

*На правах рукописи*



Литвиненко Алёна Леонидовна

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ  
И ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АГОНИСТА АКТИВАЦИИ**

1.5.2. Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2023

**Работа выполнена** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН), г. Новосибирск

**Научный руководитель:** **Мальцев Валерий Павлович**, доктор физико-математических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Сироткина Ольга Васильевна**, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, декан факультета биомедицинских наук, профессор кафедры лабораторной медицины с клиникой  
**Зырянов Виктор Яковлевич**, доктор физико-математических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН), руководитель научного направления Института физики им. Л.В.Киренского Сибирского отделения Российской академии наук (ИФ СО РАН) – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита диссертации состоится «30» января 2024 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, Красноярск, Академгородок, д.50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <https://www.ibp.ru>

Автореферат разослан «\_\_» декабря 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.



Дементьев Дмитрий Владимирович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Среди 10 основных причин смертности людей, по данным Всемирной организации здравоохранения, лидирующую позицию занимают сердечно-сосудистые заболевания. Контроль развития этих заболеваний включает в себя не только диагностику органов сердечно-сосудистой системы, но и постоянный мониторинг состояния крови.

Кровь – это жидкая ткань организма, состоящая из форменных элементов (40-45%) – эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и плазмы (жидкая часть крови, 55 – 60%). Каждый из форменных элементов отвечает в основном, за одну определённую функцию. Для эритроцитов, это перенос кислорода от органов дыхания к остальным клеткам, тканям и органам организма. Для тромбоцитов, это участие в поддержание гемостаза, то есть балансе кровяной среды между нахождением в жидком состоянии и быстрым переходом в состояние, позволяющее закупорить повреждённый сосуд. Для лейкоцитов, это в основном функция защиты организма от инородных объектов и удаление повреждённых тканей.

Нарушения в работе сердечно-сосудистой системы отражаются на изменении в функционировании всех трёх типов форменных элементов, однако самым опасным оказывается влияние на систему гемостаза, так как нарушение в работе этой системы может приводить к спонтанному образованию тромбов, а те, в свою очередь, к закупорке сосудов, и как следствие, к нарушению локального газообмена и развитию воспаления.

С морфологической точки зрения, тромбоциты представляют собой двояковыпуклые безъядерные пластинки 2-4 мкм в диаметре, происходящие от клеток предшественников – мегакариоцитов и свободно циркулирующие в кровотоке.

В момент разрыва сосуда, под воздействием появляющихся в кровотоке веществ (тканевого фактора, коллагена, аденозиндифосфата и др.) и изменением гидродинамического состояния потока крови, тромбоциты переходят в активированное состояние, которое характеризуется изменением формы, появлением специфических рецепторов и выпуском гранул, находящихся в цитоплазме тромбоцитов. В активированном состоянии эти форменные элементы способны адгезировать к стенкам сосудов и агрегировать между собой, что обеспечивает образование первичного белого тромба. На поверхности активированных тромбоцитов запускается каскад коагуляции плазмы, включающий в себя лавинообразное образование тромбина, одного из основных элементов, необходимых для формирования вторичного красного тромба и стабильной закупорки повреждения сосуда. Именно поэтому, очень важно следить за нормальным функционированием этих форменных элементов крови, в случае развития заболевания сердечно-сосудистой системы.

**Степень разработанности темы исследования** для оценки функциональных характеристик тромбоцитов необходимо регистрировать степень ответа пробы донора на агонист активации. На сегодняшний день широко используются несколько методов исследования как тромбоцитов, так и системы гемостаза в целом. Золотым стандартом в исследовании системы гемостаза является агрегометрия по методу Борна. Метод разработан в 60-е годы и основан на измерении изменения светопропускания богатой

тромбоцитами плазмы, после запуска в ней реакции агрегации под воздействием таких агонистов активации и агрегации, как тромбин, аденозиндифосфат (АДФ) и коллаген. Результаты, получаемые данным методом, зависят не только от функционирования тромбоцитов, но и от процесса коагуляции плазмы, что затрудняет исследование функционирования тромбоцитов. Развитием метода Борна является импедансная агрегометрия. Метод основан на регистрации изменения импеданса богатой тромбоцитами плазмы, после воздействия агонистов. Результат, также, как и для метода Борна, зависит не только от функционирования тромбоцитов, но и от процесса коагуляции плазмы.

Вторым по распространённости методом анализа тромбоцитов, можно назвать метод Култера, на основе которого работает большинство современных гематологических анализаторов. В основе приборов находится ячейка Култера, состоящая из двух резервуаров, соединённых между собой перегородкой с отверстием, и двух электродов. Проходя через отверстие, форменные элементы крови изменяют проводимость системы, что позволяет посчитать концентрацию эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов в отдельности и оценить объём каждой пролетевшей клетки. Несмотря на широкое распространение гематологических анализаторов, до сих пор активно ведутся исследования по поиску взаимосвязи между изменениями в распределении по объёму и широко встречающимися патологиями кровообращения. Также, подвергается сомнению правильность определения объёма данным методом для частиц на краях распределения.

Формы тромбоцитов в нативном состоянии далеки от сферы, следовательно, наблюдение только за объёмом тромбоцитов является недостаточным для описания их формы, а именно, изменение формы является самым ранним маркером активации тромбоцитов.

Для исследования элементов крови не только с точки зрения объёма, но и формы, существует технология сканирующей проточной цитометрии. Технология позволяет исследовать клетки поштучно и набирать статистически достоверные выборки за небольшое время. Применимость этой технологии для тромбоцитов была успешно показана ранее. В основе технологии лежит регистрация интенсивности сигналов светорассеяния в зависимости от угла рассеяния (индикатриса светорассеяния). Индикатриса содержит в себе всю необходимую информацию об объёме, форме и внутреннем содержании рассеивающей частицы.

Для получения параметров рассеивающей частицы необходимо решить обратную задачу светорассеяния. Для тромбоцитов хорошо себя показал метод сравнения измеренного сигнала с базой данных предварительно рассчитанных сигналов от частиц с известной конфигурацией формы и показателем преломления. В качестве математического описания формы тромбоцитов наиболее часто используется модель «сплюснутый сфероид», однако, за счёт появления псевдоподий в процессе активации, эта модель может оказаться не подходящей для тромбоцитов в активированном состоянии.

Активация одиночных тромбоцитов, в ответ на агонист, относительно хорошо изучена, с точки зрения основных биохимических процессов. Этот процесс включает в себя более 60 биохимических реакций, протекающих одновременно, под воздействием одного агониста активации. Однако, полученные результаты трудно обобщить на

популяцию с большим количеством тромбоцитов, а именно, синхронная активация множества тромбоцитов обеспечивает нормальный ответ организма на повреждение сосуда. Поэтому, особенно важным, является изучение функционирования популяции тромбоцитов в целом, на основе изменения формы одиночных тромбоцитов (самый ранний признак активации тромбоцитов).

**Целью** работы является – разработка математического описания распределения тромбоцитов по форме в нативном состоянии, и эволюции этого распределения под воздействием агониста активации.

Были выделены следующие **задачи работы**:

1. Разработать протокол экспериментальной работы с тромбоцитами для исследования формы.
2. Оценить адекватность выбранной оптической модели для определения параметра формы тромбоцита.
3. Измерить и математически описать распределение по форме для нативных тромбоцитов.
4. Построить феноменологическую модель перехода популяции тромбоцитов из нативного состояния в активированное.
5. Определить чувствительность популяции тромбоцитов к агонисту активации (аденозиндифосфату).

**Научная новизна.** В работе представлены результаты измерений распределений тромбоцитов по параметру формы, как для нативных проб, так и для проб, полученных после воздействия определённой концентрации агониста активации. Параметр формы показывает степень сплюснутости тромбоцита, что коррелирует с состоянием активации тромбоцита. В измеренных распределениях, удалось впервые наблюдать разделение всей популяции тромбоцитов на субпопуляции по параметру формы, как в нативном состоянии, так и после воздействия агониста активации. Изменения в субпопуляциях, после добавления определённой концентрации агониста активации, позволило определить чувствительность тромбоцитов к этому воздействию, и её изменение при применении антитромбоцитарной терапии.

