспечивает дополнительную активацию тромбоцитов, взаимодействуя с АДФ, который высвобождается из плотных гранул. Для нормальной АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов необходима активация обоих рецепторов, однако P2Y₁₂ имеет более выборочное распространение в тканях, и поэтому стал мишенью антитромбоцитарной терапии [65]. Таким образом, антагонисты этого рецептора блокируют звено дополнительной активации. Эту группу препаратов чаще назначают одновременно с ингибиторами ЦОГ (двойная антитромбоцитарная терапия) [97]. К первому поколению блокаторов АДФ рецепторов из семейства тиенопиридинов относится тиклопидин. В настоящее время он не используется ввиду развития побочных эффектов и появлению блокатора нового поколения тиенопиридинов – клопидогрела, обладающего большей эффективностью и низким уровнем побочных эффектов [61][62]. Прасугрел относится к третьему поколению ингибиторов P2Y₁₂ из семейства тиенопиридинов. Его действие развивается быстрее, чем у клопидогрела, а он способен ингибировать агрегацию тромбоцитов более эффективно и при меньшей дозировке [65]. Его применяют при высоких уровнях риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний или для достижения более быстрого эффекта [96]. Все тиенопиридины являются пролекарствами, на тромбоциты действуют не сами препараты, а их метаболиты, которые необратимо инактивируют P2Y₁₂ рецептор АДФ. Еще один антагонист P2Y₁₂ рецептора АДФ, тикагрелор, принадлежит к классу циклопентил-триазолопиримидинов. Он действует на рецептор напрямую и обратимо. Тикагрелор обладает быстрым действием, достигая максимального ингибирования

функций тромбоцитов приблизительно за 2 часа [63]. Его, как и прасугрел, обычно назначают пациентам для достижения быстрого эффекта, например, при ОКС, а также при недостаточном действии клопидогрела, эффект которого может индивидуально варьироваться [64].

2.2.3. Антагонисты гликопротеина IIb-IIIa

Действие антагонистов ГП IIb-IIIa направлено на конечную стадию агрегации – связывание фибриногена с ГП IIb-IIIa, и поэтому они являются сильнодействующими, наиболее эффективными среди других антитромбоцитарных препаратов [101].

Выделяют два вида антагонистов ГП IIb-IIIa. Первый, производные антител, представляет собой фрагменты моноклональных антител против ГП IIb-IIIa, которые неконкурентно блокируют его связывание с фибриногеном и другими лигандами. К таким препаратам относятся Монафрам (руциромаб) и абциксимаб. Ко второй группе относятся низкомолекулярные соединения – эптифибатид и тирофибан. Эптифибатид является кольцевым пептидом, содержащим в своем составе KGD последовательность, гомологичную RGD-последовательности, важной для узнавания фибриногена ГП IIb-IIIa. Тирофибан является пептидомиметиком (не содержит пептидных связей), и близок по своей структуре к RGD последовательности. Эти препараты ингибируют связывание фибриногена с ГП IIb-IIIa по конкурентному механизму.

Все зарегистрированные антагонисты ГП IIb-IIIa вводятся внутривенно. Они используются в наиболее опасных тромботических ситуациях, например, при ангиопластике, в том числе и у больных с ОКС. Цель их применения – быстрая и практически полная блокада агрегации тромбоцитов при уже состоявшемся или высоковероятном повреждении сосудистой стенки [94].

2.2.4. Другие препараты с антитромбоцитарным эффектом

При распаде АТФ в крови образуется аденозин. При обычных условиях аденозин транспортируется в эритроциты и эндотелиальные клетки [121].

Ингибиторы захвата аденозина задерживают его в крови. Аденозин, связываясь со своим рецептором на поверхности тромбоцитов, стимулирует аденилатциклазу. Аденилатциклаза превращает АТФ и АДФ в циклические монофосфаты, которые активируют протеинкиназу А, что приводит к снижению активности тромбоцитов. В этой системе важную роль играет фермент фосфодиэстераза, которая гидролизует фосфодиэфирную связь циклических монофосфатов, препятствуя таким образом ингибированию активации тромбоцитов. К препаратам, ингибирующим фосфодиэстеразу и захват аденозина, относятся дипиридабол и цилостазол. Этот класс препаратов иногда назначают для профилактики тромботических событий, а в случае их развития - в сочетании с другими (ингибиторы ЦОГ и рецептора P2Y₁₂) в составе двойной или тройной антитромбоцитарной терапии [102][103]. Дипиридабол и циластозол применяется существенно реже, чем другие классы антитромбоцитарных препаратов.

Среди других препаратов с антитромбоцитарным эффектом можно выделить активаторы аденилатциклазы - простагландин Е1 (ПГЕ1), простагландин и их аналоги, которые чаще применяются как вазодилаторы (например, при лечении легочной гипертензии). Однако они также действуют и на тромбоциты, повышая в них уровень цАМФ и, таким образом, ингибируя их активность [122].

Действие антитромбоцитарных препаратов стандартно оценивается по их способности ингибировать агрегацию тромбоцитов, как в условиях *in vitro*, так и при приеме пациентами. Такие работы выполняются при разработке препаратов, проведении их клинических до- и пострегистрационных исследований. В то же время способность антитромбоцитарных препаратов влиять на тромбоцит-зависимые коагуляционные реакции изучена в гораздо меньшей степени (см. ниже).

2.3. Коагуляционная активность тромбоцитов

Коагуляция крови представляет собой каскад активации ферментов, в которых неактивные проферментные субстраты превращаются в активные сериновые протеазы. Итог этого каскада приводит к образованию тромбина, превращающему растворимый в плазме фибриноген в нерастворимые фибриновые волокна. Множество этапов этого каскада требуют присутствия специфических кофакторов, а также правильной колокализации различных белков.

2.3.1. Коагуляция крови

Каскад реакций свертывания может проходить по двум путям – внешнему и внутреннему.

Внешний путь свертывания начинается с повреждения сосуда. Тканевой фактор, содержащийся в субэндотелии взаимодействует с фактором свертывания (F) VII, образуя с ним комплекс, в котором FVII активируется до FVIIa («a» - активированный). Такой комплекс называется внешним теназным комплексом. Он активирует два фактора: FIX до FIXa и FX до FXa с помощью частичного протеолиза. FV, активированный FXa или тромбином до FVa, является кофактором для FXa, связываясь они образуют комплекс FXa-FVa, или протромбиназный комплекс [74]. Образование этих комплексов и присоединение к ним кофакторов происходит с участием поверхности мембраны тромбоцитов. Комплекс FXa-FVa отщепляет два пептидных участка от протромбина, превращая его в тромбин. Тромбин способен превращать неактивные формы кофакторов FV и FVIII в активные FVa и FVIIIa, соответственно, а также активировать FXI до FXIa, что приводит к усилению образования тромбина. После образования тромбина, этот фермент активирует тромбоциты, а также активирует фибриноген, превращая его в растворимый фибрин. Фибрин полимеризуется с образованием нерастворимой полимерной формы, а FXIIIa, активированный тромбином, образует прочные ковалентные сшивки между полимерами [68]. Именно

нерастворимый фибрин наряду с тромбоцитами составляет основу тромба [78].

Альтернативный путь свертывания - внутренний или контактный. Он начинается со взаимодействия FXII с отрицательно заряженной поверхностью или полимером. Далее следует активация FXI и IX. FVIIIa, который образовался во внешнем пути, является кофактором и для FIXa. Их комплекс (внутренний теназный) активирует FX, последующее превращение протромбина в тромбин и фибриногена в фибрин, как и по внешнему пути. Считается, что в условиях *in vivo* свертывание крови происходит в основном по внешнему пути, а внутренний путь может усиливать внешний или происходить при попадании крови на искусственную поверхность [68][69].

2.3.2. Участие тромбоцитов в коагуляционных реакциях

Тромбоциты участвуют в реакциях свертывания, главным образом, благодаря своей способности предоставлять отрицательно заряженный фосфолипид ФС на своей поверхности. Такая подложка является местом сборки кальций-зависимых коагуляционных комплексов, работа которых на мембранном субстрате ускоряется на несколько порядков [68][70]. В обычном состоянии тромбоциты не содержат на поверхности ФС. Это достигается благодаря активному транспорту ФС во внутренний слой мембраны и поддержанию т.н. фосфолипидной асимметрии. Активация тромбоцитов и последующее повышение внутриклеточного кальция блокирует действие транспортных ферментов и активирует быстрый неспецифичный перенос фосфолипидов между слоями мембраны. Таким образом, на поверхности появляется ФС участвующий в связывании факторов свертывания. Экспонирование на поверхности тромбоцитов ФС стимулируется при активации тромбоцитов мощными агонистами, такими как коллаген (или коллагеновые пептиды) и тромбин по отдельности и/или при совместном добавлении. Эту реакцию можно также индуцировать кальциевыми ионофорами (например, A23187). Тромбоциты, экспонирующие ФС

называются прокоагулянтными. Помимо высокого экспонирования ФС они характеризуются шарообразной формой, слабой активностью GPIIb-IIIa и соответственно низкой способностью к агрегации и слабой секреторной функцией [106][107]. ФС на поверхности тромбоцитов и/или их МЧ (см. ниже) определяют по его связыванию с маркерами – аннексином V или лактадгерином с помощью проточной цитометрии [106][108].

Появление на поверхности активированных тромбоцитов отрицательно заряженного ФС способствует кальций зависимому связыванию с ними и последующей активации различных факторов свертывания (FV, FVII, FVIII, FIX, FX, протромбин и др.). Сборка коагуляционных комплексов, теназного, внешнего и внутреннего и протромбиназного, на поверхности тромбоцитов ускоряет активацию FX и протромбина на несколько порядков [111,128]. Связывание факторов свертывания с тромбоцитами обычно исследуют, используя флуоресцентно меченые факторы или специфические антитела против этих белков [109-111,120]. Активацию факторов на поверхности тромбоцитов регистрируют с помощью специфических хромогенных субстратов [120].

Для регистрации эффектов тромбоцитов на образование тромбина из протромбина также используют коммерческий тест генерации тромбина (ТГТ). В этом тесте коагуляционные реакции запускают в субстратной плазме добавлением тканевого фактора, кальция и фосфолипидов, а образование тромбина регистрируют с помощью специфического флуорогенного субстрата [112][113]. Классический ТГТ применяют в общеклинической практике для диагностики различных нарушений свертывания, в том числе при недостаточности факторов свертывания [79][80]. В тех случаях, когда ТГТ проводят в присутствии тромбоцитов (например, в обогащенной тромбоцитами плазме или при добавлении отделенных от плазмы тромбоцитов) в реакционную смесь не вносят экзогенные фосфолипиды, т.к. их функцию выполняет ФС, локализованный на мембране активированных тромбоцитов. Также стандартно используют более низкие концентрации

тканевого фактора, чтобы эффект тромбоцитов был более заметен. С помощью этих подходов было показано, что тромбоциты ускоряют генерацию тромбина, а их дополнительная активация экзогенными агонистами способна приводить к усилению этого эффекта [34, 114, 115]. Важность наличия ФС на поверхности тромбоцитов для их участия в генерации тромбина была продемонстрирована при ингибировании этой реакции лактадгерином [115]. Действие тромбоцитов на финальную стадию коагуляционного процесса – образование фибрина, изучено в гораздо меньшей степени, чем на предшествующие реакции. В этих исследованиях иногда используют сложные проточные камеры или метод тромбоэластографии. В проточных камерах кровь протекает с большой скоростью по поверхности, покрытой коллагеном и тканевым фактором, а образование фибринового тромба регистрируется по замедлению и полной остановке тока крови, а более детально с помощью микроскопии. С помощью этого подхода была показана роль коллагена и его тромбоцитарного рецептора GPIIb/IIIa в инициации образования фибриновых тромбов [124-126]. Различные варианты проточных камер (с и без тканевого фактора, т.е. с образованием тромбоцитарного или фибринового тромба) применяют при диагностике болезни фон Виллебранда, различных коагулопатий и для оценки действия антитромботических препаратов (в варианте тромбоцитарного тромба) [67][81][82].

Метод тромбоэластографии основан на регистрации колебания небольшого стержня, помещенного в кювету, совершающую мелкие вращающие движения. Для этого используют цельную кровь, взятую в пробирку с антикоагулянтом цитратом натрия и запускают реакции свертывания добавлением каолина [20], ионов кальция [19] или других активаторов. При образовании сгустка стержень начинает колебаться вместе с кюветой, а по мере его растворения эти колебания затухают. Время до начала подъема колебательных кривых зависит от работы коагуляционного каскада. Угол подъема кривой отражает количество фибриногена, а последующее уменьшение амплитуды позволяет оценить работу системы фибринолиза.

Считается, что тромбоциты могут влиять на максимальная амплитуду колебаний. Этот показатель определяет прочность сгустка, которая зависит от способности тромбоцитов стимулировать его уплотнение (ретракцию) (см. ниже) и снижается при снижении числа тромбоцитов у пациентов с тромбоцитопениями. [116,127]. Тромбоэластографические исследования в клинике обычно назначают для быстрого получения полной картины о состоянии системы гемостаза, например, при оперативных вмешательствах, для общей оценки коагуляционного статуса при беременности, для решения вопроса о проведении трансфузионной терапии при травмах [18,21,22]. Необходимо отметить, что и проточные камеры и тромбоэластография моделируют свертывание крови в условиях, близких к образованию фибриновых сгустков *in vivo*, однако они позволяют оценивать только общие характеристики, такие как влияние количества тромбоцитов (сгусток образуется медленнее), работу факторов свертывания, системы фибринолиза и т.д.

Кроме того, что тромбоциты, благодаря экспонированию ФС, могут ускорять активацию факторов свертывания, они также являются локальными источниками некоторых факторов – фибриногена, FXIII, FV и FXI. Эти белки содержатся в тромбоцитах в неактивной форме, но высвобождаются и активируются при дегрануляции тромбоцитов. Это способствует повышению их концентрации и ускорению коагуляционных реакции в участках повреждения сосудистой стенки и накопления тромбоцитов [68].

Также известно, что тромбоциты участвуют в процессе ретракции сгустка. Активация тромбоцитов при образовании фибринового сгустка и передача сигнала внутрь тромбоцита, вызывает сокращение актино-миозинового аппарата, присоединенному к внутриклеточной части GPIIb-IIIa, который снаружи тромбоцита связан с фибриновыми волокнами [104]. Благодаря сократительному действию тромбоцитов сгусток уменьшается в размере и уплотняется, что приводит к образованию плотной гемостатической (кровоостанавливающей) пробки при травме сосудов или плотному

внутрисосудистому тромбу при внутреннем повреждении сосудов. Такие сгустки хуже растворяются фибринолитиками, что делает более эффективной остановку кровотечения, но повышает резистентность внутрисосудистых тромбов к тромболитической терапии [105].

В заключение следует отметить, что несмотря на множество работ по изучению прокоагулянтных свойств тромбоцитов некоторые принципиальные вопросы остаются неисследованными. Во-первых, практически не изучено влияние тромбоцитов на финальную реакцию коагуляционного каскада – образование фибрина. Во-вторых, неясна взаимосвязь между эффектами тромбоцитов на образование фибрина и генерацию тромбина, а также взаимосвязь этих эффектов с уровнем презентации ФС.

2.3.3. Коагуляционная активность тромбоцитов и антитромбоцитарные препараты

Действие антитромбоцитарных препаратов чаще всего исследуют по их способности ингибировать агрегацию тромбоцитов, а работы по изучению их эффектов на коагуляционную активность тромбоцитов немногочисленны, а их результаты порой противоречивы.

Экспонирование ФС на активированных тромбоцитах частично ингибировалось антагонистами рецепторов P2Y₁₂ [29,46,49], в то время как для антагонистов аспирин и ГП IIb-IIIa и результаты были довольно противоречивыми. Аспирин не оказывает влияния на экспозицию ФС *in vitro* [29], но был эффективен при введении пациентам [45]. Для различных антагонистов ГП IIb-IIIa *in vitro* были продемонстрированы ингибирующие эффекты [38,39,43,47], отсутствие эффектов [48] и даже парадоксальные стимулирующие [38,39,49] эффекты.

Существуют доказательства того, что различные антитромбоцитарные препараты способны ингибировать генерацию тромбина в присутствии тромбоцитов [27,28,40-43]. Однако для аспирина и антагонистов P2Y₁₂ рецепторов эти эффекты в условиях *in vitro* были продемонстрированы при

добавлении специфических агонистов – арахидоновой кислоты и АДФ соответственно [28,40,41] и зависели от присутствия и концентрации фактора VII [28]. В отсутствие агонистов добавление аспирина практически не оказывало действия на генерацию тромбина [27]. В нескольких работах в условиях *in vitro* был также продемонстрирован ингибирующий эффект антагонистов ГП IIb-IIIa на тромбоцит-зависимое ускорение генерации тромбина [42,43]. Генерация тромбина в обогащенной тромбоцитами плазме снижалась у больных, получающих двойную антитромбоцитарную терапию (аспирин + клопидогрел) после проведения коронарной ангиопластики по сравнению со здоровыми донорами [44].

Несмотря на наличие отдельных работ по изучению действия антитромбоцитарных препаратов на экспонирование ФС и генерацию тромбина их эффекты на тромбоцит-зависимое образование фибрина, т.е. конечную стадию коагуляционного каскада, в настоящее время остаются практически неизученными. Лишь в одном исследовании с помощью проточных камер было показано, что прием аспирина не оказывал достоверного действия на образование фибринового тромба, хотя и ингибировал рост тромбоцитарного тромба [117].

Следует также отметить, что систематических исследований по одновременному сравнению действия антиагрегантных препаратов с разным механизмом действия на разные прокоагулянтные реакции тромбоцитов ранее не проводилось.

2.4. Микрочастицы тромбоцитов

Тромбоциты не только сами по себе обладают прокоагулянтными свойствами, но и способны продуцировать мембранные МЧ, содержащие на своей поверхности ФС и ускоряющие коагуляционные реакции.

2.4.1. Виды мембранных частиц

Клетки способны образовывать и выбрасывать во внешнюю среду два типа мембранных частиц: МЧ и экзосомы. Экзосомы представляют собой

крошечные (40-100 нм) мембранные пузырьки, которые образуются путем внутриклеточных преобразований инвагинированных участков плазматической мембраны (эндосом) и секретируются во внешнюю среду.

МЧ (или эктосомы) обладают большим (100-1000 нм) размером и представляют собой везикулы, которые образуются путем отщепления от мембран родительских клеток при их активации или повреждении и несут на своей поверхности белки, соответствующие родительским клеткам. В кровоток могут попадать МЧ, образуемые различными клетками: форменными элементами крови, включая гранулоциты, моноциты, стареющие эритроциты и активированные тромбоциты, эндотелиальными клетками и клетками опухолей. Основная функция внеклеточных везикул (как экзосом, так и МЧ) заключается в переносе ими биологически активных молекул (белков, нуклеиновых кислот и липидов от родительской к другим клеткам организма [52].

Повышение уровня внутриклеточного кальция при активации и апоптозе клеток приводит к кальций-зависимому протеолизу цитоскелета и ингибированию фермента флиппазы. В результате разрушается цитоскелет, снижается прочность плазматической мембраны и происходит нарушение асимметричности фосфолипидного состава, возникающего из-за быстрого выхода ФС и пониженного обратного транспорта сфингомиелина и фосфатидилхолина. Это вызывает локальную нестабильность мембраны и высвобождение МЧ [55]. Прокоагулянтные свойства МЧ обусловлены наличием на их поверхности ФС, с которым связываются компоненты коагуляционных комплексов, и у некоторых из них - тканевого фактора. Тканевой фактор был обнаружен в МЧ, происходящих из моноцитов и эндотелиальных клеток, но не из тромбоцитов [36]. Известно, что МЧ, содержащие тканевой фактор, обладают более сильными прокоагулянтными свойствами [36][56]. Таким образом, МЧ могут не только переносить информацию от родительской клетки к другим клеткам, но также способны ускорять свертывание крови [52][53].

2.4.2. Коагуляционная активность тромбоцитарных микрочастиц

Наибольшее число МЧ в крови имеют тромбоцитарное происхождение [52]. Тромбоцитарные МЧ образуются при активации тромбоцитов классическими агонистами (например, тромбин, TRAP, коллаген), в условиях напряжения сдвига и при апоптозе [54][59][60]. Они не содержат ТФ, поэтому их коагуляционная активность определяется наличием на их поверхности ФС и способностью активировать фактор свертывания XII (то есть контактный путь свертывания). Благодаря наличию ФС на поверхности тромбоцитарных МЧ [58] они способны усиливать генерацию тромбина [32]. и образования фибрина [36][56]. что указывает на их участие в развитии коагуляционного процесса. Таким образом, при активации тромбоцитов для факторов свертывания доступна фосфолипидная поверхность не только самих тромбоцитов, но и их мембранных МЧ, также обладающих прокоагулянтной активностью.

Эти особенности тромбоцитарных МЧ обуславливают их возможную роль в коагуляционных процессах, артериальном и венозном тромбообразовании и в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Хорошо известно, что количество циркулирующих тромбоцитарных МЧ увеличивается при заболеваниях, связанных с риском развития тромбоза [35][57]. В большинстве таких случаев это связано с внутрисосудистой активацией тромбоцитов.

Тромбоцитарные МЧ (как и другие виды МЧ) выявляют с помощью проточной цитометрии. Для этого используют антитела к специфическим маркерам поверхности тромбоцитов – CD42b, CD41, а также маркеры ФС – лактадгерина и аннексин V [52].

Несмотря на большое количество работ по исследованию МЧ тромбоцитов, ряд вопросов остается неизученными. В частности, неизвестно отличаются ли МЧ тромбоцитов, образующиеся при их активации различными агонистами, в том числе с точки зрения их коагуляционной

активности (способность ускорять коагуляционные реакции и экспонировать ФС).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Реактивы

В данной работе использовались следующие реактивы:

Для приготовления суспензии отмытых тромбоцитов: BSA (бычий сывороточный альбумин, bovine serum albumin, Диа-М, Россия), апираза из картофеля (Sigma-Aldrich, Германия), ПГЕ1 (Sigma-Aldrich, Германия).

Активаторы тромбоцитов: TRAP (пептид, активирующий рецептор тромбина (Thrombin Receptor Activating Peptide), любезно предоставленный М.В. Овчинниковым, НИМЦ Кардиологии им. ак. Е.И. Чазова, коллаген (Sysmex, Япония и Helena Biosciences, Великобритания), АДФ (AppliChem, Германия), арахидоновая кислота (Sysmex, Япония), ионофор A23187 (Thermo Fisher Scientific, США).

Ингибиторы тромбоцитов: тикагрелор (Sigma-Aldrich, Германия), аспирин (Sigma-Aldrich, Германия), руциромаб (Монафрам®), F(ab)₂ фрагмент моноклонального антитела (моноАТ) CRC64 против ГП IIb-IIIa (ЗАО "ФРАМОН", Россия) [25], ПГЕ1 (Sigma-Aldrich, Германия).

Для исследования экспонирования ФС: аннексин V, конъюгированный с FITC (флуоресцеин изотиоцианат, fluorescein isothiocyanate), (аннексин V-FITC) ("Becton Dickinson, BD Biosciences", США), лактадгерин, конъюгированный с FITC (лактадгерин-FITC) (Haematologic Technologies, США), APC конъюгат мышиных антител против CD42b тромбоцитов человека (CD42b-APC, "Becton Dickinson, BD Pharmingen", США), PPACK (D-пентанил-L-пролил-L-аргинил хлорометилкетон) (Chinese peptide company, Китай).

