

Ex vivo наблюдение процесса тромбовоспаления у пациентов с
хронической сердечной недостаточностью

Ю.-Д.Д. Коробкина¹, С.В. Галкина^{1,2}, А.Е. Луговцов³, Н.А.Миронов⁴, Л.И.
Дячук⁴, Я.А. Орлова⁴, А.В. Приезжев³, А.Н. Свешникова^{1,2,5*}

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Москва, Россия

²НМИЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дм.
Рогачева, Москва, Россия

³Физический факультет, МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

⁴Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В.
Ломоносова, Москва, Россия

⁵Факультет фундаментальной физико-химической инженерии, МГУ
имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

Цель работы – определение активности нейтрофилов и тромбообразования в ex vivo модели тромбовоспаления у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) с одновременной оценкой микрореологии крови. **Материалы и методы исследования.** В исследовании участвовал 21 пациент МНОЦ МГУ с диагнозом ХСН и 8 здоровых добровольцев. Участникам исследования проводилось определение биохимического состава плазмы крови и оценка состояния форменных элементов крови. Оценка тромбовоспалительного процесса проводилась в цельной гепаринизированной крови с использованием плоско-параллельных проточных камер, покрытых коллагеном I типа, при сдвиговой скорости 100 1/с. Параметры деформируемости эритроцитов измерялись *in vitro* с помощью метода лазерной дифрактометрии. Агрегация эритроцитов определялась методом диффузного рассеяния света от образцов цельной крови. **Результаты исследования.** Для площадей тромба не было обнаружено статистических различий между здоровыми из группы контроля и пациентами с ХСН. Однако скорость нейтрофилов для пациентов с ХСН была значимо ниже, чем у

здоровых (0.11 ± 0.02 мкм/с для ХСН против 0.16 ± 0.04 мкм/с для здоровых контролей). Площади тромба для пациентов с ХСН на 5 и 10 минуте роста коррелировали с концентрацией эритроцитов и средним объемом эритроцита (MCV). Также с размерами тромба положительно коррелировали коэффициенты агрегации эритроцитов A1 и A2, характеризующие интенсивность процесса образования линейных и трехмерных агрегатов соответственно. Кроме того, MCV, индексы деформируемости эритроцитов и предел текучести для суспензии эритроцитов коррелировали со скоростями движения нейтрофилов. **Заключение.** Таким образом, хотя при ХСН не наблюдается значимого изменения тромбообразования, однако, можно говорить о снижении активности нейтрофилов, возможно, связанным с повышением вязкости крови.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, тромбообразование, тромбовоспаление, нейтрофилы, агрегация и деформируемость эритроцитов.

Ex vivo observation of the thromboinflammation process in patients with chronic heart failure

J.-D.D. Korobkin¹, S.V. Galkina^{1,2}, A.E. Lugovtsov³, N.A. Mironov⁴, L.I. Dyachuk⁴, Ya.A. Orlova⁴, A.V. Priezzhev³, A.N. Sveshnikova^{1,2,5*}

¹ Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russia

³ Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Medical Scientific and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Faculty of Fundamental Physical and Chemical Engineering, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Aim. Determination of neutrophil activity and thrombus formation in an *ex vivo* model of thromboinflammation in patients with chronic heart failure (CHF) with simultaneous assessment of blood microrheology. **Materials and Methods.** The study involved 21 patients of the Moscow State University Medical Center with a diagnosis of CHF and 8 healthy volunteers. The patients and volunteers underwent determination of the biochemical composition of blood plasma and assessment of the condition of the blood elements. The thromboinflammation was evaluated in whole heparinized blood using parallel-flat flow chambers coated with type I collagen at a shear rate of 100 1/s. The deformability parameters of erythrocytes were measured *in vitro* using the method of laser diffractometry. Erythrocyte aggregation was determined by diffuse light scattering from whole blood samples. **Results.** For thrombus areas, no statistical differences were found between healthy controls and patients with CHF. However, the neutrophil velocities for patients with CHF were significantly lower than for healthy controls (0.11 ± 0.02 $\mu\text{m/s}$ for CHF versus 0.16 ± 0.04 $\mu\text{m/s}$ for healthy controls). The thrombus areas for patients with CHF at 5 and 10 minutes of growth correlated with the concentration of red blood cells and the

average volume of red blood cells (MCV). Also, the aggregation coefficients of erythrocytes A1 and A2 characterizing the intensity of the process of formation of linear and three-dimensional aggregates positively correlated with thrombus area. In addition, MCV, erythrocyte deformability indices, and yield strength for erythrocyte suspension correlated with neutrophil movement velocities. **Conclusion.** Thus, although there is no significant change in thrombus formation in CHF, however, we can talk about a decrease in neutrophil activity, possibly associated with the increase in blood viscosity.

Keywords: chronic heart failure, thrombosis, thromboinflammation, neutrophils, erythrocyte aggregation and deformability

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются основной причиной смертности в мире/ Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является одним из наиболее часто встречающихся и тяжелых осложнений большинства ССЗ [1, 2]. Современные исследования показывают, что микрореологические параметры эритроцитов и тромбоцитов могут существенно влиять на развитие и прогрессирование ХСН [1, 2]. Микрореология крови оказывает значительное воздействие на микроциркуляцию, периферическое сосудистое сопротивление и кровообращение в целом [3] и играет важную роль в поддержании нормальной гемодинамики [4, 5].

Такие параметры, как вязкость крови [6], деформируемость эритроцитов [7], их размер [6] и концентрация в крови [8], напрямую влияют на формирование и рост тромба. Эритроциты осуществляют маргинализацию тромбоцитов к стенкам сосуда [9], способствуя тромбообразованию как путем увеличения концентрации тромбоцитов, так и путем их активации через механочувствительные процессы [7]. При нарушениях микрореологических свойств крови и повышении ее вязкости происходит замедление кровотока и снижение сдвиговых скоростей, что также приводит тромбообразованию [10].

