

© Коллектив авторов, 2026
УДК 616-092.9

Александрова А.Д.^{1,2}, Антропова И.П.^{1,2}, Хацко С.Л.³

Влияние ингибирования P2Y₁₂ рецепторов на тромбоцитопоз и характеристики тромбоцитов крыс при моделировании травмы кости

¹Федеральное государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации, 620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, 620049, Екатеринбург, Россия, ул. Первомайская, д. 106

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени Первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620062, Екатеринбург, Россия, ул. Мира, д. 19

Введение. Травма костной ткани требует активного включения в процесс репаративной регенерации тромбоцитов. Рецепторы P2Y₁₂ являются важными регуляторами функции тромбоцитов, позволяющими быстро реагировать на повреждения. Клопидогрел, опосредованно блокирующий P2Y₁₂ рецепторы, широко используется в клинической практике, а также для изучения функционирования тромбоцитов и мегакариоцитов. **Цель** – изучить эффект блокады P2Y₁₂ рецепторов на развитие мегакариоцитов, параметры и функциональную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной костной травмы.

Методика. Исследование выполнено на крысах-самках Wistar ($n = 40$), которых разделили на две группы. Опытным животным ежедневно внутрибрюшинно вводился клопидогрел в течение 7 суток до операции (моделирование травмы нижней челюсти) и до момента выведения из эксперимента (перед операцией, через 1, 3 и 7 суток после операции). Контрольным животным клопидогрел не вводился, травма моделировалась. Определяли тромбоцитарные показатели, активность агрегации тромбоцитов с АДФ, стадии развития клеток мегакариоцитарного роста.

Результаты. Необратимое ингибирование рецепторов P2Y₁₂ оказывало существенное влияние на развитие мегакариоцитов, параметры циркулирующих тромбоцитов как до, так и после травмы. Наблюдался сдвиг мегакариоцитов в сторону зрелых форм, а также увеличение количества циркулирующих тромбоцитов до операции и повышенное их потребление в послеоперационном периоде.

Заключение. Особенности развития мегакариоцитов и параметры тромбоцитов при блокировании P2Y₁₂ рецепторов в условиях травмы отражают ответ организма на функциональную недостаточность тромбоцитарного компонента крови, что нужно учитывать при хирургических вмешательствах и травме.

Ключевые слова: тромбоциты; тромбоцитопоз; мегакариоциты; P2Y₁₂ рецепторы; клопидогрел; травма кости; крысы

Для цитирования: Александрова А.Д., Антропова И.П., Хацко С.Л. Влияние ингибирования P2Y₁₂ рецепторов на тромбоцитопоз и характеристики тромбоцитов крыс при моделировании травмы кости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2026; 70(1): 113–122.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2026.01.113-122

Участие авторов: идея исследования и дизайн эксперимента, обработка и интерпретация результатов, написание и редактирование текста – Антропова И.П., Александрова А.Д.; проведение экспериментов и сбор материала для исследования – Александрова А.Д., Хацко С.Л. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Антропова Ирина Петровна, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3, общий отдел, для ЦНИЛ, e-mail: aip.hemolab@mail.ru

Финансирование. Исследование проведено с использованием оборудования Института естественных наук и математики Уральского федерального университета и ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России в рамках государственного задания № 121030900298-9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.02.2025

Принята к печати 06.06.2025

Опубликована 27.03.2026

Aleksandrova A.D.^{1,2}, Antropova I.P.^{1,2}, Khatsko S.L.³

Effect of P2Y₁₂ receptor inhibition on thrombopoiesis and platelets characteristics in rats bone injury modeling

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ural State Medical University" of Ministry of Public Health of the Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Russian Federation, Repina str., 3

²Federal State Budgetary Institution of Science "Institute of Immunology and Physiology" of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 620049, Ekaterinburg, Russia, st. Pervomaiskaya, 106

³Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin", 620062, Ekaterinburg, Russia, st. Mira, no. 19

Introduction. Bone tissue injury requires the active involvement of platelets in the reparative regeneration process. P2Y₁₂ receptors are important regulators of platelet function, enabling a rapid response to injury. The antiplatelet drug clopidogrel, which indirectly blocks P2Y₁₂ receptors, is widely used in clinical practice and for studying platelet and megakaryocyte function.

Objectives. To study the effect of P2Y₁₂ receptor blockade on the development of MK, parameters and functional activity of the platelets in experimental bone injury.

Methods. The study was performed on female Wistar rats ($n = 40$), divided into two groups. The experimental group was administered clopidogrel intraperitoneally daily for 7 days before surgery (lower jaw injury modeling) and until withdrawal from the experiment (immediately before surgery, 1, 3 and 7 days after surgery). Control animals were without clopidogrel administration, injury was modeled. Platelet indices, platelet aggregation activity with ADP and stages of megakaryocytic lineage cell development in bone marrow punctures were determined.

Results. Irreversible inhibition of P2Y₁₂ receptors had a significant effect on MK development and platelet parameters both before and after injury modeling. A shift in MC towards mature forms was observed, as well as increase in the circulating platelets count before surgery and its increased consumption in the postoperative period.

Conclusions. Changes in MC development and platelet-related parameters when blocking P2Y₁₂ receptors at bone trauma reflect the body's response to the functional insufficiency of the platelet blood component; this must be taken into account during surgical interventions and injuries.

Keywords: platelets; thrombocytopoiesis; megakaryocytes; P2Y₁₂ receptors; clopidogrel; bone injury; rats

For citation: Aleksandrova A.D., Antropova I.P., Khatsko S.L. Effect of P2Y₁₂ receptor inhibition on thrombopoiesis and platelets characteristics in rats bone injury modeling. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2026; 70(1): 113–122. (in Russian).

