

Исследование коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов методом малоуглового светорассеяния

Г.С. Свидельская,^{1,2,3,*} Е.Н. Брускова,^{4,†} А.А. Игнатова,^{3,‡} А.А. Филькова,³
 П.А. Жарков,³ И.В. Миндукшев,⁵ С.П. Гамбарян,⁵ М.А. Пантелеев^{1,2,3}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
 физический факультет, кафедра медицинской физики
 Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН
 Россия, 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30

³ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
 Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, д. 1

⁴ГБУЗ МО Щелковская больница. Россия, 141190, Московская область, г. Фрязино, ул. Московская, д. 7

⁵Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук
 Россия, 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

(Поступила в редакцию 06.09.2024; после доработки 15.11.2024; подписана в печать 09.12.2024)

Оценка функции тромбоцитов имеет ключевое значение для диагностики нарушений свертываемости крови и мониторинга эффективности антиагрегантных препаратов. Сравнительно недавно был разработан метод оценки агрегации тромбоцитов, основанный на явлении малоуглового рассеяния света. Измерения проводятся в среде с известным значением pH и концентрации кальция. Целью данной работы было исследование влияния преаналитических и аналитических переменных, а также сопоставление результатов с уже широко используемым в клинической практике методом световой трансмиссионной агрегометрии. Было выявлено, что перевозка образца на автомобиле в течение двух часов не оказывает влияния на параметры коллаген-индуцированной агрегации. Было обнаружено, что метод малоуглового светорассеяния для измерения коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов обладает хорошей прецизионностью в условиях повторяемости и является отдаленно воспроизводимым. Параметры агрегации, полученные методом малоуглового светорассеяния, прямо коррелируют с параметрами агрегации, измеренными методом трансмиссионной агрегометрии. Показана ускоряющая роль секретируемого из плотных гранул аденозиндифосфата на коллаген-индуцируемую агрегацию тромбоцитов.

RACS: 42.62 Ve, 87.18.Ed УДК: 53.06, 53.08

Ключевые слова: тромбоцит, функции тромбоцитов, агрегация, оптические устройства, лазер.

DOI: [10.55959/MSU0579-9392.80.2520702](https://doi.org/10.55959/MSU0579-9392.80.2520702)

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты представляют собой безъядерные дискообразные клеточные фрагменты размером 2–3 мкм [1] со средним объемом фемтолитров [2]. Они циркулируют в кровотоке в концентрации 150–400 тысяч в микролитре [3]. Тромбоциты отвечают за процесс остановки кровотечения — гемостаз [4]. Они прикрепляются к месту повреждения сосуда и формируют гемостатическую «пробку» — агрегат [5]. Тромбоциты играют ключевую роль как в нормальном гемостазе, так и при патологических состояниях, кровотечениях и тромбозах, которые часто связаны именно с нарушением функции тромбоцитов [6]. В настоящее время ишемическая болезнь сердца составляет значительную долю смертности населения Российской Феде-

рации [7]. Оценка функции тромбоцитов применяется для диагностики нарушений тромбоцитарного гемостаза, а также для мониторинга антиагрегантной терапии, которая является стандартным компонентом лечения любого типа острого коронарного синдрома [8]. К методам исследования тромбоцитарного звена гемостаза относят: метод импедансной агрегометрии, метод флуктуации светопропускания, турбидиметрический метод и др. Импедансная агрегометрия, разработанная в начале 1980-х годов, позволяет изучать агрегацию тромбоцитов в цельной крови без предварительной пробоподготовки. Метод основан на измерении электрического сопротивления между двумя платиновыми электродами, погруженными в перемешиваемую цельную кровь [9]. При добавлении агониста тромбоциты агрегируют и прикрепляются к электродам, вызывая изменения в электрическом импедансе, которые затем преобразуются в детекцию агрегации [4]. К преимуществам этого метода относят возможность оценки функции тромбоцитов в липемической крови. Однако тест не реализуем при очень

* E-mail: galya.svidelskaya@mail.ru

† E-mail: lena137975@yandex.ru

‡ E-mail: procyonnlotor@gmail.com

низком количестве тромбоцитов [10]. Также к принципиальным недостаткам этого метода относят налипание на электроды не только тромбоцитов, но и белков плазмы [6].

Метод флуктуаций светопропускания (ФСП-метод) был предложен З.А. Габбасовым. Принцип этого метода основан на анализе флуктуаций светового потока, проходящего сквозь образец крови [6]. Относительная дисперсия ФСП пропорциональна среднему размеру (радиусу) частиц в анализируемой суспензии, и именно этот параметр, т.е. размер агрегатов (в относительных единицах), и определяется в ходе измерения. К достоинствам метода относят высокую чувствительность к детекции эффектов, обусловленных низкими дозами агонистов, а также возможность регистрации спонтанной агрегации [11]. К недостаткам метода относят относительно высокую погрешность, связанную с высокой чувствительностью к помехам [6].

В настоящее время тестом — «золотым стандартом» для оценки функции тромбоцитов — является световая трансмиссионная агрегометрия (СТА) [12, 13]. Этот метод основан на регистрации изменений светопропускания в суспензии тромбоцитов [14]. Эти изменения обусловлены снижением светорассеяния и увеличением прозрачности суспензии в процессе образования тромбоцитарных агрегатов после добавления агониста [15]. Оптическая агрегометрия предоставляет информацию об агрегации и дезагрегации тромбоцитов, однако имеет некоторые ограничения, такие как отсутствие стандартизации [16], нефизиологичность и трудоемкость процедуры подготовки пробы. Помимо прочего, метод СТА для оценки агрегации тромбоцитов требует сравнительно большого объема образца [17]. Для исследования агрегации методом оптической агрегометрии необходимо, чтобы концентрация тромбоцитов в крови была не менее 150 тыс. тромбоцитов/мкл, таким образом, анализ не проводят у пациентов, страдающих тромбоцитопенией.

