

## **Аннотация**

Работа посвящена исследованию активации тромбоцитов. В качестве марке активации тромбоцита используется информация о его форме. Для получения параметров формы проводилось измерение сигнала светорассеяния от одиночных тромбоцитов с последующим решением обратной задачи светорассеяния. Для решение обратной задачи светорассеяния важно правильно выбрать оптическую модель исследуемой частицы. В рамках проделанной работы было показано, что переход от широко используемой оптической модели тромбоцита «сплюснутый сфероид» к модели «супер эллипсоид» позволяет точнее определять параметры субпопуляций внутри нативной популяции тромбоцитов. Это предположительно позволит в дальнейшем находить малые отличия между распределениями тромбоцитов условно-здоровых доноров и доноров с известной патологией.

**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.

**Постановка задачи:** В рамках работы предполагается разработать методики анализа популяций тромбоцитов после воздействия определёнными реагентами и усовершенствовать методику анализа нативного распределения по форме. 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 теоретически 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 момент создания проекта):** 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 использующиеся 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, методика обладает рядом недостатков 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 человека к воздействию специфического агониста активации.

Универсальным маркером активации тромбоцитов является изменение формы. В отличие от других маркеров активации (появление специфических рецепторов, к примеру) изменение формы в норме происходит всегда при добавлении достаточного количества агониста активации. Исключением является патологии, когда форма тромбоцитов изначально изменена. Одним из удобных методов регистрации формы живой частицы является метод сканирующей проточной цитометрии. Данный метод основан на измерении сигнала светорассеяния от одиночных частиц с последующим определением параметров этой частицы в результате решения обратной задачи светорассеяния. Решение обратной задачи светорассеяния невозможно без выбора оптической модели исследуемой частицы.

Отчётный этап работы был направлен на усовершенствование оптической модели тромбоцита. Наиболее популярной оптической моделью тромбоцита является модель «сплюснутый сфероид». Такая модель осесимметрична, что позволяет задавать её 4 параметрами (объём, индекс формы, показатель преломления и угол ориентации в потоке). В тоже время, согласно исследованиям формы одиночных тромбоцитов, основным структурным элементом тромбоцита, поддерживающем форму, является периферическое кольцо микротрубочек. Благодаря наличию периферического кольца, часть нативных тромбоцитов больше походят на диски по форме, чем на сплюснутые сфероиды. Оптическая модель, определяемая периферическим кольцом микротрубочек, обладает большим количеством параметров, что затрудняет использование этой модели при решении обратной задачи светорассеяния. Дополнительно, в состоянии сильной активации, на тромбоците появляются множественные псевдоподии, влияние которых на сигнал светорассеяния также не учитываются в рамках оптической модели «сплюснутый сфероид».

Основной задачей отчётного периода являлось расширение модели «сплюснутый сфероид» для учёта влияния периферического кольца микротрубочек на сигнал рассеяния нативных тромбоцитов и появления псевдоподий на сигнал рассеяния от активированных тромбоцитов. В рамках расширения модели сплюснутый сфероид предполагается использовать модель «супер эллипсоид» (Рис.1). Такая модель описывается 5 параметрами (объём, индекс формы, показатель преломления, угол ориентации в потоке и фактор формы  $t$ ), что является

приемлемым числом параметров для определения по сигналу светорассеяния, и включает в себя модель «сплюснутый сфероид», как один из частных случаев.

Основной особенностью модели является сохранение осесимметричный и индекса формы, но увеличение объём фигуры по сравнению с сплюснутым сфероидом для  $t$ , стремящимся к 100.

### Полученные результаты.

Для новой оптической модели была рассчитана база данных теоретических сигналов. Обратная задача светорассеяния была решена для нативных проб тромбоцитов от 5 условно здоровых доноров. Далее для каждой из проб определялись параметры фракционного состава по ранее опубликованному алгоритму (DOI: 10.1002/cyto.a.23003 ). Благодаря изменению оптической модели удалось лучше описать фракционный состав популяции тромбоцитов и уменьшить ошибки определения искомым параметров (Таб. 1). Это предположительно позволит в дальнейшем находить малые отличия между параметрами тромбоцитов условно-здоровых доноров и доноров с известной патологией.

### Иллюстрации, визуализация результатов (опционально)

Рис. 1 Модель «супер эллипсоид» для трёх значений параметра формы.

		%PR	MPSI-R	PSIDW-R	MPSI-PA	PSIDW-PA	%PFA	MPSI-FA	PSIDW-FA
1	*	22 ± 4	0.291 ± 0.013	0.15	0.535 ± 0.017	0.55	16.3 ± 1.8	0.875 ± 0.008	0.13
	**	15.7 ± 1.6	0.196 ± 0.004	0.13	0.479 ± 0.013	0.65	12.7 ± 1.6	0.877 ± 0.009	0.17
2	*	21 ± 3	0.282 ± 0.013	0.15	0.564 ± 0.015	0.51	19.3 ± 1.6	0.898 ± 0.005	0.14
	**	20.1 ± 1.6	0.224 ± 0.006	0.17	0.595 ± 0.013	0.51	12.7 ± 1.2	0.921 ± 0.004	0.13
3	*	8 ± 3	0.25 ± 0.02	0.12	0.66 ± 0.02	0.48	29 ± 2	0.933 ± 0.003	0.09
	**	12.3 ± 1.8	0.234 ± 0.012	0.19	0.701 ± 0.014	0.42	21.3 ± 1.6	0.934 ± 0.002	0.11
4	*	22 ± 2	0.254 ± 0.007	0.12	0.557 ± 0.013	0.55	13.8 ± 1.7	0.897 ± 0.008	0.15

	**	25 ± 2	0.237 ± 0.006	0.12	0.577 ± 0.018	0.54	13 ± 2	0.899 ± 0.011	0.14
5	*	20 ± 3	0.254 ± 0.012	0.13	0.56 ± 0.02	0.54	17 ± 2	0.897 ± 0.008	0.14
	**	28 ± 3	0.233 ± 0.009	0.19	0.58 ± 0.02	0.52	18 ± 3	0.875 ± 0.013	0.14

Таб. 1 параметры фракционного состава нативной пробы тромбоцитов. \* модель «сплюснутый сфероид», \*\* модель «супер эллипсоид».

### Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Благодаря использованию ресурсов кластера удалось в сжатые сроки рассчитать базу данных теоретических «супер эллипсоидов» достаточной плотности. Это позволило улучшить определение параметров субпопуляций тромбоцитов в нативной популяции.

### Перечень публикаций, содержащих результаты работы

Litvinenko, A. L., Nekrasov, V. M., Gilev, K. V., Alexandrov, E. A., Strokov, D. I., Maltsev, V. P., & Yastrebova, E. S. (2024). Determining blood platelet morphology modelled by a superellipsoid from the solution of the inverse light-scattering problem. *Optics & Laser Technology*, 176, 110881. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2024.110881>