Известно, что ХСН часто связывают с измененной активностью тромбоцитов [11] и повышенным тромбообразованием [12].

Показано, что чрезмерная активация врожденного иммунитета, в первую очередь активация нейтрофилов и моноцитов, также связана с прогрессией сердечной недостаточности [13]. Активированные нейтрофилы инициируют тромбообразование как по пути затравки для образования тромбоцитарного агрегата [14, 15], так и по контактному пути свертывания плазмы крови от богатых фосфатами внеклеточных ДНК-ловушек нейтрофилов [16, 17]; чрезмерная активация нейтрофилов может привести к нарушению гемостаза и прогрессированию тромботических осложнений при ХСН [18, 19]. Активность нейтрофилов может определяться их взаимодействием с тромбоцитами и эндотелием [16], а также микрореологическим окружением, например, взаимодействием с эритроцитами [15], что может также привести к повышенному тромбообразованию.

Цель работы – определение активности нейтрофилов и тромбообразования в *ex vivo* модели тромбовоспаления у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) с одновременной оценкой микрореологии крови.

Материалы и методы исследования

Следующие реагенты были использованы в данной работе: Annexin V-Alexa Fluor 647 (BioLegend, San Diego, CA), DiOC-6, HEPES, бычий сывороточный альбумин, Hoechst-33342, PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); фибриллярный коллаген I типа (Chrono-Log Corporation; Havertown; USA);

Сбор крови проводился по протоколу, одобренному этическим комитетом Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова (№ 5/23 от 16 октября 2023 года), и от всех доноров и пациентов были получены письменные информированные согласия. Кровь собирали у здоровых взрослых добровольцев ($n = 8$, мужчины и женщины в возрасте 45–61 лет) или у пациентов с ХСН ($n = 21$, возраст 42–86) в вакуумные пробирки Vacuette© с

гепарином лития (18 МЕ/мл крови) и ЭДТА. Эксперименты проводили в течение 3 ч после сбора крови.

Основываясь на ранее опубликованных работах [15, 20], исследования роста тромбов, взаимодействия нейтрофилов с тромбами и их активности производились при помощи флуоресцентной микроскопии путем прокачивания цельной крови, нагруженной красителями DiOC₃(6), Hoechst 33342 и Annexin V-Alexa Fluor 647, через проточные камеры, покрытые коллагеном I типа.

Плоско-параллельные проточные камеры были ранее описаны в работах [20, 21]. Использовались следующие параметры канала: 0.1×18×2 мм. Покровные стекла покрывали фибриллярным коллагеном типа I (0.2 мг/мл), разведенным в уксусной кислоте в течение 1 ч 30 мин при 37 °С. Далее стекла промывали дистиллированной водой и вставляли в проточные камеры. После добавления флуоресцентных реагентов (DiOC₆ (1 мкМ), Hoechst 33342 (2 мкг/мл) и AnnexinV-Alexa647 (10 мкг/мл)) кровь перфузировали через камеры со скоростью сдвига 100 с⁻¹. Рост тромба и перемещение лейкоцитов наблюдались в режиме эпифлуоресценции с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (объектив Apo TIRF 100x Oil DIC N2).

Программное обеспечение Nikon NIS-Elements использовалось для получения изображений с микроскопа; ImageJ (<http://imagej.net/ImageJ>) использовался для обработки изображений. Плагин Manual Tracking в ImageJ и программный пакет trackpy для Python 3.6 использовался для ручного отслеживания гранулоцитов.

Местоположение тромбов определялось с помощью программного пакета ilastik (<http://ilastik.org>). Площадь тромбоцитарных тромбов рассчитывалась как процент экрана, покрытого тромбами (рис. 1А – пример роста тромба на поле зрения).

Оценка микрореологических свойств эритроцитов, т.е. агрегационных и деформационных, проводилась по предложенной ранее методике [22] с использованием лазерного агрегометра/деформометра эритроцитов RheoScan

AnD-300 (RheoMedTekh, Южная Корея) [23], а также вискозиметр Lamy Rheology RM100 CP1000 (Lamy Rheology Instruments, Франция), приобретенный в рамках программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Вкратце, измерялись такие параметры, как A1, A2, которые характеризуют суммарный вклад линейных эритроцитарных агрегатов (A1) и трехмерных агрегатов (A2) в сигнал светорассеяния в прямом направлении на исследуемых образцах тонкого слоя цельной крови. Другими словами, параметр A1 характеризует степень выраженности (интенсивность процесса) образования линейных эритроцитарных агрегатов в цельной крови, а A2 – трехмерных агрегатов. Также измерялись параметры деформируемости эритроцитов: E3 – степень удлинения эритроцитов при сдвиговом напряжении в потоке 3 Па, и предел текучести – минимальное сдвиговое напряжение, необходимое для инициации удлинения эритроцитов, характеризующий механическую жёсткость мембраны эритроцитов.

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью программного кода, написанного на Python 3.6 (USA), и программного пакета GraphPad Prism. Количественные данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения. Статистическую значимость различий между двумя группами оценивали с помощью критерия Манна-Уитни. Корреляции показателей пациентов рассчитывались по критерию Спирмана. Различия между показателями в группах считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования

При помощи разработанного ранее метода наблюдения движения нейтрофилов вокруг растущего тромба (рис. 1а), нами был оценен статус тромбовоспаления у пациентов с ХСН. Для данной группы пациентов площади тромбов не отличались по сравнению со здоровыми контролями ни в одной рассмотренной временной точке (рис. 1б). Интересно, что для пациентов с ИМТ $< 30 \text{ кг/м}^2$, площади тромба на 300 секунде были в среднем ниже, чем для популяции с ожирением (ИМТ $\geq 30 \text{ кг/м}^2$) (рис. 1г).

