ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ КИНЕТИКИ И ГОРЕНИЯ ИМ. В.В. ВОЕВОДСКОГО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Литвиненко Алёна Леонидовна

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

1.5.2. Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель

Доктор физико-математических наук

Мальцев В.П.

Новосибирск – 2023

Оглавление

Введение 5
Глава 1 Литературный обзор 12
1.1 Физиология тромбоцита 12
1.2 Современная модель ответа системы гемостаза на повреждения сосуда 14
1.3 Форма тромбоцита 15
1.3.1 Форма нативного тромбоцита 16
1.3.2 Связь повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле и изменения формы тромбоцита 17
1.3.3 Форма активированного тромбоцита 18
1.4 Физические факторы, приводящие к активации тромбоцитов 19
1.4.1 Состояние тромбоцитов при разных температурах 19
1.4.2 Состояние тромбоцитов при различной сдвиговой скорости 21
1.5 Химические факторы, приводящие к активации тромбоцитов 22
1.5.1 Реакция тромбоцитов на тромбин 22
1.5.2 Реакция тромбоцитов на АДФ 23
1.5.3 Реакция тромбоцитов на коллаген 24
1.5.4 Реакция тромбоцитов на адреналин (эпинефрин) 24
1.6 Антитромбоцитарная терапия 25
1.6.1 Ингибитор COX 25
1.6.2 Блокаторы рецепторов к АДФ 26
1.6.3 Блокаторы рецепторов к тромбину 27
1.6.4 Блокаторы гликопротеина IIb/IIIa 28
1.6.5 Ингибиторы фосфодиэстеразы 28
1.7 Методы исследования тромбоцитов 29
1.7.1 Микроскопия 29
1.7.2 Метод Култера 30

1.7.3 Оптическая агрегометрия 31
1.7.4 Проточная цитометрия 32
1.8 Метод расчёта сигнала светорассеяния от частиц произвольной формы 34
1.9 Метод решения обратной задачи светорассеяния 36
1.9.1 Оценка погрешностей определения параметров ζ 38
1.10 Обсуждение результатов главы 1 39
Глава 2 Измерение формы тромбоцитов, с использованием технологии сканирующей проточной цитометрии 40
2.1 Технология сканирующей проточной цитометрии 40
2.2 Оценка сдвиговой скорости внутри гидродинамической системы сканирующего проточного цитометра 42
2.3 Модернизация системы подачи пробы сканирующего проточного цитометра 44
2.4 Подготовка пробы 47
2.4.1 Стандартный протокол забора крови для работы с тромбоцитами. 47
2.4.2 «Мягкий» протокол подготовки пробы тромбоцитов 48
2.5 Обсуждение результатов главы 2 49
Глава 3 Влияние выбора оптической модели на значение параметра формы тромбоцита 51
3.1 Упрощённая оптическая модель нативного тромбоцита 51
3.2 Влияние искривления периферического кольца микротрубочек на решение обратной задачи светорассеяния 52
3.3 Влияние появления псевдоподий на решение обратной задачи светорассеяния 56
3.4 Обсуждение результатов главы 3 60
Глава 4 Функция распределения тромбоцитов по индексу формы 61
4.1 Распределения – кандидаты для описания распределения тромбоцитов по индексу формы 62

4.1.1 Сумма плотностей вероятности Гаусс распределений 62
4.1.2 Сумма плотностей вероятности гамма распределений 63
4.1.3 Сумма плотностей вероятности бета распределений 65
4.2 Выбор подходящей суммарной функции 67
4.3 Обсуждение результатов главы 4 70
Глава 5 Феноменологическая модель активации тромбоцитов 72
5.1 Математическое описание популяции тромбоцитов до воздействия стимулов 72
5.2 Зависимость изменения индекса формы тромбоцита под влиянием определённой концентрации АДФ 75
5.3 Выбор подходящей зависимости изменения индекса формы тромбоцита под влиянием определённой концентрации АДФ 77
5.4 Обсуждение результатов главы 5 83
Глава 6 Экспериментальные исследования популяции тромбоцитов 84
6.1 Измерение тромбоцитов на двух длинах волн одновременно 84
6.1.1 Выбор тромбоцитов, соответствующих оптической модели «сплюснутый сфероид» 85
6.2 Определение фракционного состава нативных тромбоцитов для условно здоровых доноров 89
6.3 Определение чувствительности популяции тромбоцитов к агонисту активации для условно здоровых доноров 94
6.4 Влияние антитромбоцитарной терапии на чувствительность популяции тромбоцитов к агонисту активации 99
6.5 Обсуждение результатов главы 6 102
Заключение 104
Список сокращений и условных обозначений 107
Список литературы 110

Введение

Актуальность темы исследования. 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%) [1]. 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 активирован-

ное 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 [2]. 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 [3]. Также, подвергается сомнению правильность определения объёма данным методом для частиц на краях распределения [4].

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 [5, 6].

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 [7]. 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 [7]. 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 [8],

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 (аденозиндифосфата).

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 [9]. 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±0.006, частично активированных тромбоцитов составляет 0.599±0.019, полностью активированных тромбоцитов составляет 0.892±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±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.

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.)

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-ю таблицами и 24-я рисунками.

Глава 1 Литературный обзор

1.1 Физиология тромбоцита

Как и многие форменные элементы крови, тромбоциты образуются в результате преобразования клеток предшественников. Для тромбоцитов такими клетками являются мегакариоциты. Мегакариоциты располагаются, в основном, в костном мозге и обладают достаточно большим размером, по сравнению с тромбоцитами. На текущей момент существует несколько теорий образования тромбоцитов из мегакариоцитов, но все теории объединяет наличие стадии отделения группы тромбоцитов от родительской клетки. Это происходит, благодаря смыканию конца пучка микротрубочек в кольца на периферии родительской клетки и отсоединению будущего тромбоцита с захватом мембраны, натянутой на кольцо, и цитоплазмы с органеллами, ограниченной мембраной. Вследствие случайности места смыкания кольца микротрубочек, каждый тромбоцит может немного отличается от других не только по размеру, но и по количеству захваченных веществ и органелл [10].

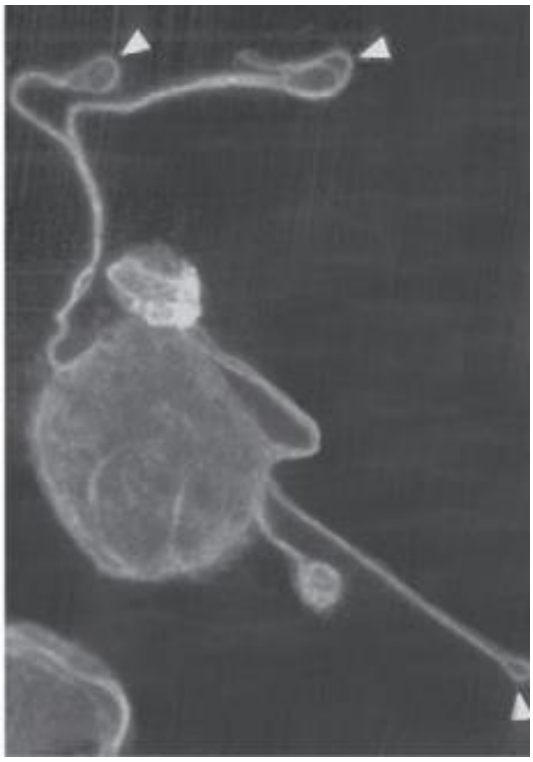

Рисунок 1 Процесс отделения тромбоцитов от мегакариоцита [10].

Рисунок 1 представлен один из этапов отделения тромбоцитов от родительской клетки. Центральный объект – мегакариоцит, длинные выросты – псевдоподии, образованные микротрубочками, белыми стрелками обозначены будущие тромбоциты.

Зрелые тромбоциты циркулируют в крови около 10 дней [11]. Форма тромбоцита в нативном состоянии поддерживается плоским периферическим кольцом замкнутых и не замкнутых микротрубочек. Незамкнутые микротрубочки находятся в динамическом равновесии. Дополнительно, на поверхности кольца, располагаются молекулярные моторы денеин и кинезин [12]. На кольцо натянута мембрана, поддерживаемая микрофиламентами, ограниченными на концах специфическими белками, поддерживающими микрофиламенты в стабильном состоянии [13]. Тромбоциты, в норме, обладают диаметром в диапазоне от 2 до 5 мкм и толщиной до 0,5 мкм. В цитоплазме тромбоцитов располагаются эндоплазматический ретикулум, митохондрии, лизосомы, гликосомы, а также α гранулы. У тромбоцитов отсутствует ядро, а поверхность тромбоцита содержит большое количество каналов и специфических рецепторов, в том числе и рецепторы к агонистам процесса активации. В нативном состоянии, тромбоциты практически не взаимодействуют между собой [11].

Основной функцией тромбоцитов является участие в остановке кровотечения. Для этого тромбоциты переходят из нативного состояния в активированное, адгезируют к месту разрыва сосуда и агрегируют между собой. Агрегаты тромбоцитов вместе с эритроцитами и нитями фибрина образуют тромб, закрывающий повреждение сосуда. Активированное состояние тромбоцитов характеризуется изменением формы с появлением множества псевдоподий, появлением специфических рецепторов и выпуском гранул. При этом известно, что морфологические изменения являются более чувствительным признаком активации, чем появление биохимических маркеров [5, 6]. Наиболее распространёнными физиологическими агонистами активации являются тромбин, коллаген, АДФ и тканевый фактор. Дополнительно тромбоциты чувствительны к механическому воздействию сдвиго-

вого напряжения, возникающему в неоднородном гидродинамическом потоке жидкости [14]. Подобный характер течения наблюдается в сосудах с атеросклеротическими изменениями.

1.2 Современная модель ответа системы гемостаза на повреждения сосуда

Основной функцией тромбоцитов является их участие в ответной реакции организма на повреждение сосуда, приводящей к остановке кровотечения. Эту функцию в организме выполняет система гемостаза, хотя это не единственное назначение данной системы. Также система гемостаза отвечает за предотвращение массированного свёртывания крови и растворение тромбов, после регенерации стенки сосуда. В последние годы активно ведутся исследования, подтверждающие вовлеченность системы гемостаза и тромбоцитов в иммунный ответ [15] и участие тромбоцитов в метастазировании раковых опухолей [16].

Всю работу системы гемостаза для упрощения принято делить на две стадии: стадия образования тромба и стадия фибринолиза. Тромбоциты являются ключевыми участниками стадии образования тромба, потому рассмотрим её подробнее.

Вместе с тромбоцитами, в процессе свёртывания крови, участвует группа белков плазмы – факторов свёртывания. Процесс свёртывания крови (реакция системы гемостаза на повреждения сосуда) запускается в момент появления в кровотоке тканевого фактора (инициация). Тканевый фактор (ТФ) – это трансмембранный белок, находящийся на поверхности многих клеток организма, за исключением эндотелия. ТФ активирует фактор свёртывания VII, образуя комплекс ТФ/VIIa. Этот комплекс катализирует активность фактора свёртывания X и IX. Далее, Xa активирует кофактор V, и на поверхности клетки с ТФ образуется комплекс Xa/Va. Этот комплекс катализирует образование малого количество тромбина. Тромбин является не только основным агонистом активации тромбоцитов (1.5.1), но и катализирует такой важный процесс, как преобразование фибриногена (не адгезирует к стенкам сосуда) в фибрин (способен адгезировать к стенкам сосудов). В дальнейшем, фибрин образует длинные нити, запечатывающие повреждение и не дающие эритроцитам покинуть сосудистое русло. Количество тромбина, образую-

щегося на стадии инициации, является недостаточным для нормального протекания процесса свёртывания. Необходимо лавинообразное образование тромбина, которое реализуется как итог развития следующих двух стадий свёртывания крови.

(Усиление) Небольшое количество тромбина, образованное на стадии инициации, приводит к активации тромбоцитов, дополнительной активации фактора свёртывания V, диссоциации фактора VIII и активации фактора XI.

(Распространение) После активации тромбоцитов, на его поверхности локализуются факторы свёртывания Va и VIIIa, а также, благодаря диффузии, комплекс ТФ/VIIa переносится на поверхность активированного тромбоцита. Комплексы VIIIa и ТФ/VIIa дополнительно активируют фактор Xa, который затем связывается с Va и тем самым, образует протромбиназный комплекс, поддерживающий достаточное количество тромбина для образования стабильного тромба. Несмотря на упрощенное разделение всего процесса на стадии (инициация, усиление и распространение), все процессы происходят одновременно, и в одном пространстве [17].

Тромбоциты важны не только для обеспечения лавинообразного образования тромбина, но и для локализации тромба. Благодаря своей способности активироваться в результате взаимодействия с коллагеном, тромбоциты могут адгезировать к месту повреждения сосуда, чем обеспечивают развитие процессов образования тромбина и фибрина непосредственно вблизи повреждения сосуда и, как следствие, образование тромба в необходимом месте [18].

1.3 Форма тромбоцита

Тромбоциты были открыты более 150 лет назад, но первые попытки детально исследовать форму тромбоцита были предприняты только в 1976 году, с помощью фазово-контрастного микроскопа [19]. В качестве оптической модели для этой клетки хорошо подходит модель «сплюснутый сфероид». Эту модель ранее использовали, как для гидродинамического расчёта, так и для расчёта сигналов светорассеяния [20, 21]. Необходимо отметить, что эта модель формы не учитывает внутреннее строение тромбоцитов и биологические особенности перестройки формы в процессе активации, которые были открыты в последние годы [22].

1.3.1 Форма нативного тромбоцита

Особенности формы клеток определяются строением цитоскелета. Для цитоскелета тромбоцита характерно наличие субмембранного кортекса и периферического кольца микротрубочек, объединённых моторными белками: динеином и кинезином. Субмембраный кортекс тромбоцитов представлен спектрином и микрофиламентами в комплексе с миозином [23]. Кортекс создаёт поверхностное натяжение мембраны, путем уменьшения площади. Периферическое кольцо микротрубочек растягивает мембрану и придаёт тромбоциту форму сфероида. Кольцо состоит из микротробучек как стабилизированных, так и находящихся в динамическом равновесии [24].

Наличие периферического кольца определяет форму нативного тромбоцита. Вайт и Роа [25] доказали это экспериментально, определив, что отсутствие кольца, растягивающего мембрану, приводит к сферизации тромбоцита. Авторы использовали винкристин, как дестабилизирующий микротрубочки агент. Под воздействием этого вещества тромбоциты, теряют свою дискоидную форму.

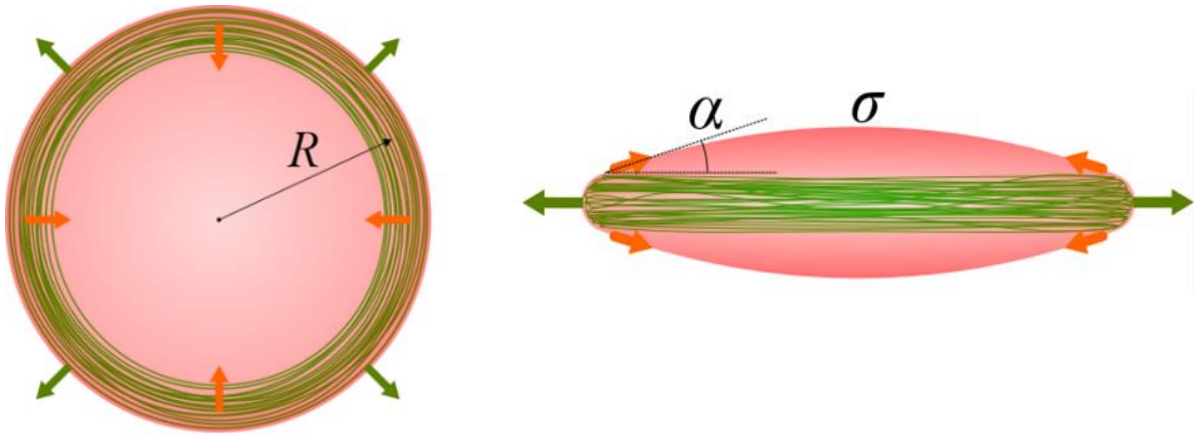

Рисунок 2 Схематичное представление структуры тромбоцита.

Периферическое кольцо микротрубочек показано зелёными линиями, поверхность мембраны показана розовым. Зелёные стрелки обозначают воздействие со стороны периферического кольца микротрубочек на кортекс, оранжевые стрелки обозначают воздействие со стороны кортекса на периферическое кольцо микротрубочек.

σ – поверхностное натяжение, α – угол между плоскостью кольца микротрубочек и касательной к поверхности, R – радиус кольца микротрубочек.

Биофизическое описание взаимосвязи между поверхностным натяжением и жёсткостью кольца микротрубочек, представлено в работе Москаленского А.Е. [26]. В его работе указано, что взаимосвязь можно выразить в виде неравенства (1) . Схематично параметры неравенства представлены на Рисунок 2

$$\sigma \cos(\alpha) \leq \frac{k}{R^3} \qquad (1)$$

здесь σ – поверхностное натяжение, α – угол между плоскостью кольца микротрубочек и касательной к поверхности, k – жёсткость кольца микротрубочек, R – радиус кольца микротрубочек. В случае нарушения неравенства, из-за изменения какого-либо параметра, происходит изменение формы тромбоцита.

1.3.2 Связь повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле и изменения формы тромбоцита

Как отмечалось выше, за поддержание формы нативного тромбоцита отвечают две структуры: периферическое кольцо микротрубочек (замкнутых и незамкнутых), объединённых между собой моторными белками динеинами и кинезинами, а также субмембранный кортекс, включающий в себя микрофиламенты, стабилизированные концевыми белками.

В процессе активации, тромбоцит меняет свою форму, благодаря нескольким параллельно происходящим процессам, запускающимся за счет резкого роста концентрации Ca^{2+}в цитозоле. На сегодняшний день принято считать, что основное изменение формы, происходит за счёт изменений в состоянии колец микротрубочек.

Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле приводит к смещению баланса в работе динеинов и кинезинов [27, 28], что в свою очередь приводит к движению колец микротрубочек друг относительно друга, внутри пучка. Это может приводить к избыточной кривизне кольца. Эти же моторные белки, закреплённые за пределами кольца микротрубочек, могут удлинить кольцо, которое будет сильнее растягивать субмембранный кортекс [12].

Повышение концентрации Ca^{2+} может приводить к ускорению деполимеризации незамкнутых микротрубочек [29, 30] и, таким образом, влиять на жёсткость периферического кольца. Наличие этого эффекта было показано при активации тромбоцитов [31, 32].

Повышение концентрации Ca^{2+} инициирует актин-миозиновое взаимодействие, что приводит к увеличению напряжения субмембранного кортекса [33]. Ca^{2+} активирует гельзолин, белок, вызывающий фрагментацию микрофиламентов [34]. Фрагментация микрофиламентов приводит к образованию длинных актиновых нитей, лежащих в основе псевдоподий активированного тромбоцита.

Каждый из описанных процессов приводит к нарушению баланса между поверхностным натяжением и жёсткостью кольца микротрубочек (1) и, как следствие, к изменению формы тромбоцита.

1.3.3 Форма активированного тромбоцита

Форма активированного тромбоцита значительно отличается от нативной. Изначально, это связано с перестройкой периферического кольца микротрубочек. Из плоского состояния, под воздействием ряда биохимических процессов (1.3.2), кольцо переходит в седловидную фигуру [22]. Так как плоское состояние тромбоцита реализуется за счёт растяжения мембраны кольцом микротрубочек, то форма продолжает определятся данной структурой, как поверхность минимальной площади и определённого объёма, натянутой на изменённое кольцо, до тех пор, пока площадь поверхности тромбоцита не станет равной площади поверхности сферы этого объёма. Подробно, метод задания таких фигур, описан в работе Москаленского А.Е. [35].

Вторым процессом, определяющим форму активированного тромбоцита, является рост псевдоподий. В основе псевдоподии лежат микрофиламенты. Также, как и микротрубочки, микрофиламенты являются структурами, находящимися в динамическом равновесии, то есть растущими с одной стороны и в тоже время разбирающимися с другой. В нативном тромбоците эти структуры стабилизированы специальными белками. В момент активации тромбоцита, в цитоплазме активиру-

ется белок гелзолин, разрезающий микрофиламенты [36]. Это приводит к дестабилизации микрофиламентов и их активному росту. Увеличение длины микрофиламентов является причиной «выпячиванию» этих структур за пределы поверхности минимальной площади, натянутой на кольцо (формирования псевдоподий).

Процесс моделирования большого количества форм тромбоцитов с псевдоподиями, сильно осложнён случайностью места «выпячивания» и длины псевдоподии. Для одиночных клеток, в случае фиксирования длины и мест выпячивания, моделирование провести возможно. Результат такого моделирования представлен в разделе 3.3.

1.4 Физические факторы, приводящие к активации тромбоцитов

Тромбоциты чувствительны к изменению параметров своего окружения, таких как температура и сдвиговое напряжение потока жидкости. Сдвиговое напряжение зависит от градиента скорости движения потока вязкой жидкости – крови или физиологического раствора в гидродинамической системе измерительного прибора. Исследование влияния различных температур на активацию тромбоцитов, важно в первую очередь для создания протоколов хранения и работы с пробами и трансфузионными препаратами, в то время как влияние напряжения сдвига потока важно, не только при измерении образцов некоторыми методами, но и при патологиях сосудов, например, таких, как атеросклероз.

1.4.1 Состояние тромбоцитов при разных температурах

На сегодняшний день, большинство протоколов работы с тромбоцитами настоятельно рекомендуют при транспортировке и хранении, не допускать охлаждения пробы ниже 15ºС, а все исследования проводить при комнатной температуре (22ºС – 24ºС).

При охлаждении пробы ниже 15ºС, тромбоциты теряют дисковидную форму. Это происходит из-за деполимеризации двух основных элементов цитоскелета тромбоцита, поддерживающих сплюснутую форму: микрофиламентов и периферического кольца микротрубочек. Дополнительно, снижение температуры хранения приводит к спонтанному росту концентрации Ca^{2+} в цитозоле [37]. При низкой тем-

пературе хранения на мембране тромбоцита появляется Р-селектин (один из маркеров активации тромбоцитов). В то же время, экспериментально замечено, что переливание тромбоцитов, хранящихся при пониженной температуре, способно сильнее повысить свёртываемость крови, чем переливание тромбоцитов, хранящихся при комнатной температуре [38]. В первую очередь, это можно связать с изначальной активацией охлаждённой тромбоцитарной массы. Стоит отметить, что тромбоциты, предварительно охлаждённые до низких температур, быстро удаляются из кровотока. Это связано с отделением сиаловых кислот с поверхности GPIbα – рецептора тромбоцитов к фактору фон Виллебранда (белок, участвующий в процессе адгезии тромбоцитов к стенкам сосудов). После этого, рецептор становится узнаваем для фагоцитов и гепатоцитов, что приводит к активному удалению охлаждённых тромбоцитов из кровотока [39].

Температура 37ºС считается нормальной физиологической температурой работы большей части клеток организма и тромбоциты не исключение. С этой точки зрения, комнатную температуру можно считать пониженной. В действительности, при проведении измерений формы тромбоцитов при различных температурах, была получена нелинейная зависимость этой характеристики от температуры с точкой перегиба в районе 30ºС. Для температуры выше 30ºС изменение формы считается незначительным, а при снижении температуры, количество тромбоцитом с изменённой формой начинает стремительно расти [37]. Также было показано, что появление Р-селектина на поверхности нативных тромбоцитов не происходит с изменением температуры. В образцах, хранящихся при температурах 28-30ºС наблюдается повышенная реакция на АДФ и коллаген и присутствие спонтанно образовавшихся микроагрегатов, чего не наблюдается для образцов, хранящихся при температуре 37ºС [40–42]. Дополнительно, наблюдается зависимости скорости изменения формы тромбоцитов и температуры (чем выше температура, тем быстрее меняется форма) [42]. Тем не менее, при нагреве пробы от 25ºС до 37ºС, тромбоциты восстанавливают свои свойства [41].

1.4.2 Состояние тромбоцитов при различной сдвиговой скорости

С точки зрения физики, кровь в сосуде упрощенно можно представить в виде вязкой жидкости, текущей в упругих цилиндрах. Форменные элементы крови, в том числе и тромбоциты, можно представить объектами, движущимися по этому цилиндру. Характер движения таких частиц представляет научный интерес и активно изучается методами математического моделирования [43]. В частности, было показано, что при движении тромбоцитов в потоке вместе с эритроцитами, последние выталкивают более мелкие частицы на границу сосуда. Таким образом, реализуется эффект «патрулирования» сосудистой стенки, и в момент повреждения, тромбоциты достаточно быстро оказываются у места разрыва [44, 45]. Также существует гипотеза о том, что изменение формы, во время активации, способствует ускорению движения тромбоцитов к точке повреждения [26].

Тромбоциты чувствительны к воздействию со стороны потока крови, как сами по себе, так и через чувствительность одного из основных посредников адгезии, фактора фон Виллебранда. В частности, сайт связывания фактора фон Виллебранда с тромбоцитом, открывается только при повышении напряжения сдвига (2) (происходит раскрутка белка) и без выполнения этого условия снижается возможность стабильной адгезии тромбоцитов к сосудистой стенке [46].

Основной характеристикой потока, к которому чувствительны тромбоциты, является напряжение сдвига – характеристика, зависимая от градиента скорости движения потока вязкой жидкости [47]. В случае, движения жидкости по трубкам круглого сечения, градиент преобразуется в частную производную скорости по радиусу трубки.

$$\tau = -\omega \frac{\partial \vartheta}{\partial r} \qquad (2)$$

где τ – напряжение сдвига, υ – скорость, r – расстояние от стенки, на котором определяется напряжение, ω – коэффициент динамической вязкости.

Отличием вязкости между пробами можно пренебречь. В этом случае, удобнее использовать параметр сдвиговой скорости γ=τ/ω, измеряемый в обратных секундах 1/с.

Таблица 1 Характерные значения сдвиговых скоростей в сосудах

Тип сосуда	**Сдвиговая скорость (1/с)**
Артерии	300-800
Артериолы	500-1600
Аорта	1000
Вены	20-200
Стенозированные сосуды	800-10000

Превышение характерных физиологических значений γ приводит к изменению формы и активации тромбоцитов [47]. При воздействии повышенной γ в цитозоле тромбоцита наблюдается повышенный уровень Ca^{2+}. Механизм появления Ca^{2+} в цитозоле, после воздействия сдвиговой скорости, отличен от активации агонистом. В мембране тромбоцита расположены катионные каналы, открывающиеся при превышении критической γ и выравнивающие концентрацию Ca^{2+} между цитозолем и внешним окружением тромбоцита [48]. В норме, в неактивированном тромбоците, концентрация Ca^{2+} составляет порядка 10^{-9} М/л, а в плазме 10^{-6} М/л [8]. На степень активации пробы также влияет время нахождения тромбоцитов под воздействием повышенной γ [14].

1.5 Химические факторы, приводящие к активации тромбоцитов

1.5.1 Реакция тромбоцитов на тромбин

Тромбин (фактор свёртываемости II) – самый сильный агонист активации тромбоцитов, хотя его основной функцией является катализ реакции перехода фибриногена в фибрин. В свою очередь, большая часть тромбина появляется в кровотоке вследствие каскада реакций, протекающих на поверхности тромбоцитов, в момент повреждения сосуда. Основными рецепторами к этому агонисту активации являются рецепторы 1 и 4 (PAR_1 и PAR_4), при этом основным считается PAR_1. Один тромбоцит может нести на своей поверхности до 2500 копий этого рецептора, что снижает порог чувствительности до концентраций в 1 нМ. PAR_4 обладает чувстви-

тельностью в 10 раз меньшей, чем PAR_1. Этот рецептор предположительно является дублирующим на случай уменьшения числа или активности рецепторов PAR_1, в результате мутаций или заболеваний [49].

