

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

Метёлкин А.А.¹, Сергеева Е.А.¹, Попов М.А.², Соколовская А.А.¹, Зыбин Д.И.², Шумаков Д.В.²

Исследование маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов до и после операции реваскуляризации миокарда

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, Москва, Россия;

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,
129110, Москва, Россия

Актуальность. Сердечно-сосудистые заболевания остаются важнейшей причиной смертности по всему миру. В структуре болезней системы кровообращения главное место занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). Одним из основных методов хирургического лечения ИБС является коронарное шунтирование. Оценка прогноза исходов послеоперационного периода остается сложной задачей. Возможными маркерами для прогнозирования риска неблагоприятных исходов могут стать показатели апоптоза тромбоцитов.

Цель исследования – оценка в динамике показателей апоптоза тромбоцитов до операции и в раннем послеоперационном периоде.

Методика. В исследование были включены 14 пациентов, которым было выполнено аортокоронарное шунтирование. Образцы крови брали непосредственно до операции, а также через 4-5 сут после операции и исследованы с помощью методов вестерн-блот и проточной цитофлуориметрии. Тромбоциты окрашивали флуоресцентно меченым Аннексином V-FITC, а также обрабатывали антителами к основным белкам, регулирующим процесс апоптоза: BAK, BAX, Cytochrome c, Caspase 3, BCL-2.

Результаты. По результатам исследования пациенты продемонстрировали значимое снижение показателей апоптоза тромбоцитов после проведенной операции. Большинство из них показали уменьшение связывания с Аннексином V (84,98%) по сравнению с состоянием до операции, что говорит об уменьшении количества клеток в ранней стадии апоптоза. С помощью метода вестерн-блот было показано снижение уровней основных проапоптотических белков (BAX: 87,76%; BAK: 91,18%), что также указывает на снижение количества тромбоцитов в состоянии апоптоза.

Заключение. Данные нашего пилотного исследования свидетельствуют о том, что функциональные параметры тромбоцитов, выявленные у пациентов с ИБС, отличаются от характеристик тромбоцитов у тех же пациентов после реваскуляризации миокарда. Полученные результаты позволяют предположить вовлечение в механизм развития заболевания ИБС метаболизма тромбоцитов, что отражает тяжесть заболевания у пациентов. Необходимы дальнейшие исследования для оценки потенциальной прогностической роли маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов с ИБС.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; тромбоциты; апоптоз

Для цитирования: Метёлкин А.А., Сергеева Е.А., Попов М.А., Соколовская А.А., Зыбин Д.И., Шумаков Д.В. Исследование маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов до и после операции реваскуляризации миокарда. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(4): 13-21.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.13-21

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Соколовская А.А.; обработка материала, проведение исследования, написание и подготовка иллюстративного материала – Метёлкин А.А., Сергеева Е.А.; Попов М.А., Зыбин Д.И., Шумаков Д.В.; обработка результатов – Метёлкин А.А.; сбор и описание материала – Сергеева Е.А., Зыбин Д.И., Метёлкин А.А.; общее руководство исследованием – Соколовская А.А., Попов М.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Метёлкин Аркадий Андреевич, e-mail: armetelkin@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена за счет средств государственного задания № FGFU-2022-0006

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.10.2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

Metelkin A.A.¹, Sergeeva E.A.¹, Popov M.A.², Sokolovskaya A.A.¹, Zybin D.I.², Shumakov D.V.²

Evaluation of platelet apoptosis markers in patients before and after myocardial revascularization

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

²Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute,
Shchepkina St. 61/2, Moscow, 129110, Russian Federation

Background. Cardiovascular diseases have remained the leading cause of death worldwide for more than 30 years. In the structure of circulatory diseases, the main place belongs to ischemic heart disease (IHD). Coronary artery bypass grafting is one of the main surgical methods for treatment of IHD. Predicting the postoperative outcome is complicated. Indicators of platelet apoptosis may become markers for predicting the risk of adverse outcomes.

Aim. The aim of this study was to assess parameters of platelet apoptosis before and after coronary artery bypass surgery.

Methods. The study included 14 patients who underwent coronary artery bypass grafting. Blood samples were taken immediately before and 4-5 days after the surgery and examined using Western blot analysis and flow cytometry. Platelets were stained with FITC-labeled Annexin V and also treated with antibodies to pro- and anti-apoptotic proteins (BAX, BCL-2, cytochrome c, caspase 3).

Results. Study patients demonstrated a significant postoperative decrease in the markers of platelet apoptosis. Most of the patients (84.98%) showed a reduced Annexin V binding compared to the preoperative baseline, which indicated a decrease in the number of platelets during early apoptosis. Western blotting showed a decrease in major pro-apoptotic proteins (BAX, 87.76%; BCL-2, 91.18%), which also indicated a decrease in the number of apoptotic platelets.

