

## КОАГУЛОЛОГИЯ

© ХАБИРОВА А.И., ЛИТВИНОВ Р.И., 2023

Хабирова А. И.<sup>1</sup>, Литвинов Р. И.<sup>2</sup>

### ВКЛАД СОКРАТИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ В ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ ФУНКЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

<sup>1</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, 420012, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup> Отдел клеточной биологии Медицинского факультета Пенсильванского университета, Филадельфия, Пенсильвания, США

*Тромбоциты играют ключевую роль в реакциях гемостаза. Исследования последних лет показали, что тромбоциты обладают сократительными свойствами и способны вызывать сжатие сгустков крови и тромбов не только in vitro, но и in vivo. Сокращение (контракция, ретракция) тромбоцитов имеет большое значение при кровотечениях и тромбозах. Для изучения функционального состояния тромбоцитов применяются различные методы лабораторного исследования, однако не известно, характеризуют ли они сократительные свойства тромбоцитов. Цель - определить вклад сократительной функции тромбоцитов в показатели тромбоэластографии (ТЭГ), анализа функции тромбоцитов на приборе PFA-200 и оптической агрегометрии.*

**Материал и методы.** Исследовали 24 образца крови здоровых доноров. Для определения вклада сократительной функции тромбоцитов в показатели лабораторных тестов ингибировали сокращение тромбоцитов с помощью латрункулина и блебистатина, а также передачу сокращения на фибрин с помощью абциксимаба. Статистический анализ выполняли с применением тестов Стьюдента или Манна-Уитни.

**Результаты.** Ингибиторы контракции тромбоцитов достоверно подавляют только структурные параметры ТЭГ (K,  $\alpha$ , MA), которые характеризуют эластические свойства формирующихся сгустков, тогда как хронометрический параметр R не меняется в присутствии тромбоцитарных ингибиторов. Ингибиторы контракции достоверно удлиняли время тромбоирования микроканалов, покрытых коллагеном, АДФ и эпинефрином, в анализаторе функции тромбоцитов PFA-200. Кинетика и степень агрегации тромбоцитов в присутствии латрункулина и блебистатина не отличались от контроля. Напротив, в присутствии абциксимаба степень агрегации и скорость агрегации предсказуемо снижались из-за ингибирования тромбоцитарного интегрина  $\alpha IIb\beta 3$ .

**Выводы.** Сократительная функция тромбоцитов, включающая участие актина, немышечного миозина IIА, а также интегрина  $\alpha IIb\beta 3$  дает существенный вклад в параметры лабораторных методов, таких как тромбоэластография и анализ функции тромбоцитов на приборе PFA-200. Показатели оптической агрегации тромбоцитов не отражают сократительную функцию тромбоцитов.

**Ключевые слова:** тромбоциты; сократительная функция тромбоцитов; гемостаз; тромбоэластография; анализатор функции тромбоцитов PFA-200; агрегация тромбоцитов.

**Для цитирования:** Хабирова А. И., Литвинов Р. И. Вклад сократительной способности тромбоцитов в лабораторные показатели, характеризующие функцию тромбоцитов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (9): 544-552  
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-544-552>

**Для корреспонденции:** Хабирова Алина Ильшатовна, мл. науч. сотр. Учебной научно-исследовательской лаборатории «Молодежный научно-образовательный инкубатор-регенератор»; e-mail: [alina.urussu.95@gmail.com](mailto:alina.urussu.95@gmail.com)

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность фирме ООО «Технология Стандарт» (Барнаул) за безвозмездно предоставленный реактив, каолин.

Поступила 04.06.2023

Принята к печати 06.07.2023

Опубликовано 08.09.2023

*Khabirova A. I.<sup>1</sup>, Litvinov R. I.<sup>2</sup>*

#### CONTRIBUTION OF PLATELET CONTRACTILITY TO THE LABORATORY PARAMETERS THAT CHARACTERIZE PLATELET FUNCTION

<sup>1</sup>Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA

*Platelets play a key role in hemostasis and thrombosis. Recent studies have shown that platelets have contractile properties and are able to cause shrinkage of blood clots both in vitro and in vivo. Platelet contractility has a great pathophysiological significance in*

bleeding and thrombosis. Various laboratory tests are used to study the functional state of platelets, but it is unknown whether they characterize the contractile properties of platelets. Aim. To determine the contribution of platelet contractility to the parameters of thromboelastography (TEG), analysis of platelet function using the PFA-200 analyzer, and optical aggregometry. Material and methods. 24 blood samples from healthy donors were studied. To determine contribution of the platelet contractile function to the laboratory parameters, platelet contractility was inhibited by latrunculin and blebbistatin as well as transmission of contraction to fibrin was inhibited by abciximab. Statistical analysis was performed using either Student's t-test or Mann-Whitney U test. Results. The inhibitors of platelet contractility suppressed significantly the structural parameters of TEG (K,  $\alpha$ , MA), which characterize the elastic properties of forming clots. The chromometric parameter R did not change in the presence of the platelet inhibitors applied. The contraction inhibitors significantly prolonged the time for complete obstruction of the microchannels coated with collagen, ADP, and epinephrine in the platelet function analyzer (PFA-200). The kinetics and degree of platelet aggregation in the presence of latrunculin and blebbistatin did not differ from the untreated control samples. On the contrary, in the presence of abciximab the degree and rate of platelet aggregation decreased expectedly due to the inhibition of platelet integrin  $\alpha IIb\beta 3$ . Conclusions. The contractile function of platelets that involves actin, non-muscle myosin IIA, and the integrin  $\alpha IIb\beta 3$  makes a substantial contribution to the parameters of thromboelastography and analysis of platelet function with the PFA-200 instrument. In contrast, the parameters of optical platelet aggregometry do not reflect platelet contractility.

**Key words:** platelets; platelet contractile function; hemostasis; thromboelastography; platelet function analyzer PFA-200; platelet aggregation.

**For citation:** Khabirova A. I., Litvinov R. I. Contribution of platelet contractility to the laboratory parameters that characterize platelet function. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (9): 544-552 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-544-552>

**For correspondence:** Khabirova A. I., Master of Biology, Junior Researcher, Educational Research Laboratory "Youth Scientific and Educational Incubator-Regenerator"; e-mail: [alina.urussu.95@gmail.com](mailto:alina.urussu.95@gmail.com)

Information about authors:

Khabirova A. I., <https://orcid.org/0000-0002-7243-8832>;

Litvinov R. I., <https://orcid.org/0000-0003-0643-1496>.

**Conflict of interest.** The authors declare absence of conflict of interest.

**Funding.** This paper has been supported by the Kazan Federal University Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030).

**Acknowledgements.** The authors are grateful to the company Technology Standard LLC (Barnaul) for the free reagent, kaolin.

Received 04.06.2023

Accepted 06.07.2023

Published 08.09.2023

**Введение.** Тромбоциты – это форменные элементы крови, играющие ключевую роль в реакциях гемостаза и тромбоза [1]. Способность тромбоцитов образовывать гемостатические сгустки или обтурационные тромбы основана на способности к адгезии и агрегации в участке повреждения сосуда, секреции биоактивных веществ, а также прокоагулянтной активности мембраны [2, 3]. Исследования последних лет показали, что активированные тромбоциты обладают способностью к сокращению, или контракции, как *in vitro*, так и *in vivo*. Внутриклеточные силы, генерируемые актином и немышечным миозином IIA, передаются через интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  на фибрин, что приводит к сжатию сгустка крови [4]. Контракция (ретракция) сгустков крови и тромбов имеет большое патофизиологическое значение при кровотечениях и тромбозах [5].

Для изучения функционального состояния тромбоцитов применяются различные методы лабораторного исследования [6-11], однако, не известно, в какой степени они характеризуют сократительные свойства тромбоцитов. Целью исследования было определение вклада сократительной функции тромбоцитов в интегральные показатели функции тромбоцитов, изучаемой с помощью тромбозластографии (ТЭГ), анализа функции тромбоцитов на приборе PFA-200 и оптической агрегометрии. Для этого указанные тесты проводились в отсутствие и в присутствии ингибиторов сократительной функции тромбоцитов (блебистатина

и латрункулина A), а также ингибитора рецептора  $\alpha IIb\beta 3$ , абциксимаба (Reorgo®), предотвращающего механотрансдукцию и сжатие сгустка крови.

**Материал и методы. Получение цельной крови и плазмы.** Использовали образцы венозной крови здоровых доноров старше 18 лет при условии исключения приема ими препаратов, влияющих на свертывание крови и тромбоциты, как минимум за 2 недели до исследования. Работа с образцами крови здоровых доноров одобрена этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (выписка из протокола №27 от 28.12.2020) и проводилась при наличии их письменного согласия. Кровь для исследований получали путем венепункции и стабилизировали, смешивая с 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1 по объему в вакутейнерах Vacuette (Greiner-Bio-One, Австрия). Кровь хранили и обрабатывали при комнатной температуре и использовали не позднее 4-х часов после взятия. Для получения плазмы, богатой тромбоцитами, цитратную кровь центрифугировали при 200g в течение 10 минут.

**Тромбозластография.** Тромбозластографию выполняли на приборе TEG® 5000 (Haemoscope, США). 350 мкл цельной крови или плазмы, богатой тромбоцитами, инкубировали с 15 мкл суспензии каолина (Технология Стандарт, Россия) в конечной концентрации 0,01 мг/мл при комнатной температуре в течение 2-х минут. Активированный каолином образец (340 мкл) переносили в измерительную кювету

тромбоэластографа, куда предварительно вносили 20 мкл 360 мМ CaCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 20 мМ. В ряде опытов после каолина в кювету вносили следующие ингибиторы функции тромбоцитов: латрункулин (Abscam, Великобритания) в конечных концентрациях 1 мкМ и 5 мкМ; блебистатин (Sigma Aldrich, США) в конечных концентрациях 20 мкМ и 50 мкМ и абциксимаб (ReoPro®, Eli Lilly, США) в конечных концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл. Каждый образец инкубировали при 37°C в течение 3-х минут. По форме тромбоэластограммы (ТЭГ) (рис. 1) автоматически определяются следующие параметры: *R* - время реакции (время от инициации свертывания хлоридом кальция до начала образования фибрина и расхождения «усов» ТЭГ до 2 мм), *K* – время увеличения амплитуды ТЭГ с 2 мм до 20 мм (характеристика начальной скорости полимеризации фибрина);  $\alpha^\circ$  – угол наклона ТЭГ, характеризующий скорость образования сгустка (по значению аналогичен *K*); *MA* - максимальная амплитуда, которая отражает максимальную упругость (эластичность) сгустка [12].

**Анализ функции тромбоцитов на приборе PFA-200.** PFA (platelet function analyzer) – серийно выпускаемый прибор фирмы Simens (Германия), предназначенный для выявления дисфункции тромбоцитов в цельной крови. Принцип действия PFA - моделирование процесса закупорки поврежденного сосуда под действием «тромбоцитарной пробки», имитирующей первичный (тромбоцитарный) гемостаз. Аналогом поврежденного сосуда служит микроканал, покрытый коллагеном и агонистами, которые активируют тромбоциты в образце крови, протекающем через канал внутри картриджа [7]. Оценку функции тромбоцитов выполняли на приборе INNOVANCE® PFA-200 (Simens, Германия) согласно инструкции производителя с использованием картриджей, покрытых коллагеном и АДФ (Coll/ADP) или коллагеном и эпинефрином (Coll/EPI). Для этого в картриджи вносили 800 мкл цельной цитратной крови, содержащей и не содержащей ингибиторы функции тромбоцитов (концентрации указаны в табл. 2). Заполненные картриджи помещали в прибор. После инкубации образца при 37°C в течение 3-х минут запускали ток крови сквозь микроканал картриджа. Прибор автоматически фиксирует время, необходимое для остановки кровотока в результате закупорки канала тромбоцитарными агрегатами.

**Оптическая агрегометрия тромбоцитов.** Агрегационную активность тромбоцитов оценивали с помощью оптического агрегометра Biola 220LA (Россия), в котором агрегация тромбоцитов регистрируется как увеличение светопропускания суспензии тромбоцитов. В кювете агрегометра к 300 мкл плазмы, богатой тромбоцитами, добавляли индуктор агрегации – пептид TRAP-6 (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 50 мкМ и измеряли нарастающую прозрачность плазмы. Прибор регистрирует увеличение светопропускания в течение 5 минут после добавления индуктора агрегации тромбоцитов в виде кривой (агрегатограммы) (рис. 2). Параметры агрегации тромбоцитов, рассчитываемые автоматиче-

чески, это степень агрегации (в %) и скорость агрегации (в %/мин.). В основных опытах в плазму вводили те же ингибиторы функции тромбоцитов и в тех же концентрациях, что указаны для ТЭГ. После введения тромбоцитарных ингибиторов образцы плазмы инкубировали 3 минуты при 37°C перед добавлением индуктора агрегации и записи агрегатограммы.