PAR_1 и PAR_4 связаны с белками G_q и $G_{12/13}$. Активация $G_{12/13}$ приводит к фосфорилированию миозиновых цепей (MLC), а те, в свою очередь, способствуют перестройке микрофиламентов. G_q приводит к активации фосфолипазы C_β (PLC_β), которая гидролизует связанный с мембраной фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP_2) с образованием инозитола-1,4,5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерина (DAG). IP_3 стимулирует высвобождение Ca^{2+}, а DAG активирует протеинкиназу C (PKC). PKC способствует высвобождению гранул.

Особое внимание стоит уделить высвобождению ионов Ca^{2+}. Этот процесс является общим этапом для всех агонистов активации и крайне важен для активации и агрегации тромбоцитов, в том числе, для изменения формы в процессе активации (1.3.2) [50].

1.5.2 Реакция тромбоцитов на АДФ

Аденозиндифосфат (АДФ) – одно из важнейших органических соединений в живых организмах. Хорошо известно, что эта молекула является одним из основных компонентов в энергетическом обмене клетки, а также может выполнять и другие функции. В системе гемостаза, АДФ является одним из первичных агонистов активации тромбоцитов, который попадет в кровоток из разрушенных клеток и гранул, секретируемых активированными тромбоцитами. АДФ является слабым агонистом и вызывает только изменение формы и обратимую агрегацию, без дегранулляции тромбоцитов [51]. Стоит отметить, что дополнительная активация под воздействием АДФ необходима для образования стабильных агрегатов[50].

Основными рецепторами тромбоцитов к АДФ являются: $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$. Также, как PAR_1, $P2Y_1$ является G_q связанным рецептором. Его активация приводит к активации PLC_β и повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле. Это способствует изменению формы тромбоцитов. Число рецепторов этого типа на тромбоците значительно меньше, чем PAR_1, чуть больше 100 на каждом тромбоците [52].

Второй рецептор к АДФ, $P2Y_{12}$, приводит к снижению уровня аденилатциклазы. Это блокирует каскад реакций, приводящих к ингибированию агрегации. Таким образом, благодаря, взаимодействию $P2Y_{12}$ и АДФ происходит усиление процесса агрегации, запущенного другими агонистами активации и агрегации [51].

1.5.3 Реакция тромбоцитов на коллаген

Коллаген – фибриллярный белок, являющийся одним из главных составляющих соединительной ткани организма человека. Основная функция коллагена – это обеспечение прочности и эластичности органов. Коллагеновые волокна встречаются в сухожилиях, связках, стенках кровеносных сосудов, в пластинчатой костной ткани, а также в коже [53]. В момент разрыва сосуда нарушается целостность коллагена, и края белка попадают в сосудистое русло.

Коллаген является одним из наиболее сильных факторов активации тромбоцитов (также, как и тромбин) [54]. Этот агонист активации, в отличие от тромбина и АДФ, не требует времени для наработки и сразу появляется в кровотоке в момент разрыва сосуда, но его количество не увеличивается в процессе развития реакции свёртывания.

Основным рецептором к коллагену является GPVI. Этот рецептор существенно отличается от описанных ранее (группы PAR и группы P2), он связан с Fc γ цепями и приводит к активации другого сигнального пути. Одним из элементов этого каскада, является фосфолипаза Cγ2 (PLCγ2). Этот тип фосфолипазы, также как PLC_{β}, приводит к высвобождению ионов Ca^{2+} вследствие активации IP_3 и DAG. Число рецепторов к коллагену, по разным данным, составляет от 4000 до 6000 копий на тромбоцит, что больше числа рецепторов, как к тромбину, так и к АДФ [54].

1.5.4 Реакция тромбоцитов на адреналин (эпинефрин)

Отдельно стоит описать взаимодействие тромбоцитов с таким веществом, как адреналин. Адреналин – гормон, синтезирующийся, в основном, мозговым веществом надпочечников. Как и любой гормон, адреналин оказывает огромное влияние на различные системы организма, в том числе и на систему гемостаза, в частности на тромбоциты. Основными рецепторами к адреналину являются α и β-адренорецепторы.

Адреналин не является первичным агонистом активации тромбоцитов, и в отсутствие остальных агонистов активации, не приводит к реакции активации, но, тем не менее, важен, для нормальной реализации гемостаза. Взаимодействие этого вещества с α-адренорецептором, через каскад реакций, приводит к снижению уровня циклического аденозинмонофосфата (cAMP). Изменение уровня cAMP является одним из способов предотвращения нежелательной активации тромбоцитов. В частности, здоровые эндотелиальные клетки способны запускать каскад реакций, приводящих к увеличению уровня cAMP в тромбоците. Основное воздействие cAMP в тромбоците, состоит в снижении активности PLC – ключевого участника каскада взаимодействия тромбоцита с тромбином, АДФ и коллагеном.

Таким образом, при высоком уровне адреналина в кровотоке, в тромбоците снижается количество cAMP, а вместе с этим уменьшается минимальная необходимая концентрация агонистов активации, приводящая к активации тромбоцита[18, 55].

1.6 Антитромбоцитарная терапия

В процесс поддержания гемостаза вовлечено множество факторов свёртывания крови, тромбоциты, изменение состояния потока и реакция сосудистой стенки на разрыв. В общем смысле, антиагрегантная терапия может быть направлена на любое звено этой сложной системы. Антитромбоцитарная терапия выступает, как часть антиагрегантной терапии и направлена на угнетение функций тромбоцитов. На сегодняшний день, выделяют 4 основные группы препаратов, различающихся по воздействию на тромбоциты.

1.6.1 Ингибитор COX

Циклооксигеназа 1 (COX_1) – основной фермент в цепочке биосинтеза простагландина. Под действием этого фермента происходит синтез простагландина H2 из арахидоновой кислоты, который далее преобразуется тканеспецифичными изомеразами. В частности, внутри тромбоцита, простагландин H2 преобразуется в тромбоксан А. Тромбоксан А способен активировать тромбоциты, а также стимулировать агрегацию тромбоцитов и вазоконстрикцию сосудов.

Основным ингибитором СОХ является ацетилсалициловая кислота (АСК), которая необратимо инактивирует СОХ. АСК не селективна и оказывает влияние как на $COX_{1,}$ так и на COX_2. Поэтому, изначально, АСК широко применялась как противовоспалительное и жаропонижающее средство, но для достижения такого эффекта, необходимо применение высоких доз и достаточно короткий период между применениями, так как большинство клеток, быстро ресинтезируют СОХ, в отличие от тромбоцитов. Для достижения антиромбоцитарного эффекта достаточно ежедневного приёма в дозах от 30 до 100 мг [56].

1.6.2 Блокаторы рецепторов к АДФ

На поверхности тромбоцита расположены два типа родственных по структуре рецепторов к АДФ: $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$. Рецептор $P2Y_{12}$ обладает большей селективностью, поэтому чаще всего выступает в качестве мишени для антитромбоцитарной терапии, хотя разработки в области блокаторов $P2Y_1$ ведутся до сих пор. Блокировка $P2Y_{12}$ в значительной степени влияет на амплификацию агрегации. Выделяют несколько групп веществ, проявляющих анти $P2Y_{12}$ свойства.

- Необратимо связывающиеся препараты.

В первую очередь, это широко применяемое вещество клопидогрел, а также менее известные – тиклопидин и прасугрел. Эти вещества относятся к группе тиеноперединов и являются пропрепаратами, то есть становящимися активными, только после воздействия определённых процессов метаболизма. В частности, клопидогрел переходит в свою активную форму только после взаимодействия с цитохромом P450 в печени.

Тиенопереденины связываются с $P2Y_{12}$ рецептором необратимо. Плато подавления агрегации наблюдается через 4-5 дней, после начала приёма препарата в рекомендованных суточных дозах. Так как, тиенопередины связываются с рецептором необратимо, то восстановление способности популяции тромбоцитов к агрегации наблюдается примерно через 10 дней после отмены препарата, что сопоставимо с периодом жизни тромбоцита в кровотоке.

Эти вещества также снижают уровень фибриногена в кровотоке, снижают агрегацию эритроцитов, стимулируют выработку NO и ингибируют зависимую от

тромбоцитов экспрессию тканевого фактора на поверхности эндотелиальных клеток.

- Обратимо связывающиеся препараты.

Тикагрелор – препарат, не требующий дополнительной метаболизации. Это вещество блокирует $P2Y_{12}$, не конкурируя с АДФ, в процессе присоединения к рецептору. Максимальная эффективность достигается через 2 часа после приёма препарата, период полувыведения из плазмы составляет 6-8 часов, хотя действие препарата сохраняется до 5-ти дней.

Ещё одним ингибитором $P2Y_{12}$ является кангрелор. Кангрелор относится к АТФ подобным веществам, обладает высокой аффинностью к $P2Y_{12}$ рецептору, и при этом, относительно устойчив к расщеплению эндонуклеазами. Вещество не требует метаболизации, и активно сразу после внутривенной инфузии. Период полувыведения составляет 3-6 часов. Короткий период полувыведения приводит к быстрому восстановлению функции тромбоцитов, после прекращения инфузии [57].

1.6.3 Блокаторы рецепторов к тромбину

На сегодняшний день, тромбин считается основным агонистом активации тромбоцитов, оказывающим влияние даже в наномолярных концентрациях. Тромбин критически важен для процесса коагуляции крови (катализ реакции перехода фибриногена в фибрин). Основными рецепторами на тромбоцитах к тромбину являются PAR_1 и PAR_4. Исследования на модельных животных показали, что блокировка этих рецепторов не приводит к нарушениям в системе гемостаза, опасным для жизни, хотя ранее они считались небезопасными. Поэтому была разработана группа веществ, выступающих в качестве антагонистов к тромбиновым рецепторам тромбоцитов, ворапаксар и атопаксар. Оба препарата являются селективными антагонистами к PAR_1 и практически не влияют на работы PAR_4. Связывание этих веществ с рецептором считается условно необратимым, за счёт малой скорости обратной реакции. Действие ворапаксара наступает быстрее и сохраняется дольше, по сравнению с атопаксаром [58].

1.6.4 Блокаторы гликопротеина IIb/IIIa

Гликопротеин IIb/IIIa – молекула, отвечающая за адгезию тромбоцитов. В процессе активации тромбоцита эта молекула меняет свою конформацию, что позволяет присоединяться к ней таким молекулам, как фибриноген и фактор фон Виллебранда. На сегодняшний день, существуют три антагониста для этого гликопротеина: абциксимаб, эптифибатид и тирофибан.

Абциксимаб представляет из себя моноклональное антитело к гликопротеину IIb/IIIa, но также связывается с гликопротеинами на поверхности макрофагов, эндотелиальных клеток и гладкой мускулатуры. Поэтому, применение абциксимаба может приводить не только к снижению агрегации тромбоцитов, но и к нарушению адгезии тромбов. Период полувыведения из плазмы очень короткий и составляет около 10-30 минут, хотя абциксимаб детектируется на тромбоцитах даже через 15 дней несмотря на то, что время жизни тромбоцитов не превышает 7-10 дней. Это говорит о возможности передачи этого антитела с клетки на клетку. В случае отмены препарата функции агрегации тромбоцитов восстанавливаются через 48 часов.

В отличие от абциксимаба, эптифибатид и тирофибан обратимо связываются с гликопротеином IIb/IIIa и находятся в кровотоке около 2-х часов. Применение этих веществ отличается по времени восстановления способности тромбоцитов к агрегации. Для эптифибатида это время составляет около 4-х часов, а для тирофибана около 8-ми часов [59].

1.6.5 Ингибиторы фосфодиэстеразы

Одним из способов уменьшения степени активации и агрегации тромбоцитов, является увеличение концентрации cAMP и cGMP внутри тромбоцита. Здоровые эндотелиальные клетки способны влиять на концентрацию этих веществ. Основное воздействие cAMP состоит в снижении активности PLC, ключевого участника каскада реакции на тромбин, АДФ и коллаген. Повышение концентрации cGMP внутри тромбоцита, сопровождается снижением внутриклеточных потоков Ca^{2+}. С другой стороны, чрезмерная концентрация cAMP и cGMP контролируется соответствующими фосфодиэстеразами, приводящими к снижению этих веществ

внутри тромбоцита. На сегодняшний день, известно два ингибитора фосфодиэстераз: дипиридомол и цилостазол.

Дипиридомол проявляет ингибирующую активность для фосфодиэстераз к cAMP и cGMP. Помимо этого, молекула оказывает сосудорасширяющее и противовоспалительное воздействие, а также стимулирует выработку NO эндотелиальными клетками, уровень которого также способствует повышению cAMP и cGMP в тромбоцитах. Поэтому, антиагрегантную активность дипиридомола не связывают с его способностью блокировать работу фосфодиэстераз, а связывают с его влиянием на эндотелиальные клетки и его противовоспалительным действием.

Циластозол проявляет ингибирующую активность к рассматриваемым фосфодиэстеразам. Эффект обратим, и зависит от концентрации препарата в крови. Также, как и дипиридомол, циластозол обладает сосудорасширяющим и противовоспалительным действиями, и стимулирует функции эндотелия. В дополнение к этим свойствам, циластозол улучшает метаболизм жиров, уменьшает уровень триглицеридов, и повышает уровень липопротеинов высокой плотности [60].

1.7 Методы исследования тромбоцитов

1.7.1 Микроскопия

Первым методом наблюдения тромбоцитов, как и для многих других малых объектов, исторически является микроскопия [61]. На сегодняшний день, этот метод продолжает активно использоваться для исследования тромбоцитов.

Самой простой, с точки зрения подготовки пробы, среди различных видов микроскопии, является оптическая микроскопия. С помощью оптической микроскопии, исследуют мазок крови на стекле, определяя количество и форму тромбоцитов, а также их агрегатов [62]. Этот метод нередко используется как рутинный, для подсчёта и оценки морфологии не только тромбоцитов, но и других клеток крови. Метод можно использовать для исследования состояния тромбоцитов, под воздействием внешних контролируемых условий. Например, под воздействием повышенной сдвиговой скорости на тромбоциты, или при моделировании состояния сосуда в специфичной микрофлюидной камере [63, 64]. Нередко используют комбинацию оптической и флуоресцентной микроскопии в случае, когда необходимо

регистрировать появление специфических рецепторов. Для исследования изменения внутренних структур тромбоцита, в процессе активации, например при перестройке периферического кольца микротрубочек тромбоцита, используется конфокальная микроскопия [65], однако при использовании этого метода, как и при использовании флюоресцентной микроскопии, требуется дополнительный этап в пробоподготовки. Не менее интересна электронная микроскопия в применениях к исследованиям форм и внутренних структур тромбоцитов. Тем не менее, этот вариант микроскопии совершенно не подходит для исследования живых клеток [62, 66].

Общим минусом для всей микроскопии является малая скорость исследования, что приводит к низкой статистической достоверности результатов, и необходимость проводить сложные процедуры подготовки проб, а также к риску влияния преаналитичеких ошибок на результат исследования.

1.7.2 Метод Култера

В 1953 году появился метод для быстрого определения объёма клеток и их подсчёта – метод Култера [67]. С появлением метода Култера, расширились возможности анализа дисперсных сред. В основе метода Култера лежит явление изменения проводимости резервуара с проводящей жидкостью, в момент прохождения непроводящей частицы через отверстие в непроводящей стенке, разделяющей резервуар надвое. В результате наблюдается изменение силы тока на электродах, присоединённых к противоположным краям резервуара, которое зависит, как от размера отверстия, так и от объёма и формы анализируемой частицы. Этим методом можно определить объём отдельных форменных элементов крови. А благодаря высокой скорости работы, возможно набрать необходимое количество частиц, для статистически достоверного описания общего состояние выбранного типа форменных элементов крови. Для тромбоцитов принято измерять количество, средний объем тромбоцитов (MPV) и ширину распределения тромбоцитов по объёму (PDW), количественно характеризующую гетерогенность популяции клеток. На сегодняшний день, эти параметры определяются любым гематологическим анализатором.

Форма тромбоцитов отлична от сферы, поэтому на сигнал будут влиять не только объём, но и другие характеристики (характеристики пролёта частицы и её геометрии). Эти характеристики невозможно получить по сигналу, измеряемому этим методом, что является основным минусов метода для исследования тромбоцитов.

1.7.3 Оптическая агрегометрия

Золотым стандартом в исследовании функционального состояния тромбоцитов и системы гемостаза является световая агрегометрия. Метод разработан в 1962 году Густавом фон Борном [68]. Агрегометр представляет собой фотометр, измеряющий интенсивность света, прошедшего через кювету с плазмой крови. Этим методом возможно достаточно точно определить оптическую плотность исследуемого образца.

Главным достоинством метода является возможность наблюдать процесс образования агрегатов в реальном времени, под воздействием различных агонистов активации. Наиболее популярным для оценки функционального состояния системы, является использование таких веществ, как коллаген, АДФ, тромбин или синтетические молекулы, связывающиеся с тромбиновыми рецепторами на тромбоцитах, адреналине, тромбоксане А.

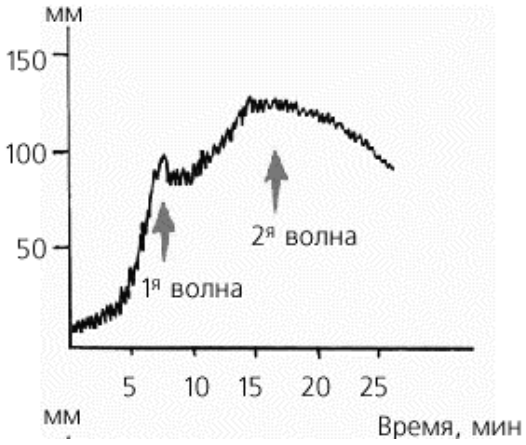

Рисунок 3 Типичная агрегатограмма для агрегации, стимулированной добавлением АДФ.

По наклону кривой агрегации определяют скорость агрегации. Дополнительно выделяют особенности процесса, такие как волны агрегации в ответ на АДФ. Некоторые исследователи отдельно выделяют участок, отвечающий за активацию тромбоцитов[69, 70].

Метод получил широкое распространение, благодаря возможности работать с живым объектом, простоте проведения анализа, возможности примерно оценивать проблемное звено коагуляционного каскада в случае наличия патологии. Но главное – благодаря данным, полученным с помощью этого прибора, возможно корректировать применяемую антиагрегантную и антитромбоцитарную терапию. Благодаря повсеместному введению агрегометрии, удалось значительно уменьшить количество послеоперационных тромбозов и спонтанных кровоизлияний, а также контролировать такое явление, как резистентность к АСК после длительного периода применения [71].

Основным минусом метода является – необходимость исследовать систему гемостаза в целом, а не отдельные её элементы и тем более не тромбоциты в отдельности. Сложность системы гемостаза не даёт в точности, математически описать получаемыми кривые, поэтому метод считается полу качественным. Результаты работы сильно зависят от качества выполненной процедуры подготовки пробы. Любое неконтролируемое воздействие на тромбоциты, вызывает дополнительную активацию, и может привести к ошибочным результатам.

1.7.4 Проточная цитометрия

Ещё одним активно используемым методом для исследования тромбоцитов является проточная цитометрия. Основной инструментальной особенностью проточной цитометрии является высокая скорость анализа, достигающая 5000 частиц в секунду на стандартных коммерческих цитометрах. Кроме того, скорость анализа на проточном цитометре, оснащенном современным компьютером, позволяет анализировать суспензии частиц в реальном времени [72]. Стандартный проточный цитометр включает в себя проточный капилляр и лазер, излучение которого направляется ортогонально потоку. Исследуемая частица вводится в центр потока

несущей жидкости, при использовании гидродинамической фокусировки. Оптическая и электронная системы стандартного проточного цитометра обеспечивают измерение интенсивности света, рассеянного одиночной частицей в определенные телесные углы, это рассеяние вперед, рассеяние вбок, под углом 90 градусов и флуоресценция. Обычно, частицы классифицируются по «цитограммам», которые представляют собой двумерные распределения интенсивности рассеяния или флуоресценции одиночными частицами в фиксированные углы.

Методом проточной цитометрии можно изучать взвеси отмытых тромбоцитов, плазму, богатую тромбоцитами и цельную кровь. Проточная цитометрия цельной крови дает возможность изучать функциональные особенности тромбоцитов, в естественных условиях, с учетом взаимодействия с другими клетками крови. Используя этот метод диагностики, определяют степень активации тромбоцитов, являющеюся показателем склонности к тромбозам, что в свою очередь играет важную роль в оценке патогенеза многих заболеваний. Метод позволяет выявить группу пациентов, которым показана антиагрегантная терапия и подобрать эффективное лекарственное средство[73].

Определение активированных тромбоцитов происходит по наличию специфических рецепторов на поверхности. Наиболее изученным методом выявления активации тромбоцитов, с помощью проточной цитометрии, является определение экспрессии Р-селектина. Р-селектин – компонент α- гранул, который экспрессируется на поверхность клеточной мембраны только после секреции. Поэтому Р-селектин – специфическое антитело, которое определяется только у дегранулированных тромбоцитов. В некоторых работах утверждается, что для определения активности тромбоцитов метод проточной цитометрии более чувствительный, чем оптическая агрегометрия [74].

Значительным недостатком технологии для определения активированных тромбоцитов, является необходимость использования флюоресцентных меток. Подготовка флюоресцентно-окрашенных образцов требует дополнительного времени и манипуляций, что повышает риск преаналитических ошибок.

Существует модификация технологии, это сканирующая проточная цитометрия. Этот метод включает в себя запись индикатрис светорассеяния в широком угловом диапазоне, структура которых зависит от свойств частицы (размер, плотность, форма) [75]. Для получения информация о параметрах рассеивающей частицы из индикатрисы светорассеяния, используют методы решения обратной задачи светорассеяния. Также, сканирующий проточный цитометр может измерять сигнал флюоресценции, одновременно с индикатрисой. В применении к тромбоцитам, в качестве маркера активации, удобно использовать изменение формы. Это не требует дополнительных манипуляций с окраской флюоресцентными метками.

1.8 Метод расчёта сигнала светорассеяния от частиц произвольной формы

Задачу моделирования сигналов светорассеяния от частиц произвольной формы можно решать двумя путями: путём использования аппроксимационных приближений или придерживаясь точного решения.

Все приближённые методы расчёта ограничены областью применимости метода. Чаще всего, эта область определяется границами по размерному параметру ($x = \frac{\pi n_{cp} d}{\lambda}$, где d – максимальный размер частицы, λ – длина волны освещения, $n_{ср}$ – показатель преломления среды), по параметру фазового сдвига ($\rho_0 = 2x(m-1)$) и относительному показателю преломления ($m = \frac{n}{n_{cp}}$). Наиболее известными приближениями являются: приближения Релея ($x \ll 1, |mx \ll 1|$), приближение Релея-Ганса-Дебая ($|m-1| \ll 1, |\rho_0| \ll 1$), аномальная дифракция и приближение Вентцеля-Крамерса-Бриллюена ($x \gg 1, |m-1|) \ll 1$), а также приближение геометрической оптики ($x \gg 1$) [76]. Форменные элементы крови, а в частности тромбоциты, частично попадают в области применимости приближений Релея-Ганса-Дебая, аномальной дифракции и Вентцеля-Крамерса-Брилюена. Однако, из-за пограничного положения, эти приближения могут плохо работать при расчёте сигнала от таких объектов, как тромбоциты.

Точные методы расчёта способны получать истинный вид сигналов светорассеяния, при условии неограниченного времени работы и вычислительных ресурсов. Все точные методы можно разделить на аналитические, частично-аналитические и численные. К аналитическим методам относится метод разделения переменных уравнения Гельмгольца. Этот метод применим только к частице, поверхность которой совпадает с одной из систем координат. И только в этом случае разделение переменных возможно.

Частично аналитические методы основаны на разложении дифференциального уравнения для электрического поля в определённой области в ряд по собственным функциям (чаще всего по сферическим гармоникам). К данным методам относятся: обобщённый метод разделения переменных, формализм Ми, метод согласования в конечном числе точек и метод расширенных граничных условий [76]. Перечисленные методы хорошо применимы для осесимметричных частиц, однако в случае наличия особенностей формы (вогнутостей или выпуклостей) применение методов сильно усложняется.

Для моделирования сигнала светорассеяния от неоднородных частиц произвольной формы, необходимо применять полностью численные методы, которые напрямую дискретизуют уравнения для электрического поля. К таким методам относятся метод конечных разностей во временной области и метод конечных элементов, решающие дифференциальные уравнения во временной и частотной областях. А также методы, дискретизующие объёмное интегральное уравнение для электрического поля: метод моментов и метод дискретных диполей.

В этой работе для расчёта сигналов светорассеяния используется метод дискретных диполей. Этот метод показывает большую эффективность по сравнению с методом конечных разностей во временной области [77]. В основе метода лежит представление рассеивающей частицы в виде кубической решётки, заполненной точечными диполями, поляризуемость каждого диполя определяется локальным показателем преломления. Взаимодействие диполей между собой и с падающим полем определяет итоговую поляризацию каждого диполя, а итоговое поле определяется суммой полей от точечных диполей с известной поляризацией.

Моделирование светорассеяния методом дискретных диполей реализовано в программном пакете АДДА [9]. Программный пакет позволяет моделировать сигналы рассеяния от простых предустановленных форм, а также задавать формы самостоятельно, с помощью сторонних программ, причём форма может быть неоднородной по внутренней структуре. Все расчёты сигналов светорассеяния, в рамках этой работы, проводились с использованием этого программного пакета.

1.9 Метод решения обратной задачи светорассеяния

Обратная задача – задача нахождения параметров исходного объекта по наблюдаемому сигналу. В этой работе, под исходным объектом, подразумеваются частицы, рассеивающие свет. Решением обратной задачи является параметр формы этой частицы, либо распределение по форме, для измеряемой популяции тромбоцитов. В этом случае, решением обратной задачи являются параметры распределения.

Несмотря, на отличие в постановке задач, можно использовать схожие подходы к их решению. На первом этапе необходимо построить функцию отличий $S(\zeta)$, показывающую отличие предполагаемого сигнала (назовём его модельной функцией) от наблюдаемого сигнала. Назовём ζ вектором, параметризующим функцию отличий. Решением обратной задачи являются такие параметры модельной функции, для которых $S(\zeta)$ принимает минимальное значение. В данной работе, за функцию отличий $S(\zeta)$, принимается среднеквадратичное отклонение (СКО) между модельной функцией и наблюдаемым сигналом.

При неизвестном количестве локальных минимумов у $S(\zeta)$, с задачей поиска глобального минимума, лучше всего, справляются методы глобальной оптимизации детерминированного типа.

Одним из методов глобальной оптимизации детерминированного типа является метод интервалов. Данный метод имеет несколько других названий: метод покрытий, метод деления пополам. Стратегию данного метода можно назвать стратегией ветвей и границ [78]. Такие алгоритмы рекурсивно разделяют всё пространство на интервалы, при этом вычисляется значение на верхней и нижней границах

интервала. Чаще всего, алгоритмы останавливаются, когда нижняя и верхняя граница интервала совпадают (что трудно достижимо на практике), или когда величина интервала достигает определённого значения. Основным минусом этого метода является необходимость знания некоторой априорной информации о функции (константы Липшица для функции цели или же степень дифференцируемости функции). Также функция должна быть задана явно, что необходимо для вычисления значений функции на границах интервала.

Оптимизацией метода интервалов является алгоритм Direct. Первые работы по данному алгоритму были опубликованы в 1993 году [79]. Главное отличие от метода интервалов – отсутствие требования на априорное знания константы Липшица, хотя некоторая оценка константы неявно реализуется во время работы алгоритма. Алгоритм оптимизирован таким образом, что вблизи минимумов пространство разбивается с меньшим шагом, чем всё остальное пространство. В этих местах происходит рекурсивное углубление разбиения. На первом шаге всё пространство разбивается на три интервала по каждому параметру. В том случае, когда необходимо найти один параметр – пространство является отрезком, двух – плоскостью, трёх – кубом и так далее. После этого производится определение интервала, в котором наиболее вероятно находится минимум. Далее определяются границы интервала, и алгоритм переходит на следующую итерацию.