Conclusion. This pilot study showed that the functional parameters of platelets detected in patients with IHD differed from the characteristics of platelets from the same patients after myocardial revascularization. These results suggest that platelet metabolism is involved in the mechanism of IHD that reflects the disease severity. Future studies are needed to determine the potential prognostic role of platelet apoptosis in IHD patients.

Keywords: *apoptosis; ischemic heart disease; platelets*

For citation: Metelkin A.A., Sergeeva E.A., Popov M.A., Sokolovskaya A.A., Zybin D.I., Shumakov D.V. Evaluation of platelet apoptosis markers in patients before and after myocardial revascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 13-21. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.13-21

Author's contribution: concept and design of the study, article editing – Sokolovskaya A.A.; material processing, research, writing, and preparation of illustrative material – Metelkin A.A., Sergeeva E.A., Popov M.A., Zybin D.I., Shumakov D.V.; statistical processing of the results – Metelkin A.A.; material collection and description – Sergeeva E.A., Zybin D.I., Metelkin A.A.; general management of the study – Sokolovskaya A.A., Popov M.A. All authors approved the final version of the manuscript and are responsible for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: *Metelkin A.A.*, e-mail: armetelkin@gmail.com

Information about the authors:

Metelkin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8018-4978>

Sergeeva E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4690-6900>

Popov M.A., <https://orcid.org/0000-0002-0316-8410>

Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Zybin D.I., <https://orcid.org/0000-0001-7087-5441>

Shumakov D.V., <https://orcid.org/0000-0003-4204-8865>

Financing. The work was supported by the State Assignment № FGFU-2022-0006.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 06.10.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) более 30 лет остаются одной из главных причин смертности во всем мире. Смертность от ССЗ с 1990 г. выросла на 8 млн и в 2021 г. достигла 20,5 млн че-

ловек, что составляет треть от всех смертей в мире [1]. В структуре болезней системы кровообращения главное место занимает ишемическая болезнь сердца (ИБС). 44% летальных исходов при ССЗ вызва-

ны осложнениями ИБС, такими как инфаркт миокарда [2].

Основными хирургическими методами лечения ИБС являются операции стентирования коронарных артерий и коронарного шунтирования [3]. Оценка отдаленного прогноза после проведенной операции остается сложной задачей. Ведется поиск эффективных маркеров для прогнозирования клинического исхода у пациентов, перенесших операцию реваскуляризации миокарда [4-6]. Одним из таких маркеров может быть функциональное состояние тромбоцитов – малых безъядерных форменных элементов крови. Доказано, что они играют важнейшую роль как в формировании тромба во время сосудистых катастроф, так и в сопутствующем тромбозу воспалению, интерстициальному отеку, эмболизации микроциркуляторного русла и гибели клеток [7-10]. Для оценки функционального состояния тромбоцитов может быть использован феномен апоптоза – программированной клеточной гибели.

Ранее считалось, что апоптоз возможен только в ядерных клетках. Однако было доказано, что в тромбоцитах под воздействием определенных факторов окружающей среды выявляются характерные признаки запрограммированной клеточной гибели и, следовательно, они подвергаются апоптозу так же, как и клетки, содержащие ядра [11-12]. Ряд внутриклеточных событий, таких, как экстернализация фосфатидилсерина на внешний слой мембраны тромбоцитов, снижение митохондриального потенциала, активация каспаз 3, 8, 9, а также активация проапоптотических (BAX, BAK, Cytochrome c) и антиапоптотических (BCL-2, BCL-XL) белков играют важнейшую роль в регуляции апоптоза [13-14].

В последнее время растет интерес к механизмам активации и гибели тромбоцитов при различных заболеваниях [15-17], в том числе, при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [18-19]. Взаимосвязь ИБС и морфофункциональных изменений тромбоцитов требует дальнейшего изучения с целью выявления значимых критериев, позволяющих прогнозировать течение болезни у пациентов с ИБС, перенесших операцию коронарного шунтирования, оценивать послеоперационный риск, а также проводить диспансерное наблюдение и вторичную профилактику сердечно-сосудистых осложнений.

Цель исследования – динамическая оценка показателей апоптоза тромбоцитов до операции и в раннем послеоперационном периоде.

Методика

Характеристика пациентов. В соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Все-

мирной медицинской ассоциации (1964, 2004) образцы крови собирали у пациентов и здоровых добровольцев после письменного информированного согласия на участие в исследовании. Протокол исследования утвержден локальным этическим комитетом ГБУЗ МО МОНИКИ.