Наиболее современным, но наименее проработанным методом оценки функции тромбоцитов является метод малоуглового светорассеяния, реализованный на лазерном анализаторе LaSca (low angle light scattering, ЛАСКА). Метод основан на явлении малоуглового светорассеяния на сферической частице, размер которой больше длины волны падающего света (теория светорассеяния Ми с приближением Фраунгофера). Это устройство позволяет оценить агрегацию (образование димеров и тримеров) и изменение формы тромбоцитов при их активации. Принцип действия прибора ЛАСКА таков: луч лазера падает на кювету с разбавленной суспензией тромбоцитов, рассеянный свет детектируется массивом фотодиодов, затем сигнал передается на компьютер (рис. 1) [18].

На основании полученных кривых светорассеяния оцениваются максимальная скорость агрегации тромбоцитов V_{max} , амплитуда агрегации $\Delta I(1)$, амплитуда изменения формы тромбоцитов $\Delta I(2)$, а также лаг-фаза t_{lag} (время задержки агрегации)

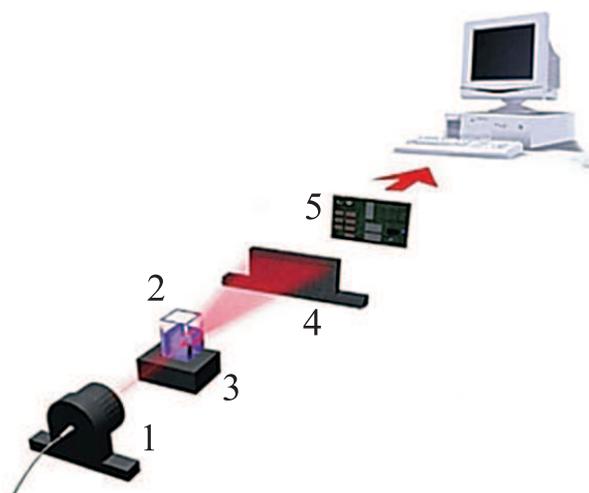


Рис. 1. Схема установки, регистрирующей малоугловое светорассеяние. 1 — Источник света (лазерный диод с коллиматором, длина волны 670 нм); 2 — прозрачная кювета с перемешивающим устройством-якорем; 3 — магнитная термостатируемая мешалка; 4 — массив фотодиодов; 5 — аналого-цифровой преобразователь. Рисунок заимствован из [18]

и время свертывания t_{clot} . По сравнению со световой трансмиссионной агрегометрией метод ЛАСКА обладает рядом преимуществ: требует меньшего объема крови, что критически важно при исследовании педиатрических пациентов, обеспечивает возможность анализа при тромбоцитопении, а также работает при физиологической концентрации ионов кальция. Метод ЛАСКА может быть использован для анализа суспензии, содержащей не менее 10 тыс. тромбоцитов/мкл [18], что на порядок меньше чем в методе СТА. Новая модификация прибора позволяет оценивать не только агрегацию тромбоцитов и изменение их формы, но и уровень внеклеточного кальция [19]. Метод ЛАСКА уже был применен для оценки влияния липополисахаридов на образование тромбоцитарных агрегатов [20], а также для оценки функции тромбоцитов у пациентов с капошиформной гемангиоэндотелиомой/синдромом Казабаха–Меритт [21]. С помощью метода ЛАСКА был проведен анализ агрегации тромбоцитов у пациентов онкологического профиля на химиотерапии [22]. С помощью данного метода было впервые показано, что ускорение агрегации при гипотермических условиях непосредственно связано с увеличением уровня внеклеточного кальция [19]. Кроме того, метод ЛАСКА был использован для характеристики ингибирования тромбоцитов уже используемым в клинике NO-независимым стимулятором растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) риоцигуатом [23], NO- и гем-независимым активатором рГЦ [24]. Однако настоящий метод до сих пор остается слабо охарактеризованным и апробированным для применения в клинической практике. Поэтому целью данной работы является апробация метода ЛАСКА для измерения аг-

регации тромбоцитов у здоровых взрослых, а также пациентов с кровоточивостью при активации тромбоцитов коллагеном.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Пациенты

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено Этическим комитетом Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии (протокол № 2/1-20 от 03.08.2020). В исследование включены здоровые взрослые добровольцы ($n = 20$, 12 мужчин, 8 женщин, возраст 18–40 лет, без хронических заболеваний), педиатрические пациенты с геморрагическим синдромом ($n = 10$, возраст 5–16 лет, 3 мальчика, 7 девочек), а также брат (8 лет) и сестра (9 лет) с дефицитом плотных гранул тромбоцитов — синдромом Германского–Пудлака (ГП). Диагноз установлен по результатам молекулярно-генетического исследования.

1.2. Протокол исследования агрегации тромбоцитов методом ЛАСКА

Цельную кровь здоровых добровольцев забирали в 3-миллилитровые вакуумные пробирки (S-Monovette, Sarstedt AG&Co., Germany) с 3.2%-м раствором цитрата натрия (соотношение кровь:цитрат — 9:1). Для получения богатой тромбоцитами плазмы (БТП) кровь центрифугировали 8 мин при $100 \times g$. БТП оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Затем БТП разбавляли до 10×10^3 тромбоцитов/мкл модифицированным буфером HEPES (140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 2.0 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM глюкозы, pH=7.4, все реагенты производства Sigma-Aldrich, США). Исследования агрегации методом малоуглового светорассеяния проводились на лазерном анализаторе частиц ЛАСКА-ТМ (Биомедицинские системы, Санкт-Петербург, Россия) при температуре в кювете 23°C и перемешивании 1200 об/мин. Для обработки данных использовалось оригинальное программное обеспечение LaSca_32 (ООО «БиоМедСистемы», Санкт-Петербург, Россия). Максимальную скорость агрегации тромбоцитов V_{max} рассчитывали как тангенс угла наклона кривой интенсивности светорассеяния на 1° за 60 с (рис. 2). Амплитуду агрегации $\Delta I(1)$ и изменения формы тромбоцитов $\Delta I(12)$ вычисляли как разность между интенсивностями светорассеяния на базовом уровне и максимальном на 1° и 12° соответственно. Время, за которое интенсивность светорассеяния на 1° увеличивалась на 3% после добавления активатора, обозначили лаг-фазой t_{lag} . Время свертывания t_{clot} — временной интервал между моментом инициации агрегации

и моментом времени, когда светорассеяние снизилось до 0 отн. ед. Измерение концентрации тромбоцитов проводилось на проточном цитофлуориметре Novocyte (Acea Bioscience, США). Тромбоциты активировали 0.4 мг/мл коллагена.