Так как константа Липшица и величина интервала подбираются в процессе построения алгоритма, то критериями остановки могут быть число итераций или глубина разбиения. Таким образом, этот алгоритм с минимальной априорной информацией, гарантирует обход всего пространства, и нахождения всех минимумов, при достаточном времени работы.

Существует ещё один активно использующийся метод глобальной оптимизации – метод баз данных [80]. Для использования этого метода необходимо предварительно создать базу данных теоретических сигналов, с известными параметрами ζ. После этого, для каждого экспериментального сигнала строится функция отличий $S(\zeta)$. Далее происходит поиск минимального значения построенной функции.

Главным достоинством метода является однократный расчёт теоретических сигналов для исследуемого типа частиц, что существенно ускоряет решение обратной задачи светорассеяния. Стоит отметить, что для применения метода необходимо знать возможные границы параметров исследуемых частиц. Также при создании базы данных, необходимо заранее оценить количество необходимых теоретических сигналов. Использование базы данных с малым числом сигналов, может привести к значительным ошибкам в определённых параметрах. В этой работе используется база данных с такой же плотностью сигналов, как и в работе Москаленского А.Е. [7]

1.9.1 Оценка погрешностей определения параметров ζ

Для того, чтобы понять, насколько корректными получаются параметры частиц или распределения после решения обратной задачи, необходимо оценить погрешности получаемых параметров. Для оценки погрешностей параметров **ζ,** рассчитаем плотность вероятности P*(*ζ), исходя из того, что исходный сигнал или плотность распределения обладает параметрами ζ.

$$P(\zeta) = \mathrm{k}\left[S(\zeta)\right]^{-\frac{n}{2}} \tag{3}$$

Здесь $k = \left(\int_B S\left[\zeta\right]^{-\frac{n}{2}} d\zeta\right)^{-1}$, n – эффективное число степеней свободы [24].

Зная плотность вероятности P*(*ζ), можно рассчитать математическое ожидание f(ζ) следующим образом:

$$\begin{gathered}\left\langle f(\zeta)\right\rangle = k\int_B f(\zeta)\left[S(\zeta)\right]^{-\frac{n}{2}} d\zeta = k\sum_{i=1}^{M} f(\zeta_i)\mathrm{S}(\zeta_i)^{-\frac{n}{2}} V_i; \\ k = \left(\sum_{i=1}^{M} S(\zeta_i)^{-\frac{n}{2}} V_i\right)^{-1}\end{gathered} \tag{4}$$

Пользуясь выражением (4) и зная P(ζ), дополнительно можно рассчитать матрицу ковариации **C**= <(ζ-**μ**)(ζ-**μ**)^{T}>

В силу предположения о независимости погрешности одного параметра от погрешностей других параметров, эта матрица имеет диагональный вид с значением квадрата дисперсии для параметров на главной диагонали.

1.10 Обсуждение результатов главы 1

Тромбоциты – форменные элементы крови, основная функция которых, состоит в поддержании гемостаза. Согласно современной модели ответа системы гемостаза на повреждение сосуда, тромбоциты занимают ключевое место в нормальном развитие процесса свёртывания крови. Именно на поверхности активированного тромбоцита, происходит лавинообразное образование тромбина, необходимое для быстрого образования стабильного тромба. Благодаря своей способности адгезировать к месту повреждения сосуда, активированные тромбоциты отвечают за локализацию места образования тромба. Эти факты показывают важность исследования тромбоцитов и их способности к активации.

Самым ранним признаком перехода тромбоцита в активированное состояние, считается изменение формы. Наблюдая за эволюцией формы набора тромбоцитов под воздействием фактора активации, можно сделать выводы о эффективности ответа организма на воздействие выбранного фактора. В данной работе будет использована технология сканирующей проточной цитометрии, которая в отличие от остальных методов исследования тромбоцитов, позволяет получить информацию не только об объёме, но и о форме одиночных тромбоцитов с достаточной статистической точностью. Это позволит измерять распределение тромбоцитов по форме в нативном состоянии и после воздействия агониста активации, а также, позволит наблюдать влияние применения антитромбоцитарной терапии на тромбоциты.

Глава 2 Измерение формы тромбоцитов, с использованием технологии сканирующей проточной цитометрии

2.1 Технология сканирующей проточной цитометрии

Современные проточные цитометры обладают высокой скоростью анализа частиц, и за счёт этого, высокой статистической точностью. Чаще всего, данные приборы используют для регистрации сигналов флюоресценции от исследуемых частиц, реже, для регистрации сигналов светорассеяния в узком угловом диапазоне. Большая часть проточных цитометров регистрируют рассеяние в передних углах, близких к 0º и в боковых, близких к 90º.

Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять сигналы флуоресценции, сигнал светорассеяния, в широком угловом диапазоне 10º–70º (индикатриса светорассеяния), который содержит информацию о морфологии измеряемой частицы. В результате решения обратной задачи светорассеяния, можно определить геометрические параметры рассеивающего объекта по его индикатрисе светорассеяния. Так, для тромбоцитов, можно определить объём и форму (индекс формы) в приближении сплюснутого сфероида (Глава 3).

Основными элементами сканирующего проточного цитометра являются: лазер, установленный соосно потоку измеряемых частиц, создающий освещение частицы для получения индикатрисы светорассеяния, кварцевый капилляр с полусферическим зеркалом (проточная кювета), который необходим для сбора сигнала рассеяния в определённый угол, лазер, установленный перпендикулярно потоку частиц, необходимый для получения сигналов рассеяния вперёд и вбок, аналогичный сигналам, получаемым стандартными проточными цитометрами, и система регистрации и записи сигналов.

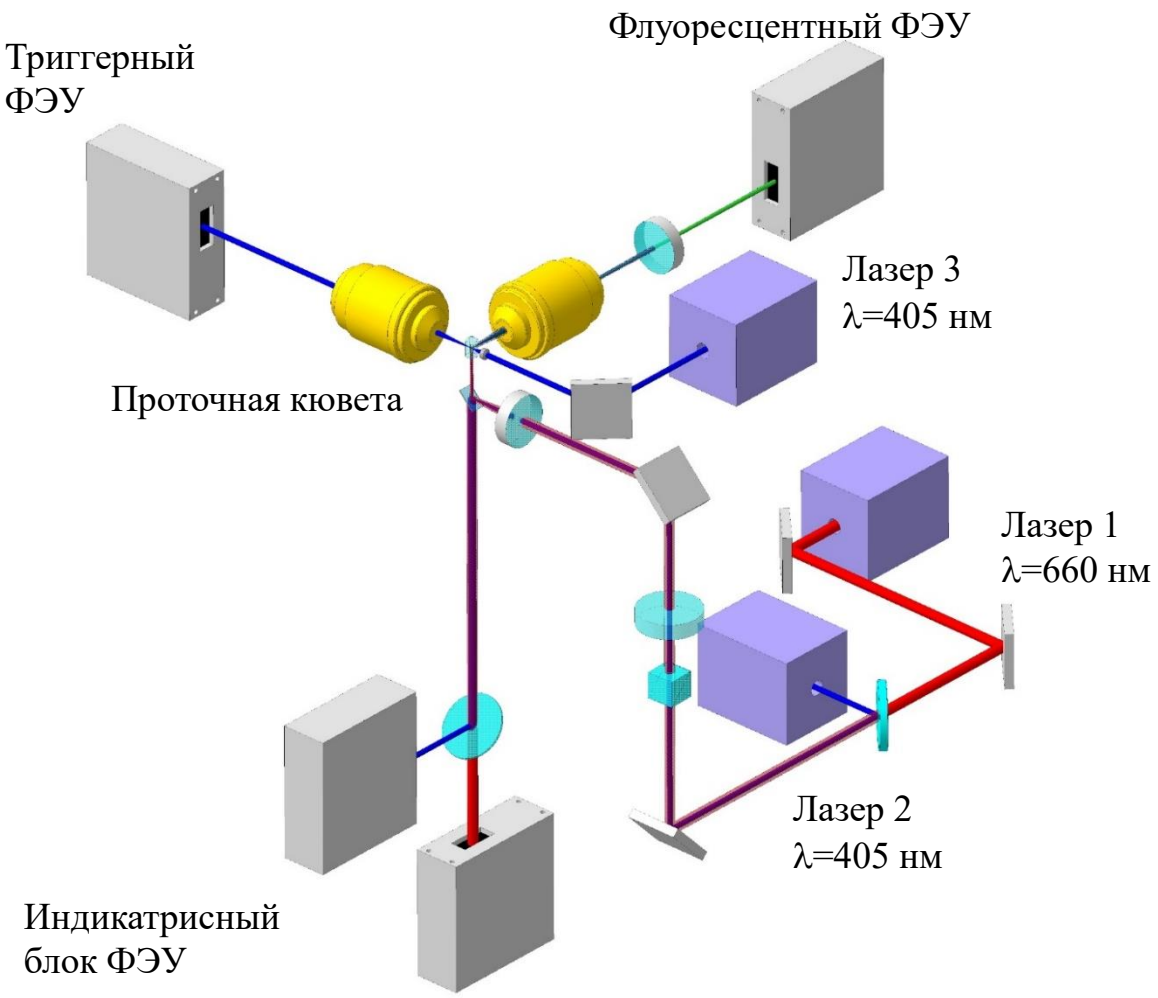

Рисунок 4 Оптическая схема сканирующего проточного цитометра.

В текущую версию конструкции оптической части сканирующего проточного цитометра входят три лазера. Лазер 1 и Лазер 2 предназначены для освещения частицы для получения индикатрис на длине волны 0.66мкм и 0.405мкм соответственно. Лазер 3, это освещающий лазер, предназначенный для создания рассеяния вперёд и вбок. Сигнал рассеяния вперёд, используется в данной системе, как триггерный сигнал для запуска записи всех сигналов рассеяния. Лучи освещающих лазеров 1 и 2 проходят через центр капилляра и сфокусированы так, чтобы обеспечивать одинаковую интенсивность излучения на протяжении всей зоны измерения.

Свет, рассеянный объектом, собирается полусферическим зеркалом. Благодаря этому, для каждого положения частицы внутри капилляра, формируется поток

света, рассеянного под определённым углом, проходящий после отражения от полусферического зеркала, строго параллельно оси капилляра. Данный поток отражается от зеркала, установленного под углом в 45° к оси цитометра, и попадает на ФЭУ. Благодаря, однозначной связи между углом рассеяния и регистрируемым сигналом, мы можем построить индикатрису светорассеяния I(β) [81].

2.2 Оценка сдвиговой скорости внутри гидродинамической системы сканирующего проточного цитометра

Основным элементом сканирующего проточного цитометра является проточная кювета. Именно в ней, происходит освещение частицы лазерным лучом и формируется сигнал рассеяния. Для получения правильного значения интенсивности в зависимости от угла рассеяния для одиночной частицы, необходимо добиться последовательного и центрированного, относительно капилляра, прохода частиц через проточную кювету. Подобный режим прохода частиц обеспечивается гидродинамической системой доставки пробы в зону измерения. В сканирующем проточном цитометре, в качестве жидкости, несущей частицы, используется физиологический раствор (0,9% NaCl).

При движении в вязкой жидкости, тромбоциты испытывают воздействие со стороны этой жидкости. Степень воздействия возможно определить, оценив сдвиговую скорость γ в системе и сравнив значение с физиологическим. При этом, системой управления контролируется расход (Q) данной жидкости, предназначенной для подачи пробы, в зону измерения. Поэтому, будет удобно оценить влияние системы подачи пробы на тромбоциты, выразив параметр γ через Q.

Определим напряжение сдвига τ (2), исходя из общих соображений. Известно, что все капилляры, подводящие к зоне измерения, капилляры имеют круглое сечение. Рассмотрим элементарный цилиндр длиной l на расстоянии r от стенки сосуда и запишем все силы, действующие на этот цилиндр:

$$\overrightarrow{F_1} + \overrightarrow{F_2} + \overrightarrow{F_\tau} = 0 \qquad (5)$$

где F_1 и F_2 силы давления, действующие на основания цилиндра, F_τ это сила вязкого трения.

Течение внутри капилляров ламинарное, следовательно, сумма всех сил равна 0. При оценке напряжения сдвига, влиянием силы тяжести пренебрегаем. Выразим все F, через параметры системы подачи пробы и получим выражение для τ.

$$p_1\pi r^2 - p_2\pi r^2 + 2\pi r l\omega\frac{\partial\vartheta}{\partial r} = 0,$$
$$\tau = -\omega\frac{\partial\vartheta}{\partial r} = \frac{\pi r(p_2 - p_1)}{2\pi l} \qquad (6)$$

здесь p – давление, индексами 1 и 2 обозначены основания цилиндра, l – длина цилиндра, υ – скорость, ω – коэффициент динамической вязкости. Q можно определить, пользуясь формулой Пуазейля:

$$Q = \frac{\pi R^4}{8\omega l}(p_2 - p_1) \qquad (7)$$

где R это радиус поперечного сечения цилиндра, p – давление, индексами 1 и 2 обозначены основания цилиндра, l – длина цилиндра, ω – коэффициент динамической вязкости. Подставив (7) в (6), получаем искомое выражение для τ и для γ (сдвиговая скорость) соответственно:

$$\tau = \frac{4\omega Q}{\pi R^3}$$
$$\gamma = \frac{4Q}{\pi R^3} \qquad (8)$$

Конструкция цитометра устроена таким образом, что сама система забора и подачи пробы находится достаточно далеко от зоны измерения. Поэтому, в гидродинамике подачи пробы, предусмотрено два режима работы: режим быстрой доставки пробы к зоне измерения и режим самого измерения. Режим доставки пробы отличается повышенным расходом Q, и следовательно, оказывает повышенное влияние на пробу со стороны гидродинамической системы.

Рассчитаем значение γ, для обоих режимов работы системы подачи пробы. Поток жидкости, необходимый для подачи пробы, получается с помощью использования поршневого насоса с шаговым двигателем. Один шаг двигателя соответствует выдаче жидкости в объеме V=50 нл., и остаётся постоянным, независимо от

режима. Для изменения расхода изменяется время t, за которое двигатель проворачивается на 1 шаг. В режиме продавливания, это время составляет t=0.003с, при этом, Q=17 мкл/с. Внутренний диаметр пробозаборника составляет 0,15мм. Подставив эти значения в (8), получаем γ=6446.6 1/с. Это значение, более чем в 6 раз, превышает нормальные значения для аорты, хотя и не достигает значения, при котором тромбоциты начинают лизировать (250 дин/см^2[47], что для физиологического раствора составляет 25000 1/с). В режиме измерения t=8с, что соответствует γ=2.3 1/с.

Таким образом, работа системы подачи пробы цитометра, может приводить к активации тромбоцитов и требует модернизации.

2.3 Модернизация системы подачи пробы сканирующего проточного цитометра

Основное воздействие на тромбоциты, со стороны системы подачи пробы, происходит в первый момент работы, а именно в момент доставки пробы в зону измерения. В момент самого измерения, сдвиговая скорость γ значительно снижается. Поэтому, для уменьшения воздействия на пробу со стороны СПЦ, необходимо уменьшить значение сдвиговой скорости, в момент доставки пробы в зону измерения и, дополнительно, максимально приблизить систему подачи пробы к зоне измерения.

В качестве решения, была установлена новая система подачи пробы, непосредственно возле зоны измерения. Чтобы ускорить процесс доставки пробы до зоны измерения, в новой системе подачи пробы, было изменено время проворачивания двигателя на один шаг, и установлено t=2с. γ для такого t составляет 9,43 1/с, что значительно ниже значений этого параметра в аорте. С таким значением t удалось получить одночастичный режим пролёта частиц через зону измерения, и в то же время сократить время задержки, между подачей пробы в систему и измерением. Для текущей реализации системы время задержки составляет 12 минут. За это время не происходит изменений в характеристиках клеток, при условии нахождения их в потоке [82].

Для проверки эффективности модернизации системы подачи пробы, было проведено измерение плазмы крови условно здорового донора, поданной через стандартную и через модифицированную систему подачи пробы цитометра.

Кровь забиралась в соответствие со стандартным протоколом (2.4.1), в пробирку с цитратом натрия 105-109 мМ/л, в качестве антикоагулянта, после чего методом седиментации выделялась плазма. Раствором 0,9% NaCl, плазма разводилась в 30 раз для того, чтобы снизить концентрацию частиц в плазме, и поданная одной из двух систем подачи пробы, плазма измерялась на сканирующем проточном цитометре.

Для каждой из проб решалась обратная задача светорассеяния и определялся процент активированных (%FA), частично активированных (%PA) и неактивированных тромбоцитов (%RES). Данные параметры отражают степень воздействия на пробу, со стороны системы подачи пробы. Метод определения фракционного состава пробы, описан в Глава 4.

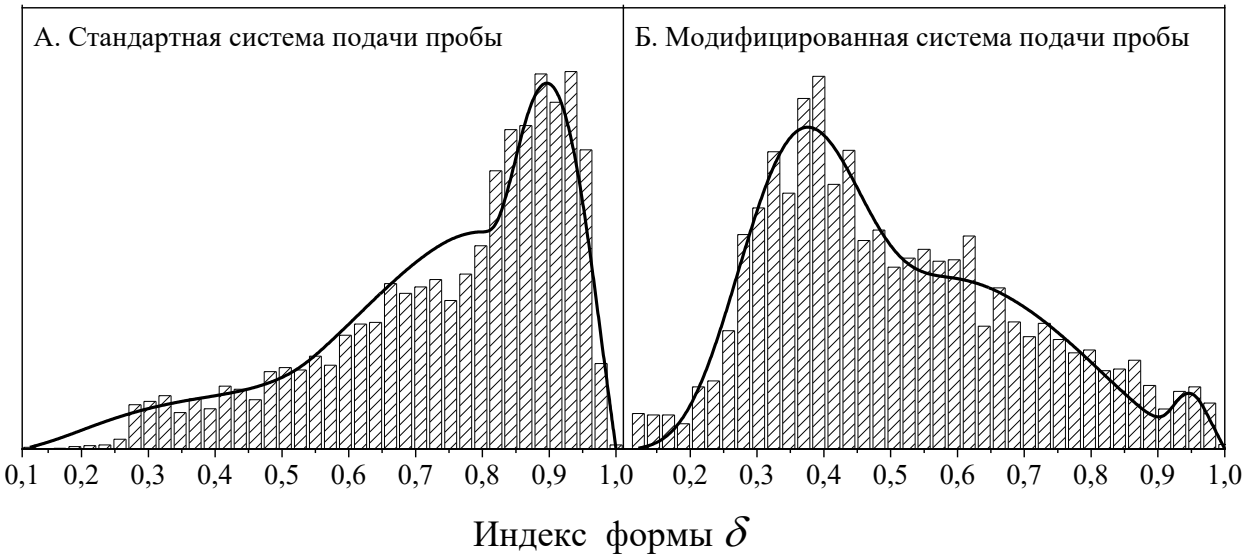

Рисунок 5 Сравнение стандартной и модифицированной систем подачи пробы тромбоцитов. Чёрной линией обозначена теоретическая кривая, описывающая распределение тромбоцитов по индексу формы.

Таблица 2 Параметры распределений тромбоцитов после влияния стандартной и модифицированной систем подачи пробы.

			Стандартная система подачи пробы	**Модифицированная система подачи пробы**
Неактивированные тромбоциты		**MPSI-RES**	0.32±0.06	0.357±0.004
		PSIDW - RES	0.24±0.10	0.18±0.03
		%RES	7±3	34.5±1.1
Активированные тромбоциты	**Частично активированные**	**MPSI-PA**	0.800±0.013	0.572±0.005
		PSIDW-PA	0.26	0.45
	Полностью активированные	**MPSI-FA**	0.911±0.011	0.955±0.002
		PSIDW-FA	0.11±0.5	0.05 ±0.02
		%FA	**20.0±1.8**	**2.31±0.03**
	η_a %		93±3	66.55±1.1

MPSI-R, PSIDW-R мода и ширина плотностей вероятности бета распределения, описывающей неактивированную субпопуляцию тромбоцитов, %PR – процент неактивированных тромбоцитов от всех измеренных, MPSI-PA, PSIDW-PA мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей частично активированную субпопуляцию тромбоцитов, MPSI-FA, PSIDW-FA мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей полностью активированную субпопуляцию тромбоцитов, %PFA процент активированных тромбоцитов от всех измеренных, η_a суммарный процент активированных тромбоцитов.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения модифицированной системы подачи пробы, в качестве уменьшения влияния со стороны цитометра на образец, но несмотря на это, суммарный процент активированных тромбоцитов остаётся достаточно высоким. В связи с этим, было принято решение пересмотреть стандартный протокол подготовки пробы с тем, чтобы уменьшить влияние преаналитического этапа работы на результат.

2.4 Подготовка пробы

Среди всех тканей человека, кровь является одной из самых простых для исследования, начиная от способа извлечения и заканчивая условиями сохранения жизнеспособности клеток. Существует три основных этапа работы с образцом: забор образца, его стабилизация и измерение (анализ). После этапа стабилизации, если есть необходимость, выполняются специфические модификации исследуемого объекта.

Тромбоциты обладают высокой способностью реагировать на изменения в кровотоке, происходящие в момент разрыва сосуда. Именно это, позволяет тромбоцитам выполнять свою основную функцию, а именно участвовать в поддержание гемостаза. Как было описано выше (1.2), тромбоциты выполняют ключевую роль в процессе образования фибрина из фибриногена, а также агрегируют между собой и адгезируют к стенкам сосудов, закупоривая разрыв. Забор пробы крови происходит после прокола сосуда иглой, что приводит к нормальной реакции системы гемостаза, включающей активацию тромбоцитов.

Для исследования функций тромбоцитов, забор пробы, проводят в одноразовые пробирки с антикоагулянтом, внутри которых создаётся пониженное давление, что ускоряет заполнение пробирки и позволяет сделать процедуру более удобной для человека, выполняющего её.

2.4.1 Стандартный протокол забора крови для работы с тромбоцитами

1. Забор крови проводят из локтевой вены.
2. Жгут должен быть удалён сразу после начала наполнения первой пробирки.
3. Первые 3-5мл. крови не используются для анализа.
4. Игла для забора крови калибра 19-21G.

5. Антикоагулянт – цитрат натрия 105-109 мМ (образует комплекс с Ca^{2+} и прерывает реакцию свёртывания крови).
6. Для перемешивания, сразу после забора крови, необходимо мягко перевернуть пробирку до 6 раз.
7. Далее пробу нельзя перемешивать в шейкере, на вортексе или другом подобном приспособлении.
8. Дальнейшее хранение пробы проводят при комнатной температуре.
9. Измерение тромбоцитов проводят в промежутке времени, от 30 минут до 4 часов, после забора крови.
10. По возможности, транспортировку стоит исключить [83, 84].

После забора крови, обычно, идёт этап выделения плазмы, богатой тромбоцитами. По стандарту, для этого проводят центрифугирование. Ранее было показано, что такая процедура выделения может приводить к активации тромбоцитов, при этом существует зависимость между скоростью центрифугирования и процентом спонтанно активированных тромбоцитов [85]. Седиментация является более щадящим способом выделения, так как значение силы тяжести ниже, чем центробежной силы в центрифугах на рекомендованном режиме.

Протокол используется для забора крови, при проведении тестов на коагуляцию. Как правило, от источника к источнику могут добавляться или меняться некоторые манипуляции (например флуоресцентное окрашивание), используются различные буферы и антикоагулянты, для ряда работ применяется рекальцификация плазмы [86, 87]. При применении описанного протокола, для исследования распределений по форме для нативных тромбоцитов, был показан высокий процент активированных тромбоцитов в пробах некоторых доноров (Таблица 9). Это показывает необходимость модификации протокола подготовки, необходимой для уменьшения количества активированных тромбоцитов в пробе.

2.4.2 «Мягкий» протокол подготовки пробы тромбоцитов

Для этой работы, в качестве маркера активации, используется изменение формы, в отличие от классических маркеров: появление специфических рецепторов и выброс Ca^{2+} в цитозоль. Изменение формы является более чувствительным

маркером активации тромбоцитов и не требует дополнительных этапов подготовки пробы [5, 6].

В первую очередь при модифицировании протокола, полностью отказались от транспортировки пробы. Дополнительно, было принято решение, максимально уменьшить количество манипуляций, а также, время между забором пробы и измерением. Все манипуляции проводились при комнатной температуре (22 – 24ºC). В гидродинамической системе сканирующего проточного цитометра, предусмотрена система термостаблизации, до физиологических значений температуры (37ºC).

1. Забор крови проводят из локтевой вены.
2. Жгут должен быть удалён сразу после начала наполнения первой пробирки.
3. Первые 3-5мл крови не используются для анализа.
4. Игла для забора крови калибра 19-21G.
5. Для предотвращения агрегации тромбоцитов и коагуляции плазмы, забор крови для исследования, производится в пластиковою пробирку с большим количеством физиологического раствора (разведение ~ 30 раз).
6. Пробирка аккуратно перемешивается круговыми движениями.
7. Седиментация в течение 30 минут.
8. Измерение с минимальной задержкой по времени, т.к. даже кратковременное хранение тромбоцитов может приводить к изменению характеристик клетки.

Такой протокол, и модернизация системы подачи пробы сканирующего проточного цитометра, позволили получить пробы, в которых, большая часть тромбоцитов находится в неактивированном состоянии. Это является особенно важным для построения феноменологической модели активации тромбоцитов (Глава 5).

2.5 Обсуждение результатов главы 2

В рамках главы рассмотрено применение технология сканирующей проточной цитометрии для измерения тромбоцитов. Оценено механическое воздействие на пробу со стороны систем подачи пробы сканирующего проточного цитометра и

предложена модификация для уменьшения этого воздействия. Показано, что предложенная модификация позволяет понизить процент активированых тромбоцитов в нативной пробе с 20.0±1.8 до 2.31±0.03.

Дополнительно в главе рассмотрены стандартный и модифицированный протоколы подготовки пробы. В модифицированном протоколе исключено влияние транспортировки и центрифугирования. Применение модифицированного протокола подготовки пробы в дополнение к модифицированной системе подачи пробы позволило получать преимущественно неактивированные пробы, необходимые для выполнения задач этой работы.

Глава 3 Влияние выбора оптической модели на значение параметра формы тромбоцита

3.1 Упрощённая оптическая модель нативного тромбоцита

Для решения обратной задачи светорассеяния методом баз данных важно правильно выбрать оптическую модель. Нативные тромбоциты представляют собой пластинки округлой формы, поддерживаемые в таком состоянии периферическим кольцом микротрубочек (1.3.1). Мембрана тромбоцита натянута на кольцо, следовательно, в нативном состоянии модель должна обладать симметрией относительно оси z. Одна из самых распространённых оптических моделей тромбоцитов – это модель сплюснутого сфероида [19–21]. Модель описывается 4-мя параметрами: D, ξ, n, β, где D – диаметр сферы с объёмом, равным объёму моделируемого тромбоцита, $\xi = a/b$ – отношение полуосей сфероида, показывает на сколько сфероид тонок, иначе говоря, сплюснут, n – показатель преломления цитоплазмы тромбоцита, а β – параметр, показывающий ориентацию тромбоцита в пространстве. Область определения параметра ξ [1, ∞), где 1 соответствует сфере и приближение к этому значению интерпретируется, как приближение к активированному состоянию, а приближение к ∞ интерпретируется, как нативное состояние.

Бесконечно сплюснутых сфероидов не существует, так как всегда есть некоторая конечная толщина мембраны, заполненная цитоплазмой и органеллами. Поэтому область определения параметра ξ необходимо ограничить сверху. Для упрощения задачи можно перейти к альтернативной параметризации, переводящей значения, приближающиеся к бесконечности в значения, приближающиеся к 0. В качестве первого варианта можно рассмотреть параметризацию $1/\xi$. Данный параметр изменяется от 0 до 1, однако эта зависимость быстро изменяется в области определения от 0 до 0.5 и медленно от 0.5 до 1. Для изучения процессов активации тромбоцитов важна вся область определения параметра. Поэтому, в этой работе использовалась следующая параметризация δ:

$$\delta = \frac{2\xi}{\xi^2 + 1} \tag{9}$$

где δ – индекс формы тромбоцита, а ξ – отношение полуосей. Область определения этого параметра от 0 до 1, где приближение к 0 соответствует утоньшению пластинки, а 1 соответствует сфере. Поведение такой параметризации является более равномерной для всей области определения по сравнению с $1/\xi$, что является удобным для выполнения задач данной работы. Однако переход к другой параметризации также требует ограничения, так как бесконечно плоских тромбоцитов не существует. В данной работе параметр δ ограничен значением 0,1, которому, к примеру, соответствует тромбоцит с $\xi = 20$. Предполагается, на основе предыдущих работ, что процент тромбоцитов с отношением полуосей меньше этого значения мал.

В процессе активации форма тромбоцита значительно меняется. Это происходит из-за перестройки и скручивания кольца микротрубочек. В простом приближении, изменение формы за счёт процесса скручивания можно описать в терминах сплюснутого сфероида, что было показано ранее в работе Москаленского [7]. Тем не менее, остаётся не ясным, каким образом отличие используемой модели «сплюснутый сфероид» от форм, определяемых искривлением кольца микротрубочек, влияет на результат решения обратной задачи светорассеяния. Дополнительно, в процессе активации тромбоцита происходит появление значительного размера псевдоподий, влияние которых на решение обратной задачи светорассеяния с использованием оптической модели «сплюснутый сфероид», также не рассматривалось ранее. Оба отличия могут оказывать значительный вклад в картину светорассеяния, влияние которых необходимо оценить, как перед выбором оптической модели, так перед выбором длины волны освещения для получения рассеянного сигнала.

3.2 Влияние искривления периферического кольца микротрубочек на решение обратной задачи светорассеяния

Сосредоточимся в этом разделе на описании формы тромбоцита, определяемой искривлением периферического кольца микротрубочек и приближении этой формы моделью «сплюснутый сфероид». Периферическое кольцо тромбоцита об-

разовано набором тубулиновых микротрубочек (замкнутых и незамкнутых), соединённых между собой моторными белками-антагонистами динеинами и кинезинами. Эта структура находится в динамическом равновесии. При появлении ионов кальция происходит переход периферического кольца из плоского состояния в седловидное за счёт увеличения локальной кривизны. В следствие этого происходит изменение формы тромбоцита [26]. Переход кольца в седловидную кривую за счёт увеличения локальной кривизны описан математически [88], и, зная уравнение данной кривой, можно рассчитать форму поверхности, соответствующую следующим условиям:

- кольцо должно находится внутри рассчитанной поверхности
- поверхность ограничивает определённый объём V
- площадь поверхности должна быть минимальной

Подробное описания метода задания и оптимизации подобной поверхности представлены в работе Москаленского [35]. В рамках модели задаются кривизна кольца Q, относительный объём объекта V/R^3, где R радиус кольца микротрубочек и отношение половины толщины кольца микротрубочек к радиусу кольца $\tilde{r}/R$.

Несмотря на большую приближенность этой модели к реальным формам, в сравнении с моделью «сплюснутый сфероид», её достаточно сложно использовать для решения обратной задачи светорассеяния, в основном, из-за необходимости задания большего количества параметров этой формы. Модель не является осесимметричной, поэтому для задания и ориентации формы в пространстве, необходимо задать 7 параметров: три параметра геометрии формы (Q, V/R^3, $\tilde{r}/R$), параметр объёма объекта (диаметр сферы эквивалентного объёма), показатель преломления и два параметра ориентации. В отличии, от рассматриваемой модели, модель «сплюснутый сфероид», является осесимметричной и задаётся 4 параметрами (2 параметра формы, показатель преломления и 1 параметр ориентации).

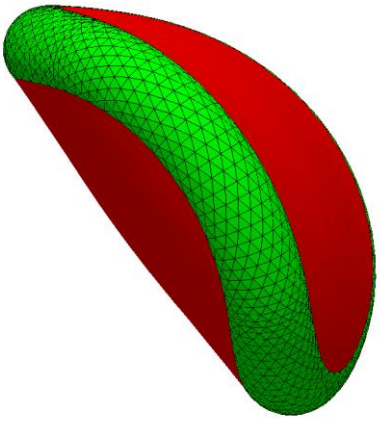

Рисунок 6 Модель тромбоцита, определяемая кривизной кольца микротрубочек. Зелёным обозначено периферическое кольцо микротрубочек, красным мембрана. Q=1.15, V/R^3 =2.4, $\tilde{r}/R$ =0.2.

Точное определение пяти и более параметров по сигналу светорассеяния, измеряемому СПЦ без измерения дополнительного сигнала, является проблематичным [89]. Это отражается как в ухудшении точности определения параметров формы, так и в необходимости использовать базы данных, содержащие несколько миллионов теоретических сигналов, что не только замедляет расчёт, но и накладывает дополнительные требования к возможностям вычислительной техники. К примеру, для определения параметров сплюснутого сфероида, достаточно базы данных, состоящей из 200000 теоретических сигналов [7]. В случае использования модели тромбоцита, определяемой кривизной кольца микротрубочек, для достижения той же плотности сигналов, оценочно, понадобится база данных больше 10 миллионов сигналов. Из-за невозможности использовать форму, определяемую искривлением кольца микротрубочек, необходимо определить, насколько приближение этой формы к модели «сплюснутый сфероид», влияет на решение обратной задачи светорассеяния. Для этого, рассчитаем сигнал светорассеяния от модели, показанной на Рисунок 6, и решим для него обратную задачу светорассеяния, используя оптическую модель «сплюснутый сфероид».

Расчёт сигнала светорассеяния проведён методом дискретных диполей, реализованным в программном пакете АДДА [9]. При использовании метода, исходную модель формы заполняем элементарными кубами, моделирующими диполи.

Для реализации этой операции, воспользуемся программой Point in Polyhedron [90] на вход принимающей модели в формате .obj и число диполей, размещающихся на большем размере модели (больший размер определяется программой автоматически). В соответствии со стандартными рекомендациями к использованию АДДА, сторона куба, моделирующего диполь, должна составлять $\lambda/(n_{ср}*10)$, где $n_{ср}$ показатель преломления среды.

Так как меньшая длина волны более чувствительна к искажениям формы, все расчёты проводились для двух длин волн 0.66 мкм и 0.405 мкм., соответственно. Рассеяние значительно зависит от показателей преломления частицы и среды. В качестве внешней среды используется 0,9% водный раствор NaCl, показатель преломления которого для λ=0.66 мкм., составляет $n_{ср}$=1.333, и для λ=0.405 мкм., составляет $n_{ср}$= 1.345 мкм. Для тромбоцита показатель преломления был выбран в диапазоне $n_{тр}$=1.37 мкм. – 1.39 мкм., для λ=0.66 мкм. и $n_{тр}$=1.41мкм. –1.43мкм., для λ=0.405 мкм. Для простоты сравнения, также оценим δ для фигуры, указанной на Рисунок 6. Это значение составляет около 0,7 мкм.

Таблица 3 Решение обратной задачи светорассеяния для модели тромбоцита, определяемой кривизной кольца микротрубочек.

	$СКО_{отн}$	**D**	**δ**	**β**
Параметры исходной модели		2.6мкм	0.7	75
	0.66 мкм			
	0.03	3.2±0.4	0.56±0.14	73±5
	0.405 мкм			
	0.015	3.2±0.3	0.47±0.12	77.4±0.8

$СКО_{отн}$ – относительное среднеквадратичное отклонение между сигналом рассеяния от модели и результатом решения обратной задачи, D – диаметр сферы эквивалентного объёма, δ – индекс формы, β – угол ориентации.

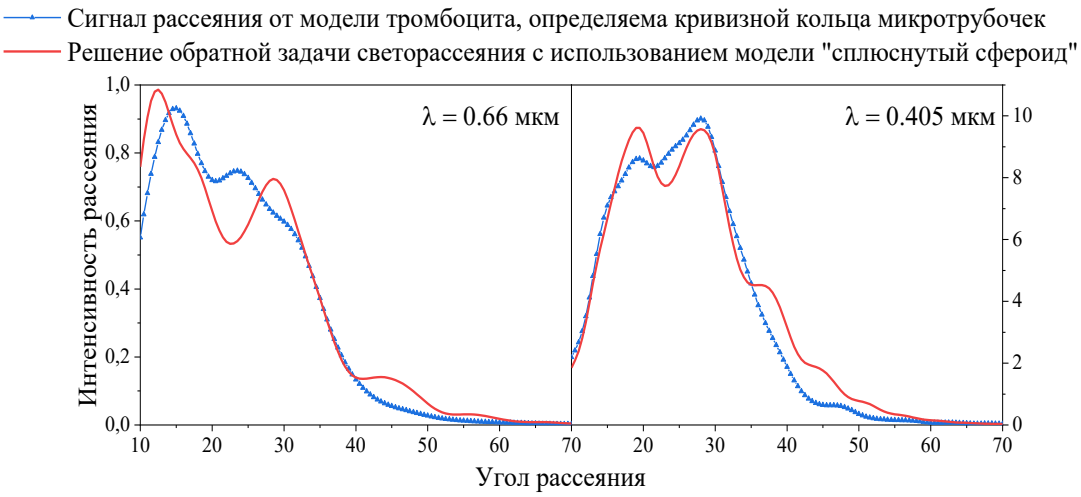

Рисунок 7 Решение обратной задачи светорассеяния для оптической модели тромбоцита, определяемой кривизной кольца микротрубочек с использованием базы данных сигналов от сплюснутых сфероидов.

Отличие исходной формы, показанной на Рисунок 6 от сфероида, приводит к уменьшению найденного индекса формы относительно заданного. Причём, при уменьшении длины волны освещения, это отличие возрастает. Решение обратной задачи светорассеяния для длины волны в 0.66 мкм ближе к заданным параметрам модели, чем для длины волны в 0.405 мкм, несмотря на большее значение $СКО_{отн}$, что говорит о меньшей чувствительности длины волны в 0.66 мкм к отличиям между рассматриваемыми оптическими моделями.

3.3 Влияние появления псевдоподий на решение обратной задачи светорассеяния

В дополнении, к изменению формы за счёт искривления кольца микротрубочек, в процессе активации, на поверхности тромбоцита появляются многочисленные выросты – псевдоподии. Псевдоподии тромбоцита не обладают какой-либо закономерностью по месту расположения, длине и форме. По этой причине, достаточно сложно рассчитать такую базу данных теоретических сигналов, чтобы учесть все возможные варианты расположения и формы псевдоподий. Рассмотрим, как именно влияет приближение подобных форм к модели «сплюснутый сфероид», на решение обратной задачи светорассеяния.

Как и в предыдущем разделе, для моделирования сигнала светорассеяния от тромбоцита с псевдоподиями, сначала необходимо задать геометрическую форму объекта. При рассмотрении электронных микрофотографий тромбоцитов видно, что на концах псевдоподии значительно тоньше основного «тела» [22]. Это наводит на мысль, что рассеяние на большей длине волны будет менее чувствительно к появлению псевдоподий.

Тромбоцит с псевдоподиями можно задать следующим образом. Центральная часть или «тело» тромбоцита, представим в виде сплюснутого сфероида, а псевдоподии в виде половинок вытянутого сфероида, которые ориентирован по осям координат в + и – стороны, а также между осями (14 псевдоподий). В конкретном примере объём «тела» V=9.2 фл и индекс формы δ=0.7, половинки вытянутых сфероидов с V=0.128 фл и δ = 0.38 каждая. Таким образом, получается фигура, представленная на Рисунок 8, упрощённо моделирующая один из вариантов формы тромбоцита с псевдоподиями.

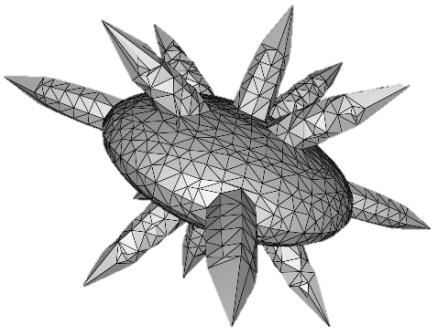

Рисунок 8 Упрощённая модель тромбоцита с псевдоподиями.

Для оценки влияния количества псевдоподий на решения обратной задачи светорассеяния, также рассчитывались сигналы светорассеяния от сплюснутого сфероида с меньшим количеством псевдоподий (9 псевдоподий), а также и без них, с теми же параметрами «тела» тромбоцита. Расчёт сигнала светорассеяния проводился с использованием метода дискретных диполей, реализованного в программном пакете АДДА. По аналогии с предыдущим разделом, расчёт проводился для двух длин волн величиной 0.66 мкм. и 0.405 мкм. (Рисунок 9).

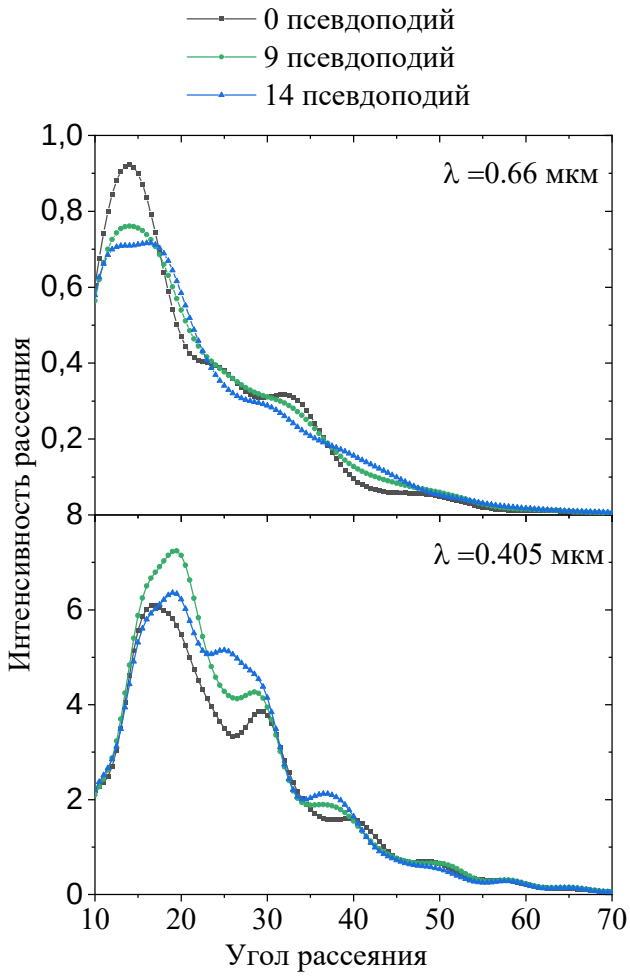

Рисунок 9 Сигнал светорассеяния для модели тромбоцита с разным количеством псевдоподий, приведённый к виду, регистрируемому СПЦ.

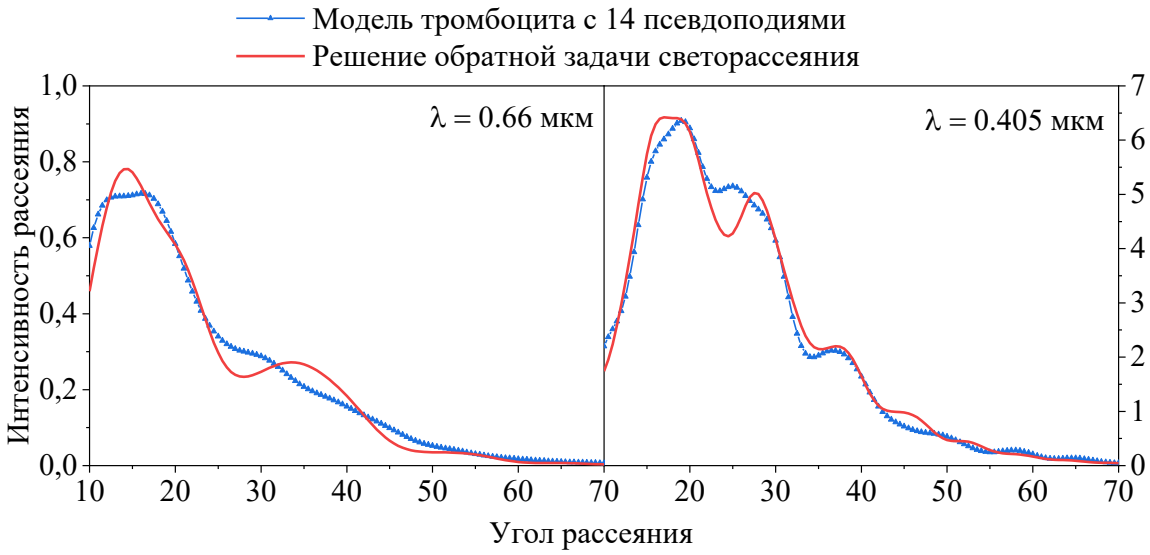

Рисунок 10 Решение обратной задачи светорассеяния для оптической модели тромбоцита с 14 псевдоподиями, с использованием базы данных сигналов от сплюснутых сфероидов.

Таблица 4 Решение обратной задачи светорассеяния для модели тромбоцита с псевдоподиями.

	$СКО_{отн}$	**D**	**δ**	**β**
Параметры сфероида без псевдоподий.		2.6мкм	0.7	75
	0.66 мкм			
Без псевдоподий	0.0005	2.63±0.03	0.69±0.01	74.2±0.7
9 псевдоподий	0.008	2.81±0.16	0.59±0.04	73±3
14 псевдоподий	0.011	2.73±0.15	0.55±0.04	72±2
	405 мкм			
Без псевдоподий	0.0008	2.717±0.011	0.6655±0.006	72.9±0.3
9 псевдоподий	0.0018	2.9±0.03	0.561±0.013	79.7±0.4
14 псевдоподий	0.006	3±0.07	0.58±0.03	77.7±0.8

$СКО_{отн}$ – среднеквадратичное отклонение между сигналом рассеяния от модели с псевдоподиями и результатом решения обратной задачи, D – диаметр сферы эквивалентного объёма, δ – индекс формы, β – угол ориентации.

Появление псевдоподий значительно изменяет структуру индикатрисы светорассеяния (Рисунок 9). Для таких фигур ухудшается решение обратной задачи, что видно, как по параметру $СКО_{отн,}$ так и по степени отличия найденных параметров от изначальных. Для обеих длин волн присутствует увеличение объёма и уменьшения индекса формы (Таблица 4). Для длины волны в 0.66 мкм., отличие найденного объёма от исходного меньше, чем для длины волны в 0.405 мкм., с учётом ошибки определения параметров, что говорит о меньшей чувствительности этой длины волны к появлению псевдоподий.

Стоит отметить, что эффект проверен только для одной конкретной конфигурации псевдоподий и в реальности его влияние может оказаться более значимым. Экспериментальная проверка эффекта показана в разделе 6.1.

3.4 Обсуждение результатов главы 3

Глава посвящена оптической модели тромбоцита, необходимой для решения обратной задачи светорассеяния. В главе рассмотрены три варианта оптической модели: «сплюснутый сфероид», модель, определяемая искривлением периферического кольца микротрубочек, и модель, учитывающая появление псевдоподий в процессе активации. Для решения обратной задачи светорассеяния, наиболее удобной является модель «сплюснутый сфероид». Она обладает необходимыми свойствами и определяется малым числом параметров, что позволяет использовать небольшие базы данных теоретических сигналов для решения обратной задачи светорассеяния.

Альтернативные модели более приближены к реальной форме тромбоцита. Поэтому, для оценки влияния выбора модели «сплюснутый сфероид», на решения обратной задачи светорассеяния, от обеих альтернативных моделей формы, были рассчитаны теоретические сигналы светорассеяния. Для этих сигналов была решена обратная задача светорассеяния с помощью использования базы данных теоретических сигналов от модели «сплюснутый сфероид». Расчёт был произведён для двух длин волн: 0.66 мкм. и 0.405 мкм. соответственно, так как известно, что разные длины волн могу обладать различной чувствительностью к отличиям от теоретической формы.

В случае модели, определяемой искривлением периферического кольца микротрубочек, отличия от сплюснутого сфероида приводят к уменьшению индекса формы и увеличению объёма. Для длины волны в 0.66 мкм. эти значения находятся в пределах ошибки определения параметров. В случае использования модели с псевдоподиями, отличия от модели сплюснутого сфероида, также приводят к увеличению объёма и уменьшению индекса формы, причём с увеличением числа псевдоподий, эффект усиливается. Для длины волны в 0.66 мкм., отличия значений объёма меньше, чем для волны, длиной в 0.405мкм. Это говорит о меньшей чувствительности длины волны в 0.66 мкм. к отличиям формы тромбоцита модели «сплюснутый сфероид». Экспериментально эффект представлен в разделе 6.1.

Глава 4 Функция распределения тромбоцитов по индексу формы

Процесс отсоединения тромбоцитов от мегакариоцитов носит во многом случайный характер, порождая широкие распределения тромбоцитов по размеру (1.1). Решив обратную задачу светорассеяния, можно охарактеризовать каждый тромбоцит в терминах диаметра сферы эквивалентного объёма (D) и индекса формы (δ). Объём, а точнее распределение по объёму, на сегодняшний день, является самой часто определяемой характеристикой популяции тромбоцитов. Это распределение описывается логнормальной зависимостью, в соответствии с которой определяется средний объем тромбоцитов (MPV) и ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW). Несмотря на это, до сих пор, ведутся исследования, направленные на поиск заболеваний, для которых отклонения в этих параметрах от нормы, являются значительными [3]. С другой стороны, распределение по индексу формы, является более гетерогенным, что может нести в себе больше информации о свойствах тромбоцитов, в случае успешного математического описания распределения.

Для абсолютно одинаковых объектов, вопрос поиска исходной плотности распределения, решается тривиально (дельта-функция). В природе такие процессы крайне редко реализуются, и чаще всего, присутствует небольшой разброс по параметрам. Для учёта этой особенности, в процессе поиска плотности распределения, часто используют класс пиковых функций – гладких функций, имеющих один глобальный экстремум внутри области определения, исключая границы, и задающихся двумя параметрами: центром пика и параметром, связанным с симметрией и/или шириной функции. Под это описание попадает широкий класс функций, различающихся областью определения.

В качестве кандидатов для описания нативного распределения тромбоцитов по индексу формы, рассмотрим следующие плотности распределений: плотность Гаусс распределения, плотность гамма распределения и плотность бета распределения. Основываясь на экспериментальных данных, представленных в разделе 6.2, а также на том факте, что активация тромбоцитов является естественной реакцией

на забор крови, предположим, что функция распределения нативных тромбоцитов представляет собой сумму 3-х пиковых функции, соответствующих неактивированной субпопуляции, полностью активированной субпопуляции и субпопуляции, находящейся в переходном состоянии. В дальнейшем будем считать параметры распределений, определённые для каждой из субпопуляций, параметрами, характеризующими фракционный состав нативной пробы тромбоцитов.

4.1 Распределения – кандидаты для описания распределения тромбоцитов по индексу формы

4.1.1 Сумма плотностей вероятности Гаусс распределений

Плотность вероятности Гаусс распределения задаётся двумя параметрами: математическим ожиданием (μ) и дисперсией (σ). Область определения носителя (x) распределения [-∞, +∞].

$$f^{gauss}(x;\mu,\sigma)=\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}}e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma}} \tag{10}$$

где μ – математическое ожидание, показывающее положение центра функции, а σ –дисперсия, показывающая, ширину распределения.

Для экспериментального распределения по индексу формы установлены границы от 0.1 до 1, что существенно отличается от области определения плотности вероятности Гаусс распределения, поэтому ограничим итоговую функцию значениями 0.1 и 1. Зададим суммарную функцию плотностей вероятности Гаусс распределения в следующем виде:

$$\begin{aligned} f_{\Sigma}^{gauss}(x)=\eta_{res}\times f^{gauss}(x;\mu_r,\sigma_r)+(1-\eta_r-\eta_{fa})\times f^{gauss}(x;\mu_{pa},\sigma_{pa}) \\ +\eta_{fa}\times f^{gauss}(x;\mu_{fa},\sigma_{fa}) \end{aligned} \tag{11}$$

Здесь индексы *r*, *fa*, *pa* соответствуют неактивированным, активированным и частично активированным субпопуляциям, *η* показывает долю определенной субпопуляции в зависимости от индекса.

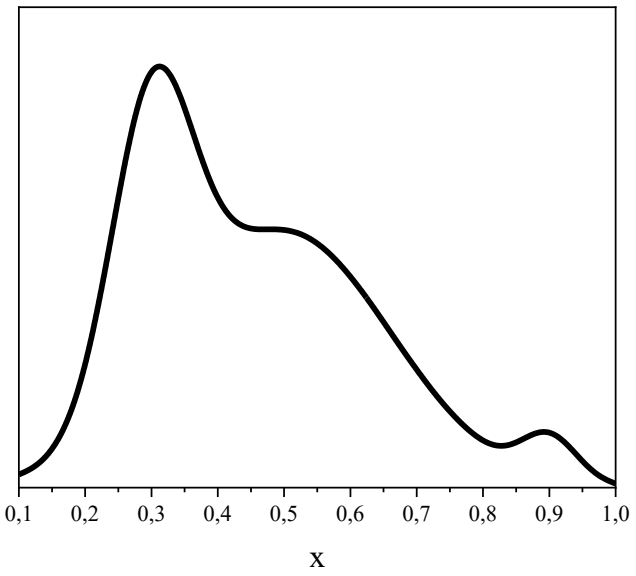

Рисунок 11 Пример $f_{\Sigma}^{gauss}(x)$ с параметрами η_r=0.3, μ_r= 0.3, σ_r=0.06, μ_{pa}=0.5, σ_{pa}=0.16, η_{fa}=0.03, μ_{fa}=0.9, σ_{fa}=0.04.

4.1.2 Сумма плотностей вероятности гамма распределений

Также, как и для плотности вероятности Гаусс распределения, плотность вероятности гамма распределения задаётся двумя параметрами, обозначаемыми k и θ. В отличии от плотности вероятности Гаусс распределения, оба параметра должны быть положительными. Математическое ожидание, дисперсия и мода выражаются как $\mu = k\theta, \sigma = k\theta^2, M_0 = (k-1)\theta$. Область определения носителя распределения [0,+∞].

$$f^{gamma}(x;k,\theta) = x^{k-1}\frac{e^{-x/\theta}}{\theta^k \Gamma(k)} \qquad (12)$$

где Γ(*κ*) гамма-функция Эйлера.

Выражением (12) при различных k и θ можно описать вид функций, представленных на Рисунок 12.

Не каждая комбинация параметров порождает функцию, соответствующую определению пиковых функций, поэтому необходимо ввести дополнительные условия на параметры распределения, а именно k≥1 и мода M_0>0.1. Суммарную функцию плотностей вероятности гамма распределения можно задать в следующем виде:

$$f_{\Sigma}^{gamma}(x) = \eta_r \times f^{gamma}(x; k_r, \theta_r) + (1 - \eta_r - \eta_{fa}) \times f^{gamma}(x; k_{pa}, \theta_{pa}) + \eta_{fa} \times f^{gamma}(x; k_{fa}, \theta_{fa}) \quad (13)$$

Здесь индексы *r*, *fa*, *pa*, также, как и выше, соответствуют неактивированным, активированным и частично активированным субпопуляциям, η показывает долю определенной субпопуляции в зависимости от индекса.