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2026.01.113-122

For correspondence: Antropova Irina Petrovna, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ural State Medical University" of Ministry of Public Health of the Russian Federation, for a central research laboratory. Address: 620028, Yekaterinburg, Repina str., 3. E-mail: aip.hemolab@mail.ru

Author's contribution: research idea and experimental design, processing and interpretation of results, writing and editing text – Antropova I.P., Aleksandrova A.D.; conducting experiments and collecting material for research – Aleksandrova A.D., Khatsko S.L. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Information about the authors:

Aleksandrova A.D., <https://orcid.org/0000-0002-3600-8894>

Antropova I.P., <https://orcid.org/0000-0002-9957-2505>

Khatsko S.L., <https://orcid.org/0000-0001-5921-6680>

Financing. The study was carried out using equipment from the Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University and the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education of the USMU of the Ministry of Health of Russia within the framework of state assignment No. 121030900298-9.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Received 14.02.2025

Accepted 06.06.2025

Published 27.03.2026

Введение

Костная ткань является сложным органом, обеспечивающим механическую стабильность организма, защиту основных органов и способствующим поддержанию ионного баланса в организме. Травматическое повреждение нарушает функцию кости, что делает крайне важным быстрое и эффективное восстановление утраченной функциональности. Костная ткань обладает собственными регенеративными способностями, однако различные патологические состояния могут нарушить ее тщательно регулируемые процессы резорбции и формирования [1].

Травма костной ткани требует активного включения в процесс репаративной регенерации тромбоцитов. В настоящее время получены убедительные данные о том, что тромбоциты являются полифункциональными элементами системы крови, которые не только осуществляют гемостатическую функцию, но также активно участвуют в воспалении, иммунных и регенераторных процессах [2]. Тромбоциты первыми контактируют с травмированным участком, активируются и индуцируют процессы, направленные на восстановление поврежденных тканей, включая формирование первичной фибриновой репаративной матрицы, высвобождение из альфа-гранул широкого спектра факторов роста, цитокинов, молекул адгезии, способствующих привлечению, пролиферации и дифференциации участвующих в регенерации клеток [2]. Нарушения функции тромбоцитов могут быть опасными для жизни, особенно при травмах и хирургических вмешательствах.

Тонкий баланс состояния тромбоцитов контролируется рядом рецептор-опосредованных сигнальных путей. Рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), являются чрезвычайно важными регуляторами функции тромбоцитов, позволяющими поддерживать гемостаз и быстро реагировать на повреждения [3]. Пуринергический Gi-связанный АДФ рецептор $P2Y_{12}$ играет важную роль при активации и агрегации тромбоцитов. Хотя АДФ считается слабым агонистом тромбоцитов, он принимает участие в усилении и стабилизации ответа тромбоцитов на многие другие агонисты рецепторов, включая тромбин и тромбоксан $A2$ [4]. Ингибирование $P2Y_{12}$ -рецепторов ослабляет агрегацию тромбоцитов, нарушает связывание фибриногена с рецепторами $GP1b/IIIa$, снижает их прокоагулянтную активность. У пациентов с наследственными дефектами рецепторов $P2Y_{12}$ наблюдаются кровотечения легкой и умеренной степени [5]. Фармакологическая регуляция ответа $P2Y_{12}$ рецепторов, связанная с мощным антитромботическим действием антиагрегантных препаратов, позволяет предотвращать развитие тромбозов.

В то же время ингибирование АДФ рецепторов может быть потенциально опасным при неотложных хирургических вмешательствах и травме [6]. Антиагрегантный препарат клопидогрел, опосредованно блокирующий $P2Y_{12}$ рецепторы, не только широко используется в клинической практике, но также играет важную роль в изучении функционирования тромбоцитов и мегакариоцитов [7, 8].

Мегакариоциты (МК) костного мозга представляют собой крупные полиплоидные клетки, являющиеся предшественниками тромбоцитов и формирующие большинство их внутриклеточных систем, необходимых для дальнейшего полноценного функционирования. Кроме того, МК участвуют в поддержании нормального количества циркулирующих тромбоцитов в периферической крови [9]. В условиях, требующих активного производства тромбоцитов, МК способны многократно увеличивать их продукцию [10]. Развитие МК и продукция тромбоцитов являются сложными регулируемыми процессами, механизмы регуляции действуют на уровнях пролиферации, дифференцировки и высвобождения тромбоцитов. Рецепторы, локализованные на плазматической мембране МК, в частности $P2Y_{12}$, интегрируют сигналы окружающей среды и регулируют развитие МК [11].

Тиенопиридиновые метаболиты клопидогрела могут селективно и необратимо модифицировать рецепторы $P2Y_{12}$ в тромбоцитах и в МК и, следовательно, предотвращать связывание АДФ и дальнейшую активацию сигнальных путей клетки [12], что может оказать негативное влияние на репаративную регенерацию при повреждении костной ткани. **Целью** нашей работы стало изучение эффектов ингибирования $P2Y_{12}$ рецепторов на развитие мегакариоцитов, параметры и функциональную активность тромбоцитов в условиях экспериментальной костной травмы.

Методика

В качестве экспериментальных животных были выбраны половозрелые самки крыс линии Wistar весом 250–340 г ($n = 40$). Все эксперименты проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики» (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.), Межгосударственными стандартами (ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными»), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS № 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006). Исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 9 от 25 ноября 2022 года).

Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 23–25 °С, цикле освещении 12 ч день/ночь и с доступом к еде и воде *ad libitum*. Животные были разделены на две группы: контрольную ($n = 20$) и опытную ($n = 20$). В контрольной группе 5 животных были интактными, они не подвергались никакому воздействию, остальным крысам ($n = 15$) моделировалось травма, но клопидогрел не вводился. Всем животным опытной группы вводился клопидогрел, из них 5 животных не подвергались хирургическому воздействию. Введение препарата осуществляли внутривентрально (в область апоневроза, отступив 1 см вниз от области пупочного сращения под углом 30–40° к брюшной стенке), ежедневно в течение недели до операции и после нее до завершения эксперимента. Раствор для инъекций в концентрации 15 мг/мл вводили в дозировке 30 мг/кг веса животного.

