

## **Аннотация**

Работа посвящена исследованию активации тромбоцитов с использованием информации о форме клеток в нативном состоянии и под воздействием специфического активатора. Данная информация получается благодаря регистрации сигналов светорассеяния от одиночных частиц и последующем решении обратной задачи. В результате была создана феноменологическая модель активации тромбоцитов, учитывающая вариабельность по чувствительности внутри популяции клеток. Данная модель была опробована для 5-ти различных условно здоровых доноров.

**Тема работы:** Исследование активации тромбоцитов под воздействием химических и физических факторов.

**Состав коллектива:** Литвиненко Алёна Леонидовна, Лаборатория цитометрии и биокинетики ИХКГ СО РАН м.н.с.

## **Научное содержание работы:**

**Постановка задачи:** В рамках данной работы предполагается разработать методики анализа популяций тромбоцитов после воздействия определёнными реагентами и усовершенствовать методику анализа нативных фракций. Одной из основополагающих задач является увеличения точности решения обратной задачи светорассеяния одиночных частиц. Предполагается определиться с формой тромбоцитов, подходящей для решения обратной задачи, а также определиться с размером базы теоритически рассчитанных сигналов светорассеяния от модельных частиц для решения обратной задачи. Далее планируется создать модель поведения популяции тромбоцитов в ответ на активатор (для начала будет взят аденозиндифосфат), используя изменения формы, как маркер активации.

**Современное состояние проблемы:** На текущий момент не существует распространённого метода для оценки состояния тромбоцитов отдельно от белков крови. Все существующие лабораторные тесты для контроля состояния системы гемостаза либо основаны на контроле определённого компонента или цепочки реакций коагуляционного гемостаза, либо оценивают состояние всей системы в целом. Оба подхода достаточно широко используются в медицине. К сожалению, не один из данных подходов не даёт информации о самом начальном этапе свёртывания крови – активации тромбоцитов. Также стоит отметить, что основные антиагрегантные препараты, широко используемые в медицине (аспирин, клопидогрел) работают, в основном, за счёт модулирования активационной способности тромбоцитов.

Существует менее распространённый метод оценки ответа тромбоцитов на специфический агонист – флуоресцентная цитометрия. Данный метод оценивает экспрессию специфических рецепторов в ответ на агонист активации. К сожалению, данный метод требует сложной подготовки пробы, а так существуют свидетельства того, что не все активированные тромбоциты несут на своей поверхности специфические рецепторы по которым можно разделить активированные и не активированные тромбоциты.

Одним из вариантов цитометрии является сканирующая проточная цитометрия. В данном методе используется уникальный прибор – сканирующий проточный цитометр (СПЦ), позволяющий исследовать форму одиночных частиц с высокой скоростью и точностью.

При этом нет необходимости проводить сложную подготовку пробы и долгие измерения для получения достаточной статистики. Достоинством метода является возможность получить информации на прямую о форме тромбоцита, не используя дополнительное окрашивание специфических рецепторов. Данная методика уже опробована для тромбоцитов[1] суть методики заключается в измерении сигналов светорассеяния и последующее решение обратной задачи светорассеяния с использованием базы данных от частиц известной формы.

На текущий момент в качестве формы чаще всего используют сплюснутый сфероид. Но уже существует улучшенная модель формы тромбоцита. Возможно она окажется полезна хотя бы частично. [2]

В то же время первые шаги в разработке методики для нативных тромбоцитов уже сделаны. К сожалению, она не идеальна в том числе из-за ошибок при решении обратной задачи. [3]

1. Moskalensky A.E. и др. Accurate measurement of volume and shape of resting and activated blood platelets from light scattering // J. Biomed. Opt. 2013. Т. 18. № 1. С. 017001–017001.

2. Moskalensky A.E. и др. A physical model of blood platelets shape and its effect on light scattering // 2016 URSI International Symposium on Electromagnetic Theory (EMTS). , 2016. С. 583–585.