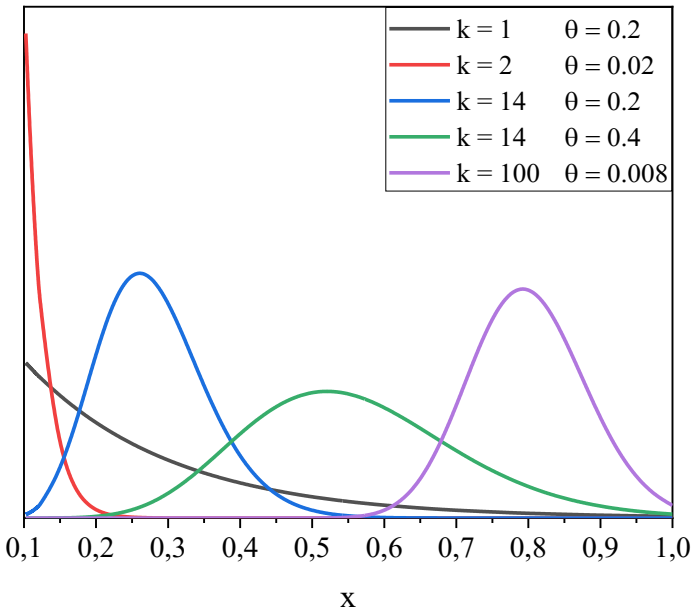

Рисунок 12 Примеры плотностей вероятности гамма распределения для различных k и θ.

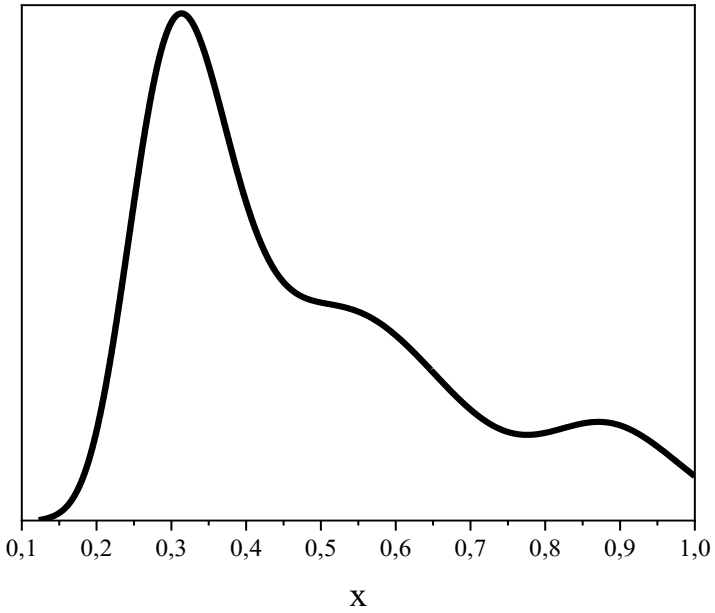

Рисунок 13 Пример $f_{\Sigma}^{gamma}(x)$ с параметрами η_r=0.5, k_r= 23, θ_r=0.0014, k_{pa}=19, θ_{pa}=0.03, η_{fa}=0.1, k_{fa}=106, θ_{fa}=0.0085.

4.1.3 Сумма плотностей вероятности бета распределений

Плотность вероятности бета распределения, как и для описанных выше вариантов, задаётся двумя параметрами (φ и χ). Для этого распределения, область определения носителя ограничена 0 и 1 включительно. Математическое ожидание, дисперсия и мода выражаются как $\mu = \frac{\varphi}{\varphi+\chi}, \sigma = \frac{\varphi\gamma}{(\varphi+\chi)^2(\varphi+\chi+1)}, M_0 = \frac{\varphi-1}{\varphi+\chi-2}$.

$$f^{beta}(x;\varphi,\chi) = \frac{x^{\varphi-1}(1-x)^{\chi-1}}{B(\varphi,\chi)} \tag{14}$$

где B(φ,χ) – бета функция Эйлера.

Выражением (14) можно описать вид функций, представленный на Рисунок 14. Так же, как и для плотности вероятности гамма распределения, не все значения параметров φ и χ задают подходящие для решения задачи функции. Ограничим набор функций условием φ≥2, χ≥2.

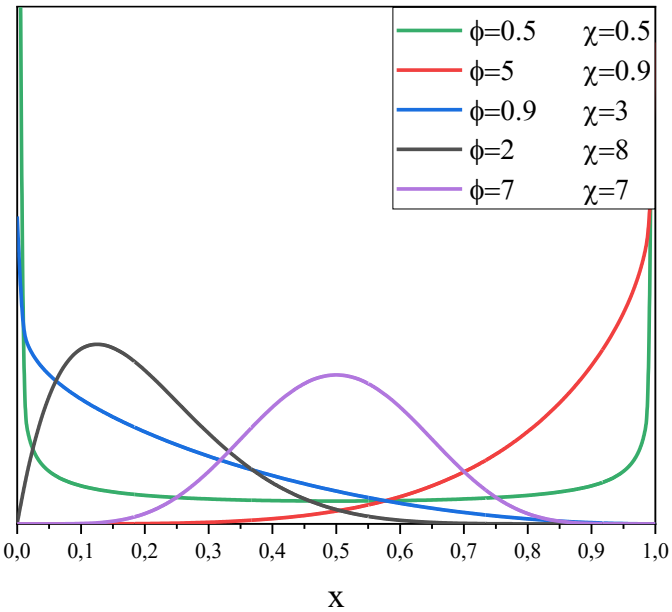

Рисунок 14 Пример плотностей вероятности бета распределения для различных φ и χ.

Главным отличием этой функции является отсутствие бесконечностей в области определения носителя. Для удобства дальнейшей работы с функцией, введём в явном виде границы определения в выражении (14). Это позволит ограничивать каждую из трёх функций, входящих в сумму, что представляется проблематичным

при работе с функциями, включающими в область определения бесконечность. Также, для наглядности задания параметров общего распределения, выразим параметр φ через M_0 и χ. Таким образом, выражение (14) переписывается в следующем виде:

$$f^{beta}(x; x_{\min}, x_{\max}, M_0, \chi) = \frac{y^{\varphi-1}(1-y)^{\chi-1}}{\mathrm{B}(\varphi, \chi)(x_{\max} - x_{\min})} \tag{15}$$

где $y = \frac{x - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}}$, $\varphi = 1 + (\chi - 1)\frac{M_0 - x_{\min}}{x_{\max} - M_0}$, x_{min} и x_{max} параметры, ограничивающие функцию плотности вероятности бета распределение, M_0 соответствует моде распределения, а χ параметр, связанный с кривизной функции. Предположим, что функции, описывающие нативную и полностью активированную субпопуляцию являются симметричными. Тогда, суммарная функция плотностей вероятности бета распределения приобретает следующий вид:

$$\begin{aligned} f_{\Sigma}^{beta}(x) = {} & \eta_{\mathrm{r}} \times f^{beta}(x; 0.1, 2M_0^{\mathrm{r}} - 0.1, M_0^{\mathrm{r}}, \chi_{\mathrm{r}}) + \eta_{\mathrm{fa}} \times f^{beta}(x; 2M_0^{\mathrm{fa}} - 1, 1, M_0^{\mathrm{fa}}, \chi_{\mathrm{fa}}) \\ & + (1 - \eta_{\mathrm{r}} - \eta_{\mathrm{fa}}) \times f^{beta}(x; 0.1, 1, M_0^{\mathrm{pa}}, \chi_{\mathrm{pa}}), \end{aligned} \tag{16}$$

Здесь индексы *r*, *fa*, *pa*, также, как и выше, соответствуют неактивированным, активированным и частично активированным субпопуляциям, *η* показывает долю определенной субпопуляции, в зависимости от индекса.

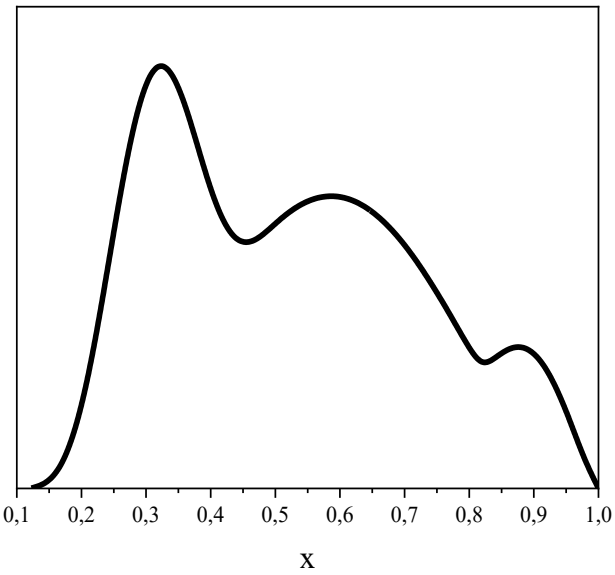

Рисунок 15 Пример $f_{\Sigma}^{beta}(x)$ с параметрами η_r=0.27, M_0^r= 0.31, χ_r=6,1, M_0^{pa}=0.58, χ_{pa}=3.47, η_{fa}=0.06, M_0^{fa}=0.9, χ_{fa}=2.46.

Для дальнейшего использования, параметр кривизны функции χ, определяемый из $f_{\Sigma}^{beta}(x)$ для каждой субпопуляции, не совсем удобен. Для более наглядного анализа получаемых параметров, перейдём от параметра χ к ширине распределения на половину высоты *w*. Так как, функция распределения каждой субпопуляции обладает всего одним максимумом, то для перехода достаточно определить значения *x*, соответствующее равенству:

$$\frac{f^{beta}(M_0)}{2} = f(x) \tag{17}$$

где, $f^{beta}(M_0)$ соответствует высоте функции, описывающей определённую субполяцию, *x* соответствует полувысоте этой функции.

Подставив явное представление $f^{beta}(M_0)$, выражение (17) можно привести к виду:

$$x^{\frac{M_0 - x_{\min}}{x_{\max} - M_0}}(1-x) = \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{1}{\chi-1}} \left(1 - \frac{x - M_0}{x_{\min} - M_0}\right)^{\frac{M_0 - x_{\min}}{x_{\max} - M_0}} \left(1 - \frac{x - M_0}{x_{\max} - M_0}\right) \tag{18}$$

У этого уравнения существует два корня (x_1, x_2), соответствующие левой (x_1) и правой (x_2) координате полувысоты $f^{beta}(M_0)/2$. Тогда ширину функции *w* можно вычислить:

$$w = |x_1 - x_2| \tag{19}$$

4.2 Выбор подходящей суммарной функции

В разделе 4.1 рассмотрены три класса пиковых функций с различной областью определения носителя, а также способные описываться как симметричные, так и не симметричные распределения в зависимости от параметров. Для каждого из типов распределений построена суммарная функция плотности распределения, состоящая из трёх пиковых функций. Для определения какой суммарной функцией описывается распределение нативных тромбоцитов по индексу формы лучшим образом, решим обратную задачу с использованием предполагаемых суммарных функций плотности распределения в качестве модельной функции. Иначе говоря, построим функцию отличий *S*(ζ) (20) и найдём вектор параметров **ζ,** для которых *S*(**ζ**) принимает минимальное значение.

$$S(\zeta) = \sum_i (f_{th}^i(\zeta) - \delta_{\exp}^i)^2 \qquad (20)$$

Под f_{th} подразумевается одна из трёх суммарных функций плотности распределения ((11), (13), (16)), а под δ_{exp} экспериментально измеренное распределение по индексу формы.

Существует несколько алгоритмов поиска глобального минимума для подобных задач (1.9). Воспользуемся алгоритмом Direct, производящим поиск решения в каждой точке пространства параметров, и благодаря этому, являющимся более устойчивым к случаю множественных локальных минимумов у $S(\zeta)$.

В качестве тестовых экспериментальных распределений, возьмём нативные распределения по индексу формы для двух различных условно здоровых доноров. Для получения экспериментальных распределений по индексу формы были измерены сигналы светорассеяния от одиночных тромбоцитов и решена обратная задача светорассеяния для каждого из сигналов (1.9). Подготовка проб проводилась согласно протоколу, описанному в разделе 2.4.1.

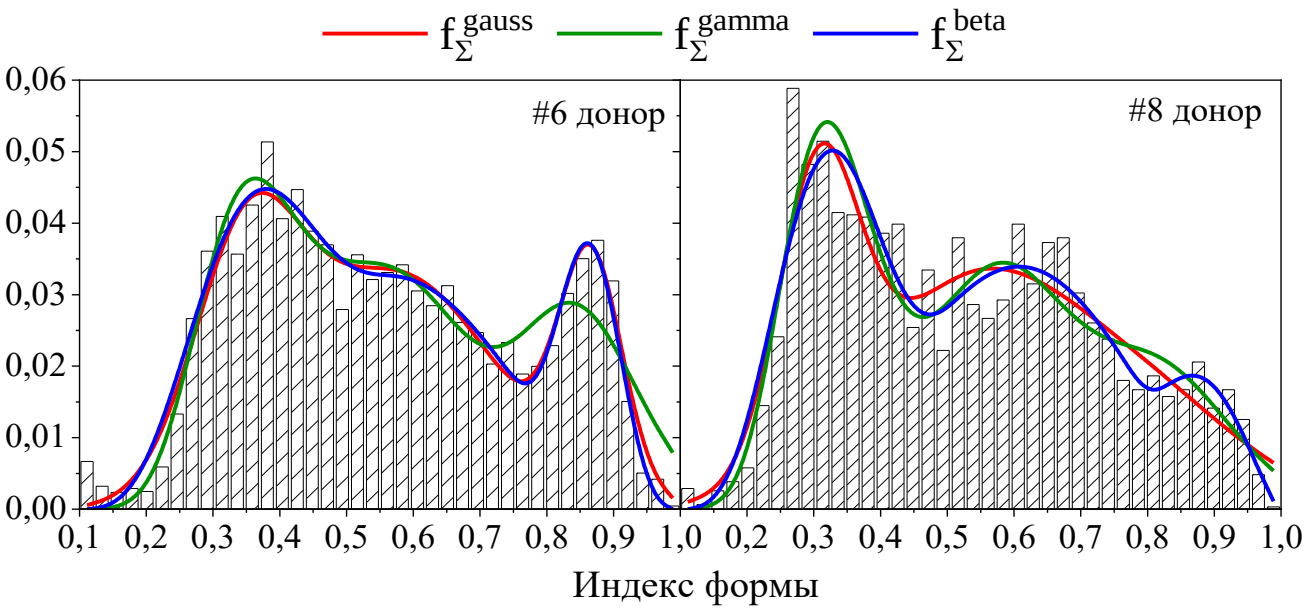

Рисунок 16 Графическое представление решения обратной задачи для двух условно здоровых доноров.

Таблица 5 Решение обратной задачи для трёх типов суммарных функций плотностей вероятности распределения.

Распределение Гаусса			**Гамма распределение**			**Бета распределение**		
	#6	**#8**		**#6**	**#8**		**#6**	**#8**
СКО $*10^{-5}$	1.04	3.09	**СКО $*10^{-5}$**	2.27	3.25	**СКО $*10^{-5}$**	1.02	2.72
η_r	28±8	26.4±1.0	η_r	36±7	40±3	η_r	25±2	34± 4
μ_r	0.349±0.018	0.3064±0.0010	k_r	29.5±1.3	30.2±1.0	M_0^r	0.344±0.015	0.314± 0.019
σ_r	0.07±0.02	0.0584 ± 0.0009	θ_r	0.020±0.002	0.019±0.001	χ_r	4.9±1.5	4.9±0.6
μ_{pa}	0.57±0.03	0.53±0.02	k_{pa}	20.0±1.1	21.6±1.1	M_0^{pa}	0.566±0.013	0.60±0.03
σ_{pa}	0.14±0.02	0.158± 0.006	θ_{pa}	0.0186± 0.0010	0.0153±0.0008	χ_{pa}	4.0±0.4	3.99±0.18
η_{fa}	16±3	20.1±1.2	η_{fa}	22±7	16±3	η_{fa}	15.4±1.6	7.4±1.4
μ_{fa}	0.866±0.012	0.80±0.04	k_{fa}	101±4	76.2±1.2	M_0^{fa}	0.866±0.007	0.896± 0.016
σ_{fa}	0.04±0.02	0.14±0.02	θ_{fa}	0.0084±0.0013	0.0110±0.0014	χ_{fa}	5.4±0.3	2.6±0.4

При решении обратной задачи, для каждого из трёх типов суммарных функций ((11), (13), (16)), были получены малые значения функции отличий (20). Это показывает справедливость предположения о наличии трёх субраспределений, внутри нативного распределения тромбоцитов по индексу формы. Стоит отметить, что суммарная функция, состоящая из плотностей вероятности бета распределения, показала наименьшее значение функции отличий для обоих типов доноров. Причиной лучшего согласия этого типа суммарной функции является учёт границ каждой из трёх плотностей вероятности. Для плотностей вероятности бета распределения это возможно из-за отсутствия в области определения носителя бесконечности. Учёт границ позволяет исключить вклад предположительно неактивированной субпопуляции тромбоцитов в процент и форму распределения активированных тромбоцитов и наоборот. 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.

Таким образом, суммарное распределение, состоящее из трёх плотностей вероятности, бета распределения, является наиболее подходящим для описания экспериментального распределения по индексу формы. Определение параметров этого суммарного распределения в дальнейшем будет подразумеваться под описанием фракционного состава (неактивированной, частично активированной и полностью активированной субпопуляций) нативной пробы тромбоцитов, для условно здоровых доноров.

4.3 Обсуждение результатов главы 4

В главе 4 рассмотрены несколько вариантов описания нативного распределения тромбоцитов по индексу формы. Для этого были построены три распределения – кандидата, в виде суммы трёх пиковых функций одного типа (суммарная функция). В качестве пиковых функций были взяты плотности вероятности Гаусс, гамма и бета распределений. Каждая из пиковых функций внутри суммарной функции интерпретировалась, как описывающая неактивированную, частично активированную или полностью активированную субпопуляцию тромбоцитов, в зависимости

от положения максимума в суммарной функции. Все три типа суммарных функций описывают экспериментальное распределение с малым значением среднеквадратичного отклонения, что говорит о справедливости предположения о наличие трёх субпопуляций тромбоцитов внутри нативной пробы. Наиболее подходящей суммарной функцией для описания экспериментальных распределений нативных тромбоцитов по индексу формы является функция, состоящая из суммы трёх плотностей вероятности бета распределения.

Глава 5 Феноменологическая модель активации тромбоцитов

Первым этапом моделирования процесса активации популяции тромбоцитов, является описание состояния популяции до воздействия любого из внешних факторов, иначе говоря, построение модели, описывающей популяцию тромбоцитов в кровотоке. Модель отображает начальное состояние тромбоцитов, эволюция которого должна описывать состояние популяции тромбоцитов после воздействия внешних факторов, приводящих к активации. Выделим основные, наиболее важные параметры активации одиночного тромбоцита, под воздействием агониста активации АДФ, и введём распределения по этим параметрам с тем, чтобы в дальнейшем описать изменение состояние всей популяции тромбоцитов после воздействия агониста активации.

5.1 Математическое описание популяции тромбоцитов до воздействия стимулов

Моделирование процессов, происходящих в одиночном тромбоците под воздействие АДФ с точки зрения химической кинетики, было выполнено ранее, в работе [8]. В соответствии с построенной моделью, существует каскад реакций, определяющий связь между концентрацией добавленного АДФ и концентрацией Ca^{2+}, высвобожденного из эндоплазматического ретикулума тромбоцита, в процессе активации. В других работах была отражена роль уровня свободного Ca^{2+} в цитозоле, который в дальнейшем определяет степень активации тромбоцита [91], а так же состояние его формы (1.3.2).

В процессе наблюдения за состоянием популяции тромбоцитов, после добавления различной концентрации АДФ, был установлен факт возрастания количества активированных тромбоцитов в пробе с увеличением концентрации добавленного АДФ [21, 92]. Ранее, экспериментально было установлено, что на одиночном тромбоците, в среднем, наблюдается порядка 100 рецепторов к АДФ [52]. Самая малая концентрация АДФ, используемая в работе [21] составляет 0.16 μM, что соответ-

ствует $9.9*10^{16}$ молекул/литр. Известно, что верхняя граница нормальной концентрации тромбоцитов для человека, находится на уровне – $320*10^{9}$ тромбоцитов/литр, что соответственно составляет – $3.2*10^{13}$ рецепторов к АДФ/литр. Такая простая оценка показывает, что несмотря на малую концентрацию АДФ в исследуемой пробе, агонист активации тромбоцита, находится в избытке, но не приводит к полной активации пробы. Отсюда следует вывод – присоединение агониста активации тромбоцита, не является достаточным условием, для его полной активации. Учтём эту особенность введя в модель параметр индивидуальной чувствительности тромбоцита к агонисту активации (S). Этот параметр отражает способность одиночного тромбоцита к переходу из начального состояния в состояние с определённой степенью активации. При этом, косвенно учитывает различия в кинетике каскада реакций активации разных одиночных тромбоцитов. Эти различия объясняются случайным содержанием в тромбоцитах веществ, участвующих в каскаде активации тромбоцита, из-за случайности захвата внутреннего содержимого и мембраны родительской клетки – мегакариоцита – при отпочкование молодых тромбоцитов от родительской клетки. Предположим, что параметр S внутри одной популяции принадлежит логнормальному распределению.

В качестве маркера активации тромбоцитов, в этой работе используется наблюдение за изменением формы тромбоцитов (изменение индекса формы δ). Известно, что основным структурным элементом, поддерживающим форму тромбоцита, является периферическое кольцо микротрубочек (1.3.1), однако для формы достаточно важен объём, заключённый внутри мембраны, натянутой на кольцо. В зависимости от объёма, могут встречаться нативные тромбоциты, обладающие различными индексами формы при одинаковой длине периферического кольца [35]. Введём начальный индекс формы δ_0, показывающий степень сплюснутости одиночного тромбоцита перед любым воздействием на него.

Ранее сообщалось (4.2), что нативное состояние популяции тромбоцитов можно описать с помощью суммы плотностей вероятностей бета распределения, поэтому предположим, что до любого воздействия на популяцию тромбоцитов,

начальный индекс формы тромбоцитов принадлежит симметричному бета распределению, левая граница которого, совпадает с начальными значениями индекса формы для тромбоцитов, и составляет 0.1.

Конфигурация периферического кольца микротрубочек, вместе с поверхностным натяжением мембраны, определяет форму тромбоцита не только в его состоянии до любого воздействия, но и в его активированном состоянии. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле, приводит к удлинению кольца микротрубочек и изменению поверхностного натяжения мембраны, что становится причиной изменения геометрии периферического кольца (1.3.2). В теоретической работе Дмитриева и соавторов [93] было показано, что перестройка геометрии кольца микротрубочек происходит через метастабильное состояние. При одних и тех же значениях длины кольца и поверхностного натяжения мембраны, кольцо может находиться, как в плоском, так и в искривлённом состоянии, в зависимости от направления изменений в его геометрии (переход от плоского состояния к искривлённому или в обратном направлении). Отсюда можно предположить, что кольцо микротрубочек, а, следовательно, и индекс формы тромбоцита, при прохождении метастабильного состоянии, изменяют свою структуру скачкообразно.

В соответствии с фактами, изложенными в статье Дмитриева и соавторов [93], существуют диапазоны длин кольца и поверхностного натяжения мембраны, для которых тромбоциты сохраняют плоскую форму. Это свидетельствует о наличие уровня воздействия на тромбоцит, до превышения которого, его форма остается неизменной.

Введём параметр C_{min}, который показывает величину скачка по индексу формы, необходимого для преодоления метастабильного состояния. Будем считать в дальнейшем, что форма кольца остаётся плоской, а, следовательно, индекс формы тромбоцита не изменяется, если внешнее воздействие на него, приводит к изменению индекса формы меньше, чем значение C_{min}. Зависимость изменения индекса формы от силы внешнего воздействия, будет рассмотрена в следующем разделе (5.2). Для упрощения модели предположим, что значение C_{min} является одинаковым для всех тромбоцитов, находящихся в исследуемой популяции.

В процессе активации, объём тромбоцита не меняется [3], при этом форма тромбоцита изменяется достаточно значительно [22]. В следствии того, что тромбоциты, находящиеся внутри исследуемой популяции, обладают различной чувствительностью к агонисту активации, а также различным начальным состоянием, во время их реакции на одинаковое количество агониста активации, они должны приходить к различному финальному состоянию процесса активации. Обозначим состояние максимальной активации тромбоцита за δ_{max}.

Максимально возможное значения индекса формы для тромбоцита ограничено 1 (соответствует сфере). Несмотря на это, достижение тромбоцитом состояния сферы, не говорит об окончании процесса активации с точки зрения биохимических процессов, которые происходя внутри тромбоцита. Поэтому предположим, что δ_{max} для популяции тромбоцитов в состоянии до воздействия, принадлежит симметричному варианту плотности вероятности бета распределения, умноженному на функцию Хевисайда в точке 1.

Таким образом, для описания популяции тромбоцитов до воздействия, необходимо задать распределения: по индивидуальной чувствительности к агонисту активации (S), по начальному индексу формы (δ_0), величину скачка по индексу формы, необходимого для начала изменения формы (C_{min}), и распределение по максимальному значению индекса формы (δ_{max}).

5.2 Зависимость изменения индекса формы тромбоцита под влиянием определённой концентрации АДФ

В разделе 5.1 описаны предположения, позволяющие задать начальное состояние популяции тромбоцитов, до любого воздействия на пробу (добавления агониста активации, влияние сдвиговой скорости или процесса забора пробы). Целью этого раздела является построение зависимости, описывающей изменения индекса формы тромбоцита с заданными начальными параметрами, в процессе воздействия на него агониста активации АДФ.

В качестве маркера степени активации тромбоцита, будем рассматривать индекс формы δ. Согласно разделу 5.1, любой рассматриваемый тромбоцит, будем описываться четырьмя параметрами: чувствительностью S, начальным состоянием

до активации δ_0, максимально возможным состоянием активации δ_{max}, и величиной скачка по индексу формы, необходимого для начала изменения формы C_{min}.

Под воздействием АДФ, тромбоцит переходит из состояния δ_0 в состояние с некоторым δ. Представим воздействие АДФ, как добавку *α(АДФ)* к начальному индексу формы δ_0.

$$\delta = \delta_0 + \alpha(АДФ) \tag{21}$$

В разделе 5.1 обсуждалось, что для различных тромбоцитов характерна различная чувствительности к агонисту активации (S). Из этого следует, что добавка α зависит не только от концентрации АДФ, но и от S.

Самым простым вариантом добавки является линейная зависимость α от концентрации АДФ, выбранная в следующем виде:

$$\alpha(АДФ) = S \times АДФ \tag{22}$$

Несмотря на то, что зависимость (22), по построению, не ограничена сверху, крайним состоянием формы тромбоцита является состояние, близкое к сфере. Введём ограничение для добавки, как $\alpha(АДФ) \leq (\delta_{max} - \delta_0)$, где δ_{max} максимально допустимый индекс формы.

Более сложным вариантом добавки является дробно-рациональная зависимость, выбранная в следующем виде:

$$\alpha(АДФ) = (\delta_{max} - \delta_0)\frac{S \times [АДФ]}{(\delta_{max} - \delta_0) + S \times [АДФ]} \tag{23}$$

Зависимость (23) также ограничена сверху, значением $(\delta_{max} - \delta_0)$. По сравнению с линейной зависимостью, эта зависимость обладает меньшей скоростью изменения *α(АДФ)*, при одинаковых начальных параметрах.

В разделе 5.1 обсуждалось, что процесс изменения формы в зависимости от концентрации агониста активации, является пороговым и скачкообразным. Параметр C_{min} обозначает величину необходимого скачка по индексу формы для начала процесса изменения формы тромбоцита, в процессе активации. Учитывая это, зависимость изменения индекса формы от концентрации АДФ можно записать в следующем виде:

$$\delta(АДФ) = \delta_0 + H(\alpha(АДФ) - C_{\min}) \times \alpha(АДФ) \qquad (24)$$

где H – функция Хевисайда, $\alpha(АДФ)$ выбирается согласно зависимости (22) или (23).