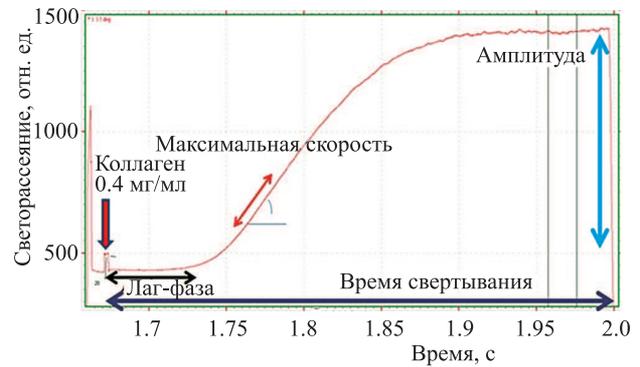


Рис. 2. Характерный вид зависимости интенсивности светорассеяния от времени при коллаген-индуцируемой агрегации тромбоцитов и характерные параметры. Рассчитываются максимальная скорость агрегации, амплитуда агрегации, лаг-фаза и время свертывания. Максимальную скорость V_{max} рассчитывали — тангенс угла наклона кривой интенсивности светорассеяния на 1° за 60 с. Амплитуда интенсивности светорассеяния — разность между интенсивностями светорассеяния на базовом уровне и максимальном. Время, за которое интенсивность светорассеяния на 1° увеличивалась на 3% после добавления активатора, обозначили лаг-фазой t_{lag} . Время свертывания t_{clot} — временной интервал между моментом инициации агрегации и моментом времени, когда светорассеяние снизилось до 0 отн. ед.

1.3. Методики экспериментов

Для оценки прецизионности метода была проанализирована степень близости друг к другу измерений, полученных в условиях одной аналитической серии, в пределах часового интервала, одним оператором. Был рассчитан коэффициент вариации (CV) как отношение стандартного отклонения к среднему для всех параметров агрегации.

Для оценки отдаленной воспроизводимости результатов исследования здоровые добровольцы были приглашены на исследование агрегации дважды с интервалом в неделю ($n = 5$).

Для оценки влияния транспортировки образца сравнивали результаты, полученные на цельной крови здоровых добровольцев ($n = 5$) до и после транспортировки образца в термостатируемом контейнере в течение двух часов на наземном транспорте.

Для изучения влияния секретируемого аденозиндифосфата (АДФ) на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов, тромбоциты инкубировали с аспиразой (100 ед. акт./мл).

1.4. Протокол исследования агрегации тромбоцитов методом агрегометрии по Борну

Для получения БТП цельную кровь центрифугировали при 200 g в течение 7 мин. Из каждой пробирки осторожно отбирали супернатант (500 мкл БТП). Обедненную тромбоцитами плазму (ОТП) получали повторным центрифугированием оставшегося образца при $2000 \times g$ в течение 15 мин. БТП разводили в ОТП до 200 тыс. тромбоцитов/мкл. Для калибровки прибора использовали 200 мкл ОТП.

В измерительную кювету помещали 200 мкл БТП и магнитный якорь (скорость перемешивания 800 оборотов в мин). Затем образец термостатировали в измерительной ячейке при 37°C не менее 3 мин. Процесс агрегации индуцировался коллагеном в концентрации 2 мг/мл. Оценку степени агрегации проводили по кривой светопропускания в %. Агрегация тромбоцитов наблюдалась методом световой турбидометрической агрегометрии на приборе Viola LA-230.

1.5. Статистика

Для оценки достоверных различий в парных измерениях был использован парный t -критерий (уровень значимости $p < 0.05$). Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовался критерий Манна–Уитни. Корреляцию параметров оценивали коэффициентом Пирсона. Результаты анализировались программным обеспечением OriginPro v.8.5 (OriginLab Corporation, США) и были представлены в виде среднего (по меньшей мере 3 повторных измерений) \pm стандартное отклонение (SD), если не указано другое.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Оценка прецизионности метода малоуглового светорассеяния в условиях повторяемости результатов измерений

Для описания точности результатов по измерению коллаген-индуцируемой агрегации методом ЛАСКА была поставлена задача об оценке прецизионности метода малоуглового светорассеяния в условиях повторяемости результатов измерений. Для решения данной задачи мы повторили на одном доноре последовательно один и тот же эксперимент трижды в течение одной аналитической серии. Рассчитанные коэффициенты вариации (CV) для всех параметров агрегации представлены в табл. 1.

Выяснено, что коэффициент вариации для V_{max} составил 3.5%, для $\Delta I(1)$ — 1.8%, для $\Delta I(12)$ — 2.3%, время свертывания воспроизвелось с точностью в 2.2%, а лаг-фаза варьировалась при повторных измерениях с разбросом в 1%. Таким обра-

зом, оценена изменчивость результатов и полученные данные могут быть использованы для практической интерпретации измерений.