В исследование были включены 14 пациентов, страдающих ИБС, которым была назначена операция – хирургическая реваскуляризация миокарда. Критериями включения являлись: наличие гемодинамически значимого стеноза магистральных коронарных артерий, планируемая операция – хирургическая реваскуляризация миокарда, возраст 45-65 лет, критериями исключения – острый инфаркт миокарда, хроническая сердечная недостаточность III-IV функционального класса, онкологические заболевания, заболевания крови. Исследуемым пациентам гемотрансфузии не проводились. Антиагрегантная терапия отменялась за 3 сут до операции.

Обследование пациентов включало оценку физического состояния, клинические и биохимические анализы, электрокардиографию, эхокардиографию. Диагноз ИБС с множественным поражением коронарных артерий был подтвержден с помощью коронарной ангиографии. Контрольную группу составили 5 добровольцев в возрасте 40-60 лет. Критерии включения: отсутствие сердечно-сосудистой патологии, заболеваний крови, онкологических заболеваний, прием наркотических препаратов, а также препаратов, влияющих на функциональное состояние тромбоцитов.

Образцы крови получали из локтевых вен пациентов (~3 мл) с использованием одноразовых вакуумных систем BD Vacutainer (Becton Dickinson, США), содержащих 2,5% цитрата натрия. Образцы были исследованы в течение 1 ч после забора крови. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Анализ жизнеспособности клеток. Способность тромбоцитов к активации и агрегации оценивали с помощью агрегометра Whole Blood Lumi-Aggregometer (Chrono-log Corporation, США). В качестве индуктора активации была использована АДФ в концентрации 6 мкМ.

Выделение тромбоцитов. После центрифугирования цельной крови без торможения при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре (КТ) богатую тромбоцитами плазму (PRP) тщательно отбирали и обрабатывали CD45 MicroBeads и CB235a (Glycophorin A) MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия). После прохождения плазмы через колонку MiniMACS в магнитном поле выделенные тромбоциты промывали цитратным

буфером (PBS, 2mM цитрат, 0,5% BSA). Подсчет тромбоцитов проводили в камере Горяева.

Оценка чистоты выделения тромбоцитов. Тромбоциты в количестве $4 \cdot 10^6$ клеток на 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами CD61 (BD, Biosciences, США) в течение 30 мин при 4 °С. После инкубации к клеткам добавляли 400 мкл параформальдегида 1% и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). На цитограмме на основании показателей прямого и бокового рассеивания определили популяцию тромбоцитов, сравнивая ее с микрочастицами известного размера: 2 и 3 мкм (рис. 1, а). Для каждого экспериментального образца анализировали 50 тыс. событий.

Антиген CD61 ($\beta 3$ интегрин) присутствует на поверхности как покоящихся, так и активированных тромбоцитов. Экспрессия выделенными частицами этого антигена почти в 100% случаях доказывает чистоту выделения тромбоцитов (рис. 1, б).

Обработка тромбоцитов ионофором кальция. В качестве внутреннего положительного контроля был использован ионофор кальция A23187 (HelloBio, Великобритания), который вызывает **немедленный апоптоз** тромбоцитов. Тромбоциты в количестве $1 \cdot 10^7$ в 100 мкл буфера инкубировали с ионофором кальция при комнатной температуре 15 мин.

Проточно-цитофлуориметрический анализ количества клеток в состоянии апоптоза. Выделенные

тромбоциты в количестве $4 \cdot 10^6$ переносили в пробирку с аннексином V и пропидий йодидом (Invitrogen, США). Образцы инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 мин, после чего, добавив в образец 400 мкл связывающего буфера, проводили анализ на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Для оценки использовался показатель средней интенсивности флуоресценции. Для каждого экспериментального образца анализировали 50 тыс. событий. Сбор данных осуществлялся с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Анализ методом вестерн-блот. Тромбоциты после выделения лизировали в буфере для радиоиммунопреципитации (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолева кислота натрия, 1% NP-40, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), pH – 7,4). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) и 28 мкг общего белка на образец использовали для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия 12%. Образцы из геля были перенесены на мембрану из поливинилидендифторида 0,45 мкм (Immobilon-P Transfer Membrane; Millipore, США) методом полусухого переноса. Мембраны блокировали 5% молоком (Bio-Rad Laboratories, США) в буфере ТБСТ (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) при комнатной температуре в течение 1 ч. Далее мембраны инкубировали с мышинными моноклональными анти-