Зависимость (24) допускает нахождение тромбоцитов в промежуточном (частично активированном) состояния тромбоцита, при котором индекс формы может находиться между неактивированным (δ_0) и полностью активированным (δ_{max}) состояниями. Наличие такого состояния экспериментально продемонстрировано как для нативных тромбоцитов, так и для тромбоцитов, находящихся в состоянии активации, после добавления к ним, определённой концентрации АДФ (данные представлены в разделах 6.2 и 6.3). Появление такого состояния, согласно исследуемой модели, можно объяснить наличием таких тромбоцитов, воздействие эффективной концентрации АДФ (с учётом чувствительности S) на которые приводит к изменению формы этих тромбоцитов ($\alpha(АДФ) > C_{min}$), но недостаточно для достижения тромбоцитами максимально возможного индивидуального изменения формы ($\delta_0 + \alpha(АДФ) < \delta_{max}$).

Зависимость (24), вместе с начальными распределениями по параметрам популяции, представляет феноменологическую модель активации популяции тромбоцитов [94].

5.3 Выбор подходящей зависимости изменения индекса формы тромбоцита под влиянием определённой концентрации АДФ

В разделе 5.2 представлены два варианта описания воздействия АДФ на индекс формы одиночного тромбоцита. При выборе подходящего варианта для описания поведения популяции, проведём моделирование зависимости (24) для двух вариантов $\alpha(АДФ)$. Выберем наиболее подходящую добавку по характеру поведения итогового теоретического распределения, согласно экспериментальным данным.

На первом этапе, методом Монте-Карло, зададим модельную популяцию тромбоцитов размером 30000 частиц в начальном состоянии (состояние до забора крови), для которой начальные параметры δ_0, δ_{max} и S принадлежат симметричным

бета распределениям и логнормальному распределению соответственно. Пороговое значение изменения формы (C_{min}) одинаково для вех тромбоцитов в теоретической популяции. Значения параметров начального распределения по форме (δ_0), распределения по максимальному значению индекса формы (δ_{max}) и C_{min} подбирались из анализа форм экспериментально измеренных нативных распределений тромбоцитов. Предполагаем, что активация тромбоцитов приводит только к изменения процентного соотношения между субпопуляциями неактивированных, частично активированных и полностью активированных тромбоцитов. Значения распределения по чувствительности (S) подбирались из условия малой восприимчивости заданной популяции к постоянному уровню АДФ, согласно биохимической модели активации одиночного тромбоцита [95].

Таблица 6 Параметры начальных распределений модельной популяции

MPSI-MIN	**PSIDW-MIN**	**MPSI-MAX**	**PSIDW-MAX**	**LT-MAX**	C_{min}	**MPS-ADP**	**PSDW-ADP**
0.3	0.18	0.995	0.2	0.83	0.17	16	0.34

где MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина плотности вероятности бета распределения, которой принадлежит δ_0, MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX – среднее значение, ширина и левая граница плотности вероятности бета распределения, которой принадлежит δ_{max}, MPS-ADP и PSDW-ADP – средний логарифм и ширина логарифма распределения чувствительности S к АДФ и C_{min} – пороговое значение, после преодоления которого начинается изменение формы тромбоцита.

Рассчитаем изменения индекса формы для каждого тромбоцита из модельной популяции в зависимости от «добавленной» концентрации АДФ, согласно уравнению (24) для двух вариантов *α(АДФ)* (22) и (23), и построим получаемые распределения по индексу формы. Ограничимся диапазоном концентраций АДФ, сравнимых с концентрацией, используемой в эксперименте и позволяющей наблюдать «трёхгорбое» распределение после воздействия АДФ.

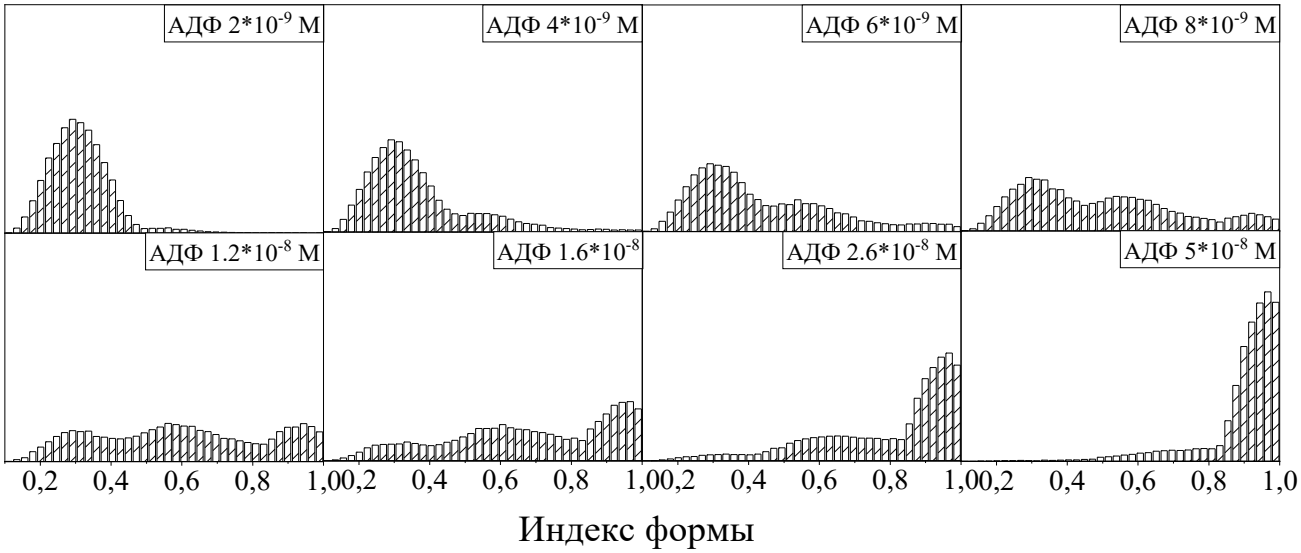

Рисунок 17 Эволюция распределения популяции тромбоцитов согласно уравнению (24), α(АДФ) задана зависимостью (22).

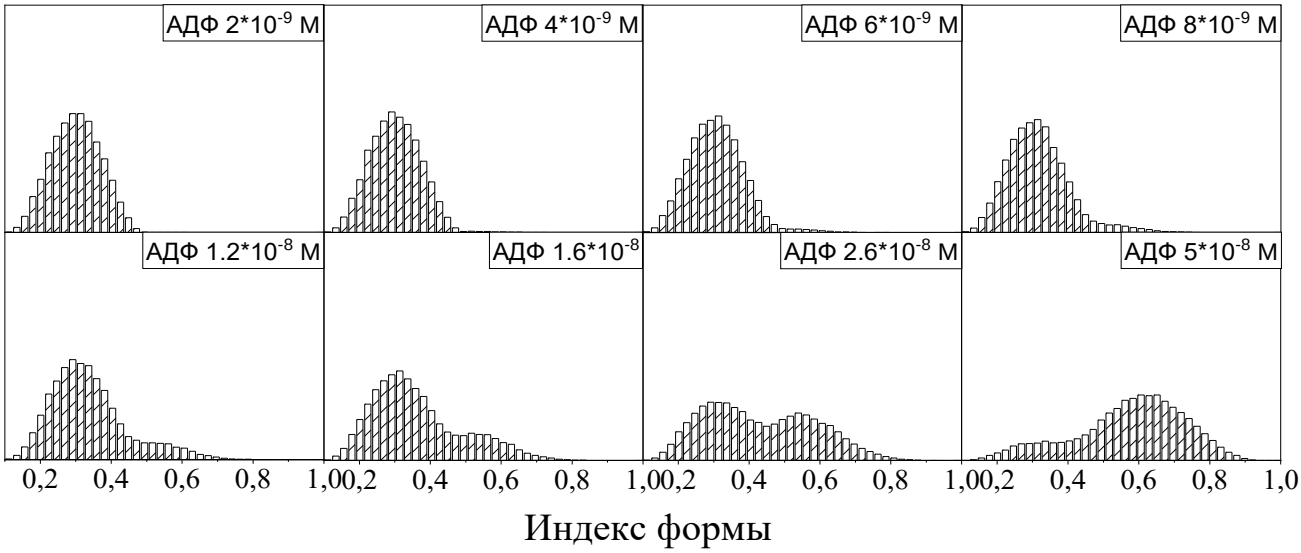

Рисунок 18 Эволюция распределения популяции тромбоцитов согласно уравнению (24), α(АДФ) задана зависимостью (23).

При одинаковых начальных распределениях и одинаковом заданном количестве агониста активации, рассматриваемые зависимости приводят к совершенно разным результирующим распределениям. Для зависимости (23) в отличие от зависимости (22) в заданном диапазоне концентраций АДФ не наблюдается появления «трёхгорбой» функции, которая наблюдается для экспериментальных данных (Рисунок 16, Рисунок 19). Это можно связать с различной скоростью роста значения добавки α(АДФ). Для линейной зависимости наблюдается большая скорость

изменения в сравнении с дробно-рациональной зависимостью, что позволяет оставаться части тромбоцитов с низкой чувствительностью в неизменённой форме, а тромбоцитам с высокой чувствительностью – достичь своего финального состояния.

Моделирование показывает, что зависимость (22) даёт результаты более похожие на наблюдаемые распределения, в отличие от зависимости (23). Проверим это предположение, определив параметры модели, для экспериментально измеренных популяций тромбоцитов, до и после воздействия на них, определённой концентрации АДФ.

Зная типы начальных распределений по параметрам и зависимость изменения формы одиночного тромбоцита от концентрации АДФ, можно по аналогии с моделированием, описанным выше, задать модельную функцию для метода глобальной оптимизации Direct. Это позволит определить параметры MPSI-MAX, PSIDW-MAX, LT-MAX, MPSI-MIN, PSIDW-MIN, C_{min}, MPS-ADP, PSDW-ADP из экспериментально измеренного распределение по индексу формы, после воздействия определённой концентрации АДФ.

При правильном исполнении забора пробы тромбоцитов происходит незначительная активация, в любом случае, влияющая на измеряемое распределение по индексу формы. Для учёта этого влияния, введём параметр ADP_{eff}, соответствующий концентрации АДФ, эквивалентной воздействию процедуры забора и измерения на пробу.

Распределение тромбоцитов не обладает большим количеством особенностей, поэтому, для повышения точности определения параметров при решении обратной задачи, необходимо использовать одновременно нативную пробу (переход из состояния до забора пробы в нативное под действием ADP_{eff}), и пробу после воздействия определённой концентрации ADP_{ip} (переход из состояния до забора пробы в активированное под воздействием ADP_{eff}+ADP_{ip}).

Таблица 7 Сравнение определяемых параметров для двух вариантов добавки α(АДФ).

		СКО	**MPSI-MAX**	**PSIDW -MAX**	**LT-MAX**	**MPSI-MIN**	**PSIDW -MIN**	C_{min}	**ADP_{eff} *10^{-9}**	**MPS-ADP**	**PSDW-ADP**
(22)	**Донор 5**	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
(23)		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
(22)	**Донор 6**	0.0032	0.990 ± 0.005	0.21	0.716 ± 0.018	0.309 ± 0.012	0.18	0.146 ± 0.012	9.97 ± 0.06	16.382 ± 0.007	0.34
(23)		0.0043	0.990 ± 0.003	0.04	0.930 ± 0.013	0.345 ± 0.007	0.29	0.091 ± 0.008	11.8 ± 2	16.60 ± 0.04	0.9

СКО – среднеквадратичное отклонение между теоретической кривой и экспериментальными распределениями, MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина плотности вероятности бета распределения, которой принадлежит δ_0, MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX – среднее значение, ширина и левая граница плотности вероятности бета распределения, которой принадлежит δ_{max}, MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина логарифма распределения по чувствительности S к АДФ, C_{min} пороговое значение, после которого влияние АДФ на тромбоциты становится заметным, ADP_{eff} – концентрация АДФ, эквивалентная влиянию процедуры подготовки пробы.

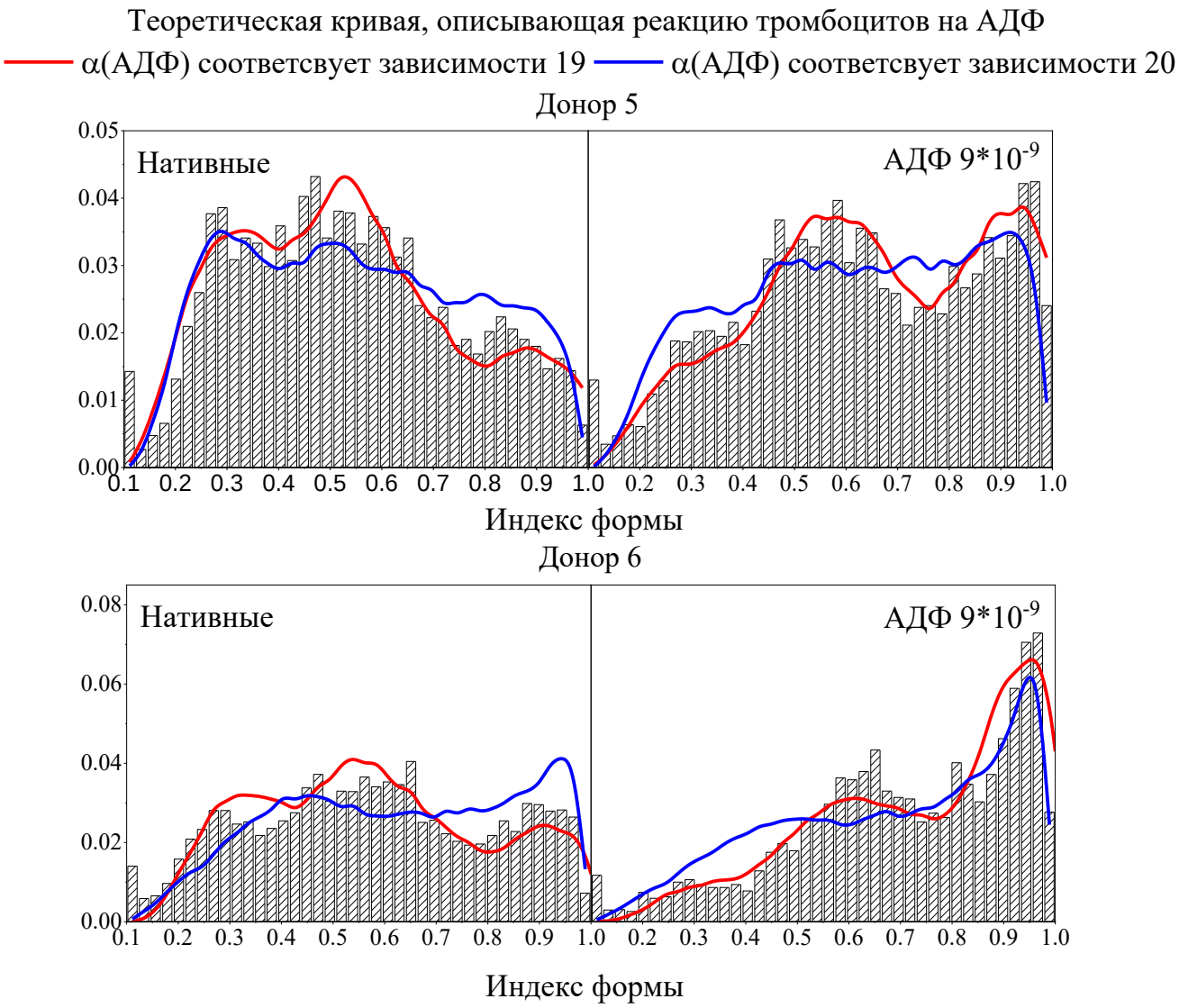

Рисунок 19 Пример определения параметров чувствительности тромбоцитов к агонистам активации, с использованием двух разных зависимостей *α(АДФ)*, для двух различных доноров.

Из Рисунок 19 и Таблица 7 видно, что зависимость (22) лучше подходит для описания реакции популяции тромбоцитов на АДФ. Об этом свидетельствует значение СКО, которое для зависимости (22) меньше, чем для зависимости (23) для представленных экспериментальных распределений. Среди получаемых параметров, наиболее интересными с точки зрения дальнейшего исследования, являются параметры чувствительности (MPS-ADP, PSDW-ADP).

5.4 Обсуждение результатов главы 5

В рамках главы построена феноменологическая модель реакции популяции тромбоцитов на АДФ. Модель включает в себя параметры, характеризующие начальное состояние тромбоцитов, в том числе чувствительность к агонисту активации, а также зависимость, описывающую переход начального распределения тромбоцитов в активированное, под воздействием определённой концентрации АДФ.

Для описания изменения распределения по индексу формы, после воздействия определённой концентрации АДФ, были построены и исследованы два варианта зависимости изменения индекса формы одиночного тромбоцита от концентрации добавленного АДФ: линейная и дробно-рациональная. Было показано, что теоретические распределения, полученные с использованием линейной зависимости, больше соответствуют особенностям экспериментальных данных. В рамках этой зависимости объясняется появление частично активированного состояния тромбоцитов, наблюдаемого в эксперименте, как для нативных тромбоцитов, так и для тромбоцитов, активированных определённой концентрацией АДФ. Пользуясь этой зависимость, можно определить все параметры феноменологической модели по двум экспериментальным распределениям: нативному и под воздействием определённой концентрации АДФ.

Глава 6 Экспериментальные исследования популяции тромбоцитов

6.1 Измерение тромбоцитов на двух длинах волн одновременно

В Глава 3 описано влияние отличий формы активированного тромбоцита от оптической модели «сплюснутый сфероид» на результаты решения обратной задачи светорассеяния. Форма активированного тромбоцита задавалась двумя моделями: моделью, учитывающей искривление периферического кольца микротрубочек, и моделью, учитывающей появление псевдоподий. Для этих моделей было определено уменьшение найденного индекса формы и увеличение объёма путём решения обратной задачи светорассеяния с использованием модели «сплюснутый сфероид», в сравнении с заданными значениями, при этом для длины волны 0.66 мкм отличия были определены меньше, чем для длины волны 0.405 мкм. Форма отдельно взятого активированного тромбоцита может значительно отличаться от форм тромбоцитов, рассмотренных в Глава 3, но при этом, рассмотренные формы могут отражать основные особенности изменений форм тромбоцитов, происходящих в процессе активации.

Подтвердить описанный эффект для отдельно взятых тромбоцитов и для отдельно взятой волны освещения экспериментально, достаточно проблематично, так как заранее не известны параметры измеряемого тромбоцита. Но всё-таки возможно, зарегистрировать некоторое отличие индексов формы, определённых для одной и той же частицы, по сигналам рассеяния разных длин волн благодаря тому, что разные длины волн освещения обладают разной чувствительностью к особенностям формы.

В работе было проведено одновременное измерение сигналов рассеяния от активированных тромбоцитов на длинах волн 0.405 мкм и 0.66 мкм., помещенных в СПЦ [96]. Подготовка пробы проводилась согласно протоколу из раздела 2.4.2. Для каждого из полученных сигналов решена обратная задача светорассеяния с использованием оптической модели «сплюснутый сфероид» и получены итоговые распределения по индексу формы. (Рисунок 20).

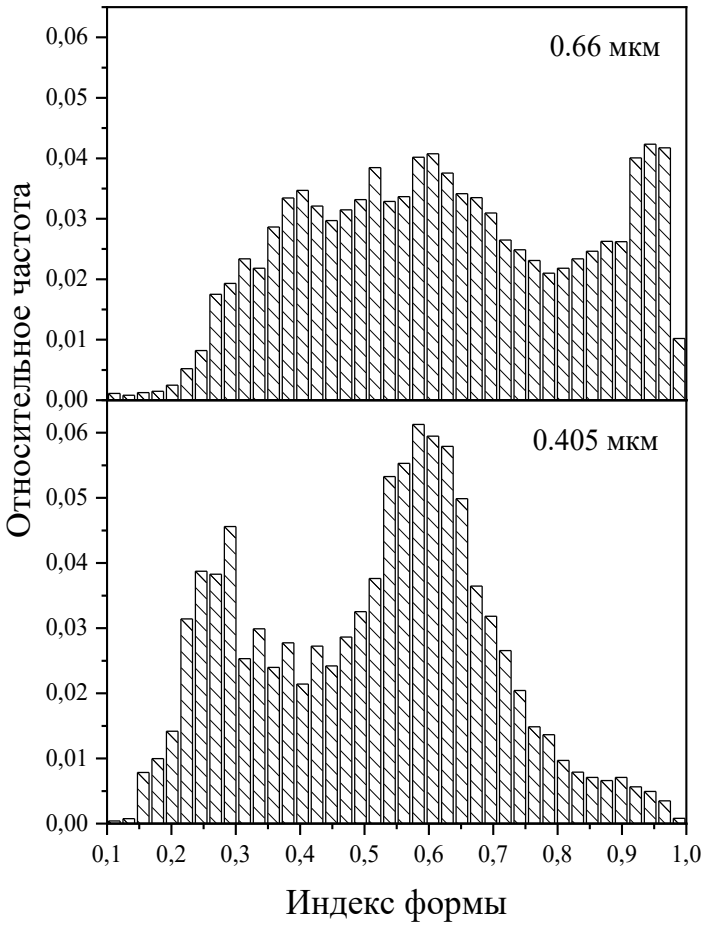

Рисунок 20 Распределение по индексу формы для пробы тромбоцитов, измеренной одновременно на двух длинах волн.

Для сигналов, измеренных на длине волны 0.405 мкм, наблюдается значительное смещение решений обратной задачи светорассеяния в область средних и малых индексов формы, относительно индексов формы, определенных для сигналов, измеренных на 0.66 мкм. Именно к такому эффекту приводит отличия форм, рассмотренных в разделах 3.2 и 3.3, от оптической модели «сплюснутый сфероид». Это показывает превалирующий вклад рассмотренных искажений в модельную ошибку, за счёт использования модели «сплюснутый сфероид».

6.1.1 Выбор тромбоцитов, соответствующих оптической модели «сплюснутый сфероид»

Несмотря на значительные отличия формы активированного тромбоцита, модель «сплюснутый сфероид» является наиболее удобной для описания большой по-

пуляции тромбоцитов. Для дальнейшего использования модели в процессе решения обратной задачи светорассеяния необходимо отделить частицы, несоответствующие оптической модели, и оценить влияние этой операции на значения параметров, описывающих популяцию (параметры фракционного состава). Способ описания фракционного состава нативной пробы тромбоцитов представлен в Глава 4.

Когда тромбоцит соответствует оптической модели «сплюснутый сфероид», результат решения обратной задачи светорассеяния с использованием этой модели, не зависит от длины волны освещения. Поэтому сравнивая результаты решения обратной задачи светорассеяния для одной частицы, измеренной на двух длинах волн, можно отделить тромбоциты, не соответствующие модели «сплюснутый сфероид».

В качестве критерия, для определения таких частиц, выберем значение СКО между параметрами, полученными для сигналов, измеренных на разных длинах волн, для одной и той же частицы. В этом случае, СКО будет рассчитываться следующим образом:

$$СКО = \frac{(d^{0.66} - d^{0.405})^2}{(d^{0.66})^2} + \frac{(\delta^{0.66} - \delta^{0.405})^2}{(\delta^{0.66})^2} + \frac{(\beta^{0.66} - \beta^{0.405})^2}{(\beta^{0.66})^2} \qquad (25)$$

где индексы 0.66, 0.405 соответствую длине волны, на которой измерен сигнал рассеяния от частицы, d – диаметр сферы эквивалентного объёма, δ – индекс формы, β – угол ориентации в потоке. Для частиц, соответствующих модели, СКО между параметрами будет минимальным. В качестве границы разделения соответствующих и не соответствующих моделей частиц, выберем медианной значение СКО для пробы (25).

Основными достижениями данной работы являются результаты анализа распределений тромбоцитов по индексу формы в нативном состоянии, а также после воздействия на них агониста активации в определенной концентрации. Рассмотрим, как изменяются распределения по индексу формы и параметрам фракционного состава (Глава 4), если отбросить все частицы, форма которых не соответствует модели «сплюснутый сфероид» (для частиц СКО (25) меньше медианного значения по пробе).

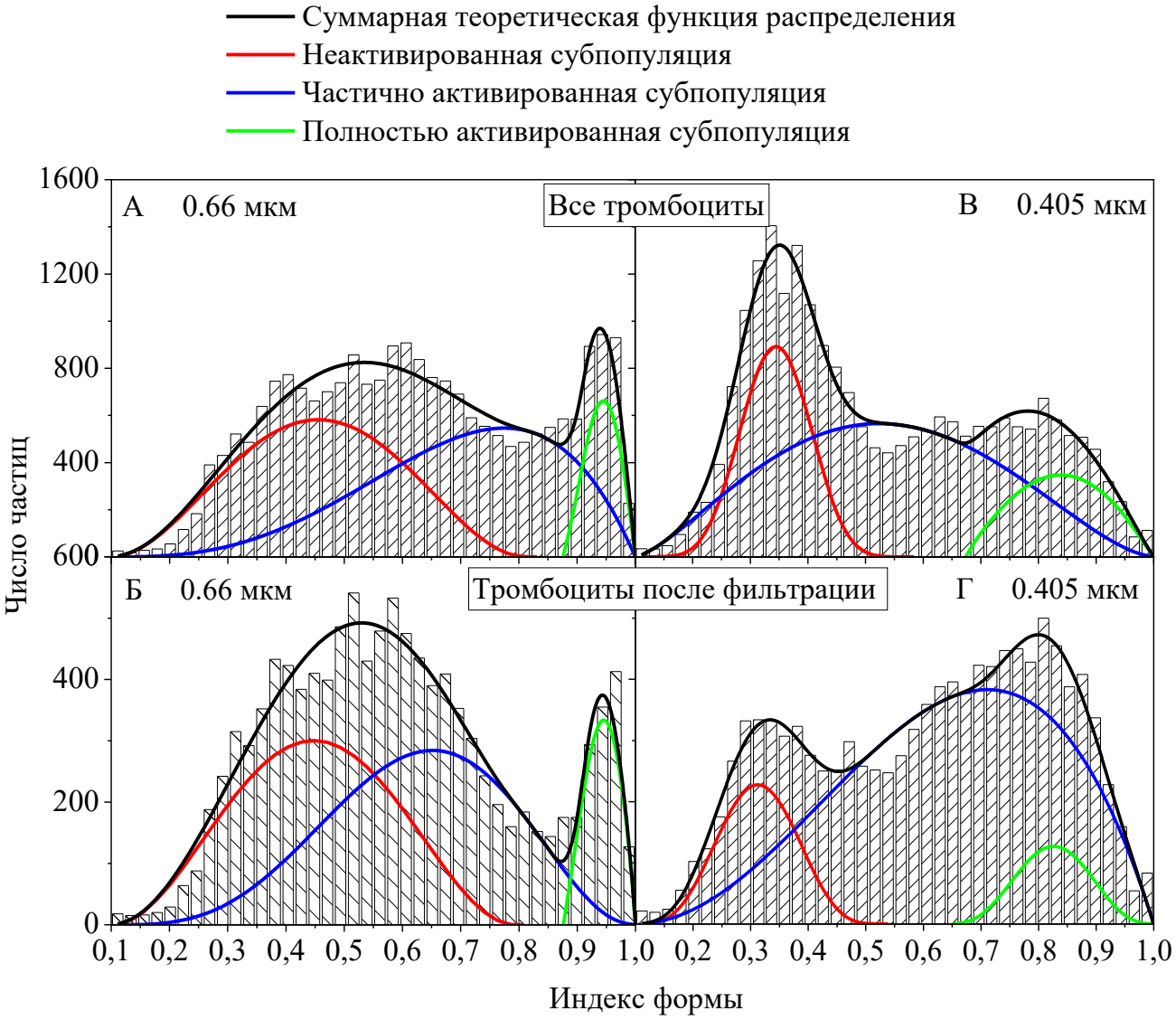

Рисунок 21 Распределение тромбоцитов, измеренных на двух длинах волн одновременно и описание фракционного состава, полученных распределений, до и после выбора тромбоцитов, соответствующих оптической модели сплюснутого сфероида.