Также в работе использовались: моноАТ VM16d против ГП Ib [23], ранее полученное и охарактеризованное в лаборатории клеточной адгезии НИМЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России; СТИ (corn trypsin inhibitor, ингибитор трипсина из кукурузы), любезно предоставленный д.б.н. Г.В. Шехватовой, Институт белка РАН, Пущино, Россия; иодоген (Pierce, США),

лактадгерин (Haematologic Technologies, США), Na^{125}I (АО «Радиевый институт им. В. Г. Хлопина», Россия).

Химические реактивы соответствовали квалификации х.ч. и о.с.ч.

3.2. Доноры и пациенты

Основным материалом исследования была венозная кровь здоровых доноров и пациентов.

3.2.1. Здоровые добровольцы и пациенты

В целом, в исследовании принимал участие 81 здоровый доброволец, не принимавший антикоагулянтные и антиагрегантные препараты в течение 10-12 дней до исследования. Из них 37 женщин (46%) и 44 мужчины (54%). Их возраст составлял от 25 до 70 лет.

В исследовании по изучению влияния антитромбоцитарных препаратов на экспонирование ФС на поверхности тромбоцитов в условиях *in vivo* (при приеме препаратов пациентами) принимали участие:

1) 35 здоровых добровольцев, не принимавших антикоагулянтные и антиагрегантные препараты в течение 10-12 дней до исследования.

2) 30 пациентов с ОКС, находившееся на стационарном лечении в НМИЦ Кардиологии им. ак. Е. И. Чазова Минздрава России и получавшие двойную антитромбоцитарную терапию: аспирин 100 мг в день, тикагрелор 90 мг 2 раза в день. Кровь у пациентов собирали через 5-6 дней после развития ОКС.

Включение здоровых добровольцев и пациентов проводилось с их информированного согласия и было одобрено Этическим комитетом НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России (протокол № 279 от 25 апреля 2022 г.).

Характеристики здоровых доноров и пациентов с ОКС, участвовавших в этом исследовании, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика здоровых доноров и пациентов с ОКС, включенных в исследования по изучению влияния антитромбоцитарных препаратов в условиях *in vivo* (прием пациентами) на экспонирование ФС.

	Здоровые доноры	Пациенты
Количество	35	30
Средний возраст	45,9±19,02	65,46 ±12,45
Пол, м/ж	18/17	29/9
Диагноз:	-	
Инфаркт миокарда	-	25
Нестабильная стенокардия	-	5
Чрескожное коронарное вмешательство	-	30

Различия по возрасту (непарный тест Стьюдента) и по соотношению мужчины/женщины (тест Хи квадрат) в группах здоровых доноров и пациентов не достоверны.

3.3. Забор крови

Забор крови проводился в НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России квалифицированным персоналом.

Забор крови у доноров и пациентов осуществляли из кубитальной вены, с предварительным накладыванием сдавливающего манжета. Для снижения риска активации тромбоцитов использовались иглы толщиной не менее 18 g.

Кровь собирали в коммерческие пластиковые пробирки S-Monovette (Sarstedt AG&Co., Германия) с напылением антикоагулянт цитратом натрия, соответствующим 3,2% или в пластиковые пробирки с раствором 3,8% цитрата натрия в соотношении кровь/антикоагулянт 9/1. Для получения суспензии отмытых тромбоцитов в качестве антикоагулянта использовался кислый цитрат-декстроза (КЦД, 85 мМ цитрат Na, 65 мМ лимонная кислота, 2% D-глюкоза) в соотношении кровь/антикоагулянт 6/1. Выбор

антикоагулянта КЦД обусловлен тем, что он предотвращает агрегацию тромбоцитов в плазме в процессе их отмывки [15][16].

Концентрацию тромбоцитов в цельной крови, в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) и в суспензии отмывтых тромбоцитов считали на гематологическом анализаторе Abacus Junior B (Diatron Ltd., Австрия) с обязательной стандартизацией метода, рекомендованной производителем.

3.4. Получение отмывтых тромбоцитов для теста рекальцификации, теста генерации тромбина и исследования фосфатидилсерина

ОТП получали из крови, взятой в КЦД. Кровь центрифугировали в бакет-роторах при 200 g, 10 мин при комнатной температуре, в режиме «остановка без торможения». Собирали 4/5 ОТП, не затрагивая нижние слои, граничащие с верхней поверхностью осадка, для более полного отделения от эритроцитов и лейкоцитов. Центрифугированием ОТП при 1500 g, 15 мин получали осадок тромбоцитов. Осадок ресуспендировали в растворе Тироде/цитрат (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,36 mM NaH_2PO_4 , 0,1% декстроза, 30 mM цитрат натрия, 1 mM MgCl_2 , pH 6,5), содержащим 0,35% BSA, 0,5 ед./мл апиразы и 20 нг/мл ПГЕ1. Проводили две последующие отмывки тромбоцитов в тех же условиях. После последней отмывки, тромбоциты ресуспендировали в растворе Тироде/HEPES (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,36 mM NaH_2PO_4 , 0,1% dextrose, 5 mM HEPES, pH 7,35) с 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 (Тироде/HEPES/Mg/Ca, 0,35% BSA) в требуемой концентрации.

3.5. Агрегация тромбоцитов

Агрегацию тромбоцитов использовали для контроля качества антитромбоцитарных препаратов (ингибиторов), используемых в работе. Исследование агрегации проводили в ОТП на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 (БИОЛА, Россия). ОТП получали из крови, антикоагулированной 3,8% цитратом натрия. Для этого кровь центрифугировали при 180 g, 10 мин и отбирали 4/5 плазмы, не затрагивая нижние слои. В стеклянные кюветы добавляли 300 мкл ОТП и помещали в

агрегометр. К ОТП не добавляли ингибиторы (контроль) или добавляли 0,2 мМ аспирина, 1 мкМ тикагрелора, 1 мкг/мл ПГЕ1 или 20 мкг/мл руциромаба и инкубировали 5 мин при температуре 37°C. При проверке действия аспирина агрегацию стимулировали 0,2 мМ арахидоновой кислоты, при проверке действия тикагрелора – 20 мкМ АДФ, при проверке действия ПГЕ1 и руциромаба – 20 мкМ TRAP. Образование агрегатов тромбоцитов и ингибирование агрегации оценивали по изменению оптической плотности при температуре 37°C и при постоянном перемешивании в течение 5 мин. Полученные кривые изображены на рисунке 1. Все активаторы стимулировали необратимую агрегацию тромбоцитов. Все антитромбоцитарные препараты эффективно ингибировали агрегацию тромбоцитов, стимулированную соответствующими агонистами. Аспирин ингибировал на 100% агрегацию, индуцированную арахидоновой кислотой, тикагрелор ингибировал приблизительно на 70% агрегацию, индуцированную АДФ, а руциромаб и ПГЕ1 ингибировали на 100% агрегацию, индуцированную TRAP.

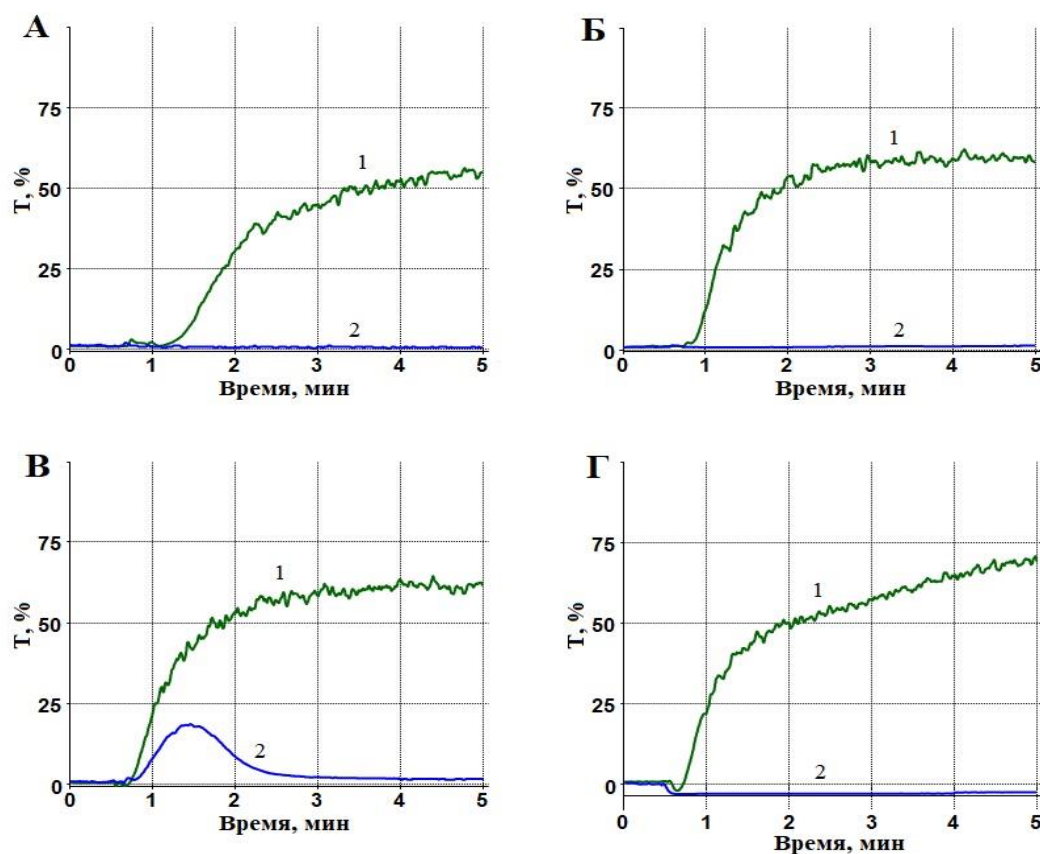


Рисунок 1. Ингибирование агрегации антитромбоцитарными препаратами. К ОТП (А) не добавляли (1) или добавляли 0,2 мМ аспирин, а затем стимулировали агрегацию 1,0 мМ арахидоновой кислотой; (Б) не добавляли (1) или добавляли (2) 1 мкМ тикагрелор, а затем стимулировали агрегацию 20 мкМ АДФ; (В) не добавляли (1) или добавляли (2) 1 мкг/мл ПГЕ1, а затем стимулировали агрегацию 20 мкМ TRAP; (Г) не добавляли (1) или добавляли (2) 20 мкг/мл руциромаб, а затем стимулировали агрегацию 20 мкМ TRAP.

3.6. Модифицированный тест рекальцификации плазмы

Модифицированный тест рекальцификации плазмы использовали для изучения действия тромбоцитов на образование фибрина (свертывание плазмы)

3.6.1. Получение субстратной плазмы

Субстратную плазму готовили из крови, антикоагулированной 3,8% цитратом натрия. Кровь от 3-4 доноров центрифугировали 10 мин при 180 g для получения ОТП. Затем ОТП центрифугировали 90 мин при 20000 g при температуре 4°C (для осаждения обломков клеток и МЧ) и собирали 4/5 плазмы, не затрагивая осадок. Плазму хранили в аликвотах при температуре -70°C.

3.6.2. Проведение модифицированного теста рекальцификации плазмы

Для проведения модифицированного теста рекальцификации плазмы тромбоциты выделяли из цельной крови и готовили суспензию отмытых тромбоцитов, как описано в пунктах 3.3. и 3.4. Активацию тромбоцитов проводили в микроцентрифужных пробирках (Ахуген, США). К 100 мкл суспензии отмытых тромбоцитов ($0,5 \times 10^8$ /мл) не добавляли или добавляли активаторы: 20 мкМ TRAP, 20 мкМ АДФ, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена, 10 мкМ A23187. Для исследования действия антитромбоцитарных препаратов к тромбоцитам вначале добавляли 1 мкМ тикагрелора, 0,2 мМ аспирина, 20 мкг/мл руциромаба, 1 мкг/мл ПГЕ1, а также сочетание 0,2 мМ аспирина + 1 мкМ тикагрелора. Эти пробы затем не

активировали или активировали 10 мкг/мл коллагена (Sysmex, Япония). Все пробы инкубировали после добавления ингибиторов, а затем активаторов в течение 5 мин при комнатной температуре. Пробы переносили в 96-луночный планшет для культивирования клеток (EIA plate, Costar, Cambridge MA) с плоским дном, и затем центрифугировали в специальном бакет-ротаторе при 1500 g в течение 5 мин при комнатной температуре с целью осаждения клеток на дно лунок. Супернатант аккуратно сливали. В лунки добавляли 50 мкл раствора буфера Тироде/HEPES без Ca^{2+} и Mg^{2+} , содержащего 150 мкг/мл СТИ (с целью частичного ингибирования контактной активации тромбоцитов) и 50 мкл субстратной плазмы, получение которой описано в пункте 3.7.1. В экспериментах по оценке влияния ФС на реакции свертывания в субстратную плазму добавляли 150 нМ лактадгерина. Образцы инкубировали в шейкер-термостате при 250 оборотах / мин, в течение 5 мин при температуре 25°C. Затем вносили по 50 мкл 0,025 М раствор хлорида кальция. Планшет помещали в спектрофотометр Thermo Scientific Multiscan Go (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Время образования фибрина в плазме оценивалось по изменению светопропускания каждые 30 секунд в течение 1 часа при длине волны 450 нм (A450) и температуре 25°C. Оценивались следующие параметры: лаг-фаза, мин (время достижения 5% от подъема A450) и максимальная скорость реакции $V_{\text{макс}}$, %A450/мин (максимальное увеличение A450 в мин, в процентах от общего повышения A450 в течение часа измерения). Измерения в каждой пробе проводили в трех повторах и использовали средние значения для последующего анализа

В предварительных опытах было показано, что этиловый спирт, в котором были растворены тикагрелор и ПГЕ1 в соответствующих количествах не влиял на параметры свертывания плазмы в тесте рекальцификации.

3.7. Тест генерации тромбина

Исследование генерации тромбина проводили с использованием стандартного коммерческого теста (тест генерации тромбина, ТГТ). Для

проведения ТГТ в присутствии тромбоцитов использовали отмытые тромбоциты (выделение описано в пунктах 3.3., 3.4.), которые инкубировали с активаторами и ингибиторами и осаждали в лунки 96-луночного планшета так же, как для проведения теста рекальцификации.

Исследование генерации тромбина проводили на флуориметре Fluoroscan Ascent plate fluorimeter (ThermoLab Systems, Финляндия) с использованием реактивов Diagnostica Stago (Франция) в соответствии с рекомендациями производителя. Ко всем пробам в лунки планшета добавляли 80 мкл субстратной плазмы и 20 мкл активирующего реагента («PRP reagent», тканевой фактор с минимумом содержания фосфолипидов). Планшет инкубировали в флуориметре в течение 10 мин и затем запускали реакцию добавлением 20 мкл флуо-буфера («Fluo-Buffer», флуорогенный субстрат и CaCl_2). Конечная концентрация тканевого фактора составила 0,5 нМ. Для контроля флуоресцентного сигнала использовали 750 нМ комплекса тромбин- $\alpha 2$ -макрोगлобулин. В качестве отрицательного контроля использовалась проба субстратной плазмы без тромбоцитов. Образование тромбина регистрировали при 37°C в течение 1 часа. Результаты ТГТ анализировали, используя программу Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Голландия). Оценивались следующие параметры: лаг-фаза, мин (время до начала подъема кривой генерации тромбина); величина пика, нМ (максимальная концентрация тромбина); время достижения пика, мин; максимальная скорость реакции, нМ/мин и эндогенный тромбиновый потенциал, нМ x мин (площадь под кривой).

В предварительных опытах было показано, что этиловый спирт, в котором были растворены тикагрелор и ПГЕ1 в соответствующих количествах не влиял на параметры генерации тромбина.

3.8. Подбор условий иммобилизации тромбоцитов для теста рекальцификации и теста генерации тромбина

3.8.1. Оценка иммобилизации тромбоцитов с помощью световой микроскопии

Суспензию отмытых тромбоцитов, получение которой описано в главе 3.4, готовили в различных концентрациях: 2×10^8 , 1×10^8 , $0,5 \times 10^8$ и $0,25 \times 10^8$ в 1мл и затем добавляли по 100 мкл в 96-луночный планшет для культивирования клеток. Далее тромбоциты осаждали на дно лунок в бакет-ротаторе при 1500 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Иммобилизацию тромбоцитов оценивали в световом микроскопе (Nikon, Япония) при 20- и/или 40-кратном увеличении

3.8.2. Оценка иммобилизации радиоактивно меченых тромбоцитов

Для количественной оценки иммобилизации тромбоцитов их предварительно метили радиоизотопной меткой (^{125}I -меченных моноАТ против ГП Ib).

3.8.2.1 Мечение антител с помощью ^{125}I

Моноклональное антитело VM16d, направленное против ГП Ib, метили иодом-125 с помощью иодогена, как описано ранее [33]. Антитела (0,5 мг) и Na^{125}I (0,5 мКи) помещали в стеклянную пробирку, покрытую иодогеном и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Затем свободный Na^{125}I удаляли методом гель-фильтрации на колонках PD-10, заполненных Сефадексом G-25M и уравновешенных фосфатно-солевым буфером. Все манипуляции проводили в вытяжном шкафу. Концентрацию меченных антител оценивали по поглощению при 280 нм используя коэффициент экстинкции 1,4 $A_{280} / 1 \text{ мг антител}$.

3.8.2.2 Связывание антител с тромбоцитами

Тромбоциты выделяли из цельной крови и готовили суспензию отмытых тромбоцитов, как описано в пунктах 3.3. и 3.4., однако после первой отмывки суспензию инкубировали с моноАТ VM16d, мечеными I^{125} .

Инкубация проводилась 20 мин при 37°C, затем после однократной отмывки в растворе Тироде/цитрат/Mg тромбоциты ресуспендировали в растворе Тироде/HEPES/Ca/Mg, 0,35% BSA в концентрации $0,5 \times 10^8$ /мл.

3.8.2.3 Количественная оценка иммобилизации радиоактивно меченых тромбоцитов

После добавления активаторов тромбоциты осаждали в лунки 96-луночных планшета, как описано в пункте 3.7.2, и тщательно отбирали супернатант. К осажденным тромбоцитам добавляли 100 мкл 2% раствора додецилсульфата натрия, инкубировали 5 мин при комнатной температуре, отбирали содержимое и определяли радиоактивность. В отдельных пробах определяли радиоактивность добавляемых в лунки тромбоцитов (после предварительного осаждения), которую принимали за 100%.

Радиоактивность измеряли в автоматическом гамма-счетчике CliniGamma - 1272 (LKB Wallac, Финляндия).

3.9. Определение экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии

Появление (экспонирование) ФС на поверхности активированных тромбоцитов измеряли с помощью проточной цитометрии, используя в качестве маркера аннексин V-FITC. Все растворы для проточной цитометрии фильтровали через фильтр 0,2 мкм перед экспериментом.

3.9.1. Подготовка проб для исследования уровня экспонирования фосфатидилсерина на поверхности отмытых тромбоцитов

Отмытые тромбоциты, получение которых описывалось в пункте 3.4., вносили в микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл по 100 мкл в концентрации

$0,5 \times 10^8$ /мл, а затем активировали различными индукторами, как описано в пункте 3.6. При исследовании влияния антитромбоцитарных препаратов к тромбоцитам после их добавления и инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре (как описано в п. 3.6) добавляли 10 ед/мл тромбин или сочетание 10 ед/мл тромбин + 10 мкг/мл коллаген. Далее инкубировали 15 мин при 37°C. По 50 мкл суспензии тромбоцитов вносили в пробирки для проточной флуорометрии, содержащие 3 мкл аннексина V-FITC и 3 мкл антитела CD42b-APC. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре в темноте. После инкубации в каждую пробирку добавляли 250 мкл раствора Тироде/HEPES/Mg/Ca, 0,35% BSA. В качестве контролей использовали образцы суспензии неокрашенных (без добавления аннексина V-FITC) и не активированных тромбоцитов.

3.9.2. Подготовка проб для исследования уровня экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов в цельной крови

Различия в экспонировании уровня ФС тромбоцитами здоровых доноров и пациентов, принимающих антитромбоцитарные препараты, оценивали в цельной крови. Для этого кровь получали, как описано в пункте 3.3, используя в качестве антикоагулянта цитрат натрия 3,2%, и затем, для предотвращения свертывания крови, при последующем добавлении Ca^{2+} -содержащего буфера, необходимого для связывания аннексина V с ФС, в кровь добавляли РРАСК в конечной концентрации 100 мкМ. [17]

К крови добавляли буфер Тироде/HEPES/Mg/Ca, 0,35% BSA в соотношении кровь/буфер 1/20 и затем тромбоциты активировали 20 мкМ TRAP, 10 мкг/мл коллагена и сочетанием 20 мкМ TRAP + 10 мкг/мл коллаген. Пробы инкубировали в течение 15 мин при 37°C и затем готовили их для анализа экспонирования ФС, как описано для суспензии отмытых тромбоцитов (см. 3.10.1).

3.9.3. Анализ экспонирования фосфатидилсерина

Уровень экспонирования ФС на поверхности тромбоцитов оценивали по окраске аннексином V-FITC в проточном цитометре FACS Canto II («Becton Dickinson», США). Тромбоциты выявляли («гейтировали») по окраске антитела к специфическому маркеру CD42b, меченным APC. Выделение тромбоцитов, не экспонирующих ФС (ФС-), экспонирующих ФС (ФС+) и субпопуляции тромбоцитов с очень высоким уровнем экспонирования ФС (ФС++) описано в разделе «Результаты исследований». Сбор и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения CELLQuest® («Becton Dickinson, BD Biosciences»).

В предварительных опытах было показано, что этиловый спирт, в котором были растворены тикагрелор и ПГЕ1 в соответствующих количествах не влиял на экспонирование ФС на поверхности тромбоцитов.

3.10. Исследование прокоагулянтных свойств мембранных микрочастиц тромбоцитов

3.10.1. Получение микрочастиц

Мембранные МЧ получали из супернатанта активированных отмытых тромбоцитов. Отмытые тромбоциты получали, как описано в пункте 3.4. К суспензии отмытых тромбоцитов в концентрации $2,5 \times 10^8$ /мл добавляли активаторы: TRAP, коллаген, АДФ, арахидоновую кислоту, ионофор A23187, как описано в пункте 3.6., и интенсивно перемешивали в шейкер-термостате при 400 оборотах / мин и температуре 37°C в течение 15 мин. Затем пробы центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин, отбирали супернатант, не затрагивая осадок, и затем повторно центрифугировали 15 мин при 2500 g. Далее для осаждения МЧ пробы центрифугировали при 20000 g, 30 мин, аккуратно сливали супернатант. Для исследования коагуляционных свойств МЧ в модифицированном тесте рекальцификации их ресуспендировали в 200 мкл субстратной плазмы, получение которой описано в пункте 3.7.1. Для последующего подсчета МЧ, их осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера

HEPES/NaCl/BSA (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1% BSA, pH 7,4), профильтрованном через фильтр 0,2 мкм и замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C.

3.10.2. Тест рекальцификации плазмы

Определение коагуляционной активности МЧ проводили, сразу после получения МЧ, как было описано ранее [30]. Субстратную плазму, не содержащую или содержащую МЧ, смешивали с 50 мкл буфера Оуэна-Коллера (Diagnostica Stago, Франция), содержащего 150 мкг/мл СТІ. Пробы переносили в 96-луночный планшет для культивирования клеток и инкубировали в шейкер-термостате в течение 5 мин при 25°C и 250 оборотах / мин, запускали свертывание плазмы добавлением 50 мкл 0,025 М раствора CaCl_2 и сразу помещали планшет в спектрофотометр Thermo Scientific Multiscan Go (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Отрицательным контролем служила субстратная плазма без МЧ. Образование фибрина в плазме оценивалось по изменению светопропускания каждые 30 секунд в течение 1 часа, при длине волны 450 нм (A450), при температуре 25°C. Оценивались следующие параметры: лаг-фаза, мин (время достижения 5% от подъема A450) и максимальная скорость реакции $V_{\text{макс}}$, %A450/мин (максимальное увеличение A450 в минуту, в процентах от общего повышения A450 в течение часа измерения).