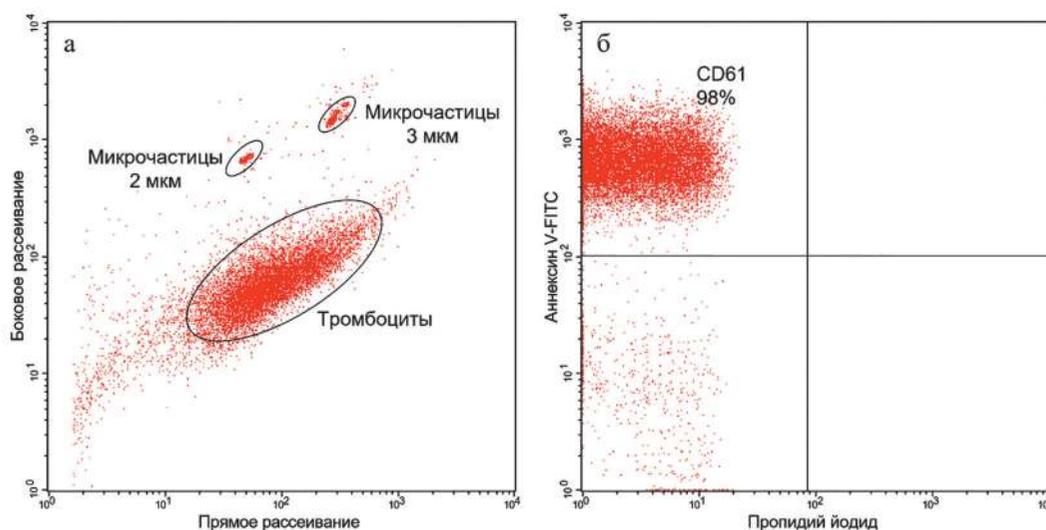


Рис. 1. Оценка чистоты выделения тромбоцитов. а – цитофлуориметрический анализ распределения тромбоцитов и сравнение с микрочастицами заданного размера; б – точечное распределение тромбоцитов.

Fig. 1. Evaluation of the purity of platelet isolation. а – cytofluorimetric analysis of platelet distribution and comparison with microparticles of a given size; б – point distribution of platelets.

телами против белков апоптоза BAX, BAK, Caspase-3 (FineTest, Китай), Cytochrome c (AbClonal, США), BCL-2 (BD Biosciences, США) в течение ночи при 4 °C и рабочими разведениями соответствующих первичных антител в присутствии 5% обезжиренного молока с 0,06% NaN₃ в буфере TBST. После инкубации с первичными антителами мембраны промывали буфером TBST по 10 мин, 4 раза, затем инкубировали с вторичными антителами (иммуноглобулин G конъюгированный пероксидазой) в разведении 1:5000 (FineTest, Китай) при температуре 4 °C в течение 1 ч с последующей промывкой в TBST 4 раза по 10 мин.

Обнаружение белковых полос осуществлялось с использованием станции изображения Odyssey XF Imaging System, LI-COR Biosciences, США и набора для обнаружения вестерн-блоттинга Amersham ECL (GE Healthcare, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Моноклональные антитела против β-актина (FineTest, Китай) использовали в качестве контроля загрузки.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Выборка соответствует нормальному распределению, что было оценено с помощью критерия Шапиро–Уилка. Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Анализ был выполнен с помощью StatSoft Statistica для Windows.

Результаты

Первым этапом исследования был отбор пациентов, поступивших в кардиохирургическое отделение для проведения операции реваскуляризации миокарда, и исследование функциональных параметров тромбоцитов. Следующим этапом работы был анализ изменения этих параметров на 4-е – 5-е сут после реваскуляризации миокарда (рис. 2, 3).

По результатам данных проточной цитометрии и вестерн-блота пациенты были разделены на 2 группы. У пациентов 1-й группы ($n=10$) отмечалось устойчивое снижение связывания Аннексина V, показатель средней интенсивности флуоресценции снизился на 33% ($p < 0,05$). У пациентов 2-й группы ($n=4$, $p < 0,05$), результаты демонстрировали небольшое (на 14%) увеличение среднего показателя флуоресценции, что связано с увеличением количества клеток в стадии раннего апоптоза.

Согласно результатам вестерн-блота, в 1-й группе экспрессия основных белков апоптоза, таких как BAX, BAK, Caspase-3 и Cytochrome снижается после

операции, в то время как экспрессия ингибитора апоптоза BCL-2, напротив, повышается на $9,91 \pm 5,85\%$, $p < 0,05$. Во 2-й группе пациентов снижения не наблюдается: экспрессия белков остается на прежнем уровне или даже несколько повышается. На рис. 4 представлены данные вестерн-блота 3 пациентов. Пациенты № 1 и № 2 принадлежат к 1-й группе, они демонстрируют снижение проапоптотических белков и повышение BCL-2. Пациент № 3 принадлежит к 2-й группе и демонстрирует отсутствие снижения экспрессии таких белков, как BAK и BAX, а BCL-2, напротив, снижается, что говорит о сохранившемся на прежнем уровне апоптозе тромбоцитов.