2.2. Оценка воспроизводимости результатов исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом ЛАСКА

Одной из характеристик любого диагностического метода, определяющей его ценность, является воспроизводимость полученных при его использовании результатов. Для введения метода ЛАСКА в клиническую практику, а также для исследовательских целей была поставлена задача об оценке воспроизводимости результатов исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом ЛАСКА в течение недели. На рис. 3 отражены результаты серии экспериментов для оценки воспроизводимости параметров агрегации тромбоцитов, стимулированных коллагеном. Максимальная скорость агрегации V_{max} (рис. 3, а) воспроизводится в рамках недели наблюдения: 2.3 ± 2.0 отн.ед./с в день 1 и 1.7 ± 0.7 отн.ед./с (среднее \pm среднеквадр. откл.) на 8-й день. Амплитуда коллаген-индуцированной агрегации $\Delta I(1)$ остается неизменной: в 1-й день наблюдения она составила 790 ± 140 отн.ед., а на 8-й день наблюдения была равной 700 ± 250 отн.ед. (рис. 3, б). Изменение формы тромбоцитов при активации коллагеном $\Delta I(12)$ в 1-й день составило 1.9 ± 0.5 отн.ед., а на 8-й день было равным 2.1 ± 0.4 отн.ед. (рис. 3, в). Время свертывания составило 900 ± 300 с и 800 ± 300 с соответственно на 1-й и 8-й дни исследования (рис. 3, г); а лаг-фаза была равной 80 ± 60 с и 76 ± 18 с (рис. 3, д). Значимых изменений в параметрах от 1-го дня исследования к 8-му обнаружено не было ($p > 0.05$).

По результатам измерений выявлено, что результаты исследования агрегации и изменения формы тромбоцитов методом ЛАСКА являются воспроизводимыми в течение недели наблюдения.

2.3. Исследование зависимости параметров агрегации и изменения формы тромбоцитов от транспортировки образца

Для того чтобы выяснить, могут ли образец привезти из другого диагностического центра при соблюдении условий перевозки, мы исследовали влияние транспортировки крови на результаты измерения агрегации тромбоцитов. Было получено, что максимальная скорость коллаген-индуцируемой агрегации V_{max} , измеренная методом ЛАСКА, составила 1.7 ± 1.1 отн.ед./с (рис.4, а), а после транспортировки 2.1 ± 0.6 отн.ед./с. Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ была равной 750 ± 180 отн.ед., а после перевозки 800 ± 300 отн.ед. (рис.4, б). Амплитуда изменения формы $\Delta I(12)$ составила 2.1 ± 0.7 отн.ед., а после транспортировки

Таблица 1. Коэффициенты вариации параметров агрегации и изменения формы у трех здоровых добровольцев

Донор	CV(V_{max}), %	CV($I(1)$), %	CV($I(12)$), %	CV(t_{clot}), %	CV(t_{lag}), %
1	3.3	1.6	5.0	3.5	0.9
2	3.8	1.8	0.6	2.0	0.9
3	3.4	2.0	1.1	1.1	1.0

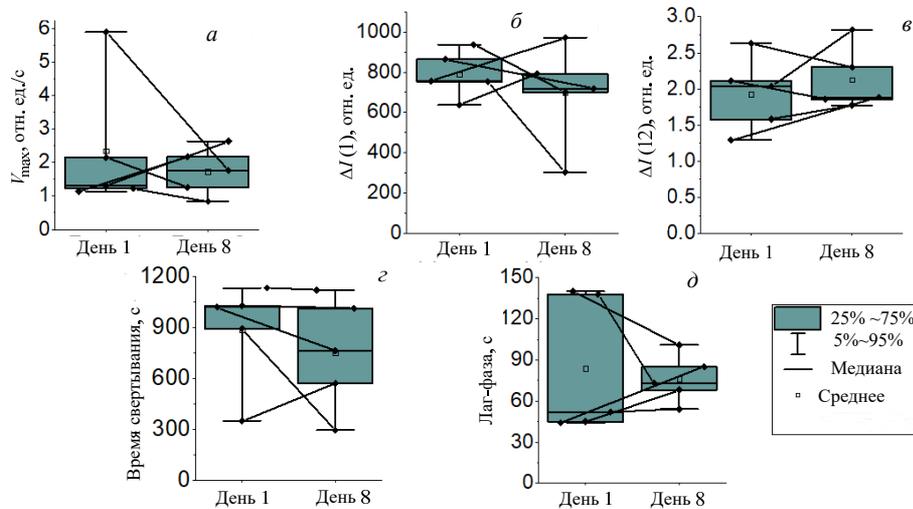


Рис. 3. Параметры коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов измеренной методом ЛАСКА стабильны в течение недели ($n = 5$). Максимальная скорость агрегации (а) тромбоцитов, амплитуда агрегации (б), изменение формы (в), время свертывания (г), а также лаг-фаза (д) значительно не изменяются за неделю ($p > 0.05$). Средние линии — медианы, рамки показывают 25–75 процентиля, полосы ошибок показывают интервалы 5–95%

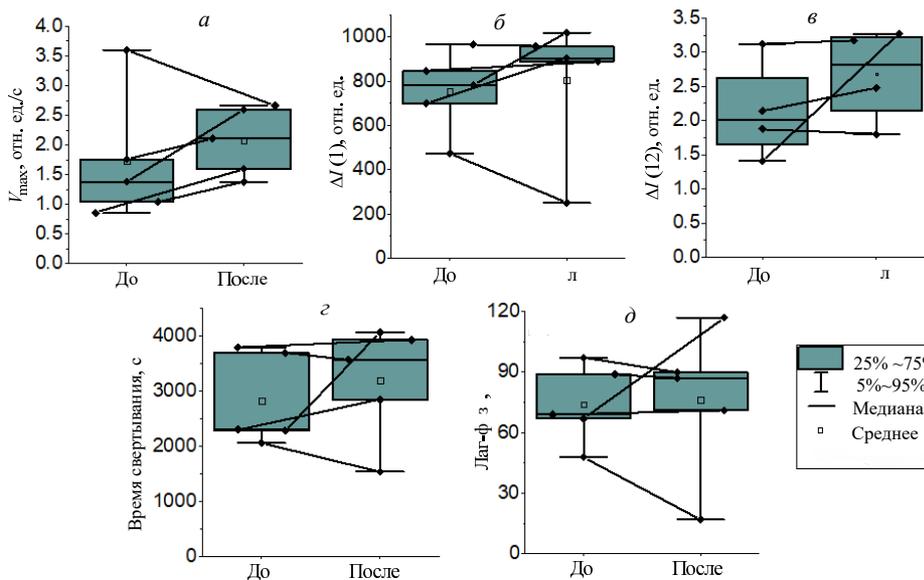


Рис. 4. Оценка влияния транспортировки крови на результаты исследования коллаген-индуцируемой агрегации методом ЛАСКА: а — максимальная скорость агрегации тромбоцитов, б — амплитуда АДФ-индуцированной агрегации, в — изменение формы тромбоцитов, г — время свертывания, д — лаг-фаза. Статистика как на рис. 1