**Теоретическая значимость** заключается в математическом описании субпопуляций тромбоцитов по параметру формы для нативных проб и в построении модели изменения параметра формы одиночного тромбоцита в процессе активации. На основе построенной модели, математически описана активация популяции тромбоцитов, после воздействия определённой концентрации агониста активации. Благодаря построенной модели, получено объяснение феномена появления промежуточного состояния тромбоцитов (между активированными и неактивированными состояниями в терминах изменения формы), показанного экспериментально как для нативных проб, так и для проб, полученных в результате воздействия на них, определённой концентрации агониста активации.

**Практическая значимость** состоит в разработке протокола подготовки и измерения тромбоцитов на сканирующем проточном цитометре, позволяющего регистрировать влияние воздействия агониста активации на популяцию тромбоцитов,

воздействие сдвиговой скорости, а также, влияние других манипуляций на пробу. В работе определена чувствительность тромбоцитов к агонисту активации и проведена оценка эффективности антитромбоцитарной терапии, на основе изменения чувствительности к агонисту активации. Одновременно с определением чувствительности тромбоцитов к агонисту активации, была определена, степень влияния процедуры подготовки на пробу тромбоцитов, что позволило учесть влияние преаналитических манипуляций на результат.

**Методология и методы исследования.** Работа проводилась с использованием технологии сканирующей проточной цитометрии, позволяющей регистрировать сигнал светорассеяния от одиночных частиц в широком угловом диапазоне. Решение обратной задачи светорассеяния для измеренных сигналов позволяет получить параметры рассеивающего объекта в рамках заданной оптической модели.

Для изучения влияния выбора оптической модели тромбоцита на определение параметра формы, проводился расчёт сигнала светорассеяния от частиц с заведомо более сложной формы и, для полученных сигналов, решалась обратная задача светорассеяния с использованием общепринятой оптической модели. Для расчёта сигналов светорассеяния использовался метод дискретных диполей, реализованный в программном пакете АДДА. Для ускорения расчётов сигналов светорассеяния от большого количества частиц (например, для построения базы данных теоретических сигналов), использовались мощности суперкомпьютера НГУ.

**Степень достоверности** результатов работы обеспечивается применением современного подхода к исследованию формы тромбоцитов, показавшего свою эффективность и для других клеток крови; использованием современных статистических методов для анализа получаемых результатов; согласием результатов численного моделирования с экспериментальными измерениями и воспроизводимостью получаемых экспериментальных данных.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. Распределение по индексу формы для нативных тромбоцитов состоит из трёх субпопуляций.
2. Значение моды индекса формы для субпопуляции неактивированных тромбоцитов составляет  $0.330 \pm 0.006$ , частично активированных тромбоцитов составляет  $0.599 \pm 0.019$ , полностью активированных тромбоцитов составляет  $0.892 \pm 0.005$  (среднее значение для 20 условно здоровых доноров).
3. Величина скачка индекса формы тромбоцитов условно здоровых доноров, необходимая для начала изменения формы, под воздействием АДФ составляет  $0.137 \pm 0.011$  (среднее значение для 9 условно здоровых доноров).

**Личный вклад автора:** Представленные в работе результаты были получены автором либо самостоятельно, либо при его непосредственном участии. Автор осуществлял работу на всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора методов, расчёта теоретических моделей формы, описания экспериментальных распределений тромбоцитов по форме и разработки модели процесса активации и проведения расчетов с последующим анализом до обобщения и интерпретации результатов с подготовкой и оформлением публикаций.

**Соответствие диссертации паспорту специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика. Результаты проведенного исследования соответствуют направлению исследования специальности – разработка математических моделей биологических объектов как сложных нелинейных физических систем.

**Апробация результатов:**

*Результаты, изложенные в работе представлены на следующих международных и всероссийских конференциях:* на 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015 (2015 г.), на 30-м конгрессе международного общества улучшения цитометрии в Глазго, Великобритания (2015 г.), на 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016 (2016 г.), на Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2017» (2017 г.), на Международном конгрессе общества тромбозов и гемостаза 2017 в Берлине, Германия (2017 г.), на 33-ем конгрессе международного общества улучшения цитометрии в Праге, Чехия (2018 г.), на Международном конгрессе общества тромбозов и гемостаза 2019 в Мельбурне, Австралия (2019 г.)

**Публикации.** *Основные положения диссертационного исследования отражены в 21 научных публикациях:* из них 6 статей опубликовано в международных журналах, рецензируемых системой WoS, 1 статья представлена в Российском журнале, рецензируемом системой РИНЦ и 14 публикаций представлены в материалах отечественных и зарубежных научных конференций.

**Объём и структура работы:** Диссертация состоит из введения, 6 глав, содержащих обзор литературы, описания метода исследования и результаты, заключения, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы (97 наименований). Работа выполнена на базе института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского и поддержана стипендией президента Российской Федерации. Объём работы составляет 119 страниц текста с 11 таблицами и 24 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность работы, определены цель и задачи, показаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, степень достоверности полученных результатов, описана методология работы, сформулированы основные положения, вынесенные на защиту, приведён личный вклад автора и описана структура работы.

**В главе 1** представлен обзор литературы по теме диссертации. В обзоре рассмотрена информация об основных особенностях происхождения тромбоцитов, процессе остановки кровотечения системой гемостаза и роли тромбоцитов в этом процессе. Подробно рассмотрена форма как нативного, так и активированного тромбоцита, а также ключевые процессы, приводящие к изменению формы тромбоцита при его переходе из нативного состояния в активированное. Тромбоциты могут находиться под воздействием как физических факторов активации, а именно: изменение температуры, сдвиговой скорости, так и химических факторов активации (агонисты активации), под которыми понимается влияние биологических молекул, появляющихся в кровотоке в момент нарушения

целостности сосуда. Согласно ряду исследований общим событием, предшествующим изменению формы тромбоцита для всех рассмотренных факторов активации, является повышение концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Дополнительно к этому, в работе рассмотрены способы угнетения активации тромбоцита, применяемые в медицинской практике.

В завершении главы рассмотрены основные методы исследования тромбоцитов и приведены достоинства и недостатки рассмотренных методов. В качестве наиболее подходящего для выполнения задач работы выбран метод сканирующей проточной цитометрии (СПЦ). Использование этого метода требует решения обратной задачи светорассеяния с использованием оптической модели исследуемых частиц. Поэтому, дополнительно рассмотрены способы моделирования сигналов светорассеяния для частиц произвольной формы, и существующие методы решения обратных задач. Самым оптимальным подходом к решению обратных задач, является подход глобальной оптимизации функции отличий. Этот подход предполагает решение прямой задачи, для заранее заданной модели и последующее сравнение рассчитанных сигналов с экспериментально наблюдаемыми данными.

**Глава 2** посвящена описанию методики измерения формы тромбоцитов, с использованием технологии СПЦ. В разделе 2.1 описан принцип регистрации сигналов светорассеяния и основные элементы СПЦ.

Раздел 2.2 посвящён оценке сдвиговой скорости внутри гидродинамической системы СПЦ. В стандартном варианте эта система предполагает два режима работы: режим быстрой доставки пробы до зоны измерения и режим измерения. После оценки сдвиговой скорости  $\gamma$  для обоих режимов работы было установлено, что в режиме доставки пробы  $\gamma$  составляет 6446.6 1/с, а в режиме измерения  $\gamma$  составляет 2.3 1/с. Исходя из этого, значение  $\gamma$  в режиме доставки, почти в 6,5 раз превышает максимальное нормальное значение  $\gamma$  в организме.

Раздел 2.3 посвящён уменьшению значения  $\gamma$  в пробе, в момент её доставки, за счёт установки «мягкой» системы подачи пробы. В предложенном варианте работы удалось достичь значения сдвиговой скорости  $\gamma$  9.43 1/с, что позволило уменьшить процент полностью активированных тромбоцитов, в нативной пробе с  $20.0 \pm 1.8$  % до  $2.31 \pm 0.03$  %.

Раздел 2.4 посвящён обсуждению общепринятого протокола забора пробы для исследования тромбоцитов. По стандартному протоколу, в качестве антикоагулянта, используется цитрат натрия 105-109 мМ. Первые 3–5 мл взятой крови не используются для исследования. В качестве процедуры выделения плазмы, богатой тромбоцитами, используется седиментация. Хранение пробы проводят при комнатной температуре не более 4 часов. При использовании стандартного протокола, для получения распределений по форме, у нативных тромбоцитов (раздел 6.2), был показан высокий процент активированных тромбоцитов в пробах некоторых доноров. Поэтому, для экспериментальных исследований реакции тромбоцитов на агонист активации, был разработан «мягкий» протокол подготовки пробы.

По «мягкому» протоколу работы с тромбоцитами, кровь забирается в пробирку с большим количеством физиологического раствора, что предотвращает коагуляцию плазмы

и агрегацию тромбоцитов. После этого, проводится седиментация при комнатной температуре в течение 30 минут, далее измерение, с минимальной задержкой по времени. Применение «мягкого» протокола подготовки пробы, в дополнение к модифицированной системе подачи пробы, позволило получить преимущественно не активированные пробы.

**Глава 3** посвящена описанию оптической модели тромбоцита, а именно влиянию приближения сложных вариантов формы простой оптической модели «сплюснутый сфероид», на определение параметра формы одиночного тромбоцита. Эффект рассмотрен для двух длин волн освещения (0.66 мкм и 0.405 мкм).

В разделе 3.1 описана упрощённая оптическая модель тромбоцита – модель «сплюснутый сфероид». Основным достоинством модели, являются малое число параметров и хорошее согласие с формой тромбоцита в нативном состоянии. Модель описывается четырьмя параметрами:  $D$ ,  $\delta$ ,  $n$ ,  $\beta$ , где  $D$  – диаметр сферы с объёмом, равным объёму моделируемого тромбоцита,  $\delta$  – индекс формы, связанный с отношением полуосей  $\xi$  следующим образом  $\delta = \frac{2\xi}{\xi^2 + 1}$ ,  $n$  – показатель преломления цитоплазмы тромбоцита,  $\beta$  –

параметр, показывающий ориентацию тромбоцита в потоке.

В процессе активации форма тромбоцита значительно изменяется. Это происходит за счёт скручивания периферического кольца микротрубочек – элемента цитоскелета, ответственного за поддержание сплюснутой формы тромбоцита. В дополнение к этому, активация тромбоцитов, сопровождается появлением псевдоподий значительного размера.

Разделы 3.2 и 3.3 посвящены исследованию влияния приближения альтернативных моделей форм тромбоцитов (формы, определяемых искривлённым периферическим кольцом микротрубочек и формы с псевдоподиями), моделью «сплюснутый сфероид» на получаемые значения параметра  $\delta$ , в результате решения обратной задачи светорассеяния.

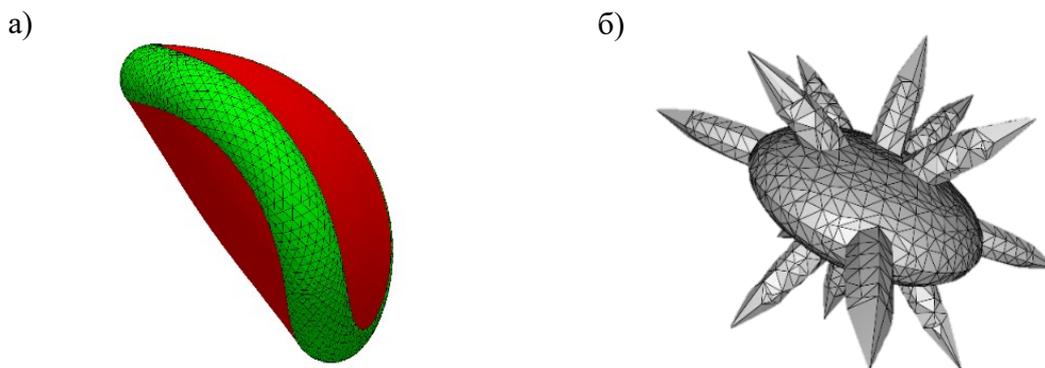


Рисунок 1 Модели формы тромбоцита. а) определяемая искривлённым периферическим кольцом микротрубочек б) сфероид с псевдоподиями.

На первом этапе задавалась геометрия приближаемых форм (Рисунок 1), а также, рассчитывался сигнал светорассеяния (решалась прямая задача светорассеяния) с заданным показателем преломления, на известной длине волны. Все расчёты проводились для двух длин волн 0.66 мкм и 0.405 мкм, методом дискретных диполей, реализованным в

программном пакете ADDA. Далее, для рассчитанных сигналов, решалась обратная задача светорассеяния методом глобальной оптимизации, с использованием базы данных сигналов от модели «сплюснутый сфероид» и полученные в качестве решения параметры сравнивались с исходными параметрами форм. Параметр  $\delta$  для фигуры а (Рисунок 1) оценивался через соотношение полуосей, для фигуры б на (Рисунок 1) за исходный параметр  $\delta$  бралось значение для центрального сфероида.

В результате расчётов было показано, что отличия моделируемых форм от модели «сплюснутый сфероид», приводят к увеличению определяемого  $D$  и уменьшению  $\delta$ . При этом, меньшая длина волны более чувствительна к искажениям. Эффект смещения индекса формы для активированных тромбоцитов в меньшие значения, был показан экспериментально в разделе 6.1, для тромбоцитов, измеренных одновременно на двух длинах волн.

**Глава 4** посвящена описанию распределения тромбоцитов по индексу формы  $\delta$  в нативном состоянии. При рассмотрении экспериментальных распределений (Рисунок 2), можно заметить несколько пересекающихся пиков даже для нативных проб с малым количеством активированных тромбоцитов (частиц с параметром  $\delta$  близким к 1). Для описания подобных распределений, в работе использовалась сумма трёх пиковых функций одного типа, где каждая из функций предположительно соответствует субпопуляциям неактивированных ( $r$ ), частично активированных ( $pa$ ), и полностью активированных ( $fa$ ) тромбоцитов. В разделе 4.1 описаны математические свойства рассматриваемых пиковых функций, в качестве которых взяты плотность вероятности Гаусс распределения (1), плотность вероятности гамма распределения (2) и плотность вероятности бета распределения (3).

$$f^{gauss}(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma}} \quad (1)$$

$$f^{gamma}(x; k, \theta) = x^{k-1} \frac{e^{-x/\theta}}{\theta^k \Gamma(k)} \quad (2)$$

$$f^{beta}(x; x_{min}, x_{max}, M_0, \chi) = \frac{y^{\varphi-1} (1-y)^{\chi-1}}{B(\varphi, \chi)(x_{max} - x_{min})} \quad (3)$$

где  $\mu$  – математическое ожидание, показывающее положение центра функции,  $\sigma$  – дисперсия, показывающая, ширину плотности вероятности Гаусс распределения,  $\Gamma(k)$  – гамма-функция Эйлера,  $k$  и  $\theta$  параметры плотности вероятности гамма распределения, через которые выражаются математическое ожидание и дисперсия,  $B(\varphi, \chi)$  – бета функция Эйлера,  $y = \frac{x - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}$ ,  $\varphi = 1 + (\chi - 1) \frac{M_0 - x_{min}}{x_{max} - M_0}$ ,  $x_{min}$  и  $x_{max}$  параметры, ограничивающие

область определения плотности вероятности бета распределения,  $M_0$  соответствует моде бета распределения,  $\chi$  параметр, связанный с кривизной плотности вероятности бета распределения.