При этом, скорость движения нейтрофила вокруг растущего тромба для пациентов с ХСН была значительно снижена по сравнению со здоровыми контролями (0.11 ± 0.02 мкм/с против 0.16 ± 0.04 мкм/с, рис. 1в). Интересно, что для единственного пациента в выборке с нормальным ИМТ, скорость движения нейтрофилов повышена (0.19 мкм/с), что может указывать на иную причину ХСН у пациента; поэтому данный пациент не участвовал в дальнейшем анализе.

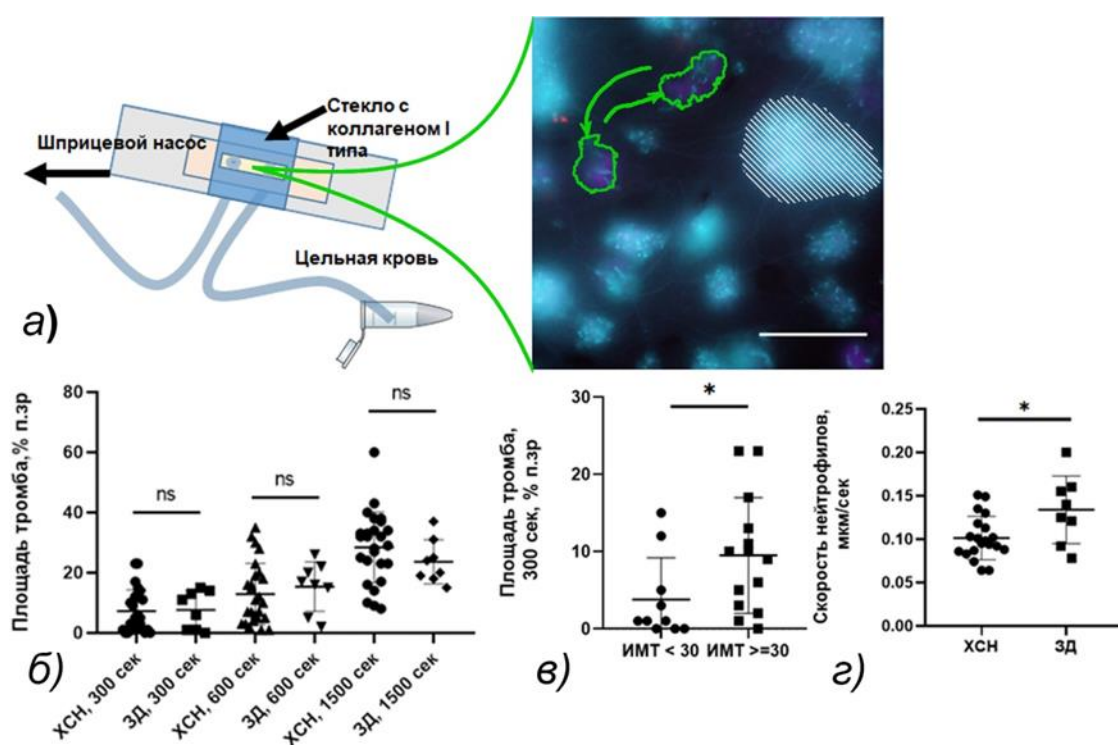


Рис. 1. Определение статуса тромбовоспаления у пациентов с ХСН. а) плоскопараллельная проточная камера и типичный поле зрения для здорового донора на 25й минуте эксперимента. Композитное изображение (бирюзовый - DiOC(6), фиолетовый - Hoechst 33342, красный - Annexin V-Alexa 647). Белой штриховкой отмечено расположение растущего тромба. Зеленым контуром обведены нейтрофилы. Зеленая линия соответствует траектории движения нейтрофила. Масштабный отрезок 25 мкм. (б) Площади тромба статистически значимо не отличались между пациентами с ХСН и здоровыми контролями на 300, 600 и 1500 секундах съемки. (в) Нейтрофилы пациентов с ХСН имеют

статистически значимо меньшую скорость движения, чем здоровые контроли.

(г) Пациенты с ИМТ ≥ 30 кг/м² демонстрируют повышенное тромбообразование на 300 секундах.

Fig. 1. Determination of the status of thromboinflammation in patients with CHF. a) parallel-plane flow chamber and a typical field of view for a healthy donor at the 25th minute of the experiment. Composite image (DiOC(6), Hoechst 33342, Annexin V-Alexa 647). The location of the growing blood clot is marked with white shading. Neutrophils are outlined in green. The green line corresponds to the trajectory of the neutrophil. Scale bar 25 μ m. (b) The thrombus area did not differ statistically significantly between patients with CHF and healthy controls at 300, 600 and 1500 seconds. (c) Neutrophils of patients with CHF have a statistically significantly lower movement velocity than healthy controls. (d) Patients with a BMI ≥ 30 show increased thrombosis at 300 seconds.

Далее для пациентов с ХСН мы проанализировали связь роста тромба с такими микрореологическими параметрами крови, как размер и концентрация эритроцитов, а также параметрами, характеризующими линейную и трехмерную агрегацию эритроцитов (A1 и A2, соответственно) (рис. 2). Было показано, что средний объем эритроцита (MCV) положительно коррелирует с площадями тромбов на 300 и 600 секундах ($r = 0.4$, $p < 0.05$ и $r = 0.5$, $p < 0.05$, соответственно). Это может объясняться вытеснением эритроцитами более мелких тромбоцитов к краям сосуда из-за гидродинамических эффектов, которое происходит эффективнее для более крупных эритроцитов. Также и для 300, и для 600 секунды, была обнаружена положительная корреляция для параметра A1 с площадями тромбов ($r = 0.4$, $p < 0.05$ и $r = 0.4$, $p < 0.05$), однако параметр A2, характеризующий линейную агрегацию эритроцитов, коррелировал с площадями тромбов только на 300 секунде ($r = 0.5$, $p < 0.01$ для 300 секунды против $r = 0.35$, $p = 0.08$ для 600 секунды), что может быть связано с характерными временами линейной и трехмерной агрегации.

Для площади тромба на 1500 секунде не было обнаружено связи с микрореологическими параметрами крови. При этом интересно, что площади тромба на 300 и 600 секунде коррелировали друг с другом ($r = 0.83$, $p < 0.0001$), однако для 1500 секунды корреляция не наблюдалась ни с 300, ни с 600 секундами ($r = 0.2$, $p = 0.3$ и $r = 0.2$, $p = 0.25$, соответственно). Вероятно, это связано с тем, что площадь тромба на 1500 секунде описывает уже насыщенную площадь тромба для данной постановки, а не динамику его роста. Единственным параметром, с которым коррелировала площадь тромба, было наличие терапии антагонистами минералокортикоидных рецепторов ($r = 0.4$, $p < 0.05$), что может говорить о повышении уровня альдостерона у данной группы пациентов [24].

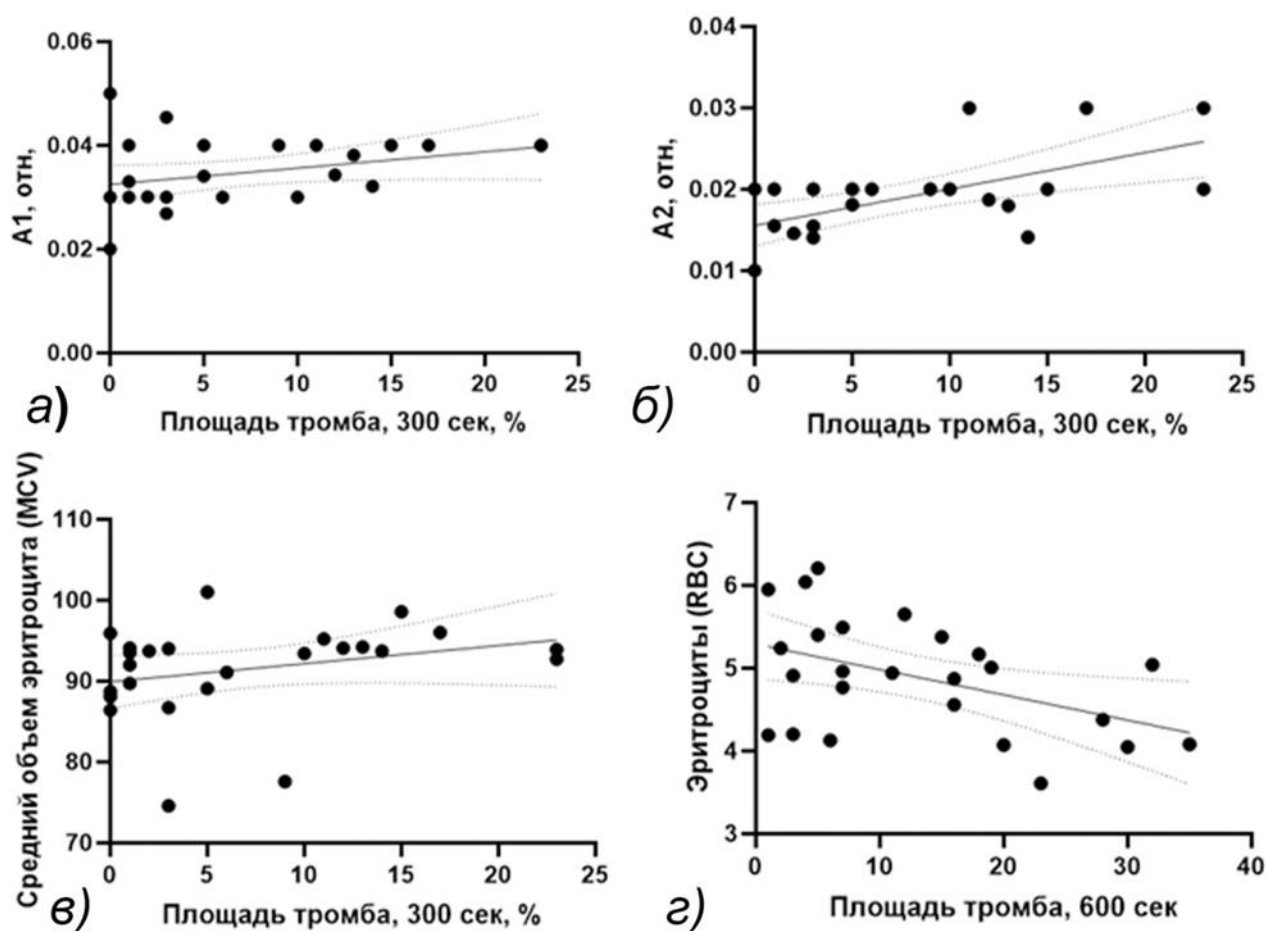


Рис. 2. Корреляция площади тромбов с микрореологическими параметрами крови. (а,б) Площадь тромбов на 300 секунде положительно коррелирует с параметром агрегации эритроцитов A1 (а, $r = 0.4$, $p < 0.05$) и A2 (б, $r = 0.5$, $p < 0.01$). (в) Площадь тромбов на 300 секунде положительно

коррелирует со средним объемом эритроцитов ($r = 0.4$, $p < 0.05$). (з) Концентрация эритроцитов отрицательно коррелирует с площадью тромба на 600 секунде. $r = 0.4$, $p < 0.05$. Представлена линейная интерполяция данных (сплошная линия) и 95% доверительные интервалы (пунктир).

Fig. 2. Correlation of the area of blood clots with microrheological parameters of blood. (a, b) The area of blood clots at 300 seconds positively correlates with the parameter of erythrocyte aggregation A1 (a, $r = 0.4$, $p < 0.05$) and A2 (b, $r = 0.5$, $p < 0.01$). (c) The area of blood clots at 300 seconds positively correlates with the average volume of red blood cells ($r = 0.4$, $p < 0.05$). (d) The concentration of erythrocytes negatively correlates with the area of the thrombus at 600 seconds. $r = 0.4$, $p < 0.05$. Linear data interpolation (solid line) and 95% confidence intervals (dotted line) are presented.

Также нами была проанализирована связь микрореологии крови с поведением нейтрофилов вокруг растущего тромба (рис. 3). Как и в случае площадью тромбов, скорость нейтрофилов коррелировала с параметрами, характеризующими способность эритроцитов образовывать агрегаты. При этом и для A1 ($r = -0.5$, $p < 0.05$), и для A2 ($r = -0.5$, $p < 0.05$), в отличие от площади тромбов, скорости движения нейтрофилов отрицательно коррелировали с данными параметрами, что, вероятно, связано с уменьшенным количеством столкновений эритроцитов с нейтрофилами при их агрегации в потоке на низких скоростях сдвига. Аналогичная ситуация (обратная зависимость) наблюдалась и со средним объемом эритроцита MCV ($r = -0.55$, $p < 0.01$) и шириной распределения эритроцитов RDW-SD ($r = -0.4$, $p < 0.03$).

Также измеренный индекс деформируемости при напряжениях 1-20 Па (E1-E20) отрицательно коррелировал со скоростями нейтрофилов в случае E1 ($r = -0.5$, $p < 0.05$), E2 ($r = -0.55$, $p < 0.01$), E3 ($r = -0.6$, $p < 0.01$, рис. 3а), E4 ($r = -0.55$, $p < 0.05$) и E5 ($r = -0.5$, $p < 0.05$), как и предел текучести для суспензии эритроцитов ($r = 0.5$, $p < 0.05$, рис. 3б) .

Интересно, что скорость нейтрофилов имела отрицательную линейную связь с таким клиническим параметром как функциональный класс ХСН по NYHA ($r = -0.45$, $p < 0.05$), что указывает на более заметное подавление нейтрофилов при более выраженной ХСН.

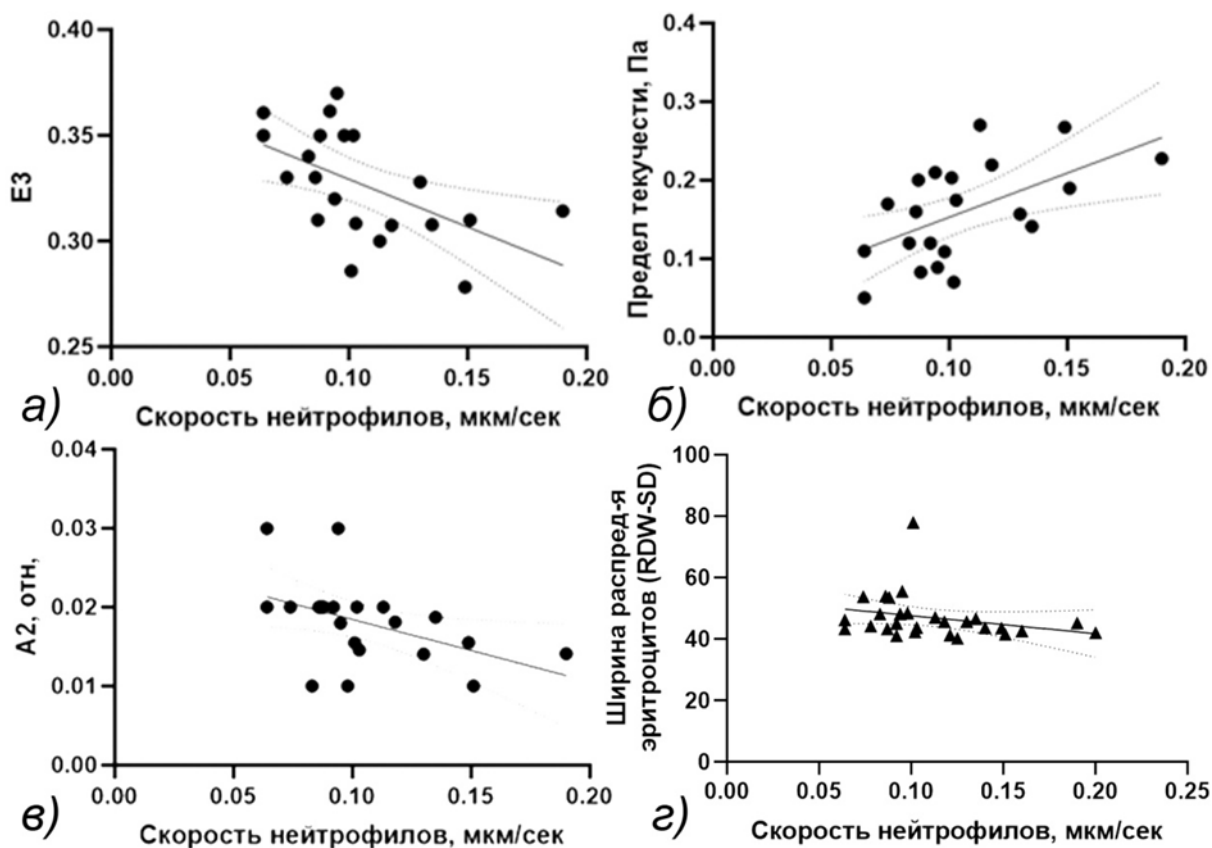


Рис. 3. Корреляция скорости движения нейтрофилов с микрореологическими параметрами крови у пациентов с ХСН. (а) Скорость движения нейтрофилов отрицательно коррелирует с параметром деформируемости эритроцитов ЕЗ. $r = -0.6$, $p < 0.01$, соответственно. (б) Скорость движения нейтрофилов положительно коррелирует с пределом текучести для суспензии эритроцитов. $r = 0.5$, $p < 0.05$. (в) Скорость движения нейтрофилов отрицательно коррелирует с параметрами агрегации нейтрофилов A_1 и A_2 для суспензии эритроцитов. $r = -0.5$, $p < 0.05$ и $r = -0.5$, $p < 0.05$, соответственно. (г) Отрицательная корреляция для скорости движения нейтрофилов и ширины распределения эритроцитов для обобщенных данных по пациентам и здоровым донорам. $r = -0.4$, $p < 0.03$. Представлена линейная интерполяция данных (сплошная линия) и 95% доверительные интервалы (пунктир).

Fig. 3. Correlation of neutrophil velocity with microrheological parameters of blood. (a) The velocity of neutrophils negatively correlates with the deformability

parameter of erythrocytes E1 and E3. $r = -0.5$, $p < 0.05$ and $r = -0.6$, $p < 0.01$, respectively. (b) The velocity of neutrophils is positively correlated with the yield strength for erythrocyte suspension. $r = 0.5$, $p < 0.05$. (c) The speed of neutrophil movement negatively correlates with the parameters of neutrophil aggregation A1 and A2 for erythrocyte suspension. $r = -0.5$, $p < 0.05$ and $r = -0.5$, $p < 0.05$, respectively. (d) Negative correlation for neutrophil velocity and RBW-SD. $R = -0.4$, $p < 0.03$. Linear data interpolation (solid line) and 95% confidence intervals (dotted line) are presented.

Обсуждение

В данной работе нами были проанализированы рост тромбов и активность нейтрофилов, адгезирующих к тромбу, у пациентов с ХСН. Было показано, что наблюдаемые параметры тромбовоспаления коррелируют с показателями микрореологии, что находится в согласии с предыдущими исследованиями, предполагающими, что деформируемость и агрегация эритроцитов могут играть решающую роль в тромбогенезе [4, 7], потенциально способствуя гиперкоагуляционным состояниям у пациентов с ХСН [5].

Сниженная скорость миграции нейтрофилов у пациентов с ХСН по сравнению с контрольной группой, отрицательно коррелирующая с функциональным классом ХСН, может указывать на нарушение функциональности иммунных клеток, вероятно, отражающее хроническое воспаление, связанное с сердечной недостаточностью [5]. Корреляция между движением нейтрофилов и деформируемостью эритроцитов дополнительно указывает на то, что аномальные свойства эритроцитов могут усугублять воспалительные реакции вблизи тромбов у пациентов с ХСН [2].

Интересно, что коэффициенты агрегации A1 и A2 положительно коррелировали со скоростью роста тромба, указывая на повышенную агрегацию эритроцитов как на потенциальный фактор развития тромба при ХСН. Эти результаты согласуются с более ранними исследованиями,

указывающими на то, что повышенная агрегация эритроцитов может усиливать образование тромбов [25].

В целом, это исследование находится в согласии с существующими данными о том, что изменения микрореологии крови могут играть значительную роль в образовании тромбов и иммунных реакциях у пациентов с ХСН [2].

Выводы

Таким образом мы показали, что хотя у пациентов с ХСН мы не выявили отклонений в тромбообразовании в сравнении со здоровыми добровольцами из группы контроля, нейтрофилы при ХСН находятся в подавленном состоянии, причем снижение активности нейтрофилов наиболее выражено при ожирении сопровождающем основное заболевание ($ИМТ > 30 \text{ кг/м}^2$). Впервые показано, что показатели тромбовоспаления – площади тромбов и подавление активности нейтрофилов – положительно коррелируют с изменениями микрореологии крови, а именно, показателями объема и агрегационной способности эритроцитов.

Соблюдение этических норм. Выполнение исследования одобрено локальным этическим комитетом МНОЦ МГУ имени М.В.Ломоносова (протокол № 5/23 от 16 октября 2023 года).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина». Цифровая медицина" (проект № 23-Ш06-03).

Список литературы

1. Miličić D, Jakuš N, Fabijanović D (2018) Microcirculation and Heart Failure. *Curr Pharm Des* 24:2954–2959.
<https://doi.org/10.2174/1381612824666180625143232>
2. Tikhomirova I, Petrochenko E, Muravyov A, Malysheva Y, Petrochenko A, Yakusevich V, Oslyakova A (2017) Microcirculation and blood rheology abnormalities in chronic heart failure. *Clin Hemorheol Microcirc* 65:383–391.
<https://doi.org/10.3233/CH-16206>
3. Del Buono MG, Montone RA, Camilli M, Carbone S, Narula J, Lavie CJ, Niccoli G, Crea F (2021) Coronary Microvascular Dysfunction Across the Spectrum of Cardiovascular Diseases. *J Am Coll Cardiol* 78:1352–1371.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.07.042>
4. Guizouarn H, Barshtein G (2022) Editorial: Red Blood Cell Vascular Adhesion and Deformability, Volume II. *Front Physiol* 13:849608.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.849608>
5. Mohaissen T, Proniewski B, Targosz-Korecka M, Bar A, Kij A, Bulat K, Wajda A, Blat A, Matyjaszyk-Gwarda K, Grosicki M, Tworzydło A, Sternak M, Wojnar-Lason K, Rodrigues-Diez R, Kubisiak A, Briones A, Marzec KM, Chlopicki S (2022) Temporal relationship between systemic endothelial dysfunction and alterations in erythrocyte function in a murine model of chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 118:2610–2624.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvab306>
6. Chang H-Y, Yazdani A, Li X, Douglas KAA, Mantzoros CS, Karniadakis GE (2018) Quantifying Platelet Margination in Diabetic Blood Flow. *Biophys J* 115:1371–1382. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.031>
7. Czaja B, Gutierrez M, Závodszy G, De Kanter D, Hoekstra A, Eniola-Adefeso O (2020) The influence of red blood cell deformability on hematocrit profiles and platelet margination. *PLOS Comput Biol* 16:e1007716.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007716>
8. Spann AP, Campbell JE, Fitzgibbon SR, Rodriguez A, Cap AP, Blackburne LH, Shaqfeh ESG (2016) The Effect of Hematocrit on Platelet Adhesion: Experiments and Simulations. *Biophys J* 111:577–588.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.024>
9. Oh D, Ii S, Takagi S (2022) Numerical Study of Particle Margination in a Square Channel Flow with Red Blood Cells. *Fluids* 7:96.
<https://doi.org/10.3390/fluids7030096>
10. Sloop GD, De Mast Q, Pop G, Weidman JJ, St. Cyr JA (2020) The Role of Blood Viscosity in Infectious Diseases. *Cureus*.
<https://doi.org/10.7759/cureus.7090>

11. Jafri SM, Ozawa T, Mammen E, Levine TB, Johnson C, Goldstein S (1993) Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur Heart J* 14:205–212. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.2.205>
12. Popovic B, Zannad F, Louis H, Clerc-Urmès I, Lakomy C, Gibot S, Denis CV, Lacolley P, Regnault V (2019) Endothelial-driven increase in plasma thrombin generation characterising a new hypercoagulable phenotype in acute heart failure. *Int J Cardiol* 274:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.130>
13. Antipenko S, Mayfield N, Jinno M, Gunzer M, Ismahil MA, Hamid T, Prabhu SD, Rokosh G (2024) Neutrophils are indispensable for adverse cardiac remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 189:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2024.02.005>
14. Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Panteleev MA (2024) Conditions for the implementation of the phenomenon of programmed death of neutrophils with the appearance of DNA extracellular traps during thrombus formation. *Pediatr Hematol Immunopathol* 23:211–218. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218>
15. Korobkin J-JD, Deordieva EA, Tesakov IP, Adamanskaya E-IA, Boldova AE, Boldyreva AA, Galkina SV, Lazutova DP, Martyanov AA, Pustovalov VA, Novichkova GA, Shcherbina A, Panteleev MA, Sveshnikova AN (2024) Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol* 22:115. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01912-2>
16. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM (2019) Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 133:906–918. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-882993>
17. Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Korobkina Yu-DD, Panteleev MA (2024) Intracellular signaling involved in the programmed neutrophil cell death leading to the release of extracellular DNA traps in thrombus formation. *Pediatr Hematol Immunopathol* 23:222–230. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230>
18. Tracchi I, Ghigliotti G, Mura M, Garibaldi S, Spallarossa P, Barisione C, Boasi V, Brunelli M, Corsiglia L, Barsotti A, Brunelli C (2009) Increased neutrophil lifespan in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 11:378–385. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp031>
19. Tang X, Wang P, Zhang R, Watanabe I, Chang E, Vinayachandran V, Nayak L, Lapping S, Liao S, Madera A, Sweet DR, Luo J, Fei J, Jeong H-W, Adams RH, Zhang T, Liao X, Jain MK (2022) KLF2 regulates neutrophil activation and

thrombosis in cardiac hypertrophy and heart failure progression. *J Clin Invest* 132:e147191. <https://doi.org/10.1172/JCI147191>

20. Morozova DS, Martyanov AA, Obydenyi SI, Korobkin J-JD, Sokolov AV, Shamova EV, Gorudko IV, Khoreva AL, Shcherbina A, Panteleev MA, Sveshnikova AN (2022) Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* 20:32. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x>
21. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, Obydenyi SI, Eckly A, Léon C, Gachet C, Grishchuk EL, Ataulakhanov FI, Mangin PH, Panteleev MA (2019) Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39:37–47. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>
22. Ermolinskiy PB, Lugovtsov AE, Maksimov MK, Umerenkov DA, Moldon PA, Sveshnikova AN, Pshonkin AV, Smetanina NS, Priezzhev AV (2024) Interrelation of Blood Microrheological Parameters Measured by Optical Methods and Whole Blood Viscosity in Patients Suffering from Blood Disorders: a Pilot Study. *J Biomed Photonics Eng* 10:020306. <https://doi.org/10.18287/JBPE24.10.020306>
23. Priezzhev AV, Lee K, Firsov NN, Lademann J (2016) Optical Study of RBC Aggregation in Whole Blood Samples and Single Cells. In: *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, Second Edition, Volume 2: Methods*. SPIE PRESS
24. Gromotowicz-Poplawska A, Marcinczyk N, Misztal T, Golaszewska A, Aleksiejczuk M, Rusak T, Chabielska E (2019) Rapid effects of aldosterone on platelets, coagulation, and fibrinolysis lead to experimental thrombosis augmentation. *Vascul Pharmacol* 122–123:106598. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2019.106598>
25. Baskurt OK, Meiselman HJ (2024) Blood Rheology and Hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 50:902–915. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1777802>

References

1. Miličić D, Jakuš N, Fabijanović D (2018) Microcirculation and Heart Failure. *Curr Pharm Des* 24:2954–2959. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180625143232>
2. Tikhomirova I, Petrochenko E, Muravyov A, Malysheva Y, Petrochenko A, Yakusevich V, Oslyakova A (2017) Microcirculation and blood rheology

- abnormalities in chronic heart failure. *Clin Hemorheol Microcirc* 65:383–391. <https://doi.org/10.3233/CH-16206>
3. Del Buono MG, Montone RA, Camilli M, Carbone S, Narula J, Lavie CJ, Niccoli G, Crea F (2021) Coronary Microvascular Dysfunction Across the Spectrum of Cardiovascular Diseases. *J Am Coll Cardiol* 78:1352–1371. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.07.042>
 4. Guizouarn H, Barshtein G (2022) Editorial: Red Blood Cell Vascular Adhesion and Deformability, Volume II. *Front Physiol* 13:849608. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.849608>
 5. Mohaissen T, Proniewski B, Targosz-Korecka M, Bar A, Kij A, Bulat K, Wajda A, Blat A, Matyjaszczyk-Gwarda K, Grosicki M, Tworzydło A, Sternak M, Wojnar-Lason K, Rodrigues-Diez R, Kubisiak A, Briones A, Marzec KM, Chlopicki S (2022) Temporal relationship between systemic endothelial dysfunction and alterations in erythrocyte function in a murine model of chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 118:2610–2624. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab306>
 6. Chang H-Y, Yazdani A, Li X, Douglas KAA, Mantzoros CS, Karniadakis GE (2018) Quantifying Platelet Margination in Diabetic Blood Flow. *Biophys J* 115:1371–1382. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.08.031>
 7. Czaja B, Gutierrez M, Závodszy G, De Kanter D, Hoekstra A, Eniola-Adefeso O (2020) The influence of red blood cell deformability on hematocrit profiles and platelet margination. *PLOS Comput Biol* 16:e1007716. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007716>
 8. Spann AP, Campbell JE, Fitzgibbon SR, Rodriguez A, Cap AP, Blackburne LH, Shaqfeh ESG (2016) The Effect of Hematocrit on Platelet Adhesion: Experiments and Simulations. *Biophys J* 111:577–588. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.024>
 9. Oh D, Ii S, Takagi S (2022) Numerical Study of Particle Margination in a Square Channel Flow with Red Blood Cells. *Fluids* 7:96. <https://doi.org/10.3390/fluids7030096>

10. Sloop GD, De Mast Q, Pop G, Weidman JJ, St. Cyr JA (2020) The Role of Blood Viscosity in Infectious Diseases. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.7090>
11. Jafri SM, Ozawa T, Mammen E, Levine TB, Johnson C, Goldstein S (1993) Platelet function, thrombin and fibrinolytic activity in patients with heart failure. *Eur Heart J* 14:205–212. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.2.205>
12. Popovic B, Zannad F, Louis H, Clerc-Urmès I, Lakomy C, Gibot S, Denis CV, Lacolley P, Regnault V (2019) Endothelial-driven increase in plasma thrombin generation characterising a new hypercoagulable phenotype in acute heart failure. *Int J Cardiol* 274:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.07.130>
13. Antipenko S, Mayfield N, Jinno M, Gunzer M, Ismahil MA, Hamid T, Prabhu SD, Rokosh G (2024) Neutrophils are indispensable for adverse cardiac remodeling in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 189:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2024.02.005>
14. Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Panteleev MA (2024) Conditions for the implementation of the phenomenon of programmed death of neutrophils with the appearance of DNA extracellular traps during thrombus formation. *Pediatr Hematol Immunopathol* 23:211–218. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2024-23-1-211-218>
15. Korobkin J-JD, Deordieva EA, Tesakov IP, Adamanskaya E-IA, Boldova AE, Boldyreva AA, Galkina SV, Lazutova DP, Martyanov AA, Pustovalov VA, Novichkova GA, Shcherbina A, Panteleev MA, Sveshnikova AN (2024) Dissecting thrombus-directed chemotaxis and random movement in neutrophil near-thrombus motion in flow chambers. *BMC Biol* 22:115. <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01912-2>
16. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM (2019) Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood* 133:906–918. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-882993>

17. Sveshnikova AN, Adamanskaya EA, Korobkina Yu-DD, Panteleev MA (2024) Intracellular signaling involved in the programmed neutrophil cell death leading to the release of extracellular DNA traps in thrombus formation. *Pediatr Hematol Immunopathol* 23:222–230. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2024-23-2-222-230>
18. Tracchi I, Ghigliotti G, Mura M, Garibaldi S, Spallarossa P, Barisione C, Boasi V, Brunelli M, Corsiglia L, Barsotti A, Brunelli C (2009) Increased neutrophil lifespan in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 11:378–385. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfp031>
19. Tang X, Wang P, Zhang R, Watanabe I, Chang E, Vinayachandran V, Nayak L, Lapping S, Liao S, Madera A, Sweet DR, Luo J, Fei J, Jeong H-W, Adams RH, Zhang T, Liao X, Jain MK (2022) KLF2 regulates neutrophil activation and thrombosis in cardiac hypertrophy and heart failure progression. *J Clin Invest* 132:e147191. <https://doi.org/10.1172/JCI147191>
20. Morozova DS, Martyanov AA, Obydennyi SI, Korobkin J-JD, Sokolov AV, Shamova EV, Gorudko IV, Khoreva AL, Shcherbina A, Panteleev MA, Sveshnikova AN (2022) Ex vivo observation of granulocyte activity during thrombus formation. *BMC Biol* 20:32. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01238-x>
21. Nechipurenko DY, Receveur N, Yakimenko AO, Shepelyuk TO, Yakusheva AA, Kerimov RR, Obydennyi SI, Eckly A, Léon C, Gachet C, Grishchuk EL, Ataulakhanov FI, Mangin PH, Panteleev MA (2019) Clot Contraction Drives the Translocation of Procoagulant Platelets to Thrombus Surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39:37–47. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311390>
22. Ermolinskiy PB, Lugovtsov AE, Maksimov MK, Umerenkov DA, Moldon PA, Sveshnikova AN, Pshonkin AV, Smetanina NS, Priezzhev AV (2024) Interrelation of Blood Microrheological Parameters Measured by Optical Methods and Whole Blood Viscosity in Patients Suffering from Blood Disorders:

a Pilot Study. J Biomed Photonics Eng 10:020306.
<https://doi.org/10.18287/JBPE24.10.020306>

23. Priezzhev AV, Lee K, Firsov NN, Lademann J (2016) Optical Study of RBC Aggregation in Whole Blood Samples and Single Cells. In: Handbook of Optical Biomedical Diagnostics, Second Edition, Volume 2: Methods. SPIE PRESS

24. Gromotowicz-Poplawska A, Marcinczyk N, Misztal T, Golaszewska A, Aleksiejczuk M, Rusak T, Chabielska E (2019) Rapid effects of aldosterone on platelets, coagulation, and fibrinolysis lead to experimental thrombosis augmentation. Vascul Pharmacol 122–123:106598.
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2019.106598>

25. Baskurt OK, Meiselman HJ (2024) Blood Rheology and Hemodynamics. Semin Thromb Hemost 50:902–915. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1777802>