2.7 ± 0.7 отн. ед. (рис.4, в). Время свертывания составило 2800 ± 800 с и 3200 ± 1000 с соответственно до и после транспортировки (рис. 4, г); а лаг-фаза была равной 74 ± 19 с и 80 ± 40 с (рис. 4, д). Значи-

мых изменений в измеряемых параметрах коллаген-индуцируемой агрегации тромбоцитов методом ЛАСКА до/после транспортировки крови обнаружено не было ($p > 0.05$).

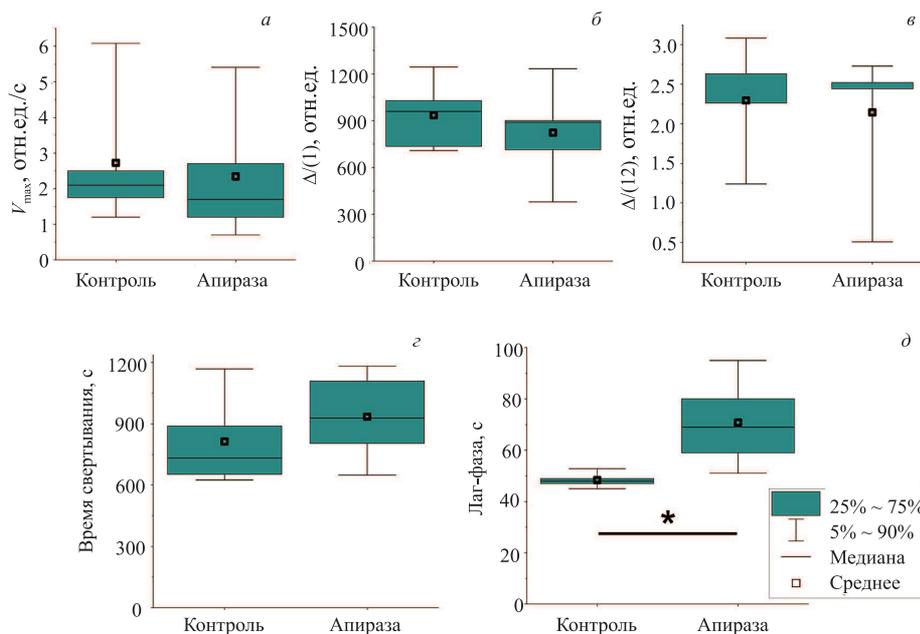


Рис. 5. Роль секретлируемого АДФ в коллаген-индуцированной агрегации для метода малоуглового светорассеяния. На графике представлены усредненные данные для параметров ($n = 5$). Агрегацию тромбоцитов индуцировали коллагеном 0,4 мг/мл в отсутствии (контроль) или присутствии ингибитора (аспираза): *a* — максимальная скорость агрегации тромбоцитов, *b* — амплитуда АДФ-индуцированной агрегации, *c* — изменение формы тромбоцитов, *d* — время свертывания, *e* — лаг-фаза. Статистика как на рис. 1. Значимо увеличена лаг-фаза в пробе с аспиразой по сравнению с контрольной ($p < 0.05$)

Таким образом, было показано, что наземная перевозка образца крови в течение двух часов не оказывает влияния на результаты исследования агрегации тромбоцитов методом ЛАСКА.

2.4. Роль секретлируемого АДФ в коллаген-индуцированной агрегации для метода малоуглового светорассеяния

Поскольку метод ЛАСКА требует сильно разбавленной БТП для достижения одночастичного рассеяния, мы проверили, наблюдается ли влияние секретлируемого АДФ на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов в этих условиях.

Известно, что при стимуляции коллагеном происходит секреция содержимого гранул из тромбоцитов, в которых содержатся вещества такие, как АДФ. В свою очередь, АДФ активирует тромбоциты и еще больше усиливает эффект агрегации [6]. Для исследования влияния секретлируемого АДФ на коллаген-индуцированную агрегацию мы использовали известный фермент, катализирующий гидролиз АДФ, — аспиразу. На рис. 5 показано изменение основных параметров агрегации, индуцированной коллагеном, при добавлении аспиразы. Максимальная скорость агрегации в пробе с аспиразой составила 2.3 ± 1.9 отн. ед./с., а в контрольной пробе — 2.7 ± 1.9 отн. ед./с (рис. 5, *a*). Амплитуда агрегации (рис. 5, *b*) в пробе с антиагрегантом (800 ± 300 отн. ед.) не отличалась от контрольной (940 ± 220 отн. ед.). Амплитуда изменения

формы (рис. 5, *c*) тромбоцитов в пробе с аспиразой (2.3 ± 0.7 отн. ед.) принимала такие же значения, как и в контрольной (2.1 ± 0.9 отн. ед.). Время свертывания (рис. 5, *d*) в пробе с аспиразой и в контрольной пробе одинаковы (940 ± 220 с и 810 ± 220 с соответственно). Лаг-фаза (рис. 5, *e*) значимо увеличена на 46% при добавлении аспиразы (71 ± 17 с) по сравнению с контрольной пробой (48 ± 3 с).

Увеличение t_{lag} свидетельствует о снижении коллаген-индуцируемой агрегации тромбоцитов в присутствии гидролазы. Таким образом, было установлено, что агрегация тромбоцитов, индуцированная коллагеном, во многом зависит от секреции содержимого тромбоцитарных гранул. Метод малоуглового светорассеяния способен обнаруживать эффекты низкомолекулярных соединений, секретлируемых активированными тромбоцитами из плотных гранул. На основании этих данных было сделано предположение, что метод может быть чувствительным к дефициту плотных гранул тромбоцитов.