В завершении раздела 4.1 построены функции (суммарные функции), состоящие из суммы трёх пиковых функций каждого рассмотренного типа: плотностей вероятности

Гаусс распределения (4), плотностей вероятности гамма распределения (5) или плотностей вероятности бета распределений соответственно (6).

$$f_{\Sigma}^{gauss}(x) = \eta_{res} \times f^{gauss}(x; \mu_r, \sigma_r) + (1 - \eta_r - \eta_{fa}) \times f^{gauss}(x; \mu_{pa}, \sigma_{pa}) + \eta_{fa} \times f^{gauss}(x; \mu_{fa}, \sigma_{fa}) \quad (4)$$

$$f_{\Sigma}^{gamma}(x) = \eta_r \times f^{gamma}(x; k_r, \theta_r) + (1 - \eta_r - \eta_{fa}) \times f^{gamma}(x; k_{pa}, \theta_{pa}) + \eta_{fa} \times f^{gamma}(x; k_{fa}, \theta_{fa}) \quad (5)$$

$$f_{\Sigma}^{beta}(x) = \eta_r \times f^{beta}(x; 0.1, 2M_0^r - 0.1, M_0^r, \chi_r) + \eta_{fa} \times f^{beta}(x; 2M_0^{fa} - 1, 1, M_0^{fa}, \chi_{fa}) + (1 - \eta_r - \eta_{fa}) \times f^{beta}(x; 0.1, 1, M_0^{pa}, \chi_{pa}) \quad (6)$$

здесь индексы  $r, fa, pa$ , соответствуют неактивированным, активированным и частично активированным субпопуляциям,  $\eta$  показывает долю определенной субпопуляции в зависимости от индекса.

Раздел 4.2 посвящён выбору подходящей теоретической функции для описания распределения тромбоцитов по индексу формы ( $\delta$ ). Для этого взяты два экспериментально измеренных распределения нативных тромбоцитов по индексу формы. Для каждого из распределений, методом глобальной оптимизации Direct, подобраны оптимальные для описания распределения параметры суммарных функций, построенных в разделе 4.1.

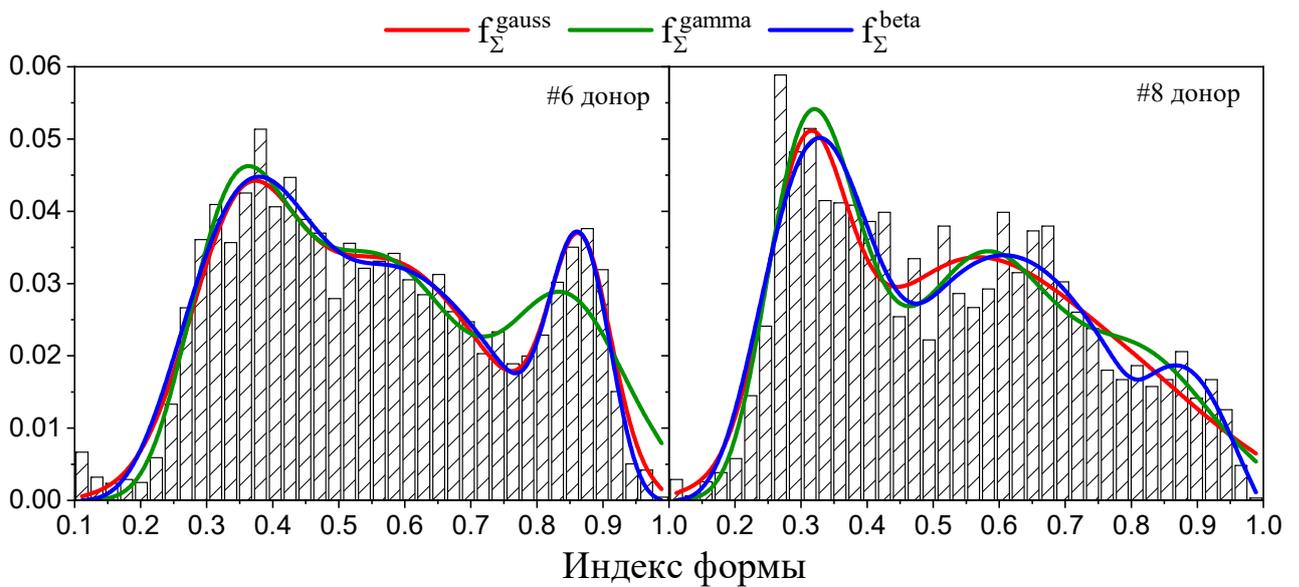


Рисунок 2 Решение задачи нелинейной регрессии для трёх типов суммарной функций.

Таблица 1 Среднеквадратичное отклонение между экспериментальным распределением и суммарной функцией с оптимальными параметрами.

	Распределение Гаусса		Гамма распределение		Бета распределение	
	#6	#8	#6	#8	#6	#8
СКО	$1.04 \cdot 10^{-5}$	$3.09 \cdot 10^{-5}$	$2.27 \cdot 10^{-5}$	$3.25 \cdot 10^{-5}$	$1.02 \cdot 10^{-5}$	$2.72 \cdot 10^{-5}$

В решении обратной задачи, с учетом использования суммарной функции, состоящей из плотностей вероятности бета распределения, установлено наименьшее

среднеквадратичное отклонение между экспериментальным распределением и полученной суммарной функцией. Причиной лучшего согласия этого типа суммарной функции заключается в учёте границ, каждой из трёх плотностей вероятности. Для плотностей вероятности бета распределения – это возможно из-за отсутствия в области определения бесконечности. В графическом представлении решения обратной задачи это проявляется, как корректное описание каждой субпопуляции, даже для слабо выраженных пиков, например, для донора 8 в области полностью активированной субпопуляции. Определение оптимальных параметров для суммарной функции, состоящей из плотностей вероятности бета распределения, в дальнейшем будем считать определением фракционного состава нативной пробы тромбоцитов.

**Глава 5** посвящена построению феноменологической модели активации тромбоцитов. В раздел 5.1 задано начальное состояние (состояние до любого воздействия) популяции тромбоцитов. Эволюция этого состояния под воздействием факторов активации в дальнейшем приводит к появлению измеряемых распределений тромбоцитов.

Наблюдая, в процессе эксперимента, за распределением популяции тромбоцитов по индексу формы, при добавлении к ним различной концентрации АДФ, было показано, что количество активированных тромбоцитов в пробе возрастает с увеличением концентрации<sup>1</sup>. При этом, даже для самой малой концентрации добавленного АДФ (0.16µM) количество молекул ( $9.9 \cdot 10^{16}$  молекул/литр) много больше, чем суммарное количество рецепторов АДФ на тромбоцитах, при условии, что на одном тромбоците находится примерно 100 рецепторов, и концентрация тромбоцитов составляет  $3.2 \cdot 10^{11}$  1/л. Оценка показывает, что даже в случае малой концентрации АДФ, агонист активации находится в избытке, но это не приводит к полной активации пробы тромбоцитов, значит присоединение агониста активации не является достаточным условием для полной активации тромбоцита.

Для учёта особенности введём параметр чувствительности к агонисту активации  $S$ . Этот параметр отражает способность одиночного тромбоцита перейти из начального состояния в состояние с определённой степенью активации, а также косвенно учитывает различия в кинетике каскада реакций активации одиночных тромбоцитов. Предположим, что параметр  $S$ , внутри одной популяции, принадлежит логнормальному распределению.

Внутри одной популяции, форма каждого тромбоцита немного отличается от другого. Введём начальный индекс формы одиночного тромбоцита  $\delta_0$  и предположим, что он принадлежит симметричному бета распределению с левой границей, равной 0.1. Так как, тромбоциты внутри одной популяции обладают различным начальным индексом формы  $\delta_0$  и различной чувствительностью  $S$ , то максимальное состояние активации, также может быть различным. Обозначим это состояние как  $\delta_{\max}$ . В качестве маркера активации, в работе используется индекс формы. Максимально возможное значения индекса формы для тромбоцита математически ограничено 1 (соответствует сфере). При достижении тромбоцитом формы сферы, продолжающиеся биохимические процессы активации перестают влиять на форму тромбоцита, но не прекращаются. Поэтому, предположим, что

<sup>1</sup> Litvinenko A.L. et al. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets: 11 // Cytometry A. 2016. Vol. 89, № 11. P. 1010–1016

$\delta_{\max}$  для популяции тромбоцитов, как и для состояния до любого воздействия, принадлежит симметричному бета распределению, умноженному на функцию Хевисайда в точке 1.

