

DOI: 10.7868/S0869813918070092

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *E. coli*
НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ МЕТОДОМ РЕГИСТРАЦИИ
МАЛОУГЛОВОГО СВЕТОРАССЕЯНИЯ (LaSca)**

© *Е. М. Фок, С. П. Гамбарян, Р. Г. Парнова, И. В. Миндукушев*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: efock@mail.ru

Известно, что одним из проявлений сепсиса как у человека, так и у животных является повышение тромбообразования, ключевую роль в котором играют тромбоциты. Данные литературы о способности липополисахарида (ЛПС), основного фактора патогенности грамотрицательных бактерий, непосредственно влиять на агрегацию тромбоцитов крайне противоречивы. В данной работе, выполненной на обогащенной тромбоцитами плазме и на цельной крови, проведена оценка эффекта ЛПС *E. coli* на агрегацию тромбоцитов с помощью высокочувствительного метода регистрации малоуглового светорассеяния (LaSca), позволяющего оценить изменение формы тромбоцитов и их агрегацию. Показано, что инкубация тромбоцитов с ЛПС в течение 1.5—2 ч приводит к ингибированию АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов и снижению активации гликопротеина Пб/Ша (GP IIb/IIIa). Обнаруженные эффекты ЛПС, по всей вероятности, не связаны с классическим механизмом ингибирования активации тромбоцитов, опосредованным действием циклических нуклеотидов, так как ЛПС не менял уровня фосфорилирования VASP ни по Ser-157, ни по Ser-239. Полученные данные свидетельствуют, что усиление тромбообразования при действии грамотрицательных патогенов не является следствием прямого взаимодействия ЛПС с тромбоцитами, а зависит от системного действия многообразных факторов, генерируемых в условиях сепсиса.

Ключевые слова: тромбоциты, агрегация, липополисахарид, метод регистрации малоуглового светорассеяния.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 7. С. 835—844. 2018

E. M. Fock, S. P. Gambaryan, R. G. Parnova, I. V. Mindukshev. EVALUATION OF THE EFFECT OF *E. coli* LIPOPOLYSACCHARIDE ON PLATELETS AGGREGATION BY THE TECHNIQUE BASED ON THE REGISTRATION OF LOW ANGLE LIGHT SCATTERING (LaSca). I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia; e-mail: efock@mail.ru.

It is known that one of the manifestations of sepsis in both humans and animals is an increase in thrombogenesis, the key role in which platelets play. The literature data on the ability of lipopolysaccharide (LPS), the main factor of the pathogenicity of Gram-negative bacteria, directly affect platelet aggregation, are extremely controversial. In this study fulfilled on platelet rich plasma (PRP) and on whole blood we evaluated the effect of *E. coli* LPS on platelet aggregation using new highly sensitive technique based on the registration of low angle light scat-

tering changes (Low Angle Light Scattering Analysis, LaSca) which allows to trace platelets shape change and aggregation. It was shown that incubation with LPS for 1.5—2 hours inhibits ADP-stimulated platelets aggregation and integrin GP IIb/IIIa activation. These effects were not mediated by the activation of cyclic nucleotides system, the classical pathway of platelets inhibition, since LPS did not change phosphorylation of VASP at either Ser-157 or Ser-239. Our data suggest that thrombus formation during severe sepsis caused by Gram-negative pathogens is not a consequence of the direct interaction of LPS with platelets, but depends on the systemic response to the multiple factors generated in the conditions of sepsis.

Key words: platelets, aggregation, lipopolysaccharide, LaSca.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 7. P. 835—844. 2018

Одним из осложнений тяжелого сепсиса является образование множественных микротромбов, сопровождающееся повреждением тканей, кровотечениями и тромбоцитопенией. Механизм этих явлений до сих пор остается малопонятным. Классическим подходом при исследовании сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, является изучение в модельных системах эффекта липополисахарида (ЛПС) — основного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий, являющегося одним из основных индукторов септического шока.

Тромбообразование является чрезвычайно сложным, многокомпонентным процессом с участием как системы свертывания крови (коагуляционного каскада), так и активации и взаимного воздействия друг на друга клеток крови (тромбоцитов, моноцитов и др.) и эндотелия. Показано, что в тромбоцитах, мелких безъядерных клетках, активно участвующих в гемостазе, экспрессируются TLR4, рецепторы ЛПС [2, 6, 30] и многочисленные белки, обеспечивающие внутриклеточный сигналинг ЛПС [31], что указывает на возможность непосредственного действия ЛПС на тромбоциты.