Для проверки этой гипотезы было проведено исследование коллаген-индуцированной агрегации у двух пациентов с диагностированным синдромом Германского–Пудлака (выраженным дефицитом плотных гранул). По результатам проточной цитометрии у обоих пациентов обнаружен выраженный дефицит плотных гранул — 20% от нормы. При этом агрегометрия по Борну с активацией тромбоцитов коллагеном у пациентов с синдромом ГП была в референсном диапазоне [58% у мальчика и 67% у девочки, норма 50–80%]. На рис. 6 представлены данные коллаген-индуцированной агрегации

Таблица 2. Параметры коллаген-индуцированной агрегации для пациентов с синдромом Германского–Пудлака и здоровых добровольцев

	V_{max} , отн. ед./с	$\Delta I(1)$, отн. ед.	$\Delta I(12)$, отн. ед.	Ляг-фаза, с	Время свертывания, с
Здоровый доброволец, среднее \pm стандартное отклонение	2 ± 1	870 ± 160	1.6 ± 1	160 ± 70	850 ± 130
Пациент с синдромом Германского–Пудлака, девочка	0.9	790	1.75	270	1270
Пациент с синдромом Германского–Пудлака, мальчик	0.6	600	2.25	400	1500

пациента с синдромом Германского–Пудлака в сравнении со здоровым донором.

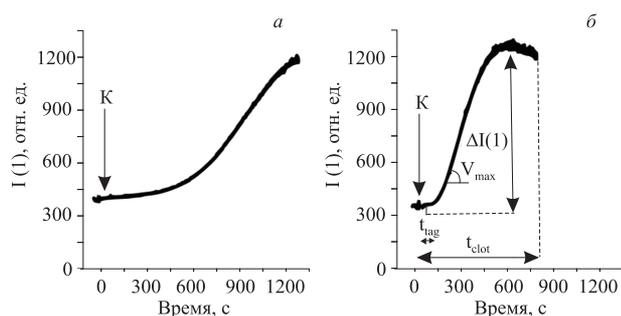


Рис. 6. Оригинальные кривые интенсивности светорассеяния (сглаживание по 10 точкам), полученные методом ЛАСКА, для коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов пациента с синдромом Германского–Пудлака (а) в сравнении со здоровым донором (б). Характерные кривые для пациентов с синдромом Германского–Пудлака отличаются от характерных кривых здоровых добровольцев: увеличены ляг-фаза t_{lag} и время свертывания t_{clot} , а также снижена скорость агрегации V_{max} . Стрелкой обозначен момент добавления агониста к- коллагена в концентрации 0.4 мг/мл

В табл. 2 приведены параметры агрегации тромбоцитов пациентов с синдромом Германского–Пудлака и здоровых доноров ($n = 20$). Было обнаружено удлинение ляг-фазы t_{lag} в 1.7 и 2.5 раза у пациентов с синдромом Германского–Пудлака в сравнении со здоровыми донорами, а также наблюдалось значимое снижение максимальной скорости агрегации. Амплитуда агрегации у пациента мужского пола с синдромом Германского–Пудлака снижена на 31% по сравнению с контрольной группой, а у пациентки находилась в пределах нормальных значений. Время свертывания у пациентов с синдромом Германского–Пудлака удлинено в 1.5 и 1.8 раза (у девочки и мальчика соответственно) по сравнению со здоровыми добровольцами.

Таким образом, было показано, что АДФ, секретуемый из плотных гранул тромбоцитов, оказывает значительное влияние на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов, измеряемую методом малоуглового светорассеяния.

2.5. Анализ параметров агрегации тромбоцитов в когортах здоровых добровольцев и пациентов методом малоуглового светорассеяния и методом СТА

Мы проанализировали параметры коллаген-индуцируемой агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев и педиатрических пациентов с геморрагическим синдромом (рис. 7). Максимальная скорость агрегации V_{max} составила 1.5 ± 0.7 отн. ед./с у здоровых добровольцев и 1.4 ± 0.7 отн. ед./с (среднее \pm станд. откл.) у педиатрических пациентов, без существенных различий (рис. 7, а). Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ значимо повышена на 30% в группе педиатрических пациентов по сравнению со здоровыми добровольцами (930 ± 140 отн. ед. и 720 ± 240 отн. ед. соответственно, рис. 7, б). Ляг-фаза составила 190 ± 90 с у здоровых взрослых и 150 ± 90 с для педиатрических пациентов, достоверные различия не обнаружены (рис. 7, в).

Для сопоставления результатов, полученных при исследовании здоровых добровольцев ($n = 18$) и пациентов ($n = 10$) на агрегометре Биола (агрегометрия по Борну), а также на лазерном малоугловом анализаторе ЛАСКА, были оценены коэффициенты корреляции параметров агрегации, определенных этими двумя методами. Они приведены в табл. 3.

Таблица 3. Коэффициенты корреляции параметров агрегации, измеренные методом ЛАСКА и методом оптической агрегометрии

Коэффициент корреляции P	Здоровые доноры	Пациенты
V_{max} (ЛАСКА-Биола)	0.87***	0.79**
ΔI (ЛАСКА-Биола)	0.74*	0.84**
t_{lag} (ЛАСКА-Биола)	0.94***	0.90**

Примечание. Уровни значимости: $p < 0.05$ обозначен *; $p < 0.01$ обозначен **; $p < 0.001$ обозначен ***

Было получено, что параметры агрегации (V_{max} , $\Delta I(1)$ и t_{lag}), измеренные методом ЛАСКА, сильно положительно коррелируют с соответствующи-