Костная травма выполнялась под общим ингаляционным эфирным наркозом, в условиях чистой операционной, при соблюдении правил антисептики и асептики. Крысам выбривали шерсть в области височно-нижнечелюстного сустава с левой стороны. Производили разрез кожи и жевательной мышцы в области угла нижней челюсти длиной 0,5 см и обнажали поверхность кости. Высверливали сквозное округлое отверстие сверлом диаметром 2 мм, после чего прикрывали дефект и ушивали рану. Выведение из эксперимента животных контрольной и опытной групп проводили непосредственно перед операцией (0 суток), через 1, 3 и 7 суток после операции ($n = 5$ на каждую временную точку). Кровь отбирали методом пункции сердца под общим ингаляционным эфирным наркозом, процедуру завершали эвтаназией 0,5% раствором новокаина внутрисердечно.

Тромбоцитарные параметры определяли с использованием гематологического анализатора «MEDONIC M 20». Агрегатометрию проводили по Борну на лазерном анализаторе Алат-2 «Биола», в качестве индуктора использовали АДФ в конечной концентрации 20 μ M.

Красный костный мозг отбирали после эвтаназии животных из не травмированной бедренной кости и изготавливали мазки. Мазок фиксировали красителем-фиксатором Май-Грюнвальда (0,30% раствор сухого красителя эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду в метаноле) в течение 3 минут, добавляли равное количество дистиллированной воды и продолжали окрашивание еще 1 минуту; докрашивали свежеприготовленным водным раствором краски Романовского в течение 12 минут [13]. При изучении мазков определяли (в % на 500 мегакариоцитов препарата) основные стадии развития клеток мегакариоцитарного роста: промегакариоциты, базо-

фильные мегакариоциты, полихроматофильные мегакариоциты, оксифильные мегакариоциты, инволютивные мегакариоциты (рис. 1).

Статистическую обработку проводили в программе «Statistica 10.0». Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимым принимался уровень $p < 0,05$. Данные представлены как медиана [интерквартильный размах].

Результаты

Основой оценки тромбоцитопоза является определение стадии развития клеток мегакариоцитарного роста в пунктатах костного мозга. Был проведен анализ морфологических особенностей клеток красного костного мозга на разных стадиях развития из бедренной кости крыс опытной и контрольной групп. Различия между группами по относительному уровню про-МК были обнаружены уже на дооперационном этапе: в опытной группе их было существенно меньше, чем в контрольной группе: 5,83 [5,77; 8,02]% и 11,71 [10,40; 11,83]% соответственно, $p = 0,008$. То есть после недели введения клопидогрела пул промегакариоцитов значительно снижался, а общий пул МК увеличивался относительно контроля (рис. 2). Аналогичные различия в проМК между опытной и контрольной группами сохранялись и в 1-е сутки после операции: 4,60 [4,49; 4,77]% и 9,40 [8,35; 10,00]% соответственно, $p = 0,032$. Однако к 3-м суткам у животных опытной группы происходило существенное возрастание количества про-МК, тогда как в контрольной группе данный показатель снижался: 9,11 [7,28; 10,41]% и 5,59 [3,53; 5,98]% соответственно, $p = 0,030$. К 7-м суткам различия между группами по уровню про-МК нивелировались.

Относительный уровень зрелых, но не способных к эффективному тромбоцитопозу, базофильных МК в опытной группе перед операцией был выше, чем в контрольной группе, хотя различия не достигали статистической значимости (рис. 3А). В 1-е сутки после операции отмечено значительно более выраженное падение базофильных МК в опытной группе по сравнению с контрольной (на 56,2% и 16,9% соответственно), что, по-видимому, объясняется ускорением перехода к более зрелым формам МК для более интенсивной продукции тромбоцитов в условиях костной травмы.

Относительное количество зрелых и наиболее активных полихроматофильных МК, в которых можно наблюдать отделение от цитоплазмы готовых пластинок, на протяжении всего эксперимента оставалось на достаточно высоком уровне в обеих группах (рис. 3В). До операции не выявлено существенных различий между группами. Однако спустя 1 сутки после операции существенно бо-

