

КИШЕНКО

Василий Васильевич

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ ТРОМБОЦИТНОГО
КОНЦЕНТРАТА**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2026

Диссертационная работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук доцент **Сироткина Ольга Васильевна**

Официальные оппоненты:

Мазуров Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии главный научный сотрудник.

Жибурт Евгений Борисович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра трансфузиологии и проблем переливания крови, заведующий.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «23» июня 2026 года в 14:30 на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://nrcerm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одной из задач клинической лабораторной диагностики является разработка новых методов исследования клеточного состава биоматериалов, определение требований и показаний к условиям их применения, что напрямую связано с оценкой качества приготовления и хранения препаратов и компонентов крови, в том числе тромбоцитного концентрата.

Тромбоцитный концентрат (ТК) применяется у пациентов с тромбоцитопенией или сниженной функциональной активностью тромбоцитов с лечебной и профилактической целью (Garraud O., Hamzeh-Cognasse H., Chalayer E. et al, 2023). Переливания ТК используют при гематологических злокачественных новообразованиях, недостаточности костного мозга, а также для профилактики и лечения геморрагического синдрома (Карпова О.В., Образцов И.В., Трахтман П.Е. и др., 2014; Liu C., Su Y., Guo W. et al, 2024). Кроме участия в гемостазе, тромбоциты участвуют в иммунных и воспалительных процессах, в ангиогенезе и межклеточных взаимодействиях (Trochanowska-Pauk N., Walski T., Bohara R. et al, 2024). Расширяется и область применения ТК, в частности в регенеративной медицине.

Срок хранения ТК ограничен и составляет 3–7 дней в зависимости от метода получения и стандартов хранения (Rezvan M.R., Moradi Hasan-Abad A., Sobhani-Nasab A. et al, 2024). Это приводит к значительным потерям: по данным ВОЗ, около 23% компонентов крови утилизируется из-за истечения срока годности (Всемирная организация здравоохранения, 2023 г.). Дополнительные ограничения связаны с логистикой и необходимостью проведения лабораторного обследования доноров, особенно в медицинских организациях без собственных станций переливания крови (Liu C., Su Y., Guo W. et al, 2024).

Ограниченные сроки хранения и высокий спрос на ТК усложняют управление запасами и приводят к значительным ресурсным потерям (Garraud O., Hamzeh-Cognasse H., Chalayer E. et al, 2023). В связи с этим поиск маркеров, позволяющих оценивать качество и функциональную активность тромбоцитов при хранении, является актуальной задачей клинической лабораторной диагностики.

Степень научной разработанности темы исследования. Переливание тромбоцитов является стандартной медицинской процедурой, направленной на поддержание их уровня и функциональной активности в кровотоке. Ключевыми параметрами при этом являются количество, качество и продолжительность жизни тромбоцитов.

Методы получения, обработки и хранения ТК, включая меры по снижению трансфузионных реакций, могут оказывать негативное влияние на тромбоциты (Garraud O., Hamzeh-Cognasse H., Chalayer E. et al, 2023; Trochanowska-Pauk N., Walski T., Bohara R. et al, 2024). Даже при оптимальных условиях хранения в ТК развиваются изменения, приводящие к

снижению функциональной активности и жизнеспособности клеток, известные как повреждение тромбоцитов при хранении (Platelet Storage Lesion) (Maués J.H.D.S., Moreira-Nunes C.F.A., Pontes T.B. et al, 2018; Liu C., Su Y., Guo W. et al, 2024). Данное явление сопровождается морфологическими, биохимическими и функциональными изменениями тромбоцитов, включая изменение формы и объёма, сдвиг pH, активацию, агрегацию, высвобождение содержимого гранул и образование микровезикул (Ray V., Chaudhary R., Singh H. et al, 2003; Trochanowska-Pauk N., Walski T., Bohara R. et al, 2024). Активация тромбоцитов также связана с развитием апоптоза и изменением экспрессии гликопротеинов (Сироткина О.В., Ласковец А.Б., Андоскин П.А. и др., 2016)

Несмотря на широкое применение ТК, в рутинной практике его оценка ограничивается показателями безопасности: количеством тромбоцитов, содержанием лейкоцитов, pH и стерильностью (Постановление Правительства Российской Федерации от 22.06.2019 № 797). Эти параметры не отражают функциональное состояние клеток (Garraud O., Hamzeh-Cognasse H., Chalayer E. et al, 2023).

Изменения, происходящие с тромбоцитами при хранении, постоянно изучаются, идет поиск новых методов для функциональной характеристики тромбоцитов с целью их внедрения для более качественной характеристики тромбоцитных концентратов (Vučetić D., Ilić V., Vojvodić D. et al, 2018). Перспективным направлением является анализ внеклеточных микровезикул, образование которых отражает степень активации клеток (Flaumenhaft R., 2006; Ha D., Yang N., Nadithe V., 2016).

Цель исследования: определить лабораторные морфологические, иммунологические и молекулярно-генетические маркеры функционального состояния клеток в тромбоцитном концентрате для оценки его качества на разных сроках хранения.

Задачи:

1. Проанализировать морфологические изменения клеток тромбоцитного концентрата с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения в процессе его хранения.
2. Разработать способ получения фракций различных типов мембранных везикул, содержащихся в тромбоцитном концентрате.
3. Охарактеризовать изменения функционального состояния тромбоцитов и мембранных везикул в процессе хранения тромбоцитного концентрата иммунологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими методами.
4. На основе выявленных лабораторных маркеров функционального состояния тромбоцитов разработать протокол оценки состояния клеток в тромбоцитном концентрате при хранении для оценки его качества.

Научная новизна исследования. Впервые определены лабораторные маркеры для оценки качества тромбоцитного концентрата в процессе хранения и разработан протокол лабораторного исследования для внедрения в клиническую практику. Впервые для морфологической характеристики тромбоцитного концентрата использован метод сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения (СЭМНН), имеющий целый ряд преимуществ по сравнению с другими типами электронной микроскопии: не требуется токопроводящий слой, упрощается процесс иммунодетекции биологических структур, используется менее жесткая фиксация препаратов. Впервые для количественной и иммунологической характеристики везикул и клеток при хранении тромбоцитного концентрата использован метод высокочувствительной проточной цитометрии. Впервые методом ПЦР в реальном времени в тромбоцитах и внеклеточных микровезикулах проанализированы микроРНК *mir-451a*, *mir-142-3p*, *mir-223* и *mir-126*, которые ранее не оценивались в процессе хранения тромбоцитного концентрата.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в комплексном анализе состояния тромбоцитов в процессе хранения тромбоцитного концентрата, что приближено к физиологическим условиям существования тромбоцитов. Был визуализирован процесс везикуляции тромбоцитов при хранении тромбоцитного концентрата, проведена комплексная биохимическая оценка содержимого тромбоцитов и выделяемых ими везикул, оценено изменение состава ряда белков и микроРНК в процессе активации тромбоцитов при хранении тромбоцитного концентрата. Полученные данные обогащают знания о физиологии тромбоцитов и тромбоцитарных везикул.

Найденные лабораторные маркеры и разработанный протокол, позволяющие оценить функциональное состояние тромбоцитов и их жизнеспособность имеет большое значение для оценки качества тромбоцитных концентратов в процессе приготовления и при трансфузии, и могут быть внедрены в практику клинической лабораторной диагностики. Новые методы оценки функционального состояния тромбоцитов позволяют получать больше клинически значимой информации о состоянии клеток в тромбоцитном концентрате и применять подход к трансфузионной терапии в зависимости от клинических задач.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертации является систематизированное применение экспериментальных и теоретических методов научного познания с целью решения поставленных задач. Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого исследования с использованием лабораторных, клинических и статистических методов с разрешения локального этического комитета: протокол № 34 от 13.03.2017 г.

Положения, выносимые на защиту:

1. Тромбоцитарные мембранные везикулы представляют собой биомаркер функционального состояния тромбоцитов в тромбоцитном концентрате, могут быть визуализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии и выделены в отдельную фракцию методом ультрацентрифугирования.

2. В процессе хранения тромбоцитного концентрата увеличивается количество активированных тромбоцитов и тромбоцитарных мембранных везикул, что сопровождается увеличением в тромбоцитах количества активированной каспазы-3 и белка VDAC1, а в тромбоцитарных мембранных везикулах – увеличением количества микроРНК miR-126, miR-223, miR-15a, miR-221 и белка AGO2.

3. Разработан протокол лабораторной диагностики функционального состояния клеток в тромбоцитном концентрате на основе определения количества тромбоцитарных мембранных везикул с помощью проточной цитометрии и флуоресцентно окрашенных специфичных антител.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность полученных результатов обоснована теоретическим анализом проблемы с использованием литературных данных международных цитируемых баз, четким следованием дизайну исследования, протоколам конкретных исследований, использованием современных методов исследования и корректными приемами статистической обработки.

Результаты исследования были представлены в виде устных и стендовых сообщений на российских и международных конгрессах и симпозиумах: XVII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, г. Гатчина, 29 февраля – 5 марта 2016 года; XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology, Milano, Italy, May 12-14, 2016; XXVlth Congress of the ISTH. Berlin, Germany, July 8-13, 2017; VI Всероссийская конференция «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы», г. Самара, 10-11 ноября 2017 года; XIX Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, г. Гатчина, 17–22 февраля 2018 года; The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis 2018 together with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology, St.Petersburg, October 4-6, 2018; The International Society on Thrombosis and Hemostasis Scientific and Standardization Committee Meeting. Dublin, Ireland, July 18-21, 2018; the XXVII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Melbourn, Australia, July 6-10, 2019; Российский форум по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 8-9 октября 2020; XXX Всероссийская юбилейная научно-практическая

конференция «Национальные традиции клинической лабораторной диагностики», Москва, 18-20 марта 2025 года.

Внедрение результатов в практику. Результаты диссертационного исследования внедрены в практику работы станции переливания крови и в образовательный процесс кафедры лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, а также ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 4 статьи - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований и в международной базе Scopus.

Личный вклад автора. Диссертант непосредственно участвовал на всех этапах проведения исследования. Формулировка цели и задач, разработка дизайна исследования проводились совместно с научным руководителем д.б.н. Сироткиной О.В. Подбор и анализ зарубежных и отечественных литературных источников и нормативных документов по теме диссертационного исследования, проведение лабораторных исследований, формирование базы данных полученных результатов с последующим статистическим анализом, написание текста диссертации, подготовка публикаций и докладов по теме исследования выполнены диссертантом самостоятельно.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах, состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; материалы и методы; результаты; обсуждение; выводы; практические рекомендации; перспективы дальнейшей разработки темы; список сокращений; список литературы, включающий 160 источников, из них 17 отечественных и 143 зарубежных. Диссертация содержит 2 таблицы и 32 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Тромбоцитные концентраты (ТК) получали на станции переливания крови ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Для анализа микроРНК использовали ТК из лейко-тромбоцитарного слоя, для остальных исследований — ТК, полученные методом автоматического тромбофереза (Trima Accel, Terumo BCT). Образцы хранили до 7 суток при 22 °С с постоянным перемешиванием. Аликвоты отбирали на 2-й и 7-й дни хранения.

Фракционирование ТК выполняли методом дифференциального центрифугирования в следующих режимах: 5000 g 10 мин, 16000 g 10 мин, 100000 g 2 ч. Таким образом были получены четыре фракции: тромбоцитов (Ф5), микровезикул (Ф16), экзосом (Ф100),

супернатанта Фс. Полученные фракции анализировали методом проточной цитометрии и хранились при -80°C .

Морфологическую оценку концентрата тромбоцитов и его фракций проводили методом сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения (СЭМНН) с использованием модифицированной методики подготовки образцов (Кондратов К.А., Петрова Т.А., Михайловский В.Ю. и др., 2017). Для анализа фракций концентрата тромбоцитов методом динамического рассеяния света (ДРС) использовалась установка Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments). Анализ микроРНК включал выделение РНК, обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени (7500 Real-Time PCR System, Life Technologies). В исследовании оценивались следующие микроРНК: микроРНК-142-3р, микроРНК-223, микроРНК-223*, микроРНК-21, микроРНК-126, микроРНК-15а, микроРНК-451а, микроРНК-221, микроРНК-210, микроРНК-199а, микроРНК-326, микроРНК-145, микроРНК-39. Белковый состав исследовался методом электрофореза с последующим иммуноблоттингом с использованием специфических антител. Фракции ТК анализировали методом проточной цитометрии (Cytoflex, Beckman Coulter) с применением маркеров тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов, эндотелиальных клеток и активации тромбоцитов (CD41, CD235а, CD45, VEGFR2, CD62P).

Результаты исследования и их обсуждение. При оценке цельного ТК методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМНН) на 2-й день хранения наблюдалась неоднородная популяция везикул диаметром от 25 до 700 нм (Рисунок 1А). На 7-й день количество везикул увеличивалось (Рисунок 1Б).

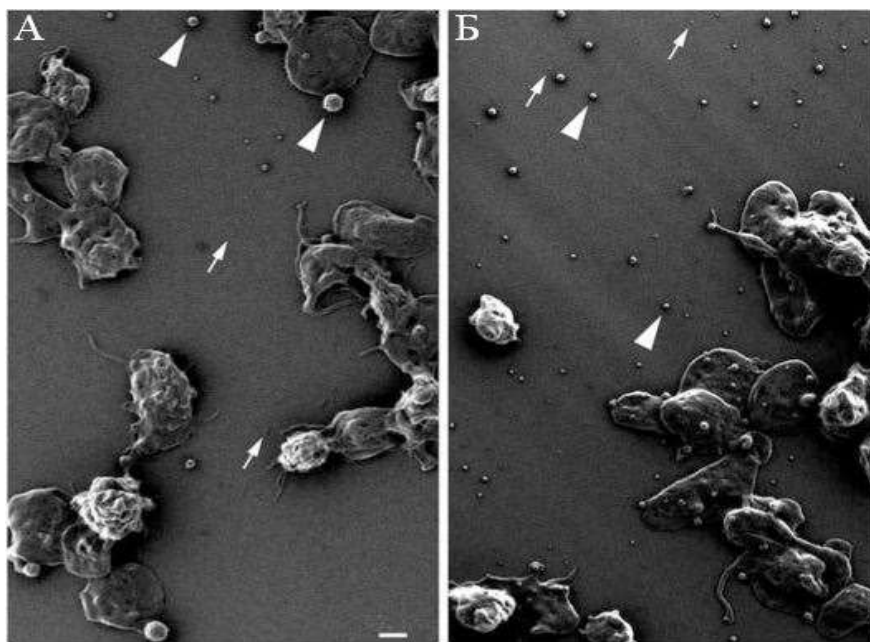


Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения тромбоцитного концентрата на 2-й день и 7-й дни хранения. А – 2-й день Б – 7-й день. Масштабный отрезок — 1000 нм. Везикулы диаметром более 100 нм показаны на микрофотографиях головками стрелок; везикулы диаметром менее 100 нм показаны стрелками.