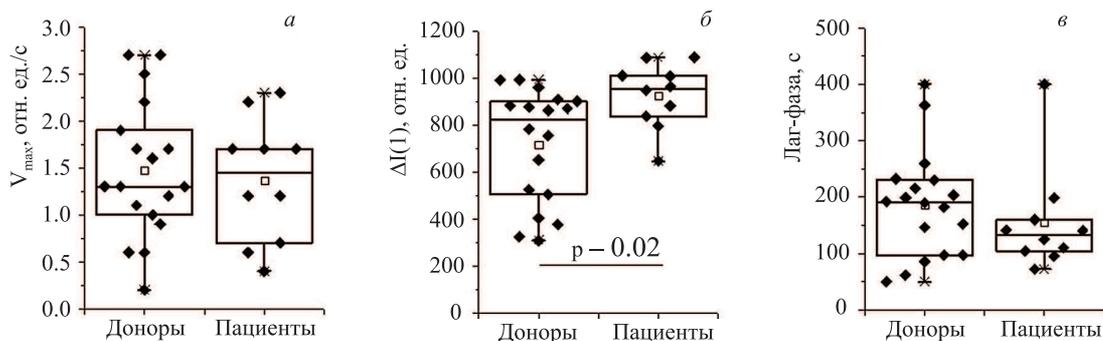


Рис. 7. Сравнение параметров коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов у здоровых добровольцев ($n = 18$) и пациентов детского возраста с геморрагическим синдромом ($n = 10$). Максимальная скорость агрегации тромбоцитов (а) и лаг-фаза (в) для этих групп достоверно не различаются. Амплитуда агрегации $\Delta I(1)$ (б) в когорте пациентов достоверно повышена, уровень значимости $p < 0.05$. Статистика такая же, как на рис. 1

ми параметрами агрегации, измеренными методом СТА среди здоровых доноров и пациентов с геморрагическим синдромом (коэффициенты корреляции Пирсона 0.7–0.8, $p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было сосредоточено на характеристике и валидации недавно разработанного метода ЛАСКА для оценки функции тромбоцитов. Мы оценили влияние некоторых преаналитических и аналитических переменных и сопоставили результаты, полученные с использованием метода ЛАСКА с параметрами теста — «золотого стандарта» СТА.

Проведена оценка критерия качества полученных измерений: было показано, что метод малоуглового светорассеяния для исследования коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов обладает хорошей прецизионностью в условиях повторяемости. Коэффициент вариации параметров не превысил 3.5% при последовательном повторении экспериментов одним оператором в течение часа. Метод ЛАСКА сравним по прецизионности с методом СТА, коэффициент вариации коллаген-индуцированной агрегации у которого также 3.5% [25].

Оценка отдаленной воспроизводимости результатов выявила, что при воспроизведении эксперимента с интервалом в неделю параметры агрегации статистически значимо не изменяются. Эти данные позволят сделать выводы о статистически значимых отличиях в агрегации тромбоцитов, наблюдаемой в динамике, например при оценке функции тромбоцитов у пациентов на продолжительной терапии антиагрегантами. Помимо этого, данные результаты могут быть полезными в перспективе при оценке агрегации тромбоцитов в образцах, подлежащих длительному хранению, например тромбоцитарного концентрата, использующегося в трансфузиологии.

Подбор оптимальных условий транспортировки образца цельной крови и в целом факт ее наличия перед проведением анализа функции тромбо-

цитов до сих пор остаются дискуссионным вопросом. Для световой трансмиссионной агрегометрии было показано, что пересылка образца с помощью пневматической почты искажает результаты исследования агрегации тромбоцитов: агрегация тромбоцитов с коллагеном значимо увеличивается [25]. Текущее исследование не оценивало эффекты пневматической почты на результаты исследования агрегации методом ЛАСКА. Однако нам удалось выявить, что наземная перевозка образца крови в течение двух часов не оказывает влияния на результаты исследования агрегации тромбоцитов.

В ходе работы было установлено, что АДФ, секретруемый из плотных гранул тромбоцитов, оказывает значительное влияние на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов: добавление в пробу фермента-гидролазы значимо замедляет коллаген-индуцируемую агрегацию тромбоцитов. Полученные результаты находятся в согласии с данными из статьи [18], где было продемонстрировано снижение коллаген-индуцированной агрегации в присутствии ингибиторов рецепторов P2Y12, P2Y1. Результаты СТА при исследовании пациентов с дефицитом плотных гранул тромбоцитов могут вызывать от недиагностических до свидетельствующих о многочисленных отклонениях, особенно при использовании слабых агонистов [26]. В текущем исследовании метод СТА не выявил отклонений в коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов у двух обследованных пациентов с синдромом Германского–Пудлака. В то же время исследование агрегации тромбоцитов с помощью метода ЛАСКА выявило отклонения в параметрах коллаген-индуцированной агрегации у этих пациентов. Небольшая когорта пациентов является ограничением в этом исследовании.

Параметры агрегации, измеренные методом малоуглового светорассеяния, положительно коррелируют (сильная связь) с параметрами агрегации, измеренными методом СТА, среди здоровых добровольцев и среди пациентов с кровоточивостью. Несмотря на то, что методы имеют принципиальные отличия (среда для клеток, концентрация

ионов кальция, концентрация тромбоцитов, уровень кислотности среды и т.д.), методы предоставляют информацию об одном и том же процессе, поэтому неудивительно, что связь между параметрами, ее описывающими, высокая.

Тем не менее по сравнению с методом СТА метод ЛАСКА имеет ряд преимуществ: он выявляет способность тромбоцитов к агрегации в образцах с обедненным количеством тромбоцитов, тромбоцитопенией [21]; метод потенциально способен детектировать дефицит плотных гранул тромбоцитов,

а также ввиду того, что метод ЛАСКА использует сильное разведение образца, он потенциально может быть использован и для детекции агрегации тромбоцитов в образцах с гемолизом или липемией.

Таким образом, полученные результаты, несомненно, представляют интерес для практической диагностики тромбоцитопатий, а также в рамках фундаментальных исследований в области гематологии, трансфузиологии и кардиологии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-15-00387).