Трансформация формы тромбоцита определяется изменениями периферического кольца микротрубочек и поверхностного натяжения мембраны, под воздействием высвободившихся в цитозоль ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , в результате воздействия агониста активации. В теоретической работе Дмитриева и соавторов<sup>2</sup> было показано, что перестройка геометрии кольца микротрубочек происходит через метастабильное состояние, а также существуют диапазоны длин кольца и поверхностных натяжений мембраны, для которых тромбоциты сохраняют плоскую форму. Предположим, что кольцо микротрубочек, проходя метастабильное состояние, изменяет свою структуру скачкообразно. Введём параметр  $C_{\min}$ , который показывает величину скачка по индексу формы, возникающего после преодоления метастабильного состояния. Будем считать в дальнейшем, что форма кольца остаётся плоской, если внешнее воздействие приводит к изменению индекса формы меньшему, чем  $C_{\min}$ . Для упрощения модели предположим, что это значение одинаково для всех тромбоцитов, внутри одной популяции.

Таким образом, для описания популяции тромбоцитов до воздействия, необходимо задать распределение по индивидуальной чувствительности к агонисту активации ( $S$ ), распределение по начальному индексу формы ( $\delta_0$ ), величину скачка по индексу формы, необходимого для начала изменения формы ( $C_{\min}$ ) и распределение по максимальному значению индекса формы ( $\delta_{\max}$ ).

Раздел 5.2 посвящён описанию изменения индекса формы тромбоцита с заданными параметрами под воздействием определённой концентрации АДФ. В предыдущем разделе был введён начальный индекс формы  $\delta_0$  для каждого тромбоцита. В этом разделе предполагается, что влияние АДФ на форму тромбоцита, можно рассматривать как добавку  $\alpha(\text{АДФ})$  к  $\delta_0$ . Так как для тромбоцитов характерна различная чувствительность ( $S$ ), то добавка должна зависеть не только от концентрации АДФ, но и от  $S$  тромбоцита к этому агонисту активации. В разделе рассматриваются два варианта добавки  $\alpha(\text{АДФ})$ , отличные скоростью изменения: линейная (7) и дробно-рациональная зависимость (8) от концентрации АДФ

$$\alpha(\text{АДФ}) = S \times \text{АДФ} \quad (7)$$

$$\alpha(\text{АДФ}) = (\delta_{\max} - \delta_0) \frac{S \times [\text{АДФ}]}{(\delta_{\max} - \delta_0) + S \times [\text{АДФ}]} \quad (8)$$

Для зависимости (7) дополнительно вводится ограничение  $\delta_0 + \alpha(\text{АДФ}) \leq \delta_{\max}$ , для зависимости (8) это ограничение учтено в самой зависимости.  $\delta_{\max}$  соответствует максимально возможному индексу формы для тромбоцита. Ограничение связано с достижением тромбоцитом индивидуального максимального значения индекса формы. В разделе 5.1 обсуждалось, что процесс изменения формы является не только пороговым, но

<sup>2</sup> Dmitrieff S. et al. Balance of microtubule stiffness and cortical tension determines the size of blood cells with marginal band across species // PNAS. National Academy of Sciences, 2017. Vol. 114, № 17. P. 4418–4423.

и скачкообразным. Особенность можно учесть, введя  $C_{\min}$  в зависимость изменения формы следующим образом:

$$\delta(AДФ) = \delta_0 + H(\alpha(AДФ) - C_{\min}) \times \alpha(AДФ) \leq \delta_{\max} \quad (9)$$

здесь  $H$  – функция Хевисайда,  $\alpha(AДФ)$  выбирается согласно одной из двух описанных выше зависимостей.

Зависимость (9) учитывает появление промежуточного (частично активированного) состояния тромбоцита, при котором индекс формы может находиться между неактивированным ( $\delta_0$ ) и полностью активированным ( $\delta_{\max}$ ) состоянием. Наличие такого состояния экспериментально показано при измерении индекса формы как для нативных тромбоцитов, так и для тромбоцитов после добавления определённой концентрации АДФ (данные представлены в разделах 6.2 и 6.3). Появление такого состояния, согласно модели, можно объяснить наличием тромбоцитов, находящихся под воздействием эффективной концентрации АДФ (с учётом чувствительности  $S$ ), которая приводит к изменению формы этих тромбоцитов ( $\alpha(AДФ) > C_{\min}$ ), но является недостаточной для достижения тромбоцитами максимально возможного индивидуального изменения формы ( $\delta_0 + \alpha(AДФ) < \delta_{\max}$ ).

Раздел 5.3 посвящён выбору зависимости  $\alpha(AДФ)$ , описывающей экспериментальные особенности изменения распределения по индексу формы под воздействием определённой концентрации АДФ. Для выбора характера добавки  $\alpha(AДФ)$  была решена обратная задача для экспериментально измеренных распределений. Пользуясь методом Монте-Карло, задавался набор теоретических тромбоцитов, начальные параметры которых принадлежали распределениям, описанным в разделе 5.1. Далее, для каждого теоретического тромбоцита, рассчитывался итоговый индекс формы согласно зависимости (9), и строилось итоговое распределение по индексу формы. Процесс получения итогового распределения по индексу формы, можно реализовать в качестве модельной функции для метода глобальной оптимизации *Direct* и определить параметры распределений начального состояния в согласии с экспериментальными данными.

Для повышения точности определения параметров распределений, необходимо одновременное использование распределения по индексу формы для нативной пробы (переход из состояния до забора пробы в нативное под действием  $ADP_{\text{eff}}$ ) и пробы после воздействия определённой концентрации  $ADP_{\text{ip}}$  (переход из состояния до забора пробы в активированное под воздействием  $ADP_{\text{eff}} + ADP_{\text{ip}}$ ), и решать обратную задачу одновременно для обоих распределений. Процедура подготовки пробы также может приводить к активации тромбоцитов. Для учёта этого эффекта в работе вводится параметр  $ADP_{\text{eff}}$ , соответствующий концентрации АДФ эквивалентной влиянию процедуры подготовки пробы.

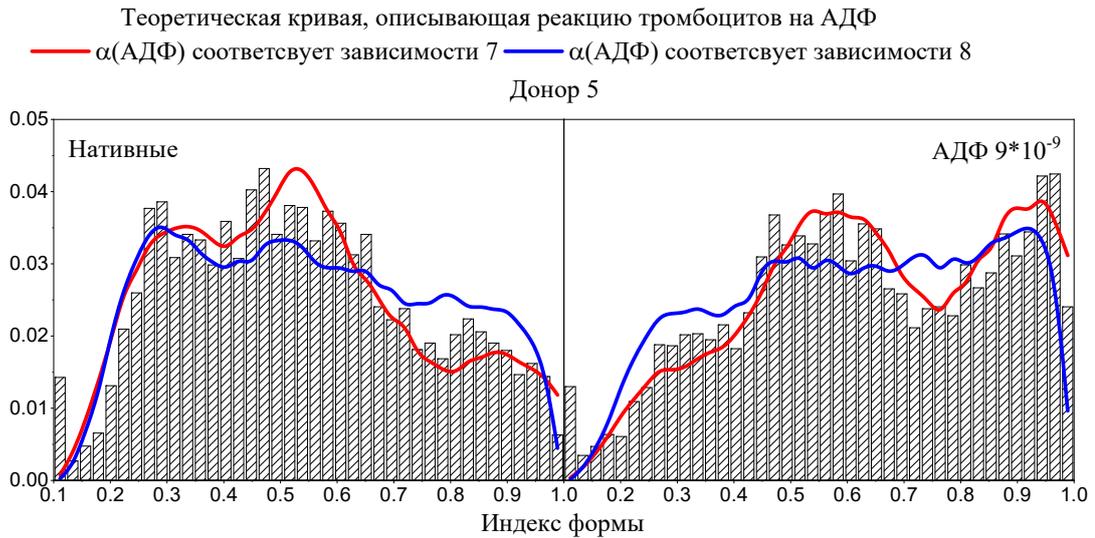


Рисунок 3 Пример определения параметров чувствительности тромбоцитов к агонистам активации с использованием двух разных зависимостей  $\alpha(\text{АДФ})$ .

