

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К АГОНИСТУ АКТИВАЦИИ АДЕНОЗИНДИФОСФАТУ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИТРОМБОЦИТАРНОЙ ТЕРАПИИ.

Литвиненко А.Л., Некрасов В.М., Четвертак Е.В., Мальцев В.П.

Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского
ул. Институтская, 3, г. Новосибирск, 630090, РФ; e-mail: roseline.neolis@gmail.com
Поступила в редакцию 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0516

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующее место среди причин смертности населения. Основные осложнения течения заболевания этой группы тесно связаны с изменением в работе системы гемостаза, в том числе её тромбоцитарного звена. Для предотвращения развития осложнений, связанных с нарушениями в работе системы гемостаза, применяется антитромбоцитарная терапия. В данной работе рассматривается поведение популяции тромбоцитов условно здоровых доноров до и после применения двух основных типов терапевтических агентов: ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела. С использованием метода сканирующей проточной цитометрии производилось измерение индекса формы одиночных тромбоцитов с последующим построением распределений по данной характеристике для проб в нативном состоянии и после воздействия малого количества аденозиндифосфата - агониста активации. По изменению в распределениях индекса формы оценивается чувствительность тромбоцитов к агонисту активации до и после применения краткого курса терапии. По результату оценки пороговое значение начала изменения формы тромбоцитов и чувствительность при применении ацетилсалициловой кислоты увеличились, а при применении клопидогрела уменьшились. Продемонстрированный подход для оценки чувствительности может быть полезен как при оценке степени эффективности, применяемой антитромбоцитарной терапии, так и при диагностике наличия осложнений течения заболеваний сердечно-сосудистой системы со стороны тромбоцитарного звена системы гемостаза.

Ключевые слова: тромбоциты, сканирующая проточная цитометрия, антитромбоцитарная терапия, АДФ.

ВВЕДЕНИЕ

На текущий момент заболевания сердечно-сосудистой системы занимают одно из первых мест в списке причин смертности по статистике ВОЗ, при этом доля смертей, приходящихся на данную причину, возрастает с каждым годом. Основные осложнения течения данных заболеваний связаны с изменениями в работе системы гемостаза. Эта система состоит из набора белков коагуляции, кофакторов и форменных элементов крови — тромбоцитов и системы фибринолиза, которая ответственна за рассасывание тромбов после заживления сосуда. При этом согласно общепринятой модели гемостаза, реакции коагуляции крови протекают преимущественно на поверхности активированного тромбоцита [1]. Также в последние годы было показано, что тромбоциты участвуют в развитии реакции воспаления и распространении метастаз в организме [2,3]. Именно поэтому важно контролировать функциональное состояние тромбоцитов, причём не только во время приёма терапевтических препаратов.

Основной особенностью тромбоцитов является способность к активации, то есть к переходу с состояния, в котором тромбоциты способны слипаться между собой (агрегировать) и образовывать тромб. Процесс активации характеризуется запуском каскада биохимических реакции, приводящих к высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула и росту свободного Ca^{2+} внутри цитозоля [4]. Рост концентрации Ca^{2+} приводит к ряду изменений внутри тромбоцита, в том числе к изменению формы и появлению специфических рецепторов [5]. Используя информацию о состоянии тромбоцитов под воздействием агониста активации, можно оценить их функциональное состояние.

Самым широко используемым методом для исследования функционального состояния системы гемостаза, и тромбоцитов в том числе, является оптическая агрегометрия [6]. Метод основан на исследовании изменения сигнала светопропускания в процессе реакции агрегации. В качестве индукторов агрегации широко используют такие вещества, как тромбин, коллаген, аденозиндифосфат (АДФ), выступающих также и в роли агонистов активации. Однако данный метод оценивает воздействие агониста активации на систему гемостаза в целом, а не только на тромбоциты, что делает его менее чувствительным к малым функциональным изменениям. Другим методом исследования тромбоцитов является метод Култера, который позволяет получать информацию об объёме одиночных клеток [7]. Однако в процессе активации в основном изменяется форма тромбоцитов, а не их объём. Одним из методов, позволяющих определять форму тромбоцитов с высокой скоростью и точностью, является метод сканирующей проточной цитометрии [8]. Ранее была показана применимость данного метода для исследования различных форменных элементов крови [9–11], в том числе и тромбоцитов [12]. С использованием данного метода было показано, что даже нативная проба является более гетерогенной по форме, чем по объёму