Таблица 8 Параметры распределений, представленных на Рисунке 21.

N		Неактивированные тромбоциты			Активированные тромбоциты					
					Частично активированные		Полностью активированные			η_a, %
		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

MPSI-R, PSIDW-R мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей неактивированную субпопуляцию тромбоцитов, %PR – процент неактивированных тромбоцитов от всех измеренных, MPSI-PA, PSIDW-PA мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей частично активированную субпопуляцию тромбоцитов, MPSI-FA, PSIDW-FA мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей полностью активированную субпопуляцию тромбоцитов, %PFA процент активированных тромбоцитов от всех измеренных, η_a, % – суммарный процент активированных тромбоцитов.

После исключения из распределений частиц, не соответствующих оптической модели «сплюснутый сфероид», распределения изменили свою форму, что привело к изменению параметров фракционного состава (Таблица 8). Для распределений, полученных по сигналам, измеренным на длине волны 0.66мкм (А и Б на Рисунок 21 и в Таблица 8) различия находятся внутри погрешностей определения параметров субпопуляций, за исключением моды распределения частично активированной субпопуляции (MPSI-PA). Точность определения параметров фракционного состава выше для распределения, из которого исключили частицы, не соответствующие оптической модели. Для распределений, полученных по сигналам, измеренным на длине волны 0.405мкм (В и Г на Рисунок 21 и в Таблица 8) изменения значительней, чем для распределений, измеренных на длине волны 0.66 мкм. В первую очередь, это связано с большей чувствительностью меньшей длины волны к особенностям формы, что и было показано при моделировании в разделах 3.2 и 3.3.

Так как для длины волны 0.66 мкм, отбрасывание из распределений частиц, не соответствующих модели «сплюснутый сфероид», не приводит к значительным изменения в параметрах фракционного состава, то в дальнейшем результат измерения, полученный на длине волны 0.66 мкм, будем считать соответствующим реальной форме измеренных тромбоцитов.

6.2 Определение фракционного состава нативных тромбоцитов для условно здоровых доноров

В разделе 4.2 предложена гипотеза о теоретической функции 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 подтверждении этой гипотезы опишем 20 проб нативных тромбоцитов, взятых у различных условно здоровых доноров. Это позволит оценить разброс получаемых параметров субпопуляций тромбоцитов для группы доноров.

Кровь забиралась у доноров, с их согласия. Все участники были проинформированы о целях исследования. В исследовании участвовали доноры, не имеющие

диагностированных патологий кровообращения и не проходящие терапию, влияющую на систему гемостаза. Ограничений по половому и возрастному принципу для доноров наложено не было. Для всех исследований подготовка пробы проводилась в соответствии с протоколом, описанном в разделе 2.4.1.

В разделе 4.2 на Рисунок 16 для выбора наиболее подходящей теоретической функции для определения фракционного состава нативной пробы тромбоцитов, были использованы распределения по индексу формы для донора 6 и донора 8. На Рисунок 22 дополнительно представлены распределения по индексу формы ещё для двух доноров из группы, отличающихся друг от друга процентными соотношением, как неактивированной, так и активированной субпопуляции в пробе. Результаты описания фракционного состава нативных проб тромбоцитов всех доноров группы представлены в Таблица 9.

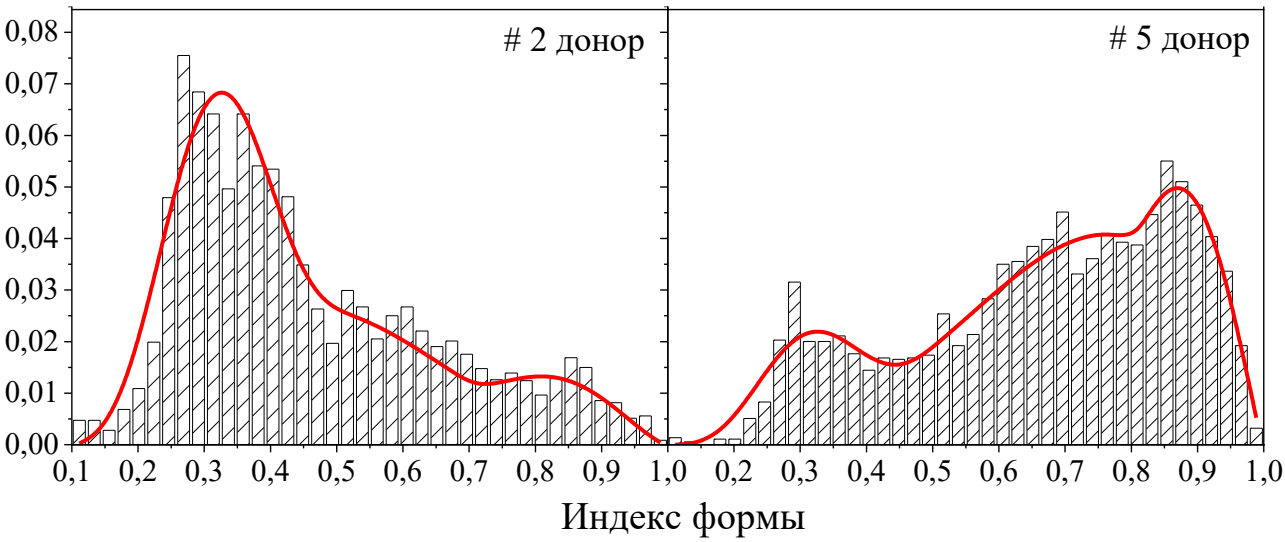

Рисунок 22 Примеры распределений по индексу формы для условно здоровых доноров. Красной линией обозначена теоретическая кривая, соответствующая сумме 3 плотностей вероятности бета распределения.

Среднее значение моды субпопуляции неактивированных тромбоцитов составляет 0.330±0.006, частично активированных тромбоцитов составляет 0.599±0.019, полностью активированных тромбоцитов составляет 0.892±0.005. Несмотря на одинаковую подготовку пробы наблюдается сильный разброс по % неактивированных и активированных тромбоцитов внутри группы (от 63 до 96%).

Это свидетельствует о различной чувствительности тромбоцитов к преаналитическим манипуляциям.

Сосредоточимся на анализе параметров, показывающих моды субпопуляций. Для этого рассчитаем взвешенную дисперсию (отношение дисперсии параметра к его среднему значению) для параметров, далее сравним полученные дисперсий с величиной взвешенной дисперсии среднего значения распределения по объёму (MPV), измеряемого стандартным методом (гематологический анализатор). Значение взвешенной дисперсии для MPV получим из интервала нормальных значений. Нормальные значения параметра MPV лежат в диапазоне 7.5–12фл [3]. Для больших выборок, в качестве границ нормальных значений, выбирается интервал 95% вероятности попадания значений. Предположим, что параметр MPV принадлежит нормальному распределению. В этом случае, среднее значение объёма тромбоцитов будет составлять 9.75 фл. Известно, что для нормально распределённых величин ширина интервала 95% вероятности (ширина интервала нормальных значений) соответствует 4 дисперсиям, тогда дисперсия параметра будет составлять 1.125 фл. В этом случае, взвешенная дисперсия для MPV составляет 0.11. Для параметров, показывающих моду каждой субпопуляции (MPSI-R, MPSI-PA, MPSI-FA), взвешенная дисперсия будет составлять 0.09, 0.15 и 0.02 соответственно. Сравнимые значения взвешенных дисперсий параметров соответствуют сравнимому разбросу значений параметров MPSI-R, MPSI-PA, MPSI-FA и MPV для условно здоровых доноров. Это говорит о потенциальной пригодности параметров для поиска корреляций с заболеваниями. Подтверждение гипотезы требует более детального рассмотрения, выходящего за рамки этой работы.

Ещё одним наблюдением, вызывающим интерес, является воспроизводимое наличие субпопуляций частично активированных тромбоцитов. Для объяснения появления этих субпопуляций, а также для оценки чувствительности тромбоцитов к агонисту активации, в Глава 5 была построена феноменологическая модель активации популяции тромбоцитов.

Таблица 9 Фракционный состав популяции нативных тромбоцитов для 20 условно здоровых доноров.

	Неактивированные тромбоциты			**Активированные тромбоциты**					
				Частично активированные		**Полностью активированные**			**η_a, %**
	MPSI-R	**PSIDW-R**	**%PR**	**MPSI-PA**	**PSIDW-PA**	**MPSI-FA**	**PSIDW-FA**	**%PFA**	
1	0.347±0.012	0.16	15±2	0.605±0.008	0.31	0.873±0.005	0.16	29±3	85±2
2	0.315±0.011	0.17	37±9	0.44±0.06	0.51	0.84±0.04	0.17	7±3	63±9
3	0.357±0.009	0.09	7±2	0.60±0.06	0.55	0.891±0.007	0.13	13±4	93±2
4	0.396±0.010	0.09	9±3	0.619±0.018	0.48	0.92±0.03	0.12	1±1	91±3
5	0.309±0.014	0.17	14.0±1.5	0.76±0.02	0.32	0.900±0.003	0.12	10±2	86±1.5
6	0.344±0.015	0.17	25±2	0.566±0.013	0.43	0.866±0.007	0.09	5.4±0.3	75±2
7	0.339±0.006	0.18	28±9	0.56±0.04	0.41	0.880±0.004	0.09	13.0±1.9	72±9
8	0.314±0.019	0.15	34±4	0.60±0.03	0.41	0.896±0.016	0.11	7.4±1.4	66±4
9	0.362±0.009	0.13	35±4	0.601±0.010	0.50	0.865±0.009	0.139	17±2	65±4
10	0.251±0.018	0.19	9±3	0.560±0.013	0.43	0.908±0.005	0.139	11.2±1.5	91±3
11	0.298±0.010	0.08	4±2	0.527±0.014	0.46	0.900±0.004	0.15	4±2	96±2
12	0.298±0.005	0.05	4.2±1.3	0.518±0.013	0.54	0.886±0.005	0.144	15.9±1.6	95.8±1.3
13	0.34±0.03	0.11	4±3	0.56±0.09	0.73	0.87±0.02	0.16	7±6	96±3

	MPSI-R	PSIDW-R	%PR	MPSI-PA	PSIDW-PA	MPSI-FA	PSIDW-FA	%PFA	η_a, %
14	0.336±0.014	0.15	10±3	0.57±0.07	0.66	0.926±0.004	0.10	12±3	90±3
15	0.35±0.02	0.25	12±3	0.75±0.04	0.23	0.897±0.010	0.11	16±9	88±3
16	0.35±0.05	0.25	23±12	0.59±0.05	0.32	0.891±0.007	0.16	16±2	77±12
17	0.32±0.03	0.2	8±3	0.7±0.02	0.31	0.94±0.006	0.1	34±2	92±3
18	0.32±0.02	0.18	6±2	0.7±0.008	0.35	0.909±0.004	0.15	10±2	94±2
19	0.356±0.008	0.13	3±1	0.699±0.008	0.43	0.899±0.002	0.13	9±1	97±1
20	0.31±0.005	0.07	4±1	0.45±0.01	0.45	0.9±0.002	0.16	10±1	96±1

MPSI-R, PSIDW-R – мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающих неактивированную субпопуляцию тромбоцитов, %PR – процент неактивированных тромбоцитов от количества всех измеренных тромбоцитов, MPSI-PA, PSIDW-PA – мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающих частично активированную субпопуляцию тромбоцитов, MPSI-FA, PSIDW-FA – мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающих полностью активированную субпопуляцию тромбоцитов, %PFA процент полностью активированных тромбоцитов от всех измеренных тромбоцитов, η_a, % – суммарный процент активированных тромбоцитов(частично активированные + полностью активированные), MPV, PDW – центр и ширина распределения по объёму тромбоцитов, PLT – концентрация тромбоцитов.

6.3 Определение чувствительности популяции тромбоцитов к агонисту активации для условно здоровых доноров

В разделе 5.3 описана феноменологическая модель реакции популяции тромбоцитов на определённую концентрацию АДФ, с учётом влияния подготовки пробы. В рамках модели, учтена различная восприимчивость одиночных тромбоцитов к агонисту активации, а также пороговый и скачкообразный характер изменения формы тромбоцита, после воздействия на него агониста активации. В этом разделе, пользуясь моделью из раздела 5.3, опишем реакцию популяции тромбоцитов на добавление одинаковой концентрации АДФ, для 9 условно здоровых доноров. Также, как и для получения результатов предыдущего раздела, кровь забиралась с согласия доноров, все доноры были проинформированы о цели исследования. В исследовании участвовали доноры без диагностированных патологий кровообращения и не проходящих терапию, влияющую на систему гемостаза. Ограничений на пол и возраст доноров наложено не было.

Все пробы были получены согласно с протоколом, описанном в разделе 2.4.2. Для каждого донора подготавливались две пробы: нативная, производимая через 30 минут после забора крови в вакутейнер и проба, активированная определённой концентрацией АДФ. Для активации, плазма с тромбоцитами добавлялась в малую пробирку, предварительно содержащую необходимое количество АДФ, после этого проба отправлялась в модифицированную систему подачи пробы. Далее, для каждого измеренного тромбоцита, решалась обратная задача светорассеяния для получения параметров формы частицы (диаметр сферы эквивалентного объёма D и индекс формы δ).

Используя метод глобальной оптимизации Direct, определяем параметры модели из раздела 5.3 для каждой пары экспериментальных распределений. В качестве экспериментальной функции будем использовать и нативное и активированное распределения тромбоцитов одновременно. В качестве теоретической функции будем использовать две кривые: соответствующую концентрации АДФ, моделирующей влияние забора пробы ($АДФ_{eff}$) и концентрации АДФ после добавления дополнительного стимула ($АДФ_{eff}$+$АДФ_{ip}$).

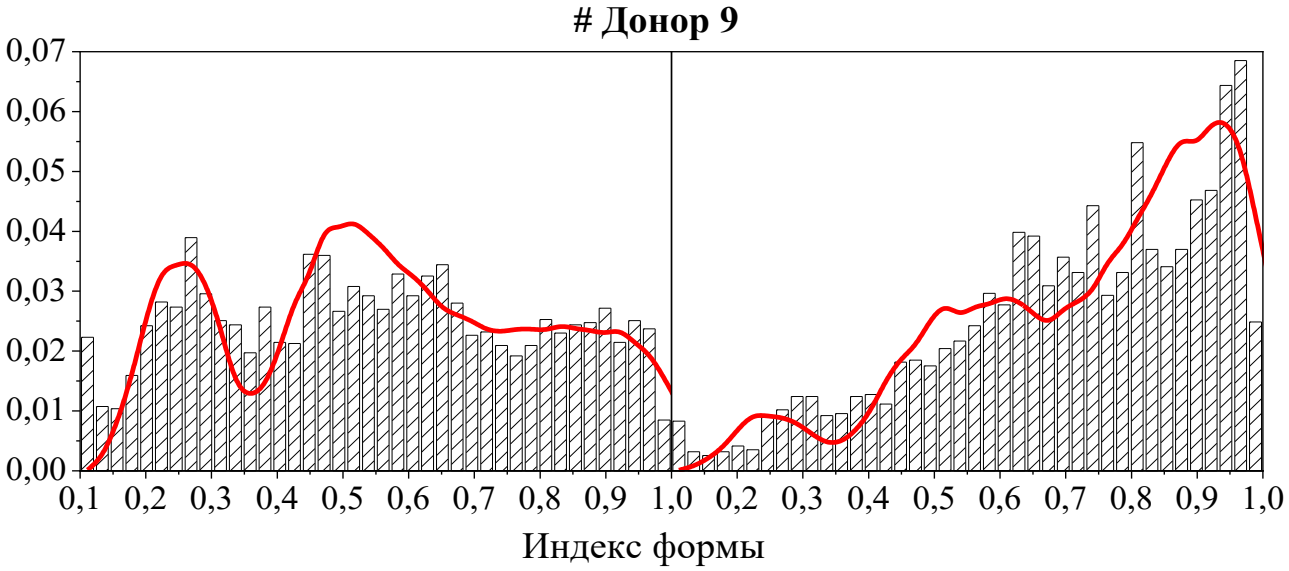

Рисунок 23 Пример поиска параметров чувствительности для донора 9. Красная линия – теоретическая кривая, соответствующая зависимости (24) с оптимальными параметрами, полученными методом Direct. α(АДФ) соответствует зависимости (22). Гистограмма соответствует экспериментально полученному распределению по δ для тромбоцитов, до и после воздействия $АДФ_{ip}$.

В Таблица 10 представлены параметры чувствительности для 9 условно здоровых доноров. Особый интерес вызывает параметр величины скачка C_{min}, который не удаётся измерить другими методами. Его среднее значение для 9 условно здоровых доноров составляет 0.137±0.011. Внутри выборки, этот параметр может меняться почти в 2 раза. Такой разброс может быть связан с индивидуальными особенностями тромбоцитов конкретного донора, например с изменением жёсткости периферического кольца микротрубочек и/или поверхностного натяжения мембраны, так как для начала изменения формы необходимо нарушение выполнения неравенства, связывающего эти два параметра (1). При построении модели, параметры MPS-ADP и PSDW-ADP задают распределение тромбоцитов по чувствительности к АДФ. Величина вышеуказанных параметров определяет степень эффективного воздействия АДФ на популяцию тромбоцитов. Среднее значение для 9 условно здоровых доноров для этих параметров составляет 16.15±0.12 и 0.348±0.015 соответственно. Изменение значений параметра чувствительности для

доноров происходит предположительно в случае применения антитромбоцитарной терапии, блокирующей воздействие АДФ.

Параметр $АДФ_{eff}$ между донорами варьируется почти в 10 раз, несмотря на одинаковый протокол работы с пробой после забора крови. Такой высокий разброс может быть связан с особенностями выполнения забора пробы, которые в реальности очень трудно стандартизировать, при выполнении этой процедуры разными людьми. Это говорит о важности учёта влияния преаналитических манипуляций в работе с тромбоцитами.

Параметры MPSI-MIN, PSIDW-MIN при построении модели, были связаны с состоянием популяции тромбоцитов до любого воздействия. Различия в этих параметрах между донорами могут быть связаны с индивидуальными особенностями доноров, например, с повышением жёсткости мембраны тромбоцитов у конкретного человека. Параметры MPSI-MAX, PSIDW-MAX, LT-MAX показывают максимально возможное активированное состояние популяции тромбоцитов. Предположительно, эти параметры могут быть связаны с средним количеством ионов Ca^{2+} в популяции тромбоцитов. Недостаток или широкий разброс содержания ионов Ca^{2+} между тромбоцитами в одной популяция, предположительно может проявиться в смещении параметров. Проверка предложенных гипотез требует, исследования большего количества доноров, а также исследования пациентов с различными заболеваниями.

Таблица 10 Параметры чувствительности тромбоцитов для 9 условно здоровых доноров.

	MPSI-MAX	**PSIDW-MAX**	**LT-MAX**	**MPSI-MIN**	**PSIDW-MIN**	C_{min}	$ADP_{eff}*10^{-9}$	**MPS-ADP**	**PSDW-ADP**
1	0.991 ± 0.005	0.22	0.59 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.32	0.074 ± 0.019	5.8 ± 1.4	16.519 ± 0.004	0.42
2	0.997 ± 0.005	0.19	0.73 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.3	0.110 ± 0.016	18.2 ± 0.7	16.04 ± 0.04	0.41
3	0.966 ± 0.009	0.13	0.72 ± 0.03	0.408 ± 0.009	0.21	0.12 ± 0.02	57 ± 2	15.51 ± 0.01	0.37
4	0.983 ± 0.005	0.15	0.71 ± 0.09	0.37 ± 0.04	0.23	0.12 ± 0.04	26 ± 3	15.7 ± 0.1	0.34
5	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
6	0.990 ± 0.005	0.21	0.716 ± 0.018	0.309 ± 0.012	0.18	0.146 ± 0.012	9.97 ± 0.06	16.382 ± 0.007	0.34
7	0.982 ± 0.005	0.17	0.726 ± 0.017	0.251 ± 0.012	0.13	0.16 ± 0.02	18.8 ± 0.2	16.318 ± 0.003	0.31

	MPSI-MAX	PSIDW-MAX	LT-MAX	MPSI-MIN	PSIDW-MIN	C_{min}	$ADP_{eff}*10^{-9}$	MPS-ADP	PSDW-ADP
8	0.995 ± 0.005	0.19	0.70 ± 0.02	0.275 ± 0.005	0.21	0.193 ± 0.011	10.6± 0.2	16.366 ± 0.002	0.28
9	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 – мода, ширина и левая граница плотности вероятности бета распределения, которой принадлежит максимально возможный индекс формы для каждого тромбоцита, MPSI-MIN и PSIDW-MIN – мода и ширина плотности вероятности бета распределения, которой принадлежит индекс формы 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 ADP_{eff} концентрация АДФ, эквивалентная по воздействию процедуре забора пробы.

6.4 Влияние антитромбоцитарной терапии на чувствительность популяции тромбоцитов к агонисту активации

Тромбоциты обладают высокой чувствительностью как к агонистам активации, так и к изменениям характеристик потока. Это позволяет этим форменным элементам крови выполнять своим основные функции. В процессе развития заболеваний сердечно-сосудистой системы происходят изменение как в работе системы кровообращения, так и в работе системы гемостаза, а также в работе тромбоцитов. Стратегии лечения нарушений в системе кровообращения включают в себя применение препаратов, значительно снижающих естественные способности тромбоцитов к активации и агрегации. Неправильный подбор терапии может приводить как к геморрагическим осложнениям, так и к тромботическим. Именно поэтому важно отслеживать состояния системы гемостаза, и тромбоцитов в том числе, при проблемах с сердечно-сосудистой системой и при применении антитромбоцитарных препаратов.

Основные вещества, применяемые при антитромбоцитарной терапии описаны в разделе 1.6. Остановимся на исследовании двух наиболее популярных веществ, оказывающих влияния на тромбоциты и применяемых при лечении заболеваний, связанных с сердечно-сосудистой системой: ацетилсалициловая кислота (АСК) и клопидогрел [97]. Эти антитромбоцитарные препараты оказывают воздействие на два, непересекающихся между собой каскада активации тромбоцитов.

Исследование проводилось для двух условно здоровых доноров, с их полного согласия и под контролем квалифицированного врача. На первом этапе проводилось измерение чувствительности тромбоцитов к АДФ, до применения терапии. После, назначался короткий курс (3 дня приёма), одного из веществ, в профилактических дозах (по 75мг один раз в сутки), и проводилось повторное измерение чувствительности тромбоцитов.

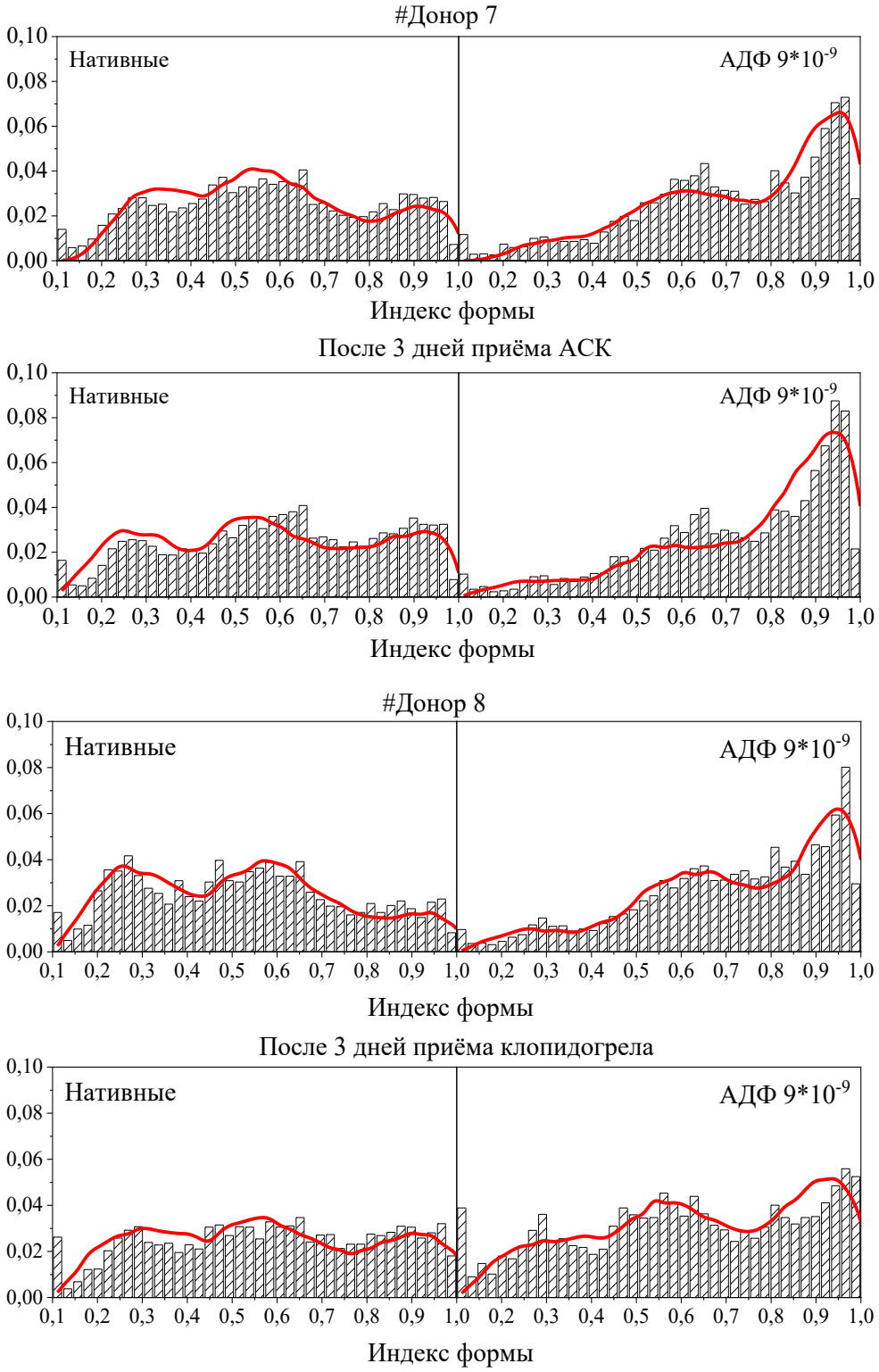

Рисунок 24 Распределения тромбоцитов до и после приёма антиагрегантной терапии. Красная линия – теоретическая кривая, соответствующая зависимости (24) с оптимальными параметрами, полученными методом Direct. Гистограмма соответствует экспериментально полученному распределению по δ для тромбоцитов, до и после воздействия $АДФ_{ip}$.

Таблица 11 Параметры чувствительности популяций тромбоцитов для двух условно здоровых доноров до и после применения препаратов.

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

На Рисунок 24 представлены экспериментальные распределения тромбоцитов в нативном состоянии, после воздействия агониста активации, до и после приёма донорами антитромбоцитарной терапии. В Таблица 11 представлены параметры чувствительности популяций тромбоцитов до и после приёма АСК или клопидогрела соответственно. Основные различия заметны в параметре MPS-ADP. Этот параметр характеризует значение чувствительности к активатору. При применении АСК значение параметра увеличивается, что говорит о его большей чувствительности к АДФ. При применении клопидогрела значение параметра уменьшается, что говорит о снижении его чувствительности к АДФ. В случае применения клопидогрела, такое поведение ожидаемо, так как этот препарат блокирует один из двух рецепторов к АДФ на поверхности тромбоцита, и тем самым способствует подавлению индуцированной активации. В случае с АСК такое поведение остаётся неясным.

Также для донора, принимавшего клопидогрел наблюдается уменьшение параметра C_{min}. В данной ситуации это предположительно связано не с изменением значения скачка, а с изменением чувствительности к агонисту активации. Тромбоциты с изначально малым индексом формы преодолевают необходимый скачок, но не могут продолжить изменять свою форму из-за уменьшенной чувствительности к АДФ, что приводит к уширению максимально возможного индекса формы (увеличению параметра PSIDW-MAX).

Уменьшение чувствительности тромбоцитов к АДФ, при применении клопидогрела, косвенно доказывает адекватность интерпретации параметра MPS-ADP, и демонстрирует потенциальную применимость описанной модели при оценке эффективности применения антитромбоцитарной терапии.

6.5 Обсуждение результатов главы 6

Глава 6 посвящена получению экспериментальных подтверждений эффектов и моделей, описанных в Глава 3, Глава 4 и Глава 5. В начале главы, экспериментальными измерениями, подтверждён эффект смещения индекса формы в меньшие значения для активированных тромбоцитов при решении обратной задачи светорассеяния, с использованием оптической модели «сплюснутый сфероид». Для этого было проведено измерение пробы тромбоцитов одновременно на двух длинах волн, и для каждого из полученных сигналов, решена обратная задача светорассеяния. Для длины волны 0.405 мкм эффект проявляется в смещении решений в область малых индексов формы, относительно решений для длины волны 0.66 мкм, как и ожидалось.

В продолжении раздела, приведён способ идентификации тромбоцитов, соответствующих модели «сплюснутый сфероид». При отделении тромбоцитов, не соответствующих модели «сплюснутый сфероид», для длины волны 0.66 мкм параметры распределения по индексу формы изменяются незначительно, что позволяет пренебречь этим в распределении тромбоцитов, плохо соответствующих оптической модели, и использовать длину волны 0.66 мкм в качестве длины волны основного освещения, для последующих экспериментов.

Далее, в главе описано исследование нативных тромбоцитов для 20 условно здоровых доноров. Полученные распределения тромбоцитов, гетерогенны по индексу формы. Пользуясь теоретической функцией распределения тромбоцитов по индексу формы, построенной в разделе 4.2, был определён фракционный состав популяции тромбоцитов для каждого донора. Среднее значение моды субпопуляции неактивированных тромбоцитов составляет 0.331± 0.009, частично активированных тромбоцитов составляет 0.599 ± 0.017, полностью активированных тромбоцитов составляет 0.894±0.005. Значения взвешенной дисперсии для мод субпопуляции внутри группы составляют 0.09, 0.12 и 0.02 соответственно, что сравнимо с значением взвешенной дисперсии (0.11) для среднего значения распределения по объёму тромбоцитов, используемого в медицинской практике.

После этого, в главе представлен результат измерения чувствительности тромбоцитов к АДФ, для 9 условно здоровых доноров. Для определения чувствительности используется феноменологическая модель изменения индекса формы тромбоцитов под воздействием АДФ, описанная в Глава 5. В качестве экспериментального сигнала одновременно использовались нативное распределение по индексу формы и распределение, непосредственно возникающее после воздействия малой концентрации АДФ. Особый интерес вызывает параметр величины скачка C_{min}, который в работах других авторов был введён теоретически, но не был экспериментально измерен ранее. Среднее значение для 9 условно здоровых доноров составило 0.137±0.011.

В завершении главы, автором экспериментально установлено, что применение антиагрегантной терапии приводит к изменению чувствительности популяции тромбоцитов к агонисту активации. При этом, применение АСК приводит к увеличению параметра чувствительности, а применение клопидогрела приводит к снижению чувствительности к АДФ, в сравнении с результатами, полученными до проведения терапии, у этих доноров. Результаты применения АСК являются неожиданными и требуют дальнейшего, более детального исследования. Уменьшение чувствительности к АДФ, при применении клопидогрела, является ожидаемым и доказывает адекватность интерпретации параметра MPS-ADP.

Заключение

Диссертационная работа посвящена разработке математического описания распределения тромбоцитов по индексу формы и исследованию эволюции этого распределения под воздействием агониста активации. Для получения распределения тромбоцитов по индексу формы проводилось измерение этого параметра для большого количества одиночных тромбоцитов. В качестве метода, позволяющего исследовать формы одиночных тромбоцитов, в работе выбран метод сканирующей проточной цитометрии. Для получения параметров формы из сигнала светорассеяния необходимо решить обратную задачу светорассеяния, что требует знаний о оптической модели, исследуемой частицы. Для тромбоцитов, наиболее популярной оптической моделью является модель «сплюснутый сфероид». Эта модель хорошо подходит для описания тромбоцитов в нативном состоянии, однако не учитывает особенностей формы тромбоцита в активированном состоянии. В рамках работы показан эффект уменьшения параметра формы тромбоцита, проявляющийся при приближении формы тромбоцита в активированном состоянии, моделью «сплюснутый сфероид», как теоретически, так и экспериментально, и описаны условия, при которых этот эффект проявляется.

Для нативных тромбоцитов, измеренных на сканирующем проточном цитометре, впервые была показана гетерогенность популяции по параметру формы, и предложен метод описания этой гетерогенности. Пользуясь предложенным методом, удалось выделить три субпопуляции в каждой измеренной нативной пробе тромбоцитов и получить параметры этих субпопуляции.

При воздействии на пробу тромбоцитов агонистом активации АДФ гетерогенность по параметру формы сохраняется, но значительно изменяется количество тромбоцитов, принадлежащих разным субпопуляциям. Пользуясь информации о биохимических процесса, приводящих к изменению формы тромбоцитов в процессе активации, в рамках работы была построена феноменологическая модель ак-

тивации тромбоцитов. Эта модель включает в себя не только информацию о субб-популяциях полностью неактивированных и полностью активированных тромбоцитов, с точки зрения формы, но и параметры чувствительности тромбоцитов к агонисту активации. Благодаря введению параметров чувствительности, впервые удалось объяснить появление частично активированной популяции тромбоцитов, которая экспериментально наблюдается, как в нативных пробах, так и в пробах под воздействием агониста активации.

В завершении работы, было показано уменьшение значения параметра чувствительности к АДФ (MPS-ADP) для популяции тромбоцитов донора, принимавшего антитромбоцитарную терапию (клопидогрел), направленную на подавление активации тромбоцитов, индуцированной АДФ. Это доказывает адекватность разработанной феноменологической модели и показывает ценность разработанного подхода для исследования воздействия различных факторов (применение препаратов, патологии системы кровообращения, консервация тромбоцитарной массы) на популяцию тромбоцитов.

Из основных результатов работы, можно выделить следующие:

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±1.8 до 2.31±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±0.006, частично активированных тромбоцитов составляет 0.599±0.019, полностью активированных тромбоцитов составляет 0.892±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.

Список сокращений и условных обозначений

– PLC_{β} фосфолипазы C_{β}
– PIP_2 фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат
– IP_3 инозитол-1,4,5-трифосфата
– DAG диацилглицерина
– PKC протеинкиназу C
– АДФ Аденозиндифосфат
– $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ основные рецепторы к АДФ
– GPVI рецептор к коллагену
– PLCγ2 фосфолипаза Cγ2
– cAMP циклический аденозинмонофосфат
– cGMP циклический гуанинмонофосфат
– τ напряжение сдвига
– υ – скорость
– r – расстояние от стенки, на котором определяется напряжение
– ω – коэффициент динамической вязкости
– γ – сдвиговая скорость
– $x = \frac{\pi n_{cp} d}{\lambda}$ размерный параметр
– d – максимальный размер частицы
– λ – длина волны освещения
– n – показатель преломления объекта
– n_{cp} – показатель преломления среды
– m – относительный показатель преломления
– $\rho_0 = 2x(m-1)$ – параметр фазового сдвига
– S(ζ) – функция отличий
– P(ζ) – вероятность, что исходный сигнал или распределение облает параметрами ζ
– ζ – вектор параметров исходного объекта / распределения
– COX_1 – Циклооксигеназа 1
– АСК – Ацетилсалициловая кислота
– PAR_1 и PAR_4 – рецепторы, активируемые протеиназой для тромбина
– ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

– $I(\beta)$ – индикатриса светорассеяния
– β – угол рассеяния
– S_{ij} – соответствующий элемент матрицы Мюллера
– F_1 и F_2 – силы давления
– F_τ – сила вязкого трения
– p–давление
– l–длина цилиндра
– Q – расход
– V – объём
– t – время поворота шагового двигателя на один шаг
– D – диаметр сферы с объёмом, равным объёму моделируемого тромбоцита
– $\xi = a/b$ – отношение полуосей
– δ – индекс формы тромбоцита
– $СКО_{отн}$ – относительное среднеквадратичное отклонение
– MPV – среднее значение распределения по объёму
– PDW – ширина распределения по объёму
– μ – математическое ожидание
– σ – дисперсия
– k, θ – параметры гамма распределения
– M_0 – мода распределения
– φ, χ – параметры бета распределения
– w – ширина бета функции на половине высоты
– MPSI-R, PSIDW-R мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей неактивированную субпопуляцию тромбоцитов
– %PR – процент неактивированных тромбоцитов
– MPSI-PA, PSIDW-PA – мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей частично активированную субпопуляцию тромбоцитов
– %PFA процент активированных тромбоцитов
– MPSI-FA, PSIDW-FA – мода и ширина плотности вероятности бета распределения, описывающей полностью активированную субпопуляцию тромбоцитов
– η_a, % – суммарный процент активированных тромбоцитов
– PLT – концентрация тромбоцитов
– S – чувствительность тромбоцита к агонисту активации
– δ_0 – начальный индекс формы одиночного тромбоцита

– δ_{max} – максимально возможный индекс формы одиночного тромбоцита
– C_{min} – величина скачка по δ, необходимого для начала изменения формы тромбоцита
– α(АДФ) – добавка к индексу формы за счёт воздействия АДФ
– *H* – функция Хевисайда
– MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина плотности вероятности бета распределения, которому принадлежит δ_0
– MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX - среднее значение, ширина и левая граница плотности вероятности бета распределения, которому принадлежит δ_{max}
– MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина логорифма распределения чувствительности S к АДФ
– $АДФ_{eff}$ – концентрация АДФ, эквивалентная влиянию процедуры подготовки и измерения пробы
– $АДФ_{ip}$ – концентрация АДФ добавленная в нативную пробу

Список литературы

1. Агаджанян Н.А.Нормальная физиология / Н. А. Агаджанян, В. М. Смирнов – Москва: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2009.

2. Hoffman M. A Cell-based Model of Hemostasis / Hoffman M., Iii D.M.M. // Thrombosis and Haemostasis – 2001. – Vol. 85 – № 6 – P.958–965.

3. Korniluk A. Mean Platelet Volume (MPV): New Perspectives for an Old Marker in the Course and Prognosis of Inflammatory Conditions / Korniluk A., Koper-Lenkiewicz O.M., Kamińska J., Kemona H., Dymicka-Piekarska V. // Mediators of Inflammation – 2019. – P.9213074.

4. Mohandas N. Accurate and independent measurement of volume and hemoglobin concentration of individual red cells by laser light scattering / Mohandas N., Kim Y.R., Tycko D.H., Orlik J., Wyatt J., Groner W. // Blood – 1986. – Vol. 68 – № 2 – P.506–513.

5. Riondino S. Collagen-induced platelet shape change is not affected by positive feedback pathway inhibitors and cAMP-elevating agents / Riondino S., Lotti L.V., Cutini L., Pulcinelli F.M. // The Journal of Biological Chemistry – 2005. – Vol. 280 – № 8 – P.6504–6510.

6. Le Minh G. Differential sensitivity of various markers of platelet activation with adenosine diphosphate / Le Minh G., Peshkova A.D., Andrianova I.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. // BioNanoScience – 2019. – Vol. 9 – № 1 – P.53–58.

7. Moskalensky A.E. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering / Moskalensky A.E., Yurkin M.A., Konokhova A.I., Strokotov D.I., Nekrasov V.M., Chernyshev A.V., Tsvetovskaya G.A., Chikova E.D., Maltsev V.P. // Journal of biomedical optics – 2013. – Vol. 18 – № 1 – P.017001–017001.

8. Purvis J.E. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation / Purvis J.E., Chatterjee M.S., Brass L.F., Diamond S.L. // Blood – 2008. – Vol. 112 – № 10 – P.4069–4079.

9. Team of core ADDA developers// GitHub [Электронный ресурс]. URL: https://github.com/adda-team (accessed: 13.03.2022).

10. Machlus K.R. 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 25–46p.

11. Josefsson E.C. Chapter 3 - The Regulation of Platelet Life Span / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 51–65p.

12. Diagouraga B. Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation / Diagouraga B., Grichine A., Fertin A., Wang J., Khochbin S., Sadoul K. // The Journal of Cell Biology – 2014. – Vol. 204 – № 2 – P.177–185.

13. Barkalow K.L. Dynamics of the platelet cytoskeleton / ed. C.P. Page, J. Vermylen, P. Gresele, V. Fuster. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. – 93–103p.

14. Sheriff J. High-shear stress sensitizes platelets to subsequent low-shear conditions / Sheriff J., Bluestein D., Girdhar G., Jesty J. // Annals of Biomedical Engineering – 2010. – Vol. 38 – № 4 – P.1442–1450.

15. Slaba I. Platelets and Immunity / ed. P. Gresele, N.S. Kleiman, J.A. Lopez, C.P. Page. Cham: Springer International Publishing, 2017. – 489–512p.

16. Li Z. 30 - The Role of Platelets in Tumor Growth, Metastasis, and Immune Evasion / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 547–561p.

17. Hoffman M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis / Hoffman M., Monroe D.M. // Hematology/Oncology Clinics of North America – 2007. – Vol. 21 – № 1 – P.1–11.

18. Brass L.F. Chapter 19 - Signal Transduction During Platelet Plug Formation / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 367–398p.

19. Frojmovic M.M. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. / Frojmovic M.M., Panjwani R. // Biophysical Journal – 1976. – Vol. 16 – № 9 – P.1071–1089.

20. Chesnutt J.K.W. Platelet size and density affect shear-induced thrombus formation in tortuous arterioles / Chesnutt J.K.W., Han H.-C. // Physical biology – 2013. – Vol. 10 – № 5 – P.056003.

21. 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: The Journal of the International Society for Analytical Cytology – 2016. – Vol. 89 – № 11 – P.1010–1016.

22. Thomas S.G. 3 - The Structure of Resting and Activated Platelets / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 47–77p.

23. Hartwig J.H. Chapter 8 - The Platelet Cytoskeleton / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 145–168p.

24. Patel-Hett S. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules / Patel-Hett S., Richardson J.L., Schulze H., Drabek K., Isaac N.A., Hoffmeister K., Shivdasani R.A., Bulinski J.C., Galjart N., Hartwig J.H., Joseph E. Italiano J. // Blood – 2008. – Vol. 111 – № 9 – P.4605–4616.

25. White J.G. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape / White J.G., Rao G.H. // The American journal of pathology – 1998. – Vol. 152 – № 2 – P.597–609.

26. 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.

27. Hisanaga S. Calmodulin interaction with cytoplasmic and flagellar dynein: calcium-dependent binding and stimulation of adenosine triphosphatase activity / Hisanaga S., Pratt M.M. // Biochemistry – 1984. – Vol. 23 – № 13 – P.3032–3037.

28. Vinogradova M.V. Structure of the complex of a mitotic kinesin with its calcium binding regulator / Vinogradova M.V., Malanina G.G., Reddy A.S.N., Fletterick R.J. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2009. – Vol. 106 – № 20 – P.8175–8179.

29. Karr T.L. Calcium ion induces endwise depolymerization of bovine brain microtubules. / Karr T.L., Kristofferson D., Purich D.L. // Journal of Biological Chemistry – 1980. – Vol. 255 – № 24 – P.11853–11856.

30. O’Brien E.T. How calcium causes microtubule depolymerization / O’Brien E.T., Salmon E.D., Erickson H.P. // Cell Motility and the Cytoskeleton – 1997. – Vol. 36 – № 2 – P.125–135.

31. Kenney D.M. Ionophore-induced disassembly of blood platelet microtubules: effect of cyclic AMP and indomethacin / Kenney D.M., Chao F.C. // Journal of cellular physiology – 1980. – Vol. 103 – № 2 – P.289–298.

32. Steiner M. Quantitative Assessment of Polymerized and Depolymerized Platelet Microtubules / Steiner M., Ikeda Y. // Journal of Clinical Investigation – 1979. – Vol. 63 – № 3 – P.443–448.

33. Daniel J.L. Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response / Daniel J.L., Molish I.R., Rigmaiden M., Stewart G. // The Journal of Biological Chemistry – 1984. – Vol. 259 – № 15 – P.9826–9831.

34. Hartwig J.H. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. / Hartwig J.H. // Journal of Cell Biology – 1992. – Vol. 118 – № 6 – P.1421–1442.

35. 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.

36. Hartwig J.H. Chapter 4 - The platelet cytoskeleton / ed. A.D. Michelson. Burlington: Academic Press, 2007. – 75–97p.

37. Maurer-Spurej E. Room temperature activates human blood platelets / Maurer-Spurej E., Pfeiler G., Maurer N., Lindner H., Glatter O., Devine D.V. // Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology – 2001. – Vol. 81 – № 4 – P.581–592.

38. Shea S.M. The effect of platelet storage temperature on haemostatic, immune, and endothelial function: potential for personalised medicine / Shea S.M., Thomas K.A., Spinella P.C. // Blood Transfusion – 2019. – Vol. 17 – № 4 – P.321–330.

39. Rumjantseva V. Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets / Rumjantseva V., Hoffmeister K.M. // Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis – 2010. – Vol. 42 – № 1 – P.63–70.

40. Egidi M.G. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics / Egidi M.G., D’Alessandro A., Mandarello G., Zolla L. // Blood Transfusion – 2010. – Vol. 8 – № 3 – P.73–81.

41. Faraday N. In Vitro Hypothermia Enhances Platelet GPIIb-IIIa Activation and P-Selectin Expression / Faraday N., Rosenfeld B. // Anesthesiology – 1998. – Vol. 88 – № 6 – P.1579–1585.

42. Mindukshev I. Platelet Hemostasis Reactions at Different Temperatures Correlate with Intracellular Calcium Concentration / Mindukshev I., Fock E., Dobrylko I., Sudnitsyna J., Gambaryan S., Panteleev M.A. // International Journal of Molecular Sciences – 2022. – Vol. 23 – № 18 – P.10667.

43. Fedosov D.A. Multiscale modeling of blood flow: from single cells to blood rheology / Fedosov D.A., Noguchi H., Gompper G. // Biomechanics and Modeling in Mechanobiology – 2014. – Vol. 13 – № 2 – P.239–258.

44. Vahidkhah K. Platelet Dynamics in Three-Dimensional Simulation of Whole Blood / Vahidkhah K., Diamond S.L., Bagchi P. // Biophysical Journal – 2014. – Vol. 106 – № 11 – P.2529–2540.

45. Li L. Quantifying Shear-induced Margination and Adhesion of Platelets in Microvascular Blood Flow / Li L., Wang S., Han K., Qi X., Ma S., Li L., Yin J., Li D., Li X., Qian J. // Journal of Molecular Biology – 2023. – Vol. 435 – № 1 – P.167824.

46. Rack K. Margination and stretching of von Willebrand factor in the blood stream enable adhesion / Rack K., Huck V., Hoore M., Fedosov D.A., Schneider S.W., Gompper G. // Scientific Reports – 2017. – Vol. 7 – № 1 – P.14278.

47. Kroll M.H. Platelets and shear stress / Kroll M.H., Hellums J.D., McIntire L.V., Schafer A.I., Moake J.L. // Blood – 1996. – Vol. 88 – № 5 – P.1525–1541.

48. Ilkan Z. Evidence for shear-mediated Ca2+ entry through mechanosensitive cation channels in human platelets and a megakaryocytic cell line / Ilkan Z., Wright J.R., Goodall A.H., Gibbins J.M., Jones C.I., Mahaut-Smith M.P. // The Journal of Biological Chemistry – 2017. – Vol. 292 – № 22 – P.9204–9217.

49. Clemetson K.J. Chapter 9 - Platelet Receptors / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 169–194p.

50. Han X. 13 - Protease-Activated Receptors / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 243–257p.

51. Cattaneo M. 14 - The Platelet P2 Receptors / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 259–277p.

52. Cattaneo M. CHAPTER 10 - The Platelet P2 Receptors / ed. A.D. Michelson. Burlington: Academic Press, 2007. – 201–220p.

53. Potekhina Y.. Collagen Structure and Function / Potekhina Y.. // Russian Osteopathic Journal – 2016. – № 1–2 – P.87–99.

54. K M Prakash Lingam Kinetic Modeling of Thrombin Induced and Collagen Induced Platelet Aggregation Pathway–A System Biology Approach / K M Prakash Lingam, Venugopal K R, L M Patnaik – 2011. – Vol. 1 – № 3 – P.184–191.

55. Lanza F. Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent / Lanza F., Beretz A., Stierlé A., Hanau D., Kubina M., Cazenave J.P. // The American Journal of Physiology – 1988. – Vol. 255 – № 6 Pt 2 – P.H1276-1288.

56. Patrono C. 50 - Aspirin / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 921–936p.

57. Cattaneo M. Chapter 54 - ADP Receptor Antagonists / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 1117–1138p.

58. Tricoci P. 53 - PAR-1 Antagonists / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 973–977p.

59. Bavry A.A. Chapter 55 - αIIbβ3 (GPIIb-IIIa) Antagonists / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 1139–1153p.

60. Gurbel P.A. 54 - Phosphodiesterase Inhibitors / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2019. – 979–989p.

61. Berndt M.C. A Brief History of Blood Platelets: A Personal View / ed. P. Gresele, N.S. Kleiman, J.A. Lopez, C.P. Page. Cham: Springer International Publishing, 2017. – 3–9p.

62. Козловский В.И. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию / Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П., Детковская И.Н., Козловский И.В. // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2013. – Т. 13 – № 4.

63. Paulus J. Platelet size in man / Paulus J. // Blood – 1975. – Vol. 46 – № 5 – P.321–336.

64. Sakurai Y. A microengineered vascularized bleeding model that integrates the principal components of hemostasis / Sakurai Y., Hardy E.T., Ahn B., Tran R., Fay M.E., Ciciliano J.C., Mannino R.G., Myers D.R., Qiu Y., Carden M.A., Baldwin W.H., Meeks S.L., Gilbert G.E., Jobe S.M., Lam W.A. // Nature Communications – 2018. – Vol. 9 – № 1 – P.509.

65. Diagouraga B. Motor-driven marginal band coiling promotes cell shape change during platelet activation / Diagouraga B., Grichine A., Fertin A., Wang J., Khochbin S., Sadoul K. // The Journal of Cell Biology – 2014. – Vol. 204 – № 2 – P.177–185.

66. White J.G. CHAPTER 3 - Platelet Structure / ed. A.D. Michelson. Burlington: Academic Press, 2007. – 45–73p.

67. Coulter W.H. Means for counting particles suspended in a fluid / Coulter W.H. – 1953.

68. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / Born G.V. // Nature – 1962. – Vol. 194 – P.927–929.

69. Born G.V.R. Observations on the Change in Shape of Blood Platelets Brought About by Adenosine Diphosphate / Born G.V.R. // The Journal of Physiology – 1970. – Vol. 209 – № 2 – P.487–511.

70. Hayward C.P.M. Chapter 28 - Platelet Aggregation / ed. A.D. Michelson. Academic Press, 2013. – 559–580p.

71. Harrison P. Testing Platelet Function / Harrison P., Lordkipanidzé M. // Hematology/Oncology Clinics – 2013. – Vol. 27 – № 3 – P.411–441.

72. Wang L. Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry / Wang L., Hoffman R.A. // Current Protocols in Cytometry – 2017. – Vol. 79 – P.1.3.1-1.3.27.

73. Paniccia R. Platelet function tests: a comparative review / Paniccia R., Priora R., Alessandrello Liotta A., Abbate R. // Vascular Health and Risk Management – 2015. – Vol. 11 – P.133–148.

74. Sbrana S. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation / Sbrana S., Della Pina F., Rizza A., Buffa M., De Filippis R., Gianetti J., Clerico A. // Cytometry Part B: Clinical Cytometry – 2008. – Vol. 74B – № 1 – P.30–39.

75. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis / Maltsev V.P. // Review of Scientific Instruments – 2000. – Vol. 71 – № 1 – P.243–255.

76. Mishchenko M.Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles / M. Mishchenko, L. Travis, A. Lacis – Cambridge: Cambridge University Press, 2002.– 496p.

77. Юркин М.А. Моделирование светорассеяния клетками крови с помощью метода дискретных диполей / Юркин М.А. – 2008. – С.231.

78. Минашина И.К. Обзор методов многомерной оптимизации / Минашина И.К., Захарова Е.М. – Т. 14 – № 3 – С.256–274.

79. Jones D.R. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant / Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. // Journal of Optimization Theory and Applications – 1993. – Vol. 79 – № 1 – P.157–181.

80. Maltsev V.P. Characterisation of Bio-Particles from Light Scattering De Gruyter, 2013. – 139p.

81. 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.

82. Дуплякин Е.О. Исследование взаимосвязи между оптическими характеристиками тромбоцитов человека и их агрегационной и адгезионной активностью / Дуплякин Е.О. – 2005. – С.90.

83. Favaloro E.J. Preanalytical and Postanalytical Variables: The Leading Causes of Diagnostic Error in Hemostasis? / Favaloro E.J., Lippi G., Adcock D.M. // Seminars in Thrombosis and Hemostasis – 2008. – Vol. 34 – № 07 – P.612–634.

84. Harrison P. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function / Harrison P., Mackie I., Mumford A., Briggs C., Liesner R., Winter M., Machin S., British Committee for Standards in Haematology // British Journal of Haematology – 2011. – Vol. 155 – № 1 – P.30–44.

85. Söderström A.C. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation / Söderström A.C., Nybo M., Nielsen C., Vinholt P.J. // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine – 2016. – Vol. 54 – № 12 – P.1913–1920.

86. Ahnadi C.E. Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy / Ahnadi C.E., Chapman E.S., Lépine M., Okrongly D., Pujol-Moix N., Hernández A., Boughrassa F., Grant A.M. // Thrombosis and Haemostasis – 2003. – Vol. 90 – № 5 – P.940–948.

87. Topalov N.N. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation / Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Panteleev M.A. // British Journal of Haematology – 2012. – Vol. 157 – № 1 – P.105–115.

88. Mouthuy P.-O. Overcurvature describes the buckling and folding of rings from curved origami to foldable tents / Mouthuy P.-O., Coulombier M., Pardoen T., Raskin J.-P., Jonas A.M. // Nature Communications – 2012. – Vol. 3 – P.1290.

89. Strokotov D.I. Polarized light-scattering profile—advanced characterization of non-spherical particles with scanning flow cytometry / Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Nekrasov V.M., Maltsev V.P. // Cytometry Part A – 2011. – Vol. 79A – № 7 – P.570–579.

90. Schuh Roman Arbitrary particle shape modeling in DDSCAT and validation of simulation results. / Schuh Roman – 2007. – P.22–24.

91. Sveshnikova A.N. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1 / Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. // Molecular bioSystems – 2015. – Vol. 11 – № 4 – P.1052–1060.

92. Born G.V.R. Observations on the Change in Shape of Blood Platelets Brought About by Adenosine Diphosphate / Born G.V.R. // The Journal of Physiology – 1970. – Vol. 209 – № 2 – P.487–511.

93. Dmitrieff S. Balance of microtubule stiffness and cortical tension determines the size of blood cells with marginal band across species / Dmitrieff S., Alsina A., Mathur A., Nédélec F.J. // Proceedings of the National Academy of Sciences – 2017. – Vol. 114 – № 17 – P.4418–4423.

94. 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.

95. Purvis J.E. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation / Purvis J.E., Chatterjee M.S., Brass L.F., Diamond S.L. // Blood – 2008. – Vol. 112 – № 10 – P.4069–4079.

96. 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.

97. Литвиненко А.Л. Оценка чувствительности тромбоцитов крови человека к агонисту активации 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 – Т. 7 – № 2 – С.286–292.