Также следует отметить (рис. 5), что в сравнении с другими белками апоптоза, экспрессия белка BAX значительно снижается в 1-й группе ($68,99 \pm 10,24\%$ против $87,69 \pm 12,55\%$ BAK) и сильнее возрастает во 2-й группе ($138,13 \pm 11,25\%$ против $107,90 \pm 7,51\%$ BAK, $p < 0,05$).

Обсуждение

Широко известно, что состояние тромбоцитов оказывает влияние на течение ишемической болезни сердца. Терапия, направленная на подавление активности тромбоцитов, является важнейшим компонентом лечения таких пациентов, независимо от вероятности оперативного лечения [3], при этом более агрессивная терапия показывает лучшие результаты [20]. Ведутся исследования по выявлению обратной связи —

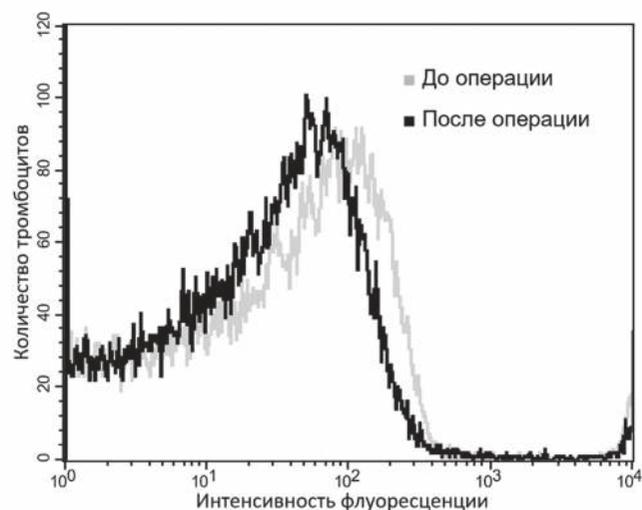


Рис. 2. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов.

Fig. 2. Phosphatidylserine externalization on the platelet surface.

как само заболевание может влиять на состояние тромбоцитов и, следовательно, как можно прогнозировать течение заболевания по состоянию тромбоцитов [18]. Исследуют маркеры на поверхности тромбоцитов, такие, как GPIIb/IIIa [21], р-селектин [22-23]; циркулирующие молекулы, связанные с тромбоцитами – матриксные металлопротеиназы [24-25], SCUBE1 [26]; и даже такие факторы, как размер тромбоцитов, их вариабельность по объему и относительное количество

среди всех клеток крови [27]. Ведутся также исследования общего протеома [28] тромбоцитов с целью обнаружения белков, специфичных для ИБС и инфаркта миокарда; был выявлен ряд мРНК, экспрессия которых также повышается при этих заболеваниях [29].

Доказано изменение функционального состояния тромбоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом [30-31], однако данные о связи тромбоцитов с проведенным лечением практически отсут-

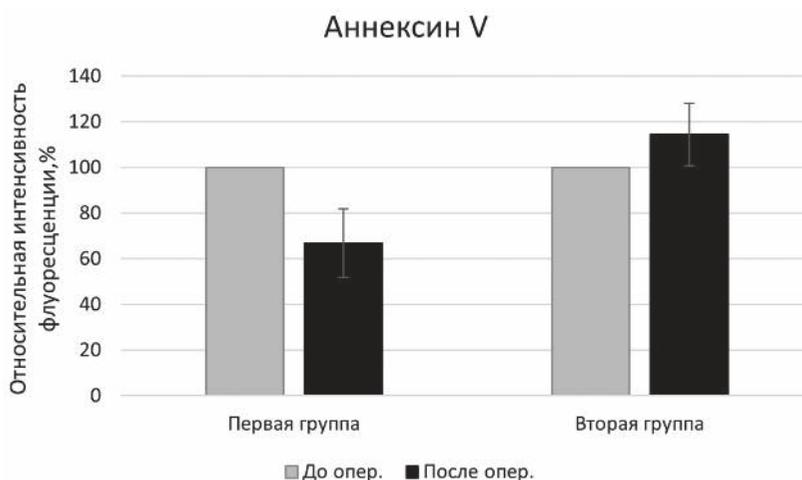


Рис. 3. Результаты определения относительной интенсивности флуоресценции аннексина V. Показатели апоптоза у пациентов до операции приведены к 100%.

Fig. 3. The results of determining the relative intensity of annexin V fluorescence. The indicators of apoptosis in patients before surgery are shown as 100%.