3.10.3. Подсчет количества микрочастиц

После размораживания МЧ их подсчет осуществляли с помощью проточной цитофлуориметрии в проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson, США), добавляя 2,5 мкл лактадгерина-FITC (Haematologic Technologies, Inc., США) в качестве маркера ФС. Подсчет МЧ производился в области частиц положительных по ФС и размером менее 1 мкм. Для определения уровня экспонирования ФС оценивали медиану флуоресценции по FITC.

3.11. Статистический анализ полученных данных

Статистический анализ был выполнен с помощью программного пакета MedCalc (MedCalc Software, Бельгия) и/или программы Microsoft Excel (Microsoft, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. В связи с тем, что большинство переменных имели нормальное распределение для их анализа использовали параметрическую статистику. Данные представлены как средние $\pm$ стандартные отклонения. Для сравнения групп использовали t-критерий Стьюдента, непарный для независимых и парный для зависимых переменных. Критерий Хи квадрат использовали для сравнения качественных переменных. Для анализа корреляций использовали корреляционный тест Спирмена.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Разработка модифицированного теста рекальцификации плазмы для оценки прокоагулянтных свойств тромбоцитов

Исследования прокоагулянтных свойств тромбоцитов в тесте рекальцификации плазмы и в ТГТ проводили, используя тромбоциты не в суспензии, а предварительно осажденные на поверхность пластика в 96-луночных планшетах. Имобилизованные тромбоциты использовали для того, чтобы исключить возможное влияние их неконтролируемой агрегации на результаты коагуляционных тестов, а также влияние тромбоцитарных МЧ (удаляемых с супернатантом), которые способны ускорять свертывание плазмы [30] и генерацию тромбина [32]. Подбор условий иммобилизации тромбоцитов проводили при разработке модифицированного теста рекальцификации плазмы, предназначенного для регистрации образования фибрина (свертывания плазмы). Ранее тест рекальцификации был использован для исследования коагуляционных свойств МЧ [30] (см. также раздел 4.4), а в настоящей работе он был модифицирован для оценки коагуляционных свойств тромбоцитов.

4.1.1. Подбор условий проведения модифицированного теста рекальцификации плазмы

На первом этапе мы подбирали концентрацию отмытых от плазмы тромбоцитов для их иммобилизации в лунках микропланшета (использовались концентрации $0,25 \times 10^8$ /мл, $0,5 \times 10^8$ /мл, 1×10^8 /мл и $2,5 \times 10^8$ /мл). Оказалось, что при концентрации тромбоцитов $0,5 \times 10^8$ /мл при добавлении 100 мкл суспензии в лунку ($0,5 \times 10^7$ тромбоцитов на лунку), после их осаждения на пластике образовывался монослой тромбоцитов без агрегатов и покрывающий большую часть поверхности (рисунок. 2).

Проверка применяемых условий центрифугирования (1500 g, 5 мин) с использованием радиоактивно меченных тромбоцитов показала, что на дно

лунок осаждается более 95% тромбоцитов из суспензии вне зависимости от условий их активации (таблица 2).

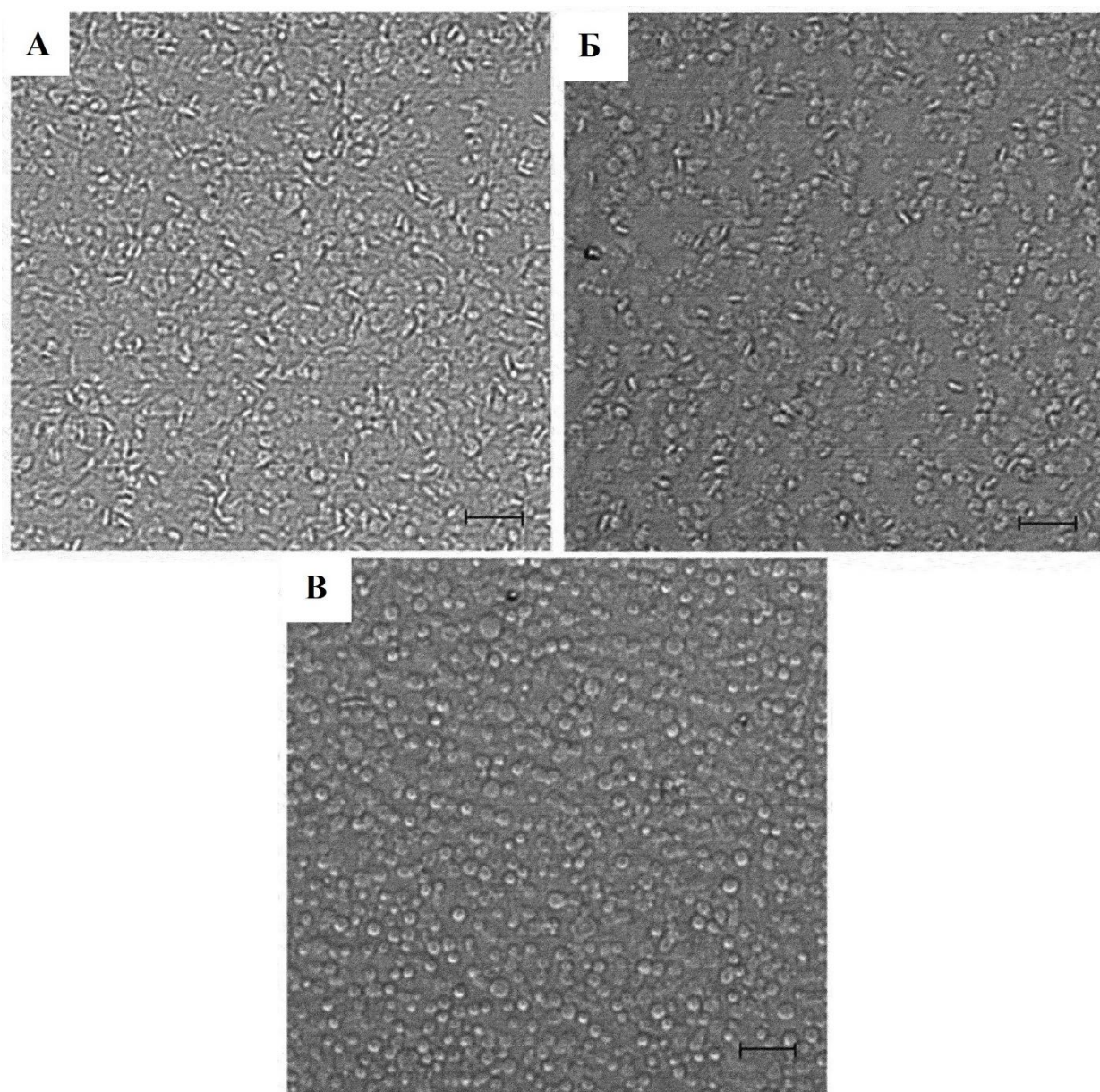


Рисунок. 2. Тромбоциты, иммобилизованные на поверхности 96-луночного планшета. Отмытые тромбоциты в концентрации $0.5 \times 10^8/\text{мл}$ не активировали (А) или активировали 0,2 мМ арахидоновой кислоты (Б) и 10 мкМ ионофора А23187 (В), инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре и осаждали центрифугированием при 1500g в течение 5 мин. Супернатант отбирали и фиксировали образцы 2% параформальдегидом. Анализ проводили на фазово-контрастном микроскопе. Шкала - 10 мкм. Тромбоциты образуют монослой без агрегатов. При активации ионофором А23187 тромбоциты приобретает ошаренную форму.

Таблица 2. Иммобилизация тромбоцитов на поверхности 96-луночного планшета.

	Имп/мин, среднее	Тромбоциты, %, среднее
Осадок тромбоцитов из 100 мкл суспензии	109875	100
Иммобилизованные тромбоциты из 100 мкл суспензии		
Без агонистов	108193	98,4
TRAP, 20 мкМ	106972	97,3
АДФ, 20 мкМ	104820	95,4
Арахидоновая кислота, 0,2 мМ	107568	97,9
Коллаген, 10 мкг/мл	103832	94,5
A23187, 10 мкМ	100900	91,8

Отмытые тромбоциты метили моноАТ против ГП Ib, меченым ^{125}I , как описано в главе «Материалы и Методы», а затем готовили суспензию отмытых тромбоцитов в растворе Тироде/HEPES/Ca/Mg с 0.35% BSA в концентрации $0,5 \times 10^8$ /мл. Тромбоциты не активировали («Без агонистов») или активировали 20 мкМ TRAP, 20 мкМ АДФ, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена и 10 мкМ ионофора A23187, добавляли по 100 мкл суспензии тромбоцитов в лунки 96-луночного планшета, осаждали на дно и измеряли радиоактивность, как описано в главе «Материалы и методы». За 100% принимали радиоактивность осадка тромбоцитов, полученного после центрифугирования 100 мкл суспензии при 10000 g в течение 5 мин. Представлены средние из двух экспериментов, выполненные в трех повторях для каждой пробы.

В предварительных опытах мы также продемонстрировали, что осажденные на пластик тромбоциты более эффективно ускоряют свертывание плазмы в тесте рекальцификации, в сравнении с тем же количеством тромбоцитов в суспензии (рисунок. 3). Мы предполагаем, что это может быть обусловлено возможным образованием агрегатов в суспензии и снижением доступности коагуляционно активного ФС на их поверхности.

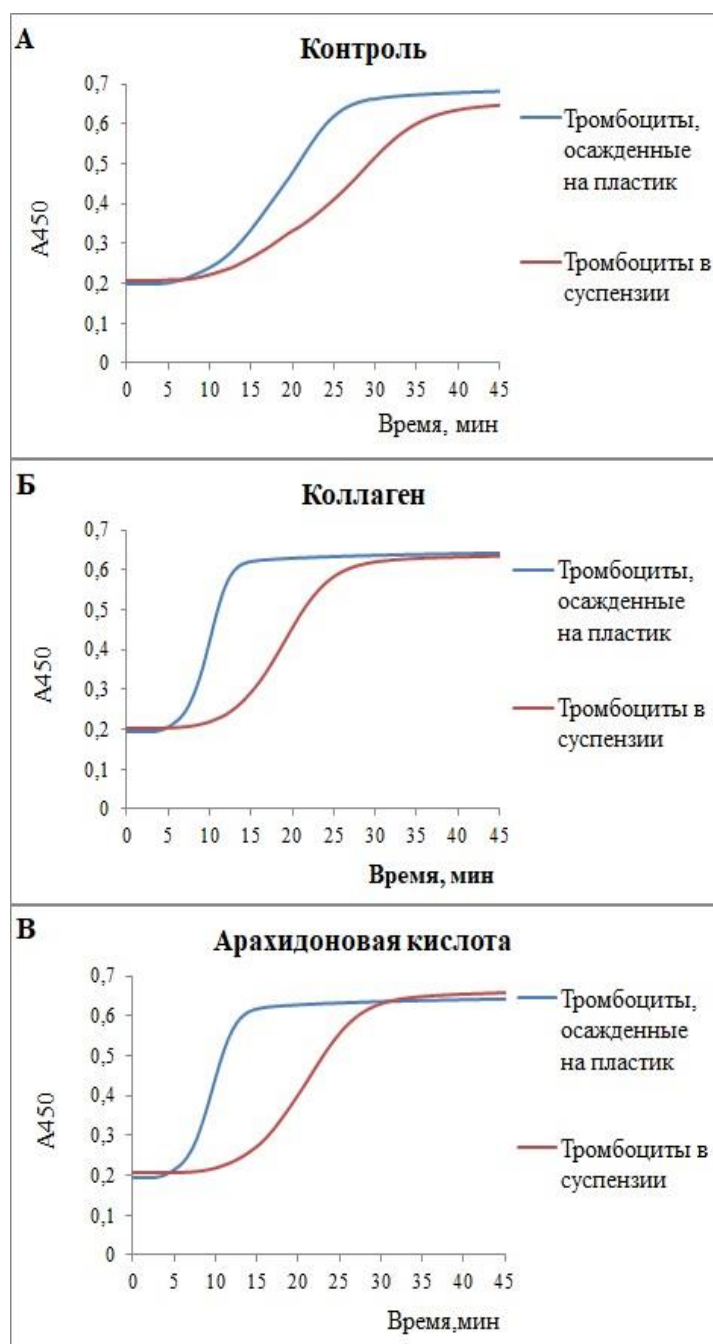


Рисунок 3. Сравнение эффектов тромбоцитов, осажденных на пластик и тромбоцитов в суспензии на образование фибрина в модифицированном тесте рекальцификации. К 100 мкл суспензии отмытых тромбоцитов в концентрации $0,5 \times 10^8$ /мл не добавляли (**А**) или добавляли 10 мг/мл коллагена (**Б**) и 0,2 мМ арахидоновой кислоты (**В**). Пробы инкубировали в течение 5 мин при 25°C и затем вносили в лунки планшета. Пробы центрифугировали 5 мин при 1500g и затем удаляли супернатант, который замещали раствором Тироде/HEPES без Ca/Mg (кривые синего цвета, тромбоциты, осажденные на пластик) или не центрифугировали (кривые красного цвета, тромбоциты в суспензии) и измеряли свертывание плазмы после ее рекальцификации, как описано в разделе «Материалы и методы».

Схема проведения разработанного модифицированного теста рекальцификации плазмы с использованием иммобилизованных тромбоцитов представлена на рисунке 4. (см. также раздел «Материалы и методы»).

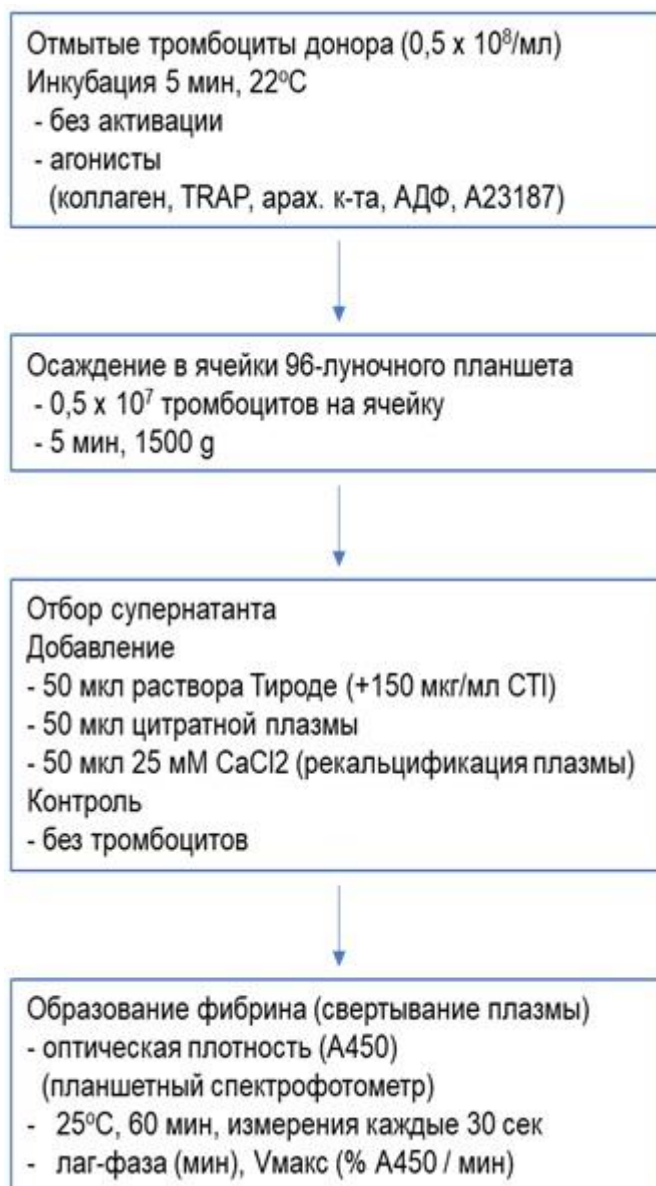


Рисунок 4. Схема проведения модифицированного теста рекальцификации плазмы. (см. также раздел «Материалы и методы»)

4.2. Влияние различных агонистов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов

4.2.1. Влияние различных агонистов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина

На данном этапе мы оценили влияние тромбоцитов при разных способах их активации на скорость образования фибрина в плазме крови. Тромбоциты не активировали или активировали в суспензии различными индукторами. В качестве активаторов тромбоцитов применяли TRAP, связывающийся с PAR-1 рецептором тромбина, коллаген, действующий на GPIIb/IIIa, АДФ, активирующий рецептор P2Y₁₂ и арахидоновую кислоту, предшественник ТХА₂. В качестве положительного контроля использовали ионофор A23187, напрямую увеличивающий уровень внутриклеточного кальция. После активации тромбоциты осаждали на дно ячеек 96-луночного планшета, к ним добавляли субстратную плазму и запускали реакцию добавлением CaCl₂. В ходе опытов были получены воспроизводимые кривые свертывания плазмы, представленные на рис. 5. Статистические данные представлены в таблице 3.

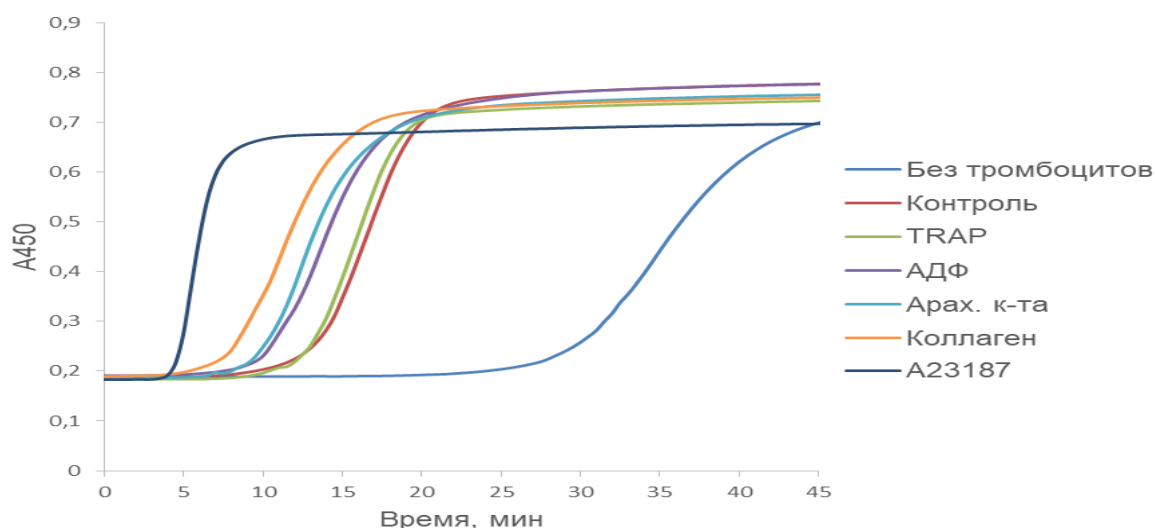


Рисунок 5. Образование фибрина в тесте рекальцификации плазмы. Эффекты тромбоцитов, активированных разными агонистами. Отмытые тромбоциты не активировали («Контроль»), или активировали 20 мкМ TRAP, 20 мкМ АДФ, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена, 10 мкМ ионофора A23187, осаждали на дно лунок, добавляли субстратную плазму. Свертывание запускали добавлением CaCl₂. Отрицательным контролем для всех проб

служила проба без тромбоцитов. Представлены воспроизводимые кривые из ≥ 8 экспериментов.

Таблица 3. Активация тромбоцитов и образование фибрина в тесте рекальцификации плазмы.

	Лаг фаза, мин	V _{макс} , %A450 / мин
Без тромбоцитов (n = 26)	19,1 ± 3,1 p <0,001	5,7 ± 1,4 p <0,001
Контроль (n = 28)	10,9 ± 1,4	8,5 ± 3,6
TRAP, 20 мкМ (n = 18)	10,5 ± 2,3	8,6 ± 3,2
АДФ, 20 мкМ (n = 8)	7,6 ± 1,9 ⁺⁺⁺	8,2 ± 3,2
Арах. к-та, 0,2 мМ (n = 9)	7,1 ± 1,5 ⁺⁺⁺	11,9 ± 3,7 ⁺
Коллаген, 10 мкг/мл (n = 18)	7,2 ± 1,7 ⁺⁺⁺	12,4 ± 3,6 ⁺⁺
A23187, 10 мкМ (n = 23)	6,2 ± 1,1 ⁺⁺⁺	17,4 ± 5,8 ⁺⁺⁺

Отмытые тромбоциты не активировали («Контроль»), или активировали 20 мкМ TRAP, 20 мкМ АДФ, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена, 10 мкМ ионофора A23187, осаждали на дно лунок, добавляли субстратную плазму. Свертывание запускали добавлением CaCl₂. Отрицательным контролем служила проба без тромбоцитов. Представлены средние ± стандартные отклонения. p <0,001 – достоверность отличий проб без тромбоцитов от остальных проб; +p <0,05, ++p <0,01, +++p <0,001 – достоверность отличий от контроля (пробы без экзогенных активаторов).

Тромбоциты существенно ускоряли образование фибрина (свертывание плазмы) в тесте рекальцификации. Добавление тромбоцитов в лунки без предварительной активации экзогенными активаторами укорачивало лаг-фазу в 1,7 раза и в 1,6 раза повышало максимальную скорость свертывания плазмы по сравнению с пробами без тромбоцитов. Скорее всего в этом случае тромбоциты активировались эндогенным тромбином, образующимся в плазме

при ее рекальцификации и активации коагуляционных реакций. TRAP не влиял на свертывание плазмы, не меняя достоверно ни лаг-фазу, ни максимальную скорость реакции. Такие результаты можно объяснить присутствием эндогенного тромбина, который образуется в плазме, и с которым TRAP вступает в конкуренцию за PAR рецептор. АДФ лишь укорачивает лаг-фазу и не влияет на ее максимальную скорость. Добавление к тромбоцитам арахидоновой кислоты и коллагена приводит к более существенному ускорению свертывания. И максимальное ускорение происходит при добавлении ионофора A23187, в этом случае лаг-фаза уменьшалась на 43%, а максимальная скорость увеличивалась на 104% по сравнению с пробами без экзогенных активаторов.

4.2.2. Влияние различных агонистов на способность тромбоцитов ускорять образование тромбина

Для оценки способности тромбоцитов ускорять образование тромбина был использован коммерческий тест его генерации с применением флуорогенного субстрата.