Так как тяжелый сепсис сопровождается тромбообразованием, логично было бы предположить, что ЛПС будет усиливать агрегацию тромбоцитов. Анализ литературы показал, что во всех работах, выполненных *in vivo* как на животных с введением грамотрицательных бактерий или ЛПС, так и на человеке (септических больных или после введения ЛПС), способность тромбоцитов к спонтанной и агонист-стимулированной агрегации была снижена [1, 4, 7, 12, 21, 35]. Однако при исследовании действия ЛПС на тромбоциты *in vitro* результаты оказались противоречивы. Так, показано усиление агрегации при действии ЛПС [25, 36], угнетение [24, 26, 27] или отсутствие эффекта [10]. В связи с этим целью настоящей работы явился анализ прямого действия ЛПС на агрегацию тромбоцитов с использованием нового высокочувствительного метода, основанного на регистрации малоуглового светорассеяния (Low Angle Light Scattering Analysis — LaSca).

МЕТОДИКА

Кровь здоровых добровольцев собирали в шприцы (S-monovette), содержащие цитратный буфер. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP), в кровь добавляли ЭГТА (рабочая концентрация 2 мМ), затем центрифугировали 7 мин при 250 g. PRP или цельную кровь (без ЭГТА) инкубировали при комнатной температуре с различными дозами ЛПС *E. coli* серотипа B8 (Sigma, Германия) в течение разного времени.

Агрегацию тромбоцитов оценивали методом регистрации изменения малоуглового светорассеяния на лазерном анализаторе LaSca TM (БиоМедСистем, РФ) [14, 15]. Агрегация тромбоцитов лучше всего регистрируется на подъеме

интенсивности светорассеяния, измеренного на $1-2^\circ$, и может быть охарактеризована как наклон кривой интенсивности светорассеяния в первые 30—60 с стимуляции (V_{in}). Изменение формы тромбоцитов (platelets shape change) на начальной стадии их агрегации лучше всего коррелирует с подъемом сигнала, регистрируемого на 12° . После добавления тромбоцитов в кювету отсутствие спонтанной активации определяли по стабильности светорассеяния на 12° .

Измерения проводили в буфере следующего состава (мМ): NaCl 140, KCl 2, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2.5, D-глюкоза 5, HEPES 10, pH 7.4, осмоляльность 290 мосм/кг H₂O в условиях постоянного перемешивания (1200 об/мин) при 25 °С. Через 1—2 мин после установления стабильного базального сигнала в кювету, содержащую 15 000 тромбоцитов/мл, добавляли АДФ в дозах от 100 до 500 нМ и регистрировали светорассеяние на 1.5 и 12° . V_{in} агрегации рассчитывали за первые 40 с после добавления АДФ.

В связи со значительной индивидуальной вариабельностью величины V_{in} тромбоцитов, взятых от разных доноров, ее приходилось нормировать. Для этого внутри одного опыта в каждой серии измерений, объединенных по одинаковому времени инкубации тромбоцитов с ЛПС, определялась максимальная скорость агрегации в использованном диапазоне концентраций АДФ (V_{max}) для контрольных клеток. Далее, вычисленные V_{in} агрегации для всех точек внутри одного эксперимента нормировались на соответствующие значения V_{max} в серии. Полученные нормированные значения использовались при построении графиков зависимости скорости агрегации тромбоцитов от концентрации АДФ.

Активацию тромбоцитов оценивали по связыванию с флуоресцентно-меченым фибриногеном (fibrinogen-Alexa 647, Molecular Probes) методом проточной цитофлуорометрии (Navios, Beckman Coulter, США). В связи с индивидуальной вариабельностью данные были нормированы на величину флуоресценции контрольных тромбоцитов в каждом опыте.

Для оценки фосфорилирования белка VASP применяли два независимых метода: проточную цитометрию и иммуноблотинг. Для проточной цитометрии PRP (1×10^7 тромбоцитов/мл) инкубировали с ЛПС (50 мкг/мл) 2 ч, затем тромбоциты фиксировали 10 мин формальдегидом в конечной концентрации 1%, отмывали фосфатным буфером, пермеабелизировали 0.5%-ным тритоном X-100 и инкубировали в этом растворе в течение 45 мин с первичными антителами против p-VASP^{Ser239} и p-VASP^{Ser157} (NanoTOOLS, Германия) в разведении 1:100. Затем добавляли вторичные антитела (anti-mouse-FITC, Sigma, Германия) в разведении 1:200, инкубировали 30 мин и оценивали фосфорилирование VASP на проточном цитометре (Navios, Beckman Coulter, США).

