УДК 577.31

И. В. Колесникова [1], В. М. Некрасов [2, 3], Т. Н. Шерстова [2, 3], Г. А. Цветовская [3, 4, 6], Е. Д. Чикова [4, 6], В. П. Мальцев [2, 3, 5], А. В. Чернышев [2, 3]

[1] ЗАО «Вектор-Бест»
ул. Пасечная, 3, Новосибирск, 630128, Россия

[2] Институт химической кинетики и горения СО РАН
ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090, Россия

[3] Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

[4] Центр новых медицинских технологий в Академгородке
ул. Пирогова, 25/4, Новосибирск, 630090, Россия

[5] ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
пос. Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

[6] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: chern@ns.kinetics.nsc.ru

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТРОМБОЦИТОВ ПО НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ИХ АГРЕГАЦИИ *

В данной работе предложена методика применения сканирующей проточной цитометрии для исследования динамики агрегации *in vitro* активированных тромбоцитов. В результате для двух доноров определены константа скорости образования первичных агрегатов – димеров, из одиночных тромбоцитов, а также эффективный стерический фактор агрегации, характеризующий степень активации тромбоцитов. В работе раскрывается диагностический потенциал сканирующего проточного цитометра в определении относительных концентраций агрегатов и неагрегированных тромбоцитов в пробе по измеренным сигналам светорассеяния от одиночных частиц и эволюции функции распределения частиц по этим сигналам. Теоретическая обработка экспериментальных кинетических данных проводится на основе моделирования кинетики агрегации частиц с использованием уравнения Смолуховского.

Ключевые слова: тромбоциты, кинетика агрегации, светорассеяние, сканирующий проточный цитометр.

Введение

Тромбоциты в организме являются одним из ведущих компонентов системы остановки кровотечения (гемостаза), поэтому нарушения в ее работе проявляют себя изменением свойств тромбоцитов [1;2]. Содержание тромбоцитов в крови здорового человека колеблется в пределах $(1{,}5–4) \cdot 10^8$ в миллилитре. При концентрации тромбоцитов менее $3 \cdot 10^7$ в миллилитре могут возникать спонтанные кровотечения. Основной функцией тромбоцитов является остановка кровотечения при повреждении кровеносных сосудов. В соответствии с современными представлениями тромбоциты циркулируют в крови в относительно неактивном состоянии и не взаимодействуют друг с другом. Повреждение стенки сосуда запускает каскад процессов, активизирующих тромбоциты, что ведет к образованию тромбоцитарного агрегата и в дальнейшем к образованию сгустка крови, останавливающего кровотечение. В процессе активации тромбоциты меняют форму [3] от дискообразной до почти сферической с образованием изгибов (выростов) мембраны– псевдоподий, и выделяют факторы агрегации [4]. Активи-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 07-04-00356; 08-02-91954), интеграционной программы Сибирского отделения РАН (2009-37; 2009-7), Президиума РАН (2009-27), Президента РФ (НШ-387.2008.4).

© И. В. Колесникова, В. М. Некрасов, Т. Н. Шерстова,
Г. А. Цветовская, Е. Д. Чикова, В. П. Мальцев, А. В. Чернышев, 2009

рование тромбоцитов лежит в основе как нормального гемостаза, так и патологического образования тромбов и диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Нарушения в процессе активации тромбоцитов ведут к тяжелым геморрагиям и являются непосредственным следствием неправильной работы системы гемостаза. Например, нарушения в адгезивно-агрегационных свойствах тромбоцитов проявляются при тромбоцитопениях и тяжелых тромбоцитопатиях в виде резкого увеличения времени кровотечения (кровоточивости). В целом, нарушения могут быть обусловлены либо изменением числа тромбоцитов в кровотоке, либо изменениями в морфологическом строении или функциональном поведении самих тромбоцитов.

Молекулярные механизмы активации и агрегации тромбоцитов изучены, в основном, с помощью флуоресцентно-меченых моноклональных антител [5]. Согласно современным теоретическим представлениям [6], тромбоциты агрегируют посредством взаимодействия своих поверхностных рецепторов (GPIb/IX/V, GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, GPVI) с молекулами лигандов (фибриноген, коллаген, фибриновектин, фактор Виллибранда). Между собой тромбоциты агрегируют посредством образования связей типа «рецептор – лиганд – рецептор», где лигандом выступает молекула фибриногена. Таким образом, процесс агрегации тромбоцитов может быть математически моделирован аналогично реакции антиген-антитело и иммуноагглютинации с использованием кинетического уравнения Смолуховского [7] для процесса агрегации.

Флуоресцентно-меченые антитела составляют основу флуоресцентного метода определения различных отклонений от нормального гомеостаза. Однако себестоимость таких анализов высока из-за дорогостоящих расходных материалов. Поэтому популярными остаются простые методы исследования агрегации тромбоцитов, которые идентифицируют наличие итоговых агрегатов, не вдаваясь в механизм процесса. При этом исследуется изменение кинетики агрегации в ответ на различные химические и физические стимулы. Большинство современных агрегометров основано на турбидиметрическом методе Борна [8], который состоит в измерении зависимости оптической плотности суспензии тромбоцитов от времени при добавлении индукторов агрегации. Хотя точность приборов постоянно улучшается, основной проблемой этого метода являются фундаментальные ограничения возможности определения параметров суспензии по результатам измерения оптической плотности. Оптическая плотность сложным образом зависит от статических характеристик образующих суспензию клеток [9], которые в свою очередь имеют широкие распределения значений внутри популяции [10]. Таким образом, фундаментальные ограничения не позволяют связать изменение оптической плотности с какой-либо характеристикой суспензии тромбоцитов и поэтому не позволяют количественно определять свойства тромбоцитов данным методом.

Более сложные методы анализа суспензий клеток позволяют определять функцию распределения клеток по размерам и тем самым улучшать качество анализа свойств тромбоцитов. К таким методам относятся динамическое светорассеяние (фотон-корреляционная спектроскопия) [11], в основе которого лежит измерение флуктуаций, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале, и малоугловое светорассеяние [12]. Основным фундаментальным ограничением данных методов является использование гомогенной сферы в качестве оптической модели тромбоцитов и их агрегатов. Такая модель существенно отличается от результатов микроскопического анализа тромбоцитов в норме, в активном состоянии и агрегатов, что в свою очередь уменьшает достоверность анализа свойств тромбоцитов, определяемых этими методами. Более того, размеры агрегатов тромбоцитов лежат вне рабочего диапазона метода динамического светорассеяния [13], что не позволяет использовать этот метод для характеризации процесса агрегации.

Авторами данной работы разработан сканирующий проточный цитометр [14] для определения морфологических параметров одиночных частиц по их угловой зависимости (индикатрисе) светорассеяния. Сканирующий проточный цитометр применялся для исследования кинетики начальной стадии латексной иммуноагглютинации и измерения константы скорости димеризации латексных частиц [15]. В данной работе предложена методика использования сканирующего проточного цитометра для исследования кинетики агрегации *in vitro* ак-

тивированных тромбоцитов с целью определения константы скорости димеризации как количественной характеристики степени активации тромбоцитов.

Инструментальная часть

Сканирующий проточный цитометр (СПЦ) позволяет измерять угловую (между падающим и рассеянным светом) зависимость (индикатрису) интенсивности светорассеяния от одиночных частиц (клеток, агрегатов и пр.) со скоростью до 500 частиц в секунду. Текущая конфигурация СПЦ измеряет индикатрису светорассеяния в диапазоне полярных углов от 5 до 60 º, интегрируя светорассеяние по азимутальному углу от 0 до 180 º.

Для подготовки образцов использовалась цельная периферическая венозная кровь из локтевой вены здоровых доноров (без предварительного наложения жгута и массажа предплечья), взятая с помощью шприца в пробирку с антикоагулянтом – 3,8 % раствором цитрата натрия, в соотношении объемов 9 : 1. Далее цельная венозная кровь с антикоагулянтом отстаивалась в течение одного часа при комнатной температуре, чтобы эритроциты успели осесть на дно пробирки. Снятием верхнего слоя с отстоявшейся крови получали обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП). В ОТП добавляли калибровочные полистирольные микросферы (Molecular Probes, USA) диаметром 1 мкм с целью контроля. СПЦ измеряет одиночные частицы последовательно по мере поступления частиц (по одной) в проточную оптическую кювету. Правильная форма сигнала от калибровочной частицы заранее известна. Поэтому, сравнивая наблюдаемый сигнал от калибровочных частиц с ожидаемым, можно судить о правильности и стабильности работы СПЦ в течение всего процесса измерения пробы.

Процесс агрегации тромбоцитов запускали добавлением индуктора агрегации – раствора аденозиндифосфата (АДФ) при концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Начальная концентрация тромбоцитов перед агрегацией устанавливалась одинаковой (путем регулировки степени разбавления) – $6 \cdot 10^{8}$ см$^{-3}$. Остановка процесса агрегации тромбоцитов достигалась следующим образом: через определенные интервалы времени (0, 2, 4, 6, 10 и 15 минут) небольшие порции данной приготовленной смеси разбавляли изотоническим водным буферным раствором хлорида натрия в 200 раз, и полученный раствор (с остановленным процессом агрегации) являлся измеряемой на СПЦ пробой. Время от времени и перед измерением каждая проба мягко перемешивалась пипеткой для предотвращения осаждения образовавшихся агрегатов тромбоцитов и полистирольных микросфер на дно пробирки. Из каждой пробы, поступающей на измерение СПЦ, записывали около четырех тысяч сигналов светорассеяния одиночных частиц. Всего было обследовано два донора.

Математическая модель динамики агрегации тромбоцитов

Динамику необратимой агрегации частиц различной природы можно описать с помощью кинетического уравнения Смолуховского [7]:

$$\frac{dP_i}{dt} = \frac{1}{2}\sum_{j=1}^{i-1} k(j, i-j) P_j P_{i-j} - \sum_{j=1}^{\infty} k(i, j) P_i P_j, \qquad (1)$$

где P_i – концентрация агрегата из i мономеров; $k(i, j)$ – константа скорости слипания агрегата из i мономеров с агрегатом из j мономеров. В силу рецепторного характера связывания [6] реакция слипания тромбоцитов и их агрегатов между собой может рассматриваться как диффузионно-контролируемая контактная реакция между реакционно-анизотропными частицами [16]. Реакционная анизотропия возникает в силу того, что не вся поверхность диффузионно сталкивающихся тромбоцитов доступна для слипания, а только «активные пятна» рецептров (слипание происходит посредством образования фибриногеновых мостиков между рецепторами сталкивающихся тромбоцитов). Тогда константа скорости $k(i, j)$ может быть представлена через произведение диффузионной константы скорости реакции реакционно-изотропных частиц $K_D(i, j)$, слипающихся при первом столкновении, и эффективного стерического фактора β, который мы будем считать независимым от i и j:

$$k(i, j) = \beta\, K_D(i, j). \qquad (2)$$

Если бы клетки и их агрегаты были сферические, то константа $K_D(i, j)$ выражалась бы через их радиусы – R_i и R_j, и коэффициенты диффузии – D_i и D_j, следующим известным образом:

$$K_D(i,j) = 4\pi\left(R_i + R_j\right)\left(D_i + D_j\right). \quad (3)$$

Учитывая, что, согласно формуле Стокса, коэффициент диффузии сферической частицы обратно пропорционален ее радиусу, выражение (3) можно переписать в виде

$$K_D(i,j) = \frac{1}{4}K_D(1,1)\left(R_i + R_j\right)\left(1/R_i + 1/R_j\right). \quad (4)$$

Для несферических частиц и агрегатов формально можно также применять формулу (4), вводя для них некие эффективные столкновительные и диффузионные радиусы. Известно, что агрегаты, образованные при слипании твердых частиц, обычно имеют фрактальную структуру [17]. Фрактальные свойства этих объектов выражаются в том, что если выбрать одну из связанных частиц в качестве центра сферы, радиус которой R существенно превышает размер отдельной частицы, то число частиц i, сосредоточенных внутри сферы, зависит от радиуса, согласно закону

$$i \sim R^d, \quad (5)$$

где параметр d носит название фрактальной размерности объекта. Применим эту модель к нашему случаю и предположим, что эффективный столкновительный и диффузионный радиусы тромбоцитарного агрегата практически равны между собой и связаны с числом мономеров в агрегате, согласно формуле (5). Объединяя формулы (2), (4) и (5) получим:

$$k(i,j) = \frac{1}{4}k(1,1)\left(i^{1/d} + j^{1/d}\right)\left(i^{-1/d} + j^{-1/d}\right). \quad (6)$$

Известно [17], что фрактальная размерность кластера, образующегося в трехмерном пространстве при ассоциации твердых частиц, зависит от характера агрегации и находится в диапазоне от 1,77 (кластер-кластер, броуновское движение) до 3 (частица-кластер, прямолинейная траектория). Предполагая, что в начальный момент времени все частицы были мономерами, а размерность d находится в диапазоне от 1,7 до 3, мы провели численное моделирование решения уравнения (1) с учетом формулы (6) для следующей функции $Y(\tilde{t})$:

$$Y(\tilde{t}) = \frac{1}{P_1(\tilde{t})}\sum_{i=2}^{\infty} P_i(\tilde{t}), \quad (7)$$

где введено безразмерное время $\tilde{t}$:

$$\tilde{t} = t\,k(1,1)P_1(0).$$

Результаты численного моделирования, приведенные на рис. 1, показывают, что при $Y < 3$ функция $Y(\tilde{t})$ не отклоняется от зависимости $Y(\tilde{t}) = \tilde{t}/2$ более чем на 10 % при любом d в диапазоне от 1,7 до 3, что соответствует формуле

$$Y(t) = \frac{1}{2}t\,k(1,1)P_1(0). \quad (8)$$

Таким образом, измеряя кинетику отношения концентраций агрегатов и мономеров в эксперименте, по начальному линейному наклону этой зависимости можно оценить константу скорости первичной элементарной стадии агрегации – димеризации, $k(1,1)$ при достаточно общих предположениях о размерности (а значит, и о структуре) образующихся агрегатов.

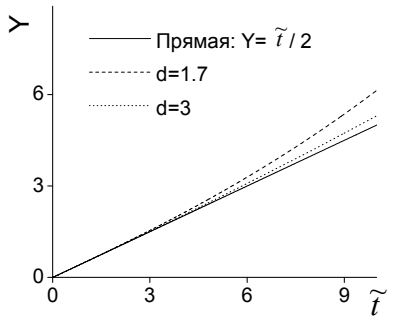


Рис. 1. Численный расчет динамики отношения концентраций агрегатов и мономеров по уравнению Смолуховского, предполагая разные значения размерности d, а также линейная зависимость $Y(t)$

Статистический метод исследования динамики агрегации

Из-за большой вариабельности сигналов светорассеяния от одиночных частиц обычно не удается дискриминировать тромбоциты от агрегатов по одиночным индикатрисам для прямого вычисления функции $Y(t)$ по формуле (7). Очевидно, это связано с большой вариабельностью размеров и форм самих тромбоцитов и их агрегатов. Поэтому для определения относительной доли агрегатов в тромбоцитарной пробе мы выбрали статистический подход. Суть его заключается в наблюдении эволюции функции распределения частиц $N(x)$, по интенсивности их светорассеяния x. Интенсивность светорассеяния определяется как интеграл по времени от измеренного на СПЦ сигнала светорассеяния. Наблюдаемая функция распределения разлагается на три функции распределения соответственно трем основным популяциям в пробе: полимерным мик-

росферам $N_1(x)$, тромбоцитам $N_2(x)$ и агрегатам $N_3(x)$:

$$N(x) = N_1(x) + N_2(x) + N_3(x). \quad (9)$$

При этом предполагается что парциальные функции $N_i(x)$ являются логнормальными с соответствующими параметрами A_i, w_i и $\bar{x}_i$:

$$N_i(x) = \frac{A_i}{xw_i} \exp\left[\frac{(\ln x - \ln \bar{x}_i)^2}{2w_i^2}\right]. \quad (10)$$

В процессе агрегации исчезают одиночные тромбоциты, появляются и растут агрегаты, а полимерные микросферы остаются неизменными. Поэтому мы предполагаем, что при описании эволюции функции распределения (9) некоторые параметры парциальных логнормальных функций остаются неизменными, а другие меняются. А именно, остаются неизменными следующие параметры: w_1, $\bar{x}_1$, w_2, $\bar{x}_2$. Остальные параметры (w_3, $\bar{x}_3$, A_1, A_2, A_3) меняются. Тогда неизменные параметры можно узнать и зафиксировать в начальный момент, когда число агрегатов еще пренебрежимо мало. Таким образом, число неизвестных в задаче разложения существенно сокращается, что повышает точность определения параметров. Искомая функция $Y(t)$ при этом находится из соотношения

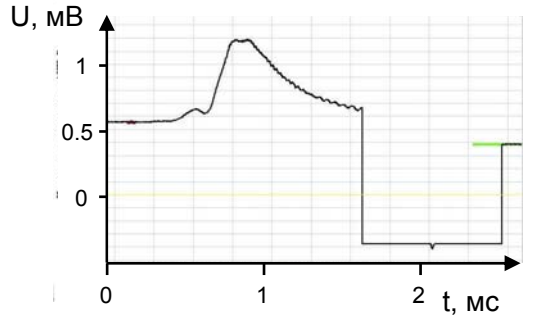
$$Y(t) = A_3 / A_2. \quad (11)$$

Результаты исследования и обсуждение

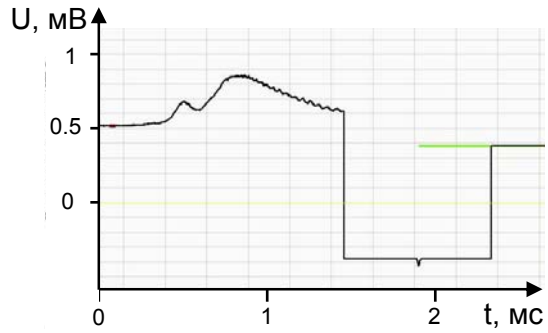
На рис. 2 показаны типичные регистрируемых на СПЦ сигналы светорассеяния от одиночных частиц: калибровочная полистирольная микросфера диаметром 1 мкм, тромбоцит и агрегат.

Прямоугольные «провалы» на рис. 2 означают переключение каналов аналого-цифрового преобразователя (АЦП). В СПЦ есть два разных фотоприемника: «триггерный» для регистрации пересечения частицей поперечного лазерного луча (для привязки по времени прохождения частицей определенной точки измерительной системы СПЦ) и «индикатрисный» для регистрации угловой функции светорассеяния (индикатрисы) одиночной частицы в продольном лазерном луче. Аналоговые сигналы от разных фотоприемников поступают на разные каналы многоканального АЦП с разным нулевым уровнем. Триггерный сигнал запускает (с определенной временной задержкой) переключение каналов между измерением триггера и индикатрисы. В момент такого переключения на выходе АЦП и наблюдается прямоугольный «провал», равный разности нулевых уровней каналов.

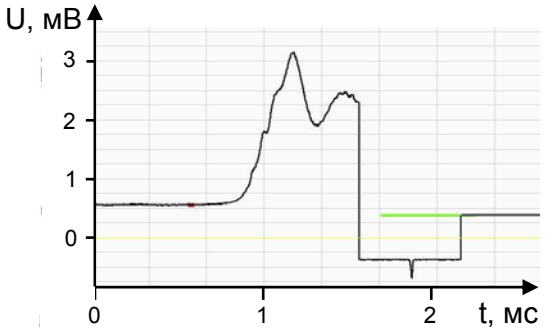
В начальный момент времени в пробе активированных тромбоцитов наблюдаются в основном сигналы от микросфер и тромбоцитов (рис. 2, *а*, *б*). С течением времени начинают появляться, сигналы от агрегатов (рис. 2, *в*).



а



б

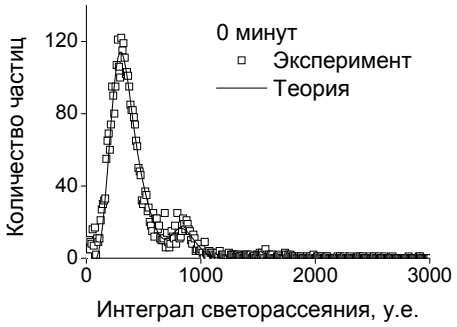


в

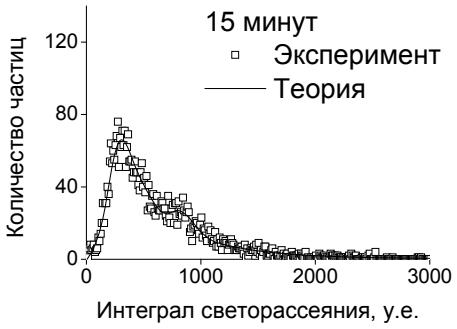
Рис. 2. Сигналы с индикатрисного и триггерного фотоприемников СПЦ при измерении одиночной полистирольной микросферы диаметром 1 мкм (*а*), одиночного тромбоцита (*б*), одиночного агрегата тромбоцитов (*в*)

Примеры получаемой функции распределения по интенсивности сигнала светорассеяния в разные моменты времени агрегации, а также их теоретическая обработка

согласно формулам (9), (10) приведены на рис. 3 Видно хорошее согласие теории и эксперимента. Параметры (и их ошибки) парциальных логнормальных распределений определялись стандартным методом нелинейной регрессии, минимизируя среднеквадратичное отклонение экспериментальной функции распределения от теоретической по алгоритму Левенберга – Марквардта [18]. Проверка на глобальный минимум осуществлялась проведением повторных процедур нелинейной регрессии при других начальных значениях параметров: при этом конечные результаты не менялись при изменении начальных данных, что свидетельствовало об отсутствии нескольких локальных минимумов и достижении глобального минимума среднеквадратичного отклонения. Табл. 1 и 2 показывают полученные таким образом параметры логнормальных распределений в разные моменты времени для обоих доноров. Видно, что параметры парциальных распределений определяются из суммарного распределения с разумной точностью (ошибки параметров



а



б

Рис. 3. Функция распределения частиц по интегралу сигнала светорассеяния вначале агрегации (*а*) и после 15 минут агрегации (*б*)

достаточно малы), что позволяет применить вышеописанный статистический метод определения искомой функции $Y(t)$ по формуле (11).

Полученная временная зависимость относительной концентрации агрегатов в результате теоретической обработки эволюции функций распределения частиц по светорассеянию для двух разных доноров приведена на рис. 4. Линейная аппроксимация функции $Y(t)$ достаточно хорошо описывает экспериментальные данные, как и предсказывает теоретическое моделирование.

Для каждой экспериментальной точки приведены абсолютные ошибки нахождения отношения амплитуд логнормальных распределений при разложении экспериментальных распределений на логнормальные функции (см. рис. 4). При этом относительная погрешность каждой амплитуды не превышала 3 %. Из линейной регрессии экспериментальных данных определялась константа скорости димеризации по формуле (8), зная начальную концентрацию тромбоцитов ($P_1(0) = 6 \cdot 10^8$ см$^{-3}$): для первого донора $k(1,1) = (1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$ см^3/с, для второго донора $k(1,1) = (6,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-12}$ см^3/с. Предельная константа скорости димеризации одинаковых частиц $K_{D,\text{сфер}}(1,1)$, согласно формуле (3), равна

$$K_{D,\,\text{сфер}}(1,1) = 16\pi RD. \qquad (12)$$

Для оценки константы диффузии мы воспользовались следующим выражением:

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\eta R}, \qquad (13)$$

где k_B – константа Больцмана; T – температура; η – вязкость раствора. Формула (13) отличается от известной формулы Стокса – Эйнштейна традиционной эмпирической поправкой [19]: заменой в знаменателе коэффициента 6 коэффициентом 4. При подстановке формулы (13) в формулу (12) получается следующее выражение:

$$K_{D,\,\text{сфер}}(1,1) = \frac{4k_B T}{\eta}.$$

Предполагая известные значения для вязкости и температуры ($\eta = 10^{-3}$ Н·с/м^2, $T = 298$ K), получаем для предельной константы скорости димеризации одинаковых частиц оценку $K_{D,\text{сфер}}(1,1) = 1,5 \cdot 10^{-11}$ см^3/с. Сравнивая это значение с измеренными константами скорости димеризации, можно оценить эффективный стерический фактор

Таблица 1

Параметры (и их ошибки) парциальных логнормальных функций распределения для донора 1

Показатель	Время					
	0 мин	2 мин	4 мин	6 мин	9 мин	14 мин
A_1	1307 ± 72	549 ± 73	317 ± 83	213 ± 69	1173 ± 72	858 ± 58
w_1	0,1026 ± 0,0063	–	–	–	–	–
$\bar{x}_1$	860,7 ± 5,4	–	–	–	–	–
A_2	13331 ± 88	9060 ± 270	6210 ± 660	4160 ± 370	6550 ± 230	3710 ± 180
w_2	0,3803 ± 0,0028	–	–	–	–	–
$\bar{x}_2$	336,0 ± 1,0	–	–	–	–	–
A_3	–	5630 ± 310	8180 ± 650	10780 ± 390	13450 ± 280	11370 ± 220
w_3	–	0,646 ± 0,019	0,508 ± 0,012	0,5682 ± 0,0093	0,726 ± 0,010	0,742 ± 0,010
$\bar{x}_3$	–	557 ± 25	519 ± 23	580 ± 15	579 ± 12	589 ± 12

Таблица 2

Параметры (и их ошибки) парциальных логнормальных функций распределения для донора 2

Показатель	Время					
	0 мин	2 мин	4 мин	6 мин	9 мин	14 мин
A_1	1980 ± 110	2991 ± 91	2840 ± 130	1726 ± 91	1640 ± 150	440 ± 170
w_1	0,186 ± 0,010	–	–	–	–	–
$\bar{x}_1$	676,7 ± 6,5	–	–	–	–	–
A_2	14100 ± 100	11569 ± 69	10792 ± 79	7520 ± 240	7830 ± 560	5480 ± 560
w_2	0,4558 ± 0,0036	–	–	–	–	–
$\bar{x}_2$	256,1 ± 1,1	–	–	–	–	–
A_3	–	1180 ± 160	2260 ± 270	6995 ± 310	6070 ± 590	9870 ± 580
w_3	–	0,253 ± 0,041	0,593 ± 0,070	0,763 ± 0,015	0,642 ± 0,0755	0,626 ± 0,0481
$\bar{x}_3$	–	1273 ± 48	1290 ± 120	487 ± 18	635 ± 43	638 ± 25

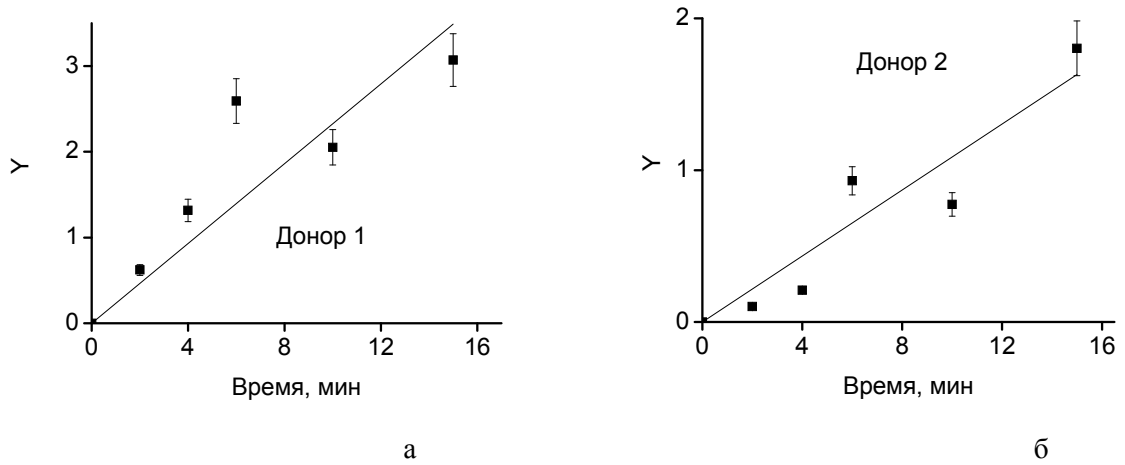


Рис. 4. Зависимость относительной доли агрегатов от времени для первого (*а*) и второго (*б*) доноров (точки – эксперимент, линия – теория)

β, который оказался равным 0,73 ± 0,08 для первого донора и 0,40 ± 0,04 для второго донора. Таким образом, степень активации тромбоцитов у второго донора почти в два раза ниже, чем у первого. В будущем представляется интересным исследовать возможную корреляцию фактора β с различными заболеваниями системы гемостаза.

Заключение

В данной работе предложен статистический метод динамики функции распределения для кинетического исследования процесса агрегации *in vitro* активированных тромбоцитов с использованием сканирующего проточного цитометра, позволяющего измерять светорассеяние от одиночных частиц. В результате была продемонстрирована возможность измерения константы димеризации тромбоцитов и определения эффективного стерического фактора агрегации в качестве количественного параметра степени активированности тромбоцитов. Метод был апробирован на двух добровольных донорах. Оказалось, что у разных доноров эффективный стерический фактор агрегации существенно отличается (в два раза). Полученные данные имеют диагностическое значение при установлении гемостатического статуса организма. Необходимо отметить, что в силу отсутствия в литературе аналогичных данных по константам скорости димеризации тромбоцитов для сравнения с полученными в данной работе можно уверенно говорить пока только об оценке константы скорости, а полученные количественные данные требуют дополнительной проверки и доказательств в последующих публикациях. Необходимы дальнейшие исследования как в направлении совершенствования техники эксперимента, так и в развитии теоретической модели.

Список литературы

1. *Calverley D.*, *Maness L.* Platelet Function in Hemostasis and Thrombosis // Wintrobe's Clinical Hematology / Eds. J. Greer, J. Foerster, J. Lukens. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003. P. 651–675.

2. *Bath P. M. W.*, *Butterworth R. J.* Platelet Size: Measurement, Physiology and Vascular Disease // Blood Coagulation and Fibrinolysi. 1996. Vol. 7. P. 157–161.

3. *Ferrell J. E. Jr.*, *Mitchell K. T.*, *Huestis W. H.* Membrane Bilayer Balance and Platelet Shape: Morphological and Biochemical Responses to Amphipathic Compounds // Biochimica et Biophysica Acta. 1988. Vol. 939. P. 223–237.

4. *Gaffet P.*, *Bettache N.*, *Bienvenüe A.* Transverse Redistribution of Phospolipids during Human Platelet Activation: Evidence for a Vectorial Outflux Specific to Aminophospolipids // Biochemistry. 1995. Vol. 34. P. 6762–6769.

5. *Jackson S.* The Growing Complexity of Platelet Aggregation // Blood. 2007. Vol. 109. P. 5087–5095.

6. *Воронина Е. Н.*, *Филипенко М. Л.*, *Сергеевичев Д. С.*, *Пикалов И. В.* Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10, № 3. С. 553–563.

7. *Goodisman J.*, *Chaiken J.* Scaling and the Smoluchowski Equations // J. Chem. Phys. 2006. Vol. 125. P. 074304:1–7.

8. *Born G. V. R.* Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal // Nature. 1962. Vol. 194. P. 927–929.

9. *Bohren C. F.*, *Huffman D. R.* Absorption and Scattering of Light by Small Particles. N. Y.: Wiley, 1983. 541 p.

10. *Kolesnikova I. V.*, *Potapov S. V.*, *Yurkin M. A.*, *Hoekstra A. G.*, *Maltsev V. P.*, *Semyanov K. A.* Determination of Volume, Shape and Refractive Index of Individual Blood Platelets // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. 2006. Vol. 102. P. 37–45.

11. *Clark N. A.*, *Lunacek J. H.*, *Benedek G. B.* A Study of Brownian Motion Using Light Scattering // Am. J. Phys. 1970. Vol. 38. No 5. P. 575–585.

12. *Mindukshev I.*, *Jahatspanian I.*, *Goncharov N.*, *Jenkins R.*, *Krivchenko A.* A New Method for Studying Platelets, Based upon the Low-Angle Light Scattering Technique. 1: Theoretical and Experimental Foundations of the Method // Spectroscopy. 2005. Vol. 19. P. 235–246.

13. *Maurer-Spurej E.*, *Brown K.*, *Labrie A.*, *Marziali A.*, *Glatter O.* Portable Dynamic Light Scattering Instrument and Method for the Measurement of Blood Platelet Suspensions // Physics in Medicine and Biology. 2006. Vol. 51. P. 3747–3758.

14. *Maltsev V. P.* Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // Review of

Scientific Instruments. 2000. Vol. 71. P. 243–255.

15. *Surovtsev I. V.*, *Yurkin M. A.*, *Shvalov A. N.*, *Nekrasov V. M.*, *Sivolobova G. F.*, *Grajdantseva A. A.*, *Maltsev V. P.*, *Chernyshev A. V.* Kinetics of the Initial Stage of Immunoagglutination Studied with the Scanning Flow Cytometer // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2003. Vol. 42. No. 3. P. 245–255.

16. *Ivanov K. L.*, *Lukzen N. N.* Diffusion-influenced Reactions of Particles with Several Active Sites // J. Chem. Phys. 2008. Vol. 128. P. 155105:1–5.

17. *Смирнов Б. М.* Свойства фрактального агрегата // УФН. 1989. Т. 157, № 2. С. 357–360.

18. *Демиденко Е. В.* Оптимизация и регрессия. М.: Изд-во «Наука», 1989. 296 с.

19. *Воробьев А. Х.* Диффузионные задачи в химической кинетике. М.: Изд-во МГУ, 2003. 98 с.

Материал поступил в редколлегию 05.03.2009

I. V. Kolesnikova, V. M. Nekrasov, T. N. Sherstova, G. A. Tsvetovskaya, E. D. Chikova, V. P. Maltsev, A. V. Chernyshev

DETERMINATION OF DYNAMICAL CHARACTERISTICS OF THROMBOCYTES THROUGH INITIAL STAGE OF THEIR AGGREGATION

In the work, a method of application of scanning flow cytometry for investigation of the aggregation dynamics of *in-vitro* activated thrombocytes is presented. As a result, the rate constant of creation of initial aggregates, – dimers, – from single thrombocytes, and the effective steric factor of aggregation, which characterized the thrombocytes activation degree, are determined. The study reveals diagnostic potential of the scanning flow cytometer in determination of relative concentrations of aggregates and non-aggregated thrombocytes in a sample by measuring light-scattering signals from single particles and evolution of the distribution function of the particles on the signals. Theoretical treatment of the experimental data is based on modeling the particles aggregation kinetics with the use of Smoluchovski equation.

Keywords: thrombocytes, aggregation kinetics, light scattering, scanning flow cytometer.