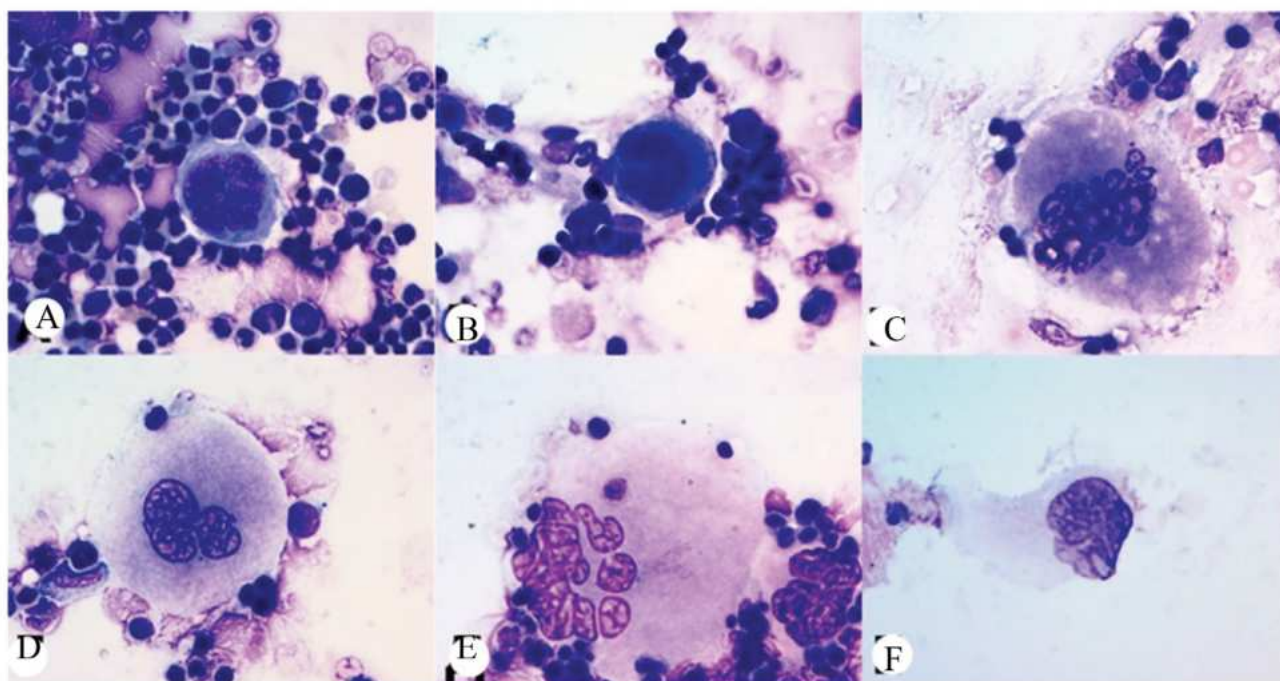


Рис. 1. Основные стадии мегакариоцитарного роста: А – промегакариоцит, В – базофильный мегакариоцит, С, D – полихроматофильный мегакариоцит, Е – оксифильный мегакариоцит, F – инволютивный мегакариоцит. Фиксация по Май-Грюнвальду, окрашивание по Романовскому-Гимзе, ув. $\times 1000$.

Fig. 1. The main stages of megakaryocytic growth are: A – promegakaryocyte, B – basophilic megakaryocyte, C, D – polychromatophilic megakaryocyte, E – oxyphilic megakaryocyte, F – involute megakaryocyte. May-Grunwald fixation, Romanovsky-Giemse staining, $\times 1000$.

более высокий относительный уровень полихроматофильных МК был обнаружен в опытной группе по сравнению с контролем: 52,73 [52,58; 53,60]% и 49,01 [46,98; 51,14]% соответственно, $p = 0,032$. Возможно, это объясняется необходимостью более активной продукции тромбоцитов для компенсации их функциональной недостаточности в раннем периоде после травмирующей операции. В 7-е сутки после операции статистически значимых различий между группами по уровню полихроматофильных МК выявлено не было.

Процентное содержание оксифильных МК до операции не имело существенных различий между группами (рис. 3С). Однако в раннем послеоперационном периоде в опытной группе уровень клеток данного типа был выше, чем в контрольной группе, к 3 суткам различия достигали статистической значимости: 15,18 [14,34; 19,01]% и 10,22 [5,41; 13,09]% соответственно, $p = 0,030$. Можно предположить, что на фоне снижения функциональной активности тромбоцитов травма ускоряет процесс отделения тромбоцитов от мегакариоцитов, поэтому после операции функционирующих, постепенно стареющих клеток становится больше.

Инволютивные формы мегакариоцитов образуются в результате вызревания мегакариоцитов с постепенным отторжением вещества цитоплазмы и ядра в процессе образования тромбоцитов. До операции и в раннем послеоперационном периоде определение относительного количества инволютивных форм МК не выявило существенных различий между изучаемыми группами (рис. 3D). Однако к 7-м суткам этот показатель имел тенденцию к большим значениям в опытной группе по сравнению с контролем: 14,78 [13,98; 15,66]% и 11,85 [10,16; 13,47]% соответственно, $p = 0,056$, что может свидетельствовать о более высокой скорости оборота тромбоцитов на фоне введения клопидогрела.

Дооперационное определение уровня тромбоцитов выявило существенное различие между группами (рис. 4А). У животных опытной группы количество циркулирующих тромбоцитов почти в 2 раза превышало соответствующий показатель контрольной группы: 984 [949; 1031] тыс/мкл и 582 [548; 606] тыс/мкл соответственно, $p = 0,016$. Данные различия можно объяснить компенсаторным повышением количества кровяных пластинок на фоне применения антиагреганта. Послеопе-

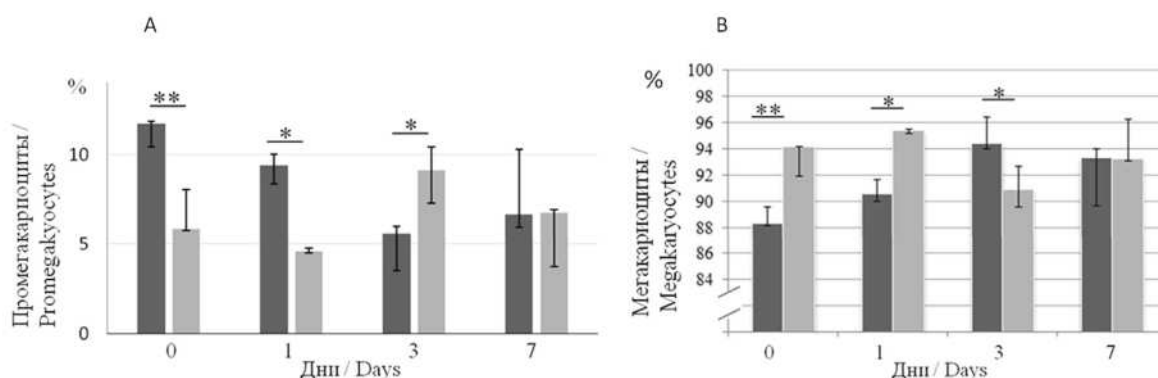


Рис. 2. Относительное количество промегакариоцитов (А) и мегакариоцитов (В) в опытной и контрольной группах до и после моделирования травмы кости. По оси абсцисс – срок относительно операции. Результаты представлены как медиана [интерквартильный интервал]; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

Fig. 2. The relative number of promegakaryocytes (A) and megakaryocytes (B) in the experimental and control groups before and after bone injury modeling. The abscissa axis shows the time period relative to the operation. The results are presented as the median [interquartile range]; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

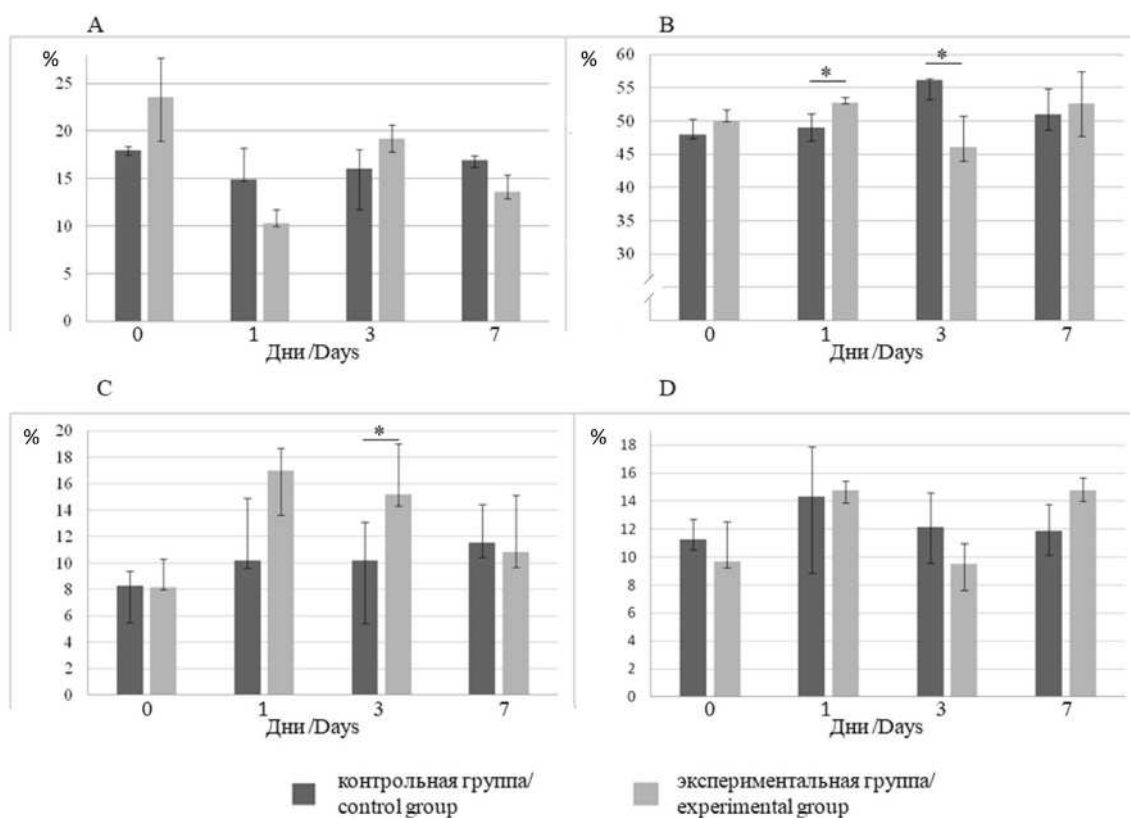


Рис. 3. Относительное количество базофильных мегакариоцитов (А), полихроматофильных мегакариоцитов (В), оксифильных мегакариоцитов (С), инволютивных мегакариоцитов (D) в опытной и контрольной группах до и после моделирования травмы кости. По оси абсцисс – срок относительно операции. Результаты представлены как медиана [интерквартильный интервал]; * – $p < 0,05$.

Fig. 3. The relative number of basophilic megakaryocytes (A), polychromatophilic megakaryocytes (B), oxyphilic megakaryocytes (C), and involute megakaryocytes (D) in the experimental and control groups before and after bone injury modeling. The abscissa axis shows the time period relative to the operation. The results are presented as the median [interquartile range]; * – $p < 0.05$.

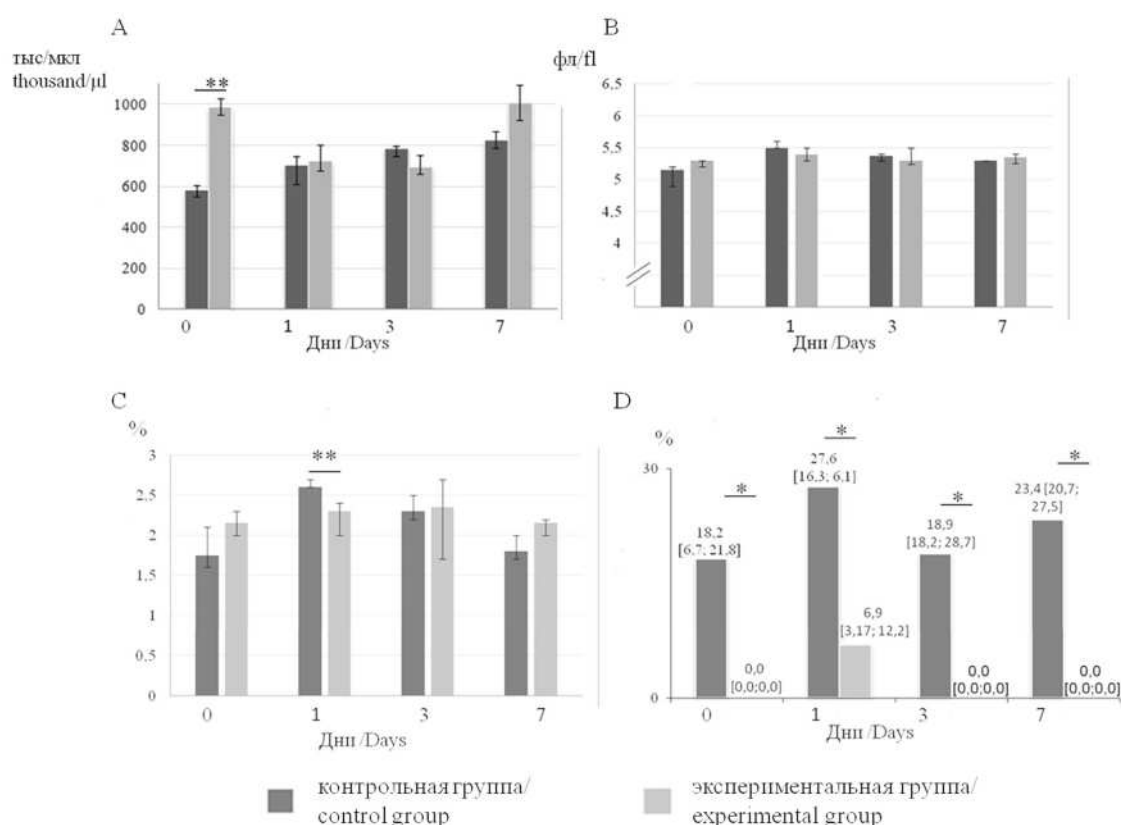


Рис. 4. Количество тромбоцитов (А), средний объем тромбоцитов (В), коэффициент крупных тромбоцитов (С), АДФ – индуцированная агрегация тромбоцитов (D) в опытной и контрольной группах до и после моделирования травмы кости. По оси абсцисс – срок относительно операции. Результаты представлены как медиана [интерквартильный интервал]; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

Fig. 4. Platelet count (A), average platelet volume (B), large platelet ratio (C), ADP – induced platelet aggregation (D) in the experimental and control groups before and after bone injury modeling. The abscissa axis shows the time period relative to the operation. The results are presented as the median [interquartile range]; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

рационального снижения уровня тромбоцитов в контрольной группе не наблюдалось, в отличие от опытной группы, где выявлено падение количества тромбоцитов в 1-е сутки после операции на 26,6% от исходного уровня, что можно объяснить необходимостью рекрутирования большего их количества для эффективного формирования сгустка при хирургическом вмешательстве. Отмечено, что количество тромбоцитов опытной и контрольной групп в 1-е сутки практически выравнивается, такое нивелирование уровней сохранялось до 3-х суток после операции. К 7-м суткам в обеих группах наблюдалось реактивное повышение уровня кровяных пластинок, при этом нарастание тромбоцитов в опытной группе шло более интенсивно.

Средний объем тромбоцитов (MPV), как и относительное содержание крупных тромбоцитов, до операции имел тенденцию к большим значениям у животных опытной группы (рис. 4B, C). Однако в 1-е сутки после операции количество крупных тромбоцитов в опытной группе

было ниже, чем в контрольной группе: 2,30 [2,00; 2,40]% и 2,60 [2,60; 2,70]% соответственно $p = 0,008$, что можно объяснить активным потреблением более крупных тромбоцитов в раннем послеоперационном периоде в условиях применения клопидогрела. С 3-х суток после операции существенных различий в объемных характеристиках тромбоцитов выявлено не было.

Анализ функциональной активности тромбоцитов показал, что агрегация значимо индуцировалась только у животных контрольной группы, как до операции, так и в послеоперационном периоде (рис. 4D). У животных опытной группы блокирование P2Y₁₂ рецепторов приводило практически к полному ингибированию АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Однако отмечено, что в 1-е сутки после операции у животных опытной группы наблюдалось умеренное повышение агрегационной активности, которое, тем не менее, было существенно ниже, чем в контрольной группе.

Обсуждение

Проблема эффективного лечения костной травмы имеет высокую актуальность и является предметом широкого круга экспериментальных и клинических исследований, в результате которых получены убедительные данные о важной роли тромбоцитов в репарации травматических повреждений. Активированные тромбоциты первыми контактируют с травмированным участком и индуцируют процессы, направленные на восстановление поврежденных тканей [2]. В активации тромбоцитов и амплификации их ответа на действие тромбина, коллагена, фактора фон Виллебранда, тромбоспандина A2 важную роль играют $P2Y_{12}$ -рецепторы. Активация этих рецепторов сопровождается также секрецией гранул, увеличением экспрессии Р-селектина, прокоагулянтными изменениями на поверхности плазмолеммы тромбоцитов [14]. Ингибирование $P2Y_{12}$ рецепторов может быть потенциально опасным при неотложных хирургических вмешательствах и травме, но данный вопрос является малоизученным.

Определяя влияние ингибирования рецепторов $P2Y_{12}$ на количество тромбоцитов, A. Balduini с соавторами провели анализ данных клинического исследования, в котором количество тромбоцитов регистрировалось до и после введения пациентам клопидогрела. В данном исследовании было показано, что активные метаболиты препарата не ингибировали образование протромбоцитов и не влияли на количество тромбоцитов в крови [15].

В настоящей работе мы проанализировали влияние блокирования рецепторов $P2Y_{12}$ на тромбоцитарные параметры. Введение в течение 7 дней экспериментальным животным клопидогрела приводит к практически полному ингибированию индуцируемой АДФ агрегационной активности тромбоцитов. В отличие от работы A. Balduini с соавторами, в нашем исследовании на фоне значительного снижения функциональной активности тромбоцитов существенно повышалось их количество в крови.

Циркулирующие тромбоциты неоднородны по размеру, уровню экспрессии поверхностных рецепторов и возрасту. Эта гетерогенность связана с различиями в мегакариocyтах, продуцирующих тромбоциты, и с воздействием изменений окружающей среды в течение жизни тромбоцитов [16]. Размер тромбоцитов является важным параметром, влияющим на их функциональную активность. Доказано, что с увеличением MPV увеличивается площадь контакта со стенкой сосуда, связывается больше фибриногена на поверхности, более высок уровень фосфорилирования белков после стимуляции тромбином, сильнее реакция на агонисты, то есть увеличивает-

ся гемостатический потенциал тромбоцита [17]. Согласно литературным данным, в норме существует обратная нелинейная зависимость между количеством тромбоцитов и MPV [18]. В нашем исследовании увеличение количества тромбоцитов при ингибировании $P2Y_{12}$ рецепторов не приводило к уменьшению MPV, наоборот, присутствовала тенденция к увеличению MPV и относительного уровня крупных тромбоцитов.

Травма костной ткани является мощным воздействием на организм, требующим мобилизации системы гемостаза, в частности её тромбоцитарного звена [19]. В 1-е сутки после операции в контрольной группе количество тромбоцитов в крови повышается на 20,8%, тогда как на фоне применения клопидогрела – снижается на 26,6%. Повышение уровня тромбоцитов в контрольной группе является следствием развития реактивного тромбоцитоза в ответ на травму [20]. В то же время снижение уровня циркулирующих тромбоцитов в опытной группе можно объяснить повышенной потребностью в рекрутировании кровяных пластинок в условиях их функциональной недостаточности. Нами было отмечено, что на фоне применения клопидогрела более интенсивно потреблялись крупные, наиболее функционально активные кровяные пластинки, поскольку количество крупных тромбоцитов в 1-е сутки после операции в опытной группе было существенно ниже по сравнению с контролем.

Мы обнаружили, что в 1-е сутки после операции на фоне ингибирования $P2Y_{12}$ рецепторов у животных наблюдается всплеск агрегационной активности. Данный феномен можно объяснить включением альтернативного пути активации на фоне мощной стимуляции тромбоцитов в условиях хирургической операции и травмы кости. Известно, что одним из вариантов путей стимуляции агрегационной активности тромбоцитов при блокировании $P2Y_{12}$ рецепторов может быть экспрессия аденозиновых рецепторов, которые также представляют собой подсемейство рецепторов, связанных с G-белком [21].

Мегакариоцит содержит все метаболические компоненты, присутствующие в тромбоцитах. Доказано, что зрелые МК экспрессируют рецепторы функциональной активации, аналогичные рецепторам тромбоцитов, включая рецепторы $P2Y_{12}$ [11, 15], поэтому МК могут иметь аналогичную тромбоцитам чувствительность к препаратам, в частности, к антиагреганту клопидогрелу [12, 22].

Развитие МК регулируется рецепторами, локализованными на плазматической мембране и интегрирующими сигналы окружающей среды [23]. Мегакариоциты имеют несколько каскадов передачи сигналов и способны реагировать на межклеточные взаимодействия, компоненты внеклеточного матрикса, поток, создаваемый

кровообращением в синусоидальном просвете, при этом могут происходить изменения в созревании, пролиферации и выработке тромбоцитов [24, 25]. Вместе с тем, нет данных о реактивных изменениях МК в условиях костной травмы при индуцированном клопидогрелом ингибировании P2Y₁₂ рецепторов.

В настоящем исследовании мы показали, что после недельного введения экспериментальным животным препарата клопидогрел существенно снижается относительное количество проМК. Сдвиг происходит от проМК в сторону более зрелых форм, что можно расценить как ускорение развития МК на фоне снижения функциональных возможностей производимых ими тромбоцитов.

В 1-е сутки после операции на фоне блокирования P2Y₁₂, сохраняется низкий уровень проМК, в то же время наблюдается значительно более высокий в сравнении с контрольной группой уровень зрелых и наиболее активных полихроматофильных МК. К 3-м послеоперационным суткам в опытной группе происходит двукратное повышение относительного количества проМК, с существенным превышением значений контроля. Известно, что развитие МК и продукция тромбоцитов являются сложными процессами, которые регулируются рядом факторов, включающих цитокины, хемокины, межклеточные взаимодействия. Механизмы регуляции мегакариопоэза

действуют на уровнях пролиферации, дифференцировки и высвобождения тромбоцитов, положительным регулятором, в частности, является IL6 [26], который синтезируется при повреждениях тканей и является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления [27]. Можно предположить, что нарастание пула проМК, стимулированное послеоперационным молекулярным спектром, особенно выражено в условиях ингибирования рецепторов P2Y₁₂ и снижения функциональной активности циркулирующих тромбоцитов. В то же время на фоне введения клопидогрела в послеоперационном периоде наблюдается повышение относительного уровня стареющих форм МК.

Заключение

Полученные в работе новые данные свидетельствуют о значительном влиянии необратимого ингибирования АДФ рецепторов P2Y₁₂ на тромбопоэз, количество и размер формирующихся тромбоцитов как до, так и после травматичного хирургического вмешательства. Сдвиг развития МК в сторону зрелых форм и существенное повышение количества циркулирующих тромбоцитов можно рассматривать в качестве ответа организма на наличие функциональной недостаточности тромбоцитарного компонента крови.

Литература

(п.п. 1; 3-12; 14-18; 21-27 см. References)

- Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра; 2011.
- Сачилович Д.С. Миелограмма – процедура исследования и интерпретация. Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2019.
- Антропова И.П., Рейно Е.В., Юшков Б.Г. Клоттинговые тесты и молекулярные маркеры в оценке коагуляционных изменений на фоне антитромботической профилактики дабигатраном после крупных ортопедических операций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(1): 25–30. <https://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-25-30>
- Михайлова З.Д., Черепанова В.В., Бабаев Р.Х., Клишкин П.Ф. Тромбоцитозы в практике терапевта. *Врач*. 2020; 31(3): 38–43. <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-03-08>

References

- Bai L., Song P., Su J. Bioactive elements manipulate bone regeneration. *Biomater Transl.* 2023; 4(4): 248–69. <https://doi.org/10.12336/biomatertransl.2023.04.005>
- Mazurov A.V. *Physiology and pathology of platelets*. Moscow: Litterra; 2011 (in Russian).
- Fernández D.I., Kuijpers M.J.E., Heemskerk J.W.M. Platelet calcium signaling by G-protein coupled and ITAM-linked receptors regulating anoctamin-6 and procoagulant activity. *Platelets*. 2021; 32(7): 863–71. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1859103>
- Hechler B., Gachet C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signal*. 2011; 7(3): 293–303. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9247-6>
- Cattaneo M. P2Y₁₂ receptors: structure and function. *J Thromb Haemost.* 2015; 13(Suppl 1): 10–16. <https://doi.org/10.1111/jth.12952>
- Mazzeffi M., Tanaka K.A., Gurbel P.A. et al. Platelet P2Y₁₂ Receptor Inhibition and Perioperative Patient Management. *Anesthesiology*. 2025; 142(1): 202–16. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000005148>
- Braun A., Anders H.J., Gudermann T., Mammadova-Bach E. Platelet-Cancer Interplay: Molecular Mechanisms and New Therapeutic Avenues. *Front Oncol* 2021; 11: 665534. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.665534>
- Parker W.A.E., Storey R.F. The role of platelet P2Y₁₂ receptors in inflammation. *Br J Pharmacol*. 2024; 181(4): 515–31. <https://doi.org/10.1111/bph.16256>
- Wang H., He J., Xu C. et al. Decoding Human Megakaryocyte Development. *Cell Stem Cell*. 2021; 28(3): 535–49. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.006>

10. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005; 115(12): 3339–47. <https://doi.org/10.1172/JCI26674>
11. Gerhards C., Uhlig S., Etemad M. et al. Expression of ADP receptor P2Y₁₂, thromboxane A₂ receptor and C-type lectin-like receptor 2 in cord blood-derived megakaryopoiesis. *Platelets.* 2021; 32(5): 618–25. <https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1782868>
12. Cazenave J.P., Gachet C. Anti-platelet drugs: do they affect megakaryocytes? *Baillieres Clin Haematol.* 1997; 10(1): 163–80. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(97\)80056-x](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(97)80056-x)
13. Sachilovich D.S. Myelogram – research procedure and interpretation. Gomel: State Institution “Republican Scientific and Practical Center for Cardiology and Epidemiology of the Humanities”, 2019 (in Russian)
14. Murugappa S., Kunapuli S.P. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci.* 2006; 11(2): 1977–86. <https://doi.org/10.2741/1939>
15. Balduini A., Di Buduo C.A., Malara A. et al. Constitutively released adenosine diphosphate regulates proplatelet formation by human megakaryocytes. *Haematologica.* 2012; 97(11): 1657–65. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.059212>
16. Veninga A., Baaten C.C.F.M.J., De Simone I. et al. Effects of Platelet Agonists and Priming on the Formation of Platelet Populations. *Thromb Haemost.* 2022; 122(5): 726–38. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1735972>
17. Handtke S., Thiele T. Large and small platelets-(When) do they differ? *J Thromb Haemost.* 2020; 18(6): 1256–67. <https://doi.org/10.1111/jth.14788>
18. Bessman J.D., Williams L.J., Gilmer P.R. Jr. Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artifact of other particles. *Am J Clin Pathol.* 1981; 76(3): 289–93. <https://doi.org/10.1093/ajcp/76.3.289>
19. Antropova I.P., Reino E.V., Yushkov B.G. Clotting tests and molecular markers in the assessment of coagulation changes during antithrombotic prophylaxis with dabigatran after major orthopedic surgeries. *Clinical laboratory diagnostics.* 2017; 62(1): 25–30. (in Russian). <https://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-1-25-30>
20. Michailova Z.D., Cherepanova B.B., Babaeva R.H., Klimkin P.F. Thrombocytosis in the practice of a therapist. *Vrach. (The Doctor).* 2020; 31(3): 38–43. (in Russian). <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-03-08>
21. Wolska N., Rozalski M. Blood Platelet Adenosine Receptors as Potential Targets for Anti-Platelet Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(21): 5475. <https://doi.org/10.3390/ijms20215475>
22. Myers R.A., Ortel T.L., Waldrop A. et al. Platelet RNA Biomarker of Ticagrelor-Responsive Genes Is Associated With Platelet Function and Cardiovascular Events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2024; 44(2): 423–34. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.319759>
23. Sun S., Wang W., Latchman Y., et al. Expression of plasma membrane receptor genes during megakaryocyte development. *Physiol Genomics.* 2013; 45(6): 217–27. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00056.2012>
24. Kawaguchi T., Hashimoto R., Nawa K., Yokota H. The human megakaryocytic cell line UT-7/TPO responds to platelet agonists with intracellular Ca²⁺ elevation and P-selectin expression. *Cell Biol Int.* 2011; 35(5): 537–43. <https://doi.org/10.1042/CBI20100636>
25. Di Buduo C.A., Miguel C.P., Balduini A. Inside-to-outside and back to the future of megakaryopoiesis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023; 7(4): 100197. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100197>
26. Deutsch V.R., Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol.* 2006; 134(5): 453–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06215.x>
27. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018; 10(8): a028456. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028456>

Сведения об авторах:

Александрова Анастасия Дмитриевна, ассистент ФГБОУ ВО Уральский медицинский университет Минздрава России; аспирант, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, e-mail: anastasia.nikanorova@yandex.ru

Антропова Ирина Петровна, ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО Уральский медицинский университет Минздрава России; ведущий научный сотрудник, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, e-mail: aip.hemolab@mail.ru

Хацко Сергей Леонидович, кандидат биологических наук, заведующий анатомо-физиологической экспериментальной лабораторией ФГАОУ ВО УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, e-mail: hardscore@mail.ru