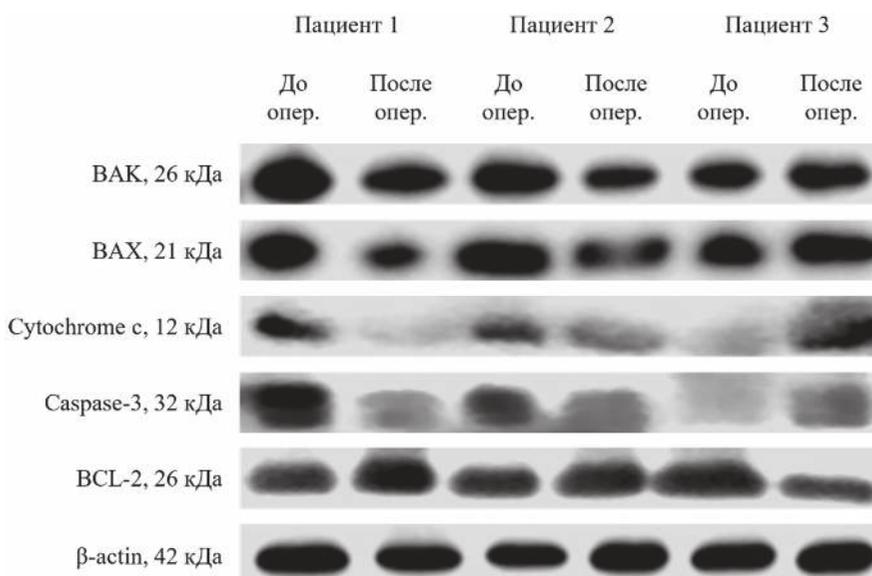


Рис. 4. Результаты определения экспрессии белков апоптоза методом вестерн-блот у пациентов.

Fig. 4. The results of determining the expression of apoptosis proteins by the Western blot method in patients.

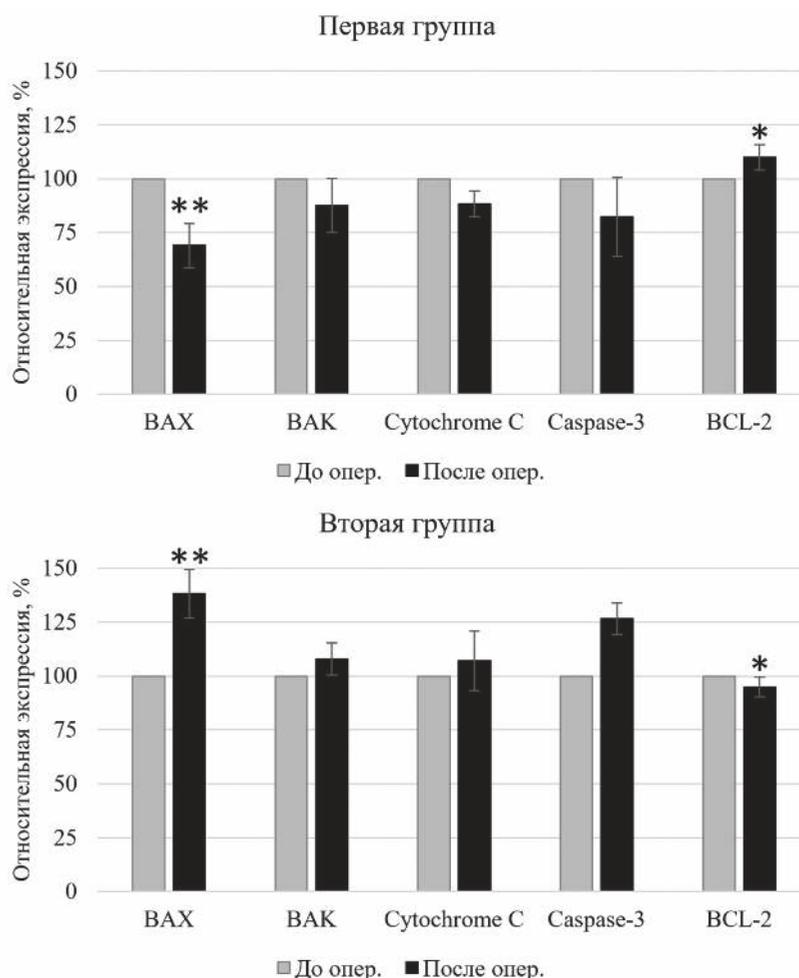


Рис. 5. Результаты количественного определения относительной экспрессии белков апоптоза. Показатели апоптоза у пациентов до операции приведены к 100%. * – указывает на изменения экспрессии BCL-2, противоположные таковым в экспрессии проапоптотических белков. ** – указывает на большее изменение BAX, в сравнении с другими белками апоптоза.

Fig. 5. Results of quantitative determination of relative expression of apoptosis proteins. The indicators of apoptosis in patients before surgery are shown as 100%. * – indicates changes in BCL-2 expression opposite to those in the expression of proapoptotic proteins.

** – indicates a greater change in BAX, compared to other apoptosis proteins.

ствуют – в работе показано, что вместе с улучшением состояния пациентов изменяются и характеристики тромбоцитов.

Результаты нашего исследования продемонстрировали значимое снижение маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов с ИБС после проведенной операции. Большинство из них показали уменьшение связывания с Аннексином V по сравнению с состоянием до операции, что говорит об уменьшении количества клеток в ранней стадии апоптоза. С помощью метода вестерн-блот было показано снижение уровня основных проапоптотических белков, что также указы-

вает на снижение количества тромбоцитов в состоянии апоптоза.

Заключение

Данные нашего пилотного исследования свидетельствуют о том, что функциональные параметры тромбоцитов, такие как экспрессия фосфатидилсерина на поверхности тромбоцитов и экспрессия белков апоптоза, выявленные у пациентов с ИБС, отличаются от характеристик тромбоцитов у этих же пациентов после реваскуляризации миокарда. Полученные результаты позволяют предположить, что метаболизм тромбо-

цитов вовлечен в механизмы развития ИБС и отражает тяжесть заболевания у пациентов. Необходимы дальнейшие исследования для определения потенциальной прогностической роли маркеров апоптоза тромбоцитов у пациентов с ИБС.

Литература

(п.п. 1-2; 4-10; 12-31 см. References)

3. Стабильная ишемическая болезнь сердца. Клинические рекомендации 2020. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(11): 4076.
11. Миндукшев И.В., Рукояткина Н.И., Добрылко И.А., Скверчинская Е.А., Никитина Е.Р., Кривошлык В.В. и др. Особенности апоптоза безъядерных клеток: тромбоцитов и эритроцитов человека. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2013; 99(1): 92-110.

References

1. Lindstrom M., DeCleene N., Dorsey H., Fuster V., Johnson C.O., LeGrand K.E., et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaboration, 1990-2021. *J Am Coll Cardiol*. 2022; 80(25): 2372-425.
2. Khan M.A., Hashim M.J., Mustafa H., Baniyas M.Y., Al Suwaidi S.K.B.M., AlKatheeri R. et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*. 2020 Jul 23; 12(7): e9349.
3. Clinical practice guidelines for Stable coronary artery disease. *Russian Journal of Cardiology*. 2020; 25(11): 4076. (In Russian)
4. Karadeniz F.Ö., Karadeniz Y., Altuntaş E. Systemic immune-inflammation index, and neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios can predict clinical outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Cardiovasc J Afr*. 2023 May 5; 34: 1-7.
5. Zhang S., Wu Z., Zhuang Y., Sun X., Wang J., Chen S., et al. The metabolic score for insulin resistance in the prediction of major adverse cardiovascular events in patients after coronary artery bypass surgery: a multicenter retrospective cohort study. *Diabetol Metab Syndr*. 2023 Jul 17; 15(1): 157.
6. Wu Z., Guo D., Chen S., Sun X., Zhang Y., Liu X., et al. Combination of the triglyceride-glucose index and EuroSCORE II improves the prediction of long-term adverse outcomes in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Diabetes Metab Res Rev*. 2023 Nov; 39(8): e3710.
7. Michelson A., Cattaneo M., Frelinger A., Newman P. *Platelets 4th edition*. 2019.
8. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(3): 498-511.
9. Schanze N., Bode C., Duerschmied D. Platelet Contributions to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Immunol*. 2019; 10: 1260.
10. Khodadi E. Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules. *Cardiovasc Toxicol*. 2020; 20(1): 1-10.
11. Mindukshev I.V., Rukoiatkina N.I., Dobrylko I.A., Skverchinskaja E.A., Nikitina E.R., Krivoslyk V.V., et al. Characterisation of enucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes. *Russ Fiziol Zhurnal Im I.M. Sechenova*. 2013 Jan; 99(1): 92-110. (In Russian)
12. Brown S.B., Clarke M.C., Magowan L., Sanderson H., Savill J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. *J Biol Chem*. 2000; 275(8): 5987-96.
13. Mason K.D., Carpinelli M.R., Fletcher J.I., Collinge J.E., Hilton A.A., Ellis S., et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*. 2007 Mar 23; 128(6): 1173-86.
14. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev*. 2012; 26(2): 51-63.
15. Thushara R.M., Hemshekhar M., Basappa, Kemparaju K., Rangappa K.S., Girish K.S. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015; 93(3): 149-58.
16. Wu F., Liu Y., Luo L., Lu Y., Yew D.T., Xu J., et al. Platelet mitochondrial dysfunction of DM rats and DM patients. *Int J Clin Exp Med*. 2015 May 15; 8(5): 6937-46.
17. Stein T., Hinselmann R., Gowin C., Greber D., Shllaku S., Gözl N., et al. Activation of Platelet Apoptosis and Autophagy in Immune Thrombocytopenia: New Mechanistic Insights. *J Comp Pathol*. 2022; 191: 60.
18. Ferroni P., Riondino S., Vazzana N., Santoro N., Guadagni F., Davi G. Biomarkers of platelet activation in acute coronary syndromes. *Thromb Haemost*. 2012; 108(6): 1109-23.
19. Ziogos E., Chelko S.P., Harb T., Engel M., Vavuranakis M.A., Landim-Vieira M., et al. Platelet activation and endothelial dysfunction biomarkers in acute coronary syndrome: the impact of PCSK9 inhibition. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2023 Nov 2; 9(7): 636-46.
20. Sarathy K., Wells G.A., Singh K., Couture E., Chong A.Y., Rubens F., et al. Platelet Quiescence in Patients With Acute Coronary Syndrome Undergoing Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *J Am Heart Assoc*. 2021 Feb; 10(5): e016602.
21. Tantry U.S., Bliden K.P., Suarez T.A., Kreutz R.P., Dichiaro J., Gurbel P.A. Hypercoagulability, platelet function, inflammation and coronary artery disease acuity: results of the Thrombotic Risk Progression (TRIP) study. *Platelets*. 2010; 21(5): 360-7.
22. Ferroni P., Pulcinelli F.M., Lenti L., Gazzaniga P.P. Is soluble P-selectin determination a more reliable marker of in vivo platelet activation than CD62P flow cytometric analysis? *Thromb Haemost*. 1999 Mar; 81(3): 472-3.
23. Shen L., Yang T., Xia K., Yan Z., Tan J., Li L., et al. P-selectin (CD62P) and soluble TREM-like transcript-1 (sTLT-1) are associated with coronary artery disease: a case control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2020 Aug 24; 20(1): 387.
24. Blankenberg S., Rupprecht H.J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003 Apr 1; 107(12): 1579-85.
25. Bräuninger H., Krüger S., Bacmeister L., Nyström A., Eyerich K., Westermann D., et al. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2023 May 9; 118(1): 18.
26. Özkara T., Yüksel V., Güçlü O., Hüseyin S., Özgün E., Turan F.N., et al. Pericardial SCUBE1 levels may help predict postoperative results in patients operated on for coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc J Afr*. 2021 Sep-Oct 23; 32(5): 243-7.
27. Budzianowski J., Pieszko K., Burchardt P., Rzeźniczak J., Hiczkiewicz J. The Role of Hematological Indices in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Dis Markers*. 2017: 3041565.

28. Maguire P.B., Parsons M.E., Szklanna P.B., Zdanyte M., Münzer P., Chatterjee M., et al. Comparative Platelet Release Proteomic Profiling of Acute Coronary Syndrome versus Stable Coronary Artery Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2020 Jun 24; 7: 101.
29. Szelenberger R., Karbownik M.S., Kacprzak M., Maciak K., Bijak M., Zielińska M., et al. Screening Analysis of Platelet miRNA Profile Revealed miR-142-3p as a Potential Biomarker in Modeling the Risk of Acute Coronary Syndrome. *Cells.* 2021 Dec 14; 10(12): 3526.
30. Bao J., Lin L. Platelet apoptosis in patients with acute coronary syndromes [published correction appears in *J Thromb Thrombolysis.* 2015 May; 39(4): 547]. *J Thromb Thrombolysis.* 2015; 39(4): 539-46.
31. Sokolovskaya A.A., Popov M.A., Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Zybin D.I., Shumakov D.V., et al. Investigation of Platelet Apoptosis in Patients after Surgical Myocardial Revascularization. *Biomedicine.* 2023 Jan 18; 11(2): 251.

Сведения об авторах:

Метёлкин Аркадий Андреевич, мл. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП;

Сергеева Екатерина Андреевна, мл. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП;

Попов Михаил Александрович, канд. мед. наук, врач-кардиохирург, ст. науч. сотр. ГБУЗ Московской области «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского»;

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Зыбин Дмитрий Игоревич, канд. мед. наук, зав. отд-нием кардиохирургии, ГБУЗ Московской области «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского»;

Шумаков Дмитрий Валерьевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, гл. внештатный специалист кардиохирург МО, зав. отд-нием ГБУЗ Московской области «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского».