

УДК 612.111.7.014.46-088.9

<https://doi.org/10.23888/HMJ2024123418-428>

Микрофлюидные системы для оценки тромбоцитарных агрегатов на фоне сероводорода и ацетилцистеина

М. Н. Тризно, Е. В. Тризно[✉], М. В. Мажитова, А. М. Абакаров, Е. И. Кривоносова

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Тризно Екатерина Валерьевна, neiron-2010@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Введение. Поскольку тромбоциты играют центральную роль в процессе гемостаза, понимание их роли в инициации и развитии тромбов является ключом к изучению как здорового, так и патологического гемостаза. Однако, естественная среда свертывания крови от природы гетерогенна, что затрудняет определение основных механизмов, регулирующих поведение тромбоцитов. Высоко контролируемые исследования с помощью микрофлюидных систем играют важную роль в обеспечении понимания поведения тромбоцитов в условиях патогенного действия факторов среды и подбора селективных средств защиты от них. Так, актуально изучение патологической свёртываемости крови в контексте воздействия сероводорода. Изучение механизма формирования тромбоцитарных агрегатов на фоне данного поллютанта и ацетилцистеина предоставит возможность использовать последний в качестве специфического средства коррекции дисфункции пластинок крови.

Цель. Оценка агрегационной способности тромбоцитов в среде сероводорода с возможностью коррекции ацетилцистеином с применением микрофлюидных систем.

Материалы и методы. Микрофлюидные чипы, изготовленные 3D стереолитографическим методом на LCD принтере из оптически прозрачной полимерной смолы. Исследовалась богатая тромбоцитами плазма лабораторных крыс самцов. Взаимодействие пластинок крови моделировалось с раствором донора сероводорода (Na₂S) и L-ацетилцистеина (АЦЦ). Формирование агрегатов в микроканалах чипов оценивали с помощью оптического микроскопа и программных средств.

Результаты. Отмечалась гипофункция пластинок крови (на основе данных уровня заполненности просветов микрофлюидных каналов и размеров тромбоцитарных агрегатов) при взаимодействии с сероводородом, близкие к контролю значения реакции с ацетилцистеином и более активным формированием агрегатов на фоне «сероводород + ацетилцистеин». Удалось достичь высокой воспроизводимости и качества изготовленных чипов. Использованные материалы позволили спроектировать оптимальную геометрию микроканалов для моделирования взаимодействия тромбоцитов с экзогенными факторами среды. В результате на полученных изображениях зафиксированы различные по форме и размерам агрегаты тромбоцитов в каналах микрофлюидных чипов.

Заключение. Ацетилцистеин обладает прекодиционирующим эффектом на тромбоциты в условиях ингибитора агрегации сероводорода. Применённая адаптированная нами техника изготовления микрофлюидных чипов показала хороший результат в отношении количества и качества экземпляров, затраченного времени и средств.

Ключевые слова: микрогидродинамика; микрофлюидика; тромбоциты; сероводород; ацетилцистеин

Для цитирования:

Тризно М. Н., Тризно Е. В., Мажитова М. В., Абакаров А. М., Кривоносова Е. И. Микрофлюидные системы для оценки тромбоцитарных агрегатов на фоне сероводорода и ацетилцистеина // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2024. Т. 12, № 3. С. 418–428. <https://doi.org/10.23888/HMJ2024123418-428>.

<https://doi.org/10.23888/HMJ2024123418-428>

Microfluidic Systems for Assessment of Platelet Aggregates on Exposure to Hydrogen Sulfide and Acetylcysteine

Matvey N. Trizno, Ekaterina V. Trizno[✉], Marina V. Mazhitova, Akhmed M. Abakarov, Ekaterina I. Krivonosova

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

Corresponding author: Ekaterina V. Trizno, neiron-2010@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION: Since platelets play the central part in the process of hemostasis, understanding their role in thrombus initiation and development is a key to the study of both normal and pathological hemostasis. However, the natural environment of blood coagulation is inherently heterogeneous making it difficult to determine the underlying mechanisms regulating platelet behavior. Highly controlled studies using microfluidic systems are important in understanding the behavior of platelets on exposure to pathogenic exogenous factors and in the choice of selective means of protection against them. Thus, the study of pathological blood clotting in the context of exposure to hydrogen sulfide is relevant. Studying the mechanism of formation of platelet aggregates on exposure to the given pollutant and acetylcysteine will permit to use the latter as a specific means to correct platelet dysfunction.

AIM: Assessment of platelet aggregation ability in hydrogen sulfide environment with the possibility of correction with acetylcysteine using microfluidic system.

MATERIALS AND METHODS: Microfluidic chips were manufactured using 3D stereolithography method on LCD printer from optically-transparent polymer resin. The study material was platelet-rich plasma of male laboratory rats. The interaction of blood platelets was modeled with donor hydrogen sulfide (Na_2S) solution and L-acetylcysteine (ACC). The formation of aggregates in chip microchannels was assessed using an optical microscope and software means.

RESULTS: Hypofunction of platelets was noted (based on the data of filling the lumens of microfluidic channels and the size of platelet aggregates) on the interaction with hydrogen sulfide, and close to control values of reaction with acetylcysteine and more active formation of aggregates under the action of 'hydrogen sulfide + acetylcysteine'. High reproducibility and quality of manufactured chips were achieved. The materials used permitted to design the optimal geometry of microchannels to model the interaction of platelets with environmental factors. On the resulting images, platelet aggregates of different shapes and sizes were visualized in the channels of microfluidic chips.

CONCLUSION: Acetylcysteine has a preconditioning effect on platelets in the presence of aggregation inhibitor hydrogen sulfide. The method of microfluidic chip manufacture adapted by us, showed good results in terms of the quantity and quality of copies, consumed time and cost.

Keywords: *microhydrodynamics; microfluidics; platelets; hydrogen sulfide; acetylcysteine*

For citation:

Trizno M. N., Trizno E. V., Mazhitova M. V., Abakarov A. M., Krivonosova E. I. Microfluidic Systems for Assessment of Platelet Aggregates on Exposure to Hydrogen Sulfide and Acetylcysteine. *Science of the Young (Eruditio Juvenium)*. 2024;12(3):418–428. <https://doi.org/10.23888/HMJ2024123418-428>.

Введение

При движении в потоке крови форменные элементы испытывают на себе напряжение сдвига, которое меняется в различных патологических условиях. Режим течения крови влияет на её физиологические характеристики, такие, как вязкость, например. Заболевания, нарушения обмена, влияющие на гомеостатический баланс, меняют и реологические характеристики крови. Состояние форменных элементов и, в частности, тромбоцитов, значительно зависит от гуморального микроокружения. Подобные изменения физико-химических свойств пластинок крови способствуют повышению их чувствительности к активации. В большей степени на предрасположенность тромбоцитов к тромбообразованию оказывает скорость кровотока: замедление в венозном и ускорение в артериальном русле. Не всегда и первично звено системы гемостаза, с которого начинается активация: в артериальном русле тромбообразование начинается с сосудисто-тромбоцитарного, а в венозном — с плазменного. Кроме того, повреждение эндотелия может усугублять прокоагуляционный фон [1, 2].

Известны различные пути активации тромбоцитов. Так, оксид азота индуцирует секрецию плотных, лизосомальных и α -гранул пластинок крови путём дезактивации интегрина α IIb β 3 с помощью реакции s-нитрозилирования. Посредством другой реакции, карбонилирования, действует на тромбоциты окислительный стресс, образуя, наряду со специфическими белковыми аддуктами, продукты перекисного окисления липидов [3]. Подобный механизм активации пластинок крови происходит в процессе клеточного старения, сахарного диабета, а также при специфической стимуляции тромбином. В ряде случаев, реакция тромбоцитов не поддаётся логическому описанию. Например, снижение агрегационного потенциала в первое время кровотечения. В качестве объяснения можно предположить, что подобная реакция обеспечивает диффузию тканей и защищает от неконтролируемого

микротромбоза. Другим примером «неадекватной» реакции тромбоцитов является неуправляемое, кажущееся чрезмерным их участие в генерализации воспалительного ответа. В то же время, участвуя в локальном воспалении, пластинки крови способствуют более продуктивному течению процесса [4]. Таким образом, характеризовать тромбоцитарное функционирование с позиции адаптивного/дезадаптивного представляется, с точки зрения их фундаментального значения, излишним упрощением и часто недостаточно.

Моделирование микрофлюидных чипов позволяет исключить суммирующее значение целого ряда физических факторов и сконцентрировать внимание на влиянии определённого патогена (в данном исследовании — раствора сульфида натрия, донатора сероводорода). Контроль давления в каналах микрожидкостных чипов позволяет имитировать участки микрососудистого русла, соответствующие венам, капиллярам или артериолам.

Микрогидродинамика или микрофлюидика — наука о поведении и контроле небольших объемов жидкости в микроканалах, размеры которых не превышают 1000 мкм. Технология широко применяется в изготовлении медицинских устройств, биотестировании и различных сферах инженерии [5]. Классический вариант — изготовление форм методом фотолитографии с последующей заливкой полученных чипов полидиметилсилоксаном [6]. В зависимости от преследуемых целей возможна обработка полученной системы в холодной плазме для установления гидрофобных свойств поверхности каналов. Существуют и более быстрые и дешёвые способы изготовления, такие как 3D стереолитографическая печать [7]. Несмотря на определённые ограничения и допуски в точности изготовления, данная техника может применяться как самостоятельно, так и в комбинации с полидиметилсилоксаном. Преимуществом данной методики является быстрота и дешевизна изготовления, что является важным фактором, учитывая, что изготовление финальной версии микро-

жидкостной системы может потребовать нескольких вариаций. Кроме того, он способен обеспечить изготовление многоуровневых систем, невозможных при обычном методе изготовления.

Сероводород (H_2S) — газ природного происхождения, но в случае превышения предельно допустимой концентрации в воздухе, оказывает патологический эффект на организм человека и животных [8–10]. В то же время, H_2S вырабатывается *in vivo* ферментативным путём и осуществляет гомеостатические функции в роли газотрансммиттера [11]. Поэтому исследование возможностей регуляции последствий негативного экзогенного воздействия H_2S крайне актуально. В зависимости от диапазона доз поллютант проявляет разнонаправленный эффект на тромбоциты [12, 13].

Поиск путей оптимизации диагностических мер по изучению поведения тромбоцитов в патогенных условиях сероводорода сформировал наше исследование для отбора средств, позволяющих моделировать взаимодействие пластинок крови с патогеном и потенциальными средствами коррекции «*in cito*» и экономически доступно.

В качестве корректирующего средства исследован L-ацетилцистеин (АЦЦ), ввиду увеличения количества опубликованных данных по росту детоксикационных возможностей данного химически модифицированного дополнительной ацетильной группой L-цистеина [14–18].

Цель. Оценка агрегационной способности тромбоцитов в среде сероводорода с возможностью коррекции ацетилцистеином с применением микрофлюидных систем.

Материалы и методы

Для экспериментального изучения характеристик тромбоцитарных агрегатов оценивали тромбоцитарную активность по показателям размера и уровня заполненности каналов микрофлюидного чипа агрегатами. Оценка производилась инвертированным оптическим микроскопом ЛОМО МИБ-2 (ООО «ЛОМО-МА», Рос-

сия) с помощью программы Rising View 4.11 (Китай, 2023). Использовали кровь лабораторных крыс самцов массой тела 370 ± 17 г, старше восемнадцати месяцев. Исследование одобрено Локальной Этической Комиссией (Протокол № 7/1 от 01.09.2023). Животные были из вивария Астраханского государственного университета имени В. Н. Татищева, которые содержались и выводились из эксперимента в соответствии «Положением о содержании и использовании лабораторных животных в ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России и рекомендациями «Commission of the European Communities, 86/609/ЕЕС».

Забор крови в количестве 2–4 мл осуществлялся из хвостовой вены крыс в вакуумную пробирку, содержащую цитрат натрия 3,2%.

Не позднее 5 мин. после аспирации в пробирку кровь под давлением, равным капиллярному, помещали в один из двух входов в микроканал чипа, соответствующий по размеру Luer-lock по направлению в общий канал, где осуществляется смешивание и далее направляется по каналам меньшего диаметра. Одновременно с плазмой в другой вход подавался раствор Na_2S (0,2 мг/1 мл), АЦЦ (0,1 мг/1 мл) (Флуимуцил, Zambon, Италия) или смесь Na_2S + АЦЦ (1:1). Рекальцификация происходила внутри чипа путем смешения с хлоридом кальция (0,2 М) и флюоресцентной меткой. Каждый чип использовался однократно.

Процесс печати микрофлюидного чипа — модификация существующих методик [6, 7], но адаптирован нами с учётом экономической доступности компонентов производственного процесса. Для печати использован LCD принтер Anycubic Photon Mono 4k (Китай). Прозрачная смола, плотностью 1,05–1,25 г/см³ и прочностью на разрыв 35–55 МПа (Anycubic ABS-like, Китай), заливалась в ванночку с прозрачным тефлоновым дном. Экран, расположенный под ним, засвечивал топографически необходимые области моделируемого чипа. По мере отверждения смолы в потоке ультрафиолетового света (с длиной волны полимери-

зации 365–405 нм) печатная платформа поднимается и опускается за вычетом высоты заданного слоя. После печати модели чипов промывались в изопропиловом спирте, продувались сжатым воздухом и дополнительно подвергались воздействию ультрафиолетового света тридцать секунд. Для большей прозрачности поверхность чипа покрывалась акриловым спреем. Среднее время печати составляло девяносто минут. На чип смоделировали основной канал (диаметром 100 мкм), который разделялся на четыре периферических (диаметром по 200 мкм) с адсорбированным индуктором агрегации тромбоцитов

ристомицином (0,1 мл) (фирмы Технология-стандарт, Россия) с помощью программы Blender.

Результаты

В результате визуального анализа микрофлюидных систем произведено исследование реакции тромбоцитов в условиях воздействия сульфидного раствора и АЦЦ на индукторе агрегации ристомicine. На рисунке представлены результаты микроскопической визуализации формирования агрегатов тромбоцитов в каналах микрожидкостных систем (рис. 1а–в).

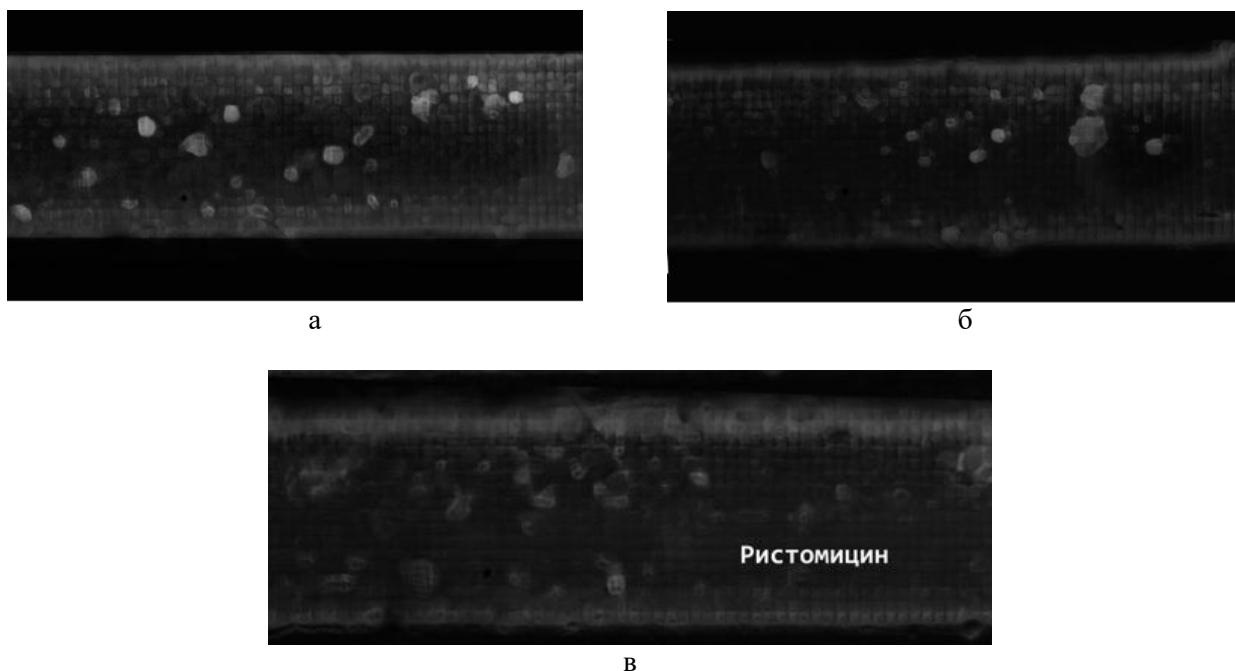


Рис. 1. Взаимодействие плазмы и стимулятора агрегации ристомицин, $\times 200$. Окрашивание акридиновым оранжевым.

Примечания: а — контроль, б — взаимодействие плазмы с раствором АЦЦ, в — взаимодействие плазмы с растворами Na_2S + АЦЦ.

В каналах с контрольной плазмой (богатой тромбоцитами) формировались крупные агрегаты округлой формы. Заполнение просвета каналов составляло 23% ($p \leq 0,05$). Средний размер агрегатов соответствовал 37,42 [30,44; 41,74] мкм (рис. 1а). При взаимодействии плазмы и АЦЦ (0,1 мг/мл) определялась схожая с

контролем картина. Образование агрегатов происходило в просвете каналов, с заполнением просвета на 31% ($p \leq 0,05$) и средним размером 27,73 [21,82; 32,46] мкм. Отмечались разнообразные по форме агрегаты, с «рваными» краями, преимущественно пристеночной локализации (рис. 1б).

В каналах, где моделировалось взаимодействие Na_2S с плазмой крови, показано, что агрегаты формировались только на концах каналов и на статистически незначимом уровне. Очевиден гипоагрегационный эффект сульфидного донора в рамках исследования (0,2 мг/1 мл).

При анализе состояния тромбоцитов в каналах чипов, после взаимодействия плазмы с Na_2S + АЦЦ (1:1), отмечено, что заполненность просвета канала 16% ($p \leq 0,05$), и размеры агрегатов 16,71 [21,82; 32,46] мкм (рис. 1в).

Применённая нами DLP технология для изготовления микрожидкостных чипов показала высокий процент качественных чипов (76%) при условии диаметра каналов до 100 мкм. При превышении размерности каналов свыше 300 мкм, количество репродуцированных чипов достигало 90%.

Обсуждение

Немаловажную роль в модуляции поведения тромбоцитов в микроканалах играет материал, из которого изготовлен чип. Смола, использованная нами при создании чипов, способствует оптимальному распределению напряжения, действующего на адгезированные пластинки крови [19]. Устройства, к примеру, из полидиметилсилоксана и полиакриламидного гидрогеля более жёсткие в этом отношении. Кроме того, данные полимерные материалы крайне вариативны по своим физическим характеристикам в различных партиях, обладают высокой пористостью, гидрофобностью и требуют длительной обработки. Термопластичные полимеры, включая полиметилметакрилат и полимеры циклических олефинов, обладают некоторыми привлекательными свойствами для использования в микрофлюидных исследованиях, но только с позиции оптимальной среды для форменных элементов. Для их изготовления требуется сложная техника литья под давлением. Для придания необходимых геометрических параметров каналов чипов необходимо приме-

нить фрезерование под цифровым программным управлением [5].

Наибольшей простотой для создания микрофлюидных устройств отличается технология 3D-печати. В качестве материалов в подобной технике используют меркаптоэфирную смолу, диакрилат полиэтиленгликоля, силикон-полиэфиракрилат, в том числе фотоактивную смолу на основе акрилата. Оптически прозрачные стереолитографические смолы имеют низкие значения контактного угла с точки зрения смачиваемости и шероховатости. Используемая смола из данной категории на LCD принтере с высокой степенью позволяет воспроизводить каналы диаметром 120–300 мкм, что соответствует размерам мелких артерий преартериолярного звена. При этом не требуют многостадийного процесса, как при изготовлении из полидиметилсилоксана. Структура чипа позволяет исследовать и различать процессы агрегации пластинок крови с помощью доступных реагентов: АДФ, ристоцетина и коллагена, причём одновременно и в одном образце крови. Системы *in vitro* обеспечивают исключительный контроль над представленными лигандами, жёсткостью субстрата, идентичностью и концентрациями биохимических агонистов [1, 20].

Вариантом исполнения микрофлюидного устройства является покрытие внутриканальной среды слоем эндотелиальных клеток [21]. Однако, данная техника достаточно трудоёмка, так как требует производства и хранения клеточных культур, а также учёта межвидовой биосовместимости. Поэтому, в долгосрочной перспективе в условиях специализированных лабораторий подобные исследования в высокой степени актуальны.

Применение микрожидкостных чипов информативно с целью изучения поведения отдельных клеток крови. Важное диагностическое значение в отношении функционирования системы гемостаза имеют тромбоциты. Весомый объём протеомных данных в сочетании с такими стратегиями, как метаболомика, транскриптомика и биоинформатика позволит

расширить представления о сигнальных путях, лежащих в основе патофизиологических механизмов активации тромбоцитов, что позволит развиваться таргетной медицине [2]. Оценка вариабельности протеома у здоровых субъектов и пациентов увеличит возможности персонализированной медицины.

Для изучения на микрофлюидных устройствах тромбоциты отделяют от других клеток крови, например, центрифугированием [22]. Подобное фракционирование от других форменных элементов нивелирует клеточную аутофлуоресценцию и обеспечивает более чёткую визуализацию. Для исследований можно применять отмытые тромбоциты, плазму, обогащённую тромбоцитами, и цельную кровь. Различные сочетания концепций субстрата с прокоагулянтами в микрофлюидных системах позволяют изучать функцию тромбоцитов и роль напряжения сдвига одновременно, используя небольшое количество крови. Для всестороннего определения вклада агрегации в процесс гемостаза образец крови необходимо рекальцифицировать для исключения действия антиагреганта [23, 24].

Тромбоциты реагируют с экзогенными факторами посредством конформационных изменений мембранных белков. Каждый из упомянутых материалов обладает своими особенностями по отношению к способу активации тромбоцитов. Так, на чипах из полидиметилсилоксана и стереолитографической смолы тромбоциты при адгезии мобилизуют маркёр CD62P (P-селектин), инициируя процесс активации, что может иметь значение для изучения поведения тромбоцитов при различных заболеваниях [23].

Изменение геометрии каналов микрожидкостных чипов помогает расширить вариативность патологических условий. В нашем случае, угол ответвления дочерних от основного канала составляет 45° , что предотвращает турбулентность потока. Перспективным направлением проектирования микрофлюидных чипов являются модели стенолитических сосудов [25, 26]. В

настоящее время единственным широко используемым в клинике устройством, учитывающим элемент напряжения сдвига для оценки функции тромбоцитов является анализатор функции тромбоцитов PFA-100 и PFA-200, который оценивает время до закупорки картриджей с коллагеновым или адреналиновым покрытием и образцом цитратной цельной крови [24]. Тем не менее, показатели времени до окклюзии чрезвычайно разнообразны не только среди лиц с патологией, но и у здоровых субъектов. На время образования агрегатов оказывает значение низкий гематокрит и общее количество тромбоцитов. С точки зрения специфики тромбообразования в каждом конкретном случае подобный глобальный тест тромбоактивности нуждается в ряде дополнительных лабораторных анализов: гемостазиограмме, лейкоцитарной формуле, общем анализе крови [25, 28].

Микрофлюидные платформы позволяют моделировать взаимодействие клетка-патоген в точно заданных, близких к физиологическим условиям, с учётом нескольких интересных параметров.

Исследования в области воздействия такого патогена, как сероводород, говорят о его значительном влиянии на состояние форменных элементов крови. Причём, характер его плейотропного воздействия зависит от его концентрации. Так, профиль сероводородного влияния начинается от физиологического противовоспалительного, цитопротекторного и антиапоптотического и заканчивается патологическим в отношении внутриклеточного дыхания [25, 29].

Что касается влияния сероводорода на пластинки крови, имеются данные, говорящие, как об увеличении агрегационного потенциала тромбоцитов [9, 12], так и об уменьшении [27, 30–32].

Воздействие сероводорода на тромбоциты возможно смоделировать на основе его метаболического предшественника ацетилцистеина. Так, NaHS — донатор сероводорода, который аналогично препарату N-ацетилцистеину повышает чувстви-

тельность тромбоцитов к эндотелиальному оксиду азота, реализуя гипоагрегационный эффект [29]. Однако, гипоагрегационный эффект *in vitro* и *in vivo* донора сероводорода и ацетилцистеина неравнозначен и зависит от влияния оксида азота у пациентов с ишемией миокарда.

В литературе встречается упоминание о влиянии ацетилцистеина на гипofункцию тромбоцитов в условиях экспериментального стеноза [30]. Однако, физиологический эффект препарата и в данном случае зависел от синергизма с оксидом азота.

Известно, что добавление ацетилцистеина в концентраты тромбоцитов *ex vivo* оказывает защитную роль в отношении их целостности и способствует увеличению сроков хранения [31].

Дисульфидные группы поверхностных белков тромбоцитов достаточно реакциогенны [32]. Наше исследование позволяет предположить, что активация мембранных белков тромбоцитов осуществляется не только за счёт *s*-нитрозилирования и карбонилирования, но и за счёт тиоловых (SH-) групп. В условиях динамичного кон-

курентного воздействия сульфидных групп АЦЦ и сероводорода друг с другом, происходит взаимное подавляющее действие. АЦЦ буферизует сероводород, создавая эффект физиологического прекодиционирования и защищает от чрезмерной гипоагрегации тромбоциты.

Заключение

В рамках проведённого экспериментального исследования было выяснено, что сероводородный донор в приведённой высокой концентрации оказывает гипоагрегационный эффект на тромбоциты. Ацетилцистеин обладает прекодиционирующим эффектом на тромбоциты в присутствии сероводорода.

Наличие выбора материалов для производства микрофлюидных чипов позволяет реализовывать разнообразные исследовательские задачи. С учётом наибольшей экономической выгоды, простоты изготовления и принципа исследования наша адаптированная методика позволяет проводить диагностику функциональной активности тромбоцитов практически *in cito*.

Список источников

1. Hanke J., Ranke C., Perego E., et al. Human Blood Platelets Contract in Perpendicular Direction to Shear Flow // *Soft Matter*. 2019. Vol. 15, No. 9. P. 2009–2019. doi: [10.1039/c8sm02136h](https://doi.org/10.1039/c8sm02136h)
2. Gianazza E., Brioschi M., Baetta R., et al. Platelets in Healthy and Disease States: From Biomarkers Discovery to Drug Targets Identification by Proteomics // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, No. 12. P. 4541. doi: [10.3390/ijms21124541](https://doi.org/10.3390/ijms21124541)
3. Potrich C., Frascella F., Bertana V., et al. Human Blood Platelets Adsorption on Polymeric Materials for Liquid Biopsy // *Sensors (Basel)*. 2022. Vol. 22, No. 13. P. 4788. doi: [10.3390/s22134788](https://doi.org/10.3390/s22134788)
4. Vulliamy P., Kornblith L.Z., Kutcher M.E., et al. Alterations in platelet behavior after major trauma: adaptive or maladaptive? // *Platelets*. 2021. Vol. 32, No. 3. P. 295–304. doi: [10.1080/09537104.2020.1718633](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1718633)
5. Платонов И.А., Платонов В.И., Аникина М.А., и др. Тренды в отечественном аналитическом приборостроении для определения газовых сред. В сб.: Инновации и «зелёные» технологии в газохимии и нефтепереработке. Всероссийский научно-практический семинар: сборник материалов и докладов; Самара, 22 декабря 2022 г. Самара; 2023. С. 72–78.
6. Лазарева Е.О., Евстапов А.А., Гареев К.Г., и др. Синтез микро- и наночастиц в микрофлюидных реакторах для биомедицинского применения // *Российский журнал персонализированной медицины*. 2021. Т. 1, № 1. С. 207–236.
7. Тризно Е.В., Тризно М.Н. Микрожидкостные системы в оценке агрегационного гемостаза. В сб.: *Forum of Antithrombotic Therapy (FACT bridge-2023): сборник тезисов*; Москва, 7–8 сентября 2023 г. М.; 2023. С. 8.
8. Тусупкалиев Б.Т., Жумалина А.К., Тусупкалиев А.Б., и др. Особенности адаптации новорожденных, родившихся от матерей проживающих в нефтегазоносном регионе // *West Kazakhstan Medical Journal*. 2021. Т. 63, № 2. С. 90–96. doi: [10.24412/2707-6180-2021-63-90-96](https://doi.org/10.24412/2707-6180-2021-63-90-96)
9. Saadat M., Bahaoddini A. Hematological changes due to chronic exposure to natural gas leakage in polluted areas of Masjid-i-Sulaiman (Khozestan province, Iran) // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004. Vol. 58, No. 2. P. 273–276. doi: [10.1016/j.ecoenv.2003.07.005](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.07.005)

10. Seydi E., Irandoost Z., Khansari M.G., et al. Toxicity of Hydrogen Sulfide on Rat Brain Neurons // *Drug Res. (Stuttg)*. 2022. Vol. 72, No. 4. P. 197–202. doi: [10.1055/a-1750-8870](https://doi.org/10.1055/a-1750-8870)
11. Голубкина Е.В., Тризно М.Н., Дюкарева О.С., и др. Эволюция представлений о значении сероводорода в формировании возрастзависимой патологии // *Вестник РАЕН*. 2021. Т. 21, № 4. С. 89–98. doi: [10.52531/1682-1696-2021-21-4-89-98](https://doi.org/10.52531/1682-1696-2021-21-4-89-98)
12. Тихомирова И.А., Муравьев А.В., Петроченко Е.П., и др. Влияние доноров оксида азота и сероводорода на показатели свёртывания крови // *Тромбоз, гемостаз, реология*. 2022. № 1. С. 45–52. doi: [10.25555/THR.2022.1.1008](https://doi.org/10.25555/THR.2022.1.1008)
13. Messerer D.A.C., Gaessler H., Hoffmann A., et al. The H₂S Donor Sodium Thiosulfate (Na₂S) Does Not Improve Inflammation and Organ Damage After Hemorrhagic Shock in Cardiovascular Healthy Swine // *Front. Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 901005. doi: [10.3389/fimmu.2022.901005](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901005)
14. Муфтахов М.В., Щукин П.В. Резонансный захват электронов молекулами цистеина и N-ацетилцистеина // *Журнал физической химии*. 2020. Т. 94, № 1. С. 89–97. doi: [10.31857/S0044453720010240](https://doi.org/10.31857/S0044453720010240)
15. Красильникова В.Л., Мармыш В.Г. Ацетилцистеин: биологическая активность и потенциальные терапевтические возможности применения в клинике // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2021. Т. 19, № 6. С. 577–586. doi: [10.25298/2221-8785-2021-19-6-577-586](https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-6-577-586)
16. Репина Э.Ф., Каримов Д.О. Новое соединение с ацетилцистеином как антигипоксикант // *Науко-сфера*. 2022. № 1 (2). С. 48–51. Доступно по: <https://disk.yandex.ru/d/13Y1fhu7syxrTA>. Ссылка активна на 15.03.2023.
17. Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., и др. Исследование защитного действия N-ацетилцистеина при поражениях сернистым ипритом с учетом результатов биомониторинга // *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019. Т. 21, № 1. С. 145–154.
18. Мойсеёнок А.Г., Хованская Г.Н., Гуринович В.А., и др. Системный дефицит глутатиона в развитии COVID-19 и постковидного синдрома // *Рецепт*. 2022. Т. 25, № 4. С. 511–515. doi: [10.34883/PI.2022.25.4.017](https://doi.org/10.34883/PI.2022.25.4.017)
19. Zhang C., Neelamegham S. Application of microfluidic devices in studies of thrombosis and hemostasis // *Platelets*. 2017. Vol. 28, No. 5. P. 434–440. doi: [10.1080/09537104.2017.1319047](https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1319047)
20. Dupuy A., Hagimola L., Mgaith N.S.A., et al. Thromboinflammation Model-on-A-Chip by Whole Blood Microfluidics on Fixed Human Endothelium // *Diagnostics (Basel)*. 2021. Vol. 11, No. 2. P. 203. doi: [10.3390/diagnostics11020203](https://doi.org/10.3390/diagnostics11020203)
21. Семелев В.Н., Тыренко В.В., Никитин В.Ю., и др. Определение количества гликопротеиновых рецепторов ПВ/PIA и экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии у больных острым миелоидным лейкозом // *Гены и Клетки*. 2016. Т. 11, № 3. С. 140–143.
22. Oshinowo O., Lambert T., Sakurai Y., et al. Getting a good view: *in vitro* imaging of platelets under flow // *Platelets*. 2020. Vol. 31, No. 5. P. 570–579. doi: [10.1080/09537104.2020.1732320](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1732320)
23. Montague S.J., Lim Y.J., Lee W.M., et al. Imaging Platelet Processes and Function-Current and Emerging Approaches for Imaging *in vitro* and *in vivo* // *Front. Immunol*. 2020. Vol. 11. P. 78. doi: [10.3389/fimmu.2020.00078](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00078)
24. Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults // *Br. J. Haematol*. 2005. Vol. 130, No. 1. P. 3–10. doi: [10.1111/j.1365-2141.2005.05511.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05511.x)
25. Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe? // *Chem. Biol. Interact*. 2014. Vol. 217. P. 49–56. doi: [10.1016/j.cbi.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.04.006)
26. Kolluru G.K., Shackelford R.E., Shen X., et al. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease // *Nat. Rev. Cardiol*. 2023. Vol. 20, No. 2. P. 109–125. doi: [10.1038/s41569-022-00741-6](https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6)
27. Gojon G. On H₂S Prodrugs // *Antioxid. Redox Signal*. 2020. Vol. 33, No. 14. P. 999–1002. doi: [10.1089/ars.2020.8078](https://doi.org/10.1089/ars.2020.8078)
28. Powell C.R., Dillon K.M., Matson J.B. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications // *Biochem. Pharmacol*. 2018. Vol. 149. P. 110–123. doi: [10.1016/j.bcp.2017.11.014](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014)
29. Imam H., Nguyen T.H., Stafford I., et al. Impairment of platelet NO signalling in coronary artery spasm: role of hydrogen sulphide // *Br. J. Pharmacol*. 2021. Vol. 178, No. 7. P. 1639–1650. doi: [10.1111/bph.15388](https://doi.org/10.1111/bph.15388)
30. Folts J.D., Stamler J., Loscalzo J. Intravenous nitroglycerin infusion inhibits cyclic blood flow responses caused by periodic platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries // *Circulation*. 1991. Vol. 83, No. 6. P. 2122–2127. doi: [10.1161/01.cir.83.6.2122](https://doi.org/10.1161/01.cir.83.6.2122)
31. Handigund M., Kim J.T., Bae T.W., et al. N-acetylcysteine reduce the stress induced by cold storage of platelets: A potential way to extend shelf life of platelets // *Transfus. Apher. Sci*. 2021. Vol. 60, No. 2. P. 103039. doi: [10.1016/j.transci.2020.103039](https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.103039)
32. Pijning A.E., Butera D., Hogg P.J. Not one, but many forms of thrombosis proteins // *J. Thromb. Haemost*. 2022. Vol. 20, No. 2. P. 285–292. doi: [10.1111/jth.15567](https://doi.org/10.1111/jth.15567)

References

1. Hanke J, Ranke C, Perego E, et al. Human Blood Platelets Contract in Perpendicular Direction to Shear Flow. *Soft Matter*. 2019;15(9):2009–19. doi: [10.1039/c8sm02136h](https://doi.org/10.1039/c8sm02136h)
2. Gianazza E, Brioschi M, Baetta R, et al. Platelets in Healthy and Disease States: From Biomarkers Discovery to Drug Targets Identification by Proteomics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4541. doi: [10.3390/ijms21124541](https://doi.org/10.3390/ijms21124541)
3. Potrich C, Frascella F, Bertana V, et al. Human Blood Platelets Adsorption on Polymeric Materials for Liquid Biopsy. *Sensors (Basel)*. 2022;22(13):4788. doi: [10.3390/s22134788](https://doi.org/10.3390/s22134788)
4. Vulliamy P, Kornblith LZ, Kutcher ME, et al. Alterations in platelet behavior after major trauma: adaptive or maladaptive? *Platelets*. 2021;32(3):295–304. doi: [10.1080/09537104.2020.1718633](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1718633)
5. Platonov IA, Platonov VI, Anikina MA, et al. Trends in domestic analytical instrument for determination of gas mediums. In: *Innovatsii i «zelënyye» tekhnologii v gazokhimi i neftepererabotke. Vserossiyskiy nauchno-prakticheskiy seminar: sbornik materialov i dokladov; Samara, 22 December 2022*. Samara; 2023. P. 72–8. (In Russ).
6. Lazareva EO, Evstrapov AA, Gareev KG, et al. Synthesis of micro- and nanoparticles in microfluidic reactors for biomedical applications. *Russian Journal for Personalized Medicine*. 2021;1(1):207–36. (In Russ).
7. Trizno EV, Trizno MN. Mikrozhidkostnyye sistemy v otsenke agregatsionnogo gemostaza. In: *Forum of Antithrombotic Therapy (FACT bridge-2023): sbornik tezisov; Moscow, 7–8 September 2023*. Moscow; 2023. P. 8. (In Russ).
8. Tusupkaliyev B, Zhumalina AK, Tusupkaliyev AB, et al. Features of newborns adaptation born from mothers living in the oil and gas region. *West Kazakhstan Medical Journal*. 2021;63(2):90–6. (In Russ). doi: [10.24412/2707-6180-2021-63-90-96](https://doi.org/10.24412/2707-6180-2021-63-90-96)
9. Saadat M, Bahaoddini A. Hematological changes due to chronic exposure to natural gas leakage in polluted areas of Masjid-i-Sulaiman (Khozestan province, Iran). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;58(2):273–6. doi: [10.1016/j.ecoenv.2003.07.005](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.07.005)
10. Seydi E, Irandoost Z, Khansari MG, et al. Toxicity of Hydrogen Sulfide on Rat Brain Neurons. *Drug Res (Stuttg)*. 2022;72(4):197–202. doi: [10.1055/a-1750-8870](https://doi.org/10.1055/a-1750-8870)
11. Golubkina EV, Trizno MN, Dyukareva OS, et al. Evolution of concepts about the importance of hydrogen sulfide in the formation of an age-dependent pathology. *Bulletin of the Russian Academy of Natural Sciences*. 2021;21(4):89–98. (In Russ). doi: [10.52531/1682-1696-2021-21-4-89-98](https://doi.org/10.52531/1682-1696-2021-21-4-89-98)
12. Tikhomirova IA, Murav'yov AV, Petrochenko EP, et al. Effect of nitric oxide and hydrogen sulfide donors on blood clotting parameters. *Tromboz, Gemostaz i Reologiya*. 2022;(1):45–52. (In Russ). doi: [10.25555/THR.2022.1.1008](https://doi.org/10.25555/THR.2022.1.1008)
13. Messerer DAC, Gaessler H, Hoffmann A, et al. The H₂S Donor Sodium Thiosulfate (Na₂S) Does Not Improve Inflammation and Organ Damage After Hemorrhagic Shock in Cardiovascular Healthy Swine. *Front Immunol*. 2022;13:901005. doi: [10.3389/fimmu.2022.901005](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901005)
14. Muftakhov MV, Shchukin PV. Rezonansnyy zakhvat elektronov molekulami tsisteina i N-atsetil-tsisteina. *Zhurnal Fizicheskoy Khimii*. 2020;94(1):89–97. (In Russ). doi: [10.31857/S0044453720010240](https://doi.org/10.31857/S0044453720010240)
15. Krasilnikova VL, Marmysh VG. Acetylcysteine: biological activity and potential clinical applications. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2021;19(6):577–86. (In Russ). doi: [10.25298/2221-8785-2021-19-6-577-586](https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-6-577-586)
16. Repina EF, Karimov DO. New compound with acetylcysteine as an antihypoxant. *Naukosfera*. 2022;(1):48–51. Available at: <https://disk.yandex.ru/d/13Y1fhu7syxrtA>. Accessed: 2023 March 15. (In Russ).
17. Orlova OI, Savelyeva EI, Karakashev GV, et al. The study of the protective action of n-acetylcystein in damages to sulfur mustard gas taking into account the results of biomonitoring. *Medicine of Extreme Situations*. 2019;21(1):145–54. (In Russ).
18. Moiseenok A, Khovanskaya G, Gurinovich V, et al. Systemic Glutathione Deficiency in the Development of COVID-19 and Post-COVID-19 Syndrome. *Recipe*. 2022;25(4): 511–5. (In Russ). doi: [10.34883/PI.2022.25.4.017](https://doi.org/10.34883/PI.2022.25.4.017)
19. Zhang C, Neelamegham S. Application of microfluidic devices in studies of thrombosis and hemostasis. *Platelets*. 2017;28(5):434–40. doi: [10.1080/09537104.2017.1319047](https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1319047)
20. Dupuy A, Hagimola L, Mgaïeth NSA, et al. Thromboinflammation Model-on-A-Chip by Whole Blood Microfluidics on Fixed Human Endothelium. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(2):203. doi: [10.3390/diagnostics11020203](https://doi.org/10.3390/diagnostics11020203)
21. Semelev VN, Tyrenko VV, Nikitin VYu, et al. Determining the number of IIb/IIIa glycoprotein receptors and expression of P-selectin on the surface of platelets using flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia. *Genes & Cells*. 2016;11(3):140–3. (In Russ).
22. Oshinowo O, Lambert T, Sakurai Y, et al. Getting a good view: *in vitro* imaging of platelets under flow. *Platelets*. 2020;31(5):570–9. doi: [10.1080/09537104.2020.1732320](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1732320)
23. Montague SJ, Lim YJ, Lee WM, et al. Imaging Platelet Processes and Function—Current and Emerging Approaches for Imaging *in vitro* and *in vivo*. *Front Immunol*. 2020;11:78. doi: [10.3389/fimmu.2020.00078](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00078)

24. Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol.* 2005; 130(1):3–10. doi: [10.1111/j.1365-2141.2005.05511.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05511.x)
25. Olas B. Hydrogen sulfide in hemostasis: friend or foe? *Chem Biol Interact.* 2014;217:49–56. doi: [10.1016/j.cbi.2014.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.04.006)
26. Kolluru GK, Shackelford RE, Shen X, et al. Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(2):109–25. doi: [10.1038/s41569-022-00741-6](https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6)
27. Gojon G. On H₂S Prodrugs. *Antioxid Redox Signal.* 2020;33(14):999–1002. doi: [10.1089/ars.2020.8078](https://doi.org/10.1089/ars.2020.8078)
28. Powell CR, Dillon KM, Matson JB. A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol.* 2018;149:110–23. doi: [10.1016/j.bcp.2017.11.014](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014)
29. Imam H, Nguyen TH, Stafford I, et al. Impairment of platelet NO signalling in coronary artery spasm: role of hydrogen sulphide. *Br J Pharmacol.* 2021;178(7):1639–50. doi: [10.1111/bph.15388](https://doi.org/10.1111/bph.15388)
30. Folts JD, Stamler J, Loscalzo J. Intravenous nitroglycerin infusion inhibits cyclic blood flow responses caused by periodic platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. *Circulation.* 1991;83(6):2122–7. doi: [10.1161/01.cir.83.6.2122](https://doi.org/10.1161/01.cir.83.6.2122)
31. Handigund M, Kim JT, Bae TW, et al. N-acetylcysteine reduce the stress induced by cold storage of platelets: A potential way to extend shelf life of platelets. *Transfus Apher Sci.* 2021; 60(2):103039. doi: [10.1016/j.transci.2020.103039](https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.103039)
32. Pijning AE, Butera D, Hogg PJ. Not one, but many forms of thrombosis proteins. *J Thromb Haemost.* 2022;20(2):285–92. doi: [10.1111/jth.15567](https://doi.org/10.1111/jth.15567)

Дополнительная информация

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Этика. Исследование выполнено в соответствии с международными принципами экспериментальной этики.

Информация об авторе:

Тризно Матвей Николаевич — канд. мед. наук, доцент кафедры анатомии, SPIN: 7602-9668, <https://orcid.org/0000-0001-8704-6594>, e-mail: pakotm@yandex.ru

Тризно Екатерина Валерьевна — канд. мед. наук, доцент кафедры патологической физиологии, SPIN: 1777-3336, <https://orcid.org/0000-0001-6328-3317>, e-mail: neiron-2010@mail.ru

Мажитова Марина Владимировна — д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой фундаментальной химии, SPIN: 7386-9674, <https://orcid.org/0000-0002-1822-6652>, e-mail: marinamazhitova@yandex.ru

Абакаров Ахмед Магомедович — студент 4 курса педиатрического факультета, SPIN: 3767-0112, e-mail: dag_gangsta@mail.ru

Кривоносова Екатерина Игоревна — студент 4 курса лечебного факультета, SPIN: 6186-0645, <https://orcid.org/0009-0006-3535-285X>, e-mail: bunny.nice@mail.ru

Вклад авторов:

Тризно М. Н. — анализ первоисточников, техническая реализация проекта.
Тризно Е. В. — концепция и дизайн исследования, написание текста.
Мажитова М. В. — анализ результатов, редактирование.
Абакаров А. М. — помощь в постановке эксперимента.
Кривоносова Е. И. — подготовка списка литературы.
Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. The authors declare no funding for the study.

Ethics. The study was carried out in accordance with the international principles of experimental ethics.

Information about the authors:

Matvey N. Trizno — MD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Anatomy, SPIN: 7602-9668, <https://orcid.org/0000-0001-8704-6594>, e-mail: pakotm@yandex.ru

Ekaterina V. Trizno — MD, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of Pathological Physiology, SPIN: 1777-3336, <https://orcid.org/0000-0001-6328-3317>, e-mail: neiron-2010@mail.ru

Marina V. Mazhitova — Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Head of the Department of Fundamental Chemistry, SPIN: 7386-9674, <https://orcid.org/0000-0002-1822-6652>, e-mail: marinamazhitova@yandex.ru

Akhmed M. Abakarov — 4th-Year Student of the Pediatric Faculty, SPIN: 3767-0112, e-mail: dag_gangsta@mail.ru

Ekaterina I. Krivonosova — 4th-Year Student of the Faculty of Medicine, SPIN: 6186-0645, <https://orcid.org/0009-0006-3535-285X>, e-mail: bunny.nice@mail.ru

Contribution of the authors:

Trizno M. N. — analysis of primary sources, technical implementation of the project.
Trizno E. V. — concept and design of study, writing the text.
Mazhitova M. V. — analysis of the results, editing.
Abakarov A. M. — assistance in setting up the experiment.
Krivonosova E. I. — preparation of the list of references.
Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article all authors.

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