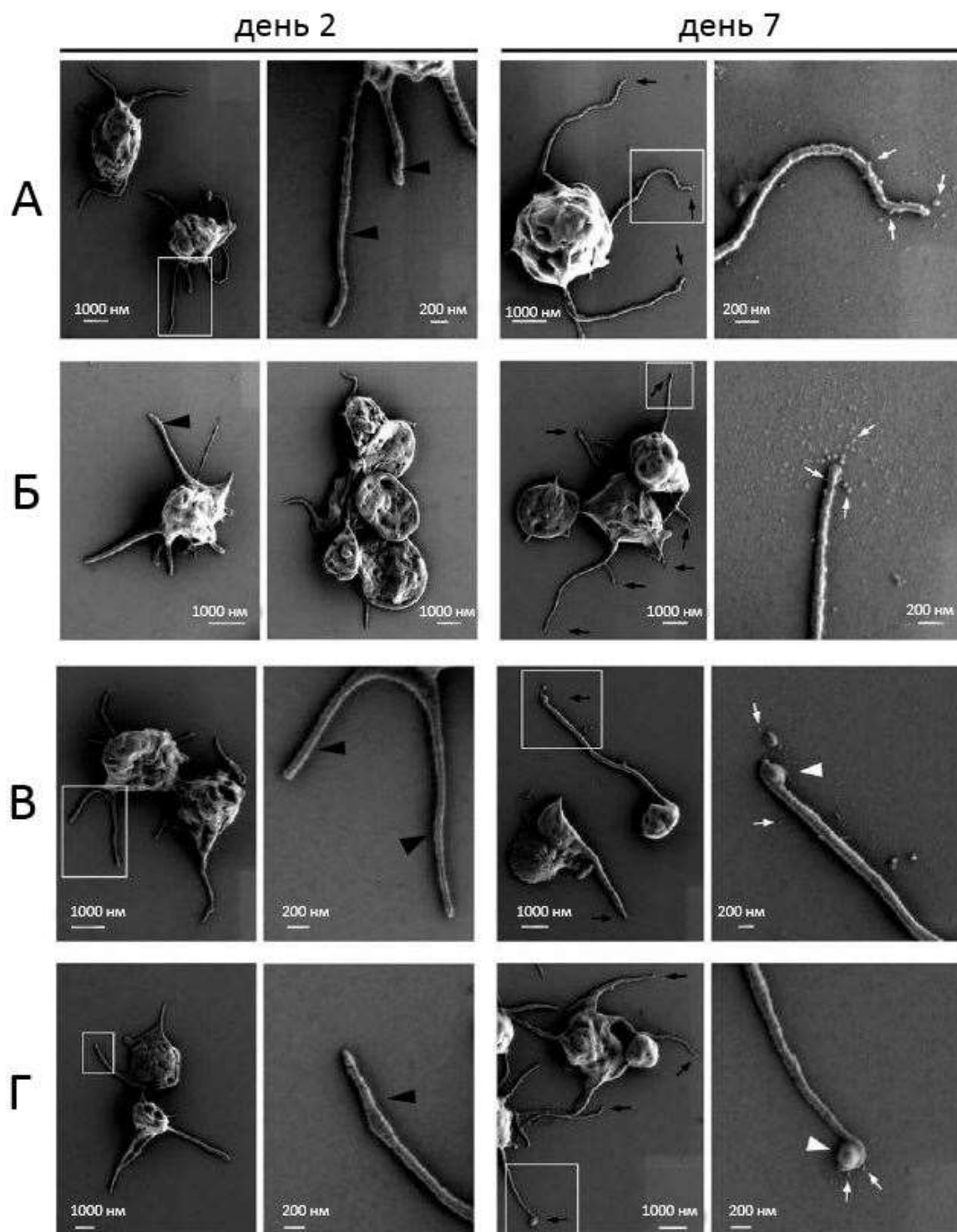


Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения тромбоцитарного концентрата на 2-й день и 7-й дни хранения. А – концентрат №1; Б – концентрат №2; В – концентрат №3; Г – концентрат №4. Белыми прямоугольниками выделена зона для увеличения. Черными стрелками указаны везикулы диаметром менее 100 нм, прилегающие к концевым отделам выростов тромбоцитов на 7-й день хранения. Белые стрелки обозначают отдельные лежащие везикулы диаметром менее 100 нм. Белые головки стрелок указывают на везикулы диаметром более 100 нм, связанные с концевым отделом выростов тромбоцитов. Черные головки стрелок указывают на выросты тромбоцитов без везикул на своей поверхности

Тромбоциты при хранении ТК формировали псевдоподии (Рисунок 2), причем этот процесс наблюдался и на 2-й, и на 7-й день хранения тромбоцитного концентрата. На 7-й день хранения на терминальном участке псевдоподий тромбоцитов наблюдались везикулы с преимущественным диаметром около 50 нм (Рисунок 2, черные стрелки), также встречались везикулы с диаметром около 200 нм (Рисунок 2, белые головки стрелок). При этом на 2-й день хранения на поверхности псевдоподий тромбоцитов везикулы не наблюдались (Рисунок 2, черные головки). Данная картина наблюдалась при микроскопическом анализе всех исследованных тромбоцитных концентратов, соответственно можно заключить, что формирование везикул сопровождает процесс морфологических изменений в клетке, а именно образование псевдоподий при активации тромбоцитов, и эти процессы – активация, изменение морфологии тромбоцитов и образование везикул взаимосвязаны.

Для визуальной оценки полученных фракций тромбоцитарных мембранных везикул (ТМВ) также применялся метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМНН). Изображения на рисунке 3 демонстрируют примеры объектов, выявляемых с помощью СЭМНН во фракциях ТК на 2-й день хранения. Фракция Ф16 в основном содержала везикулы диаметром более 100 нм, но были и везикулы размером менее 100 нм (Рисунок 3А). Присутствие частиц диаметром менее 100 нм во фракции осадка после центрифугирования при 16000 g может быть объяснено их агрегацией во время центрифугирования (Linares et al., 2015). Фракция Ф100 содержала везикулы размером менее 100 нм и их агрегаты (Рисунок 3Б). При этом натрий-фосфатный буфер, использованный в качестве контроля, не содержал везикул (Рисунок 3В). Наиболее часто в Ф16 фракции встречались везикулы диаметром около 200, а в Ф100 диаметром 50 нм. На основании метода их выделения, формы и размера визуализированных объектов можно заключить, что они соответствуют ранее охарактеризованным ТМВ (Pook M. et al., 2014; Пономарева А.А. и др., 2016).

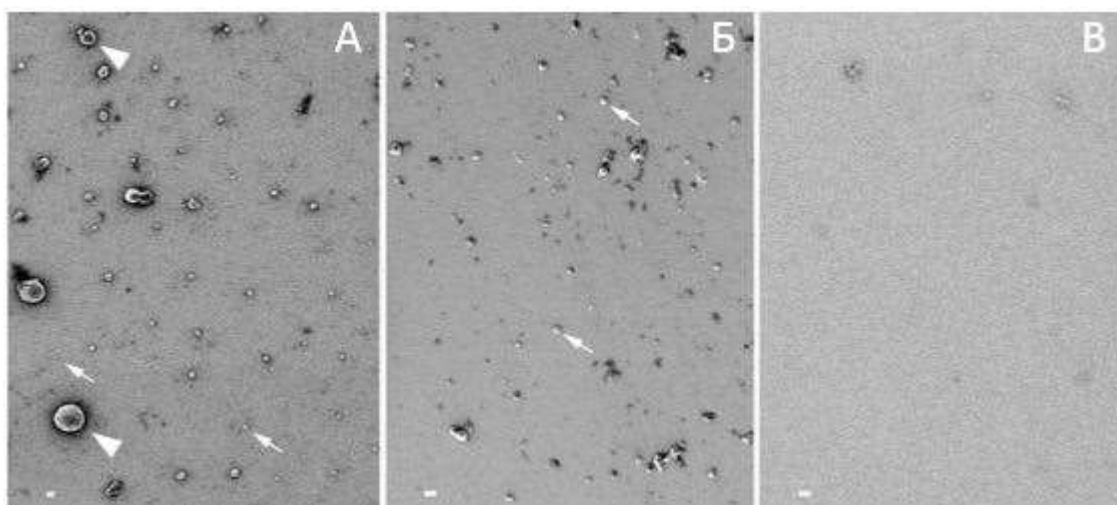


Рисунок 3. Сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения фракций концентрата тромбоцитов на 2-й день хранения.

Дополнительная характеристика фракций проводилась методом динамического рассеяния света (ДРС). Фс фракция (супенатант) на 2-й день хранения содержит объекты диаметром от 6 до 500 нм с двумя максимумами размеров около 10 и 80 нм. На 7-й день явных изменений не происходит (Рисунок 4А). Фракция Ф16 на 2-й день хранения содержит везикулы диаметром 25-80 нм и 150-700 нм. Образуется два максимума диаметров: 50 и 300 нм. Такое распределение по размерам согласуется с результатами СЭМНН (Рисунок 4Б). Фракция Ф100 на 2-й день хранения содержит две выраженные популяции везикул с диаметром 20-80 нм и 120-500 нм. Максимумы этих популяций равны 50 нм и 250 нм. Присутствие в этой фракции везикул диаметром около 50 нм согласуется с результатами СЭМНН, а объекты диаметром около 250 нм и выше, по-видимому, являются агрегатами более мелких частиц (Рисунок 4В). В обеих фракциях везикул на 7-й день хранения максимумы распределений смещаются в сторону больших диаметров.

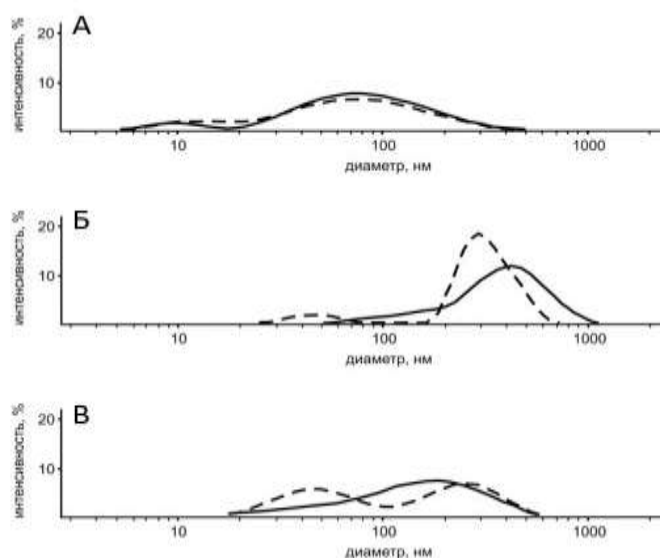


Рисунок 4. Оценка Ф16, Ф100, Фс фракций методом ДРС на 2-й и 7-й дни хранения концентрата тромбоцитов. Объекты из Фс фракции (А) и фракций Ф16 (Б) и Ф100 (В). Штриховая линия — 2-й день хранения, сплошная линия — 7-й день хранения.

По размерам и способу выделения объекты, наблюдаемые во фракциях Ф16 и Ф100 наноразмерные, явно соответствуют ранее охарактеризованным тромбоцитарным мембранным везикулам – микровезикулам и экзосомам (Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R. et al, 1999; Pook M., Tamming L., Padari K. et al, 2014). При оценке фракций тромбоцитного концентрата методами СЭМНН и ДРС показано, что предложенные режимы центрифугирования позволяют получить фракции, обогащенные тромбоцитарными мембранными везикулами, содержащие достаточно чистые образцы везикул, которые могут использоваться для дальнейшей оценки свойств и функций везикул методами с высокой чувствительностью.

Оценка микроРНК во фракциях показала, что микроРНК-142-3р имела тенденцию к увеличению на 7-й день только в Ф16 фракции ($p = 0,063$), тогда как в остальных фракциях

статистически значимых различий не выявлено: Ф5 ($p = 0,688$), Ф100 ($p = 0,156$), Фс ($p = 0,438$), цельный концентрат ($p = 1$). Содержание микроРНК-223 увеличивалось в Ф16 и Ф100 фракциях ($p = 0,031$), без значимых изменений в Ф5 ($p = 0,563$), Фс ($p = 0,438$) и цельном концентрате ($p = 0,313$). МикроРНК-21 увеличивалась только в Ф100 ($p = 0,031$); в остальных фракциях различий не выявлено: Ф5 ($p = 0,313$), Ф16 ($p = 0,438$), Фс ($p = 0,094$), цельный концентрат ($p = 0,156$). МикроРНК-126 увеличивалась в Ф16 и Ф100 ($p = 0,031$), без изменений в Ф5 ($p = 0,219$), Фс ($p = 0,156$) и цельном концентрате ($p = 0,563$). МикроРНК-15а увеличивалась только в Ф16 ($p = 0,031$); в остальных фракциях различий не выявлено: Ф5 ($p = 1$), Ф100 ($p = 0,063$), Фс ($p = 0,313$), цельный концентрат ($p = 0,562$). Для микроРНК-451а отмечено увеличение в Ф5 и Ф100 ($p = 0,031$) и снижение во Фс ($p = 0,031$), без изменений в Ф16 ($p = 0,219$) и цельном концентрате ($p = 0,563$). МикроРНК-221 и микроРНК-210 увеличивались только в Ф100 фракции ($p = 0,031$), без значимых изменений в остальных фракциях. МикроРНК-199а, микроРНК-223*, микроРНК-145 и микроРНК-326 не продемонстрировали значимых изменений ни в одной из фракций.

Полученные результаты наглядно представлены в таблице 1. Для всех микроРНК со статистически значимым изменением уровня на 7-й день хранения посчитан индекс микроРНК, отображающий, во сколько раз изменился уровень микроРНК. Индекс микроРНК рассчитывается по формуле: индекс микроРНК = Ме 7-й день (уровень микроРНК на 7-й день) / Ме 2-й день (уровень микроРНК на 2-й день), где Ме – медиана.

Таблица 1. Индекс микроРНК.

микроРНК	Ф5	Ф16	Ф100	Фс
микроРНК-142-3р	N/A	1,4	N/A	N/A
микроРНК-223	N/A	2,0	2,9	N/A
микроРНК-21	N/A	N/A	1,9	N/A
микроРНК-126	N/A	3,0	4,2	N/A
микроРНК-15а	N/A	2,5	2,9	N/A
микроРНК-451а	1,8	N/A	2,5	-0,5
микроРНК-221	N/A	2,5	5,6	2,1
микроРНК-210	N/A	2,3	2,9	N/A
микроРНК-199а	N/A	N/A	N/A	N/A
микроРНК-326	N/A	N/A	N/A	N/A
микроРНК-223*	N/A	N/A	N/A	N/A
микроРНК-145	N/A	N/A	N/A	N/A

Примечания: 1) Отрицательный знак перед индексом указывает на снижение уровня микроРНК на 7-й день. 2) N/A – индекс микроРНК не продемонстрировал изменение в уровнях микроРНК.

Несмотря на ожидаемое снижение уровня микроРНК при хранении (Köberle V., Kakoschky B., Ibrahim A.A. et al, 2016), большинство из них увеличивалось, что может быть связано с образованием зрелых микроРНК или деградацией полноразмерных РНК с

формированием коротких регуляторных фрагментов, характерных для «старения» тромбоцитов (Kato M., Slack F.J., 2013). Повышение уровня микроРНК в везикулах, вероятно, обусловлено активацией тромбоцитов и усилением процессов везикуляции (Willeit P., Zampetaki A., Dudek K. et al, 2013).

Полученные данные согласуются с литературой: miR-21 преимущественно ассоциирована с везикулами (Köberle V., Kakoschky B., Ibrahim A.A. et al, 2016), miR-142-3p накапливается в везикулах и может рассматриваться как маркер везикуляции, а miR-223 и miR-126 — как маркеры активации тромбоцитов (Willeit P., Zampetaki A., Dudek K. et al, 2013; Sunderland N., Skroblin P., Barwari T. et al, 2017). Увеличение miR-223 в везикулах согласуется с данными об её росте при активации тромбоцитов (Ambrose A.R., Alsahli M.A., Kurmani S.A. et al, 2018) и её роли в регуляции рецептора P2Y₁₂ (Landry P., Plante I., Ouellet D.L. et al, 2009; Sunderland N., Skroblin P., Barwari T. et al, 2017). Отсутствие изменений антисмысловой miR-223* подтверждает её ограниченное участие в этих процессах. Увеличение miR-15a связано с регуляцией активации тромбоцитов и апоптоза (Basak I., Bhatlekar S., Manne B.K. et al, 2017; Yu S., Deng G., Qian D. et al, 2014), а изменение уровня miR-451a может отражать апоптотические процессы в тромбоците (Kawamura S., Iinuma H., Wada K. et al, 2019; Su Z., Ni L., Yu W. et al, 2015; Xu K., Han B., Bai Y. et al, 2019; Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A. et al, 2014). Наиболее выраженные изменения продемонстрировала miR-221 (до 5,6 раза в Ф100), что позволяет рассматривать её как перспективный маркер качества ТК. В целом, несмотря на ограничения метода (трудоемкость и стоимость), анализ микроРНК расширяет понимание процессов повреждения и активации тромбоцитов при хранении, включая влияние инактивации патогенов (Osman A., Hitzler W.E., Meyer C.U. et al, 2015).

При анализе общего белкового состава фракций тромбоцитного концентрата определяются дополнительные бэнды, появляющиеся на 7-й день хранения, как в тромбоцитах, так и во фракциях мембранных везикул (Рисунок 5, стрелки). Это свидетельствует об изменении белкового состава ТК и фракций мембранных везикул при хранении. Такие изменения могут быть обусловлены селективным накоплением продуктов определенных генов в мембранных везикулах и/или запуском известного для препаратов, хранящихся тромбоцитов процесса синтеза белка *de novo* (Weyrich A.S., Lindemann S., Tolley N.D. et al, 2004; Thon J.N., Devine D.V., 2007; Сироткина О.В., Ласковец А.Б., Андоскин П.А. и др. 2016).

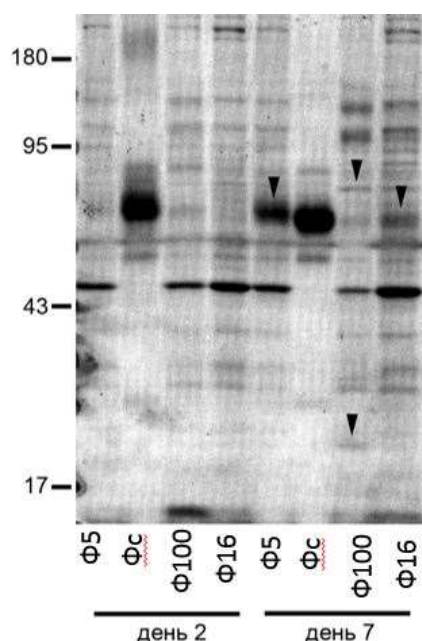


Рисунок 5. Анализ общего белкового состава фракций тромбоцитного концентрата на 2-й и 7-й дни хранения, окраска Ронсеау S. Головки стрелок указывают на примеры бэндов, интенсивность которых увеличивается на 7-й день.

Далее методом иммуноблотинга оценивалось изменение состава фракций ТК в процессе хранения на примере конкретных белков: P2Y₁₂, CD42b, Каспаза 3 (Включая активированную каспазу 3), VDAC1, CD9, TSG101, AGO2 (Рисунок 6).

Тромбоцитарный белок P1Y₁₂ на 2-й день хранения содержится только в Ф5 фракции, на 7-й день его количество увеличивается в Ф5 фракции, кроме того, данный белок на 7-й день определяется в Фс фракции. Белок CD42b на 2-й день детектируется в двух фракциях Ф5 и Ф16, на 7-й день количество белка снижается в Ф5 фракции. CD42b на 7-й день накапливается в Ф16 и Ф100 фракциях. Неактивную форму каспазы-3 (прокаспазу-3) на 2-й и 7-й дни хранения содержат фракции Ф5, Ф16, Ф100. При этом активированная каспаза-3 практически отсутствует в тромбоцитах на 2-й день хранения, но ее уровень значительно возрастает в тромбоцитах на 7-й день. Интересно, что фракция Ф100 на 2-й день хранения содержит большое количество активированной каспазы-3, при этом на 7-й день ее содержание снижается. VDAC1 обнаружен в фракциях Ф5, Ф16, Ф100, значительно VDAC1 изменяет свой уровень только в Ф5 фракции, где на 7-й день увеличивается его содержание. CD9 содержится в Ф5, Ф16, Ф100, но больше всего в Ф100 фракции, где значительно накапливается на 7-й день. TSG101 содержится во всех фракциях и не демонстрирует значительной разницы во фракциях на 2-й и 7-й дни хранения. AGO2 на 2-й день хранения присутствует в фракциях Ф5, Ф16, Ф100, на 7-й его содержание в Ф100 фракции значительно увеличивается, в других фракциях его содержание значительно не изменяется.

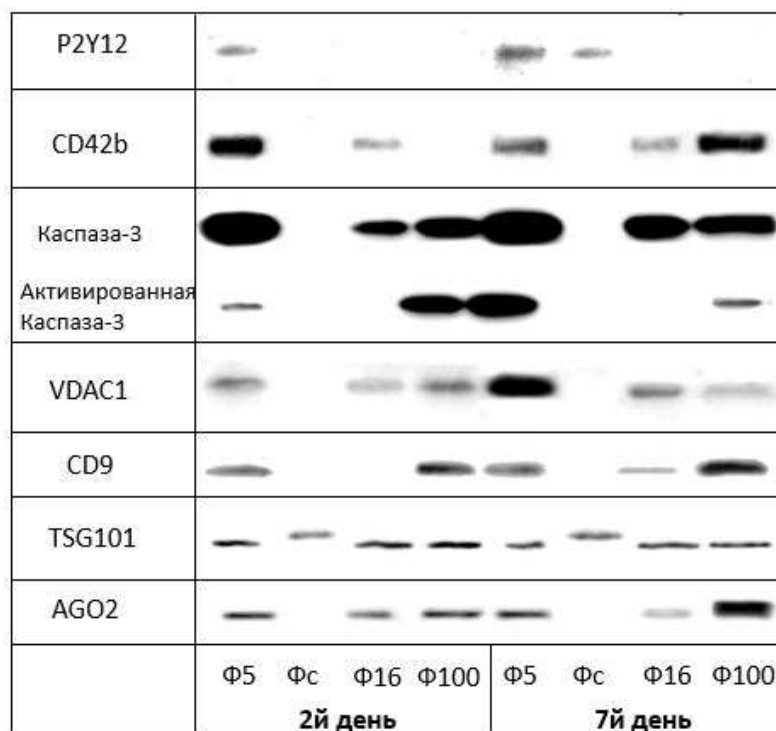


Рисунок 6. Детекция специфических белков с помощью иммуноблотинга во фракциях тромбоцитного концентрата на 2-й и 7-й дни хранения

Белок P2Y12 опосредует важные функции тромбоцитов, включая агрегацию и секрецию гранул, он активируется АДФ, который является физиологическим агонистом этого рецептора (Sunderland N., Skroblin P., Barwari T. et al, 2017). На 7-й день хранения концентрата увеличивается содержание P2Y12 во фракции тромбоцитов Φ5, что свидетельствует об активации тромбоцитов и секреции гранул хранения.

GP Ibα (CD42b) характерен для молодых тромбоцитов и снижается с возрастом. Он входит в комплекс GP Ib-IX-V, участвующий в адгезии и активации тромбоцитов, а также в регуляции апоптоза и выживания тромбоцитов (Du X., Fox J.E., Pei S., 1996; Gardiner E.E., Andrews R.K., 2014). В модели на мышах показано, что активация GP Ibα может индуцировать нейраминидазу Neu1 и приводить к тромбоцитопении (Grewal P.K., 2010; Li J., van der Wal D.E., Zhu G. et al, 2015; Quach M.E., Chen W., Li R., 2018). Снижение GP Ibα рассматривается как признак старения тромбоцитов (Quach M.E., Chen W., Li R., 2018). В Φ5 фракции выявлено снижение CD42b, что может указывать на снижение функциональной активности.

Активированная каспаза-3 на 2-й день присутствует в низких количествах в Φ5, но резко возрастает на 7-й день, что соответствует признакам апоптоза тромбоцитов (Li J., Xia Y., Bertino A.M., Coburn J.P. et al, 2000). Активацию каспазы-3 рассматривают как ключевой фактор повреждения тромбоцитов при хранении (Quach M.E., Chen W., Li R., 2018), а её ингибирование может продлить функциональную активность и жизнеспособность тромбоцитов

в концентрате (Shiri R., Yari F., Ahmadinejad M. et al, 2014). Обнаружение активированной каспазы-3 во Ф100 на 2-й день может указывать на её ассоциацию с малыми везикулами и возможную межклеточную передачу апоптотического сигнала (Boilard E., Duchez A.C., Brisson A., 2015).

Белок VDAC1, участвующий в регуляции митохондриального апоптоза (Blachly-Dyson E., Baldini A., Litt M. et al, 1994), увеличивается на 7-й день, что также указывает на активацию апоптоза. Было показано, что N-концевой регион VDAC1 требуется для высвобождения проапоптотических белков из матрикса митохондрии – цитохрома c, второго митохондриального активатора каспаз SMAC и индуцирующего апоптоз фактора. Известно, что индукция апоптоза связана с VDAC олигомеризацией (Shoshan-Barmatz V., Keinan N., Abu-Hamad S. et al, 2010).

CD9 рассматривался как маркер везикул и преимущественно ассоциирован с малыми везикулами (<100 нм) (Bobrie A., Colombo M., Krumeich S. et al, 2012). В Ф16 он появляется только на 7-й день, а во Ф100 определяется уже на 2-й день с последующим увеличением, что указывает на его связь преимущественно с экзосомами и ограниченность как универсального маркера.

TSG101, компонент сортировочного комплекса необходимого для транспорта (ESCRT sorting complexes required for transport), этот комплекс необходим для формирования везикул и мультивезикулярных телец (Henne W.M., Buchkovich N.J., Emr S.D. 2011; Sahoo S., Klychko E., Thorne T. et al, 2011). Интересно, что обе фракции везикул содержат TSG101, это может говорить о участии TSG101 в нескольких путях формирования везикул, или свидетельствовать о том, что путем эндоцитоза с формированием эндосом могут образовываться везикулы более 100 нм в диаметре. Уменьшение количества TSG101 в тромбоцитах на 7-й день может говорить об активации процесса генерации везикул, так как TSG101 рассматривают в качестве инициатора пути биосинтеза экзосом (Henne W.M., Buchkovich N.J., Emr S.D., 2011).

Белок Argonaute 2, участвующий в формировании RISC-комплекса с микроРНК (Landry P., Plante I., Ouellet D.L. et al, 2009), защищает микроРНК от дегградации (Hulsmans M., Holvoet P., 2013). На 7-й день количество Argonaute 2 значительно увеличивается во фракции Ф100. Не исключено, что везикулы небольшого размера преимущественно участвуют в межклеточной коммуникации, как уже было показано в других работах (Sadallah S., Eken C., Martin P.J. et al, 2011).

При анализе методом проточной цитометрии оценивалось количество событий в микролитре, событий/мкл. Тромбоцитарные мембранные везикулы определялись как структуры размером 0,1-1 мкм, несущие на своей поверхности CD41. Концентрация CD41

позитивных ТМВ возрастала на 7-й день хранения как в Ф16 фракции (значение $p = 0,0078$), так и в Ф100 (значение $p = 0,0078$) (Рисунок 7).

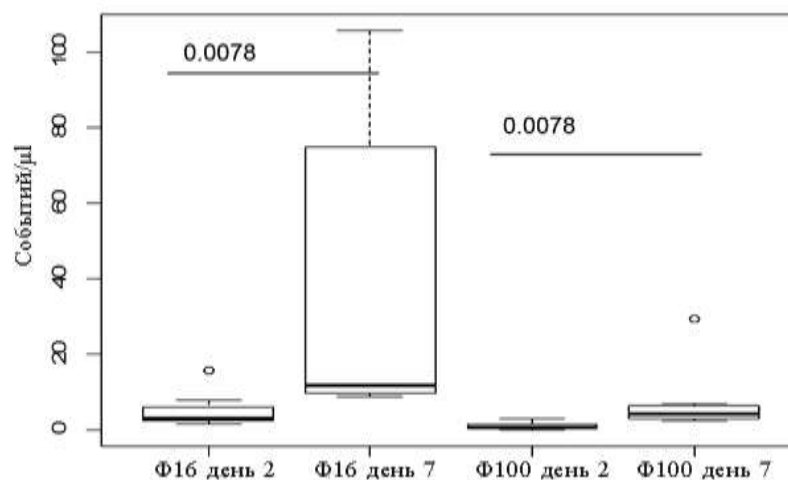


Рисунок 7. Анализ изменения концентрации CD41 позитивных ТМВ в Ф16 и Ф100 фракциях на 2-й и 7-й дни хранения

Окрашивание антителами к CD45 на 2-й день выявило CD45-позитивные ТМВ лишь в отдельных образцах: в фракции Ф16 — в 3 концентратах (до 0,03 событий/мкл), в Ф100 — в 1 концентрате (0,01 событий/мкл). На 7-й день статистически значимых изменений не отмечено (Ф16: $p = 0,332$; Ф100: $p = 1$), относительное содержание оставалось низким. Окрашивание на CD235a и VEGFR2 в Ф16 на 2-й день выявило оба маркера только в одном образце; в остальных они отсутствовали. Во фракции Ф100 данные маркеры не обнаружены ни в одном ТК. Их относительное содержание было незначительным. Таким образом, ТК содержат лишь следовые количества ТМВ лейкоцитарного, эритроцитарного и эндотелиального происхождения, не увеличивающиеся при хранении, что косвенно указывает на отсутствие контаминации.

Вторым вариантом окраски было использование маркеров тромбоцитов CD41 и Р-селектин (CD62P). Концентрация CD41/CD62P позитивных тромбоцитов увеличилась на 7-ой день ($p=0,031$), при этом концентрация увеличивалась в больших диапазонах от 4 до 50 раз (Рисунок 8А) Концентрация CD41/CD62P позитивных ТМВ на 7-ой день хранения возросла только в Ф100 фракции ($p=0,015$), но их концентрация не превышала 0,09 событий/мкл (Рисунок 8В). Ф16 фракция не показала статистически значимой разницы в концентрации CD41/CD62P позитивных ТМВ (Рисунок 8Б)

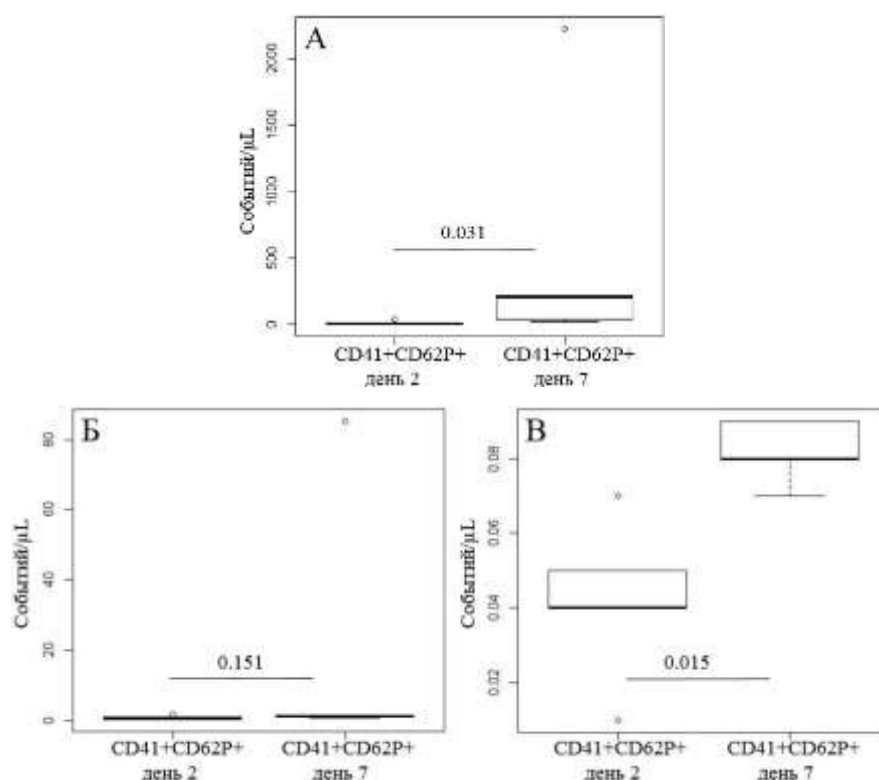


Рисунок 8. Анализ изменения концентрации ТМВ, несущих маркеры CD41 и CD62P в Ф5, Ф16 и Ф100 фракциях на 2-ой и 7-ой дни хранения. А – фракция Ф5; Б – фракция Ф16; В – фракция Ф100.

Методом проточной цитометрии выявляются и признаки повышенного выделения тромбоцитами мембранных везикул. Известно, что тромбоциты при активации выделяют мембранные везикулы (Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R. et al, 1999; Marcoux G., Duchez A.C., Rousseau M. et al, 2016). Важно отметить, что большинство CD41-позитивных везикул в кровотоке происходит от мегакариоцитов, поэтому появление CD41-позитивных везикул может свидетельствовать об усиленной активации тромбоцитов (Aatonen M., Ohman T., Nyman T.A. et al, 2014). CD41 представляет собой мембранный тромбоцитарный белок семейства интегринов, компонент гликопротеина IIb/IIIa – рецептора тромбоцитов для фибриногена, обеспечивающего агрегацию тромбоцитов (Mateo A., Perez de la Lastra J.M., Garrido J.J. et al, 1996). При анализе фракций ТК, обогащенных везикулами, выявлено увеличение CD41 позитивных везикул, некоторые образцы ТК демонстрировали увеличение концентрации таких частиц в 30 раз. Увеличение CD41 позитивных везикул при хранении ТК было выявлено и в других исследованиях (Marcoux G., Duchez A.C., Rousseau M. et al, 2016). Показано, что CD41 содержит тромбоцитарные антигены, приводящие к аллоиммунизации и развитию рефрактерности тромбоцитов при переливании (Forest S.K., Hod E.A., 2016).

На данном этапе существуют минимальные требования к качеству тромбоцитных концентратов, по которым возможно судить только о количестве клеток. Они не учитывают биохимические и функциональные изменения, происходящие с тромбоцитами. Однако такие

изменения связаны с серьезными клиническими рисками (Bessos H., Seghatchian J. et al, 2005). Помимо недостаточного эффекта от трансфузии (рефрактерность тромбоцитов после трансфузии, повышенный клиренс тромбоцитов) существует вероятность возникновения неблагоприятных трансфузионных реакций (Marcoux G., Duchez A.C., Rousseau M. et al, 2016). В процессе изготовления и хранения ТК помимо активации самих тромбоцитов, происходит высвобождение везикул (Trochanowska-Pauk N., Walski T., Bohara R. et al, 2024). Активация тромбоцитов и везикуляция ведут к функциональным нарушениям в тромбоцитах и его ускоренному апоптозу (Bessos H., Seghatchian J. et al, 2005). Тромбоцитарные везикулы, помимо самих тромбоцитов, являются важным компонентом тромбоцитного концентрата, который оказывает влияние на эффективность трансфузии. Везикулы участвуют в процессах гемостаза, интенсифицируют клиренс тромбоцитов из кровотока, участвуют в апоптозе тромбоцитов, участвуют в иммунорегуляции и в воспалительных реакциях (Piccin A., Murphy W.G., Smith O.P. et al, 2007; Quach M.E., Chen W., Li R., 2018; Wu J., Piao Y., Liu Q. et al, 2021). Избыточное накопление и изменение молекулярного состава везикул в процессе хранения тромбоцитного концентрата повышает риск развития неблагоприятных трансфузионных реакций, в частности команда McVey показала, что переливание пятидневных тромбоцитарных везикул мышам вызывало характерные признаки TRALI, при этом переливание однодневных везикул не приводило к таким последствиям (McVey M.J., Weidenfeld S., Maishan M. et al, 2021). Везикулы транспортируют биохимические соединения от родительских тромбоцитов и влияют на функции клеток-мишеней. Кроме того, микроРНК тромбоцитов, такие как miR-24, miR-223 и miR-126, содержатся в везикулах и могут попадать в клетки мишени и оказывать различные эффекты на клетку реципиент (Michael J.V., Wurtzel J.G.T., Mao G.F. et al, 2017; Gasperi V., Vangapandu C., Savini I. et al, 2018). Для комплексной оценки качества тромбоцитного концентрата везикулы являются наиболее перспективным объектом. Количественная оценка везикул отображает как функциональное состояние тромбоцитов, так и влияние самих везикул на результат трансфузии. Проточная цитометрия позволяет дать количественную и биохимическую характеристику везикул (Vučetić D., Ilić V., Vojvodić D. et al, 2018).

Таким образом, везикулы могут служить маркером функционального состояния тромбоцитов и оценки качества ТК, при этом увеличение их количества свидетельствует об активации тромбоцитов и потере клетками функциональной активности. В данном исследовании показано, что чувствительности современных проточных цитометров достаточно для количественной характеристики везикул. Необходимо проводить дальнейшие исследования с помощью проточной цитометрии для определения диапазонов концентрации везикул, допускающих переливания концентрата реципиенту. Для этого требуется дальнейшая оценка

уровня везикул непосредственно перед трансфузией с оценкой тромбоцитов в кровотоке после переливания по критериям эффективности переливания тромбоцитного концентрата.

Протокол оценки везикуляции в тромбоцитном концентрате.

На базе проведенного исследования предлагается в качестве метода оценки качества тромбоцитного концентрата использовать количественную характеристику везикул с помощью высокочувствительной проточной цитометрии. В рамках данного метода разработан протокол оценки качества тромбоцитного концентрата, основанный на количественной характеристике везикул в Ф16 фракции методом проточной цитометрии с применением маркера CD41 (Рисунок 9). Протокол можно разделить на два этапа: первый представляет собой получение образца обогащенного тромбоцитарными мембранными везикулами методом центрифугирования, второй заключается в окраске образца флуоресцентно мечеными антителами и непосредственной оценке результата на проточном цитометре.



Рисунок 9. Протокол оценки качества концентрата тромбоцитов.

Результаты настоящего исследования показали, что более 80% всех маркер-позитивных везикул были выделены во фракции Ф16. Принимая это во внимание, для получения фракции, обогащенной тромбоцитарными мембранными везикулами, целесообразно использовать центрифугирование при 16000 g. Соответственно для оценки везикул методом проточной цитометрии достаточно анализа Ф16 фракции, что значительно упрощает этап подготовки проб к исследованию. Режим центрифугирования для получения фракции везикул опционален и может выбираться в соответствии с имеющимся на станции переливания крови оснащением, но должен лежать в диапазоне от 10000 g до 16000 g.

В качестве маркера для количественной характеристики везикул на проточном цитометре необходимо использовать наиболее экспрессированные на тромбоцитарных мембранных везикулах белки такие как: CD41, CD42a, CD61, CD62P (Wu J, Piao Y, Liu Q, et al 2021). В данном исследовании оценка методом проточной цитометрии выполнена с использованием маркера CD41. CD41 имеет несколько преимуществ: его увеличение является признаком активации тромбоцитов (Aatonen M., Ohman T., Nyman T.A. et al, 2014) и повышает риск развития аллоиммунизации и рефрактерности тромбоцитов (Forest S.K., Hod E.A., 2016).

Таким образом, определение количества/концентрации CD41 позитивных везикул методом проточной цитометрии можно считать подходящим способом оценки качества тромбоцитного концентрата.

ВЫВОДЫ

- 1) В тромбоцитном концентрате происходит образование тромбоцитарных мембранных везикул, которые накапливаются в процессе хранения и выступают маркером активации тромбоцитов; тромбоцитарные мембранные везикулы могут быть выявлены с помощью сканирующей электронной микроскопии и проточной цитометрии.
- 2) Разработанный способ выделения тромбоцитарных мембранных везикул на основе дифференциального центрифугирования с режимом в диапазоне от 5000 g до 100000 g позволяет получить обогащенные везикулами фракции для дальнейших лабораторных исследований.
- 3) Содержание ключевых белков – тромбоцитарных рецепторов, факторов регуляции апоптоза и маркеров микровезикул – GP IВ α , активированная каспаза-3, VDAC1, AGO2, а также содержание микроРНК – miR-126, miR-223, miR-15a, miR-221, меняется в тромбоцитах и мембранных везикулах в процессе хранения тромбоцитного концентрата, что свидетельствует об изменениях функциональной активности клеток и везикул, которые могут влиять на качество концентрата; изменение количества указанных белков и микроРНК может служить биохимическим и молекулярно-генетическим маркером функциональной активности тромбоцитов при хранении тромбоцитного концентрата.
- 4) Предложенный протокол выделения мембранных везикул и определение их количества с помощью проточной цитометрии позволяет провести лабораторную оценку функционального состояния клеток в тромбоцитном концентрате в процессе хранения и перед процедурой трансфузии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-трансфузиологов.

1. Рекомендуется использовать протокол оценки качества тромбоцитного концентрата на основе определения количества внеклеточных мембранных везикул с помощью проточной цитометрии в клинической лабораторной диагностике как инструмент оценки качества концентрата перед трансфузией, при разработке новых методов получения и хранения препаратов крови, новых сред для стабилизации, контейнеров для хранения и транспортировки.
2. Рекомендуется при применении разработанного протокола оценки качества тромбоцитного концентрата на основе определения количества внеклеточных мембранных везикул с помощью проточной цитометрии определение референсных интервалов количества мембранных везикул

с учетом конкретной модели используемого проточного цитометра, флуоресцентно меченых антител, оборудования для выделения фракций мембранных везикул, способа получения и хранения концентрата.

3. Для выделения фракции тромбоцитарных мембранных везикул, достаточной для оценки функциональной активности тромбоцитов в практических условиях клинико-диагностической лаборатории, рекомендуется использовать режим центрифугирования от 10000 g до 16000 g.

4. Для количественной характеристики везикул на проточном цитометре при оценке качества тромбоцитного концентрата рекомендуется использовать белки CD41, CD42a, CD61, CD62P, экспрессированные на тромбоцитарных мембранных везикулах.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Необходимо проводить дальнейшие исследования для определения диапазонов концентрации везикул, допускающих переливание тромбоцитного концентрата реципиенту. Для этого требуется определение уровня везикул непосредственно перед трансфузией с дальнейшей оценкой тромбоцитов после переливания по критериям эффективности переливания концентрата. Дальнейшее определение клинической информативности предлагаемого метода может осуществляться с помощью оценки клиренса тромбоцитов. Оценка клиренса может осуществляться несколькими способами. Первый самый простой и распространенный способ: измерение уровня тромбоцитов в крови в определенные временные точки. Для этих целей оптимально взять точки принятые для оценки эффективности трансфузий: через 1, 24 и 48 часов после трансфузии. Второй более подходящий для оценки клиренса тромбоцитов после трансфузии метод заключается в радиоизотопном или флуоресцентном (carboxyfluorescein succinimidyl ester, 5-chloromethylfluorescein diacetate, or N-hydroxysuccinimido biotin) окрашивании тромбоцитов концентрата перед трансфузией с последующим выделением их из крови и количественной оценкой после трансфузии в определенные временные точки. При втором способе оценивается два параметра. Первый параметр, известный как восстановление тромбоцитов, обозначает появление перелитых тромбоцитов в кровотоке реципиента. Второй, известный как выживаемость тромбоцитов, характеризует клиренс перелитых тромбоцитов. (Quach ME, Chen W, Li R, 2018). Также потенциально может выполняться оценка уровня тромбоцитарных внеклеточных везикул в кровотоке до трансфузии и после нее.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, а также международных базах данных, для опубликования основных научных результатов диссертации по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

1. Fedorov A., Kondratov K., Kishenko V., Mikhailovskii V., Kudryavtsev I., Belyakova M., Sidorkevich S., Vavilova T., Kostareva A., Sirotkina O., Golovkin A. Application of high-sensitivity flow cytometry in combination with low-voltage scanning electron microscopy for characterization of nanosized objects during platelet concentrate storage. *Platelets*. 2020;31(2):226-235.
2. Кишенко В.В., Сироткина О.В., Сидоркевич С.В., Вавилова Т.В. Тромбоцитарные везикулы — потенциальный маркер качества концентрата тромбоцитов. *Профилактическая и клиническая медицина*. 2020;4(77):93–101.
3. Кишенко В.В., Кондратов К.А., Михайловский В.Ю., Сидоркевич С.В., Вавилова Т.В., Сироткина О.В., Федоров А.В. Выделение тромбоцитами мембранных везикул, несущих зрелую микроРНК-221 и активированную каспазу-3, в процессе хранения тромбоцитного концентрата. *Цитология*. 2018;60(№7):563-566.
4. Кишенко В.В., Кондратов К.А., Белякова М.В., Михайловский А.Ю., Сидоркевич С.В., Вавилова Т.В., Федоров А.В., Сироткина О.В. Дифференциальная экспрессия белков CD42b и CD9 в тромбоцитах и внеклеточных мембранных везикулах при хранении тромбоцитного концентрата. *Цитология*. 2017;59(№7):467-473.

Тезисы и прочие публикации:

5. Sirotkina O., Kondratov K., Golovkin A., Kishenko V., Belyakova M., Fedorov A. Analysis of microRNA release during storage of platelet concentrate. *ISLH 2016 Abstracts. Int J Lab Hem.* 2016;38(Suppl. 2):100.
6. Кишенко В., Сироткина О., Федоров А., Кондратов К., Головкин А., Белякова М., Вавилова Т. Мониторинг свойств тромбоцитарного концентрата при хранении – анализ функционального состояния тромбоцитов, микровезикуляции и экспрессии генов регуляторов. XVII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, 29 февраля-5 марта 2016 г. Сборник тезисов, стр.60.
7. Sirotkina O., Kishenko V., Golovkin A., Belyakova M., Kondratov K., Fedorov A., Vavilova T. Detection and Characterization of Extracellular Vesicles at Different Stages of Platelet Concentrate Storage Using Highresolution Flow Cytometry. *ISTH 2017 Abstracts. Res Pract Thromb Haemost.* 2017;1(Suppl 1):1289.
8. Сироткина О.В., Кишенко В.В., Кондратов К.А., Федоров А.В., Вавилова Т.В. Перспективы недалекого будущего – новые маркеры активации тромбоцитов. Материалы VI Всероссийской конференции «Противоречия современной кардиологии: спорные и нерешенные вопросы» (10-11 ноября 2017 года). - Самара, 2017. – 148 с., стр. 39-40.
9. Сироткина О.В., Кишенко В.В., Кондратов К.А., Белякова М.В., Топанова А.А., Вавилова Т.В., Федоров А.В. Оценка функциональной активности тромбоцитов в препаратах тромбоцитного концентрата – роль микрочастиц, содержащих микроРНК. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. – Вып. 26.- Новосибирск: Академиздат, 2017.- 156 с., стр. 116-137.
10. Сироткина О.В., Черныш Н.Ю., Гайковая Л.Б., Топанова А.А., Мельничникова О.С., Ермаков А.И., Замятина К.Н., Кишенко В.В., Вавилова Т.В. Оценка системы гемостаза лабораторными методами при тромбоцитарных состояниях. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. чл.-корр. РАЕН А.Б. Масленникова. – Вып. 28.- Новосибирск: Академиздат, 2018.- 194 с., стр. 90-126.

11. Golovkin A., Kondratov K., Kishenko V., Fedorov A., Kudryavtsev I., Belyakova M., Vavilova T., Sirotkina O. The new approach for nanoparticles detection using flow cytometry. *Cardiovascular Research*. 2018;114(suppl_1): S111.
12. Kishenko V., Kondratov K., Fedorov A., Sirotkina O. Quantitative Alteration of Vesicle Associated miRs and RISC Complex Reflect Platelet Concentrate Molecular Pattern during Storage as Platelets Activity Model. *ISTH 2018 Abstracts. Res Pract Thromb Haemost*. 2018 Jul; 2(Suppl 1): 1–368, page 39 abstract PB083.
13. Sirotkina O.V., Kishenko V.V., Kondratov K.A., Fedorov A.V., Vavilova T.V. Microparticles containing microRNAs provide platelets functions. The book of abstracts The Congress on Open Issue in Thrombosis and Hemostasis 2018 jointly with the 9th Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology, October 4-6, 2018, p.258.
14. Кищенко В.В., Кондратов К.А., Сироткина О.В., Федоров А.В. Уровни микроРНК в тромбоцитах и тромбоцитарных мембранных везикулах при хранении тромбоцитного концентрата. Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии 17–22 февраля 2018 г. Сборник тезисов и список участников, стр. 131.
15. Сироткина О.В., Кищенко В.В., Головкин А.С., Сидоркевич С.В., Вавилова Т.В. Количество микровезикул как потенциальный маркер для оценки качества концентрата тромбоцитов при хранении. Сборник материалов Российского форума по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии, 8-9 октября 2020 г., стр. 116.
16. Сироткина О.В., Кищенко В. В., Вавилова Т.В. Молекулярный портрет клеток в концентрате тромбоцитов. Материалы XXX Всероссийской юбилейной научно-практической конференции «Национальные традиции клинической лабораторной диагностики». Москва, 18-20 марта 2025 года / Под редакцией В.В. Долгова. – М.: Издательство «У Никитских ворот», 2025. – 352 с., стр. 275-277.

Список сокращений

АДФ — аденозиндифосфат
 ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
 ДРС — динамическое рассеяние света
 МикроРНК (miRNA, microRNA, miR) — микро-рибонуклеиновая кислота
 ПЦР — полимеразная цепная реакция
 СЭМНН — сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения
 ТК — тромбоцитный концентрат
 ТМВ — тромбоцитарные мембранные везикулы
 AGO2 — белок Argonaute 2 (Аргонавт-2)
 CD (Cluster of Differentiation) — кластер дифференцировки
 ESCRT — комплекс сортировки эндосом, необходимый для транспорта
 GP Iba — гликопротеин Ib альфа
 P2Y12 — пуриnergический рецептор P2Y12
 Platelet Storage Lesion (PSL) — повреждение тромбоцитов при хранении
 RISC — РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс
 TRALI — острое повреждение лёгких, связанное с трансфузией
 TSG101 — ген опухолевой чувствительности 101
 VDAC1 — потенциалзависимый анионный канал 1
 VEGFR2 — рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов