

На правах рукописи

АВТАЕВА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК КРОВИ С АДГЕЗИВНОЙ БЕЛКОВОЙ
ПОВЕРХНОСТЬЮ В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ПОТОКА И
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДИАГНОСТИКИ НАРУШЕНИЙ КЛЕТОЧНОГО
ГЕМОСТАЗА НА ОСНОВЕ МИКРОФЛЮИДНОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика»

3.1.28 «Гематология и переливание крови»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор биологических наук

Масенко Валерий Павлович
Габбасов Зуфар Ахнафович

Официальные оппоненты:

Васильев Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, врач-гематолог Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ройтман Александр Польевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования Российской медицинской академии непрерывного медицинского образования Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в ____, на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России (121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А) и на сайте <http://cardioweb.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Ускач Татьяна Марковна

Введение. Актуальность проблемы. Гемостаз – процесс остановки кровотечения в месте повреждения сосуда и поддержания целостности сосудистой стенки за счет образования тромба. Гемостаз – физиологический процесс, который регулируется сложными взаимодействиями между факторами свертывания крови и клеточными элементами сосудистой стенки и крови (эндотелиальными клетками, тромбоцитами и т.д.). Повреждение сосудистой стенки, при котором обнажается субэндотелиальный матрикс, запускает процесс гемостаза. Гемостаз и тромбоз – процессы, связанные с ответом на повреждение сосудов, но гемостаз направлен на защиту организма от потери крови, а тромбоз – ключевой фактор патогенеза некоторых сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваний. Как следствие, хронические сосудистые заболевания могут приводить к образованию внутрисосудистых закупоривающих тромбов, обычно вызванных возникновением дестабилизирующих явлений, таких как внезапный разрыв атеросклеротической бляшки [Ruggeri Z.M., 2009]. Тромбоциты адгезируют на месте повреждения сосуда, запуская последующую агрегацию их друг с другом, необходимую для достижения гемостаза. В любом случае, адгезионные взаимодействия, опосредованные специфическими мембранными рецепторами, такими как GP Ib, GP IIb/IIIa (интегрин $\alpha IIb\beta 3$) и GP VI [Chen Y., Ju L.A., 2020], поддерживают первоначальное прикрепление тромбоцитов к сосудистой стенке. Поэтому адгезия тромбоцитов к структурам сосудистой стенки, друг к другу или к другим клеткам – грани одного и того же фундаментального процесса, зависящего от условий потока крови [Trevisan B.M. et al, 2020].

Среди молекулярных взаимодействий, регулирующих адгезию тромбоцитов, значительный интерес представляет взаимодействие тромбоцитов с фактором фон Виллебранда (ФВ). ФВ – мультимерный гликопротеин плазмы крови, который присутствует в эндотелиальных клетках, мегакариоцитах, тромбоцитах и соединительной ткани. Он опосредует адгезию тромбоцитов в условиях артериального кровотока. Помимо участия в адгезии тромбоцитов, ФВ также связывает и защищает от деградации фактор свертывания крови VIII [Löf A. et al, 2018]. Недавно было показано, что ФВ участвует в воспалительных процессах, опосредуя связь между гемостазом, тромбозом и воспалением. Мультимеры ФВ и тромбоциты, прикрепленные к поврежденному или активированному эндотелию опосредуют рекрутирование лейкоцитов, что создает условия для распространения воспалительной реакции [Chen J., Chung D.W., 2018]. В

исследованиях последних лет было показано, что молекулы ФВ активируются в условиях потока, то есть способны к гидродинамической активации, изменяя свою конформацию с глобулярной на фибриллярную при скоростях сдвига выше 5000 с⁻¹ [Schneider S.W. et al, 2007]. Активация молекул ФВ делает доступными места связывания ФВ с коллагенами, тромбоцитами, лейкоцитами, металлопротеиназой ADAMTS-13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 13 – дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1-го типа, 13). Гидродинамические силы влияют и на функциональное состояние тромбоцитов. Связывание молекул ФВ с механо-чувствительным доменом GP Ib тромбоцитов способствует запуску каскада внутриклеточной сигнализации и, в конечном итоге, приводит к активации тромбоцитов [Chen Y., Ju L.A., 2020]. Этот механо-сигнальный путь усиливает внешнее механическое воздействие тока крови на GP IIb/IIIa тромбоцитов, способствуя его переходу в активное состояние [Chen Y. et al, 2019]. Активированный GP IIb/IIIa взаимодействует и с фибриногеном, и с ФВ, поддерживая агрегацию тромбоцитов. Тем самым, фактор фон Виллебранда – ключевой игрок клеточного гемостаза в условиях потока, в присутствии высоких скоростей сдвига.

Нарушение функций фактора фон Виллебранда, врожденные дефекты, дефицит синтеза его мультимеров или усиление протеолиза приводят к спонтанным кровотечениям, например, при болезни фон Виллебранда, или к криптогенным желудочно-кишечным кровотечениям, как при синдроме Heyde [Blackshear J.L., 2019, Calmette L., Clauser S., 2018]. В последние годы появились данные о том, что патологическая активация ФВ может приводить к развитию тромботических осложнений ишемической болезни сердца (ИБС) [Kato Y. et al, 2018]. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), особенно ее тяжелое течение, характеризуется повышенным риском тромбоэмболических осложнений. Анализ секционных данных умерших от COVID-19 пациентов указывает на тромботические изменения не только в макрососудах (тромбоэмболия легочной артерии, венозные тромбозы), но и в микрососудах альвеолярных капилляров. Было выявлено, что у больных с COVID-19 повышается количество ФВ в плазме, в следствии повреждения эндотелия, и снижается активность ADAMTS-13. Соответственно, было показано, что при COVID-19 происходит изменение в оси ФВ/ADAMTS-13 [Maharaj S. et al, 2021]. При этих патологиях тромбоциты

функционально активны, но нарушение функций фактора фон Виллебранда приводит к изменению зависимо от этого белка процесса адгезии тромбоцитов.

Таким образом, вклад активации фактора фон Виллебранда и функциональная оценка адгезии тромбоцитов, особенно в условиях потока, имитирующих поток крови в сосудах, могут быть информативными критериями в фундаментальных медико - биологических исследованиях, в лабораторной диагностике и мониторинге антитромбоцитарной терапии. Современные исследования механизмов адгезии и агрегации тромбоцитов и функционального состояния ФВ должны выходить за пределы статических условий и начинать учитывать реологические переменные, которые влияют на процессы гемостаза и тромбоза.

Цель исследования: оценка взаимодействия клеток крови с белковой поверхностью в условиях контролируемого потока и разработка микрофлюидной системы для диагностики нарушений клеточного гемостаза.

Задачи исследования:

1. Апробировать микрофлюидную систему для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковой поверхности (фибриноген, коллагены) в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в условиях контролируемого потока.
2. Исследовать методами световой микроскопии (в том числе, флуоресцентной) клеточный и белковый состав структур, образовавшихся в результате взаимодействия образцов крови с белковыми поверхностями, в разработанной микрофлюидной системе в условиях контролируемого потока.
3. Оценить кинетику адгезии клеток крови на белковую поверхность (фибриноген) в условиях потока в образцах цельной крови у больных с синдромом Heyde.
4. Оценить кинетику адгезии клеток крови на поверхность, покрытую белком (фибриноген), у больных с ИБС в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в потоке при скоростях сдвига, характерных для коронарных артерий.
5. Оценить кинетику адгезии клеток крови на поверхность, покрытую белком (фибриноген) в образцах цельной крови у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в условиях потока.

Научная новизна. Впервые будет создана и апробирована микрофлюидная система регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивной белковой поверхности в условиях контролируемого потока в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и

цельной крови. Впервые будет исследован белково-клеточный состав структур, образовавшихся в результате взаимодействия образцов крови с белковыми поверхностями, в условиях контролируемого потока. Впервые будет оценено влияние ФВ на адгезию клеток крови к покрытой адгезивным белком поверхности в условиях потока у пациентов с ИБС, с синдромом Heyde, у больных с COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость. Создание микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к поверхности, покрытой белком (фибриноген, коллагены), позволит оценивать влияние ФВ на адгезию клеток крови к белковой подложке в условиях потока. Также система поможет определить клеточный и белковый состав структур, образующихся в потоке в результате взаимодействия крови с белковой поверхностью. Определение роли гидродинамической активации ФВ и его вклада в развитие желудочно-кишечных кровотечений у пациентов с синдромом Heyde и тромботических осложнений у пациентов с ИБС будет способствовать получению новых диагностических данных. Исследование вклада взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов в адгезию клеток крови к белковой поверхности в потоке у пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) позволит внести вклад в изучение патогенеза COVID-19.

Методология и методы исследования. В основу методологии и теоретической части исследования легли данные, представленные в работах отечественных и зарубежных авторов, а также в научных трудах в области клинической лабораторной диагностики, гематологии и кардиологии. В них особое внимание уделялось исследованиям структуры и функций фактора фон Виллебранда, принципам диагностики и терапии болезней, ассоциированных с ФВ, а также микрофлюидным технологиям.

Положения, выносимые на защиту:

1. Микрофлюидная система позволяет в реальном времени регистрировать кинетику адгезии клеток крови к белковой поверхности в обогащенной тромбоцитами плазме и цельной крови в условиях контролируемого потока.
2. В результате взаимодействия образцов крови с поверхностью, покрытой коллагеном I типа, в микрофлюидной системе в условиях потока, образуются белково-клеточные структуры, которые состоят из тромбоцитов и фактора фон Виллебранда с многочисленными включениями лейкоцитов.

3. Исследование кинетики адгезии клеток крови к фибриногену при высоких скоростях сдвига в образцах цельной крови позволяет выявлять нарушения гемостаза у больных с синдромом Heyde.

4. Изучение адгезии клеток крови к фибриногену в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови при скоростях сдвига, характерных для коронарных артерий, позволяет исследовать нарушения гемостаза у больных с ИБС.

5. Оценка адгезии клеток крови к фибриногену в условиях потока в образцах цельной крови позволяет выявлять нарушения гемостаза у больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

Степень достоверности. Достоверность и обоснованность выводов, полученных в результате исследования, подтверждены изучением научной литературы, использованием соответствующей методологии, также тщательным анализом данных, собранных в процессе диссертационного исследования.

Апробация результатов. Апробация диссертационной работы состоялась на заседании межотделенческой конференции ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России 09 декабря 2021 года (протокол №85). Диссертация рекомендована к защите.

Публикации результатов исследования. По теме диссертационного исследования опубликована 21 научная работа, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований (2 в международных журналах), 1 глава в монографии и 2 патента на изобретение. Основные положения диссертации докладывались на нескольких российских и зарубежных конгрессах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 112-ти страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Список литературы включает 149 источников. Текст диссертации иллюстрирован 26-ю рисунками и содержит 1 таблицу.

Личный вклад автора. Автором работы проведен анализ литературы, посвященной изучаемой проблеме, разработана концепция исследования. Автором разработан метод регистрации адгезии клеток крови к белковой поверхности в условиях потока. Автором исследована адгезии клеток крови к фибриногену и коллагену у здоровых добровольцев и больных. Автором осуществлена обработка результатов со

статистическим анализом, написаны статьи и тезисы, подготовлен текст диссертации, разработаны практические рекомендации.

Основное содержание работы

Материалы и методы

Объем исследования и критерии включения здоровых добровольцев и пациентов.

Все исследования были проведены с использованием информированного согласия пациентов и одобрены Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ России.

Здоровые добровольцы. 28 здоровых добровольцев (18 мужчин, 10 женщин) в возрасте 37 ± 14 лет. Здоровыми считали добровольцев, у которых отсутствовали клинические проявления заболеваний крови и сердечно-сосудистых заболеваний, так же они не принимали никаких препаратов, влияющих на систему гемостаза. Все здоровые добровольцы за 48 часов до исследований не принимали нестероидных противовоспалительных препаратов и алкоголь.

Синдром Heyde. 6 больных (2 мужчины, 4 женщины) в возрасте 76 ± 9 лет со стенозом аортального клапана со средним трансклапанным градиентом давления (ΔP_m) ≥ 40 мм.рт.ст., пиковой скоростью тока через аортальный клапан (V_{max}) ≥ 4 м/с и с желудочно-кишечным кровотечением или с состоявшимся желудочно-кишечным кровотечением в анамнезе (синдром Heyde по клиническим признакам) и 7 больных (2 мужчины, 5 женщин) без желудочно-кишечного кровотечения в возрасте 72 ± 4 года. Всем больным предстояла операция по протезированию аортального клапана в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ.

Ишемическая болезнь сердца. 22 больных с ИБС мужского пола в возрасте 52 ± 7 лет, наблюдавшиеся в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ, у которых возраст возникновения первого события ИБС был 46 ± 8 лет.

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19). 17 пациентов (5 мужчин, 12 женщин) с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в возрасте 64 ± 11 лет.

В исследования не включались пациенты в первые 2 месяца после перенесённого инфаркта миокарда, с острым нарушением мозгового кровообращения, с хроническими аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, со злокачественными новообразованиями, с наследственными тромбоцитопатиями, гемофилией, тромбоцитопениями, дефицитами других факторов свертывания крови.

Методы исследования. Цельную кровь у здоровых добровольцев и пациентов отбирали из локтевой вены с помощью системы S-Monovette (Германия), содержащей 3,2% цитрата натрия в соотношении антикоагулянт/кровь 1/9 или 100 мкМ РРАСК (D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone) в соотношении антикоагулянт/кровь 1/10. ОТП получали центрифугированием цельной крови при 200g в течение 5-ти минут. Плазменный уровень фактора фон Виллебранда определяли методом иммуноферментного анализа [Янушевская Е.В. и др., 2005]. Подсчет количества клеток крови в ОТП и цельной крови производили на гематологическом анализаторе Abacus Junior B (Diatron Ltd., Австрия).

Микрофлюидная система для регистрации кинетики адгезии клеток крови к адгезивному белковому покрытию в условиях потока. Для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковым поверхностям в условиях контролируемого потока была разработана микрофлюидная система (рис. 1), имитирующая кровоток в кровеносных сосудах, состоящая из оптической подложки, двух фотодетекторов (ФД), управляемого компьютером перистальтического насоса Р625 (Instech Laboratories, Inc., США), аналого-цифрового преобразователя (АЦП) «Е-14-140М» (L-Card, Россия) и полупроводникового лазера с длиной волны излучения $\lambda = 650$ нм.

Взаимодействие клеток крови с оптической подложкой в тонком пристеночном слое (толщиной до 400 нм) осуществлялось в проточной камере, которая состояла из стеклянной оптической подложки, покрытой фибриногеном или коллагеном, корпуса из оргстекла, создающей канал для потока крови или ОТП. Принцип регистрации адгезированных к белковой поверхности клеток крови заключался в том, что лазерное излучение, падающее на границу оптических сред стекло–плазма крови при углах падения более критического, полностью отражалось от поверхности подложки по закону полного внутреннего отражения и регистрировалось фотоприемником ФД₁.

Тем не менее, отраженный свет проникал в образец цельной крови или ОТП за зону отражения на глубину примерно 400 нм и при адгезии клеток крови на оптическую подложку взаимодействовал с ними, вызывая изменения в интенсивности отраженного и рассеянного излучения, которые регистрировались двумя фотоприемниками (ФД₁ - интенсивность отраженного света, ФД₂ - интенсивность рассеянного света).

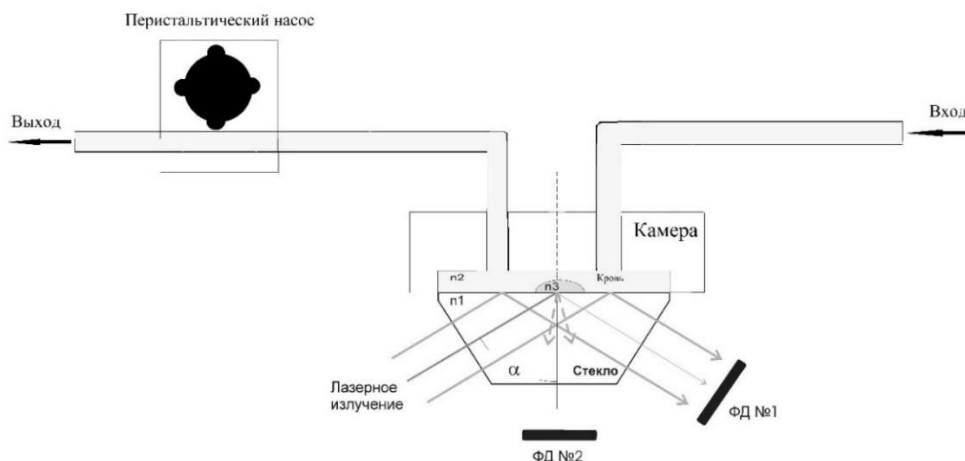


Рисунок 1. Схема микрофлюидной системы для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковой поверхности. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) или цельная кровь попадала в проточную камеру с помощью управляемого компьютером перистальтического насоса. ФД₁ – фотодетектор №1, ФД₂ – фотодетектор №2.

В процессе исследования адгезии клеток крови циркуляция ОТП через проточную камеру происходила со скоростью сдвига 1700 с^{-1} . Расчет сдвиговых скоростей при использовании образцов ОТП был произведен по формуле:

$$\gamma = \frac{6 \cdot Q}{L \cdot H^2};$$

где Q – расход ОТП в единицу времени, L – ширина проточной камеры (0,3 см), H – высота проточной камеры (0,01 см) [Kroll M.H. et al, 1996]. Произвести расчет значений скоростей сдвига в случае использования образцов цельной крови на данный момент невозможно, так как не существует необходимых формул и условий. Поэтому в данной работе расчет значений скоростей сдвига при циркуляции образцов цельной крови через проточную камеру не был произведен.

Степень адгезии клеток крови оценивали путем измерения увеличения интенсивности рассеянного и снижения интенсивности отраженного лазерного излучения от оптической подложки камеры в течение 15-ти минутной циркуляции образцов цельной крови и ОТП через проточную камеру при скорости сдвига (γ) 1700 с^{-1} . Непосредственно перед исследованиями адгезии клеток крови к фибриногену в образцах ОТП и цельной крови тромбоциты активировали 5 мкМ АДФ. Для исследования адгезии клеток крови к коллагену I типа в образцах цельной крови предварительная активация тромбоцитов не требовалась. Вклад взаимодействия FВ и GP Ib рецепторов тромбоцитов в адгезию

клеток крови исследовали блокированием с помощью добавления мАт к GP Ib (10 мкг/мл) в образцы ОТП и цельной крови здоровых добровольцев и пациентов. Вклад взаимодействия GP Ib/IIIa рецепторов тромбоцитов с фибриногеном – с помощью блокирования Fab₂ фрагментов мАт к GP Ib/IIIa (20 мкг/мл).

Окрашивание образцов в проточной камере, образовавшихся в результате взаимодействия цельной крови с белковой поверхностью. Образцы в проточной камере, образовавшиеся в результате циркуляции цельной крови здорового добровольца в течении 15 минут, фиксировали 3,7% раствором формалина. После фиксации образцов проводили их окрашивание по методу Гимза. Тромбоциты в цельной крови окрашивали акридиновым оранжевым (АО) непосредственно перед началом эксперимента. ФВ окрашивали путем инкубации образцов в проточной камере с мышинными мАт против ФВ. Далее эти образцы инкубировали с флуоресцеином изотионатом (ФИТЦ)-мечеными козьими анти-мышинными мАт. После этого образцы в проточной камере инкубировали с 0,5% раствором Triton X-100. Далее их инкубировали с DAPI. Все образцы исследовали под флуоресцентным микроскопом Leica DM 5000 B с цифровой камерой (DFC 420 C).

Статистика. Статистические данные для значений с асимметричным распределением были представлены через медиану (верхний квартиль, нижний квартиль). Сравнение результатов исследования проводилось U-критерием Манна-Уитни для сравнения двух групп и критерием Краскела-Уоллиса ANOVA для сравнения трёх и более групп пациентов. Различия считались статистически значимыми, если нулевая гипотеза не подтверждалась с вероятностью >95%. Для анализа использовалось программное обеспечение STATISTICA версии 6.0 (StatSoftInc., США).

Результаты исследования и их обсуждение

Для проверки разработанной методики на основе микрофлюидной технологии и возможности ее применения для анализа адгезии клеток крови у пациентов, вначале была произведена оценка адгезии клеток крови к поверхности, покрытой фибриногеном или коллагеном, в ОТП и цельной крови здоровых добровольцев. Далее возможность применения методики была оценена при исследовании адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови пациентов с синдромом Heyde, ИБС и COVID-19.

Адгезия тромбоцитов к фибриногеновой поверхности в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови здоровых добровольцев. На начальном этапе

была проведена апробация разработанной микрофлюидной системы для исследования адгезии клеток крови к фибриногену в ОТП и цельной крови здоровых добровольцев.

На рисунке 2 представлены типичные кривые адгезии клеток крови к покрытой фибриногеном поверхности проточной камеры в образцах ОТП и цельной крови одного и того же здорового добровольца. Как видно из представленных результатов наибольшие изменения интенсивности рассеянного света, регистрируемого на ФД₂, были зарегистрированы в случае использования образцов цельной крови, а не ОТП (рис. 2А, кривые 1 и 2, соответственно). Аналогичные изменения оптического сигнала при циркуляции цельной крови и ОТП через проточную камеру наблюдались при регистрации отраженного лазерного излучения на ФД₁ (рис. 2Б). Блокирование GP IIb/IIIa тромбоцитов путем добавления мАт в образцы цельной крови или ОТП способствовало значительному ингибированию адгезии клеток крови в цельной крови и полному блокированию адгезии клеток крови в ОТП, что приводило к соответствующим изменениям интенсивности оптического сигнала на фотодетекторе ФД₁ и ФД₂ (рис. 2, кривые 3 и 4, соответственно).

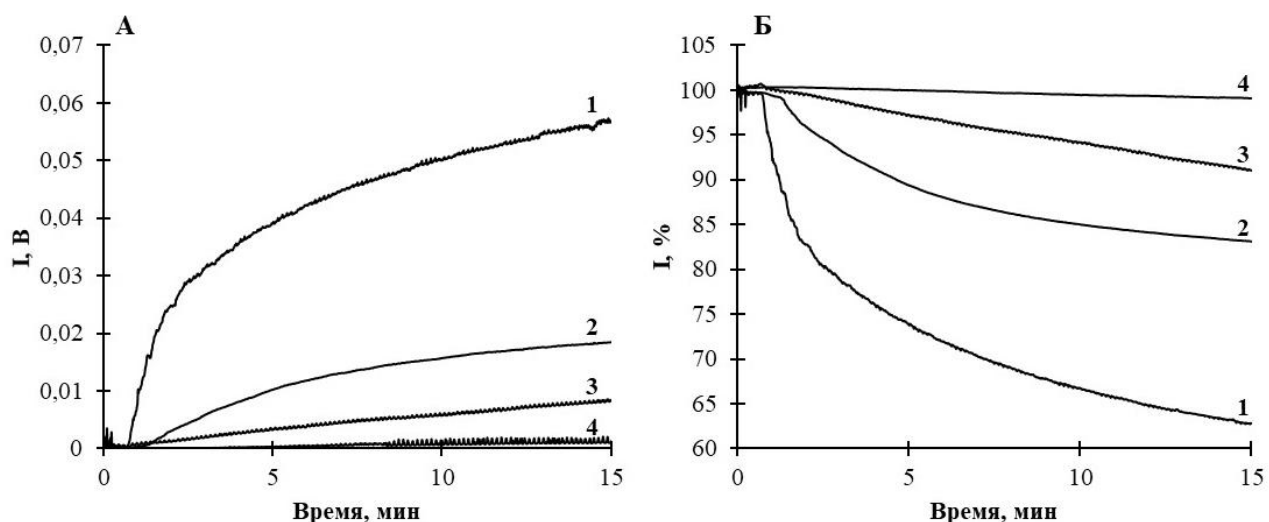


Рисунок 2. Изменение интенсивности рассеянного лазерного излучения (А) и отраженного лазерного излучения (Б) при адгезии тромбоцитов к фибриногеновой подложке в условиях потока в образцах ОТП и цельной крови. Концентрация тромбоцитов в образцах ОТП и цельной крови составляла $200 \cdot 10^3/\text{мкл}$ и $100 \cdot 10^3/\text{мкл}$, соответственно. 1 – цельная кровь; 2 – ОТП; 3 – цельная кровь + мАт к GP IIb/IIIa; 4 – ОТП + мАт к GP IIb/IIIa. I – интенсивность лазерного излучения рассеянного (В) и отраженного (%).

На рисунке 3 представлены статистические данные, полученные при исследовании роли GP IIb и GP IIb/IIIa в адгезии тромбоцитов к фибриногену в образцах ОТП ($n = 10$)

здоровых добровольцев. Средняя концентрация ФВ в плазме составляла 82 ± 38 %. При регистрации изменений интенсивности рассеянного лазерного излучения на ФД₂ степень ингибирования тромбоцитарной адгезии после предварительной инкубации образцов ОТП с мАт к GP Ib составляла 19,6 % (-1,8; 57,6), после добавления мАт к GP IIb/IIIa – 82,8 % (74,7; 89,7) (рис. 3А). При регистрации изменений интенсивности отраженного лазерного излучения на ФД₁ степень адгезии тромбоцитов после блокирования GP Ib с помощью мАт составляла 22 % (3,2; 52,8), после блокирования GP IIb/IIIa – 86,2 % (77,3; 94,7) (рис. 3Б).

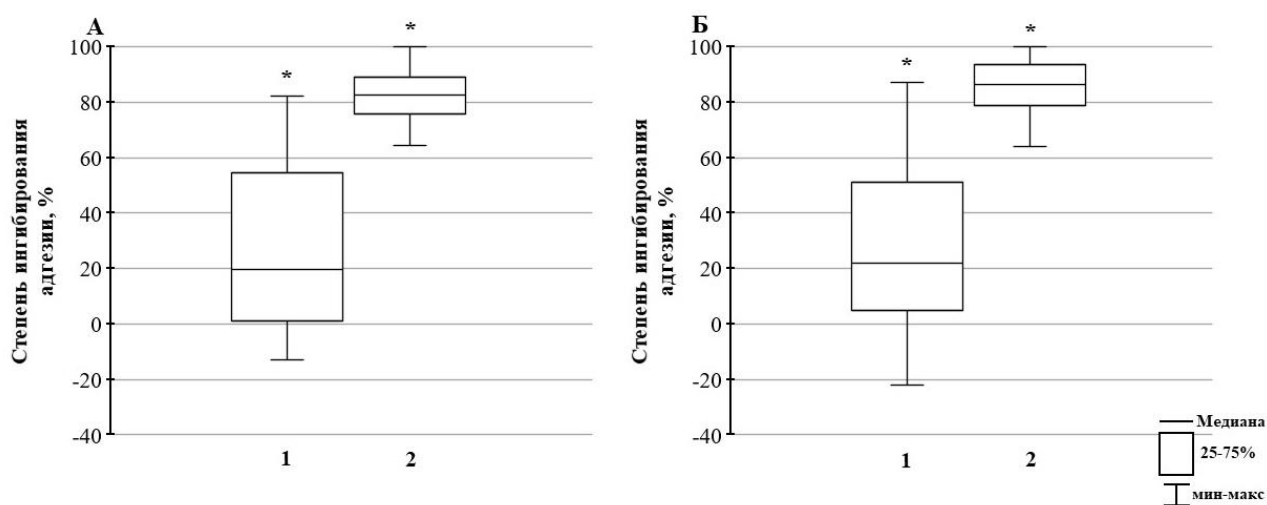


Рисунок 3. Степень ингибирования адгезии тромбоцитов к фибриногену в образцах ОТП здоровых добровольцев при регистрации рассеянного (А) и отраженного (Б) лазерного излучения. 1 - после добавления мАт к GP Ib; 2 - после добавления мАт к GP IIb/IIIa. *- $p < 0,05$ (Манна-Уитни тест, $n = 10$)

Рисунок 4 демонстрирует статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови ($n = 16$) здоровых добровольцев. Степень ингибирования адгезии клеток крови после предварительной инкубации образцов цельной крови с мАт к GP Ib составляла 36,4 % (14,2; 49,7), после добавления мАт к GP IIb/IIIa – 86,1 % (80,8; 89,2) при регистрации изменений интенсивности рассеянного лазерного излучения на ФД₂ (рис. 4А). При регистрации изменений интенсивности отраженного лазерного излучения на ФД₁ степень адгезии тромбоцитов после блокирования GP Ib с помощью мАт составляла 39,3 % (9,3; 47,1), после блокирования GP IIb/IIIa – 86,4 % (82,2; 89,4) (рис. 4Б).

Полученные на первом этапе результаты дают возможность предполагать, что разработанная методика позволяет исследовать адгезию клеток крови к фибриногеновой

поверхности в ОТП [Автаева Ю.Н. и др., 2018] и цельной крови [Автаева Ю.Н. и др., 2020, Gabbasov Z.A. et al, 2021] здоровых добровольцев в условиях потока с помощью микрофлюидной системы.

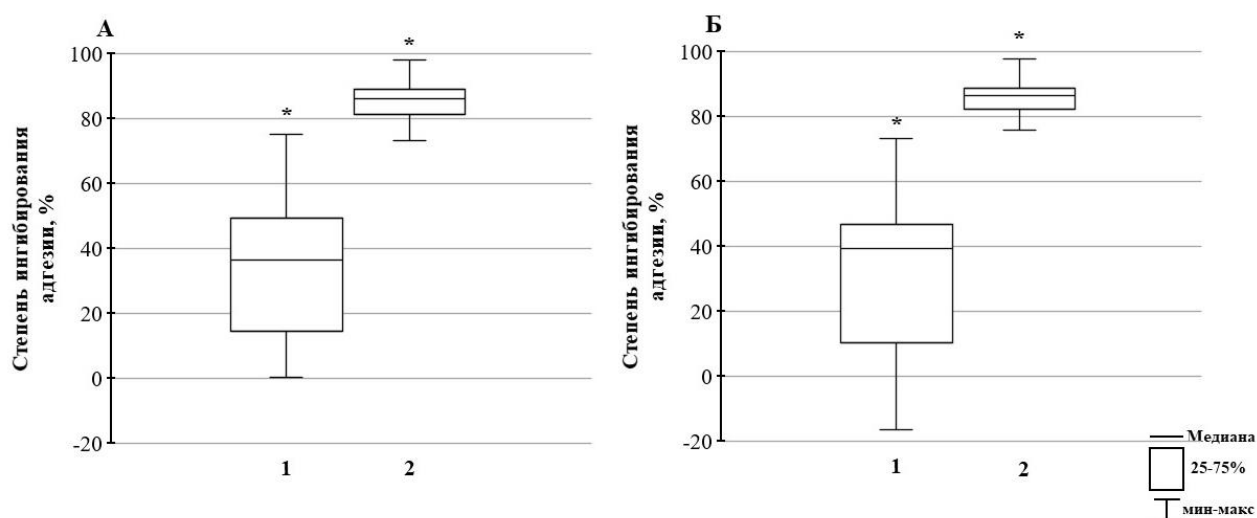


Рисунок 4. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови здоровых добровольцев при регистрации рассеянного (А) и отраженного (Б) лазерного излучения. **1** - после добавления мАт к GP Ib; **2** - после добавления мАт к GP IIb/IIIa. *- $p < 0,05$ (Манна-Уитни тест, $n = 16$)

Было обнаружено, что вклад взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов в цельной крови выше, чем в ОТП. Высокий вклад взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов позволяет изучать роль этих рецепторов в адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови в условиях потока. Поэтому дальнейшие исследования адгезии клеток крови к белковым поверхностям проводились в цельной крови, а не в ОТП.

Адгезия клеток крови к коллагену I типа в образцах цельной крови здоровых добровольцев. Следующий этап работы состоял в исследовании адгезии клеток крови к коллагену I типа в потоке в образцах цельной крови здоровых добровольцев. Первые опыты по оценке адгезии клеток крови к коллагену были выполнены в образцах цельной крови, антикоагулированной цитратом натрия, но изменений интенсивности оптических сигналов, регистрируемых на ФД₂ и ФД₁, в опытах без добавления мАт обнаружено не было. При исследовании адгезии клеток крови в цельной крови, но уже антикоагулированной РРАСК, на обоих ФД были зарегистрированы изменения оптических сигналов. Таким образом, дальнейшее изучение адгезии клеток крови к коллагену было проведено в цельной крови, антикоагулированной РРАСК, для сохранения физиологических концентраций кальция в плазме крови.

На рисунке 5 продемонстрированы статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к коллагену I-го типа в цельной крови ($n = 17$) здоровых добровольцев. Степень ингибирования адгезии клеток крови после предварительной инкубации образцов крови с МАТ к GP Ib составляла 22,8 % (10,8; 45,9), после добавления МАТ к GP IIb/IIIa – 72,0 % (56,3; 83,7) при регистрации изменений интенсивности рассеянного лазерного излучения на ФД₂ (рис. 5А). При регистрации изменений интенсивности отраженного лазерного излучения на ФД₁ степень адгезии клеток крови после блокирования GP Ib с помощью МАТ составляла 18,3 % (5,8; 43,4), после блокирования GP IIb/IIIa – 63,5 % (53,3; 78,5) (рис. 5Б).

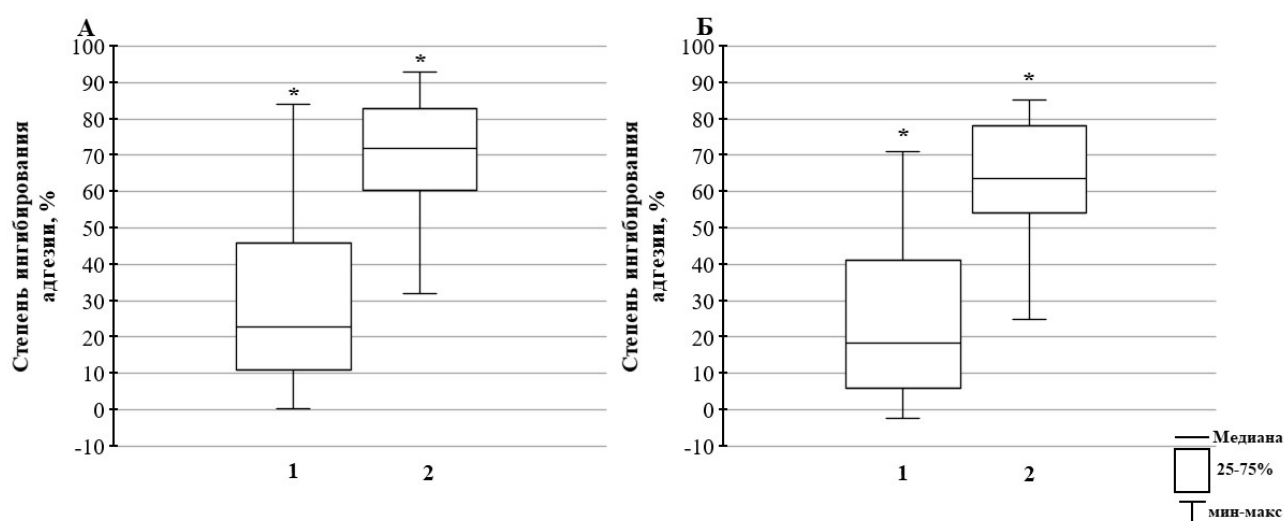


Рисунок 5. Степень ингибирования адгезии клеток крови к коллагену типа I в образцах цельной крови здоровых добровольцев при регистрации рассеянного (А) и отраженного (Б) лазерного излучения. 1 - после добавления МАТ к GP Ib; 2 - после добавления МАТ к GP IIb/IIIa. *- $p < 0,05$ (Манна-Уитни тест, $n = 17$)

Полученные результаты свидетельствуют о возможности исследовать адгезию клеток крови к коллагену в цельной крови здоровых добровольцев с помощью микрофлюидной системы. Покрытие оптической подложки коллагеном I типа позволяет моделировать повреждение сосудистого русла и оценивать вклад GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в адгезию клеток крови в цельной крови в условиях потока.

Белково-клеточный состав структур, образующихся на поверхности проточной камеры с коллагеновым покрытием. После 15-ти минут циркуляции цельной крови здорового добровольца на коллагеновом покрытии проточной камеры образуются вытянутые структуры, располагающиеся по ходу тока крови (рис. 6). При микроскопии образцов проточных камер, окрашенных по методу Гимза, на поверхности

коллагена были выявлены большие длинные белковые структуры с колокализованными лейкоцитами и тромбоцитами (рис. 6Б). После блокирования GP IIb/IIIa отложения таких структур не наблюдалось, но были обнаружены отдельно расположенные тромбоциты (рис. 6В).

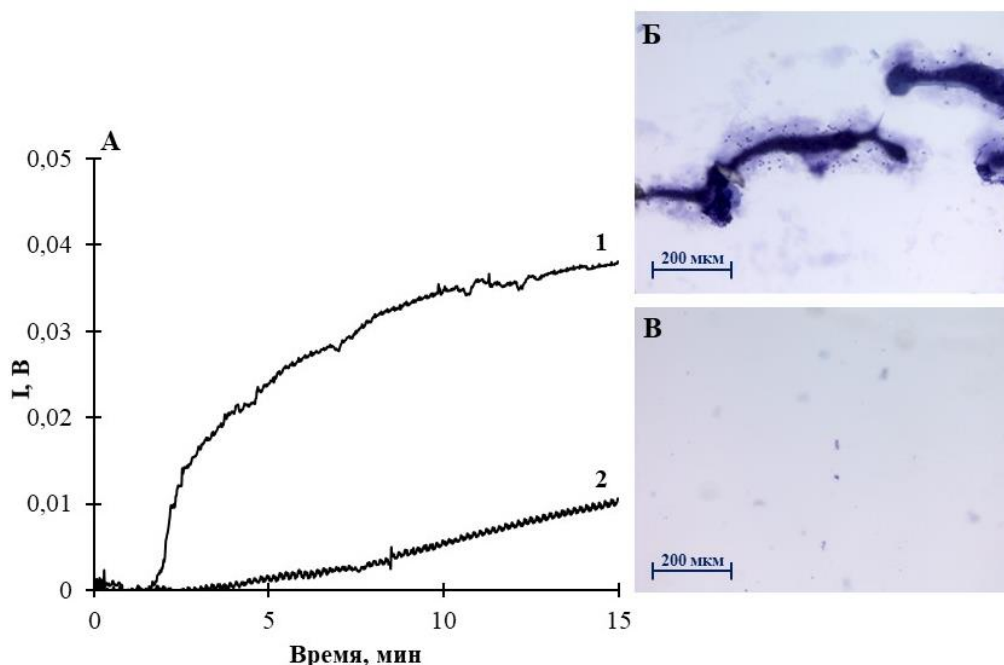


Рисунок 6. Адгезия клеток крови к поверхности, покрытой коллагеном типа I, в цельной крови здорового добровольца при высоких скоростях сдвига. **А** – типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к коллагену I типа при скорости сдвига 1700 c^{-1} (**1** – цельная кровь; **2** – цельная кровь + мАт к GP IIb/IIIa); **Б** – белково-клеточная структура на поверхности коллагена I типа в контрольном образце, окрашенная по методу Гимза. Увеличение $\times 100$; **В** – единичные клетки в образце с заблокированным GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов, окрашенные по методу Гимза. Увеличение $\times 100$.

Далее белково-клеточные структуры, образующиеся на коллагеновой поверхности, окрашивали флуоресцентными красителями (анти-ФВ-ФИТЦ, АО и DAPI). При флуоресцентной микроскопии образцов в проточной камере было визуализировано интенсивное ФВ-положительное окрашивание белковых структур (рис. 7А). В этих же ФВ-положительных областях были обнаружены тромбоциты (рис. 7Б) и лейкоциты (рис. 7В).

В работе было продемонстрировано, как может происходить процесс адгезии клеток крови при высоких скоростях сдвига в местах повреждения сосудов и разрыва атеросклеротической бляшки, когда обнажаются волокна коллагена. ФВ может образовывать гиперадгезивные области, обогащенные тромбоцитами и лейкоцитами [Автаева Ю.Н. и др., 2021].



Рисунок 7. Белковая структура с колокализованными тромбоцитами и лейкоцитами на поверхности коллагена I-го типа, образовавшаяся в контрольном образце после перфузии цельной крови через проточную камеру, окрашенные флуоресцентными красителями (анти-ФВ-ФИТЦ, АО, DAPI) **А** – окраска на фактор фон Виллебранда (ФВ) культуральной средой, содержащей мышинные мАТ против ФВ человека и ФИТЦ-конъюгированными козьими мАТ против мышинных мАТ (анти-ФВ-ФИТЦ) **Б** – окраска на тромбоциты акридиновым оранжевым (АО). **В** – окраска на лейкоциты 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Увеличение x400.

Адгезия клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с тяжелым аортальным стенозом и синдромом Heyde. Была оценка вклада GP Ib и GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты (АС) и с синдромом Heyde. Расчетные значения скорости сдвига в опытах были такие же, как и на предыдущих этапах.

На рисунке 8 представлены статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к фибриногену в цельной крови у пациентов с тяжелым АС ($n = 7$) (А) и пациентов с синдромом Heyde ($n = 6$) (Б). Концентрация ФВ в плазме у пациентов с тяжелым АС составляла – 155 ± 42 %, у пациентов с синдромом Heyde – 194 ± 81 %. Блокирование GP Ib в цельной крови снижало степень адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности на 3,1 % (-75; 39,6) у пациентов с синдромом Heyde и на 24,3 % (7,6; 38,0) у пациентов с тяжелым стенозом клапана аорты (рис. 8А). Добавление мАТ к GP IIb/IIIa в цельную кровь снижало степень адгезии клеток крови на 86,5 % (78; 92,4) у пациентов с синдромом Heyde и на 86,3 % (52,1; 86,6) у пациентов с тяжелым АС (рис. 8Б). Стоит отметить, что у больных с тяжелым АС ($0,031 \pm 0,012$ В) и синдромом Heyde ($0,019 \pm 0,013$ В) снижена степень общей адгезии клеток крови к фибриногену по сравнению со здоровыми добровольцами ($0,046 \pm 0,021$ В) при отсутствии снижения концентрации тромбоцитов и ФВ в крови (табл. 1).

Почти полное отсутствие вклада взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов в адгезию клеток крови к фибриногену у пациентов с синдромом Heyde при скоростях высоких сдвига может свидетельствовать об уменьшении количества гемостатически-активных высокомолекулярных мультимеров ФВ при отсутствии снижения количества ФВ в плазме. В результате, функциональная недостаточность ФВ может способствовать развитию желудочно-кишечных кровотечений у пациентов с синдромом Heyde. У пациентов с тяжелым АС, но без желудочно-кишечных кровотечений, вклад взаимодействия GP Ib – ФВ в адгезию клеток крови значительно выше, чем у больных с синдромом Heyde.

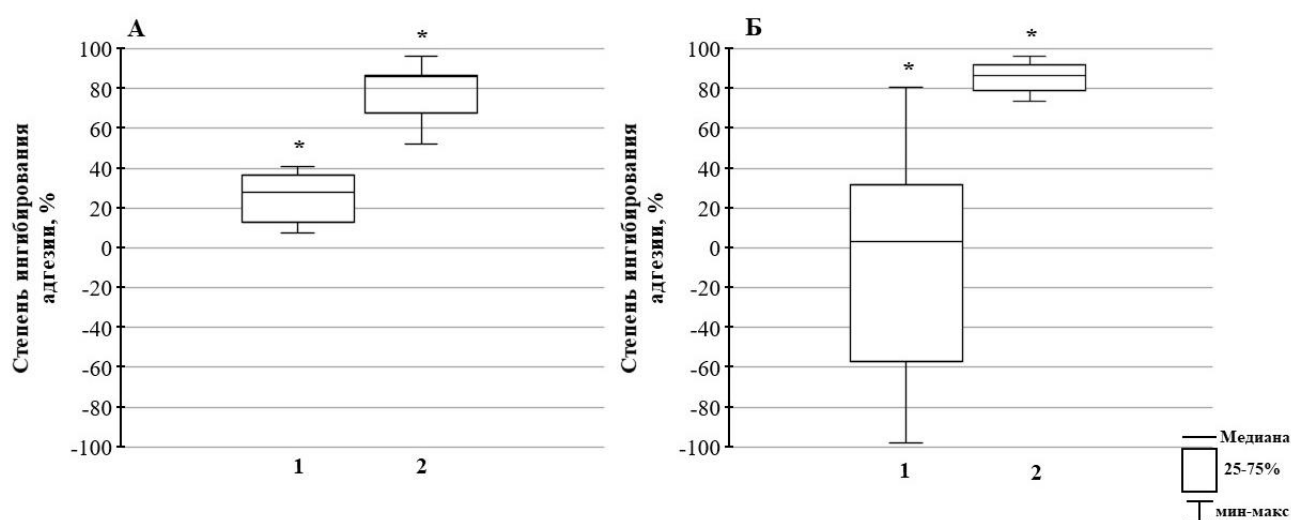


Рисунок 8. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в образцах цельной крови у пациентов с тяжелым АС (n = 7) (А) и пациентов с синдромом Heyde (n = 6) (Б). 1 - после добавления мАт к GP Ib; 2 - после добавления мАт к GP IIb/IIIa.

*- $p < 0,05$ (Манна-Уитни тест)

Адгезия тромбоцитов к фибриногеновой поверхности в образцах ОТП и цельной крови пациентов с ИБС до 55 лет. На этом этапе работы была проведена оценка адгезии клеток крови к фибриногеновой поверхности в ОТП и цельной крови при скоростях сдвига, присутствующих в коронарных артериях у больных с ИБС (возраст возникновения первых событий ИБС составлял 37 – 50 лет).

Рисунок 9 демонстрирует статистические данные, полученные при исследовании вклада GP Ib и GP IIb/IIIa в адгезию клеток крови к фибриногену в образцах ОТП (n=16) и цельной крови (n=22) у пациентов с ИБС до 55 лет. Блокирование GP Ib рецепторов тромбоцитов к фактору фон Виллебранда приводило к ингибированию адгезии клеток крови у пациентов с ранней ИБС в опытах с ОТП на 60 % (14,5; 72,6), в опытах в цельной

крови – на 50,5 % (27,5; 72,0) (рис. 9А). Добавление мАт к GP IIb/IIIa в образцы ОТП ингибировало адгезию клеток крови на 89,5 % (85,4; 93,2) и на 81,4 % (70,3; 87,8) при добавлении мАт к GP IIb/IIIa в образцы цельной крови (рис. 9Б).

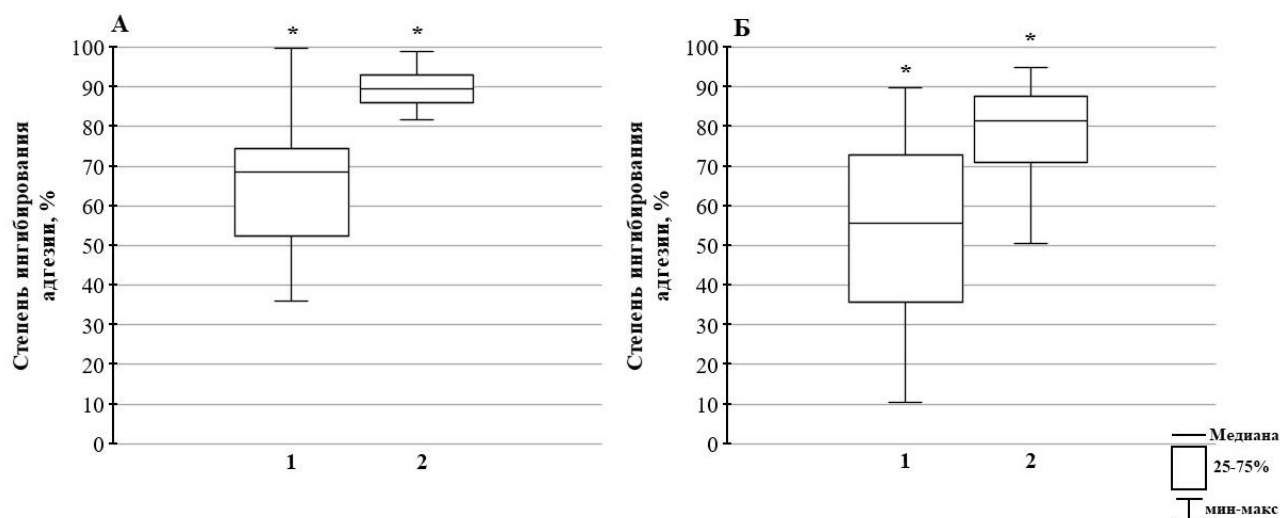


Рисунок 9. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в образцах ОТП (n = 16) (А) и цельной крови (n = 22) (Б) пациентов с ИБС до 55 лет. 1 - после добавления мАт к GP IIb; 2 - после добавления мАт к GP IIb/IIIa.

*- $p < 0,05$ (Манна-Уитни тест)

У молодых больных с ИБС (до 55 лет) происходило значимое снижение степени адгезии клеток крови к фибриногену при блокировании GP IIb рецепторов тромбоцитов к ФВ в ОТП и цельной крови. Это свидетельствует о «разворачивании» ФВ уже при скорости сдвига 1700 с^{-1} . Изменение конформации ФВ при таких сдвиговых скоростях может являться новым фактором риска в развитии ИБС у молодых пациентов.

Адгезия тромбоцитов к фибриногену в образцах цельной крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). На рисунке 10 представлены типичные кривые кинетики адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови пациента с тяжелым течением COVID-19 при скорости сдвига, соответствующей артериальным сосудам. Из представленных данных видно, что блокирование взаимодействия GP IIb тромбоцитов и ФВ с помощью мАт приводило к почти полному подавлению адгезии клеток крови к фибриногену (кривая 1, рис. 10А) по сравнению с контрольным исследованием (кривая 2, рис. 10А). Блокирование взаимодействия GP IIb рецепторов тромбоцитов и фактора вон Виллебранда (рис. 10Б) у пациентов с тяжелым течением COVID-19 приводило к подавлению адгезии клеток крови на 63,9 % (47,5; 83,8), в то время как у здоровых добровольцев на 39,3 % (9,3; 47,1), $p=0,002$ (U-критерий Манна-

Уитни). Из данных, представленных в таблице 1, видно, что у больных с COVID-19 средние значения степени общей адгезии клеток крови ($0,047 \pm 0,03$ В) примерно равны с данными, полученными у здоровых добровольцев ($0,046 \pm 0,021$ В), несмотря на значительное увеличение вклада взаимодействия GP Ib – ФВ в адгезию клеток крови.

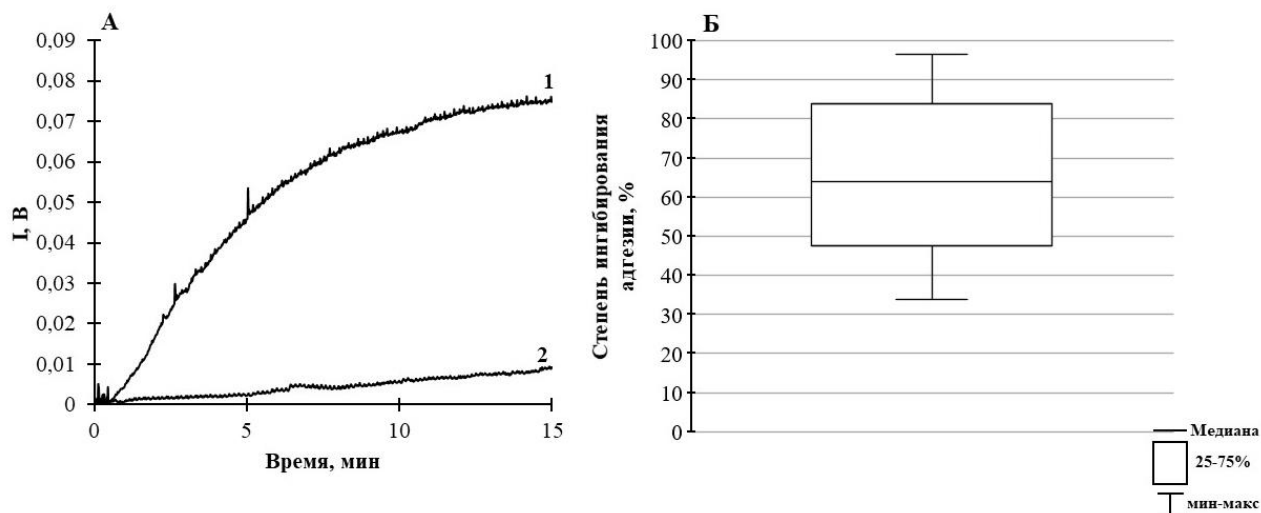


Рисунок 10. А. Адгезия клеток крови к фибриногену при скорости сдвига, соответствующей артериальным сосудам, в цельной крови пациента с тяжелым течением COVID-19. Концентрация тромбоцитов в цельной крови пациента с COVID-19 составляла $78 \cdot 10^3$ /мкл. 1 – цельная кровь; 2 – цельная кровь + мАт к GP Ib. Б. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови ($n = 17$) у пациентов с тяжелым течением COVID-19. I – интенсивность рассеянного лазерного излучения (В).

При исследовании адгезии клеток крови к фибриногену у больных с новой коронавирусной инфекцией был обнаружен наибольший вклад взаимодействия ФВ и GP Ib тромбоцитов. Также эти данные были ассоциированы со значительным повышением концентрации ФВ в плазме. Полученные на данном этапе результаты, не противоречат данным литературы об участии ФВ в развитии гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19 [Mancini I. et al, 2021].

Рисунок 11 и таблица 1 демонстрируют интегральные результаты, полученные в диссертационном исследовании. Они свидетельствуют о возможности исследования адгезии клеток крови к белковым поверхностям (фибриноген, коллаген) в ОТП и цельной крови в реальном времени с помощью микрофлюидной системы. Следует отметить, что разработанная методика для диагностики нарушений клеточного гемостаза на основе микрофлюидной технологии дает возможность оценки адгезии клеток крови в реальном времени без использования трудоемких и дорогих методов микроскопии. Для

детектирования результатов нет необходимости проводить пробоподготовку образцов, которая занимает длительное время и повышает вероятность ошибки.

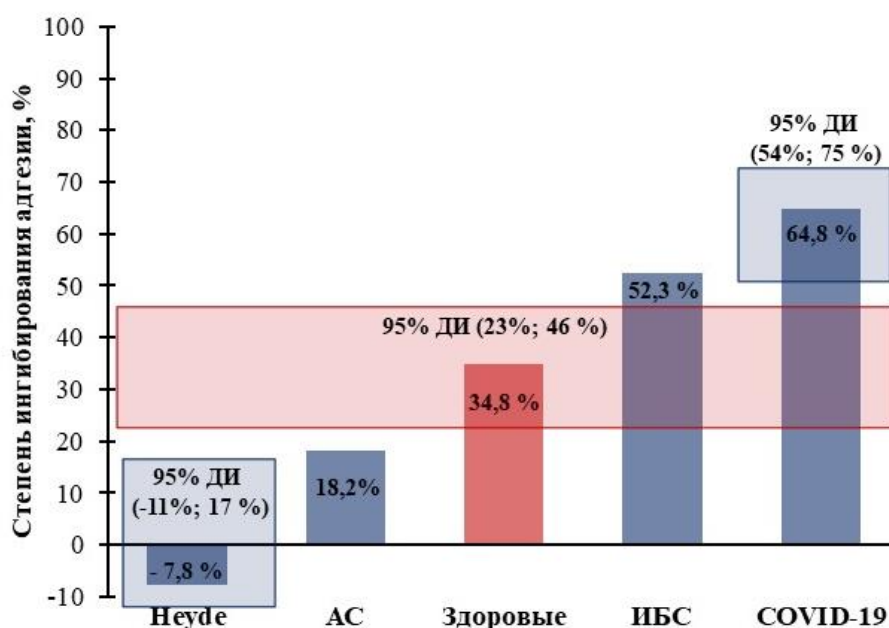


Рисунок 11. Степень ингибирования адгезии клеток крови к фибриногену при блокировании GP IIb рецепторов тромбоцитов в цельной крови здоровых добровольцев и пациентов с синдромом Heyde, тяжелым стенозом клапана аорты, ранней ИБС и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19). Для каждой группы (здоровые добровольцы и пациенты) представлены средние значения. ДИ – доверительный интервал ($p < 0,01$, тест Краскела-Уоллиса).

В таблице 1 представлены средние значения концентраций тромбоцитов и ФВ у здоровых добровольцев и пациентов, а также степень общей адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови в контрольных исследованиях без добавления МАТ.

Таблица 1. Количество тромбоцитов, концентрация антигена фактора фон Виллебранда (ФВ) и степень общей адгезии клеток крови к фибриногену в цельной крови в контрольных исследованиях у здоровых добровольцев и пациентов с синдромом Heyde, тяжёлым аортальным стенозом (АС), ишемической болезнью сердца (ИБС) и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

	Heyde	АС	Здоровые	ИБС	COVID-19
Тромбоциты, $\cdot 10^3/\text{мкл}$	173 ± 72	205 ± 59	174 ± 55	228 ± 94	167 ± 68
ФВ:Аг, %	194 ± 81	155 ± 42	82 ± 38	95 ± 30	533 ± 214
Степень общей адгезии (I, B)	$0,019 \pm 0,013$	$0,031 \pm 0,012$	$0,046 \pm 0,021$	$0,023 \pm 0,011$	$0,047 \pm 0,03$

Данные предоставлены как среднее \pm стандартное отклонение

Выводы

1. Создана микрофлюидная система, позволяющая в реальном времени регистрировать кинетику адгезии клеток крови к поверхностям, покрытых фибриногеном или коллагеном типа I, в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы и цельной крови в условиях контролируемого потока.
2. Обнаружено, что в микрофлюидной системе в результате взаимодействия образцов крови с поверхностью, покрытой коллагеном I типа, в условиях потока, образуются белково-клеточные структуры, которые состоят из тромбоцитов и фактора фон Виллебранда с многочисленными включениями лейкоцитов.
3. У больных с синдромом Heude, при отсутствии снижения общего уровня фактора фон Виллебранда в плазме, почти отсутствовал вклад взаимодействия GP Ib и фактора фон Виллебранда в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока.
4. При исследовании крови больных с ишемической болезнью сердца был обнаружен повышенный вклад фактор фон Виллебранда – GP Ib зависимых реакций в адгезию клеток крови к фибриногену в потоке ($\approx 50\%$) при нормальном плазменном уровне фактора фон Виллебранда.
5. У больных с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) был выявлен максимальный вклад взаимодействия GP Ib и фактора фон Виллебранда ($\approx 60\%$) в адгезию клеток крови к фибриногену в условиях потока, который ассоциировался со значительным повышением уровня фактора фон Виллебранда в крови.

Практические рекомендации

1. Исследование адгезии клеток крови к белковой поверхности в потоке целесообразно проводить в образцах цельной крови, а не обогащенной тромбоцитами плазмы в связи с более выраженным вкладом взаимодействия GP Ib и фактора фон Виллебранда, зависящих от условий потока.
2. Для оценки адгезии клеток крови к коллагену I типа в условиях потока цельную кровь необходимо антикоагулировать в PPACK (прямой ингибитор тромбина) для сохранения физиологических концентраций свободного кальция.
3. Разработанная микрофлюидная система может быть использована для выявления и мониторинга нарушений общей адгезии клеток крови к фибриногену и зависимых от взаимодействия GP Ib и фактора фон Виллебранда адгезивных реакций у больных с

синдромом Heyde, ишемической болезнью сердца и новой коронавирусной инфекцией (COVID-19).

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Автаева Ю.Н.**, Мельников И.С., Габбасов З.А. Регистрация в реальном времени адгезии тромбоцитов на иммобилизованном на оптической подложке фибриногеновом покрытии в условиях потока // Клеточные технологии в биологии и медицине — 2018. N 1. — С. 48-52.
2. **Автаева Ю.Н.**, Мельников И.С., Охота С.Д., Зозуля Н.И., Габбасов З.А. Кинетика адгезии тромбоцитов к покрытой белком поверхности в образцах цельной крови в условиях высоких скоростей потока // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины — 2020. — Т. 169, N 2. — С. 188-192.
3. **Автаева Ю.Н.**, Мельников И.С., Сабурова О.С., Гурия К.Г., Осидак М.С., Домогадский С.П., Габбасов З.А. Взаимодействие тромбоцитов, фактора фон Виллебранда и лейкоцитов в цельной крови при высоких скоростях сдвига опосредовано GPIIb/IIIa тромбоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины — 2021. — Т. 171, N 5. — С. 557-561.
4. Gabbasov Z.A., **Avtaeva Y.N.**, Melnikov I.S., Okhota S.D., Caprnda M., Mozos I., Prosecky R., Rodrigo L., Kruzliak P., Zozulya N.I. Kinetics of platelet adhesion to a fibrinogen-coated surface in whole blood under flow conditions // Journal of clinical laboratory analysis — 2021. — Vol. 35, N 9. — e23939.
5. Okhota S., Melnikov I, **Avtaeva Yu.**, Kozlov S. and Gabbasov Z., Shear Stress-Induced Activation of von Willebrand Factor and Cardiovascular Pathology // Int. J. Mol. Sci. — 2020. N 21, — e7804.
6. **Avtaeva Yu.**, Melnikov I, Kozlov S. and Gabbasov Z., Von Willebrand Factor in Thromboinflammation and Cardiovascular Pathology // Recent Research Advances in Biology — 2021. — Vol. 9, N 8, — P. 25-47.
7. **Avtaeva Yu.**, Gabbasov Z., Platelet adhesion to fibrinogen-coated surface in whole blood under flow condition // The Book Of Abstracts «The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis 2018 jointly with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology, October 4–6, 2018, Saint Petersburg, Russia.
8. **Автаева Ю.Н.**, Мельников И.С. и др., Патологическая активация фактора фон Виллебранда может приводить к преждевременному развитию ишемической болезни сердца // Сборник тезисов «Российский национальный конгресс кардиологов 2019», 24 – 26 сентября 2019 г., г. Екатеринбург, — С. 795.
9. Melnikov I.S., **Avtaeva Y.N.**, Kozlov S.G., Nozadze D.N., Gabbasov Z.A., Shear stress induced unfolding of von Willebrand factor may be involved in the premature development of myocardial infarction // European Heart Journal. — 2019. — Vol. 40, N 1. — P. 328.
10. Габбасов З.А., **Автаева Ю.Н.** и др, Роль фенотипа тромбоцитов в развитии тромботических осложнений при ишемической болезни сердца // Сборник тезисов «Российский национальный конгресс кардиологов 2020», 29 сентября 2020 – 01 октября 2020, г. Казань, с. 839.
11. **Avtaeva Yu. N.** et al, Shear stress induced activation of von Willebrand factor may predispose to gastrointestinal bleeding in syndrome of Heyde // European Heart Journal. — 2020; N 41(Issue Supplement_2). — P. ehaa946.3820.
12. **Avtaeva Y.** et al, Shear stress induced activation of von Willebrand factor may facilitate thrombotic events in coronary artery disease in young adults // Atherosclerosis. — 2020. N 315. P. e79.

13. **Автаева Ю.Н.** и др., Гидродинамическая активация фактора фон Виллебранда при синдроме Хейде может приводить к развитию желудочно-кишечных кровотечений // Наследственная и приобретенная патология свертывания крови - тромбозы и кровотечения: диагностика, профилактика, лечение, экономика — 2020. — Р. 11-15.
14. Gabbasov Z., **Avtaeva Y.**, Melnikov I., Okhota S., Kozlov S. Hydrodynamic Activation of von Willebrand Factor under Flow Conditions May Contribute to Thrombotic Complications in Coronary Heart Diseases // Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis — 2020. N 4 (Suppl. 1). P. 4-5.
15. **Avtaeva Y.** et al, Platelet adhesion, von Willebrand factor activation and leukocytes recruitment at high shear rates // HemaSphere — 2021. N 5(S2). — P. 642-643.
16. **Автаева Ю.Н.** и др., Тяжелый стеноз клапана аорты может приводить к снижению гемостатической активности фактора фон Виллебранда // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний — 2021. — Vol. 10, N 2. — P. 107.
17. **Автаева Ю.Н.**, Роль GP Ib и GP IIb/IIIa в агрегации и адгезии тромбоцитов к фибриногену в образцах цельной крови и обогащенной тромбоцитами плазмы // Сборник тезисов XIV Международной (XXIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, 2019 г, г. Москва, — С. 155 – 156.
18. Мельников И. С., **Автаева Ю. Н.** и др., Гидродинамическая активация фактора фон Виллебранда при синдроме Хейде может приводить к развитию желудочно-кишечных кровотечений // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов — 2019. N 16. P. 53-54.
19. Габбасов З. А., **Автаева Ю.Н.** и др., Гидродинамическая активация фактора фон Виллебранда может способствовать тромботическим осложнениям при ишемической болезни сердца // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов — 2019. N 16. — P. 19.
20. Патент на изобретение: Прибор для регистрации кинетики адгезии тромбоцитов на оптической подложке с адгезивным белковым покрытием. Габбасов Зуфар Ахнафович, **Автаева Юлия Николаевна**, Мельников Иван Сергеевич, Миронов Павел Дмитриевич, Гришин Юрий Владимирович, Сабуров Виктор Валентинович. № регистрации в ФИПС 2019143943/14, 2019, регистрация патента 25.12.2019.
21. Патент на изобретение: Способ определения степени гидродинамической активации фактора фон Виллебранда и устройство для его осуществления. Габбасов Зуфар Ахнафович, **Автаева Юлия Николаевна**, Мельников Иван Сергеевич. № регистрации в ФИПС 2020100934/14, 2020, регистрация патента 14.01.2020.

Список сокращений

АО – акридиновый оранжевый	ADAMTS-13 – дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновым мотивом 1 типа, 13
АС – тяжелый аортальный стеноз	COVID-19 – Coronavirus disease of 2019
ИБС – ишемическая болезнь сердца	FVIII – фактор свертывания VIII
мАт – моноклональные антитела	GP – гликопротеин
ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма	PPACK – D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone
ФВ – фактор фон Виллебранда	
ФД – фотодетектор	
ФИТЦ – флуоресцеин изотионат	