

© 2024 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Поступила 03.03.2023
Принята к печати 28.04.2023



EDN: TJLMVF

Контактная информация:

Пантелеев Михаил Александрович,
член-корр. РАН, д-р физ.-мат. наук,
профессор, заведующий лабораторией
клеточного гемостаза и тромбоза
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

© 2024 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 03.03.2023
Accepted 28.04.2023

Correspondence:

Mikhail A. Panteleev,
Corresponding Member of the RAS, Dr. Sci.
in Physics and Mathematics, Professor,
Head of the Laboratory of Cell Hemostasis
and Thrombosis of the Dmitry Rogachev
National Medical Research Center of Pediatric
Hematology, Oncology and Immunology
of Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St.,
Moscow 117997, Russia
E-mail: mapanteleev@yandex.ru

Характеризация функциональной активности тромбоцита представляет собой актуальную проблему для современной лабораторной диагностики и фундаментальных исследований. Традиционные методы, такие как агрегация, давно перестали отвечать современным потребностям в оценке риска кровотечений, выявлении заболеваний, постановке диагноза, контроле и персонализации антитромботической и прогемостатической терапии. Однако эффективной альтернативы им в широкой клинической практике пока не появилось [1, 2].

Одним из наиболее многообещающих подходов к диагностике нарушений тромбоцитов является

DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-192-197

Структура гемостатического агрегата и оценка функциональной активности тромбоцитов методом проточной цитометрии

А.Н. Баландина^{1,2}, А.Д. Купраш^{1,2}, Н.С. Никитин^{2,3}, Т.А. Коваленко^{1,2}, А.А. Игнатова^{1,2},
Ф.И. Атауллаханов¹⁻⁴, М.А. Пантелеев¹⁻⁴

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Тромб представляет собой гетерогенную структуру, состоящую из тромбоцитов в разных функциональных состояниях. Проточная цитометрия является одним из наиболее многообещающих инструментов для диагностики состояния тромбоцитов. Однако вопрос ее оптимизации и стандартизации является предметом бурных дискуссий. Как правильно активировать и пометить тромбоциты для того, чтобы оценить их функциональный статус? В данной работе мы хотели бы коротко осветить этот вопрос и предложить гипотезу, что несколько уровней/типов активации тромбоцита соответствуют различному положению в тромбе и различному физиологическому смыслу. Чтобы сделать вывод о том, как себя «чувствуют» тромбоциты пациента, следует использовать весь этот необходимый и достаточный набор уровней активации.

Ключевые слова: проточная цитометрия, тромбоцит, тромб, свертывание крови

Баландина А.Н. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2024; 23 (2): 192–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-192-197

The structure of hemostatic aggregate and the assessment of platelet functional activity using flow cytometry

A.N. Balandina^{1,2}, A.D. Kuprash^{1,2}, N.S. Nikitin^{2,3}, T.A. Kovalenko^{1,2}, A.A. Ignatova^{1,2}, F.I. Ataullakhanov¹⁻⁴,
M.A. Panteleev¹⁻⁴

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

A thrombus is a heterogeneous structure consisting of platelets in different functional states. Flow cytometry is one of the most promising tools for the diagnosis of platelet state. However, its optimization and standardization are the subjects of heated debate. How to properly activate and label platelets in order to assess their functional status? In this work, we would like to briefly highlight this issue and propose the hypothesis that several levels/types of platelet activation correspond to various positions in the thrombus and various physiological meanings. One should use this entire necessary and sufficient set of activation levels in order to draw a conclusion about how the patient's platelets "feel".

Key words: flow cytometry, platelet, thrombus, blood coagulation

Balandina A.N., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology 2024; 23 (2): 192–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2024-23-2-192-197

проточная цитометрия [3, 4]. Возможность выявлять широкий спектр функциональных дефектов с помощью специфических маркеров (начиная от поверхностных антигенов и вплоть до изменений кальциевой сигнализации [5] и потенциала на митохондриях), использовать любые комбинации активаторов, оценивать десятки тысяч клеток в секунду, работать с цельной кровью с минимализацией подготовки пробы дает широкие возможности для использования цитометрии в практике. Подходы на основе проточной цитометрии доказали свою успешность для многих клинически значимых ситуаций [6–24].