Для ТГТ тромбоциты были подготовлены таким же образом, как и для теста рекальцификации, то есть тромбоциты были не активированы или активированы различными агонистами и осаждены на дно планшета. К тромбоцитам добавляли субстратную плазму и запускали реакцию добавлением тканевого фактора в низких концентрациях (0,5 пМ) и избытком ионов кальция. Фосфолипиды специально не добавляли, т. к. их источником были активированные тромбоциты. Так же, как и в случае теста рекальцификации, тромбоциты активировались не только различными экзогенными агонистами, но и образующимся в плазме тромбином. Мы оценивали следующие параметры – лаг-фазу, максимальную скорость реакции, а также величину пика и эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП) (площадь под кривой). Типичные кривые ТГТ, демонстрирующие эффекты тромбоцитов, представлены на рисунке 6. Статистические данные ТГТ

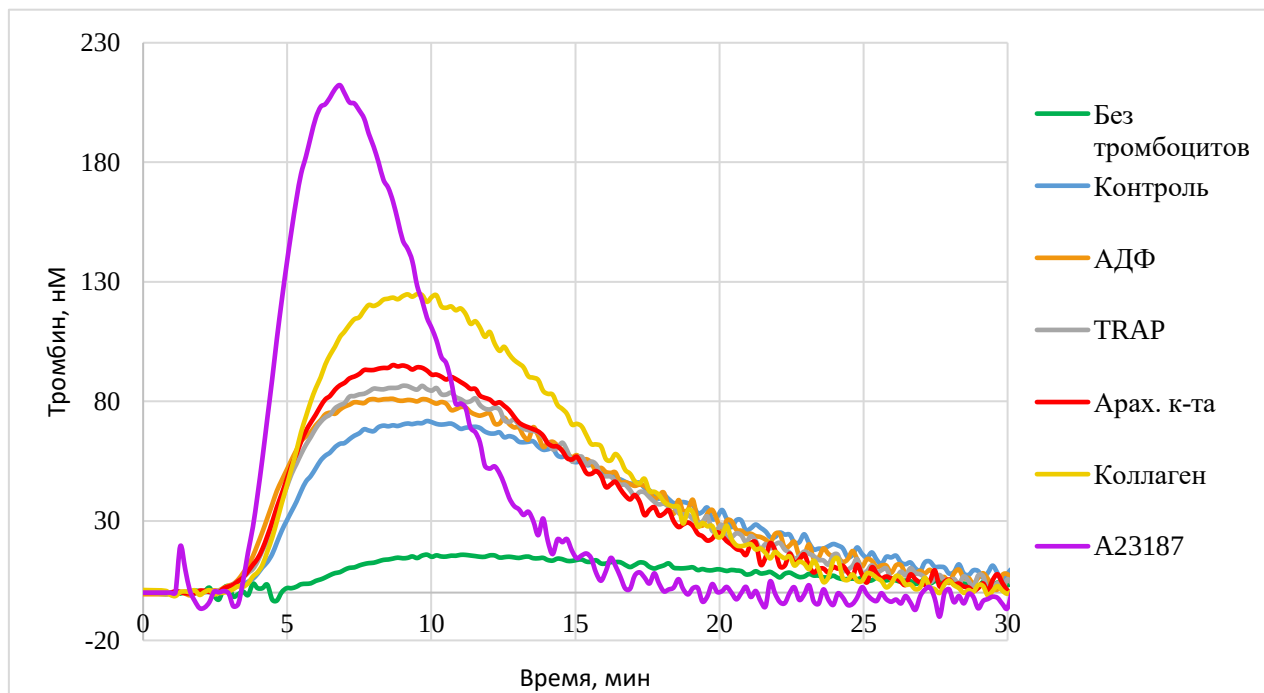


Рисунок 6. Эффекты тромбоцитов, активированных разными агонистами на генерацию тромбина. Отмытые тромбоциты не активировали («Контроль»), или активировали 20 мкМ АДФ, 20 мкМ TRAP, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена и 10 мкМ ионофора A23187. После осаждения на дно лунок к тромбоцитам добавляли субстратную плазму и запускали реакцию с помощью тканевого фактора и Ca^{2+} . Присутствует также проба без тромбоцитов в качестве отрицательного контроля ко всем остальным пробам. Представлены воспроизводимые кривые из ≥ 7 экспериментов.

Таблица 4. Активация тромбоцитов и образование тромбина.

	Лат-фаза, мин	ЭТП, нМ х мин	Пик, нМ	Vмакс нМ / мин
Без тромбоцитов (n=8)	4,5 ± 0,5	281 ±45 p <0,001	18 ±3 p <0,001	3,8 ± 0,7 p < 0,001
Контроль (n=8)	3,9 ± 0,4	1222 ±158	76 ± 12	13,0 ± 2,9
АДФ 20 мкМ (n=8)	3,9 ± 0,3	1180 ±101	82 ± 15	15,1 ± 3,5
TRAP 20 мкМ (n=7)	3,9 ± 0,3	1249 ± 211	97 ± 15 ⁺⁺	18,9 ± 3,5 ⁺
Арахидоновая кислота 0,2 мМ (n=7)	4,1 ± 0,4	1143 ±109	101 ± 12 ⁺	21,4 ± 2,7 ⁺⁺
Коллаген 10 мкг/мл (n=7)	4,0 ± 0,3	1263 ±175	131 ± 33 ⁺⁺	30,4 ± 12,0 ⁺
A23187 10 мкМ (n=8)	3,5 ± 0,3 ⁺⁺	1307 ± 204 ⁺	227 ± 44 ⁺⁺⁺	81,1 ± 24,0 ⁺⁺⁺

Отмытые тромбоциты не активировали («Контроль»), или активировали 20 мкМ АДФ, 20 мкМ TRAP, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена и 10 мкМ ионофора A23187. После осаждения на дно лунок к тромбоцитам добавляли субстратную плазму и запускали реакцию с помощью тканевого фактора с минимальным содержанием фосфолипидов и Ca²⁺. Присутствует проба без тромбоцитов в качестве отрицательного контроля ко всем остальным пробам. Представлены средние ± стандартные отклонения; p <0,001 – достоверность отличий проб без тромбоцитов от остальных проб; +p <0,05; ++p <0,01; +++p <0,001 – достоверность отличий от контроля (без экзогенных индукторов).

Наименьшее количество тромбина регистрировалось в пробе без тромбоцитов, а их присутствие даже без экзогенных активаторов значительно увеличивало генерацию тромбина и скорость его образования. Как и в тесте рекальцификации в ТГТ тромбоциты активировались за счет эндогенного тромбина, и по этой же причине добавление к тромбоцитам TRAP оказывало слабое стимулирующее действие. Менее эффективным был только АДФ, который достоверно не влиял на параметры генерации тромбина. Более значительное действие по сравнению с TRAP наблюдалось при преактивации тромбоцитов арахидоновой кислотой и коллагеном. Наибольшая скорость и

самый высокий пик наблюдались при добавлении ионофора A23187. Тромбоциты без и в присутствии активаторов, не укорачивали лаг-фазу генерации тромбина (небольшое укорочение наблюдалось лишь при добавлении A23187), которая скорее всего зависела от действия тканевого фактора. Действие на тромбоциты различных активаторов также не приводило к значительному изменению параметра ЭТП, площадь под кривой оставалась приблизительно одинаковой (опять же, небольшие изменения наблюдались только при действии A23187), то есть тромбин образовывался в одинаковых количествах, но с разной скоростью.

Сравнивая данные, полученные в тесте рекальцификации и ТГТ (см. таблицы 3 и 4), мы установили сильную обратную корреляционную зависимость между средними значениями лаг-фаз в тесте рекальцификации и пиком генерации ($r = -0,906$, $p = 0,005$) и скорости образования тромбина ($r = -0,814$, $p = 0,026$) в ТГТ. Также были установлены сильные прямые корреляционные зависимости между средними значениями максимальной скорости образования фибрина в тесте рекальцификации и пиком ($r = 0,982$, $p < 0,001$) и максимальной скоростью генерации тромбина ($r = 0,960$, $p = 0,001$) в ТГТ. Корреляционные кривые представлены на рис. 7. Как видно из приведенных графиков, при увеличении пика тромбина и скорости его образования в ТГТ в тесте рекальцификации лаг-фаза образования фибрина становится короче, а максимальная скорость выше. То есть, чем быстрее образуется тромбин в ТГТ, тем быстрее в этих же условиях начинается свертывание плазмы в тесте рекальцификации. Таким образом, видно соответствие этих двух тестов, в том числе с точки зрения взаимосвязи эффектов тромбоцитов на анализируемые реакции.

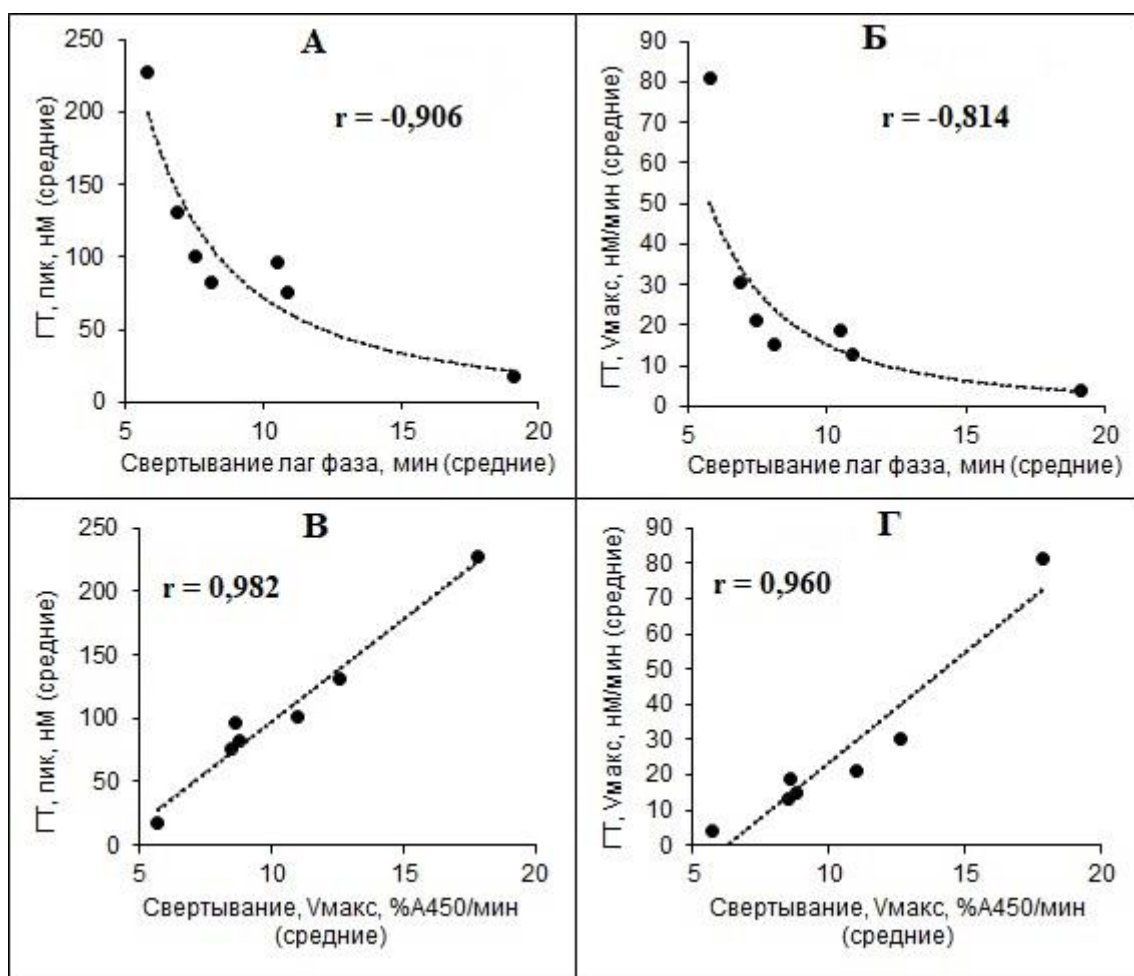


Рисунок 7. Корреляции между средними значениями полученных параметров теста рекальцификации и ТГТ в отсутствии и присутствии по-разному активированных тромбоцитов. Используются данные из таблиц 3 и 4.

(А) ТГ (генерация тромбина) пик против лаг-фазы в тесте рекальцификации, (Б) ТГ, Vмакс против лаг-фазы в тесте рекальцификации, (В) ТГ, пик против Vмакс в тесте рекальцификации, (Г) ТГ, Vмакс против Vмакс в тесте рекальцификации. Рисунки А, Б - точки слева направо: «A23187», «Коллаген», «Арахидоновая кислота», «АДФ», «TRAP», «Без экзогенных агонистов», «Без тромбоцитов». Рисунки В, Г – точки слева направо: «Без тромбоцитов», «Без экзогенных агонистов», «TRAP», «АДФ», «Арахидоновая кислота», «Коллаген», «A23187».

4.2.3. Влияние различных агонистов на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина

Появление (экспонирование) на поверхности активированных тромбоцитов ФС, субстрата для сборки коагуляционных комплексов, определяет их прокоагулянтную активность. Известно, что блокатор ФС,

лактадгерин блокирует тромбоцит-зависимое ускорение генерации тромбина [115]. В нашей работе мы продемонстрировали в пилотных экспериментах, что лактадгерин полностью подавляет образование фибрина в тесте рекальцификации (рис 8).

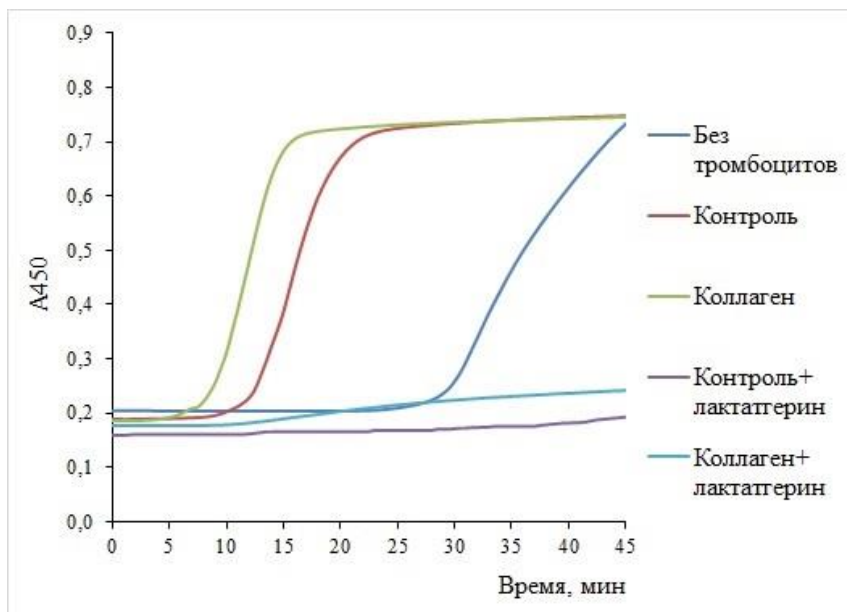


Рисунок 8. Эффекты лактадгерина на образование фибрина в модифицированном тесте рекальцификации плазмы. К отмытым тромбоцитам не добавляли (Контроль) или добавляли 10 мг/мл коллагена, осаждали на дно 96-луночного планшета. Присутствует проба без тромбоцитов в качестве отрицательного контроля. Модифицированный тест рекальцификации проводили, как описано в главе «Материалы и Методы» в отсутствие или в присутствии 50 нМ лактадгерина. Представлены результаты одного из 2-3 воспроизводимых экспериментов.

Мы оценили действие тех же активаторов тромбоцитов, что и в тесте рекальцификации и в ТГТ, на экспонирование ФС на поверхности тромбоцитов. Вместо эндогенного тромбина, образующегося в плазме при активации коагуляционных реакций в тестах рекальцификации и ТГТ в экспериментах по измерению ФС мы использовали экзогенный тромбин наряду с другими индукторами. Отмытые тромбоциты были не активированы или активированы различными индукторами и уровень экспонирования ФС оценивали по связыванию с его маркером – аннексином V- FITC с помощью проточной цитометрии. Тромбоциты разделяли на 3 фракции в зависимости от

уровня экспонирования ФС. Фракция тромбоцитов, не экспонирующая ФС, т.е. соответствующая контролю неокрашенных тромбоцитов (контроль без аннексина V) обозначалась как «ФС-». В эту область попадало >95% неактивированных тромбоцитов. Все остальные события при увеличении экспонирования ФС были отнесены к фракции ФС+. Внутри этой фракции выделялась группа с высоким уровнем экспонирования ФС – область ФС++. В эту область попадало более 90% тромбоцитов при их активации ионофором A23187. Распределение тромбоцитов по уровню экспонирования ФС изображено на рисунке 9 и 10.

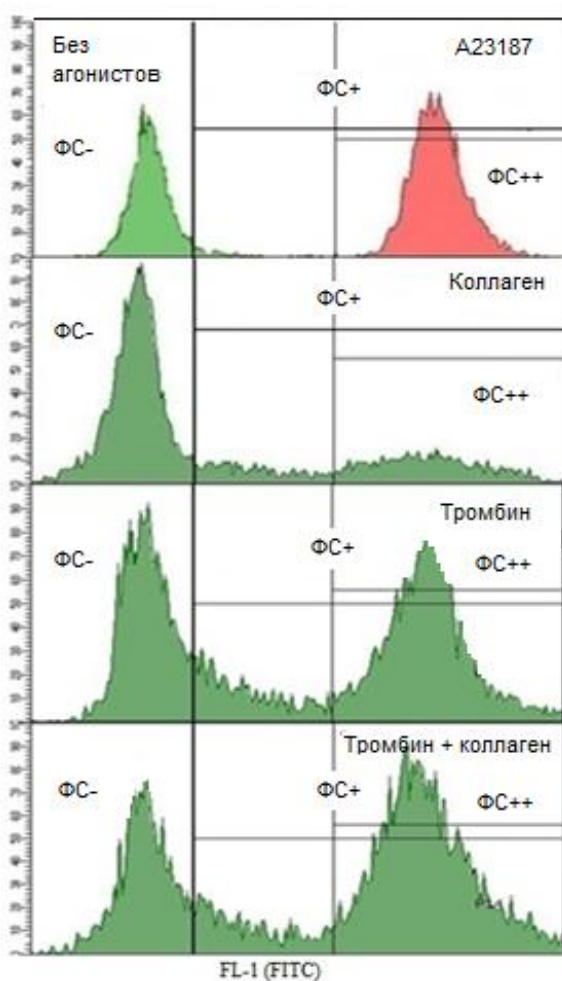


Рисунок 9. Фракции тромбоцитов в зависимости от экспонирования ФС. Проточная цитометрия, окраска аннексином V-FITC. К отмытым тромбоцитам не добавляли («Без агонистов») или добавляли 10 мкг/мл коллагена, 10 ед/мл тромбина, сочетание 10 мкг/мл коллагена + 10 мкМ тромбина и 10 мкМ ионофора A23187. «ФС-» - тромбоциты, не экспонирующие ФС (слева от вертикальной черты – 95% контрольной гистограммы без аннексина V-FITC

(не показано)). «ФС+» - все тромбоциты, экспонирующие ФС (справа от вертикальной черты - 95% контрольной гистограммы без аннексина V-FITC (не показано)). «ФС++» - тромбоциты с высоким уровнем экспонирования ФС (справа от второй вертикальной черты – 95% области «A23187»). Представлены воспроизводимые результаты из ≥ 9 экспериментов.

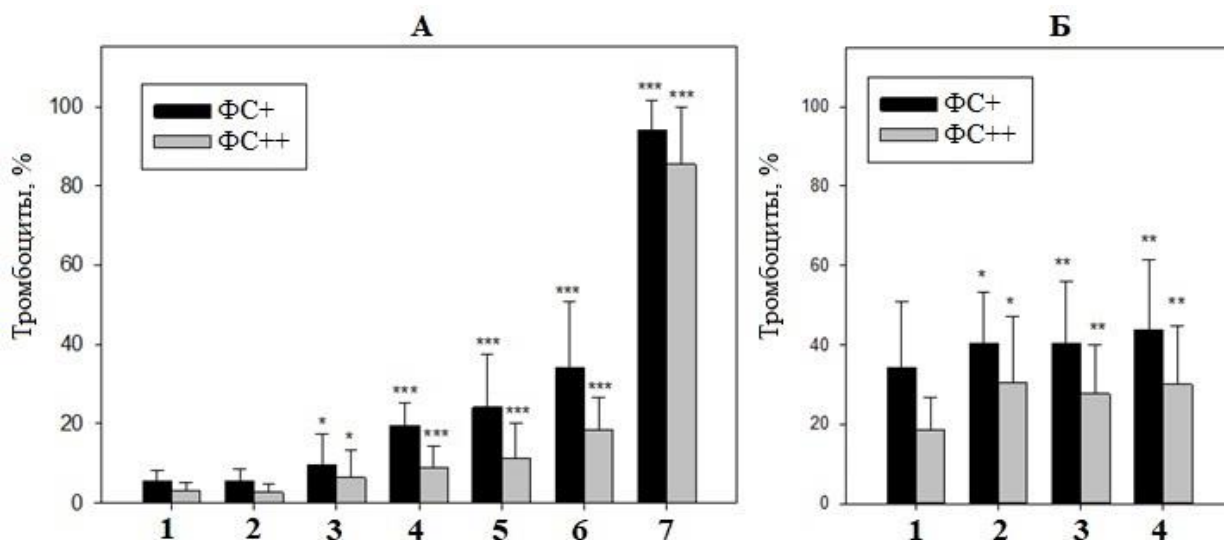


Рисунок 10. Экспонирование ФС на поверхности тромбоцитов, активированных разными агонистами.

Рисунок А: Отмытые тромбоциты не активировали (контроль) (1) или активировали (2) 20 мкМ АДФ, (3) 0,2 мМ арахидоновой кислоты, (4) 10 мкг/мл коллагена, (5) 20 мкМ TRAP, (6) 10 ед/мл тромбина и (7) 10 мкМ ионофора A23187. Черным цветом обозначены доли (%) тромбоцитов, экспонирующих ФС (ФС+). Серым цветом обозначены доли (%) тромбоцитов с высоким уровнем экспонирования ФС (ФС++). Представлены средние $\pm$ стандартные отклонения ($n \geq 9$); * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – достоверность отличий от контроля (1) (парный тест Стьюдента).

Рисунок Б: Отмытые тромбоциты активировали (1) 10 ед/мл тромбина (контроль), (2) 10 ед/мл тромбина+20 мкМ АДФ, (3) 10 ед/мл тромбина + 0,2 мМ арахидоновой кислоты, (4) 10 ед/мл тромбина+10 мкг/мл коллагеном. Черным цветом обозначены доли (%) тромбоцитов, экспонирующих ФС (ФС+). Серым цветом обозначены доли (%) тромбоцитов с с высоким уровнем экспонирования ФС (ФС++). Представлены средние $\pm$ стандартные отклонения ($n \geq 11$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – достоверность отличий от контроля (1) (парный тест Стьюдента).

В отсутствие активаторов количество ФС+ тромбоцитов обычно не превышало 5% от уровня контрольной гистограммы без аннексина V-FITC и

1-2% FC^{++} тромбоцитов. Наличие небольшого количества тромбоцитов, экспонирующих FC в отсутствие экзогенных активаторов, объясняется: (1) возможной спонтанной активацией тромбоцитов в процессе получения крови и отмывки тромбоцитов и (2) возможным неспецифическим связыванием аннексина V-FITC. Добавление к тромбоцитам АДФ не оказывало достоверного действия на экспонирование FC . Однако арахидоновая кислота, коллаген, TRAP и тромбин достоверно увеличивали процент FC^{+} и FC^{++} тромбоцитов. При действии наиболее сильного из этих индукторов, тромбина, количество FC^{+} и FC^{++} тромбоцитов достигало приблизительно 30% и 20% соответственно. Экспонирование тромбоцитами FC достигала максимума (не менее 90% FC^{+} и FC^{++}) при их активации ионофором A23187. (рис 10А). В тестах рекальцификации и ТГТ все экзогенные индукторы действовали на тромбоциты вместе с эндогенным тромбином, образующимся при активации коагуляционных реакций в плазме. При исследовании экспонирования FC мы продемонстрировали, что АДФ, арахидоновая кислота и коллаген достоверно усиливали действие тромбина, увеличивая число тромбоцитов FC^{+} и FC^{++} на 20-30% и 50-60%, соответственно, по сравнению только с тромбином (рис. 10 Б).

Эффект экзогенного тромбина на тромбоциты предположительно сравним с таковым у эндогенного тромбина, который образуется при проведении теста рекальцификации и ТГТ. Поэтому мы сравнили средние значения уровня экспонирования FC у тромбоцитов, активированных тромбином и тромбином в сочетании с коллагеном, арахидоновой кислотой и АДФ, а также ионофором A23187, со средними значениями параметров теста рекальцификации и ТГТ при активации тромбоцитов соответствующими агонистами (экзогенный тромбин сравнивали с параметрами тестов без экзогенных агонистов). Сильная тенденция к обратной корреляционной зависимости была выявлена между процентом FC^{+} тромбоцитов и лаг-фазой свертывания в тесте рекальцификации ($r = -0,835$, $p = 0,079$) (рис 11А) и достоверная прямая корреляция между процентом FC^{+} тромбоцитов и

максимальной скоростью в тесте рекальцификации ($r = 0,949$, $p = 0,014$) (рис. 11 Б), а также прямые корреляции между процентом ФС+ тромбоцитов и величиной пика ($r = 0,977$, $p = 0,04$) и максимальной скоростью генерации тромбина ($r = 0,994$, $p = 0,001$) в ТГТ. (рис 11 В и Г соответственно).

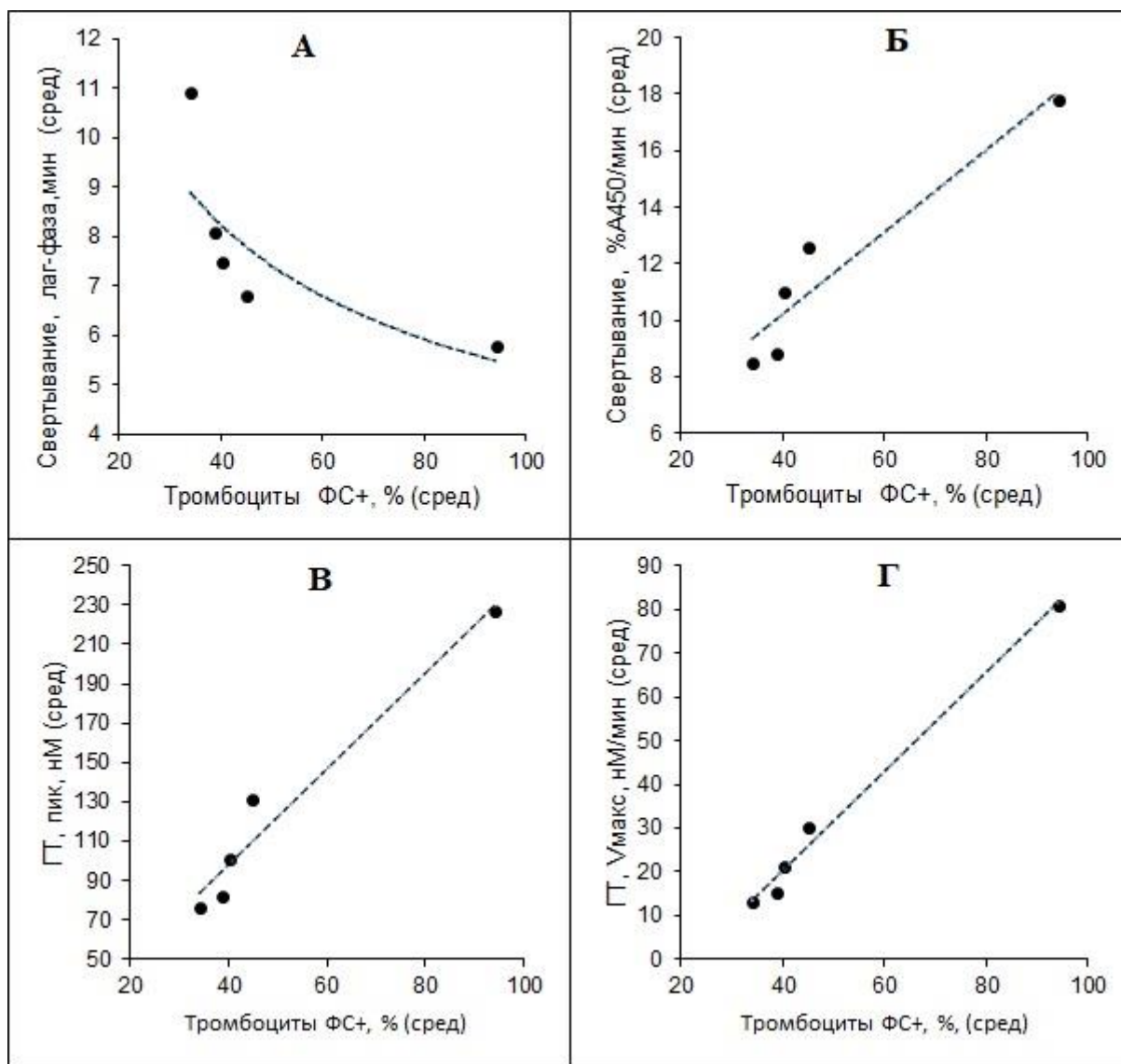


Рисунок 11. Корреляции между средними значениями экспонирования ФС (ФС+) и параметрами свертывания плазмы в тесте рекальцификации (А и Б) и генерации тромбина в ТГТ (В и Г). Используются данные из таблиц 3, 4 и рисунка 10. **Рисунок А:** ФС+ тромбоциты против лаг-фазы в тесте рекальцификации. **Рисунок Б:** ФС+ тромбоциты против максимальной скорости свертывания в тесте рекальцификации. **Рисунок В:** ФС+ тромбоциты против пика генерации тромбина в ТГТ. **Рисунок Г:** ФС+ тромбоциты против максимальной скорости свертывания в ТГТ. Точки слева направо для тромбоцитов ФС+: «Тромбин», «Тромбин + АДФ», «Тромбин + арахидоновая

кислота», «Тромбин + коллаген», «A23187» в сравнении с «Без экзогенных агонистов», «АДФ», «Арахидоновая кислота», «Коллаген» и «A23187» в тесте рекальцификации и ТГТ (все эти пробы содержали эндогенный тромбин).

4.3. Влияние антитромбоцитарных препаратов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов

На следующем этапе изучались эффекты антитромбоцитарных препаратов с разным механизмом действия на прокоагулянтные реакции тромбоцитов – их способность ускорять образование фибрина и генерацию тромбина, и экспонирование ФС. Были протестированы: ингибитор ЦОГ аспирин, антагонист P2Y₁₂ рецепторов АДФ тикагрелор, антагонист ГП IIb/IIIa руциромаб и активатор аденилатциклазы ПГЕ1.

4.3.1. Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина

Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина исследовали в разработанном модифицированном варианте теста рекальцификации плазмы. К отмытым тромбоцитам добавляли различные антитромбоцитарные препараты – аспирин, тикагрелор, сочетание аспирин + тикагрелор (аналог двойной антитромбоцитарной терапии), руциромаб и ПГЕ1. Затем тромбоциты не активировали экзогенными агонистами или активировали коллагеном, осаждали на дно лунок планшета, добавляли к ним субстратную плазму и запускали свертывание, как описано в главе «Материалы и Методы». В итоге на тромбоциты действовал эндогенный тромбин, образующийся в плазме отдельно или вместе с экзогенным коллагеном. В этих опытах также оценивались лаг-фаза и скорость реакции. Типичные кривые свертывания плазмы с добавлением к тромбоцитам антитромбоцитарных препаратов представлены на рисунке 12, а статистический анализ полученных данных представлен в таблице 5.

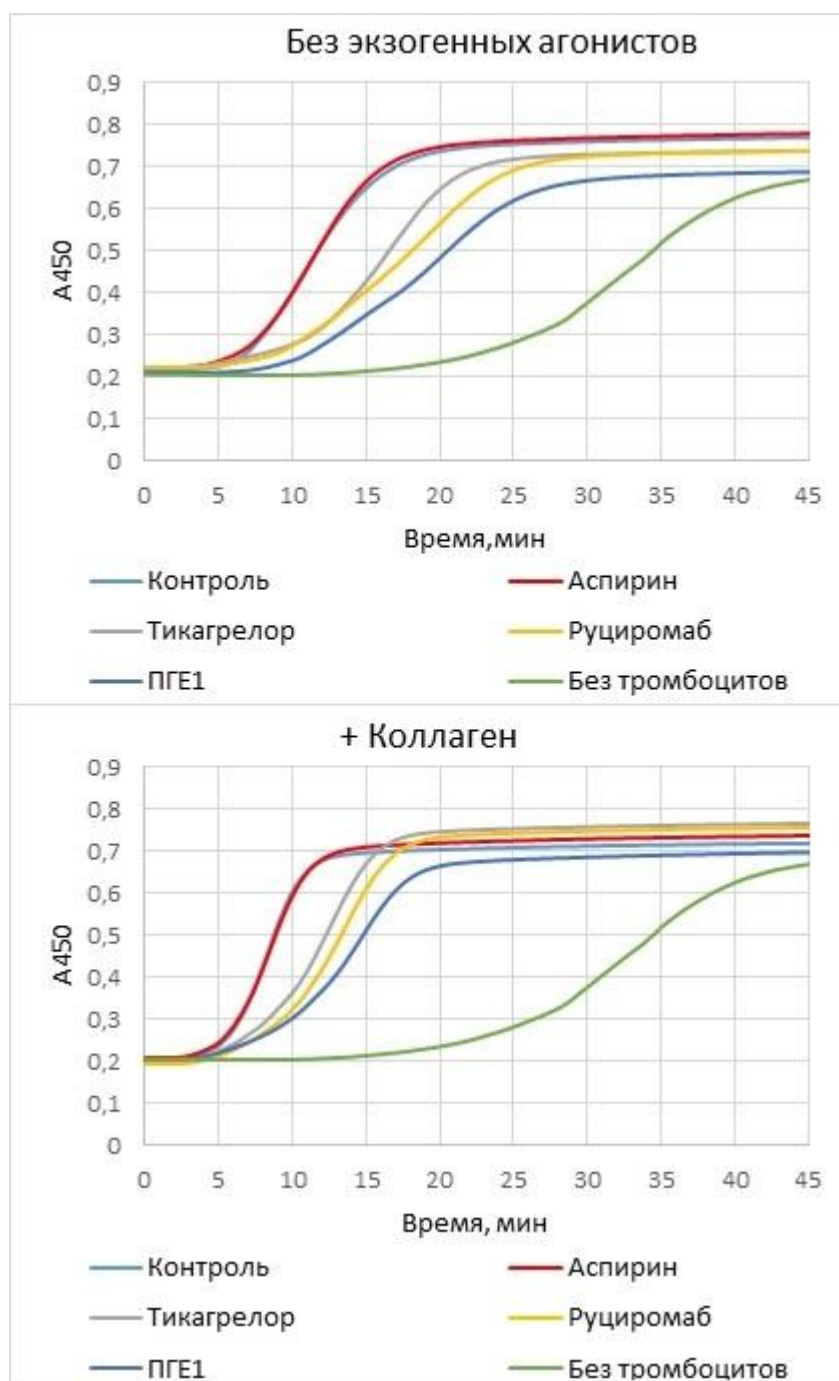


Рисунок 12. Эффекты антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина. К отмытым тромбоцитам не добавляли или добавляли 1 мкМ тикагрелора, 0,2 мМ аспирина, 20 мкг/мл руциромаба, 1 мкг/мл ПГЕ1, а затем не активировали («**Без экзогенных агонистов**») или активировали 10 мкг/мл коллагена («**+ Коллаген**»), осаждали на дно лунок, добавляли субстратную плазму. Свертывание запускали добавлением CaCl_2 . Присутствует проба без тромбоцитов (отрицательный контроль). Проба с сочетанием тикагрелор + аспирин не отличалась от пробы тикагрелор и не показана на рисунке. Представлены воспроизводимые кривые из ≥ 6 экспериментов.

Таблица 5. Эффекты антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование фибрина.

А	Без экзогенных агонистов	
	Лаг-фаза, мин	V _{макс} , %А450/мин
Контроль (n = 15)	6,4 ± 1,7	11,8 ± 2,5
Аспирин (n = 11)	6,1 ± 1,8	12,1 ± 4,3
Тикагрелор (n = 15)	8,0 ± 1,7***	7,9 ± 2,3***
Аспирин + тикагрелор (n = 10)	7,2 ± 1,2***	8,6 ± 2,4**
Руциромаб (n = 7)	9,8 ± 1,5**	5,7 ± 0,8***
ПГЕ1 (n = 7)	10,1 ± 1,0***	4,8 ± 0,7***
Б	+ Коллаген	
	Лаг-фаза, мин	V _{макс} , %А450/мин
Контроль (n = 14)	5,1 ± 1,2	18,7 ± 3,8
Аспирин (n = 9)	5,1 ± 1,1	17,8 ± 4,5
Тикагрелор (n = 15)	6,3 ± 1,4***	12,6 ± 3,8***
Аспирин + тикагрелор (n = 8)	6,0 ± 1,1**	11,8 ± 3,0**
Руциромаб (n = 6)	7,1 ± 1,7**	11,4 ± 2,2**
ПГЕ1 (n = 6)	7,5 ± 1,9**	10,2 ± 2,3**

К отмытым тромбоцитам не добавляли (контроль) или добавляли 0,2 мМ аспирина, 1 мкМ тикагрелора, сочетание 1 мкМ тикагрелора + 0,2 мМ аспирина, 20 мкг/мл руциромаба, 1 мкг/мл ПГЕ1, а затем не активировали (**А, «Без экзогенных агонистов»**) или активировали 10 мкг/мл коллагена (**Б, «+ Коллаген»**), осаждали на дно лунок, добавляли субстратную плазму. Свертывание запускали добавлением CaCl₂. Представлены средние ± стандартные отклонения; n - количество опытов. **p < 0,01; ***p < 0,001 – достоверность отличий от контроля (без антитромбоцитарных препаратов). Параметры пробы без тромбоцитов: лаг-фаза – 23,1 ± 7,0 мин, V_{макс} – 6,4 ± 1,2 %А450/мин (n = 15).

В опытах без добавления экзогенных агонистов аспирин не оказывал значимого действия на параметры свертывания в сравнении с контролем (без препаратов), в то время как остальные антитромбоцитарные препараты достоверно удлиняли лаг-фазу и снижали максимальную скорость. Действие аспирина в сочетании с тикагрелором не приводило к потенцированию действия тикагрелора. Руциромаб был немного более эффективен, чем тикагрелор, а наиболее эффективное действие оказывал ПГЕ1 – максимальная скорость реакции уменьшалась почти в 2,5 раза, а лаг-фаза уменьшалась в 1,6 раз. (рис. 12 «Без экзогенных агонистов», таблица 5А, «Без экзогенных агонистов»)

В опытах с активацией тромбоцитов коллагеном, были получены сходные результаты по сравнению с опытами без экзогенных агонистов. Добавление к тромбоцитам аспирина также не приводило к изменению параметров свертывания в сравнении с контролем и не усиливало действие тикагрелора при совместном применении. Добавление других ингибиторов достоверно снижало максимальную скорость реакции и увеличивало лаг-фазу, при этом ПГЕ1 был более эффективен, чем тикагрелор и руциромаб. (рис 12«+ Коллаген», таблица 5Б, «+ Коллаген»).

4.3.2. Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование тромбина

Для исследования эффектов антитромбоцитарных препаратов на тромбоцит-зависимое ускорение генерации тромбина, как и при исследовании действия агонистов тромбоцитов, был использован коммерческий вариант ТГТ и тромбоциты, иммобилизованные на поверхности пластика на дне ячеек планшетов. К суспензии отмытых тромбоцитов не добавляли или добавляли различные антитромбоцитарные препараты – аспирин, тикагрелор, сочетание аспирин + тикагрелор, руциромаб, ПГЕ1. Далее тромбоциты не активировали или активировали коллагеном, осаждали на дно ячеек, добавляли субстратную плазму и запускали реакцию с помощью тканевого фактора и ионов кальция,

как описано в главе «Материалы и Методы». В этих опытах в ТГТ мы стандартно оценивали лаг-фазу, максимальную скорость, величину пика и ЭТП. Результаты представлены на рисунке. 13 и в таблице 6.

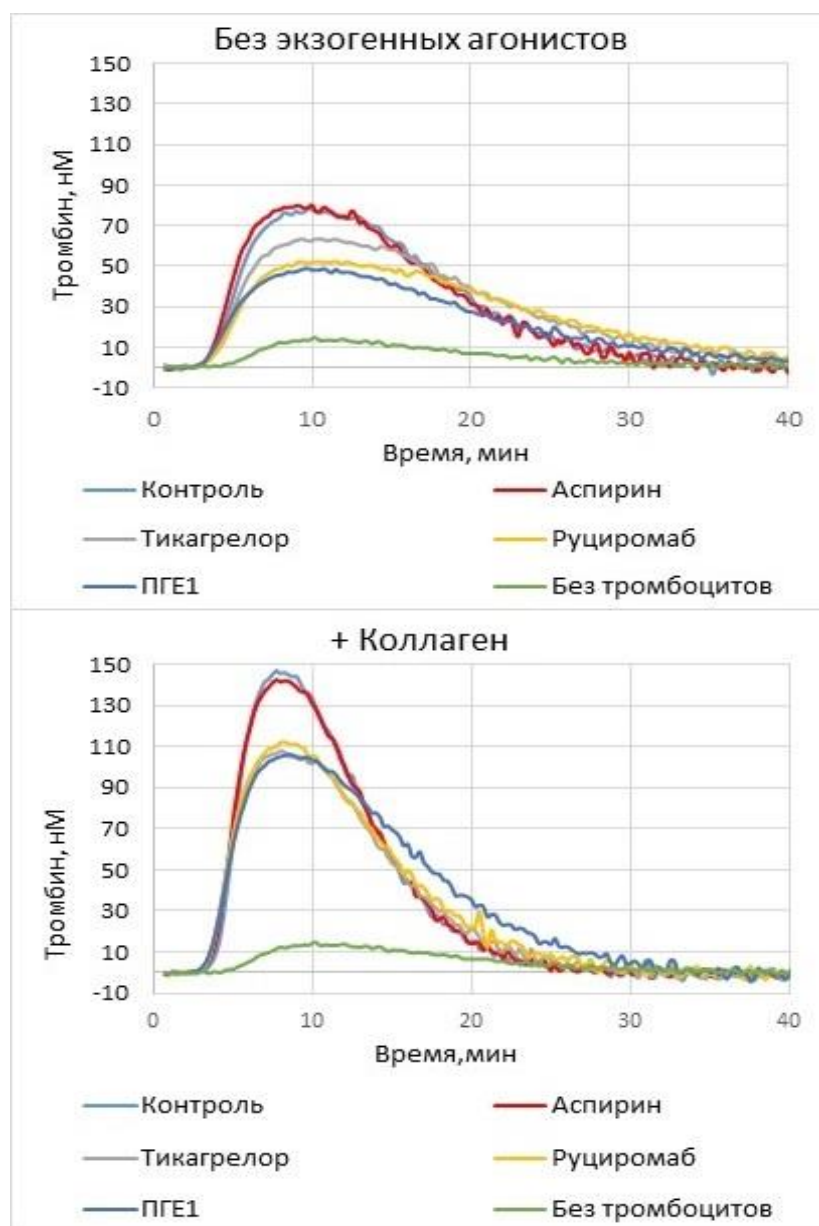


Рисунок 13. Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование тромбина. К отмытым тромбоцитам не добавляли антитромбоцитарные препараты (контроль) или добавляли 1 мкМ тикагрелора, 0,2 мМ аспирина, сочетание 1 мкМ тикагрелора + 0,2 мМ аспирина, 20 мкг/мл руциромаба, 1 мкг/мл ПГЕ1, а затем не активировали (**А, Без экзогенных агонистов**) или активировали (**Б, + Коллаген**) тромбоциты 10 мкг/мл коллагена, осаждали на дно лунок планшетов, добавляли субстратную плазму и запускали реакцию с помощью тканевого фактора и Ca^{2+} . Присутствует проба без тромбоцитов. Представлены воспроизводимые кривые из ≥ 5 экспериментов.

Таблица 6. Влияние антитромбоцитарных препаратов на способность тромбоцитов ускорять образование тромбина.

А	Без экзогенных агонистов			
	Лаг-фаза, мин	ЭТП, нМ х мин	Пик, нМ	V _{макс} , нМ/мин
Контроль (n = 9)	3,9 ± 0,3	1137 ± 146	84 ± 23	17 ± 7
Аспирин (n = 5)	3,7 ± 0,1	1177 ± 204	93 ± 28	20 ± 8
Тикагрелор (n = 7)	3,8 ± 0,2	1058 ± 164	60 ± 17**	10 ± 4**
Аспирин+тикагрелор (n = 5)	3,6 ± 0,3	1103 ± 236	67 ± 26*	12 ± 6*
Руциромаб (n = 6)	3,7 ± 0,3	1115 ± 190	62 ± 27*	12 ± 6*
ПГЕ1 (n = 5)	3,5 ± 0,3*	1007 ± 186*	62 ± 18*	10 ± 3*
Б	+ Коллаген			
	Лаг-фаза, мин	ЭТП, нМ х мин	Пик, нМ	V _{макс} , нМ/мин
Контроль (n = 8)	3,8 ± 0,3	1234 ± 140	137 ± 24	36 ± 10
Аспирин (n = 7)	3,8 ± 0,2	1257 ± 125	131 ± 15	33 ± 5
Тикагрелор (n = 7)	3,8 ± 0,3	1277 ± 193	109 ± 30**	25 ± 12**
Аспирин+тикагрелор (n = 7)	3,8 ± 0,3	1284 ± 145	111 ± 21*	25 ± 6**
Руциромаб (n = 7)	3,7 ± 0,3	1327 ± 193	115 ± 17*	26 ± 5*
ПГЕ1 (n = 7)	3,9 ± 0,2	1222 ± 183	105 ± 24**	24 ± 8**

К отмытым тромбоцитам добавляли 1 мкМ тикагрелора, 0,2 мМ аспирина, сочетание 1 мкМ тикагрелора + 0,2 мМ аспирина, 20 мкг/мл руциромаба, 1 мкг/мл ПГЕ1, а затем не активировали (**А, «Без экзогенных агонистов»**) или активировали (**Б, «+ Коллаген»**) тромбоциты 10 мкг/мл коллагена, осаждали на дно лунок планшетов, добавляли субстратную плазму и запускали реакцию с помощью тканевого фактора и Ca^{2+} . Представлены средние ± стандартные отклонения, n – количество опытов. *p < 0,05; **p < 0,01 – достоверности отличий от Контроля (без добавления антитромбоцитарных препаратов, парный t-тест Стьюдента). Параметры пробы без тромбоцитов: лаг-фаза – 4,3 ± 0,3 мин, ЭТП – 302 ± 49 нМ х мин, пик – 20 ± 3 нМ, V_{макс} – 3,7 ± 0,6 нМ/мин (n = 9).

Добавление аспирина к тромбоцитам не оказывало достоверного влияния ни на один оцениваемый параметр генерации тромбина, как без экзогенных агонистов, так и при активации тромбоцитов коллагеном (в дополнении к эндогенному тромбину). Добавление всех остальных препаратов приводило к достоверному снижению и пика и максимальной скорости реакции приблизительно на 20-30% и 30-40% соответственно. При этом аспирин не усиливал эффекты тикагрелора. Среди всех препаратов, лишь ПГЕ1 совсем незначительно (приблизительно на 10%) удлинял лаг-фазу и снижал ЭТП, и то лишь в варианте без экзогенных агонистов (рис. 13, таблица 6). Таким образом аспирин не влиял на способность тромбоцитов ускорять генерацию тромбина, а тикагрелор, руциромаб и ПГЕ1 снижали главным образом скорость реакции, и существенно не влияли на время ее инициации (очевидно определяемое тканевым фактором) и общее количество образуемого тромбина.

4.3.3. Влияние антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина

На данном этапе исследовали влияние антитромбоцитарных препаратов *in vitro* и *in vivo* (при приеме пациентами) на способность тромбоцитов экспонировать ФС на своей поверхности.

4.3.3.1. Влияние антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина в условиях *in vitro*

Для этих опытов в условиях *in vitro* использовали отмытые тромбоциты из крови здоровых доноров. Тромбоциты обрабатывали или не обрабатывали антитромбоцитарными препаратами (те же препараты, что и в тесте рекальцификации и ТГТ и в тех же концентрациях) и затем активировали тромбоциты тромбином или тромбином в сочетании с коллагеном. Уровень экспонирования ФС на поверхности тромбоцитов оценивали по уровню связывания маркера ФС, аннексина V-FITC, с помощью проточной

цитометрии, как описано выше (раздел 4.2.3.). Результаты представлены на рис. 14 и 15.

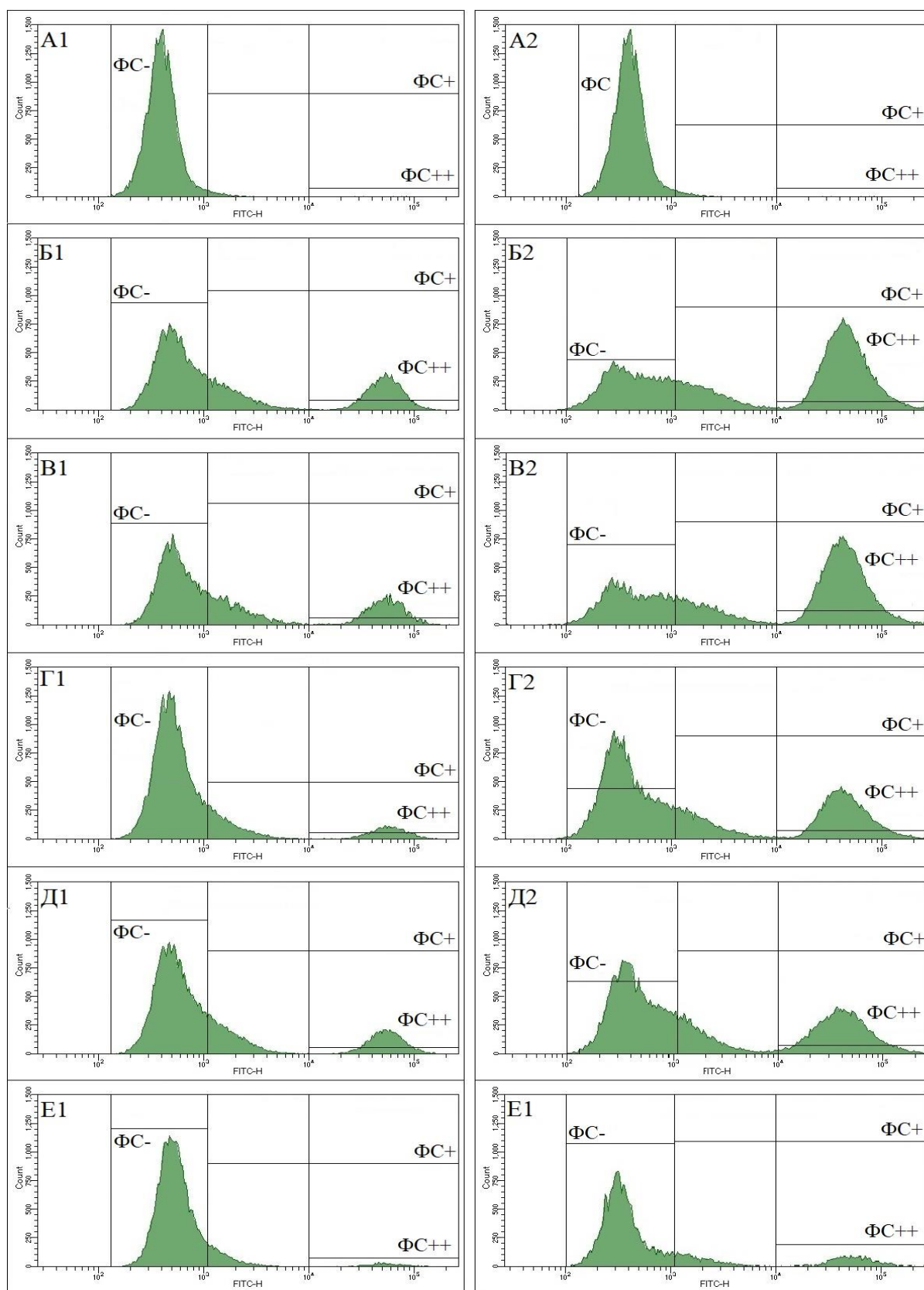


Рисунок 14. Влияние антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами ФС. К отмытым тромбоцитам не добавляли (А и Б) или

добавляли 0,2 мМ аспирина (**В**), 1 мкМ тикагрелора (**Г**), 20 мкг/мл руциромаба (**Д**), 1 мкг/мл ПГЕ1 (**Е**). Затем к тромбоцитам не добавляли агонисты (**А1** и **А2**) или активировали их 10 ед/мл тромбина (**Б1-Е1**) или сочетанием 10 ед/мл тромбина + 10 мкг/мл коллагена (**Б2-Е2**). Выделены области: «ФС-» - тромбоциты, не экспонирующие ФС. «ФС+» - все тромбоциты, экспонирующие ФС. «ФС++» - тромбоциты с высоким уровнем экспонирования ФС. Представлены воспроизводимые гистограммы из 6 экспериментов.

Аспирин не оказывал достоверного действия на экспонирование ФС тромбоцитами, активированными тромбином. Добавление к тромбоцитам тикагрелора приводило к уменьшению процента как ФС+, так и ФС++ тромбоцитов, а его сочетание с аспирином не оказывало дополнительного действия на уровень экспонирования ФС. Добавление руциромаба также приводило к уменьшению уровня ФС, хотя и несколько менее выраженному, чем при добавлении тикагрелора. Максимальное уменьшение уровня ФС в сравнении с положительным контролем (без препаратов) наблюдалось при добавлении к тромбоцитам ПГЕ1. (Рис. 14 и 15).

При сочетанной активации тромбоцитов тромбином и коллагеном, были получены аналогичные результаты. Аспирин также не оказывал достоверного действия на уровень экспонирования ФС, а все другие препараты снижали процент ФС+ и ФС++ тромбоцитов, при этом максимальный эффект наблюдался при добавлении к тромбоцитам ПГЕ1. (Рис. 14 и 15).

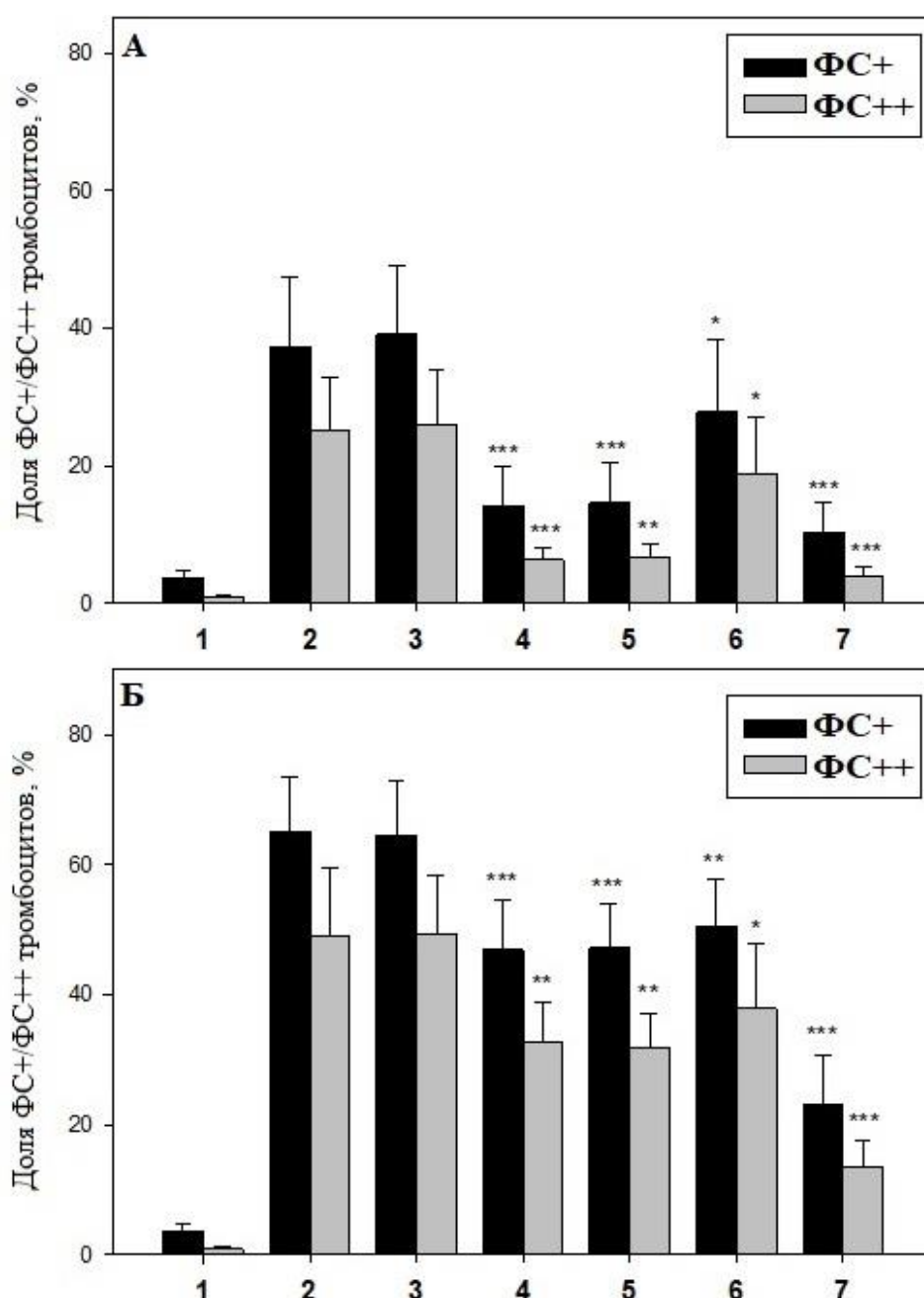


Рисунок 15. Влияние антитромбоцитарных препаратов на уровень экспонирования ФС на поверхности тромбоцитов. К отмытым тромбоцитам не добавляли (1 и 2) или добавляли 0,2 мМ аспирина (3), 1мкМ тикагрелора (4), сочетание 0,2 мМ аспирина + 1 мкМ тикагрелора (5), 20 мкг/мл руциромаба (6), 1мкг/мл ПГЕ1 (7). Тромбоциты не активировали (1) или активировали 10 ед/мл тромбина (А) или сочетанием 10 ед/мл тромбина + 10 мкг/мл коллагена (Б). Черным цветом обозначены доли тромбоцитов, экспонирующих ФС (ФС+). Серым цветом обозначены доли тромбоцитов с высоким экспонированием ФС (ФС++). Представлены средние $\pm$ стандартные отклонения, $n = 6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – достоверность отличий от проб без антитромбоцитарных препаратов (парный t-тест Стьюдента).

4.3.3.2. Влияние антитромбоцитарных препаратов, принимаемых пациентами на экспонирование тромбоцитами фосфатидилсерина

Для исследования действия антитромбоцитарных препаратов *in vivo* использовали кровь здоровых доноров и пациентов с ОКС, принимающих двойную антитромбоцитарную терапию (аспирин + тикагрелор). К цельной крови, взятой в антикоагулянт цитрат натрия, добавляли РРАСК и разводили в 20 раз буфером Тироде/HEPES/Mg/Ca, 0,35% BSA. РРАСК, ингибирующий активность ферментов свертывания, был использован для предотвращения коагуляции крови после добавления кальций-содержащего буфера. Далее пробы активировали 20 мкМ TRAP, 10 мкг/мл коллагена и их сочетанием и определяли содержание ФС на тромбоцитах в цельной крови с помощью проточной цитометрии используя аннексин V-FITC в качестве маркера, точно так же, как и в суспензии отмытых тромбоцитов (см. выше). Выбор TRAP в качестве активатора обусловлен тем, что тромбин способен вызвать коагуляцию крови. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7. Экспонирование ФС на поверхности тромбоцитов здоровых доноров и пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии в цельной крови.

	Здоровые доноры		Пациенты с ОКС	
	ФС+ тромбоциты, %	ФС++ тромбоциты, %	ФС+ тромбоциты, %	ФС++ тромбоциты, %
Без агонистов	1,7±0,9 (n=32)	0,4±0,4 (n=32)	1,1±0,7 (n=25) p=0,012	0,2±0,2 (n=25) p=0,018
TRAP	10,5±5,1 (n=23)	2,8±2,5 (n=23)	5,1±2,8 (n=19) p < 0,001	1,2±1,3 (n=19) p=0,018
Коллаген	21,2±8,2 (n=29)	14,0±6,7 (n=29)	17,0±6,1 (n=26) p=0,036	10,1±5,0 (n=26) p=0,018
TRAP + Коллаген	49,8±9,2 (n=33)	33,9±11,6 (n=33)	41,7±10,2 (n=26) p=0,002	26,6±11,9 (n=26) p=0,020

Указаны % субпопуляций ФС+ и ФС++. Представлены средние ±стандартные

отклонения; n – количество опытов. p – достоверность различий от «здоровых доноров» (t-тест Стьюдента для средних).

В этих опытах TRAP действовал менее эффективно на экспонирование ФС, чем тромбин на отмытые тромбоциты, что согласуется с ранее представленными результатами, где оба активатора добавляли к отмытым тромбоцитам (см. раздел 4.2.3). Экспонирование ФС у пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии было достоверно ниже, чем у здоровых доноров. Наблюдалось снижение как процента ФС+, так и ФС++ тромбоцитов при активации тромбоцитов TRAP, коллагеном и при их сочетании. Наблюдалось и некоторое снижение базовых значений процента ФС+ и ФС++ тромбоцитов в пробах без добавления агонистов. Полученные результаты указывают, что антитромбоцитарные препараты способны ингибировать эту ключевую прокоагулянтную реакцию тромбоцитов не только *in vitro*, но и *in vivo*, после приема их пациентами.

4.4. Исследование прокоагулянтных свойств тромбоцитарных микрочастиц

Активированные тромбоциты не только сами по себе обладают прокоагулянтными свойствами, но также способны продуцировать коагуляционно активные мембранные микрочастицы (МЧ). Такие МЧ представляют собой фрагменты плазматической мембраны тромбоцитов и содержат на своей поверхности ФС [52]. В этой части работы сравнивали коагуляционные свойства мембранных МЧ, продуцируемых тромбоцитами, активированными разными индукторами, оценивая их количество, влияние на образование фибрина в тесте рекальцификации и содержание ФС на их поверхности.

4.4.1. Исследования способности тромбоцитарных микрочастиц ускорять образование фибрина

Отмытые тромбоциты не активировали или активировали различными индукторами (ионофор A23187, TRAP, арахидоновая кислота, коллаген и АДФ), затем из супернатанта тромбоцитов осаждали МЧ, ресуспендировали в

одинаковом объеме субстратной плазмы и проводили тест рекальцификации оценивая способность МЧ ускорять образование фибрина. Типичные кривые свертывания представлены на рисунке 16, а статистические данные по измерению лаг-фазы и максимальной скорости свертывания ($V_{\text{макс}}$) – в таблице 8.

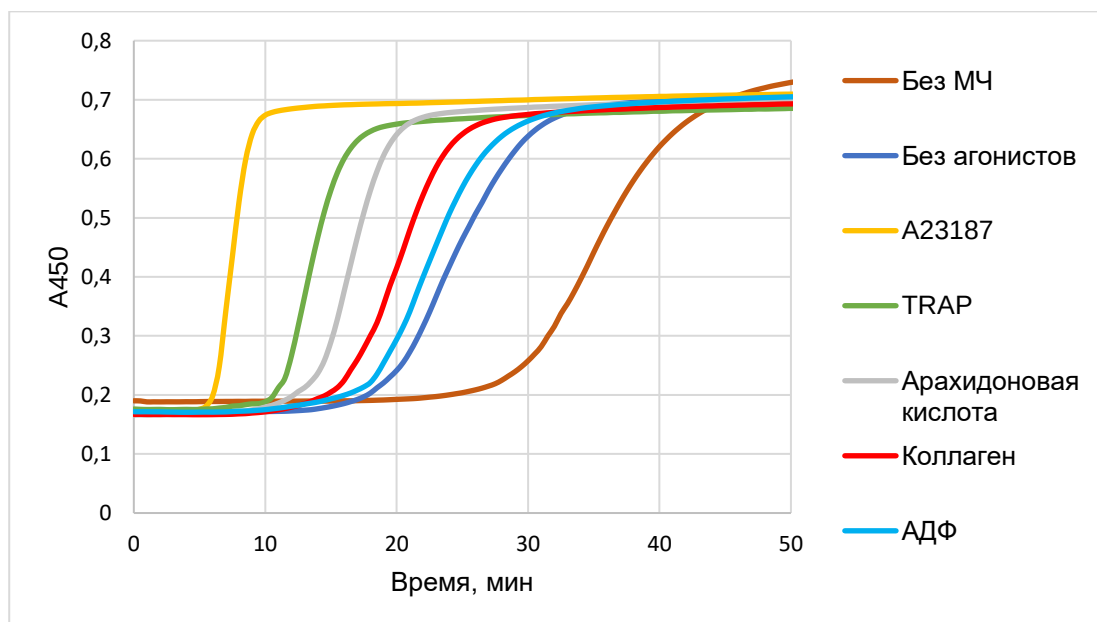


Рисунок 16. Эффекты тромбоцитарных МЧ на ускорение образования фибрина в плазме. Отмытые тромбоциты в концентрации $2,5 \times 10^8/\text{мл}$ не активировали (без агонистов) или активировали 10 мкМ ионофора A23187, 20 мкМ TRAP, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 10 мкг/мл коллагена и 20 мкМ АДФ. Пробы перемешивали в шейкер-термостате при 37°C . Центрифугированием отделяли тромбоциты, осаждали МЧ и ресуспендировали в одинаковом объеме субстратной плазмы. Реакцию запускали добавлением ионов кальция. Присутствует проба без МЧ в качестве отрицательного контроля. Представлены воспроизводимые кривые из ≥ 10 экспериментов.

Тромбоцитарные МЧ во всех пробах (даже без добавления индукторов, т.е. при спонтанной активации тромбоцитов) существенно ускоряли свертывание плазмы по сравнению с пробами без МЧ – укорочение лаг-фазы и увеличение максимальной скорости. После активации наиболее выраженные эффекты наблюдались при воздействии на тромбоциты A23187, более умеренные при воздействии TRAP, арахидоновой кислоты и коллагена, а при

действии АДФ не наблюдалось достоверного увеличения скорости реакции по сравнению с пробой без добавления агонистов. (рисунок 16, таблица 8).

4.4.2. Подсчет количества микрочастиц и определение уровня экспонирования фосфатидилсерина

Для подсчета количества МЧ измеряли уровень экспонирования ФС с помощью проточной цитометрии, как описано в главе «Материалы и методы». Пример анализа МЧ представлен на рисунке 17.

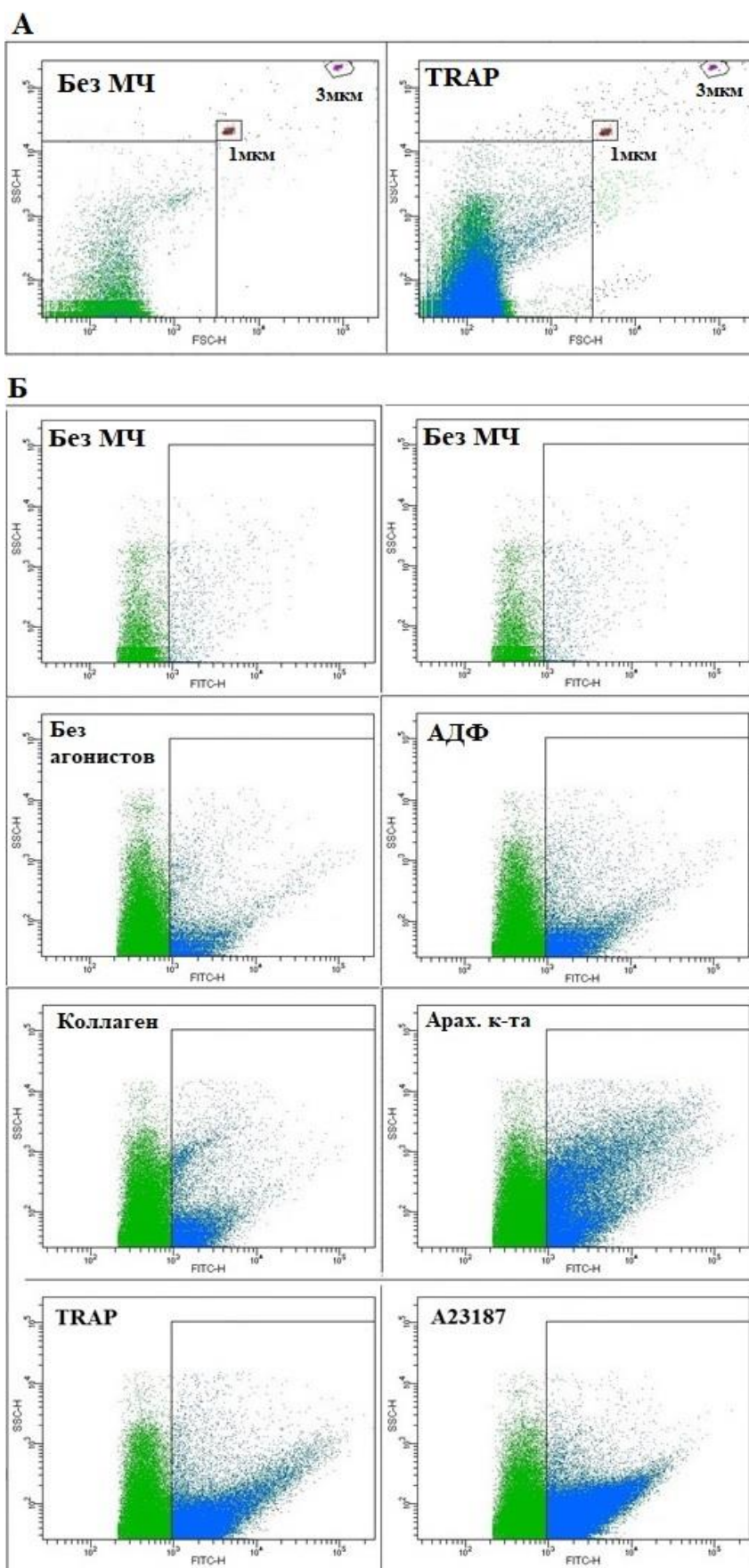


Рисунок 17. МЧ, высвобожденные из тромбоцитов, активированных различными агонистами; анализ с помощью проточной цитометрии. (А) «Гейтирование» МЧ в области бокового и прямого светорассеивания. 1 мкм –

область гранул для определения размера 1 мкм, 3 мкм – позиция гранул для подсчета размером 3 мкм. Квадратом выделена область МЧ (<1 мкм). «Без МЧ» – отрицательный контроль без МЧ, содержащий лактадгерин-FITC, гранулы для размера и подсчета, «TRAP» – МЧ из тромбоцитов, активированных 10 мМ TRAP. Зеленый и синий цвета - область событий, разделенных линией отрицательного контроля по FITC флуоресценции (см. рис. Б). (Б) Примеры анализа МЧ после их «гейтирования». «Без МЧ» - отрицательный контроль без МЧ. Линия отрицательного контроля отделяет отрицательный контроль в канале FITC в примерно 900 условных единиц. Зеленый и синий цвета - область событий, разделенных линией отрицательного контроля. «Без агонистов» - МЧ, высвобожденные из неактивированных тромбоцитов. «АДФ» - МЧ, высвобожденные из тромбоцитов, активированных 20 мкМ АДФ. «Коллаген» - МЧ, высвобожденные из тромбоцитов, активированных 10 мкг/мл коллагеном. «Арах. к-та» - МЧ, высвобожденные из тромбоцитов, активированных 0,2 мМ арахидоновой кислоты. «TRAP» - МЧ, высвобожденные из тромбоцитов, активированных 20 мкМ TRAP. «A23187» - МЧ, высвобожденные из тромбоцитов, активированных 10 мкМ ионофором A23187. Медианы флуоресценции FITC (экспонирование ФС) и количество МЧ определяли в области за линией отрицательного контроля (синий).

Таблица 8. Характеристики МЧ тромбоцитов, продуцируемых при их активации различными индукторами.

	Количество МЧ [#] x 10 ⁶	Лактадгерин-FITC, медиана флуоресценции, у.е.	Свертывание, Лаг-фаза, мин	Свертывание, V _{макс} , %A450/мин
Без МЧ	-	-	27,7±5,0 p <0,001	8,3±1,5 p <0,001
Без агонистов	0,87±0,89	1319±161	16,8±4,0	10,9±2,3
A23187	20,85±10,6 ⁺⁺⁺	1174±196	6,0±1,5 ⁺⁺⁺	33,1±7,7 ⁺⁺⁺
TRAP	5,27±3,12 ⁺⁺	1235±193	10,9±2,1 ⁺⁺⁺	17,4±5,8 ⁺⁺⁺
Арах. к-та	4,30±1,39 ⁺⁺⁺	1324±232	11,4±2,4 ⁺⁺	16,1±2,7 ⁺⁺⁺
Коллаген	3,16±2,21 ⁺	1167±99 ⁺	13,2±2,6 ⁺	13,3±2,6 ⁺
АДФ	2,13±1,03 ⁺	1232±143	14,1±3,5	13,1±3,3

Анализировали МЧ полученные из тромбоцитов, которые не активировали («Без агонистов») или активировали 10 мкМ ионофора A23187, 20 мкМ TRAP, 0,2 мМ арахидоновой кислоты (арах. к-та), 10 мкг/мл коллагена и 20 мкМ АДФ. Представлены средние ± стандартные отклонения, n = 7-10 для количества МЧ и медианы флуоресценции, и n = 10-16 для параметров

свертывания (лаг-фаза и $V_{\max}$); $p < 0,001$ – достоверность отличий от всех остальных групп от группы «Без МЧ (параметры свертывания); $+p < 0,05$, $++p < 0,01$, $+++p < 0,001$ – отличия от контроля («Без агонистов») (t-тест Стьюдента для средних). #Количество МЧ в тесте рекальцификации у.е. – условные единицы.

Измерение количества МЧ в пробах проводилось с помощью проточной цитометрии после окраски ФС лактадгерином-FITC, как подробно описано в разделе «Материалы и методы» и продемонстрировано на рис. 17. Результаты измерения количества МЧ представлены в таблице 8. Наибольшее количество МЧ продуцировалось тромбоцитами при активации A23187, меньшее при активации TRAP, арахидоновой кислотой и коллагеном и минимальное при активации АДФ и спонтанной активации тромбоцитов (без индукторов).

Как показано на рис. 18 между средними значениями параметров свертывания и количеством МЧ при разных способах активации тромбоцитов наблюдались высокодостоверные корреляционные взаимосвязи: обратная корреляция между значениями лаг-фазы и количеством МЧ (рис. 18А) и прямые корреляции между значениями $1/\text{лаг}$ фазу и количеством МЧ (рис. 18Б) и максимальной скоростью ($V_{\max}$) и количеством МЧ (рис. 18В). Высокая достоверность данных корреляций (R^2 везде $> 0,9$) и минимальное отклонение точек от корреляционных линий указывает на то, что коагуляционная активность МЧ, продуцируемая тромбоцитами, активированных различными агонистами, зависит исключительно от их количества, а качественно эти МЧ никак не различаются, т.е. они обладают одинаковой удельной прокоагулянтной активностью.

Подтверждением отсутствия качественных различий между МЧ, образующимися при активации тромбоцитов разными индукторами явилось отсутствие различий в медиане флуоресценции при связывании лактадгерином-FITC разными МЧ, что указывает на одинаковое содержание на их поверхности ФС (таблица 8).

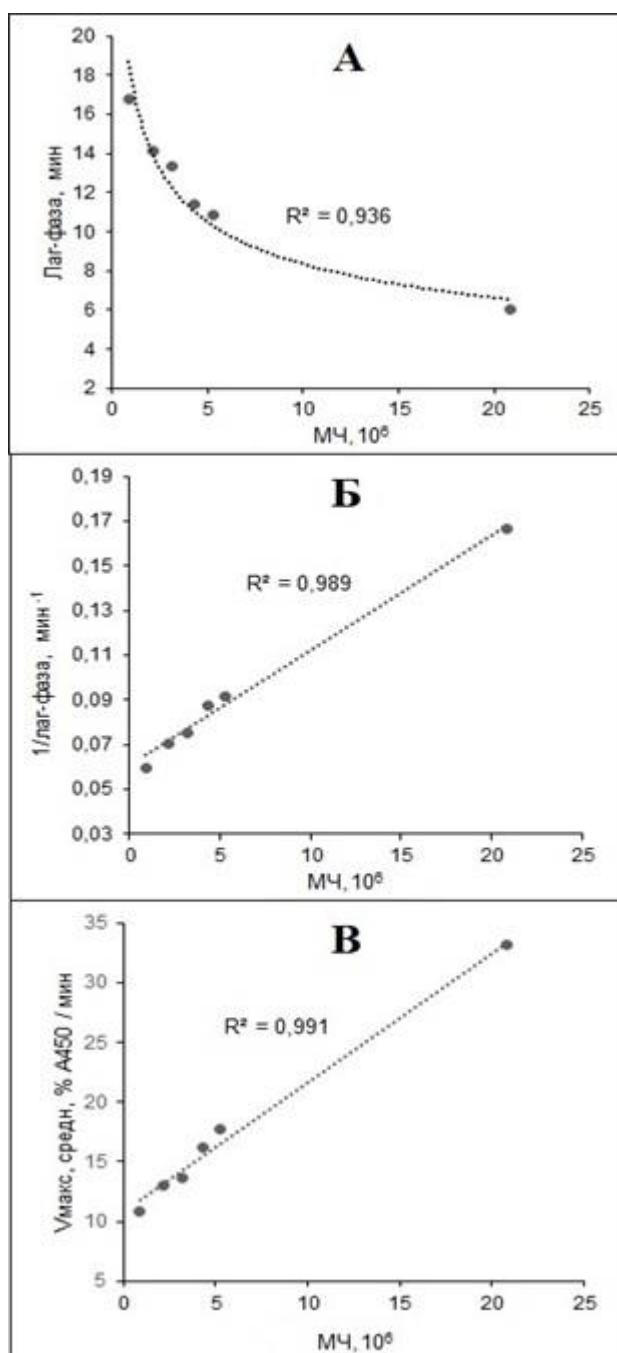


Рисунок 18. Корреляционные взаимосвязи параметров свертывания плазмы (лаг-фаза, 1/лаг фаза и максимальная скорость ($V_{\text{макс}}$)) и количества тромбоцитарных МЧ в тесте рекальцификации. Используются средние значения из таблицы 8. (А) лаг-фаза и количество МЧ, (Б) 1/лаг фаза и количество МЧ, (В) $V_{\text{макс}}$ и количество МЧ. Точки слева направо (средние значения): МЧ из неактивированных тромбоцитов, МЧ из тромбоцитов, активированных 20 мкМ АДФ, 10 мкг/мл коллагена, 0,2 мМ арахидоновой кислоты, 20 мкМ TRAP и 10 мкМ A23287. Показано значение R^2 – (R - коэффициента корреляции).

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1. Оценка прокоагулянтных свойств тромбоцитов, активированных различными агонистами

В первой части настоящей работе исследовались прокоагулянтные свойства тромбоцитов, активированных различными агонистами (индукторами). Изучали действие тромбоцитов на образование фибрина, генерацию тромбина и экспонирование на поверхности тромбоцитов ФС.

Для выполнения этого исследования был разработан и апробирован оригинальный метод подготовки тромбоцитов для последующей оценки их действия на ключевые реакции свертывания – образование фибрина и тромбина. Тромбоциты активировали в суспензии различными агонистами, осаждали на дно 96-луночного планшета, удаляли супернатант и добавляли субстратную плазму, очищенную от МЧ. Образование фибрина запускали добавлением CaCl_2 , а генерацию тромбина – добавлением CaCl_2 и небольшого количества тканевого фактора, а экзогенные фосфолипиды не добавляли. Высокие концентрации тканевого фактора в ТГТ не использовали, так как известно, что в таких условиях эффекты тромбоцитов могут нивелироваться за счет резкого ускорения реакции [28]. А экзогенные фосфолипиды не использовали в связи с тем, что тромбоциты сами по себе являются источником ФС и присутствие других фосфолипидов могло снижать их эффекты. Образование фибрина в тесте рекальцификации оценивалось по изменению светопропускания, а генерация тромбина - по изменению флуоресцентного сигнала от специфического флуорогенного субстрата. Ключевым новым моментом в нашем подходе было использование иммобилизованных на поверхности тромбоцитов, а не тромбоцитов в суспензии. Условия иммобилизации (концентрация тромбоцитов, скорость и время их осаждения) были подобраны таким образом, что более 95% тромбоцитов осаждались на дно лунок планшета, образуя монослой, покрывающий большую поверхность пластика. Такой подход исключал образование агрегатов, которые могли потенциально повлиять на

коагуляционную активность тромбоцитов, например, вследствие сниженной доступности экспонирующих ФС мембран тромбоцитов, входящих в состав агрегатов. Последнее предположение было подтверждено в эксперименте, продемонстрировавшем более выраженные эффекты иммобилизованных тромбоцитов, по сравнению с тромбоцитами в суспензии, на образование фибрина. Использование иммобилизованных тромбоцитов с последующим удалением супернатанта также позволило избежать влияния на коагуляционные реакции мембранных МЧ, образующихся при активации тромбоцитов. Хорошо известно, что такие МЧ могут ускорять и образование фибрина [35][36][56], и генерацию тромбина [32] и содержат на единицу поверхности больше ФС, чем сами активированные тромбоциты [37].

И в тесте рекальцификации, и в ТГТ тромбоциты не остаются не активированными даже без добавления экзогенных агонистов, т.к. при запуске коагуляционных реакций в плазме образуется эндогенный тромбин, который может активировать тромбоциты. Косвенным подтверждением этого предположения было то, что TRAP, будучи сильным агонистом тромбоцитов (в частности, он достаточно эффективно стимулировал экспонирование ФС), не оказывал значимого действия на эти реакции, очевидно, вступая в конкуренцию с эндогенным тромбином за PAR рецептор. АДФ и арахидоновая кислота либо не оказывали достоверных эффектов (особенно АДФ), либо оказывали весьма умеренные эффекты и на образование фибрина и на генерацию тромбина. Их слабое действие может быть связано с тем, что эндогенные тромбоцитарные АДФ (секретируемый из гранул) и ТХА₂ (продукт метаболизма арахидоновой кислоты) могут присутствовать в контрольных пробах (без агонистов), высвобождаясь из тромбоцитов при их активации эндогенным тромбином. Активация коллагеном была существенно более эффективна и значительно ускоряла образование фибрина и генерацию тромбина, а максимальное действие оказывал ионофор A23187. При исследовании действия активаторов в ТГТ было отмечено, что ни один из физиологических агонистов не оказывал действия на лаг-фазу и ЭТП (лишь

нефизиологический агонист ионофор A23187 незначительно влиял на эти параметры). Эти данные указывают на то, что активация тромбоцитов изменяет только скорость генерации тромбина, но не время инициации реакции (зависящее от тканевого фактора) и общее количество образуемого тромбина.

Действие активированных разными индукторами тромбоцитов на образование фибрина было изучено впервые в настоящей работе. В то же время эффекты активированных тромбоцитов на генерацию тромбина ранее изучались, но не отмытых и иммобилизованных, как в настоящей работе, а тромбоцитов в ОТП. В качестве активаторов авторы использовали арахидоновую кислоту [28][40][119], коллаген [28][34][119], АДФ [28][34][119], и было показано, что их добавление стимулирует эффекты тромбоцитов на генерацию тромбина. Результаты настоящей работы согласуются с вышеперечисленными.

При сравнении эффектов тромбоцитов, активированных различными индукторами, на параметры образования фибрина и генерации тромбина мы получили сильные и достоверные корреляции. Таким образом можно сделать вывод, что потенцирующий эффект активированных тромбоцитов на генерацию тромбина непосредственно ретранслируется на тромбин-зависимое образование фибрина (финальную реакцию свертывания).

При исследовании экспонирования ФС тромбоцитами агонисты использовались по отдельности и в сочетании с экзогенным тромбином, моделируя активацию тромбоцитов эндогенным тромбином. Добавление к тромбоцитам арахидоновой кислоты, коллагена, TRAP, тромбина и ионофора A23187, но не АДФ достоверно увеличивали процент ФС+ и ФС++ тромбоцитов. Максимальный эффект оказывал ионофор A23187, увеличивая число ФС+ тромбоцитов до >90%, что коррелирует с результатами теста рекальцификации и ТГТ. В целом полученные результаты согласуются с уже существующими данными, в которых эффективное экспонирование ФС наблюдалось при активации тромбоцитов тромбином, коллагеном или их

сочетание, а максимальное при действии ионофора A23187, а АДФ не оказывает стимулирующего действия [6,50]. В работе [51] была продемонстрирована и возможность экспонирования ФС при активации тромбоцитов арахидоновой кислотой. Также в настоящей работе было отмечено, что АДФ, арахидоновая кислота и коллаген достоверно усиливают действие экзогенного тромбина, в сравнении только с тромбином. Сопоставление полученных средних значений тестов, в которых на тромбоциты действовал тромбин (эндогенный или экзогенный) и другие активаторы, показало, что скорость образования фибрина в тесте рекальцификации плазмы и тромбина в ТГТ определяется уровнем экспонирования тромбоцитами ФС. Эти данные подтверждают ключевую роль ФС в реализации прокоагулянтной активности тромбоцитов.

5.2 Влияние антитромбоцитарных препаратов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов

На следующем этапе работы были исследовано влияние антитромбоцитарных препаратов на прокоагулянтные свойства тромбоцитов. Для этого к отмытым тромбоцитам добавляли препараты с различным механизмом действия – аспирин (ингибитор ЦОГ), тикагрелор (антагонист P2Y₁₂ рецептора АДФ), руциромаб (антагонист ГП IIb-IIIa), ПГЕ1 (активатор аденилатциклазы). Также было исследовано сочетание тикагрелор+аспирин, поскольку эти препараты зачастую назначают одновременно, особенно при ОКС (двойная антитромбоцитарная терапия). В настоящей работе были исследованы эффекты антитромбоцитарных препаратов на образование фибрина в плазме (модифицированный тест рекальцификации плазмы), генерацию тромбина (ТГТ) и экспонирование тромбоцитами ФС.

Мы впервые изучили эффекты различных антитромбоцитарных препаратов на ускорение тромбоцитами образование фибрина (свертывание плазмы), используя модифицированный тест рекальцификации плазмы. В тесте рекальцификации плазмы после добавления антитромбоцитарных

препаратов к части проб не добавляли экзогенных индукторов (действие эндогенного тромбина), а в части проб тромбоциты дополнительно активировали коллагеном. Таким образом, на тромбоциты действовал эндогенный тромбин или коллаген + эндогенный тромбин. Тикагрелор (как отдельно, так и в сочетании с аспирином), руциромаб, ПГЕ1, но не аспирин удлинляли лаг-фазу и снижали максимальную скорость образования фибрина. Активация тромбоцитов экзогенным тромбином или тромбином + коллаген стимулировала образование ТХА2 в тромбоцитах и высвобождение АДФ из плотных гранул. Эффективность тикагрелора, но не аспирина предполагает, что АДФ, образующийся в тромбоцитах, но не ТХА2 вовлечен в стимуляцию тромбоцит-зависимого образования фибрина. Ранее [117] была исследована кровь пациентов с ИБС, которые принимали аспирин или аспирин + клопидогрел с контрольной группой без приема препаратов, в проточной камере, где образование фибринового тромба оценивалось в рекальцифицированной крови, стимулированной иммобилизованными ТФ и коллагеном. Исследователи не обнаружили различий между этими группами, однако неэффективность обоих препаратов может объясняться сильным влиянием ТФ (присутствующего в камере) на коагуляцию, что уменьшило вклад тромбоцитов. Ингибиторный эффект руциромаба (F(ab)₂ фрагмент моноАТ CRC64 против ГП IIb-IIIa) на тромбоцит-зависимое образование фибрина предполагает участие ГП IIb-IIIa в этой реакции. Эти результаты в целом согласуются с ранними работами других авторов [38][39], в которых был обнаружен ингибиторный эффект другого антительного блокатора ГП IIb-IIIa абциксимаба (но не низкомолекулярных агонистов) на каолин-индуцированное свертывание обогащенной тромбоцитами плазмы при дополнительной активации тромбоцитов коллагеном [38] и спонтанное свертывание крови в условиях высоких скоростей сдвига [39].

В ТГТ после добавления антитромбоцитарных препаратов часть проб также активировали коллагеном, и на тромбоциты действовал эндогенный тромбин или эндогенный тромбин + коллаген. Результаты, полученные в ТГТ,

коррелируют с результатами теста рекальцификации, то есть тикагрелор, руциромаб, ПГЕ1, но не аспирин достоверно уменьшали пик и максимальную скорость генерации тромбина. Ингибиторные эффекты на генерацию тромбина ранее демонстрировались с использованием различных антитромбоцитарных агентов [28][40-43]. Однако действие аспирина и антагонистов рецептора P2Y₁₂ исследовалась главным образом с добавлением арахидоновой кислоты и АДФ, соответственно [28][40][41]. В настоящей работе эти агонисты не использовались, однако синтез ТХА₂ и высвобождение АДФ из плотных гранул может быть вызвано активацией тромбоцитов тромбином или тромбином + коллаген. Уменьшение генерации тромбина тикагрелором и неэффективность аспирина подтвердили результаты, полученные в тесте рекальцификации плазмы, указывающие, что АДФ, но не ТХА₂ участвует в реализации тромбоцитами коагуляционной активности. Ранее было показано [44], что генерация тромбина в ОТП у пациентов на двойной антитромбоцитарной терапии (аспирин+клопидогрел) ниже, чем у здоровых доноров. Это указывает на то, что сочетание аспирина и ингибитора рецептора P2Y₁₂ (в данном случае клопидогрела) может подавлять генерацию тромбина не только *in vitro*, но и при приеме их пациентами. Наши результаты с блокатором ГП IIb-IIIa руциромабом подтверждают, что этот тип антитромбоцитарных препаратов способен ингибировать генерацию тромбина, что ранее было продемонстрировано для другого производного антител абциксимаба [42][43], а также для низкомолекулярных блокаторов ГП IIb-IIIa (пептид эптифибатид и пептидомиметик тирофибан) [43].

Исследуя эффекты антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами ФС, было обнаружено, что, как и в тесте рекальцификации и ТГТ, тикагрелор, руциромаб, ПГЕ1, но не аспирин достоверно снижали уровень экспонирования ФС тромбоцитами, активированными экзогенным тромбином или сочетанием экзогенный тромбин + коллаген. Другие исследователи [29] также обнаружили, что *in vitro* аспирин не оказывает

эффект на образование т.н. «укутанных» тромбоцитов, экспонирующих ФС (и некоторые другие маркеры). В то же время в работе других авторов [45] был выявлен значительный эффект аспирина на такие тромбоциты при приеме препарата пациентами. Такое различие между эффектами аспирина *in vitro* и *in vivo* на данный момент неясно и нуждается в дополнительных исследованиях. Действие тикагрелора на экспонирование ФС согласуется с уже существующими исследованиями [29][46], однако в них исследовались другие ингибиторы рецептора P2Y₁₂. Противоречивые данные наблюдаются при исследовании эффектов антагонистов ГП IIb/IIIa. В различных работах наблюдалось снижение [43][38][39][47], отсутствие эффекта [48] и даже парадоксальное усиление [38][39][49] экспонирования ФС. Однако такая стимуляция наблюдалась только при использовании низкомолекулярных соединений [38][39][49] и не во всех исследованиях [43], в то время как производные антител демонстрировали ингибиторную активность [38][39][47], что согласуется с нашими результатами с использованием руциромаба.

Для демонстрации эффектов антитромбоцитарных препаратов на экспонирование тромбоцитами ФС не только *in vitro*, но и *in vivo*, было проведено пилотное исследование, в котором участвовали пациенты с ОКС, принимающие двойную антитромбоцитарную терапию - аспирин + тикагрелор. Уровень экспонирования ФС на поверхности тромбоцитов в цельной крови у таких пациентов оказался достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев, не принимающих антитромбоцитарные препараты. Эти данные указывают на то, что антитромбоцитарные препараты могут снижать прокоагулянтную активность тромбоцитов не только *in vitro*, но и при приеме пациентами. Определение того, какой из компонентов двойной антитромбоцитарной терапии (аспирин, тикагрелор или оба препарата) играет более значимую роль, требует дальнейших исследований.

5.3. Исследование прокоагулянтных свойств тромбоцитарных микрочастиц

Известно, что не только сами активированные тромбоциты, но и высвобождаемые ими МЧ, способны ускорять коагуляционные реакции. Эта способность у тромбоцитарных МЧ (не содержащих тканевого фактора) обусловлена наличием на их поверхности ФС, который является платформой для сборки коагуляционных комплексов [36][52]. В настоящей работе мы попытались сравнить коагуляционные свойства МЧ тромбоцитов, продуцируемых при их активации различными индукторами. Количество продуцируемых тромбоцитами МЧ ожидаемо зависело от силы индуктора – оно было максимальным при действии A23187, ниже при активации коллагеном, TRAP и арахидоновой кислотой и минимальным при активации АДФ (сравнимо со спонтанной активацией тромбоцитов без добавления индукторов). Однако, оказалось, что качественно, по своим коагуляционным свойствам, эти МЧ не отличались друг от друга. Их эффекты на образование фибрина в тесте рекальцификации плазмы зависели исключительно от их количества, а содержание ФС на их поверхности было одинаковым вне зависимости от используемого индуктора при активации тромбоцитов. Таким образом мы впервые показали, что свойства МЧ тромбоцитов и очевидно процесс их образования не отличаются при разных способах активации тромбоцитов (индукторы с разным механизмом действия).

6. ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный метод оценки эффектов тромбоцитов на ключевые коагуляционные реакции - образование фибрина и генерацию тромбина. В тесте рекальцификации плазмы и генерации тромбина использовали неактивированные или активированные тромбоциты, предварительно осажденные на дно 96-луночного микропланшета. Иммобилизация тромбоцитов в виде монослоя на поверхности пластика позволяла исключить влияние агрегации тромбоцитов, а также влияние мембранных МЧ, продуцируемых активированными тромбоцитами, на коагуляционные реакции.
2. Активированные тромбоциты ускоряют образование фибрина и генерацию тромбина. Наибольший эффект достигается при активации тромбоцитов кальциевым ионофором A23187, меньший при активации коллагеном и арахидоновой кислотой, минимальный при активации АДФ. Пептид, активирующий рецептор тромбина не влиял на прокоагулянтные реакции тромбоцитов, предположительно, вследствие конкуренции с эндогенным тромбином, образующимся в плазме при запуске коагуляционных реакций.
3. Эффекты тромбоцитов на образование фибрина и генерацию тромбина при активации разными агонистами коррелировали друг с другом и определялись уровнем экспонирования фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов.
4. В условиях *in vitro* антагонист P2Y₁₂ рецептора АДФ тикагрелор, ингибитор ГП IIb-IIIa руциромаб, и активатор аденилатциклазы простагландин E₁, но не ингибитор циклооксигеназы аспирин достоверно снижали прокоагулянтные свойства тромбоцитов, частично ингибируя их способность ускорять образование фибрина, генерацию тромбина и уменьшая уровень экспонирования фосфатидилсерина на их поверхности.
5. Уровень экспонирования фосфатидилсерина на поверхности активированных тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом, получающих двойную антитромбоцитарную терапию (аспирин + тикагрелор), был достоверно ниже, чем у здоровых доноров.

6. При активации тромбоцитов разными индукторами они продуцируют различное количество мембранных микрочастиц – наибольшее количество при активации кальциевым ионофором A23187, меньше при активации пептидом, активирующим рецептор тромбина, арахидоновой кислотой и коллагеном и минимальное при активации АДФ. Способность тромбоцитарных микрочастиц ускорять образование фибрина в тесте рекальцификации зависела исключительно от их количества. При разных способах активации тромбоциты продуцировали микрочастицы с одинаковой удельной коагуляционной активностью и одинаковым уровнем экспонирования фосфатидилсерина на их поверхности.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thon J.N., Italiano J.E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(210):3-22
2. Eckly A., Heijnen H., Pertu F. et al. Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes. *Blood*. 2014 Feb 6;123(6):921-30.
3. Battinelli E.M., Hartwig J.H., Italiano J.E. Jr. Delivering new insight into the biology of megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2007 Sep;14(5):419-26.
4. Machlus K.R., Italiano J.E. Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013 Jun 10;201(6):785-96
5. Allan H.E., Vadgama A., Armstrong P.C. et al. Platelet ageing: A review. *Thromb Res*. 2022 Dec 16;S0049-3848(22)00481-9.
6. Reddy E.C., Rand M.L. Procoagulant Phosphatidylserine-Exposing Platelets in vitro and in vivo. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Mar 3;7:15.
7. Choi E., Nichol J., Hokom M. et al. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995;85(2):402–413.
8. Kosaki G. Platelet production by megakaryocytes: Protoplatelet theory justifies cytoplasmic fragmentation model. *Int J Hematol*. 2008;88(3):255–267.
9. Selvadurai M.V., Hamilton J.R. Structure and function of the open canalicular system - the platelet's specialized internal membrane network. *Platelets*. 2018 Jun; 29(4):319-325.
10. Структура и морфология тромбоцитов / Мазуров А. В. // Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. - С. 33-51.
11. Italiano J. E. The structure and production of blood platelets/ In: platelets in hematologic and cardiovascular disorders/Eds. P. Gesele, V. Fuster, J.A. Lopez, C.P. Page, J. Vermynen. – Cambridge: Cambridge University Press, 2008. – P. 1-20.
12. Blair P., Flaumenhaft R. Platelets α -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood. Rev.* – 2009. – Vol. 23. – P. 177-189.
13. Safer D, Nachmias V.T. Beta thymosins as actin binding peptides. *Bioessays*. 1994 Jul; 16(7):473-9.
14. Hartwig J.H., DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol*, 1991; 112:407–425
15. Schmuckenschlager A., Pirabe A., Assinger A. et al. Platelet count, temperature and pH value differentially affect hemostatic and immunomodulatory functions of platelets. *Thromb Res*, 2023 Jan 27; 223:111-122.
16. Pignatelli P., Pulcinelli F.M., Ciatti F. et al. Acid citrate dextrose (ACD) formula A as a new anticoagulant in the measurement of in vitro platelet aggregation. *J Clin Lab Anal*, 1995; 9(2):138-40.

17. Greco N.J., Tenner T.E. Jr., Tandon N.N. et al. PPACK-thrombin inhibits thrombin-induced platelet aggregation and cytoplasmic acidification but does not inhibit platelet shape change. *Blood*, 1990 May 15;75(10):1989-90.
18. Коагулогические исследования / Гильманов А.Ж., Вавилова Т.В., Мамаев А.Н.// Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство. Т.1. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – С. 749-815.
19. Chen F., Zhang L., Xiaolin B. et al. Clinical Application of Thromboelastography in Acute Ischemic Stroke. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2022 Jan-Dec; 28:
20. Kim M.Y., Han H.J. Dose-dependent effect of canine lyophilized platelet on an in vitro hemodilution model. *BMC Vet Res*, 2023 Mar 17;19(1):61.
21. Cao Y., Liang T., Peng J. et al. Factors influencing thromboelastography in pregnancy. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2023 Feb 28;48(2):198-205.
22. Rizvi G., Marcinkowski B., Srinivasa N. et al. Impact on Blood Product Utilization with Thromboelastography Guided Resuscitation for Gastrointestinal Hemorrhage. *J Intensive Care Med*. 2023 Apr; 38(4):368-374.
23. Mazurov A. V., Vinogradov D. V., Vlasik T. N. et al. Characterization of an antiglycoprotein Ib monoclonal antibody that specifically inhibits platelet-thrombin interaction // *Thrombosis Research*. – 1991. – №62. – P. 673-684.
24. Shena C-L., Wu Y-F. Flow cytometry for evaluating platelet immunophenotyping and function in patients with thrombocytopenia. *Tzu Chi Med J*. 2022 Oct-Dec; 34(4): 381–387.
25. Mazurov A.V., Pevzner D.V., Antonova O.A. et al. Safety, inhibition of platelet aggregation and pharmacokinetics of Fab'2 fragments of the anti-glycoprotein IIb-IIIa monoclonal antibody FRaMon in high-risk coronary angioplasty. *Platelets*. 2002 Dec;13(8):465-77.
26. Koupenova M., Kehrel B.E., Corkrey H.A. et al. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J*. 2017 Mar 14;38(11):785-791.
27. Vanschoonbeek K., Feijge M.A.H., Van Kampen R.J.W. et al. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost*. 2004 Mar;2(3):476-84.
28. Altman R., Scazziotto A., DE Lourdes Herrera M. et al. Recombinant factor VIIa reverses the inhibitory effect of aspirin or aspirin plus clopidogrel on in vitro thrombin generation. *J Thromb Haemost*. 2006 Sep;4(9):2022-7.
29. Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5' diphosphate acting via the P2Y12 receptor. *J Thromb Haemost* 2008; Vol. 6: P. 1603–5.
30. Muravlev I.A., Antonova O.A., Golubeva N.V. et al. Platelets activated by different agonists produce microparticles with the same procoagulant properties. *Thromb Res*. 2021 Sep 30;207:123-125.

31. Gremmel T., Frelinger A.L. 3rd., Michelson A.D. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016 Apr;42(3):191-204.
32. Gasa N., Meiring M. Microparticles: a link to increased thrombin generation. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2021 Apr 1;32(3):204-208.
33. Fraker P.J., Speck J.C. Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978 Feb 28;80(4):849-57.
34. Didelot M., Docq C., Wahl D. et al. Platelet aggregation impacts thrombin generation assessed by calibrated automated thrombography. *Platelets.* 2018 Mar;29(2):156-161.
35. Aleman M.M., Gardiner C., Harrison P. et al. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J Thromb Haemost.* 2011 Nov;9(11):2251-61.
36. Khaspekova S.G., Antonova O.N., Shustova O.N. et al. Activity of Tissue Factor in Microparticles Produced in vitro by Endothelial Cells, Monocytes, Granulocytes, and Platelets. *Biochemistry (Mosc).* 2016 Feb;81(2):114-21.
37. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y. et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.* 2007 Mar; 97(3):425-34.
38. Goto S., Tamura N., Li M. et al. Different effects of various anti-GPIIb-IIIa agents on shear-induced platelet activation and expression of procoagulant activity. *J. Thromb Haemost* 2003, 1, 2022–2030.
39. Ramström S., Rånby M., Lindahl T.L. Platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in clotting whole blood—different effects of collagen, TRAP and calcium ionophore A23187. *Thromb Haemost* 2003, 89, 132–141.
40. Altman R., Scazziotto A., Rouvier J. et al. Effect of sodium arachidonate on thrombin generation through platelet activation—inhibitory effect of aspirin. *Thromb. Haemost.* 2000, 84, 1109–1112.
41. Van der Meijden P.E.J., Schoenwaelder S.M., Feijge M.A.H. et al. Dual P2Y₁₂ receptor signaling in thrombin-stimulated platelets—involvement of phosphoinositide 3-kinase but not isoform in Ca²⁺ mobilization and procoagulant activity. *FEBS J.* 2008, 275, 371–385.
42. Reverter J.C., Béguin S., Kessels H. et al. Inhibition of platelet-mediated tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and “clinical restenosis”. *J Clin Investig* 1996, 98, 863–874.
43. Van der Meijden P.E.J., Feijge M.A.H., Swieringa F. et al. Key role of integrin α IIb β ₃ signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cell Mol. Life Sci.* 2012, 69, 3481–3492.
44. Berezovskaya G., Smirnova O., Malev E. et al. Thrombin generation test for evaluation of antiplatelet treatment in patients with coronary artery disease after percutaneous coronary intervention. *Platelets* 2018, 29, 185–191.

45. Prodan C.I., Joseph P.M., Vincent A.S. et al. Coated-platelet levels are influenced by smoking, aspirin, and selective serotonin reuptake inhibitors. *J. Thromb. Haemost.* 2007, 5, 2149–2151.
46. Léon C., Ravanat C., Freund M. et al. Differential Involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol* 2003, 23, 1941–1947.
47. Pedicord D.L., Thomas B.E., Mousa S.A. et al. Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists inhibit the development of platelet procoagulant activity. *Thromb. Res.* 1998, 90, 247–258.
48. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A. et al. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br J Haematol.* 2012, 157, 105–115.
49. Jones M.L., Harper M.T., Aitken E.W. et al. RGD-ligand mimetic antagonists of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ paradoxically enhance GPVI-induced human platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* 2010, 8, 567–576.
50. Thiagarajan P., Tait J.F. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem.* 1990; 265: 17420-17423.
51. Rukoyatkina N., Shpakova V. Panteleev M. et al. Multifaceted effects of arachidonic acid and interaction with cyclic nucleotides in human platelets. *Thromb Res.* 2018; 171: 22-30.
52. Антонова О.А., Якушкин В.В., Мазуров А.В. Коагуляционная активность мембранных микрочастиц. *Биологические мембраны.* 2019, том 36, № 3, с. 155–175
53. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ.* 2013. 3, 329–340.
54. Li X., Wang Q. Platelet-Derived Microparticles and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun; 24(12): 10275.
55. Ridger V.C., Boulanger C.M., Angelillo-Scherrer A. et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb Haemost.* 2017 Jun 28;117(7):1296-1316
56. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V. et al. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: impact of active tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2017 Jul;28(5):373-382.
57. Lipets E.N., Antonova O.A., Shustova O.N. et al. Use of Thrombodynamics for revealing the participation of platelet, erythrocyte, endothelial, and monocyte microparticles in coagulation activation and propagation. *PLoS One.* 2020 May 29;15(5):e0227932

58. Tripisciano C., Weiss R., Eichhorn T. et al. Different Potential of Extracellular Vesicles to Support Thrombin Generation: Contributions of Phosphatidylserine, Tissue Factor, and Cellular Origin. *Sci Rep*. 2017 Jul 26;7(1):6522.
59. Miyazaki Y., Nomura S., Miyake T. et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996. 88, 3456–3464.
60. Chow T.W., Hellums J.D., Thiagarajan P. Thrombin receptor activating peptide (SFLLRN) potentiates shear-induced platelet microvesiculation. *J. Lab. Clin. Med*. 2000. 135, 66–72.
61. Trenk D., Hille L., Leggewie S. et al. Antagonizing P2Y₁₂ Receptor Inhibitors: Current and Future Options. *Thromb Haemost*. 2019 Oct;119(10):1606-1616.
62. Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007; 5:45-55.
63. Storey R.F., Angiolillo D.J., Patil S.B. et al. Inhibitory effects of ticagrelor compared with clopidogrel on platelet function in patients with acute coronary syndromes: the PLATO (PLATElet inhibition and patient Outcomes) PLATELET substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Oct 26;56(18):1456-62.
64. Gurbel P.A., Blinden K.P., Butler K. et al. Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study. *Circulation*. 2010 Mar 16;121(10):1188-99.
65. Cattaneo M. P2Y₁₂ Antagonists. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 937–956.
66. Mattheij N.J.A., Gilio K., van Kruchten R. et al. Dual mechanism of integrin α IIb β 3 closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13325-36
67. Spinthakis N., Farag M. Gue Y.X. et al. Effect of P2Y₁₂ inhibitors on thrombus stability and endogenous fibrinolysis. *Thromb Res*. 2019 Jan;173:102-108.
68. Smith S.A., Morrissey J.H. Interactions between Platelets and the Coagulation System. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 393-400.
69. Тромбоциты и свертывание крови / Мазуров А. В. // Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. - С. 196-205
70. Obydenny S.I., Sveshnikova A.N, Ataullakhanov F.I. et al. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost*. 2016 Sep;14(9):1867-81.
71. Houdijk W.P., de Groot P.G., Nievelstein P.F. et al. Subendothelial proteins and platelet adhesion. von Willebrand factor and fibronectin, not thrombospondin, are involved in platelet adhesion to extracellular matrix of human vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis*. 1986 Jan-Feb;6(1):24-33.

72. Sang Y., Roest M., de Laat B. et al. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev.* 2021 Mar;46:100733.
73. Broos K. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011 Jul;25(4):155-67.
74. Duga S., Asselta R., Tenchini M.L. Coagulation factor V. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Aug;36(8):1393-9.
75. Thomas S.G. The Structure of Resting and Activated Platelets. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 47-77.
76. Diacovo T.G., Puri K.D., Warnock R.A. et al. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):252-5.
77. Функциональные реакции тромбоцитов / Мазуров А. В. // Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. - С. 144-171
78. Smith S.A., Travers R.J., Morrissey J.H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(4):326-36.
79. Hemker H.C., Dieri R.A., Béguin S. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol.* 2004 May;11(3):170-5.
80. Salvagno G.L., Berntorp E. Thrombin Generation Assays (TGAs). *Methods Mol Biol.* 2017;1646:515-522.
81. Onasoga-Jarvis A.A., Leiderman K., Fogelson A.L. et al. The Effect of Factor VIII Deficiencies and Replacement and Bypass Therapies on Thrombus Formation under Venous Flow Conditions in Microfluidic and Computational Models. *PLoS One.* 2013 Nov 13;8(11):e78732.
82. Schoeman R.M., Lehmann M., Neeves K.B. Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders. *Platelets.* 2017 Jul;28(5):463-471.
83. Matskeplishvili S., Kontsevaya A. Cardiovascular Health, Disease, and Care in Russia. *Circulation.* 2021 Aug 24;144(8):586-588.
84. Bledzka K., Qin J., Plow E.F. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 227-241.
85. Perrella G., Nagy M., Steve P Watson S.P. et al. Platelet GPVI (Glycoprotein VI) and Thrombotic Complications in the Venous System. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021 Nov;41(11):2681-2692.
86. Watson S.P., Auger J.M., McCarty O.J.T. et al. GPVI and integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1752-62.
87. Агонисты тромбоцитов и их рецепторы / Мазуров А. В. // Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. - С. 63-92.
88. Han X., Bouck E.G., Zunica E.R. et al. Protease-Activated Receptors. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp 243-257.

89. Mahaut-Smith M.P., Ennion S.J., Rolf M.G. et al. ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br J Pharmacol*. 2000 Sep;131(1):108-14.
90. Cattaneo M. The Platelet P2 Receptors. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp 259-277.
91. Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2281–5.
92. Молекулы клеточной адгезии тромбоцитов. / Мазуров А. В. // *Физиология и патология тромбоцитов*. М.: Литтерра, 2011. - С. 93-143
93. Blair T.A., Frelinger A.L. 3rd. Platelet surface marker analysis by mass cytometry. *Platelets*. 2020 Jul 3;31(5):633-640.
94. Mahtta D., Bavry A.A. α IIb β III (GP IIb-IIIa) Antagonists. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp 957-971.
95. Mangieri A., Gallo F., Sticchi A. et al. Dual antiplatelet therapy in coronary artery disease: from the past to the future prospective. *Cardiovasc Interv Ther*. 2020 Apr;35(2):117-129.
96. Ajani A.E., Lefkovits J. Approaching an age of reason with antiplatelet therapy. *Lancet*. 2008 Apr 19;371(9621):1315-6.
97. Degrauwe S. et al. Dual antiplatelet therapy for secondary prevention of coronary artery disease. *Open Heart*. 2017 Oct 15;4(2):e000651.
98. Kamarova M., Baig S., Patel H. et al. Antiplatelet Use in Ischemic Stroke. *Ann Pharmacother*. 2022 Oct;56(10):1159-1173.
99. Koupenova M., Clancy L., Corkrey H.A. et al. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res*. 2018 Jan 19;122(2):337-351.
100. Paniccia R., Priora R., Liotta A.A. et al. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. 2015 Feb 18;11:133-48.
101. Maia F, Sá FC, Feres F. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in clinical practice. *Arq Bras Cardiol*. 2009 Jan;92(1):68-76.
102. Florescu C. et al. Antiplatelet therapy in secondary ischemic stroke prevention - a short review. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):383-387.
103. Gurbel P.A., Jeong Y-H., Tantry U.S. Phosphodiesterase Inhibitors. In: *Platelets*, 4th ed.; Michelson, A.D., Cattaneo, M., Frelinger, A.L., III, Newman, P.J., Eds.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp 979-989.
104. Jansen E.E., Hartmann M. Clot Retraction: Cellular Mechanisms and Inhibitors, Measuring Methods, and Clinical Implications. *Biomedicines*. 2021 Aug 21;9(8):1064.

105. Cines D.B., Lebedeva T., Nagaswami C. et al. Clot contraction: Compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. 2014;123:1596–1603.
106. Chu Y., Guo H., Zhang Y. et al. Procoagulant platelets: Generation, characteristics, and therapeutic target. *J Clin Lab Anal*. 2021 May;35(5):e23750.
107. Munnix I.C., Kuijpers M.J.E., Auger J. et al. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation: regulation by transient integrin activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2484-2490.
108. Hou J., Fu Y., Zhou J. et al. Lactadherin functions as a probe for phosphatidylserine exposure and as an anticoagulant in the study of stored platelets. *Vox Sang*. 2011 Feb;100(2):187-95.
109. Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J. et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost*. 2005 Nov;3(11):2545-53.
110. Fager A.M., Wood J.P., Bouchard B.A. et al. Properties of procoagulant platelets: defining and characterizing the subpopulation binding a functional prothrombinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Dec;30(12):2400-7.
111. Heemskerk J.W.M., Cosemans J.M.E.M., van der Meijden P.E.G. Platelets and coagulation. In: *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders* (Eds. Gresele et al.). Springer 2017, pp. 447-462;
112. Gerotziafas G.T., Depasse F., Busson J. et al. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thromboscope assay. *Thromb J*. 2005 Oct 26;3:16.
113. Wan J., Konings J., de Laat B. et al. Added Value of Blood Cells in Thrombin Generation Testing. *Thromb Haemost*. 2021 Dec;121(12):1574-1587.
114. Panova-Noeva M., van der Meijden P.E.J., Ten Cate H. Clinical Applications, Pitfalls, and Uncertainties of Thrombin Generation in the Presence of Platelets. *J Clin Med*. 2019 Dec 30;9(1):92.
115. Wielders S.J., Ungethüm L. Reutelingsperger C.P.M. et al. Factor Xa-driven thrombin generation in plasma: dependency on the aminophospholipid density of membranes and inhibition by phospholipid-binding proteins. *Thromb Haemost*. 2007 Nov;98(5):1056-62.
116. Reikvam H., Steien E., Hauge B. et al. Thrombelastography. *Transfus Apher Sci*. 2009 Apr;40(2):119-23.
117. Arima Y., Kaikita K. Ishii M. et al. Assessment of platelet-derived thrombogenicity with the total thrombus-formation analysis system in coronary artery disease patients receiving antiplatelet therapy. *J. Thromb. Haemost*. 2016, 14, 850–859.

118. Heemskerk J.W.M., Mattheij N.J.A., Cosemans J.M.E.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2–16
119. Altman R, Scazziotto AS, de Lourdes Herrera M. et al. Thrombin generation by activated factor VII on platelet activated by different agonists. Extending the cell-based model of hemostasis. *Thromb J*. 2006 Apr 21;4:5.
120. Kempton L.C., Hoffman M., Roberts H.R. et al. Platelet heterogeneity: variation in coagulation complexes on platelet subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Apr;25(4):861-6.
121. Антитромбоцитарные препараты / Мазуров А. В. // Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. - С. 328-390.
122. Jiang D-T., Tuo L., Bai X. et al. Prostaglandin E1 reduces apoptosis and improves the homing of mesenchymal stem cells in pulmonary arterial hypertension by regulating hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Jul 16;13(1):316.
123. Bodrova V.V., Shustova O.N., Khaspekova S.G. et al. Platelet reticulated forms, size indexes and functional activity. Interactions in healthy volunteers. *Platelets*. 2022 Apr 3;33(3):398-403.
124. Swieringa F., Baaten C.C.F.M.J., Verdoold R. et al. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016; 36: 692-699.
125. Brouns S.L.N., van Geffen J.P., Campello E. et al. Platelet-primed interactions of coagulation and anticoagulation pathways in flow-dependent thrombus formation. *Sci Rep* 2020; 10: 11910.
126. Navarro S., Stegner D., Nieswandt B. et al. Temporal roles of platelet and coagulation pathways in collagen- and tissue factor-induced thrombus formation. *Int J Mol Sci* . 2021; 23 (1): 358.
127. Racine-Brzostek S.E., Asmis L.M. Assessment of platelet function utilizing viscoelastic testing. *Transfusion* 2020; 60 Suppl 6: S10-S20.
128. Walsh P.N. Platelet Coagulation-Protein Interactions. *Semin Thromb Hemost*. 2004 Aug;30(4):461-71