- [1] *Thon J.N., Italiano J.E.* // *Handb. Exp. Pharmacol.* **3** (2012).
- [2] *Lippi G., Franchini M.* // *Expert Rev. Hematol.* **8**. 555 (2015).
- [3] *Шиффман Ф.* Патолофизиология крови. М.: Издательство БИНОМ, 2001.
- [4] *Пантелеев М., Свешникова А.* // *Онкогематология.* **9**. 65 (2014).
- [5] *Свешникова А.Н., Степанян М.Г., Пантелеев М.А.* // *Системная Биология и Физиология.* **1**. 14 (2022). EDN:IXNQVA
- [6] *Мазуров А.В.* Физиология и патология тромбоцитов. Литтерра, 2011.
- [7] *Дубикайтис Т.А.* // *Российский Семейный Врач.* **21**. 5 (2017).
- [8] *Константинова Е.В., Гиляров М.Ю., Шостак Н.А., Аничков Д.А.* // *Клиницист.* **12**. 10 (2018).
- [9] *Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P.* *Platelets.* Academic press, 2019.
- [10] *Rand M.L., Leung R., Packham M.A.* *J. Eur. Soc. Haemapheresis.* **28**. 307 (2003).
- [11] *Базаев И.А., Прюсиялговская А.В., Руденко П.А.* и др. // *Медицинская Техника.* **3**. 9 (2015).
- [12] *Меликова А.Я.Г.* // *Вестник Башкирского Государственного Педагогического Университета им. М. Акмуллы.* 64 (2023).
- [13] *Пономаренко Е.А., Игнатова А.А., Федорова Д.В.* // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* **18**. 112 (2019).
- [14] *Koltai K., Kesmarky G., Feher G.* et al. // *Int. J. Mol. Sci.* **18**. (2017).
- [15] *Paniccia R., Priora R., Liotta A.A., Abbate R.* // *Vasc. Health Risk Manag.* **11**. 133 (2015).
- [16] *Breddin H.K.* // *Platelets.* **16**. 151 (2005).
- [17] *Pakala R., Waksman R.* // *Med. Mol. Interv.* **12**. 312 (2011).
- [18] *Mindukshev I., Gambaryan S., Kehrer L.* et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* **50**. 1253 (2012).
- [19] *Mindukshev I., Fock E., Dobrylko I.* et al. // *Int. J. Mol. Sci.* **23**. (2022).
- [20] *Martyanov A.A., Maiorov A.S., Filkova A.A.* et al. // *Sci. Rep.* **10**. 12296 (2020).
- [21] *Martyanov A.A., Tesakov I.P., Khachatryan L.A.* et al. // *Blood Adv.* **7**. 4936 (2023).
- [22] *Martyanov A.A., Ignatova A.A., Svidelskaya G.S.* et al. *Biochem. Biokhimiia.* **85**. 1267 (2020).
- [23] *Reiss C., Mindukshev I., Bischoff V.* et al. // *Br. J. Pharmacol.* **172**. 5199 (2015).
- [24] *Beck F., Geiger J., Gambaryan S.* et al. // *Blood.* **129**. e1 (2017).
- [25] *Poletaev A.V., Koltsova E.M., Ignatova A.A.* et al. // *Thromb Res.* **170**. 156 (2018).
- [26] *Bourguignon A., Tasneem S., Hayward C.P.* *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **59**. 405 (2022).

Study of collagen-induced platelet aggregation using low angle light scattering method

G.S. Svidelskaya^{1,2,3,a}, E.N. Brusikova^{4,b}, A.A. Ignatova^{3,c}, A.A. Filkova³, P.A. Zharkov³, I.V. Mindukshev⁵, S.P. Gambaryan⁵, M.A. Panteleev^{1,2,3}

¹Department of Medical Physics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology Russian Academy of Sciences Moscow, 109029, Russia

³National Medical Research Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev Moscow, 117198, Russia

⁴GBUZ MO Shchelkovo Hospital, Fryazino, Moscow region, 141190, Russia

⁵Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences Saint Petersburg, 194223, Russia

E-mail: ^a galya.svidelskaya@mail.ru, ^b lana137975@yandex.ru

Assessing platelet function is a key to diagnosing bleeding disorders and monitoring the effectiveness of antiplatelet drugs. Recently a method for assessing platelet aggregation based on the phenomenon of low angle light scattering was developed. Measurements are carried out in a medium with a known pH value and calcium concentration. The aim of this work was to study the influence of preanalytical and analytical

variables, as well as to compare the results with the method of light transmission aggregometry, already widely used in clinical practice. It was revealed that transporting the sample by car for two hours does not affect the parameters of collagen-induced aggregation. The low angle light scattering method for measuring collagen-induced platelet aggregation has been shown to have good precision under repeatable conditions and was short-term reproducible. The aggregation parameters obtained by low angle light scattering directly correlate with the aggregation parameters measured by transmission aggregometry. Accelerating role of released adenosine diphosphate on collagen-induced platelet aggregation was shown.

PACS: 42.62 Be, 87.18.Ed.

Keywords: platelet, platelet function, aggregation, optical devices, laser.

Received 06 September 2024.

English version: *Moscow University Physics Bulletin*. 2025. **80**, No. . Pp. .

Сведения об авторах

1. Свидельская Галина Сергеевна — аспирант; e-mail: galya.svidelskaya@mail.ru.
2. Брускова Елена Николаевна — врач КЛД; e-mail: lena137975@yandex.ru.
3. Игнатова Анастасия Александровна — науч. сотрудник; e-mail: procyonlotor@gmail.com.
4. Филькова Александра Андреевна — канд. биол. наук, науч. сотрудник, доцент; e-mail: aleksa0771@gmail.com.
5. Жарков Павел Александрович — доктор мед. наук, врач-гематолог; e-mail: pzharkoff@gmail.com.
6. Миндукшев Игорь Викторович — доктор биол. наук, зав. лабораторией; e-mail: iv_mindukshev@mail.ru.
7. Гамбарян Степан Петрович — доктор биол. наук, гл. науч. сотрудник, профессор; e-mail: gambaryan.stepan@gmail.com.
8. Пантелеев Михаил Александрович — доктор физ.-мат. наук, зав. лабораторией, профессор; e-mail: mapanteleev@yandex.ru.