Таблица 2 Сравнение найденных параметров распределений для двух вариантов  $\alpha(\text{АДФ})$  для донора 5.

	СКО	MPSI-MAX	PSIDW-MAX	LT-MAX	MPSI-MIN	PSIDW-MIN	$C_{\min}$	ADP <sub>eff</sub> *10 <sup>-9</sup>	MPS-ADP	PSDW-ADP
(7)	0.0014	0.989± 0.005	0.22	0.67± 0.03	0.287 ± 0.011	0.19	0.146 ± 0.007	15.9 ± 1.4	16.14 ± 0.04	0.33
(8)	0.0026	0.998± 0.005	0.027	0.94 ± 0.07	0.274 ± 0.014	0.16	0.10 ± 0.02	13 ± 9	16.47 ± 0.13	0.73

СКО – среднеквадратичное отклонение между теоретической кривой и экспериментальными распределениями, MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина плотности вероятности бета распределения, которому принадлежит  $\delta_0$ , MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX - среднее значение, ширина и левая граница плотности вероятности бета распределения, которому принадлежит  $\delta_{\max}$ , MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина логарифма распределения чувствительности S к АДФ и  $C_{\min}$  пороговое значение, после которого влияние АДФ на тромбоциты становится заметным, ADP<sub>eff</sub> – концентрация АДФ по воздействию эквивалентная влиянию процедуры подготовки пробы, 7 – линейная зависимость  $\alpha(\text{АДФ})$ , 8 – дробно-рациональная зависимость  $\alpha(\text{АДФ})$ .

Из Рисунок 3 и Таблица 2 видно, что линейная зависимость (7) лучше подходит для описания реакции популяции тромбоцитов на АДФ. Об этом свидетельствует значение СКО, которое для линейной зависимости почти в 2 раза меньше, чем для дробно-рациональной зависимости (8), а также форма теоретической кривой для линейной зависимости, которая лучше описывает особенности экспериментального распределения.

**Глава 6** посвящена экспериментальным работам по измерению сигнала светорассеяния от тромбоцитов, для подтверждения гипотез, сформулированных в предыдущих главах.

В главе 3 было показано, что в процессе решения обратной задачи светорассеяния для частиц, заведомо отличных от модели «сплюснутый сфероид», происходит уменьшение индекса формы. Для меньшей длины волны освещения эффект проявляется сильнее. В разделе 6.1 описано измерение пробы нативных тромбоцитов на длине волны 0.66 мкм и 0.405 мкм. При этом освещение и регистрация рассеяния от каждого отдельного тромбоцита производились одновременно на двух длинах волн. В разделе было показано, что индекс формы частиц, измеренный на длине волны 0.405 мкм, смещён в область меньших значений, относительно индексов формы частиц, измеренных на длине волны 0.66 мкм.

Подраздел 6.1.1 посвящён количественной оценке влияния наблюдаемого эффекта на определяемые параметры распределения по индексу формы. Для тромбоцитов, соответствующих модели «сплюснутый сфероид», результат решения обратной задачи светорассеяния с использованием этой оптической модели, не должен зависеть от длины волны освещения. Поэтому, сравнивая результаты решения обратной задачи светорассеяния для частицы, одновременно измеренной на разных длинах волн, можно выделить тромбоциты, не соответствующие модели «сплюснутый сфероид», по отличиям в найденных параметрах. В качестве критерия разделения выбрано значение СКО между параметрами, полученными на разных длинах волн для одной и той же частицы. За частицы, соответствующие оптической модели «сплюснутый сфероид», были приняты те, для которых значение СКО между параметрами меньше, чем медианное значение СКО по всей пробе, остальные частицы отбрасывались.

Для оценки изменений в распределениях после исключения частиц по описанному правилу, определялись параметры фракционного состава, исходного и получившегося распределений методом, описанным в главе 4.

После исключения частиц, несоответствующих модели «сплюснутый сфероид», распределение по индексу формы для тромбоцитов, измеренных на длине волны 0.66 мкм., изменилось незначительно, что проявилось в изменении параметров фракционного состава, не превышающем ошибку определения. В распределении по индексу формы, измеренном на длине волны 0.405 мкм, в результате отбрасывания уменьшилось число частиц с малым индексом формы, что приводит к значительному изменению параметров фракционного состава. Так как для длины волны 0.66 мкм параметры фракционного состава меняются в пределах ошибки определения, то в дальнейшем будем считать параметры тромбоцитов, полученных в результате решения обратной задачи светорассеяния на длине волны 0.66 мкм, соответствующими реальным, и все измерения будем проводить на этой длине волны.

Таблица 3 Параметры распределения тромбоцитов по индексу формы до и после исключения частиц, несоответствующих модели «сплюснутый сфероид».

N		Неактивированные тромбоциты			Активированные тромбоциты					$\eta_a$ , %
					Частично активированные		Полностью активированные			
		MPSI-R	PSIDW-R	%PR	MPSI-PA	PSIDW-PA	MPSI-FA	PSIDW-FA	%PFA	
0.66	до (А)	0.45 ± 0.02	0.37	43 ± 11	0.77 ± 0.05	0.32	0.945 ± 0.009	0.08	10 ± 2	57 ± 11
	после (Б)	0.447 ± 0.012	0.35	43 ± 8	0.65 ± 0.03	0.35	0.946 ± 0.006	0.07	10 ± 2	57 ± 3
0.405	до (В)	0.344 ± 0.002	0.14	26 ± 2	0.52 ± 0.02	0.56	0.838 ± 0.012	0.23	14 ± 2	74 ± 2
	после (Г)	0.312 ± 0.005	0.16	15.5 ± 1.8	0.711 ± 0.007	0.41	0.826 ± 0.005	0.15	8.0 ± 1.0	85.5 ± 1.8

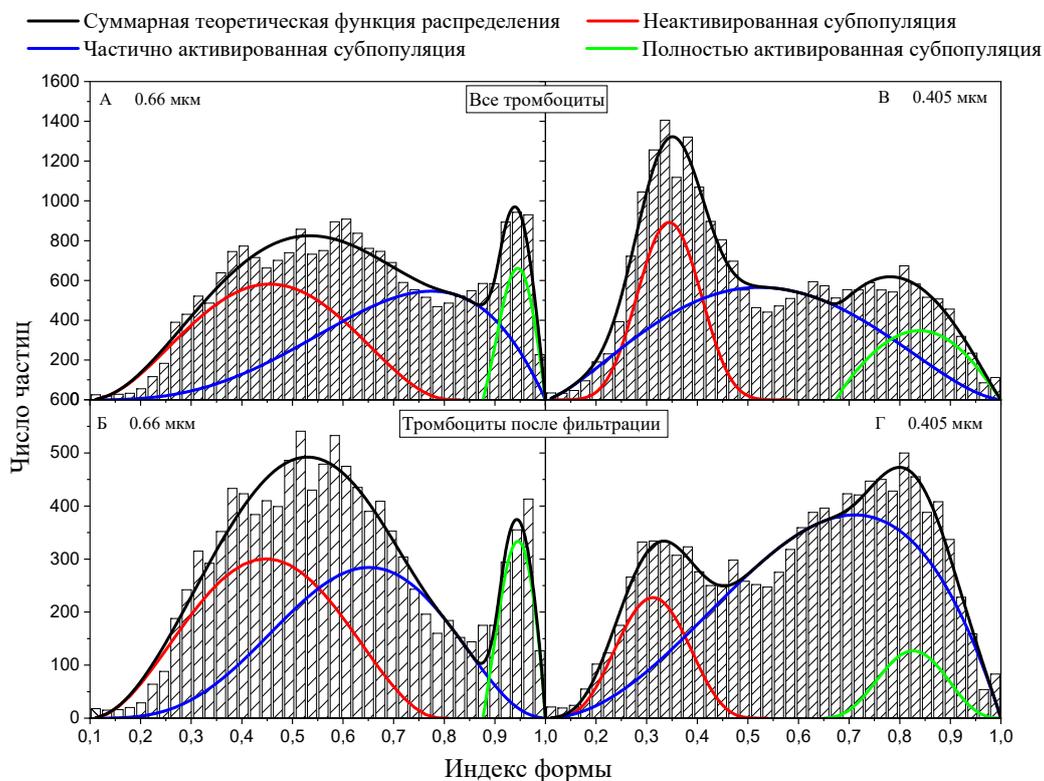


Рисунок 4 Распределение тромбоцитов, измеренных на двух длинах волн одновременно и описание фракционного состава, полученных распределений, до и после исключения тромбоцитов, соответствующих оптической модели «сплюснутый сфероид».