Иммуноблотинг проводили на отмывтых тромбоцитах. Для этого PRP центрифугировали 2.5 мин при 330 g. Осадок промывали цитратным буфером, следующего состава (мМ): NaCl 120, цитрат натрия 12, D-глюкоза 30, pH 6.5 и ресуспендировали в HEPES буфере (мМ): NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, D-глюкоза 10, HEPES 10, pH 7.4. Отмытые тромбоциты (3×10^8 /мл) инкубировали с ЛПС (50 мкг/мл) 1 либо 2 ч, после чего в пропорции 1:1 добавляли буфер, содержащий SDS и меркаптоэтанол (100:1). Пробы кипятили в течение 5 мин при 95 °С. Электрофорез проводился в SDS полиакриламидном геле (PAGE), выделенные белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифическое связывание блокировали 3%-ным раствором обезжиренного молока в Tris-буфере, содержащим 0.1% Tween-20 (TBS-T). В течение ночи при 4 °С белки инкубировали с первичными антителами против p-VASP^{Ser239} в разведении 1:1000. Далее, мембраны промывали TBS-T и добавляли вторичные

антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Amersham, Pharmacia Biotech, Германия). Блоты сканировали, интенсивность реакции рассчитывали при помощи программы ImageJ.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы AtteStat 13.1. Данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка. Проверка данных на нормальность распределения проводилась по критерию Шапиро—Уилка, достоверность различий определялась по парному критерию Стьюдента в случае нормального распределения данных и по парному критерию Вилкоксона при отсутствии нормального распределения. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

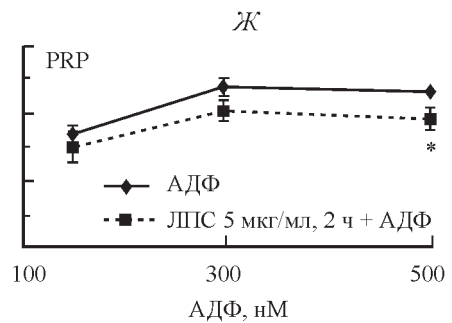
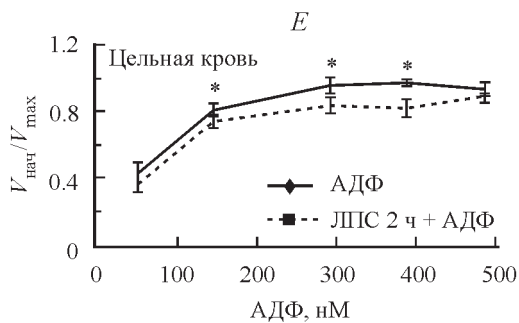
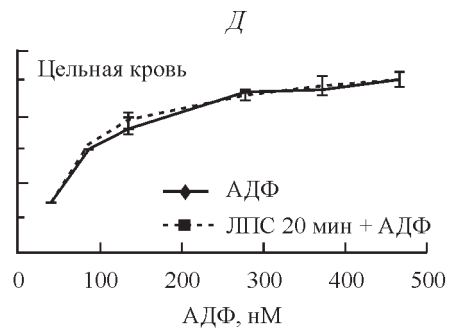
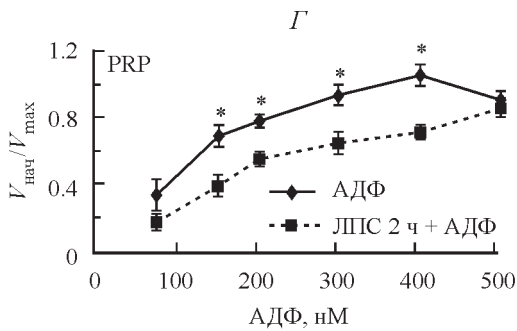
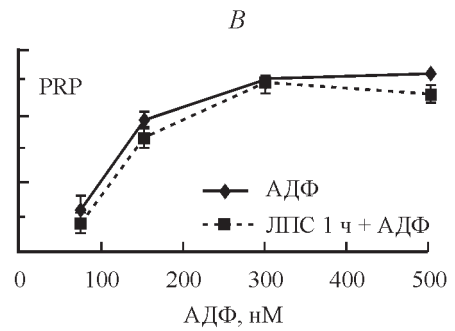
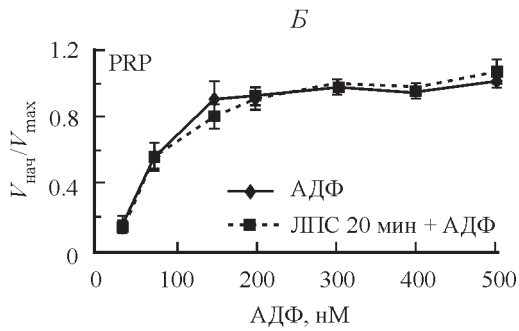
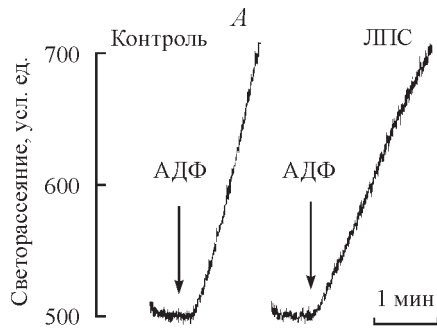
В предварительной серии опытов было установлено, что после длительных инкубаций с ЛПС, необходимых для проявления его эффекта, тромбоциты реагировали на АДФ только при проведении измерений при 25 °С и плохо отвечали на активатор при более высокой температуре (30 или 37 °С). Поэтому все анализы методом LaSca были выполнены при 25 °С.

Полученные результаты показали, что ЛПС не оказывал достоверного эффекта на агрегацию нестимулированных тромбоцитов, однако ингибировал АДФ-стимулированную агрегацию. Ранее в нашей лаборатории методом LaSca был продемонстрирован дозозависимый рост агрегации тромбоцитов в ответ на стимуляцию наномолярными концентрациями аденозин-дифосфата (АДФ), классического активатора тромбоцитов, при физиологических концентрациях Ca^{2+} [14, 15]. Типичная запись изменения светорассеяния под углом в 1.5° АДФ-стимулированными тромбоцитами после 2 ч инкубации PRP с ЛПС (50 мкг/мл) или без него приведена на рис. 1, А. Видно, что наклон кривой после добавления АДФ к суспензии тромбоцитов, прединкубированных с ЛПС, ниже, чем в контроле. Прединкубация тромбоцитов с ЛПС в течение 20 мин не оказывала никакого эффекта на АДФ-стимулированную агрегацию (рис. 1, Б), через 1 ч наблюдалась тенденция к ингибированию агрегации (рис. 1, В) и только после 2 ч ЛПС оказывал достоверное ингибирующее действие при большинстве использованных концентраций АДФ (рис. 1, Г). Инкубация ЛПС с цельной кровью приводила к схожему результату (рис. 1, Д, Е), однако величина ингибирующего эффекта оказалась значительно меньше, хотя и была статистически значима.

Эффект ЛПС был дозозависим. Так, после 2-часовой инкубации с 5 мкг/мл ЛПС наблюдалась лишь тенденция к ингибированию АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов (рис. 1, Ж), тогда как 50 мкг/мл ЛПС за то же время приводило к существенному ингибированию агрегации (рис. 1, Г).

Рис. 1. Оценка действия ЛПС на тромбоциты методом LaSca.

А — типичная запись изменения светорассеяния АДФ-стимулированными тромбоцитами после 2 ч инкубации PRP с/без ЛПС (50 мкг/мл); Б—Ж — нормированная начальная скорость агрегации (см. «Методику») АДФ-стимулированных тромбоцитов: после инкубации PRP с/без ЛПС (50 мкг/мл) в течение 20 мин (Б), 1 ч (В) или 2 ч (Г); после инкубации цельной крови с/без ЛПС в течение 20 мин (Д) и 2 ч (Е) с последующим выделением PRP; Ж — то же, что и Г, но доза ЛПС составила 5 мкг/мл. Измерения проведены на 1.5° при температуре 25 °С. Б, Г: $n = 5$. * $p < 0.05$ относительно контроля по парному критерию Стьюдента; Д, Ж: $n = 5-7$, * $p < 0.05$ относительно контроля по парному критерию Вилкоксона.



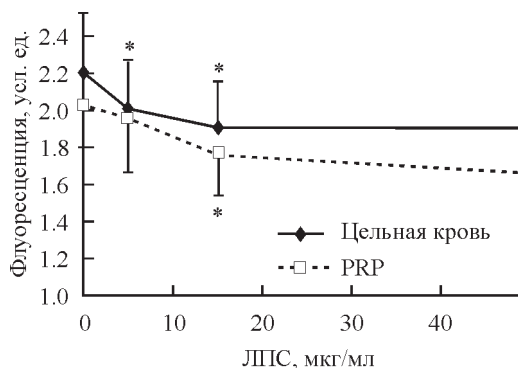


Рис. 2. Связывание флуоресцентно-меченного фибриногена с тромбоцитами после 1.5-часовой инкубации цельной крови или PRP с ЛПС. $n = 6$.

* $p < 0.05$ по парному критерию Вилкоксона.

Для выяснения того, обусловлен ли ингибирующий эффект ЛПС на агрегацию тромбоцитов снижением активации интегринов GPIIb/IIIa, оценивалось связывание флуоресцентно-меченного фибриногена с тромбоцитами методом проточной цитофлуорометрии. Было показано, что только после 1.5 ч инкубации PRP или цельной крови с ЛПС наблюдается снижение его связывания

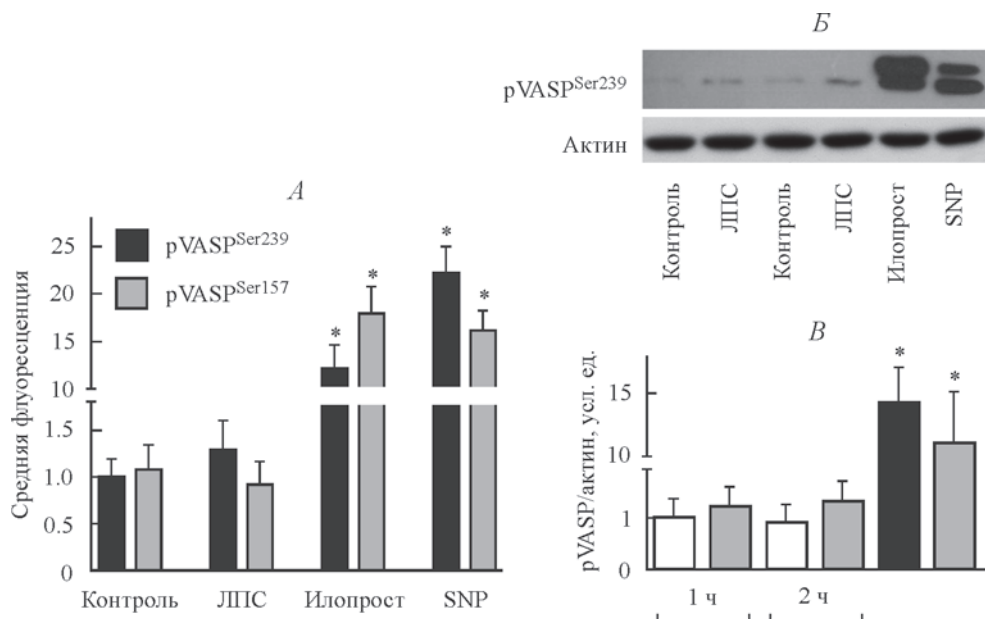


Рис. 3. Оценка эффекта ЛПС на фосфорилирование белка VASP.

Илопрост (5 нМ, 1 мин) и нитропруссид натрия (SNP, 5 мкМ, 1 мин) использовали в качестве позитивного контроля. Разбавленную PRP (1×10^7 тромбоцитов/мл) (A) либо отмые тромбоциты (3×10^8 /мл) (B, B) инкубировали с ЛПС (50 мкг/мл) 2 ч (A), 1 или 2 ч (B, B), затем определяли степень фосфорилирования VASP проточной цитометрией (A) и иммуноблотингом (B). B — количественный анализ иммуноблотинга. Отношение pVASP/актин в контроле принимали за единицу. $n = 4$, * $p < 0.05$.

с тромбоцитами, активированными АДФ (рис. 2). Как и в случае анализа агрегации, ЛПС не оказывал действия на связывание фибриногена покоящимися тромбоцитами. Действие ЛПС дозозависимо увеличивалось с повышением его концентрации от 5 до 50 мкг/мл (рис. 2) и не проявлялось при меньших временах инкубации PRP или цельной крови с ЛПС (20 мин или 1 ч, данные не приведены). Величина эффекта была также невелика, причем, как и при оценке методом LaSca, действие ЛПС было выражено в большей степени, если тромбоциты инкубировались с ЛПС в составе PRP, а не цельной крови. Таким образом, снижение АДФ-стимулированной агрегации под действием ЛПС связано с ингибированием активации GPIIb/IIIa.

Классическим механизмом, опосредующим ингибирование многих функций тромбоцитов, считается активация протеинкиназ A (PKA) и G (PKG) циклическими нуклеотидами — цАМФ и цГМФ соответственно [28, 33]. Маркером активации киназ может служить фосфорилирование белка VASP по Ser-157 и по Ser-239. Для того чтобы проверить, задействован ли этот механизм в реализации ингибирующего эффекта ЛПС в нашем случае, мы проанализировали уровень фосфорилирования VASP по этим сайтам методом проточной цитофлуориметрии и иммуноблотинга. В качестве позитивного контроля активации киназ, приводящее к фосфорилированию VASP, использовались илопрост (5 нМ, 1 мин), активатор аденилатциклазы, и нитропруссид натрия (SNP, 5 мкМ, 1 мин), активатор гуанилатциклазы. Действие ЛПС не приводило к достоверному увеличению фосфорилирования VASP по оценке обоими методами ни по Ser-157, ни по Ser-239 (рис. 3, A—B), свидетельствуя о том, что этот механизм не является магистральным в реализации эффекта ЛПС в наших опытах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших опытах ЛПС не оказывал эффекта на агрегацию покоящихся тромбоцитов, что соответствует результатам большинства работ [16, 22, 25, 31, 34]. Ингибирование АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов под действием ЛПС, выявленное методом LaSca в настоящей работе, подтверждает данные многочисленных работ *in vivo* [1, 4, 7, 12, 21, 35] и части работ, выполненных *in vitro* [17, 24, 26], хотя этот эффект находится в очевидном противоречии с наблюдаемым при сепсисе диссеминированным внутрисосудистым свертыванием.

При активации тромбоцитов под действием АДФ происходит изменение конформации тромбоцитарного мембранного интегрин GPIIb/IIIa, что приводит к его связыванию с фибриногеном, который образует «фибриногеновые мостики», соединяющие через GPIIb/IIIa тромбоциты между собой. Данные литературы о действии ЛПС на активацию GPIIb/IIIa малочисленны и при этом неоднозначны [11, 22, 27, 29]. В наших опытах при действии ЛПС наблюдалось угнетение активации GPIIb/IIIa, что согласуется с ингибирующим эффектом ЛПС на агрегацию тромбоцитов, оцененным методом LaSca.

Классическим механизмом ингибирования функций тромбоцитов является активация системы циклических нуклеотидов, которая приводит к значительному увеличению уровня фосфорилирования разнообразных белков, в том числе VASP по Ser-157 и Ser-239 [28, 33]. По данным литературы, ЛПС не влияет на уровень цАМФ в тромбоцитах [24, 26], однако результаты оценки уровня цГМФ крайне противоречивы. Так, неизменность уровня цГМФ под действием ЛПС отмечалась в двух работах: на фоне ингибирования адгезии тромбоцитов человека в широком диапазоне концентраций ЛПС (0.01—100 мкг/мл) [17],

а также при значительном повышении спонтанной или ингибировании тромбин-стимулированной адгезии тромбоцитов крыс после введения ЛПС [3]. Подъем уровня цГМФ в тромбоцитах под действием ЛПС показан в нескольких работах, причем независимо от того, ингибировал ли ЛПС агрегацию тромбоцитов [12, 27] или потенцировал ее [36]. К настоящему моменту в литературе отсутствуют данные об участии протеинкиназ А и G в действии ЛПС на тромбоциты по уровню фосфорилирования VASP. В наших экспериментах методами проточной цитофлуорометрии и иммуноблоттинга впервые показано, что ЛПС не менял уровня фосфорилирования VASP ни по Ser-157, ни по Ser-239. Полученные результаты свидетельствуют, что ингибирующий эффект ЛПС на АДФ-стимулированную агрегацию тромбоцитов, по всей вероятности, не связан с изменением активности протеинкиназ А и G, активируемых циклическими нуклеотидами.

В пользу этого предположения свидетельствуют и наши данные о необходимости длительных инкубаций с ЛПС для ингибирования агрегации АДФ-стимулированных тромбоцитов и снижения активации GРПb/Ша. Это может указывать на вовлеченность в данный процесс изменения экспрессии каких-либо белков. Помимо присутствия TLR4 рецептора и многочисленных молекул, участвующих в передаче сигнала от него, в безъядерных тромбоцитах показана экспрессия некоторых белков, мРНК которых предсуществует в самих тромбоцитах, попадая в них либо из их предшественников — мегакариоцитов, либо в результате переноса мРНК из других клеток [5]. Так, при действии ЛПС показано увеличение экспрессии тромбоцитами интерлейкина И-1β и циклооксигеназы-2, и этот процесс также требует времени [5, 25].

В некоторых работах показано, что только сами бактерии, но не ЛПС, выделенный из этих штаммов, приводили к активации или агрегации тромбоцитов [13, 18]. С другой стороны, активация TLR4 может также происходить под действием эндогенных лигандов. Так, например, агонистом TLR4 рецептора является HMGB1 (high mobility group protein B1), воспалительный цитокин, поздний медиатор септического шока, обладающий протромботическим действием [9, 19, 31]. Известно, что тромбоциты наряду с макрофагами и моноцитами являются основными источниками HMGB1 при воспалении, увеличивая его количество как в сыворотке крови, так и на поверхности тромбоцитов [32].

В качестве примеров системного ответа, способствующих образованию тромбов при сепсисе, может рассматриваться снижение экспрессии эндотелиальными клетками молекул, ингибирующих тромбообразование — антитромбина, белка С, ADAMTS-13, TFPI и других и нарушение их функции [8, 20], или рост экспрессии тканевого фактора, стимулирующего тромбообразование, макрофагами, моноцитами и эндотелиальными клетками, активированными на ранних стадиях сепсиса [20, 23].

Таким образом, агрегация тромбоцитов в условиях сепсиса обусловлена, по всей вероятности, не их прямым взаимодействием с ЛПС, а опосредованным действием каких-либо сигналов от других участников системы свертывания крови, которые в избытке генерируются в условиях сепсиса. Очевидно, что прояснение механизмов, опосредующих эти эффекты, требует дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290371-3). Цитофлуорометрические измерения выполнены на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) на базе Центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Adamzik M., Görlinger K., Peters J., Hartmann M. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit. Care.* 16(5): R204. 2012.
- [2] Andonegui G., Kerfoot S. M., McNagny K., Ebbert K. V., Patel K. D., Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood.* 106(7): 2417—2423. 2005.
- [3] Casarin A. L., Lopes-Pires M. E., Morganti R. P., Antunes E., Marcondes S. Reactive oxygen and nitrogen species modulate the ex-vivo effects of LPS on platelet adhesion to fibrinogen. *Life Sci.* 89(21—22): 773—778. 2011.
- [4] Cicala C., Santacroce C., Itoh H., Douglas G. J., Page C. P. A study on rat platelet responsiveness following intravenous endotoxin administration. *Life Sci.* 60(2): PL31—PL38. 1997.
- [5] Clancy L. I., Beaulieu L. M., Tanriverdi K., Freedman J. E. The role of RNA uptake in platelet heterogeneity. *Thromb. Haemost.* 117(5): 948—961. 2017.
- [6] Cognasse F., Hamzeh H., Chavarin P., Acquart S., Genin C., Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell. Biol.* 83: 196—198. 2005.
- [7] Davies G. R., Mills G. M., Lawrence M., Battle C., Morris K., Hawkins K., Williams P. R., Davidson S., Thomas D., Evans P. A. The role of whole blood impedance aggregometry and its utilisation in the diagnosis and prognosis of patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis in acute critical illness. *PLoS One.* 9(9): e108589. doi: 10.1371. 2014.
- [8] Iba T., Levy J. H. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J. Thromb. Haemost.* 2: 231—241. 2018.
- [9] Ito T., Kawahara K., Nakamura T., Yamada S., Nakamura T., Abeyama K., Hashiguchi T., Maruyama I. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. *J. Thromb. Haemost.* 1: 109—116. 2007.
- [10] Hashimoto K., Jayachandran M., Owen W., Miller V. Aggregation and microparticle production through Toll-like receptor 4 activation in platelets from recently menopausal women. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54: 57—62. 2009.
- [11] Kappelmayr J., Beke Debreceni I., Vida A., Antal-Szalmás P., Clemetson K. J., Nagy B. Distinct effects of Re- and S-forms of LPS on modulating platelet activation. *J. Thromb. Haemost.* 11: 775—778. 2013.
- [12] Lopes-Pires M. E., Naime A. C., Almeida Cardelli N. J., Anjos D. J., Antunes E., Marcondes S. PKC and AKT modulate cGMP/PKG signaling pathway on platelet aggregation in experimental sepsis. *PLoS One.* 10(9): e0137901. doi: 10.1371/journal.pone.0137901. 2015.
- [13] Matus V., Valenzuela J. G., Hidalgo P., Pozo L. M., Panes O., Wozniak A., Mezzano D., Pereira J., Sáez C. G. Human platelet interaction with *E. coli* O111 promotes tissue-factor-dependent procoagulant activity, involving Toll like receptor 4. *PLoS One.* 12(9): e0185431. doi: 10.1371/journal.pone.0185431. 2017.
- [14] Mindukshev I. V., Jahatspanian I. E., Goncharov N. V., Jenkins R. O., Krivchenko A. I. A new method for studying platelets, based upon the low-angle light scattering technique. 1. Theoretical and experimental foundations of the method. *Spectroscopy.* 19: 235—246. 2005.
- [15] Mindukshev I., Gambaryan S., Kehrer L., Schuetz C., Kobsar A., Rukoyatkina N., Nikolaev V. O., Krivchenko A., Watson S. P., Walter U., Geiger J. Low angle light scattering analysis: a novel quantitative method for functional characterization of human and murine platelet receptors. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50(7): 1253—1262. 2012.
- [16] Montrucchio G., Bosco O., Del Sorbo L., Fascio Pecetto P., Lupia E., Goffi A., Omedè P., Emanuelli G., Camussi G. Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopolysaccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.* 90(5): 872—881. 2003.
- [17] Morganti R. P., Cardoso M. H., Pereira F. G., Lorand-Metze I., De Nucci G., Marcondes S., Antunes E. Mechanisms underlying the inhibitory effects of lipopolysaccharide on human platelet adhesion. *Platelets.* 21(4): 260—269. 2010.
- [18] Moriarty R. D., Cox A., McCall M., Smith S. G., Cox D. *Escherichia coli* induces platelet aggregation in an FcγRIIa-dependent manner. *J. Thromb. Haemost.* 4: 797—806. 2016.
- [19] Okamoto K., Tamura T., Sawatsubashi Y. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J. Intensive Care.* 4: 23. doi: 10.1186/s40560-016-0149-0. 2016.

- [20] *Opal S. M., van der Poll T.* Endothelial barrier dysfunction in septic shock. *J. Intern. Med.* 277(3): 277—293. 2015.
- [21] *Reddi B. A., Iannella S. M., O'Connor S. N., Deane A. M., Willoughby S. R., Wilson D. P.* Attenuated platelet aggregation in patients with septic shock is independent from the activity state of myosin light chain phosphorylation or a reduction in Rho kinase-dependent inhibition of myosin light chain phosphatase. *Intensive Care Med. Exp.* 3(1): 37. 2015.
- [22] *Rivadeneira L., Carestia A., Eulain J., Pozner R. G., Fondevila C., Negrotto S., Schattner M.* Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB. *Thromb. Res.* 133(2): 235—243. 2014.
- [23] *Ren M., Li R., Luo M., Chen N., Deng X., Yan K., Zeng M., Wu J.* Endothelial cells but not platelets are the major source of Toll-like receptor 4 in the arterial thrombosis and tissue factor expression in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307(7): R901—R907. 2014.
- [24] *Saba H. I., Saba S. R., Morelli G., Hartmann R. C.* Endotoxin-mediated inhibition of human platelet aggregation. *Thromb. Res.* 34(1): 19—33. 1984.
- [25] *Shashkin P. N., Brown G. T., Ghosh A., Marathe G. K., McIntyre T. M.* Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J. Immunol.* 181(5): 3495—3502. 2008.
- [26] *Sheu J. R., Hung W. C., Kan Y. C., Lee Y. M., Yen M. H.* Mechanisms involved in the antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in human platelets. *Br. J. Haematol.* 103(1): 29—38. 1998.
- [27] *Sheu J. R., Hung W. C., Su C. H., Lin C. H., Lee L. W., Lee Y. M., Yen M. H.* The antiplatelet activity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide is mediated through a nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Haematol.* 62(5): 317—326. 1999.
- [28] *Smolenski A.* Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 10(2): 167—176. 2012.
- [29] *Stahl A. L., Svensson M., Morgelin M., Svanborg C., Tarr P. I., Mooney J. C., Watkins S. L., Johnson R., Karpman D. A.* Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets via TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 108: 167—176. 2006.
- [30] *Stark R. J., Aghakasiri N., Rumbaut R. E.* Platelet-derived Toll-like receptor 4 (TLR4) is sufficient to promote microvascular thrombosis in endotoxemia. *PLoS One.* 7(7): e41254. 2012.
- [31] *Vallance T. M., Zeuner M. T., Williams H. F., Wiedera D., Vaiyapuri S.* Toll-Like receptor 4 signalling and its impact on platelet function, thrombosis, and haemostasis. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2017/9605894. 2017.
- [32] *Vogel S., Bodenstein R., Chen Q., Feil S., Feil R., Rheinlaender J., Schäffer T. E., Bohn E., Frick J. S., Borst O., Münzer P., Walker B., Markel J., Csanyi G., Pagano P. J., Loughran P., Jessup M. E., Watkins S. C., Bullock G. C., Sperry J. L., Zuckerbraun B. S., Billiar T. R., Lotze M. T., Gawaz M., Neal M. D.* Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J. Clin. Invest.* 125(12): 4638—4654. 2015.
- [33] *Walter U., Gambaryan S.* cGMP and cGMP-dependent protein kinase in platelets and blood cells. *Handb. Exp. Pharmacol.* (191): 533—548. 2009.
- [34] *Ward J. R., Bingle L., Judge H. M., Brown S. B., Storey R. F., Whyte M. K., Dower S. K., Buttler D. J., Sabroe I.* Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb. Haemost.* 94(4): 831—838. 2005.
- [35] *Yaguchi A. I., Lobo F. L., Vincent J. L., Pradier O.* Platelet function in sepsis. *J. Thromb. Haemost.* 12: 2096—2102. 2004.
- [36] *Zhang G., Han J., Welch E. J., Ye R. D., Voyno-Yasenetskaya T. A., Malik A. B., Du X., Li Z.* Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J. Immunol.* 182: 7997—8004. 2009.

Поступила 24 IV 2018