Однако уже многие годы его внедрение в практику буксует. Отдельные группы используют различные протоколы, а эксперты не могут договориться о том, как следует проводить эксперименты [2]: как активировать, на что смотреть, чем метить и т. д.

С одной стороны, проблема, безусловно, решается масштабными клиническими испытаниями. С другой стороны, спектр путей активации тромбоцита [25] и его функциональных ответов [26], изменений настолько велик, что количество вариантов метода делает клинические испытания абсолютно неподъемными. Чтобы преодолеть эту нерешаемую проблему, в данной работе мы хотели бы предложить гипотезу, что несколько уровней/типов активации тромбоцита соответствуют различному положению в тромбе и различному физиологическому смыслу.

Рисунок 1

Пространственная архитектура гемостатического сгустка и тканей при травматическом повреждении почки мыши. Используемые антитела указаны на рисунке

Figure 1

Spatial architecture of the hemostatic clot and tissues in traumatic injury of the mouse kidney. The antibodies used are indicated in the figure

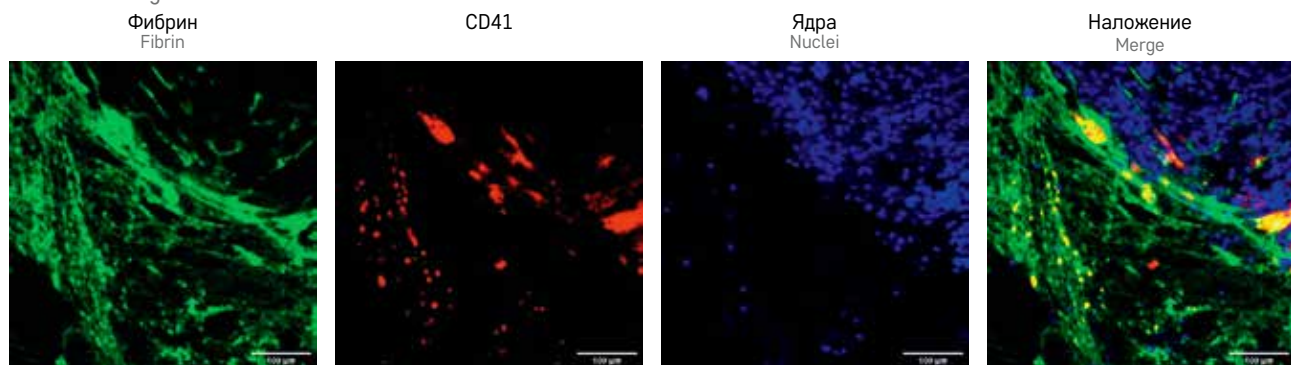


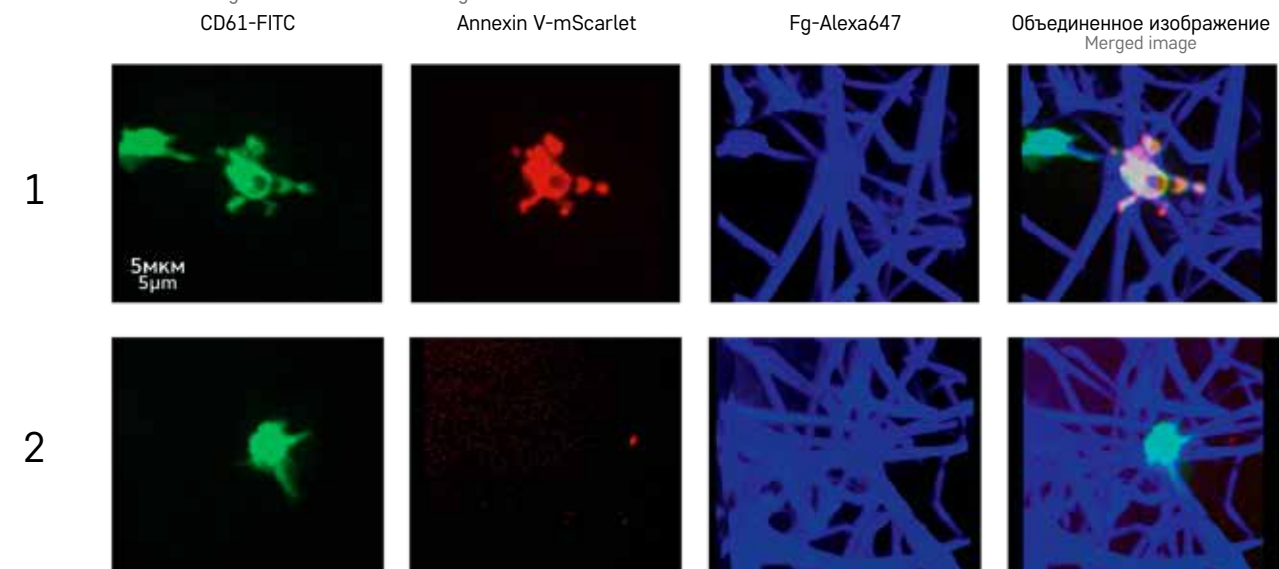
Рисунок 2

Фотографии фосфатидилсерин-положительного (1) и фосфатидилсерин-отрицательного (2) тромбоцитов в фибриновом сгустке, полученные с помощью конфокальной микроскопии. Свертывание в богатой тромбоцитами плазме активировалось 5 пМ тканевого фактора. Для окраски использовались FITC-меченные антитела к CD61, mScarlet-меченный аннексин V и Alexa647-меченный фибриноген

Figure 2

The images obtained using confocal microscopy show a phosphatidylserine-positive (1) and a phosphatidylserine-negative (2) platelet in a fibrin clot

Coagulation in platelet-rich plasma was activated by 5 pM tissue factor. FITC-labeled anti-CD61 antibodies, mScarlet-labeled Annexin V and Alexa647-labeled fibrinogen were used for staining



могут выталкиваться на периферию тромбоцитарного тромба благодаря контракции [34]. Интересно, что в относительно бедных тромбоцитами частях гемостатического сгустка контракция уплотняет [35] тромбоциты и связанный с ними фибрин на периферии (рисунки 3).

Контракция является не просто одним из механизмов перестройки тромба, но также одной из функций тромбоцитов с потенциальной клинической значимостью [36]. Однако физиологическая и патологическая роль контракции или изменения формы тромбоцита в настоящий момент является предметом исследований и дискуссий. Те функции тромбоцитов, которые однозначно важны для гемостаза и тромбоза, включают в себя способность к адгезии, активацию интегринов, выход плотных и альфа-гранул, синтез тромбоксана A₂, прокоагулянтную активность [26]. Эти функции реализуются на разных этапах тромбообразования в разных частях тромба. В частности, работы последних лет, инициированные наблюдением ядра и оболочки гемостатического агрегата в работах Тимоти Сталкера и Лоренса Брасса [37, 38], предполагают существование сильно активированных тромбоцитов близко к поврежденным тканям (с вышедшими альфа-гранулами). Это ядро окружено динамической оболочкой слабоактивированных и обратимо прикрепленных тромбоцитов [39], статус которых управляется секрецией аденозиндифосфата (АДФ) из плотных гранул тромбоцитов ядра тромба [40].

Рисунок 3

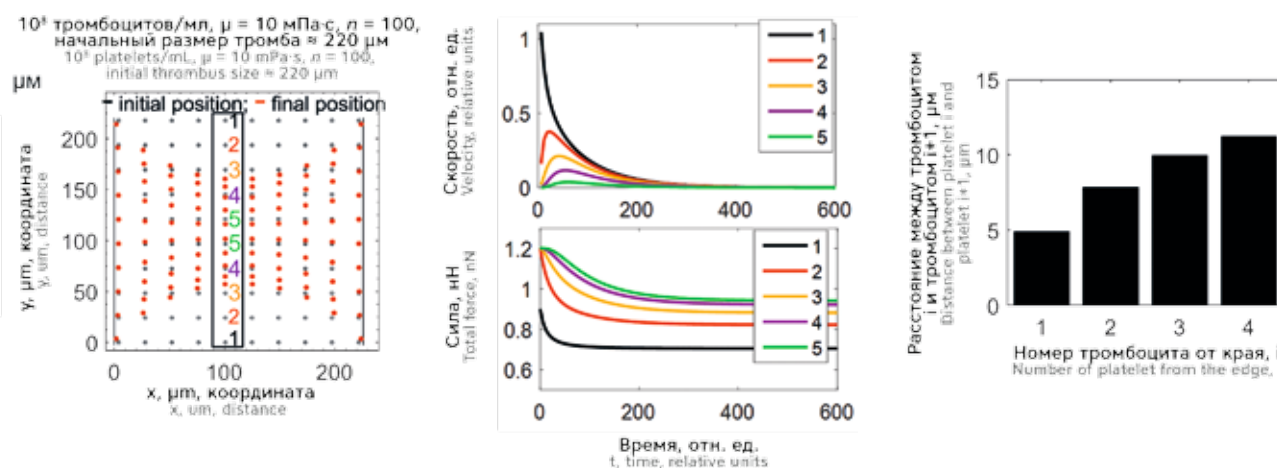
Двумерная модель контракции тромба

Левая панель: круги – тромбоциты; черный цвет – начальное положение; красный цвет – конечное положение после контракции тромба; вертикальные линии – положение холдеров, к которым присоединен тромб; μ – вязкость среды. Числа – номер тромбоцита от края тромба к центру. Центральная панель: верх – скорость тромбоцитов при ретракции выше на периферии; низ – сила, приложенная к тромбоцитам, выше в центре тромба, чем на периферии. Числа на легенде графика соответствуют номерам тромбоцитов на левой панели. Правая панель: расстояние между тромбоцитами меньше на периферии тромба. Простая модель ретракции предсказывает, что в присутствии двух холдеров, к которым прикреплен тромб, тромбоциты будут сконцентрированы на периферии тромба после ретракции

Figure 3

A two-dimensional model of thrombus contraction

Left panel: circles – platelets; black color – initial position; red color – final position after contraction of the thrombus; vertical lines – the position of the holders to which the thrombus is attached; μ – medium viscosity. Numbers – the number of platelet from the edge of the thrombus to the center. Central panel: upper graph – platelet velocity during the retraction is higher at the periphery; lower graph – force applied to the platelets is higher at the center of the thrombus than at the periphery. The numbers on the plot legend correspond to the numbers of platelets on the left panel. Right panel: the distance between platelets is smaller at the periphery of the thrombus. A simple model of thrombus retraction predicts that in the presence of two holders, to which the thrombus is attached, platelets will be concentrated at the periphery of the thrombus after the retraction



Активация тромбоцитов в проточной цитометрии

В каких-то протоколах используется максимальная активация тромбоцитов коктейлем активаторов, воздействующих на все рецепторы и вызывающих максимальный ответ. В других, наоборот, используется избирательная активация отдельными активаторами или даже исследование зависимости от их концентрации для определения чувствительности тромбоцитов. Точно так же набор вариантов детекции ответов тромбоцитов почти бесконечен.

Можно предположить, что для полноценной характеристики тромбоцитов пациента в проточной цитометрии (или иных методах) их необходимо и достаточно поместить в те варианты условий, которые наблюдаются в организме, а также детектировать набор актуальных для этих условий функций. Действительно, если какие-то функции в ответ на какую-то стимуляцию нужны для физиологической или патологической роли тромбоцитов, то они в этих условиях проявят себя адекватным образом. Из описанных выше представлений о структуре тромба и данных по ответам тромбоцитов на разную стимуляцию [22] можно сформулировать такой набор условий (таблица).

Во-первых, нам, безусловно, нужны тромбоциты без активации. Это позволяет оценить их статус в покое, загруженность гранул, наличие преактивации в циркуляции и способность к базовой адгезии.

Таблица

Основные типы/уровни активации тромбоцита

Tables

Main types/levels of platelet activation

Вид активации Type of activation	FSC, %	CD42b, %	CD61, %	Активация интегринов, % Activation of integrins, %	Выход альфа- гранул, % Alpha-granule release, %	Выход плотных гранул, % Dense granule release, %	Фосфатидилсерин, % Phosphatidylserine, %	Физиологический смысл Physiological meaning
Без активации No activation	100	100	100	~ 0	~ 0	~ 0	~ 0	В покое в циркуляции Circulating in a resting state
Аналоги тромбина + коллаген Thrombin analogues + collagen	~ 60	~ 70	~ 250	~ 100	~ 100	~ 100	20–50	Ядро тромба Thrombus core
Аналоги тромбина + АДФ Thrombin analogues + ADP	~ 60	~ 50	~ 250	~ 100	~ 100	~ 100	5–20	Граница ядра и оболочки Boundary between the core and the shell
АДФ ADP	100	~ 70	~ 150	< 10	10–30	~ 0	~ 0	Оболочка тромба Thrombus shell

Note. ADP – adenosine diphosphate.

В ряде случаев эти показатели тромбоцитов коррелируют с рисками кровотечений [14], даже когда мы плохо понимаем механизмы этой корреляции.

Во-вторых, этот набор вариантов должен включать в себя сильную коллаген-зависимую активацию для области повреждения (возможно, коллаген с тромбином, а также с АДФ). Этот вариант покажет пределы возможностей тромбоцита (что полезно для калибровки), а также охарактеризует его способность стартовать тромбообразование и сформировать ядро. Можно предположить, что это важнейший путь для проявления прокоагулянтной активности. Но сам по себе он слабо коррелирует с некоторыми видами дефектов, так как переоценивает важность активации через гликопротеин VI [24].

Основу ядра формируют тромбоциты, активированные тромбином, возможно, последовательно в комбинации с АДФ [41]. Этот вариант активации также хорошо подходит для калибровки, так как вызывает максимальные или близкие к максимальным ответы. Его главное различие в том, что он подчеркивает тромбин-зависимые пути активации. Можно обсуждать, насколько этот вариант активации можно комбинировать с предыдущим.

Наконец, необходимо учитывать слабую АДФ- и тромбоксан-зависимую активацию для имитации условий оболочки. Эта стимуляция ведет к ограниченному выходу гранул и небольшой активации

интегринов даже при высоких концентрациях активаторов. Можно осторожно предположить, что она физиологически соответствует внешнему слою ядра, а также оболочке. В любом случае, если тромбоциты не будут нормально отвечать на АДФ, то формирование тромба будет нарушено. А ответы на АДФ на фоне сильных активаторов сложно исследовать.

Несмотря на то, что наше понимание структуры тромба и функций тромбоцита на разных этапах тромбообразования ограничено, подобные рассуждения в перспективе могут привести к формированию физиологически обоснованной схемы тестирования тромбоцитов, для которой может быть оправдано проведение клинических испытаний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект №21-45-0012.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Balandina A.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7032-695X>

Kuprash A.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1210-9156>

Nikitin N.S. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-4799-5565>

Kovalenko T.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8455-1808>

Ignatova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5217-3937>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература / References

1. Ушакова О.Е., Нечипуренко Д.Ю., Бутылин А.А., Пантелеев М.А. Применение проточных систем в лабораторной диагностике для интегральной оценки системы гемостаза. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 117–32. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-117-132 [Ushakova O.E., Nechipurenko D.Yu., Butylin A.A., Panteleev M.A. Application of flow systems in laboratory diagnostics for the integral evaluation of the hemostatic system. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (1): 117–32. (In Russ.)].
2. Mezzano D., Harrison P., Frelinger A.L., 3rd, Mumford A.D., Noris P., Lordkipanidze M., et al. Expert Opinion on the Use of Platelet Secretion Assay for the Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders: Communication from the Isth Ssc Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost* 2022; 20 (9): 2127–35. DOI: 10.1111/jth.15781
3. Жарков П.А., Дёмина И.А., Пантелеев М.А. Использование Метода функциональной активности тромбоцитов для диагностики тромбоцитопатий у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (2): 40–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-2-40-46 [Zharkov P.A., Demina I.A., Panteleev M.A. Use of a platelet functional activity technique for diagnosing paediatric thrombocytopathies. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (2): 40–6. (In Russ.)].
4. Пономаренко Е.А., Игнатова А.А., Федорова Д.В., Жарков П.А., Пантелеев М.А. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2019; 18 (3): 112–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119 [Ponomarenko E.A., Ignatova A.A., Fedorova D.V., Zharkov P.A., Panteleev M.A. Platelet functional activity: physiology and laboratory diagnostic methods. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2019; 18 (3): 112–9. (In Russ.)].
5. Мартыанов А.А., Морозова Д.С., Хорева А.Л., Пантелеев М.А., Щербина А.Ю., Свешникова А.Н. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта-Олдрича. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2020; 19 (1): 100–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107 [Martyanov A.A., Morozova D.S., Khoreva A.L., Panteleev M.A., Shcherbina A.Yu., Sveshnikova A.N. Specific features of intracellular calcium signalling, distinctive for Wiskott–Aldrich syndrome patients. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (1): 100–7. (In Russ.)].
6. Кольцова Е.М., Балашова Е.Н., Пантелеев М.А., Баландина А.Н. Лабораторные аспекты гемостаза новорожденных. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (4): 100–13. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-4-100-113 [Koltsova E.M., Balashova E.N., Panteleev M.A., Balandina A.N. Laboratory aspects of hemostasis in neonates. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (4): 100–13. (In Russ.)].
7. Кумскова М.А., Дёмина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серёгина Е.А., Бондар Е.В. и др. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2015; 14 (4): 17–24. DOI: 10.24287/1726-1708-2015-14-4-17-24 [Kumskova M.A., Demina I.A., Podoplelova N.A., Balandina A.N., Seregina E.A., Bondar E.V., et al. Diagnosis of Glanzmann's thrombasthenia by assessment of plasma and platelet hemostatic parameters. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015; 14 (4): 17–24. (In Russ.)].
8. Кольцова Е.М., Баландина А.Н., Демина И.А., Радыгина С.А., Атауллаханов Ф.И., Балашов Д.Н., Пантелеев М.А. Использование метода пространственной генерации тромбина для оценки прокоагулянтной активности тромбоцитов после трансфузии тромбоконцентрата у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (2): 32–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-2-32-39 [Koltsova E.M., Balandina J.A., Demina I.A., Radygina S.A., Ataulakhonov F.I., Balashov D.N., Panteleev M.A. The use of a spatial thrombin generation method for assessment of platelet procoagulant activity after platelet concentrate transfusion in children. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (2): 32–9. (In Russ.)].
9. Глуханюк Е.В., Дёмина И.А., Игнатова А.А., Орехова Е.В., Хачатрян Л.А., Пантелеев М.А. Первый опыт оценки функциональной активности тромбоцитов у больных с синдромом Казабаха–Мерритт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2016; 15 (4): 21–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2016-15-4-21-27 [Glukhanyuk E.V., Demina I.A., Ignatova A.A., Orekhova E.V., Khachatryan L.A., Panteleev M.A. A first experience of assessing the functional activity of platelets in patients with Kasabach–Merritt syndrome. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2016; 15 (4): 21–7. (In Russ.)].
10. Полохов Д.М., Васильев С.А., Зозуля Н.И., Кумскова М.А., Моисеева Т.Н., Аль-Ради Л.С., Пантелеев М.А. Редкая форма тромбоцитопатии с нарушением прокоагулянтной активности и секреции тромбоцитов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2018; 17 (1): 9–6. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-93-96 [Polokhov D.M., Vasiliev S.A., Zozulya N.I., Kumskova M.A., Moiseeva T.N., Al-Radi L.S., Panteleev M.A. Combined disorder of procoagulant activity and platelet secretion with normal aggregation in a patient with a bleeding tendency. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2018; 17 (1): 93–6. (In Russ.)].
11. Морозова Д.С., Мартыанов А.А., Пантелеев М.А., Жарков П.А., Федорова Д.В., Свешникова А.Н. Наблюдение функционирования гранулоцитов при тромбообразовании *ex vivo* у пациентов с ANKRD26-ассоциированной тромбоцитопенией. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2020; 19 (1): 27–34. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-27-34 [Morozova D.S., Martyanov A.A., Panteleev M.A., Zharkov P.A., Fedorova D.V., Sveshnikova A.N. Observation of granulocyte function during *ex vivo* thrombus formation for patients with ANKRD26-associated thrombocytopenia. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2020; 19 (1): 27–34. (In Russ.)].
12. Сунцова Е.В., Игнатова А.А., Пшонкин А.В., Серкова И.В., Масчан А.А., Новичкова Г.А., Пантелеев М.А. Динамика функциональной активности тромбоцитов и гемостатического статуса у ребенка с хронической иммунной тромбоцитопенией на терапии ромиплостимом. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2017; 16 (3): 69–72. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-3-69-72 [Suntsova E.V., Ignatova A.A., Pshonkin A.V., Serkova I.V., Maschan A.A., Novichkova G.A., Panteleev M.A. Dynamics of platelet functional activity and hemostatic status in a child with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2017; 16 (3): 69–72. (In Russ.)].
13. Balashova E., Koltsova E., Ignatova A., Polokhov D., Kuprash A., Kirt-

- baya A., et al. Laboratory Parameters of Blood Coagulation and Platelet Functional Activity in Premature Neonates. *Am J Perinatol* 2016; 33 (S 01): A015.
14. Ignatova A.A., Demina I.A., Ptushkin V.V., Khaspekova S.G., Shustova O.N., Pankrashkina M.M., et al. Evolution of Platelet Function in Adult Patients with Chronic Immune Thrombocytopenia on Romiplostim Treatment. *Br J Haematol* 2019; 187 (2): e38–42. DOI: 10.1111/bjh.16164
 15. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E., Rumiantsev S.A., Panteleev M.A. Functional Characteristics and Clinical Effectiveness of Platelet Concentrates Treated with Riboflavin and Ultraviolet Light in Plasma and in Platelet Additive Solution. *Vox Sang* 2016; 110 (3): 244–52. DOI: 10.1111/vox.12364
 16. Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Polokhov D.M., Suntsova E.V., Zharkov P.A., Fedorova D.V., et al. Flow Cytometry for Pediatric Platelets. *Platelets* 2019; 30 (4): 428–37. DOI: 10.1080/09537104.2018.1513473
 17. Koltsova E.M., Balashova E.N., Ignatova A.A., Poletaev A.V., Polokhov D.M., Kuprash A.D., et al. Impaired Platelet Activity and Hypercoagulation in Healthy Term and Moderately Preterm Newborns During the Early Neonatal Period. *Pediatr Res* 2019; 85 (1): 63–71. DOI: 10.1038/s41390-018-0184-8
 18. Obyednyy S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Ignatova A.A., Varlamova T.V., Gambaryan S., et al. Mechanisms of Increased Mitochondria-Dependent Necrosis in Wiskott-Aldrich Syndrome Platelets. *Haematologica* 2020; 105 (4): 1095–106. DOI: 10.3324/haematol.2018.214460
 19. Poletaev A.V., Koltsova E.M., Ignatova A.A., Kuprash A.D., Gitelson P.G., Sepoyan A.M., et al. Alterations in the Parameters of Classic, Global, and Innovative Assays of Hemostasis Caused by Sample Transportation Via Pneumatic Tube System. *Thromb Res* 2018; 170: 156–64. DOI: 10.1016/j.thromres.2018.08.024
 20. Suntsova E.V., Demina I.M., Ignatova A.A., Ershov N.M., Trubina N.M., Dobrynina J., et al. Bleeding Tendency and Platelet Function During Treatment with Romiplostim in Children with Severe Immune Thrombocytopenic Purpura. *Int J Hematol* 2017; 105 (6): 841–8. DOI: 10.1007/s12185-017-2207-3
 21. Koltsova E.M., Sorokina M.A., Pisyaryuk A.S., Povalyayev N.M., Ignatova A.A., Polokhov D.M., et al. Hypercoagulation Detected by Routine and Global Laboratory Hemostasis Assays in Patients with Infective Endocarditis. *PLoS One* 2021; 16 (12): e0261429. DOI: 10.1371/journal.pone.0261429
 22. Ponomarenko E.A., Ignatova A.A., Polokhov D.M., Khismatullina R.D., Kurilo D.S., Shcherbina A., et al. Healthy Pediatric Platelets Are Moderately Hyporeactive in Comparison with Adults' Platelets. *Platelets* 2022; 33 (5): 727–34. DOI: 10.1080/09537104.2021.1981848
 23. Polokhov D.M., Ershov N.M., Ignatova A.A., Ponomarenko E.A., Gaskova M.V., Zharkov P.A., et al. Platelet Function and Blood Coagulation System Status in Childhood Essential Thrombocythemia. *Platelets* 2020; 31 (8): 1001–11. DOI: 10.1080/09537104.2019.1704710
 24. Dmitrieva E.A., Nikitin E.A., Ignatova A.A., Vorobyev V.I., Poletaev A.V., Seregina E.A., et al. Platelet Function and Bleeding in Chronic Lymphocytic Leukemia and Mantle Cell Lymphoma Patients on Ibrutinib. *J Thromb Haemost* 2020; 18 (10): 2672–84. DOI: 10.1111/jth.14943
 25. Martyanov A., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signalling: The Molecular Relationship. Part 2: Receptors. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021; 1 (3): 13.
 26. Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. Platelet Functional Responses and Signalling: The Molecular Relationship. Part 1: Responses. *Systems Biology and Physiology Reports* 2021; 1 (1): 20.
 27. Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Procoagulant Platelets: Mechanisms of Generation and Action. *Hamostaseologie* 2021; 41 (2): 146–53. DOI: 10.1055/a-1401-2706
 28. Podoplelova N., Soloveva P., Garzon Dasgupta A., Filkova A., Panteleev M. Analyzing the Interaction of Fluorescent-Labeled Proteins with Artificial Phospholipid Microvesicles Using Quantitative Flow Cytometry. *J Vis Exp* 2022; (182). DOI: 10.3791/63459
 29. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., et al. Coagulation Factors Bound to Procoagulant Platelets Concentrate in Cap Structures to Promote Clotting. *Blood* 2016; 128 (13): 1745–55. DOI: 10.1182/blood-2016-02-696898
 30. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Identification of Different Proaggregatory Abilities of Activated Platelet Subpopulations. *Biophys J* 2012; 102 (10): 2261–9. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.04.004
 31. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obyednyy S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., et al. Procoagulant Platelets Form an Alpha-Granule Protein-Covered "Cap" on Their Surface That Promotes Their Attachment to Aggregates. *J Biol Chem* 2013; 288 (41): 29621–32. DOI: 10.1074/jbc.M113.474163
 32. Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. Formation of Coated Platelets Is Regulated by the Dense Granule Secretion of Adenosine 5'diphosphate Acting Via the P2y12 Receptor. *J Thromb Haemost* 2008; 6 (9): 1603–5. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03052.x
 33. Panteleev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. Two Subpopulations of Thrombin-Activated Platelets Differ in Their Binding of the Components of the Intrinsic Factor X-Activating Complex. *J Thromb Haemost* 2005; 3 (11): 2545–53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x
 34. Nechipurenko D.Y., Receveur N., Yakimenko A.O., Shepelyuk T.O., Yakusheva A.A., Kerimov R.R., et al. Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39 (1): 37–47. DOI: 10.3390/cells10030584
 35. Kovalenko T.A., Giraud M.N., Eckly A., Ribba A.S., Proamer F., Fraboulet S., et al. Asymmetrical Forces Dictate the Distribution and Morphology of Platelets in Blood Clots. *Cells* 2021; 10 (3): 584. DOI: 10.3390/cells10030584
 36. Andrianova I.A., Khabirova A.I., Ponomareva A.A., Peshkova A.D., Evtugina N.G., Le Minh G., et al. Chronic Immune Platelet Activation Is Followed by Platelet Refractoriness and Impaired Contractility. *Int J Mol Sci* 2022; 23 (13): 7336. DOI: 10.3390/ijms23137336
 37. Stalker T.J., Traxler E.A., Wu J., Wannenmacher K.M., Cermignano S.L., Voronov R., et al. Hierarchical Organization in the Hemostatic Response and Its Relationship to the Platelet-Signaling Network. *Blood* 2013; 121 (10): 1875–85. DOI: 10.1182/blood-2012-09-457739
 38. Welsh J.D., Poventud-Fuentes I., Sampietro S., Diamond S.L., Stalker T.J., Brass L.F. Hierarchical Organization of the Hemostatic Response to Penetrating Injuries in the Mouse Macrovasculature. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (3): 526–37. DOI: 10.1111/jth.13600
 39. Kaneva V.N., Dunster J.L., Volpert V., Ataullakhanov F., Panteleev M.A., Nechipurenko D.Y. Modeling Thrombus Shell: Linking Adhesion Receptor Properties and Macroscopic Dynamics. *Biophys J* 2021; 120 (2): 334–51. DOI: 10.1016/j.bpj.2020.10.049
 40. Masalceva A.A., Kaneva V.N., Panteleev M.A., Ataullakhanov F., Volpert V., Afanasyev I., et al. Analysis of Microvascular Thrombus Mechanobiology with a Novel Particle-Based Model. *J Biomech* 2022; 130: 110801. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2021.110801
 41. Shakhidzhanov S.S., Shaturny V.I., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. Modulation and Pre-Amplification of Par1 Signaling by Adp Acting Via the P2y12 Receptor During Platelet Subpopulation Formation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850 (12): 2518–29. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.013