3. Litvinenko A.L. и др. Fluorescence-free flow cytometry for measurement of shape index distribution of resting, partially activated, and fully activated platelets // Cytometry A. 2016. Т. 89. № 11. С. 1010–1016.

## **Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.**

Основной целью данной работы является разработка метода оценки чувствительности популяции тромбоцитов крови человека к воздействию специфического активатора. В качестве активатора был выбран аденозиндифосфат (АДФ), так как данный активатор является максимально простым в работе.

Универсальным маркером активации тромбоцитов является изменение формы. В отличие от других маркеров активации (появление специфических рецепторов, к примеру) изменение формы происходит практически всегда при добавлении достаточного количества активатора. Исключением является патологии, когда форма тромбоцитов изначально изменённая.

На сегодняшний день не так много методов, способных регистрировать объёмную форму частиц. Одним из таких методов является метод сканирующей проточной цитометрии. В рамках данного метода измеряется сигнал светорассеяния в зависимости от угла  $\theta$  в сферической системе координат. По углу  $\alpha$  производится интегрирование. Полученный сигнал зависит от параметров частицы (объём, форма, показатель преломления и ориентация) и от известных параметров измерительной системы.

Для определения неизвестных параметров частицы по измеренному сигналу необходимо построить решение обратной задачи светорассеяния, что является ключевым моментов в данной работе. Для этого необходимо знать математически описанную форму исследуемого объекта и подобрать подходящий алгоритм решения. Форму нативного

тромбоцита можно описать несколькими моделями, но самой простой является модель сплюснутого сфероида различных конфигураций. В рамках данной работы форма сфероида была задана двумя параметрами:  $r$ -радиус сферы эквивалентного эквивалентного объёма для фигуры и индексом сплюснутости, связанным с отношением полуосей сфероида. Также дополнительно задавались показатель преломления и угол ориентации тромбоцита относительно освещающего луча (так как сплюснутый сфероид является осесимметричной фигурой, то достаточно задать только один угол) В качестве метода решения обратной задачи использовался метод базы данных. В данном методе прямым перебором сравнивается исходный экспериментальный сигнал с набором теоретических сигналов и находится сигнал, удовлетворяющий условию минимума среднеквадратичного отклонения. ( $CKO = \sum_i (I_i^{th} - I_i^{exp})^2$ ) Параметры, соответствующие

ближайшей теоретической, принимают за параметры рассеивающего объекта. Однако, при недостаточном размере базы данных ближайшая индикатриса может не соответствовать реальной и это приведёт к недостоверному решению обратной задачи, а значит и к неправильному распределению тромбоцитов по форме, что в свою очередь может привести к неправильной характеристике популяции тромбоцитов. Для данной работы использовалась база данных теоретически рассчитанных сигналом светорассеяния методом дискретных диполей с использованием программного обеспечения ADDA. Диапазоны параметров  $r$  0.5-2.12 мкм, индекс формы 0,1-1,  $n$  1,37-1,39, угол ориентации  $\beta$  0-90. Число индикатрис в базе данных 196 548 шт.

С использованием данной базы данных были получены распределения по форме для нативных и активированных тромбоцитов из экспериментально измеренных сигналов светорассеяния. Основываясь на полученных данных была построена феноменологическая модель изменения формы тромбоцитов в процессе активации. Параметры данной модели определялись с использованием

Основываясь на решении обратной задачи разработали феноменологическую модель и охарактеризовали 5 доноров

## Полученные результаты

Для каждого из доноров было измерено больше 5000 индикатрис светорассеяния для нативной популяции тромбоцитов и столько же для тромбоцитов после активации АДФ. Для каждой индикатрисы была решена обратная задача светорассеяния с использованием уплотнённой базы данных сигналов светорассеяния от частиц с формой сплюснутый сфероид и показателем преломления, лежащим в физиологических диапазонах тромбоцитов. Благодаря полученным данным, удалось построить распределения по индексу сплюснутости и определить все параметры феноменологической модели описания чувствительности тромбоцитов к АДФ.

## Иллюстрации, визуализация результатов:

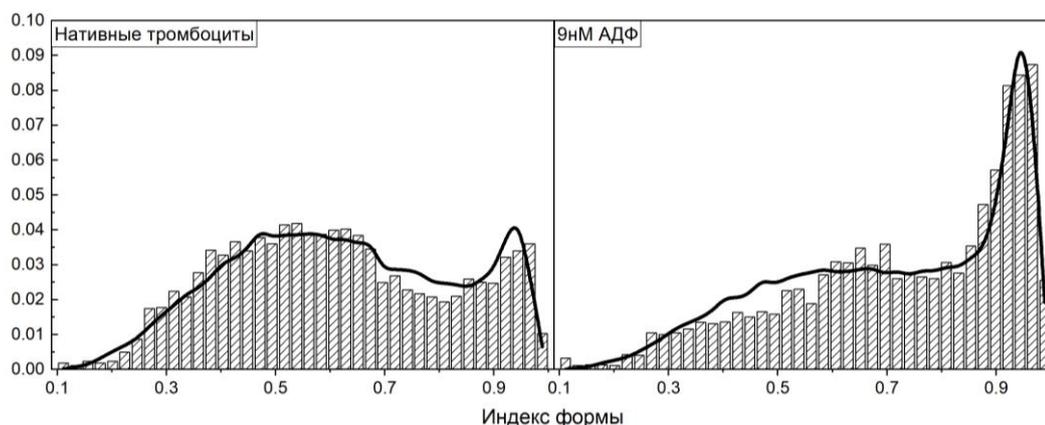


Рис. 1 Распределение тромбоцитов по индексу формы и прохождение кривой феноменологической модели описания чувствительности тромбоцитов к АДФ. (донор 2)

	MPSI-MAX	PSIDW-MAX	MPSI-MIN	PSIDW-MIN	$C_{min}$	ADP <sub>eff</sub> , 10 <sup>9</sup> M	MPS-ADP	PSDW-ADP
<b>Донор 1</b>	0.981± 0.006	0.19	0.470± 0.013	0.35	0.15±0.02	5±0.7	7.09±0.17	1.0
<b>Донор 2</b>	0.961± 0.003	0.05	0.500± 0.007	0.41	0.07± 0.03	1.5±1.3	7.60±0.04	1.4
<b>Донор 3</b>	0.954± 0.003	0.07	0.52± 0.02	0.48	0.055± 0.015	6±0.6	6.4±0.3	2.1
<b>Донор 4</b>	0.979± 0.003	0.03	0.509± 0.014	0.41	0.07± 0.005	7.58±0.15	6.78±0.03	1.1
<b>Донор 5</b>	0.94± 0.02	0.07	0.4890± 0.0003	0.4	0.15± 0.03	2±2	5.2±0.5	2.4

Таб. 1 Параметры феноменологической модели описания чувствительности тромбоцитов к АДФ для 5-ти доноров. MPSI-MIN и PSIDW-MIN среднее значение и ширина бета функции тромбоцитов до активации, MPSI-MAX и PSIDW-MAX среднее значение и ширина бета функции максимальной степени активации, MPS-ADP и PSDW-ADP средний логарифм и ширина распределения чувствительности к АДФ и  $C_{min}$  пороговое значение, после которого начинается изменение формы.

## **Эффект от использования кластера в достижении целей работы**

Использование базы данных при решении обратной задачи светорассеяния является ключевым моментом в решении данной задачи. Благодаря использованию ресурсов кластера удалось существенно уплотнить базу данных в сжатые сроки, что в свою очередь позволило точнее определять параметры рассеивающей частицы.

## **Перечень публикаций**

Litvinenko AL, Nekrasov VM, Strokotov DI, Moskalensky AE, Chernyshev AV, Shilova AN, Karpenko AA, Maltsev VP. Blood platelet quantification by light scattering: from morphology to activation. Anal Methods The Royal Society of Chemistry; 2021;DOI: 10.1039/D1AY00431J (импакт-фактор журнала 2.596), Q2