[13], а также была продемонстрирована возможность исследования чувствительности тромбоцитов к АДФ для условно здоровых доноров [14]. Основной целью данной работы является определение влияния антитромбоцитарной терапии на чувствительность тромбоцитов к АДФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась венозная кровь двух условно здоровых доноров до и после назначения краткого курса антитромбоцитарной терапии. Процедура забора пробы проводилась в непосредственной близости от измерительного прибора, для исключения влияния процессов транспортировки. Для предотвращения коагуляции крови, забор пробы проводился с одновременным разбавлением физиологическим раствором более чем в 30 раз. Для выделения богатой тромбоцитами плазмы проводилась процедура седиментации в течении от 30 минут до 1 часа с последующим измерением пробы. Для определения воздействия малой дозы АДФ на пробу тромбоцитов непосредственно перед измерением проводилось смешивание богатой тромбоцитами плазмы с АДФ в итоговой концентрации 9×10^{-9} моль/л. В работе использовался АДФ фирмы «Технология–Стандарт», предназначенный для проведения агрегации тромбоцитов.

Для определения состояния тромбоцитов в пробе использовалась технология сканирующей проточной цитометрии [8,12]. В отличие от обычного варианта проточной цитометрии, сканирующая проточная цитометрия способна определять не только наличие или отсутствие флуоресцентных меток на поверхности клеток, но и форму исследуемых объектов. Принцип метода основан на регистрации сигнала светорассеяния в широком угловом диапазоне полярного угла (θ) от одиночных частиц, при этом по азимутальному углу происходит интегрирование сигнала. Итоговую зависимость интенсивности сигнала от угла θ называют индикатрисой светорассеяния. Как и классическая проточная цитометрия, сканирующая проточная цитометрия также позволяет набирать значительную статистику частиц одной пробы в сжатое время, что особенно важно для данной работы.

Для определения параметров измеренной частицы из зарегистрированного сигнала используется один из методов решения обратной задачи светорассеяния, так называемый метод баз данных [12]. Для этого, в рамках заданной оптической модели, заранее рассчитывается набор теоретических сигналов от частиц с известными параметрами и в дальнейшем экспериментальный сигнал сравнивается с данной базой. Параметры максимально подходящего теоретического сигнала по форме и интенсивности считаются параметрами искомой частицы. Для тромбоцитов в качестве оптической модели используется модель сплюснутого сфероида, параметризованная значениями диаметра сферы эквивалентного объёма d и индексов формы δ , характеризующего сплюснутость сфероида и связанного с значениями полуосей (a и b) соотношением $\delta = \frac{2ab}{a^2+b^2}$. Данная модель хорошо описывает как тромбоциты в нативном состоянии, так и в активированном. Также данная оптическая модель включает в себя информацию о показателе преломления и угле ориентации частицы в потоке, необходимую для расчёта сигнала светорассеяния.

В работе исследовалось воздействие двух типов антитромбоцитарной терапии, на основе ацетилсалициловой кислоты (аспирин) и клопидогрела. Данные препараты кардинально отличаются по механизмам воздействия на тромбоциты. Аспирин ингибирует синтез тромбоксана А, который также является агонистом активации, в тромбоците, а метаболит клопидогрела ингибирует связывание АДФ с одним из двух рецепторов тромбоцитов к данному агонисту активации, рецептором P_2Y_{12} , в основном отвечающим за усиление ответа на агонист активации, причём не только АДФ. Перед применением терапии проводилось измерение начального состояния тромбоцитов для каждого из доноров. После этого донору назначался один из препаратов краткими курсами в течении трех дней в профилактической дозе (75 мг), и проводилось повторное измерение распределения тромбоцитов по индексу формы.

Для оценки чувствительности тромбоцитов к агонисту активации АДФ использовалась ранее разработанная феноменологическая модель активации тромбоцитов [14]. Данная модель основана на рассмотрении поведения одиночного тромбоцита в процессе активации, а именно на описании изменения индекса формы δ одиночного тромбоцита, как функции от концентрации добавленного АДФ. В качестве начальной точки берётся индивидуальный начальный индекс формы δ_0 . Из теоретических работ известно, что перестройка периферического кольца микротрубочек, элемента цитоскелета, определяющего форму тромбоцита, происходит через метастабильное состояние формы [15], что свидетельствует о пороговом и скачкообразном характере данного процесса, который в свою очередь проявляется в скачкообразном изменении индекса формы. Значение скачка индекса формы, выраженного в безразмерных единицах, в модели обозначается как S_{\min} . Дальнейший рост индекса формы зависит от индивидуальной чувствительности S рассматриваемого тромбоцита к агонисту активации. В силу рассмотрения малых воздействий со стороны агониста активации (используется концентрация, сравнимая с уровнем АДФ в кровотоке) дальнейший рост индекса формы в зависимости от S и концентрации добавленного АДФ имеет линейный характер. Также в данной модели вводится предположение о наличии максимально возможного индекса формы δ_{\max} для каждого тромбоцита, после достижения которого изменение формы уже не происходит. Таким образом, постулируется следующая зависимость индекса δ отдельного тромбоцита от концентрации АДФ.

Формула зависимости индекса формы отдельного тромбоцита от концентрации АДФ:

$$\delta = \begin{cases} \delta_0 & \text{если } S \times [\text{АДФ}] < C_{\min} \\ \delta_0 + S \times [\text{АДФ}] & \text{если } C_{\min} < S \times [\text{АДФ}] < \delta_{\max} - \delta_0 \\ \delta_{\max} & \text{если } S \times [\text{АДФ}] > \delta_{\max} - \delta_0 \end{cases} \quad (1)$$

Подчеркнем, что в данной зависимости отображен итоговый результат воздействия АДФ на индекс формы δ каждого отдельного тромбоцита, обладающего параметрами $(\delta_0, S, \delta_{\max}, C_{\min})$, и не рассматривается вопрос о кинетике данного процесса для единичного тромбоцита. Такой подход, в частности, связан с тем, что сканирующий проточный цитометр измеряет каждую частицу однократно, в некоторый фиксированный момент времени (индивидуальный для каждой частицы), и не позволяет следить за динамикой изменения индекса формы δ отдельного тромбоцита.

Далее, данная модель может быть обобщена на популяцию тромбоцитов, которые имеют различный набор исходных параметров. Предполагается, что функции распределения по начальному и конечному состояниям (распределение по индексам δ_0 и δ_{\max}) принадлежат симметричным бета распределениям. Данный тип распределений является пиковым и описывается 4 параметрами: центр, ширина пика и две границы распределения. В случае симметричного распределения количество параметров уменьшается до 3 (задание одной из границ определяет другую границу). Ранее сумма трёх распределений данного типа была успешно использована при описании нативных распределений тромбоцитов по индексу формы [13]. Для начального состояния (распределение по δ_0) граница бета распределения слева совпадает с границей экспериментального распределения по индексу формы 0.1, так как тромбоцитов с меньшим индексом формы не существует. Тогда данное распределение задаётся двумя параметрами: центр пика (далее обозначается MPSI-MIN) и ширина пика (обозначается PSIDW-MIN). Для бета распределения по максимальному индексу формы δ_{\max} такое упрощение сделать невозможно, так как, хотя экспериментальное распределение ограничено справа 1 по построению оптической модели, достижение данного значения не означает достижения максимально активированного состояния с точки зрения молекулярных процессов, происходящих внутри тромбоцита. Поэтому распределение по максимально возможному индексу формы описывается тремя параметрами: центр пика (далее обозначается MPSI-MAX), ширина пика (обозначается PSIDW-MAX) и левой границей распределения по δ_{\max} (обозначается LT-MAX).

Пороговое значение C_{\min} выбрано одинаковым для всех тромбоцитов в пробе (отметим, что по построению модели диапазоны параметров выбраны так, что всегда выполняется условие $C_{\min} < \delta_{\max} - \delta_0$). Чувствительность тромбоцитов к агонисту активации S принадлежит логнормальному распределению (MPS-ADP - средний логарифм распределения и PSDW-ADP ширина распределения), так как данный параметр должен быть связан с содержанием Ca^{2+} внутри тромбоцита, концентрация которого внутри тромбоцита зависит от объёма, принадлежащего логнормальному распределению [16]. Таким образом, задав параметры распределений и концентрацию добавленного к пробе АДФ, можно теоретически рассчитать итоговое распределение по индексу формы после воздействия.

Тромбоциты обладают высокой чувствительностью к различным воздействиям, в том числе к механическому воздействию и изменению температуры [17,18]. С этой точки зрения, процедура забора пробы также изменяет распределение тромбоцитов по индексу формы, то есть приводит к частичной активации пробы даже при учёте минимизации любых преаналитических воздействий, поэтому необходимо учитывать данное

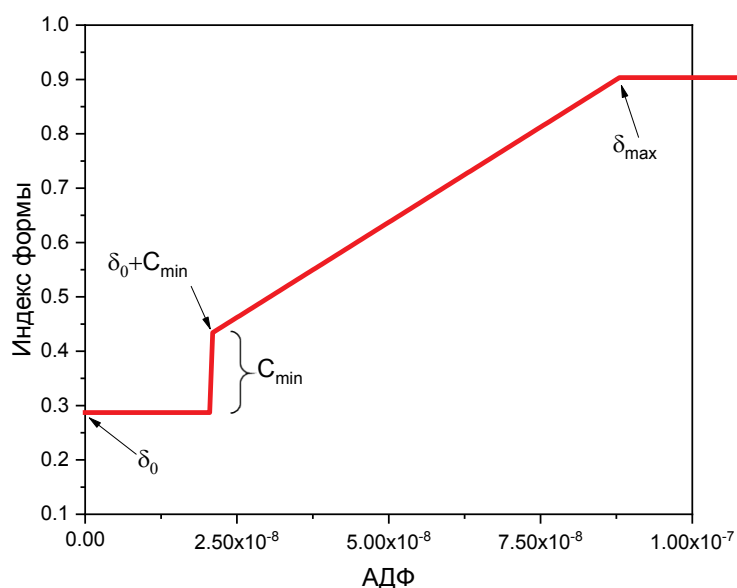


Рисунок 1. Схематичное представление изменения индекса формы от [АДФ] (Формула 1) для единичного тромбоцита

воздействие в модели. В данном случае такое воздействие учитывается, как введение эффективной концентрации АДФ (ADP_{eff}), добавление которой эквивалентно воздействию преаналитического этапа работы с пробой.

Модель изменения распределения по индексу формы под воздействием агониста активации может быть реализована в качестве модельной функции для метода глобальной оптимизации Direct [19]. Для определения параметров распределений по δ_0 , S и δ_{max} , а также C_{min} и ADP_{eff} в качестве экспериментальных данных для метода использовались одновременно два распределения тромбоцитов по индексу формы - в нативном состоянии (распределение, полученное после воздействия преаналитического этапа работы с пробой) и в активированном состоянии (распределение, полученное после воздействия определённой концентрации АДФ). Каждое из двух рассматриваемых распределений включает в себя не менее 5000 тромбоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения чувствительности до и после применения терапии проводилась нелинейная регрессия полученных экспериментальных распределений по индексу формы модельной функцией (1), обобщённой на популяцию измеренных тромбоцитов. Поиск подходящих параметров для модельной функции проводился с использованием метода глобальной оптимизации Direct, позволяющего не только найти оптимальные параметры, но и оценить точность определения данных параметров. Результаты регрессии для рассмотренных вариантов терапии представлены на рисунке 2. В таблице 1 приведены параметры полученных кривых.

В первую очередь стоит отметить, что применение терапии не повлияло на параметры начального (MPSI-MIN, PSIDW-MIN) и конечного (MPSI-MAX, PSIDW-MAX, LT-MAX) состояний. Это показывает, что данные состояния определяются индивидуальными особенностями доноров, а не применением терапии. Применение аспирина приводит к незначительному повышению величины скачка C_{min} по индексу формы, необходимого для начала изменения морфологии тромбоцитов, однако при этом возросло среднее значение чувствительности (MPS-ADP) к АДФ. Исходя из того, что аспирин ингибирует синтез тромбоксана А, то применение аспирина теоретически должно было бы приводить к уменьшению чувствительности к АДФ и, как следствие, к уменьшению MPS-ADP. На текущий момент причины увеличения MPS-ADP остаются неясными и требуют других гипотез о механизмах влияния аспирина на активацию тромбоцитов.

Для пробы, измеренной после применения клопидогрела, наблюдается значительное снижение C_{min} и снижение параметра MPS-ADP. Известно, что АДФ присоединяется к рецепторам P_2Y_{12} и P_2Y_2 , и снижение MPS-ADP может быть связано с блокированием клопидогрелем рецептора P_2Y_{12} , который служил дополнительной мишенью и вызывал усиленный ответ на добавление АДФ в пробу. Также стоит отметить, что в обоих случаях (аспирин и клопидогрел) наблюдается однонаправленная динамика изменения параметров C_{min} и MPS-ADP, причины чего также остаются неясными.

Отдельно стоит отметить разброс значений по параметру ADP_{eff} . Несмотря на одинаковые стандартные процедуры забора и измерения проб (в том числе и время между забор и измерением), данный параметр варьируется почти в 4 раза, что показывает важность учёта влияния преаналитического этапа в анализе данных, особенно при работе с тромбоцитами.

Таблица 1. Решения задачи регрессии распределений тромбоцитов по индексу формы на рисунке 1. MPSI-MIN и PSIDW-MIN – среднее значение и ширина начального распределения по индексу формы, MPSI-MAX, PSIDW-MAX и LT-MAX – среднее значение, ширина и левая граница распределение максимально возможного индекса формы, MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина распределения чувствительности тромбоцитов к АДФ, C_{min} пороговое значение начала изменения формы, а ADP_{eff} доза АДФ, эквивалентная по воздействию процедуре забора пробы

	До приёма аспирина	После приёма аспирина	До приёма клопидогреля	После приёма клопидогреля
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
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
C_{min}	0.146 ± 0.012	0.16 ± 0.03	0.193 ± 0.011	0.165 ± 0.002
$ADP_{eff} \cdot 10^{-9} M$	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

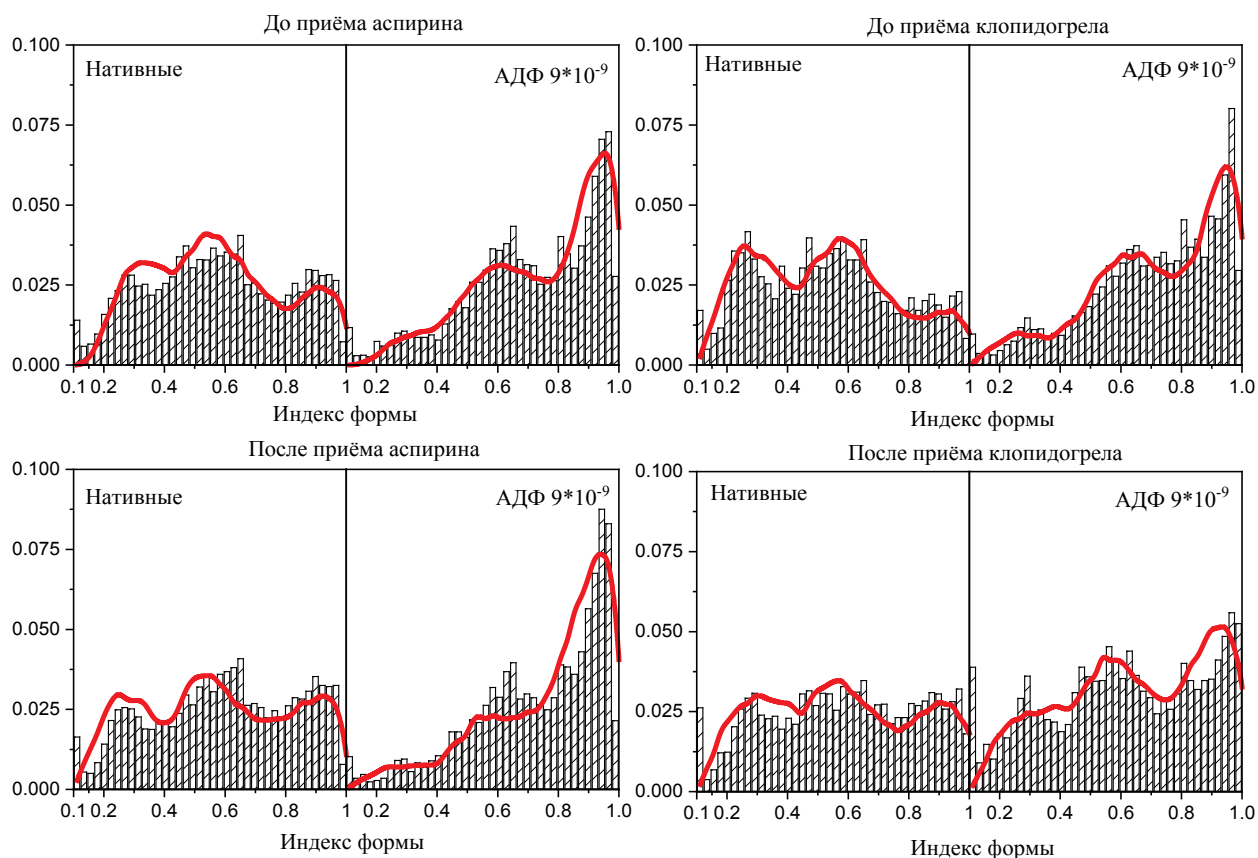


Рисунок 2. Распределения тромбоцитов по индексу формы в нативном состоянии и после воздействия агониста активации для проб до и после применения антитромбоцитарной терапии. Красной линией обозначено решение задачи регрессии. Параметры подобранных функции представлены в таблице 1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведена оценка изменения чувствительности пробы тромбоцитов после применения антитромбоцитарной терапии с использованием метода сканирующей проточной цитометрии. В качестве терапии рассматривалось применение ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела для двух условно здоровых доноров. В рамках работы проводилось измерение распределений тромбоцитов по индексу формы (характеризует сплюснутость тромбоцита) в нативном состоянии и после воздействия АДФ до и после применения терапии. После этого для полученных распределений решалась задача нелинейной регрессии с использованием феноменологической модели активации тромбоцита, приведённой в работе, и дающей информацию в том числе о чувствительности тромбоцитов к агонисту активации. В результате работы было показано увеличение порога начала изменения формы S_{\min} и увеличение чувствительности к агонисту активации S при применении ацетилсалициловой кислоты и уменьшений данных параметров при применении клопидогрела. Однако результаты являются предварительными и в дальнейшем планируется увеличение группы условно-здоровых доноров, а также наблюдение за изменением исследуемых параметров, как для одного донора, так и за разбросом значений параметров внутри исследуемой группы. Также было показано четырёхкратное изменение параметра ADP_{eff} , показывающего качество подготовки и манипуляций с пробой перед измерениями, несмотря на одинаковую технику пробоподготовки, что ещё раз показывает важность учёта влияния преаналитического этапа при работе с тромбоцитами. В дальнейшем данный подход может быть применён для исследования влияния двойной антитромбоцитарной терапии на тромбоциты, а также для оценки резистентности к одному из препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке в форме стипендии Президента Российской Федерации для аспирантов и молодых учёных.

Список литературы / References:

1. Hoffman M., Iii D.M.M. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost.*, 2001, vol. 85, no. 6, pp. 958-965, doi: 10.1055/s-0037-1615947.
2. Rondina M.T., Zimmerman G.A. 28 - The Role of Platelets in Inflammation *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press, 2019, pp. 505-522, doi: 10.1016/B978-0-12-813456-6.00028-X.

3. Li Z., Riesenber B., Metelli A., Li A., Wu B.X. 30 - The Role of Platelets in Tumor Growth, Metastasis, and Immune Evasion. *Platelets (Fourth Edition)*. Academic Press, 2019, pp. 547-561, doi: 10.1016/B978-0-12-813456-6.00030-8.
4. Purvis J.E., Chatterjee M.S., Brass L.F., Diamond S.L. A molecular signaling model of platelet phosphoinositide and calcium regulation during homeostasis and P2Y1 activation. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 10, pp. 4069-4079, doi: 10.1182/blood-2008-05-157883.
5. Moskalensky A.E., Litvinenko A.L. The platelet shape change: biophysical basis and physiological consequences. *Platelets*, 2018, vol. 0, no. 0, pp. 1-6, doi: 10.1080/09537104.2018.1514109.
6. Lordkipanidze M., Harrison P. Platelet Function Tests. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update. *Cham: Springer International Publishing*, 2017, pp. 559-570, doi: 10.1007/978-3-319-47462-5.
7. Noris P., Zaninetti C. Platelet Counting and Measurement of Platelet Dimensions *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 571-587, doi: 10.1007/978-3-319-47462-5.
8. Maltsev V.P. Scanning flow cytometry for individual particle analysis. *Review of Scientific Instruments*, 2000, vol. 71, no. 1, pp. 243-255, doi: 10.1063/1.1150190.
9. Chernova D.N., Konokhova A.I., Novikova O. I., Yurkin M.A., Strokotov D.I., Karpenko A.A., Chernyshev A.V., Maltsev V.P. Chylomicrons against light scattering: The battle for characterization. *Journal of Biophotonics*, 2018, vol. 11, no. 10, doi: 10.1002/jbio.201700381.
10. Gilev K.V., Yastrebova E.S., Strokotov D.I., Yurkin M.A., Karmadonova, N.A., Chernyshev A.V., Lomivorotov V.V., Maltsev V.P. Advanced consumable-free morphological analysis of intact red blood cells by a compact scanning flow cytometer. *Cytometry Part A*, 2017, vol. 91, no. 9, pp. 867-873, doi: 10.1002/cyto.a.23141.
11. Strokotov D.I., Yurkin M.A., Gilev K.V., van Bockstaele D. R., Hoekstra A.G., Rubtsov N.B, Maltsev V.P. Is there a difference between T- and B-lymphocyte morphology? *J. Biomed. Opt.*, 2009, vol. 14, no. 6, doi: 10.1117/1.3275471.
12. 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. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering. *Journal of biomedical optics*, 2013, vol. 18, no. 1. doi: 10.1117/1.JBO.18.1.017001.
13. 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 V.A., Maltsev V.P. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets. *Cytometry*, 2016, vol. 89, no. 11, pp. 1010-1016, doi: 10.1002/cyto.a.23003.
14. Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Strokotov D.I., Moskalensky A.E., Chernyshev a. V., Shilova A.N., Karpenko A.A., Maltsev V.P. Blood platelet quantification by light scattering: from morphology to activation. *Anal. Methods. The Royal Society of Chemistry*, 2021, vol. 13, no. 29, pp. 3233-3241, doi: 10.1039/D1AY00431J.
15. Dmitrieff S., Alsinia A., Mathura A., Nedelec J.N. Balance of microtubule stiffness and cortical tension determines the size of blood cells with marginal band across species *PNAS. National Academy of Sciences*, 2017, vol. 114, no. 17, pp. 4418-4423, doi: 10.1073/pnas.1618041114.
16. Sewell R., Ibbotson M., Phillips R., Carson P. High mean platelet volume after myocardial infarction: is it due to consumption of small platelets? 6458 *British medical journal (Clinical research ed.)*, 1984, vol. 289, no. 6458, pp. 1576-1578, doi: 10.1136/bmj.289.6458.1576.
17. Kroll M.H., Schafer A.I. Platelets and shear stress. *Blood*, 1996, vol. 88, no. 5, pp. 1525-1541, doi: 10.1182/blood.V74.4.1181.1181.
18. Egidi M.G., D'Alessandro A., Mandarello G., Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus*, 2010, vol. 8, no. 3, pp. s73-s81, doi: 10.2450/2010.012S.
19. Jones D.R., Perttunen C.D., Stuckman B.E. Lipschitzian optimization without the Lipschitz constant. *Journal of Optimization Theory and Applications*, 1993, vol. 79, no. 1, pp. 157-181, doi: 10.1007/BF00941892.

EVALUATION OF THE HUMAN BLOOD PLATELETS SENSITIVITY TO AN ACTIVATION AGONIST ADENOSINE DIPHOSPHATE BY SCANNING FLOW CYTOMETRY UNDER CONDITIONS OF ANTIPLATELET THERAPY

Litvinenko A.L., Nekrasov V.M., Chetvertak E.V., Maltsev V.P.

Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion

Institutskaya str., 33, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: golovchenko.igor1991@gmail.com

Received 15.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0516

Abstract. Cardiovascular diseases occupy a leading place among the causes of death in the population. The main complications of the disease in this group are closely related to changes in the functioning of the hemostasis system, including primary hemostasis. Antiplatelet therapy is used to prevent the development of complications associated with disorders in the hemostasis system. This paper examines the behavior of the platelet population of healthy donors before and after the use of two main types of drugs: acetylsalicylic acid and clopidogrel. Using the method of scanning flow cytometry, the shape index of single platelets was measured, followed by the construction of distributions according to this characteristic for native samples and after exposure to a small amount of an activation agonist. The sensitivity of platelets to the activation agonist is assessed by the change in distributions before and after the application of a short course of therapy. As a result of the assessment, the threshold value for the onset of changes in the shape of platelets and sensitivity increased with the use of acetylsalicylic acid, and decreased with the use of clopidogrel. The demonstrated approach for assessing sensitivity can be useful both in assessing the degree of effectiveness of antiplatelet therapy used and in diagnosing the presence of complications in the course of diseases of the cardiovascular system on the part of primary hemostasis.

Key words: *platelets, scanning flow cytometry, antiplatelet therapy, ADP.*