Раздел 6.2 посвящён определению фракционного состава тромбоцитов для группы условно здоровых доноров. В главе 4 описана теоретическая функция распределения тромбоцитов по индексу формы в нативном состоянии. В качестве этой функции была выбрана сумма трёх плотностей вероятности бета распределения, где каждая из плотностей вероятности соответствует неактивированной, частично активированной или полностью активированной субпопуляции тромбоцитов. В этом разделе представлено описание распределений нативных тромбоцитов по индексу формы для 20 условно здоровых доноров. В качестве доноров выбирались люди, не имеющие патологий кровообращения и не проходящих терапию, влияющую на систему гемостаза. Пробы подготавливались согласно протоколу, описанному в разделе 2.2.

В разделе показано, что мода субпопуляции неактивированных тромбоцитов (MPSI-R) составляет  $0.330 \pm 0.006$ , частично активированных тромбоцитов (MPSI-PA) составляет  $0.599 \pm 0.019$ , полностью активированных тромбоцитов (MPSI-FA) составляет  $0.892 \pm 0.005$ . Значения рассчитаны по всей группе. Несмотря на одинаковую подготовку проб, наблюдается сильный разброс по проценту неактивированных и активированных тромбоцитов внутри группы (от 63 до 96%).

Для анализа разброса значений моды субпопуляций условно здоровых доноров, была рассчитана взвешенная дисперсия (отношение дисперсии параметра к его среднему значению). Это значение сравнивалось со значением взвешенной дисперсии для среднего значения распределения по объёму (MPV), измеряемого альтернативными методами. Взвешенная дисперсия для MPV получена из размера интервала нормальных значений этого параметра и составляет 0.11. Для параметров, показывающих моду каждой субпопуляции (MPSI-R, MPSI-PA, MPSI-FA) взвешенная дисперсия составляет 0.09, 0.15 и 0.02 соответственно. Сравнимые значения взвешенных дисперсий говорят о сравнимом разбросе параметров MPSI-R, MPSI-PA, MPSI-FA и MPV для условно здоровых доноров. Это говорит о потенциальной пригодности параметров для поиска корреляций с заболеваниями, хотя сам вопрос требует дополнительного детального рассмотрения.

Раздел 6.3 посвящён экспериментальному исследованию реакции тромбоцитов на АДФ. В разделе 5.3 представлена феноменологическая модель изменения распределения тромбоцитов по индексу формы, в зависимости от внешнего воздействия. В этом разделе, описывается реакция популяции тромбоцитов на добавление одинаковой концентрации АДФ для 9 условно здоровых доноров. В качестве доноров выбирались люди, не имеющие патологий кровообращения и не проходящие терапию, влияющую на систему гемостаза. Пробы подготавливались согласно «мягкому» протоколу, описанному в разделе 2.2 Для определения параметров феноменологической модели, для одного донора измерялось две пробы: нативная и после добавления малого количества АДФ. Используя метод глобальной оптимизации Direct, определялись параметры модели (параметры чувствительности), описанные в разделе 5.3, для каждой пары экспериментальных распределений.

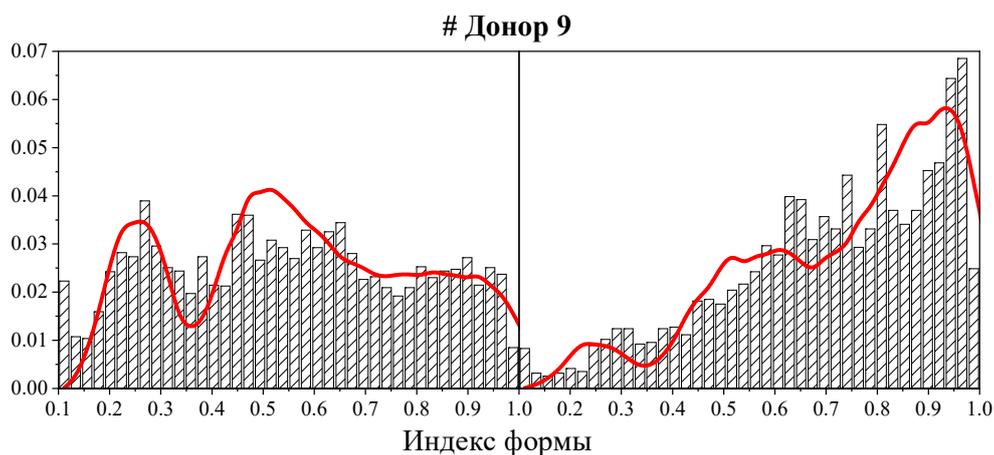


Рисунок 5 Пример поиска параметров чувствительности для донора 9. Красная линия – теоретическая кривая, соответствующая зависимости (9) с оптимальными параметрами, полученными методом Direct. Функция  $\alpha(\text{АДФ})$  соответствует зависимости (7). Гистограмма соответствует распределению по  $\delta$  для тромбоцитов, до и после воздействия  $\text{АДФ}_{\text{ip}}$ .

Таблица 4 Параметры чувствительности для условно здорового донора 9.

	<b>MPSI- MAX</b>	<b>PSIDW -MAX</b>	<b>LT- MAX</b>	<b>MPSI- MIN</b>	<b>PSIDW -MIN</b>	$C_{\min}$	<b>ADP<sub>eff</sub> *10<sup>-9</sup></b>	<b>MPS- ADP</b>	<b>PSDW- ADP</b>
<b>9</b>	0.992 ± 0.005	0.30	0.632 ± 0.019	0.253 ± 0.018	0.14	0.163 ± 0.013	10.4 ± 1.7	16.45 ± 0.06	0.33

MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX – среднее значение, ширина и левая граница плотности вероятности бета распределения, которому принадлежит максимально возможный  $\delta$  для каждого тромбоцита, MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина плотности вероятности бета распределения, которому принадлежит  $\delta$  тромбоцитов до забора пробы, MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина логарифма распределения чувствительности тромбоцитов к АДФ,  $C_{\min}$  пороговое значение начала изменения формы, а  $\text{ADP}_{\text{eff}}$  концентрация АДФ, эквивалентная воздействию процедуре забора пробы.

Особый интерес вызывает параметр величины скачка  $C_{\min}$ , который не удаётся измерить другими методами. Среднее значение для 9 условно здоровых доноров составило  $0.137 \pm 0.011$ . Внутри выборки этот параметр меняется почти в 2 раза. Такой разброс может быть связан с индивидуальными особенностями доноров, например, с изменением жёсткости периферического кольца микротрубочек и/или поверхностного натяжения мембраны. В построенной модели параметры MPS-ADP и PSDW-ADP, отвечают за средний логарифм и ширину логарифма распределения тромбоцитов по чувствительности (S) к АДФ для одного донора. Эти параметры показывают, насколько эффективно происходит воздействие АДФ на популяцию тромбоцитов. Среднее значение для 9 условно здоровых доноров для данных параметров составляет  $16.15 \pm 0.12$  и  $0.348 \pm 0.015$

соответственно. Изменение значений этих параметров для донора, предположительно происходит в случае применения терапии, блокирующей воздействие АДФ.

Раздел 6.4 посвящён оценке влияния антитромбоцитарной терапии на способность тромбоцитов к активации. Исследование проводилось для двух условно здоровых доноров с их полного согласия, и под контролем квалифицированного врача. В качестве антитромбоцитарных препаратов использовались ацетилсалициловая кислота (аспирин) и клопидогрел. Для каждого из доноров проводились измерения чувствительности тромбоцитов к АДФ, до применения терапии и после назначения короткого курса (3 дня) приёма, соответствующего препарата в профилактических дозах (по 75 мг один раз в сутки).

Таблица 5 Параметры чувствительности популяций тромбоцитов для двух условно здоровых доноров до и после применения соответствующего препарата.

	До приёма АСК	После приёма АСК	До приёма клопидогреля	После приёма клопидогреля
<b>MPSI- MAX</b>	0.990 ± 0.005	0.991 ± 0.005	0.995 ± 0.005	0.996 ± 0.005
<b>PSIDW- MAX</b>	0.21	0.25	0.19	0.25
<b>LT-MAX</b>	0.716 ± 0.018	0.54 ± 0.04	0.71 ± 0.02	0.71 ± 0.02
<b>MPSI-MIN</b>	0.309 ± 0.012	0.26 ± 0.04	0.275 ± 0.005	0.278 ± 0.003
<b>PSIDW- MIN</b>	0.18	0.19	0.21	0.21
<b>C<sub>min</sub></b>	0.146 ± 0.012	0.16 ± 0.03	0.193 ± 0.011	0.165 ± 0.002
<b>ADP<sub>eff</sub>*10<sup>-9</sup></b>	9.97 ± 0.06	7 ± 1	10.6 ± 0.2	29.4 ± 1.5
<b>MPS-ADP</b>	16.382 ± 0.007	16.5733 ± 0.0002	16.366 ± 0.002	15.967 ± 0.016
<b>PSDW- ADP</b>	0.34	0.37	0.28	0.36

Основные различия заметны в параметре MPS-ADP. Параметр характеризует значение чувствительности к активатору. При применении аспирина значение параметра увеличивается, что говорит о большой чувствительности к АДФ. При применении клопидогреля, значение параметра уменьшается, что говорит о снижении чувствительности к АДФ. В случае с применением клопидогреля такое поведение ожидаемо, так как данный препарат блокирует один из двух рецепторов к АДФ и тем самым способствует подавлению индуцированной активации. В случае с аспирином такое поведение остаётся неясным.

Для донора, принимавшего клопидогрел, дополнительно наблюдается уменьшение параметра  $C_{\min}$ . Можно предположить, что в такой ситуации это связано не с изменением значения скачка, а с изменением чувствительности к агонисту активации. Тромбоциты, с изначально малым индексом формы, преодолевают необходимый скачок, но не изменяют свою форму из-за уменьшения чувствительности к АДФ, что приводит к расширению максимально возможного индекса формы (увеличению параметра PSDW-MAX).

Уменьшение чувствительности к АДФ при применении клопидогрела косвенно доказывает адекватность интерпретации параметра MPS-ADP. И это демонстрирует потенциальную применимость описанной модели как при оценке эффективности применения антитромбоцитарной терапии, так и при исследовании влияния патологий кровообращения на чувствительность тромбоцитов к АДФ.

### **Основные результаты работы:**

1. Модернизирована система подачи пробы сканирующего проточного цитометра, для исключения влияния сдвиговой скорости на измеряемые пробы. Благодаря этому, удалось уменьшить процент полностью активированных тромбоцитов в пробе с  $20.0 \pm 1.8$  до  $2.31 \pm 0.03$ .
2. Показано, что несоответствие тромбоцитов в активированном состоянии оптической модели «сплюснутый сфероид» приводит к смещению индекса формы, определяемого в результате решения обратной задачи светорассеяния, в область меньших значений. Эффект проявляется сильнее при уменьшении длины волны освещения.
3. Экспериментально установлено и математически описано распределение тромбоцитов по индексу формы в нативном состоянии. Выявлено, что распределение по индексу формы состоит из трёх субпопуляций для каждой исследуемой пробы крови (результат показан для 20 условно здоровых доноров). Среднее значение моды субпопуляции неактивированных тромбоцитов составляет  $0.330 \pm 0.006$ , частично активированных тромбоцитов составляет  $0.599 \pm 0.019$ , полностью активированных тромбоцитов составляет  $0.892 \pm 0.005$ .
4. Построена феноменологическая модель изменения индекса формы тромбоцита под воздействием АДФ. Модель учитывает разброс начального и максимально допустимого индекса формы между тромбоцитами внутри одной популяции, наличие уровня воздействия, который не приводит к изменению формы тромбоцита (пороговое значение) и различную восприимчивость тромбоцитов к агонисту активации (чувствительность тромбоцита к агонисту активации). После преодоления порогового значения, форма тромбоцита изменяется скачком на величину порогового значения, далее линейно в зависимости от концентрации АДФ, не превышая максимально возможный индекс формы.
5. С помощью построенной феноменологической модели, определены параметры чувствительности популяции тромбоцитов к АДФ, в терминах параметров MPS-ADP и PSDW-ADP и параметр величины скачка  $C_{\min}$  для 9 условно здоровых доноров.
6. Экспериментально установлено и математически описано изменение параметров чувствительности популяции тромбоцитов к АДФ, при применении антитромбоцитарной терапии.

## ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ.

1. Yastrebova E.S. Dual-wavelength angle-resolved light scattering used in the analysis of particles by scanning flow cytometry / Yastrebova E.S., **Litvinenko A.L.**, Strokotov D.I., Vladimirov R.S., Gilev K.V., Nekrasov V.M., Karpenko A.A., Maltsev V.P. // Journal of Optics – 2021. – Vol. 23 – № 10 – P.105606.
2. **Litvinenko A.L.** Blood platelet quantification by light scattering: from morphology to activation / **Litvinenko A.L.**, Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Chernyshev A.V., Shilova A.N., Karpenko A.A., Maltsev V.P. // Analytical Methods – 2021. – Vol. 13 – № 29 – P.3233–3241.
3. Yastrebova E.S. Spectral approach to recognize spherical particles among non-spherical ones by angle-resolved light scattering / Yastrebova E.S., Dolgikh I., Gilev K.V., Vakhrusheva I.V., Liz E., **Litvinenko A.L.**, Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Maltsev V.P. // Optics & Laser Technology – 2021. – Vol. 135 – P.106700.
4. Moskalensky A.E. The platelet shape change: biophysical basis and physiological consequences / Moskalensky A.E., **Litvinenko A.L.** // Platelets – 2019. – Vol. 30 – № 5 – P.543–548.
5. Moskalensky A.E. Method for the simulation of blood platelet shape and its evolution during activation / Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Muliukov A.R., **Litvinenko A.L.**, Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. // PLOS Computational Biology – 2018. – Vol. 14 – № 3 – P.e1005899.
6. **Litvinenko A.L.** Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets / **Litvinenko A.L.**, Moskalensky A.E., Karmadonova N.A., Nekrasov V.M., Strokotov D. I., Konokhova A.I., Yurkin M.A., Pokushalov E.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. // Cytometry Part A – 2016. – Vol. 89 – № 11 – P.1010–1016.

### Прочие публикации

1. **Литвиненко А.Л.** Оценка чувствительности тромбоцитов крови человека к агонисту активации аденозиндифосфату методом сканирующей проточной цитометрии в условиях применения антитромбоцитарной терапии / **Литвиненко А.Л.**, Некрасов В.М., Четвертак Е.В., Мальцев В.П. // Актуальные Вопросы Биологической Физики И Химии – 2022. – Т. 7 – № 2 – С.286–292.