**Статистический анализ.** Статистический анализ выполняли с использованием программного пакета GraphPad Prism 8.0.1. Оценку нормальности распределения данных производили с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью параметрического теста Стьюдента или непараметрического теста Манна-Уитни. Уровень статистической значимости 95% ( $p < 0,05$ ).

**Результаты. Влияние ингибиторов контракции сгустков крови на параметры ТЭГ в цельной крови.** Чтобы определить, отражают ли параметры ТЭГ сократительную функцию тромбоцитов и, если да, то в какой степени, тромбоэластография цельной крови была проведена в отсутствие и в присутствии ингибиторов контракции тромбоцитов. Численные результаты представлены в табл. 1, А и показаны на рис. 1. При добавлении латрункулина наблюдалось дозозависимое удлинение времени реакции *K* ( $p = 0,001$ ) и уменьшение угла  $\alpha$  ( $p = 0,004$ ) по сравнению с контролем с ДМСО. Максимальная амплитуда (*MA*) в присутствии латрункулина также уменьшалась дозозависимым образом ( $p < 0,0001$ ). Аналогично, блебистатин вызывал дозозависимое удлинение времени *K* ( $p = 0,002$ ) и угла  $\alpha$  ( $p = 0,02$ ) по сравнению с контролем с ДМСО. Максимальная амплитуда (*MA*) уменьшалась в среднем на 31% при концентрации блебистатина 20 мкМ и на 49% при концентрации 50 мкМ ( $p < 0,0001$ ). Однако, наибольшее влияние на параметры ТЭГ оказывал абциксимаб. Время *K* при концентрациях абциксимаба 5 мкг/мл и 10 мкг/мл в среднем удлинялось в 3,5 и 5 раз ( $p < 0,0001$ ), угол наклона кривой  $\alpha$  уменьшался на 47% в обоих случаях ( $p = 0,001$ ), а максимальная амплитуда (*MA*) уменьшалась на 66% и 67% ( $p < 0,0001$ ), соответственно.

Важно отметить, что ингибиторы контракции тромбоцитов достоверно подавляли только структурные параметры ТЭГ (*K*,  $\alpha$ , *MA*), которые характеризуют эластические свойства формирующихся сгустков, тогда как хронометрический параметр *R* (время от активации свертывания крови до начала полимеризации фибрина) не менялся в присутствии тромбоцитарных ингибиторов (см. табл. 1).

**Влияние ингибиторов контракции сгустков крови на параметры ТЭГ в богатой тромбоцитами плазме.** Поскольку эритроциты существенно влияют и на показатели ТЭГ, и на контракцию сгустков крови, были изучены эффекты ингибиторов функции тромбоцитов на параметры ТЭГ в богатой тромбоцитами плазме, не содержащей эритроцитов.

При добавлении к плазме латрункулина в концентрациях 1 мкМ и 5 мкМ максимальная амплитуда (*MA*) уменьшалась дозозависимым образом в среднем на 1% и 26% ( $p = 0,001$ ), как и угол наклона  $\alpha$ , который

достоверно уменьшался на 1% и 12% ( $p=0,03$ ), соответственно (табл. 1, Б). Эффект блебистатина был аналогичным: в присутствии 20 мкМ и 50 мкМ блебистатина средняя максимальная амплитуда (МА) уменьшалась на 19% и 40%, соответственно ( $p=0,001$ ;  $p<0,0001$ ). Угол наклона  $\alpha$ , хотя и имел тенденцию к уменьшению, не достигал достоверных отличий по сравнению с контролем с ДМСО ( $p=0,4$ ;  $p=0,3$ ). Эффекты абциксимаба в плазме, богатой тромбоцитами, были наиболее выраженными по сравнению с другими ингибиторами контракции. При добавлении абциксимаба в концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл средние значения максимальной амплитуды (МА) уменьшались на 44% и 47% соответственно ( $p<0,0001$ ;  $p=0,001$ ); угол наклона  $\alpha$  уменьшался в среднем, соответственно, на 13% ( $p=0,01$ ) и 16% ( $p=0,02$ ).

Как и в цельной крови, в богатой тромбоцитами

плазме время до начала образования сгустка (параметр  $R$ ) не изменялось в присутствии исследованных ингибиторов. Параметр  $K$  в плазме, богатой тромбоцитами, достоверно удлинялся только в присутствии абциксимаба в максимальной концентрации ( $p=0,03$ ), в случае с другими ингибиторами не менялся, тогда как в цельной крови подавление контракции тромбоцитов приводило к его достоверному увеличению (табл. 1).

Таким образом, все изученные ингибиторы контракции сгустков крови вызывали уменьшение максимальной амплитуды (МА) и угла наклона кривой  $\alpha$ , как в цельной крови, так и в плазме, богатой тромбоцитами. В ответ на подавление контракции сгустков параметр  $K$  удлинялся только в цельной крови. Время свертывания (параметр  $R$ ) было вовсе не чувствительно к действию ингибиторов контракции тромбоцитов ни в цельной крови, ни в богатой тромбоцитами плазме.

Таблица 1

Параметры ТЭГ до и после добавления ингибиторов функции тромбоцитов

Экспериментальные условия		Параметры ТЭГ			
		R (мин)	K (мин)	Угол $\alpha$ (°)	МА (мм)
<b>(А) Цельная кровь</b>					
Контроль без ДМСО	( $n=7$ )	5,3±1,9	2,7±1,1	56,2±10,5	60,0±5,1
Контроль с ДМСО	( $n=7$ )	4,7±1,2	2,1±0,5	61,6±6,7	61,0±4,5
Латрункулин	1 мкМ ( $n=7$ )	4,8±1,1	2,4±0,8	59,1±8,6	57,5±5,1
	5 мкМ ( $n=6$ )	4,8±1,8	8,2±6,5**	39,1±14,5*	35,2±8,5***
Блебистатин	20 мкМ ( $n=7$ )	4,3±1,2	3,0±1,1	53,9±9,4	41,7±5,3***
	50 мкМ ( $n=7$ )	4,3±1,2	4,0±1,6*	50,2±8,5*	31,0±4,0***
Абциксимаб	5 мкг/мл ( $n=6$ )	5,7±2,2	9,4±3,0**	29,7±10,8**	20,4±4,4***
	10 мкг/мл ( $n=6$ )	5,6±1,8	12,8±2,6***	29,7±9,1**	19,6±3,8***
<b>(Б) Плазма, богатая тромбоцитами</b>					
Контроль без ДМСО	( $n=7$ )	4,7±1,4	0,9±0,2	79,8±4,4	74,8±4,7
Контроль с ДМСО	( $n=7$ )	4,2±1,1	0,9±0,2	79,0±4,7	74,1±4,8
Латрункулин	1 мкМ ( $n=7$ )	4,5±1,2	0,9±0,3	78,1±4,9	73,1±3,4
	5 мкМ ( $n=6$ )	4,6±1,1	1,4±0,6	69,5±8,9*	54,6±11,1**
Блебистатин	20 мкМ ( $n=7$ )	4,6±1,7	1,0±0,4	76,2±6,8	59,7±7,0**
	50 мкМ ( $n=7$ )	4,5±1,5	1,0±0,3	75,7±6,1	44,6±5,5***
Абциксимаб	5 мкг/мл ( $n=6$ )	5,3±1,9	1,7±0,8	69,1±9,7*	41,8±8,5***
	10 мкг/мл ( $n=6$ )	4,8±1,7	1,8±1,0*	66,6±12,7*	39,9±8,9**

Примечание. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Тест Стьюдента или Манна-Уитни; \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,001$ ; \*\*\* -  $p<0,0001$  по сравнению с контролем с добавлением (латрункулин и блебистатин) или без добавления ДМСО (абциксимаб); остальные показатели статистически не отличаются от контроля ( $p>0,05$ ).

$n$  – число исследованных образцов крови, полученных от независимых доноров.

**Влияние тромбоцитарных ингибиторов на время закупорки микроканала в анализаторе функции тромбоцитов PFA-200.** Чтобы определить влияние контрактной функции тромбоцитов на время закупорки микроканала тромбоцитарными агрегатами, цельную цитратную кровь пропускали через картриджи, покрытые коллагеном и АДФ или коллагеном и эпинефрином в отсутствие и в присутствии ингибиторов контракции сгустков крови: латрункулина, блебистатина, а также абциксимаба. Поскольку результаты не зависели от покрытия картриджей и от концентрации ингибиторов, они объединены в табл. 2. Время закупорки канала в картриджах в присутствии

латрункулина достоверно удлинялось по сравнению с контролем почти в 1,5 раза ( $p=0,007$ ) (см. табл. 2). В присутствии блебистатина время закупорки канала в абсолютных значениях имело тенденцию к увеличению, но не достигало достоверности ( $p=0,15$ ) ввиду разброса данных, в то время как относительные цифры показали достоверное увеличение среднего времени закупорки канала по сравнению с контролем в 1,3 раза ( $p=0,02$ ) (табл. 2). Абциксимаб также достоверно удлинял среднее время закрытия канала в картриджах, как в абсолютных ( $p=0,002$ ), так и в относительных единицах ( $p=0,0008$ ), почти в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 2).



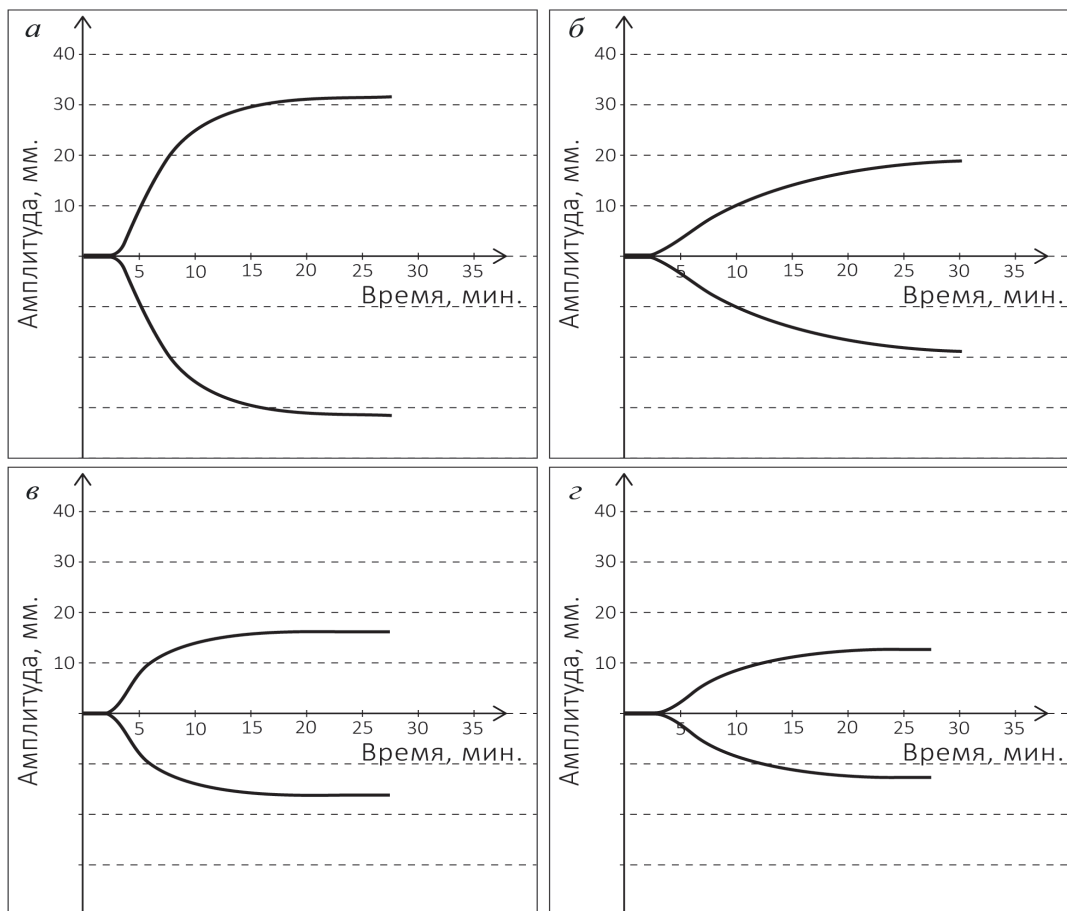


Рис. 1. Характерные кривые ТЭГ цельной крови в отсутствие (а) и в присутствии ингибиторов функции тромбоцитов: 5 мкМ латрункулина (б), 50 мкМ блебистатина (в) и 10 мкг/мл абциксимаба (г). Сравнительные ТЭГ плазмы, богатой тромбоцитами, выглядят аналогично.

Таблица 2

Влияние ингибиторов контракции тромбоцитов на время закрытия микроканалов, покрытых коллагеном, АДФ и эпинефрином, в анализаторе функции тромбоцитов PFA-200

Контроль (n=12)	Латрункулин (1 или 2 мкМ) (n=12)	Контроль (n=9)	Блебистатин (20 или 80 мкМ) (n=9)	Контроль (n=9)	Абциксимаб (0,1 или 1 мкг/мл) (n=9)
<b>(А) Абсолютные результаты (с)</b>					
117±29	168±51	120±31	144±36	127±27	224±79
$p=0,007^*$		$p=0,15$		$p=0,002^*$	
<b>(Б) Относительные результаты, нормализованные по контролю</b>					
1	1,45±0,39	1	1,30±0,32	1	1,78±0,56
$p=0,0006^{**}$		$p=0,02^*$		$p=0,0008^{**}$	

Примечание. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Тест Стьюдента или Манна-Уитни. n – число исследованных образцов крови, полученных от независимых доноров.

**Агрегация тромбоцитов в присутствии ингибиторов контракции.** Чтобы определить влияние сократительной функции тромбоцитов на скорость и полноту их агрегации, была изучена оптическая агрегация тромбоцитов, индуцированная тромбоино-подобным пептидом TRAP-6 в плазме, в отсутствие и в присутствии ингибиторов контракции. Результа-

ты, представленные на рис. 2 и в табл. 3, показывают, что средняя степень агрегации тромбоцитов в присутствии латрункулина и блебистатина не отличалась от контроля. Напротив, в присутствии абциксимаба в концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл средняя степень агрегации снижалась примерно в 2 раза и 5 раз ( $p=0,0002$ ;  $p<0,0001$ ), соответственно. Ни латрунку-

лин, ни блебистатин не влияли на скорость агрегации, тогда как при добавлении абциксимаба средняя ско-

рость агрегации достоверно уменьшалась с увеличением концентрации ( $p=0,0005$ ).

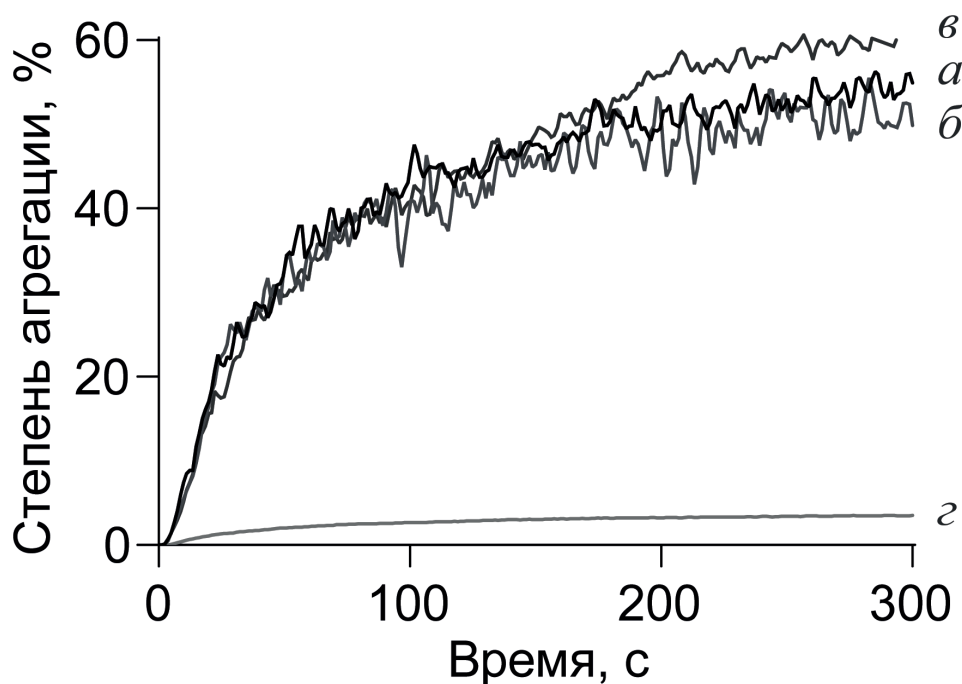


Рис. 2. Характерные индивидуальные оптические агрегограммы тромбоцитов в отсутствие (а) и в присутствии ингибиторов функции тромбоцитов: 5 мкМ латрункулина (б), 50 мкМ блебистатина (в) и 10 мкг/мл абциксимаба (г).

Таблица 3

Параметры агрегации тромбоцитов при добавлении ингибиторов контрактильной функции тромбоцитов

Параметры	Контроль (n=12)	Латрункулин (1 мкМ) (n=7)	Латрункулин (5 мкМ) (n=7)	Блебистатин (20 мкМ) (n=7)	Блебистатин (50 мкМ) (n=7)	Абциксимаб (5 мкг/мл) (n=8)	Абциксимаб (10 мкг/мл) (n=8)
Степень агрегации, %	62±7	62±6	62±8	60±12	64±11	34±18**	13±7***
Скорость агрегации, %/мин	8,0±3,6	7,3±1,9	7,5±2,8	6,9±2,2	6,5±3,6	8,0±5,8	2,3±1,5**

Примечание. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Тест Стьюдента или Манна-Уитни. \*\* -  $p<0,001$ ; \*\*\* -  $p<0,0001$  по сравнению с контролем; остальные показатели статистически не отличаются от контроля ( $p>0,05$ ). n – число исследованных образцов крови, полученных от независимых доноров.

**Обсуждение.** Известно, что сократительная функция тромбоцитов играет критически важную роль в контракции сгустков крови. Движущая сила этого процесса – сокращение актомиозинового комплекса внутри активированных тромбоцитов с формированием механической силы, которая передается на весь сгусток крови через молекулы интегрина  $\alpha IIb\beta 3$ , взаимодействующие с волокнами фибрина [5]. Контракция (ретракция, сжатие) сгустков происходит не только *in vitro*, но и *in vivo* как патофизиологический процесс, который или улучшает гемостаз, сближая края раны, предотвращая кровотечение и инфициро-

вание раны. При тромбозе контракция тромба увеличивает просвет сосуда, уменьшая степень его закупорки и восстанавливая локальный кровоток [13]. Кроме того, контракция предотвращает тромбоэмболию, уплотняя тромб и увеличивая его механическую стабильность [14, 15], а также изменяет восприимчивость сжатых сгустков к естественному фибринолизу и тромболитической терапии [16].

Для количественной оценки контракции сгустков крови существуют различные методы. Большинство основано на измерении конечного размера сжатого сгустка; они просты в использовании, однако, их

недостатками являются неточность измерений и отсутствие данных о кинетике процесса контракции [17]. Другие методы основаны на измерении силы сокращения, которую генерируют тромбоциты; для этого используются различные ретрактометры. Сравнительно недавно разработан метод автоматического и непрерывного определения размера сгустка в процессе его сжатия на основе оптического регистратора тромбодинамики («ГемаКор», Россия) [18]. На показатели контракции сгустков крови, независимо от метода ее изучения, могут влиять число тромбоцитов и эритроцитов, концентрация фибриногена, дефекты свертывания крови и другие природные и экспериментальные факторы [18 - 20].

Лабораторные исследования функции тромбоцитов проводятся в самых разных клинических случаях, когда есть основания предполагать дисфункцию тромбоцитов как причину геморрагического диатеза или, когда надо оценить эффективность применения антитромбоцитарных препаратов. Для этих целей разработаны различные методы и устройства, которые основаны на оценке различных функций тромбоцитов [10, 21]. Интегральные методы изучения тромбоцитов для клиники характеризуются быстротой, простотой и доступностью. Важнейшей особенностью интегральных методов является то, что они оценивают функцию тромбоцитов в условиях, близких к физиологическим, с участием других компонентов крови и плазмы, которые также участвуют в гемостазе. К сожалению, ни один из клинико-лабораторных методов изучения тромбоцитов не был проанализирован с точки зрения информации о сократительной функции тромбоцитов и ее вкладе в определяемые параметры.

Для определения вклада сократительной функции тромбоцитов в лабораторные тесты ТЭГ, анализа функции тромбоцитов на приборе PFA-200 и оптической агрегометрии, мы ингибировали эту функцию при помощи латрункулина, блебистатина и абциксимаба, которые действуют на разные стадии процесса генерации сократительной силы и ее передачи на внеклеточный матрикс, т.е. механотрансдукции.

Тромбоэластография визуализирует изменения упругости сгустка, происходящие в процессе свертывания крови, описывает процесс с помощью структурных ( $MA$  и угол  $\alpha$ ) и хронометрических ( $K$  и  $R$ ) параметров [22, 23]. Полученные результаты показали, что и в цельной крови, и плазме, богатой тромбоцитами, структурные параметры ТЭГ в значительной степени отражают сократительную функцию тромбоцитов. При этом в отличие от характеристики вязкоэластических свойств сгустка, зависящих от контракции, время от инициации свертывания крови до момента образования тромбина и появления первых волокон фибрина не зависит от сократительной функции тромбоцитов и не отражает ее состояние. В пользу решающей роли тромбоцитов в определении структурных параметров ТЭГ свидетельствует значительная разница в прочности сгустка ( $MA$ ) при сопоставлении богатой тромбоцитами плазмы и плазмы без тромбоцитов с добавлением каолин-кефалина [24] при отсутствии разницы в генерации тромбина [25].

Принцип действия анализатора функции тромбоцитов (PFA-200) — это моделирование процесса закупорки поврежденного сосуда в виде искусственного микроканала, стенки которого покрыты коллагеном и АДФ или эpineфрином [7, 26]. Тромбоциты участвуют в этом процессе прежде всего благодаря способности к адгезии и агрегации [27]. В наших опытах установлено, что время закупорки микроканала существенно зависит от сократительных свойств тромбоцитов, поскольку и латрункулин и блебистатин значительно удлиняли время obturации. Эти эффекты имеют как минимум два важных следствия. Во-первых, они указывают на информативность PFA-200 как метода, характеризующего, наряду с другими свойствами, сократительную функцию тромбоцитов. Во-вторых, удлинение времени закупорки канала под действием ингибиторов контракции косвенно подтверждает важность контракции тромбоцитов и сжатия сгустков крови в гемостазе. Время закрытия микроканала удлинялось также при воздействии абциксимаба, антагониста интегрин  $\alpha IIb\beta 3$ , однако его эффект может быть связан, как с нарушением механотрансдукции, так и с подавлением агрегации тромбоцитов.

Оптическая агрегометрия тромбоцитов, разработанная G.V.R. Vorn [28], до сих пор является золотым стандартом для оценки агрегационной функции тромбоцитов. Анализ основан на измерении увеличения светопропускания через образец плазмы богатой тромбоцитами после добавления экзогенного агониста [9, 29]. В нашем исследовании селективные ингибиторы контракции тромбоцитов, латрункулин и блебистатин, не влияли на параметры агрегации тромбоцитов, тогда как абциксимаб предсказуемо снижал и степень, и скорость агрегации, т. к. ингибировал связывание рецептора  $\alpha IIb\beta 3$  на тромбоцитах с фибриногеном. Полученные результаты позволяют заключить, что агрегограмма и ее параметры не отражают сократительную функцию тромбоцитов и что агрегация тромбоцитов, по крайней мере, *in vitro*, протекает без участия сократительного аппарата тромбоцитов.

**Заключение.** Таким образом, сократительная функция тромбоцитов, включающая участие актина, немышечного миозина IIА, а также интегрин  $\alpha IIb\beta 3$  вносит существенный вклад в параметры лабораторных методов, таких как тромбоэластография и анализ функции тромбоцитов на приборе PFA-200. В отличие от этих методов, показатели оптической агрегации тромбоцитов не отражают сократительную функцию тромбоцитов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P. Platelets. Cambridge: Elsevier Academic press; 2019. ISBN: 9780128134566.
2. Twomey L., Wallace R.G., Cummins P.M., Degryse B., Sheridan S., Harrison M. et al. Platelets: from formation to function. In: Castanho F.L., Ganes S.D.A., eds. Homeostasis-An Integrated Vision. London: IntechOpen; 2019:71-92. ISBN: 978-1-78985-078-9.
3. Scridon A. Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis. Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications.

- International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21):12772. DOI: 10.3390/ijms232112772.
4. Litvinov R.I., Weisel J.W. Blood clot contraction: Mechanisms, pathophysiology, and disease. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2023; 7(1):100023. DOI: 10.1016/j.rpth.2022.100023.
  5. Petrich B.G., Fogelstrand P., Partridge A.W., Yousefi N., Ablooglu A.J., Shattil S.J. et al. The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (platelet GPIIb-IIIa) activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117(8):2250-9. DOI: 10.1172/JCI31024.
  6. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005; 19(2):111-23. DOI: 10.1016/j.blre.2004.05.002.
  7. Rechner A.R. Platelet function testing in clinical diagnostics. *Hämostaseologie*. 2011; 31(02):79-87. DOI: 10.5482/ha-1133.
  8. Tyagi T., Jain K., Gu S.X., Qiu M., Gu V.W., Melchinger H. et al. A guide to molecular and functional investigations of platelets to bridge basic and clinical sciences. *Nature Cardiovascular Research*. 2022; 1(3):223-7. DOI: 10.1038/s44161-022-00021-z.
  9. Choi J.L., Li S., Han J.Y. Platelet function tests: a review of progresses in clinical application. *BioMed Research International*. 2014; 2014(3):456569. DOI: 10.1155/2014/456569.
  10. Paniccia R., Priora R., Alessandrello Liotta A., Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular Health and Risk Management*. 2015; 11:133-48. DOI: 10.2147/VHRM.S44469.
  11. Luddington R.J. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical and Laboratory Haematology*. 2005; 27(2):81-90. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2005.00681.x.
  12. Bose E., Hravnak M. Thromboelastography: a practice summary for nurse practitioners treating hemorrhage. *The Journal for Nurse Practitioners*. 2015; 11(7):702-9. DOI: 10.1016/j.nurpra.2015.05.006.
  13. Tutwiler V., Peshkova A.D., Andrianova I.A., Khasanova D.R., Weisel J.W., Litvinov R. I. Contraction of blood clots is impaired in acute ischemic stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017; 37(2):271-9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308622.
  14. Peshkova A.D., Malyasyov D.V., Bredikhin R.A., Le Minh G., Andrianova I.A., Tutwiler V. et al. Reduced contraction of blood clots in venous thromboembolism is a potential thrombogenic and embologenic mechanism. *TH Open*. 2018; 2(01):e104-e115. DOI: 10.1055/s-0038-1635572.
  15. Evtugina N.G., Peshkova A.D., Pichugin A.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. Impaired contraction of blood clots precedes and predicts postoperative venous thromboembolism. *Scientific Reports*. 2020; 10(1):1-11. DOI: 10.1038/s41598-020-75234-y.
  16. Tutwiler V., Peshkova A.D., Le Minh G., Zaitsev S., Litvinov R.I., Cines D.B. et al. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019; 17(2):361-70. DOI: 10.1111/jth.14370.
  17. Литвинов Р.И., Пешкова А.Д. Контракция (ретракция) сгустков крови и тромбов: патогенетическое и клиническое значение. *Альманах клинической медицины*. 2018; 46(7):662-71. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-662-671.
  18. Tutwiler V., Litvinov R.I., Lozhkin A.P., Peshkova A.D., Lebedeva T., Ataullakhanov F.I. et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood*. 2016; 127(1):149-59. DOI: 10.1182/blood-2015-05-647560.
  19. Litvinov R.I., Evtugina N.G., Peshkova A.D., Safiullina S.I., Andrianova I.A., Khabirova A.I. et al. Altered platelet and coagulation function in moderate-to-severe COVID-19. *Scientific Reports*. 2021; 11(1):16290. DOI: 10.1038/s41598-021-95397-6.
  20. Jansen E.E., Hartmann M. Clot retraction: cellular mechanisms and inhibitors, measuring methods, and clinical implications. *Biomedicine*. 2021; 9(8):1064. DOI: 10.3390/biomedicine9081064.
  21. Kehrel B.E., Brodde M.F. State of the art in platelet function testing. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013; 40(2):73-86. DOI: 10.1159/000350469.
  22. Reikvam H., Steien E., Hauge B., Liseth K., Hagen K.G., Størkson R. et al. Thrombelastography. *Transfusion and Apheresis Science*. 2009; 40(2):119-23. DOI: 10.1016/j.transci.2009.01.019.
  23. Hartmann J., Murphy M., Dias J.D. Viscoelastic hemostatic assays: moving from the laboratory to the site of care — a review of established and emerging technologies. *Diagnostics*. 2020; 10(2):118. DOI: 10.3390/diagnostics10020118.
  24. Lang T., Toller W., Gütl M., Mahla E., Metzler H., Rehak P. et al. Different effects of abciximab and cytochalasin D on clot strength in thrombelastography. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 2(1):147-53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2004.00555.x.
  25. Liebrecht L.K., Newton J., Martin E.J., Wickramaratne N., Jayaraman S., Han J. et al. Effects of a novel low volume resuscitation solutions on coagulation and platelet function. *PLoS One*. 2019; 14(5):e0215386. DOI: 10.1371/journal.pone.0215386.
  26. Ушакова О.Е., Нечипуренко Д.Ю., Бутылин А.А., Пантелеев М.А. Применение проточных систем в лабораторной диагностике для интегральной оценки системы гемостаза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2018; 17(1):117-29. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-117-129.
  27. Favaloro E.J. Utility of the PFA-100® for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia*. 2001; 7(2):170-9. DOI: 10.1046/j.1365-2516.2001.00486.x.
  28. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194:927-9. DOI: 10.1038/194927b0.
  29. Koltai K., Kesmarky G., Feher G., Tibold A., Toth K. Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(8):1803. DOI: 10.3390/ijms18081803.

---

## REFERENCES

1. Michelson A.D., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P. Platelets. Cambridge: Elsevier Academic press; 2019. ISBN: 9780128134566.
2. Twomey L., Wallace R.G., Cummins P.M., Degryse B., Sheridan S., Harrison M. et al. Platelets: from formation to function. In: Castanho F.L., Ganes S.D.A. eds. Homeostasis-An Integrated Vision. London: IntechOpen; 2019:71-92. ISBN: 978-1-78985-078-9.
3. Scridon A. Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis. Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21):12772. DOI: 10.3390/ijms232112772.
4. Litvinov R.I., Weisel J.W. Blood clot contraction: Mechanisms, pathophysiology, and disease. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2023; 7(1):100023. DOI: 10.1016/j.rpth.2022.100023.
5. Petrich B.G., Fogelstrand P., Partridge A.W., Yousefi N., Ablooglu A.J., Shattil S.J. et al. The antithrombotic potential of selective blockade of talin-dependent integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (platelet GPIIb-IIIa) activation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117(8):2250-9. DOI: 10.1172/JCI31024.
6. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005; 19(2):111-23. DOI: 10.1016/j.blre.2004.05.002.
7. Rechner A. R. Platelet function testing in clinical diagnostics. *Hämostaseologie*. 2011; 31(02):79-87. DOI: 10.5482/ha-1133.
8. Tyagi T., Jain K., Gu S.X., Qiu M., Gu V.W., Melchinger H. et al. A guide to molecular and functional investigations of platelets to bridge basic and clinical sciences. *Nature Cardiovascular Research*. 2022; 1(3):223-37. DOI: 10.1038/s44161-022-00021-z.
9. Choi J.L., Li S., Han J.Y. Platelet function tests: a review of progresses in clinical application. *BioMed Research International*. 2014; 2014(3):456569. DOI: 10.1155/2014/456569.
10. Paniccia R., Priora R., Alessandrello Liotta A., Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vascular Health and Risk Management*. 2015; 11:133-48. DOI: 10.2147/VHRM.S44469.
11. Luddington R.J. Thrombelastography/thromboelastometry. *Clinical & Laboratory Haematology*. 2005; 27(2):81-90. DOI: 10.1111/j.1365-2257.2005.00681.x.
12. Bose E., Hravnak M. Thromboelastography: a practice summary for nurse practitioners treating hemorrhage. *The Journal for Nurse Practitioners*. 2015; 11(7):702-9. DOI: 10.1016/j.nurpra.2015.05.006.



- Practitioners. 2015; 11(7):702-9. DOI: 10.1016/j.nurpra.2015.05.006.
13. Tutwiler V., Peshkova A.D., Andrianova I.A., Khasanova D.R., Weisel, J.W., Litvinov R.I. Contraction of blood clots is impaired in acute ischemic stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017; 37(2):271-9. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308622.
  14. Peshkova A.D., Malyasyov D.V., Bredikhin R.A., Le Minh G., Andrianova I.A., Tutwiler V. et al. Reduced contraction of blood clots in venous thromboembolism is a potential thrombogenic and embologenic mechanism. *TH Open*. 2018; 2(01):e104-e115. DOI: 10.1055/s-0038-1635572.
  15. Evtugina N.G., Peshkova A.D., Pichugin A.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. Impaired contraction of blood clots precedes and predicts postoperative venous thromboembolism. *Scientific Reports*. 2020; 10(1):1-11. DOI: 10.1038/s41598-020-75234-y.
  16. Tutwiler V., Peshkova A.D., Le Minh G., Zaitsev S., Litvinov R.I., Cines D.B. et al. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019; 17(2):361-70. DOI: 10.1111/jth.14370.
  17. Litvinov R.I., Peshkova A.D. Contraction of blood clots and thrombi: pathogenic and clinical significance. *Al'manakh Klinicheskoy Meditsiny*. 2018; 46(7):662-71. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-662-671. (in Russian)
  18. Tutwiler V., Litvinov R.I., Lozhkin A.P., Peshkova A.D., Lebedeva T., Ataulakhanov F.I. et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood. *Blood*, 2016; 127(1):149-59. DOI: 10.1182/blood-2015-05-647560.
  19. Litvinov R.I., Evtugina N.G., Peshkova A.D., Safiullina S.I., Andrianova I.A., Khabirova A.I. et al. Altered platelet and coagulation function in moderate-to-severe COVID-19. *Scientific Reports*. 2021; 11(1):16290. DOI: 10.1038/s41598-021-95397-6.
  20. Jansen E.E., Hartmann M. Clot retraction: cellular mechanisms and inhibitors, measuring methods, and clinical implications. *Biomedicines*. 2021; 9(8):1064. DOI: 10.3390/biomedicines9081064.
  21. Kehrel B.E., Brodde M.F. State of the art in platelet function testing. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2013; 40(2):73-86. DOI: 10.1159/000350469.
  22. Reikvam H., Steien E., Hauge B., Liseth K., Hagen K.G., Størkson R. et al. Thrombelastography. *Transfusion and Apheresis Science*. 2009; 40(2):119-23. DOI: 10.1016/j.transci.2009.01.019.
  23. Hartmann J., Murphy M., Dias J.D. Viscoelastic hemostatic assays: moving from the laboratory to the site of care — a review of established and emerging technologies. *Diagnostics*. 2020; 10(2):118. DOI: 10.3390/diagnostics10020118.
  24. Lang T., Toller W., Gütl M., Mahla E., Metzler H., Rehak P. et al. Different effects of abciximab and cytochalasin D on clot strength in thrombelastography. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 2(1):147-53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2004.00555.x.
  25. Liebrecht L.K., Newton J, Martin E.J., Wickramaratne N., Jayaraman S., Han J. et al. Effects of a novel low volume resuscitation solutions on coagulation and platelet function. *PLoS One*. 2019; 14(5):e0215386. DOI: 10.1371/journal.pone.0215386.
  26. Ushakova O.E., Nechipurenko D.YU., Butylin A.A., Pantelev M.A. Application of flow systems in laboratory diagnostics for the integral evaluation of the hemostatic system. *Voprosy Gematologii/ Onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2018; 17(1):117-29. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-117-129. (in Russian)
  27. Favaloro E.J. Utility of the PFA-100® for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia*. 2001; 7(2):170-9. DOI: 10.1046/j.1365-2516.2001.00486.x.
  28. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; 194:927-9. DOI: 10.1038/194927b0.
  29. Koltai K., Kesmarky G., Feher G., Tibold A., Toth K. Platelet aggregometry testing: molecular mechanisms, techniques and clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(8):1803. DOI: 10.3390/ijms18081803.