

## ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ КАРДИОЛОГИИ

© Н.В. ПИНЕГИНА, 2016

УДК 616.132.2:616.155.2/3

DOI: 10.15275/kreatkard.2016.02.03

### Лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы в патогенезе острого коронарного синдрома. Часть 1

*Н.В. Пинегина*

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»  
Минздрава РФ; ул. Делегатская, 20/1, Москва, 127473, Российская Федерация

Пинегина Наталья Викторовна, кардиолог, аспирант, лаборант, e-mail: pinegina.natalia@gmail.com

Традиционно роль тромбоцитов в патогенезе острого коронарного синдрома (ОКС), как полагают, состоит в образовании тромба при разрыве атеросклеротических бляшек. Формирование лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов (ЛТК) может быть связующим звеном между тромбообразованием и воспалением в процессе активации тромбоцитов при ОКС. Хотя повышение уровня агрегатов лейкоцитов с тромбоцитами при ОКС описано ранее, вклад комплексообразования в прогрессирование атеросклероза и дестабилизацию бляшек неясен. Также неизвестно, представляет ли собой формирование ЛТК системное явление или играет локальную роль в патогенезе местного интракоронарного воспаления при ОКС, и являются ли агрегаты в периферической крови комплексами лейкоцитов с тромбоцитами или с тромбоцитарными везикулами. В настоящем обзоре представлены механизмы образования ЛТК, методы определения лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов в периферической крови, а также влияние терапии на формирование и стабильность ЛТК.

*Ключевые слова:* острый коронарный синдром; атеросклероз; лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы; экстраклеточные везикулы; проточная цитометрия.

### Leukocyte-platelet complexes in the pathogenesis of acute coronary syndrome. Part 1

*N.V. Pinegina*

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of Ministry of Health of the Russian Federation;  
ulitsa Delegatskaya, 20/1, Moscow, 127473, Russian Federation

Pinegina Natal'ya Viktorovna, Cardiologist, Postgraduate, Assistant, e-mail: pinegina.natalia@gmail.com

Traditionally, the role platelets in the pathogenesis of acute coronary syndrome (ACS), is believed to be in the thrombus formation at the site of an atherosclerotic plaque rupture. Formation leukocyte-platelet complexes (LTC) can be a link between inflammation and thrombosis in the process of platelet activation in acute coronary syndrome. Although the increase in leukocyte aggregates with platelets in ACS described earlier, the contribution of complex formation in the progression of atherosclerosis and plaque destabilization is unclear. It is also unknown whether a formation is LTC is a systemic phenomenon or plays a role in the pathogenesis of in the local intracoronary inflammation in ACS. Also it is unclear whether detected in peripheral blood leukocytes aggregates are complexes with platelets or platelet-derived extracellular vesicles. This review presents the mechanisms of formation of LTC, methods for determination of leukocyte-platelet aggregates in the peripheral blood, and the impact of treatment on the formation and stability of the LTC.

*Keywords:* acute coronary syndrome; atherosclerosis; leukocyte-platelet complexes; extracellular vesicles; flow cytometry.

## Введение

Тромбоциты – клеточные элементы, отвечающие за гемостаз при повреждении кровеносного сосуда. Однако есть данные о том, что тромбоциты запускают и поддерживают внутрисосудистое воспаление. Выделяемые тромбоцитами медиаторы, такие как тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и фактор активации тромбоцитов (PAF), способны активировать и усиливать адгезию, хемотаксис и фагоцитарную функцию лейкоцитов и образование супероксид радикала [1]. Взаимодействие тромбоцитов и лейкоцитов приводит к различным патологическим реакциям во время острой фазы воспаления и при формировании иммунного ответа. Опосредованные тромбоцитами провоспалительные процессы играют значительную роль в патогенезе различных заболеваний, связанных с системным воспалением.

Повышенные уровни лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов, определяемые различными методами, встречаются у больных системной красной волчанкой, ревматоидным артритом, сахарным диабетом, при травмах, сепсисе, ишемическом инсульте и остром коронарном синдроме, а также в крови пациентов, инфицированных ВИЧ-1 [2–7]. Патологическое влияние тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий играет роль в патогенезе таких заболеваний, как псориаз, кожные реакции гиперчувствительности, бактериальные и вирусные инфекции, острое повреждение печени и легких, хроническая болезнь почек, реакции отторжения трансплантата, болезнь Крона и неспецифический язвенный колит, гепатоцеллюлярная карцинома [8]. Также комплексы тромбоцитов с нейтрофилами играют важную роль в механизме постишемического реперфузионного повреждения сердца, печени и легких [9–10].

### Механизмы формирования комплексов. Рецепторы тромбоцитов и лейкоцитов

Молекулярный механизм взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов был детально

изучен с использованием различных экспериментальных моделей сосудистых заболеваний, воспалительных процессов респираторной системы, кожи, кишечника, при гломерулонефрите, артрите и сепсисе [11]. Процесс взаимодействия лейкоцита и тромбоцита можно разделить на три этапа, а именно: инициация взаимодействия, стабилизация агрегатов и усиление активации лейкоцитов. Связывание активированных тромбоцитов и лейкоцитов начинается с взаимодействия Р-селектина (CD62P) и постактивационной дегрануляции тромбоцитов с Р-селектиновым гликопротеиновым лигандом-1 (PSGL-1, CD162), который постоянно экспрессирован на лейкоцитах [12]. Этот этап, как полагают, является самым важным при образовании агрегатов [13–15].

Молекула Р-селектина представляет собой белок, депонированный в альфа-гранулах инактивированных тромбоцитов. Тромбоциты, активированные различными агонистами, переносят фосфорилированный Р-селектин (pCD62P), депонированный в альфа-гранулах, на плазматическую мембрану. Одновременно происходит изменение конформации интегринового  $\text{Pb/IIIa}$  (CD41/CD61) комплекса на поверхности тромбоцитов, приводящее к повышению аффинности рецептора к фибриногену. На мембране лейкоцита в первоначальном связывании с Р-селектином тромбоцитов участвует лейкоцитарный PSGL-1 [16]. Сродство к CD62P колеблется в пределах субпопуляций лейкоцитов и является самым высоким для моноцитов, а затем следуют гранулоциты и лимфоциты, из которых наименьшей способностью образовывать гетеротипические комплексы с тромбоцитами обладают В-клетки [8–13].

Несмотря на относительно высокий уровень экспрессии PSGL-1 Т-лимфоцитами, они образуют значительно меньшее количество стабильных агрегатов с тромбоцитами, чем NK-клетки. В исследованиях K.L. Moore, L.F. Thompson и K. Ley было выдвинуто предположение о необ-

ходимости посттрансляционных модификаций PSGL-1 для связывания с P-селектином [17, 18]. Действительно, R.P. McEver, R.D. Cummings описали ферменты фукозилтрансферазу VII (FucT-VII) и ядерную N-ацетилглюкозаминтрансферазу (C2GnT), опосредующие связывание PSGL-1 с P-селектином [19]. Было показано, что среди лимфоцитов только активированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Th1 клетки экспрессируют эти ферменты и способны связывать P-селектин [20]. Также было показано, что взаимодействие P-селектина и PSGL-1 является кратковременным процессом и для стабильного связывания лейкоцитов с тромбоцитами необходимо участие дополнительных молекул адгезии. Таким образом, перекрестное связывание P-селектина и PSGL-1 приводит к внутриклеточной активации лейкоцитов и индуцированной хемокинами экспрессии белков, необходимых для плотной адгезии клеток и стабилизации агрегатов.

Связывание P-селектина и PSGL-1 не зависит от присутствия катионов кальция и магния. Тем не менее в исследовании J. Sarma et al. в присутствии хелатирующего агента образование моноцитарно-тромбоцитарных комплексов снижается в большей степени у пациентов в острой фазе инфаркта миокарда, чем у пациентов с нестабильной стенокардией или некоронарной болью в грудной клетке [21]. Удаление внеклеточных ионов кальция не предотвращает потенциальный выброс Ca<sup>2+</sup> из плотных гранул тромбоцитов ( $\approx 20$  нмоль Ca<sup>2+</sup>/10<sup>8</sup> клеток). Также было показано, что плотность экспрессии активной конформации GPIIb/IIIa рецептора и CD40L на тромбоцитах также зависит от внутриклеточного депо Ca<sup>2+</sup> [22].

Дальнейшая стабилизация лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов включает в себя образование связей между лейкоцитарным интегрином Mac-1 (CD11b/CD18, integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2) и тромбоцитарным гликопротеином (GP) Ib [23]. При связывании P-селектина на активированных тромбоцитах с PSGL-1

на лейкоцитах поддерживается процесс их роллинга и активируется экспрессия лейкоцитарного интегрин Mac-1, который связывается с гликопротеином Ib (GPIb) на поверхности тромбоцитов, что является важным этапом в стабилизации агрегатов. В результате внутриклеточной передачи сигнала запускается экспрессия тканевого фактора на лейкоцитах. Постактивационное изменение конформации рецептора Mac-1 делает возможным его связывание с фактором свертывания Ха (FXa) и/или фибриногеном. Интегрин Mac-1 также опосредует плотную адгезию лейкоцитов к эндотелию [21].

Тромбоцитарно-лейкоцитарное взаимодействие дополнительно стабилизируется путем связывания CD40L (CD154) тромбоцитов с молекулой CD40 на поверхности лейкоцитов. Это межклеточное взаимодействие играет роль при атеротромбозе и воспалении [22]. Связывание с CD40L и активация CD40 на эндотелиальных клетках или моноцитах запускает биосинтез молекул адгезии, хемокинов, тканевого фактора и матриксных металлопротеиназ. Плотность CD40L повышена на тромбоцитах в составе свежего тромба.

Также тромбоцитарно-лейкоцитарные конъюгаты образуются с помощью гликопротеина GPIb $\alpha$  тромбоцитов и связывающей адгезивной молекулы-C (JAM-C). Связывание тромбоцитов может происходить через фибриногеновые мостики активированного GPIIb/IIIa рецептора с лейкоцитарным интегрином Mac-1 [24]. Кроме того, тромбоциты взаимодействуют с лейкоцитами через связывание гликопротеина VI с индуктором матриксных металлопротеиназ (EMMPRIN, CD147) [25] через рецептор, экспрессированный на миелоидных клетках (TREM-1), и его лиганд [26], а также при помощи контактов CD62P с CD15 и CD36 с CD36 через тромбоспондиновые мостики [24]. Таким образом, целый спектр молекул участвует в образовании агрегатов между тромбоцитами и лейкоцитами [8].

### **Захват эндотелием комплексов с активированными тромбоцитами**

Миграция моноцитов в субэндотелий при участии тромбоцитов — важный этап прогрессирования атеросклероза. Было показано, что у пациентов, страдающих атеросклерозом, сахарным диабетом и ревматоидным артритом, количество тромбоцитарных комплексов с моноцитами и нейтрофилами возрастает, что предполагает их участие в патогенезе [5, 6, 27]. Предложено несколько механизмов, объясняющих роль лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов (ЛТК) в прогрессировании заболевания. Образование гетерогенных агрегатов приводит к взаимной иммуоактивации клеток, усилению воспаления и тромбозу. Адгезия тромбоцитов к поврежденным эндотелиальным клеткам облегчает трансмиграцию лейкоцитов при атеросклерозе [28]. В то же время в моделях *in vitro* и *in vivo* показано преимущественное накопление в субэндотелии моноцитов, образовавших комплексы с тромбоцитами [29]. В эксперименте *in vitro* было показано, что при образовании комплексов с активированными тромбоцитами моноциты приобретают провоспалительный фенотип, увеличивая поверхностную экспрессию маркера CD16. Этот эффект коррелировал как с количеством образованных комплексов, так и со способностью моноцитов к адгезии на эндотелиальных клетках [30]. С другой стороны, активированные лейкоциты вызывают активацию тромбоцитов, о чем свидетельствует увеличение экспрессии Р-селектина на тромбоцитах [31]. Исследования *in vivo* показывают, что лейкоциты и активированные тромбоциты депонируются в местах повреждения атеросклеротических бляшек, на участках рестеноза, кровоизлияний и ишемического повреждения [29–31].

В процессе воспаления тромбоциты способствуют привлечению лейкоцитов в сосудистую стенку и их экстравазации в окружающие ткани. Активированные тромбоциты выделяют содержимое своих  $\alpha$ -гранул, в том числе провоспалительные хемокины

CXCL4 (тромбоцитарный фактор 4 PF4), CXCL7 и CCL5 (RANTES). CCL5, связываясь с рецепторами CCR1 и CCR5 на поверхности лейкоцитов, способствует миграции и накоплению моноцитов в очаге воспаления [32]. CXCL4 связывается с CXCR3b на поверхности активированных эндотелиальных клеток, что вкупе с CCL5 приводит к плотной адгезии и трансэндотелиальной миграции моноцитов [29]. Помимо захвата/удержания моноцитов в участках сосудистого русла с поврежденным эндотелием, активированные тромбоциты, образуя комплексы с циркулирующими моноцитами, облегчают проникновение моноцитов в атеросклеротическую бляшку.

### **Методы детекции моноцитарно-тромбоцитарных комплексов**

Несмотря на ключевую роль лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов в патогенезе системного воспаления и атеротромбоза, методы измерения количества ЛТК не применяются в ежедневной клинической практике. В большинстве коммерчески доступных методов оценки функционального состояния тромбоцитов измеряется уровень агрегации тромбоцитов [33]. Также в клиническом исследовании В. Rutten et al. [34] был опробован разработанный на экспериментальной модели [35] метод измерения реактивности тромбоцитов, основанный на измерении уровня экспрессии Р-селектина под воздействием различных доз агонистов. Реактивность тромбоцитов при воздействии различных агонистов активации тромбоцитов (АДФ, TRAP, родоцитин, U46619, CRP-XL) положительно коррелировала с уровнем моноцитарно-тромбоцитарных комплексов и количеством макрофагов в атеросклеротических бляшках после каротидной эндартерэктомии [34]. Впервые А. D. Michelson et al. продемонстрировали превосходство моноцитарно-тромбоцитарных комплексов (МТК) над Р-селектином для оценки активации тромбоцитов [36].

Продолжительность жизни циркулирующих комплексов тромбоцитов с моноцитами дольше, чем с другими клетками крови, и составляет примерно 30 мин, в то время как экспрессия на тромбоцитах Р-селектина, используемого ранее маркера активации тромбоцитов, быстро снижается при слушивании маркера с поверхности тромбоцитов в условиях острого коронарного синдрома или ишемического инсульта [34, 36, 37]. Так, в экспериментах с преактивацией тромбоцитов было показано, что уровень Р-селектина на тромбоцитах снижается с 80 до 10% через 15 мин после активации, что коррелировало с ростом растворимого Р-селектина в плазме [38].

Одним из методов измерения ЛТК и одновременной оценки степени активации участвующих клеток является проточная цитофлуориметрия. При помощи этой методики, используя моноклональные антитела, меченные флуоресцентными маркерами, возможно не только оценить содержание отдельных антигенов на поверхности клеток, но и выявить степень активации клеток, участвующих в формировании комплекса. Цитометрический анализ экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов долгое время считался «золотым стандартом» оценки активации тромбоцитов. Однако *in vivo* активированные тромбоциты быстро теряют Р-селектин со своей поверхности, продолжая циркулировать и функционировать [38], тогда как моноцитарно-тромбоцитарные агрегаты сохраняются в крови значительно дольше и сохраняют экспрессию Р-селектина [36]. Аналогичные наблюдения были сделаны относительно другого маркера тромбоцитов – гликопротеина Ib (CD42b), который также слушивается с поверхности дегранулировавших тромбоцитов, приводя к их гибели и формированию агрегатов [36–39].

За последние 10–15 лет были разработаны высокочувствительные цитометрические методы измерения ЛТК в периферической крови [12–40]. Однако высокая чувствительность метода предъявляет высокие

требования к условиям пробоподготовки и проведению анализа для получения стабильных и точных результатов. Для исключения активации тромбоцитов *in vitro* необходимо стандартизировать ряд переменных, включая выбор антикоагулянта, методы забора и последующей обработки образцов крови, которые потенциально могут повлиять на уровень ЛТК. Были предложены различные антикоагулянты, такие как цитрат натрия, теофиллин, аденозин и дипиридабол (СТАД), для стабилизации тромбоцитов [41]. Исследователи старались избегать таких методик, как центрифугирование, градиентное гель-центрифугирование, лизис эритроцитов, охлаждение, встряхивание и перемешивание образцов, которые могут дополнительно активировать тромбоциты или моноциты. Удаление эритроцитов путем колоночной сепарации или лизиса также может приводить к значительным ложноположительным результатам *in vitro*. В связи с высокой концентрацией тромбоцитов двойные позитивные события могут регистрироваться на проточном цитометре не только при прохождении ЛТК, но и вследствие одновременного прохождения тромбоцитов и лейкоцитов.

S.A. Harding et al. в своей работе оценили влияние указанных факторов на формирование моноцитарно-тромбоцитарных комплексов, измеренных методом двухцветной (anti-CD14-PE и anti-CD42a-FITC) проточной цитометрии [42]. Выбор антикоагулянта оказывал значительное влияние на количество комплексов: гепарин –  $20,1 \pm 2\%$ , ингибитор тромбинзависимой активации тромбоцитов РРАСК –  $16,8 \pm 1,9\%$ , цитрат натрия –  $12,3 \pm 1,6\%$  и этилендиамин тетрауксусной кислоты (ЭДТА) –  $9,5 \pm 1\%$ . Тромбоцитарно-моноцитарная агрегация была выше при заборе крови из венозного катетера, чем при венепункции ( $20,9 \pm 3,9\%$  против  $13,8 \pm 2,4$ ,  $p=0,03$ ), и каждые 10 мин задержки перед обработкой крови увеличивали количество агрегатов на  $1,7–2,8\%$ . В то же время, по данным авторов, лизис эритроцитов не оказывал значимого влия-

ния на активацию тромбоцитов, и фиксированные образцы сохраняли постоянное количество МТК в течение 24 ч при температуре 4 °С. В работах В. Majumder et al. использовали добавление ЭДТА к образцам цитратной крови для остановки образования ЛТК [43]. Однако этот метод неоптимален, так как ЭДТА серьезно изменяет структуру фибриногенового рецептора тромбоцитов GP IIb/IIIa [44]. Исследователи, используя эту методику забора крови, а также настройки проточной цитометрии, при которых дискриминатором между моноцитарно-тромбоцитарными комплексами и совпадением сигнала от одновременного прохождения моноцита и тромбоцита является ширина флуоресцентного сигнала CD61, не получили достоверных различий в количестве МТК у пациентов с острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST и со стабильной стенокардией.

Несмотря на активную разработку методов анализа лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов, в настоящее время данные об их количестве при различных заболеваниях и у здоровых добровольцев различаются в зависимости от используемого метода детекции. По нашим неопубликованным данным, ключевым фактором, влияющим на образование ЛТК в цельной крови, является время с момента забора крови до фиксации образца. При использовании окраски флуоресцентными антителами цельной нефиксированной крови количество моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов значительно увеличивается при инкубировании цельной крови. Так, у здоровых добровольцев при заборе крови в пробирку с клеточным фиксатором формальдегидом количество МТК составляет 5–8%, тогда как при инкубации крови в течение 1 ч количество МТК возрастает до 35–60%, что согласуется с данными S.A. Harding et al. Также использование центрифугирования и лизиса эритроцитов в различных буферных системах приводит к дополнительной активации тромбоцитов и недостоверным результатам. При использовании высоких

концентраций формальдегида или параформальдегида (1–4%) меняются свойства клеточной мембраны, что приводит к образованию дополнительных связей между клетками и большего количества агрегатов. Также было показано, что высокие концентрации формальдегида стимулируют везикуляцию мембран как внутри клетки, так и на клеточной мембране [45]. В то же время при окрашивании в растворе формальдегида снижается уровень флуоресценции флуорохромов, что делает невозможным анализ полученных данных на проточном цитофлуориметре [46, 47]. Нами был разработан метод фиксации цельной крови в малых концентрациях раствора формальдегида в фосфатно-солевом буфере, при котором сохраняются стабильность ЛТК в течение 5 ч и возможная эффективная окраска фиксированных образцов флуоресцентными моноклональными антителами для последующего анализа на проточном цитометре.

#### **Конфликт интересов**

Конфликт интересов не заявляется.

#### **Финансирование**

Исследование выполнено при поддержке гранта Правительства Российской Федерации (договор № 14.B25.31.0016).

#### **Литература/References**

1. Zarbock A., Polanowska-Grabowska R., Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007; 21: 99–111.
2. Ott I., Neumann F.-J., Gawaz M., Schmitt M., Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation.* 1996; 94: 1239–46.
3. Mickelson J.K., Lakkis N.M., Villarreal-Levy G., Hughes B.J., Smith C.W. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 28: 345–53.
4. Furman M.I., Barnard M.R., Krueger L.A., Fox M.L., Shilale E.A., Lessard D.M. et al. Circulating Monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38: 1002–6.
5. Hun P., Fateh-moghadam S., Tomandl B., Klinger K., Stellos K., Garlich C. et al. Course of platelet acti-

- vation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke*. 2006; 37: 2283–7.
6. Joseph J.E., Harrison P., Mackie I.J., Isenberg D.A., Haemostasis S.J.M. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Brithsh J. Haematol*. 2001; 115: 451–9.
  7. Singh M.V., Davidson D.C., Kiebalo M., Maggirwar S.B. Detection of circulating platelet-monocyte complexes in persons infected with human immunodeficiency virus type-1. *J. Virol. Methods*. 2012; 181 (2): 170–6.
  8. Schrottmaier W.C., Kral J.B., Badrnya S., Assinger A. Aspirin and P2Y12 inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.* 2015; 114: 478–89.
  9. Köhler D., Straub A., Weissmüller T., Faigle M., Bender S., Lehmann R. et al. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2011; 123: 2579–90.
  10. Zarbock A., Singbartl K.L.K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest*. 2006; 116: 3211–9.
  11. Totani L., Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arter. Thromb. Vasc. Biol*. 2010; 30: 2357–61.
  12. Barnard M.R., Krueger L.A., Frelinger A.L., III, Mark I. Furman and ADM. Whole blood analysis of leukocyte-platelet. In: Current protocols in cytometry. 2003: 1–8.
  13. Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J. Leukoc. Biol*. 2008; 83: 1069–78.
  14. Davi G., Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N. Engl. J. Med*. 2007; 357: 2482–94.
  15. Yokoyama S., Ikeda H., Haramaki N., Yasukawa H., Murohara T., Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2005; 45: 1280–6.
  16. Zarbock A., Müller H., Kuwano Y., Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J. Leukoc. Biol*. 2009; 86: 1119–24.
  17. Moore K.L., Thompson L.F. P-selectin (CD62) binds to subpopulations of human memory T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1992; 186: 173–81.
  18. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med*. 2003; 9: 263–8.
  19. McEver R.P., Cummings R.D. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest*. 1997; 100: 485–91.
  20. Borges E., Tietz W., Steegmaier M., Moll T., Hallmann R., Hamann A. et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J. Exp. Med*. 1997; 185: 573–8.
  21. Sarma J., Laan C.A., Alam S., Jha A., Fox K.A.A., Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002; 105: 2166–71.
  22. Hermann A., Rauch B.H., Braun M., Schrör K., Weber A.A. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets*. 2001; 12: 74–82.
  23. McEver R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2002; 14: 581–6.
  24. Van Gils J.M., Zwaginga J.J., Hordijk P.L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol*. 2008; 85: 195–204.
  25. Schulz C., Von Brühl M.L., Barocke V., Cullen P., Mayer K., Okrojek R. et al. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J. Thromb. Haemost.* 2011; 9: 1007–19.
  26. Haselmayer P., Grosse-Hovest L., Von Landenberg P., Schild H., Radsak M.P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood*. 2007; 110: 1029–35.
  27. Harding S.A., Sarma J., Josephs D.H., Cruden N.L., Din J.N., Twomey P.J. et al. Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation*. 2004; 109: 1926–9.
  28. Henn V., Slupsky J.R., Gräfe M., Anagnostopoulos I., Förster R., Müller-Berghaus G. et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998; 391: 591–4.
  29. Kuckleburg C.J., Yates C.M., Kalia N., Zhao Y., Nash G.B., Watson S.P. et al. Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation. *Cardiovasc. Res*. 2011; 91: 134–41.
  30. Passacuale G., Vamadavan P., Pereira L., Hamid C., Corrigan V., Ferro A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One*. 2011; 6: e25595.
  31. Li N., Hu H., Lindqvist M., Wikström-Jonsson E., Goodall A.H., Hjerdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2000; 20: 2702–8.
  32. Von Hundelshausen P., Koenen R.R., Sack M., Mause S.F., Adriaens W., Proudfoot A.E.I. et al. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 2016; 105: 924–31.
  33. Breet N.J., van Werkum J.W., Bouman H.J., Kelder J.C., Ruven H.J.T., Bal E.T. et al. Comparison of Platelet function tests undergoing coronary stent implantation. *JAMA*. 2010; 303: 755–62.
  34. Ruiten B., Tersteeg C., Vrijenhoek J.E.P., van Holten T.C., Elsenberg E.H.A.M., Mak-Nienhuis E.M. et al. Increased platelet reactivity is associated with circulating platelet-monocyte complexes and macrophages in

- human atherosclerotic plaques. *PLoS One*. 2014; 9: e105019.
35. Huo Y., Schober A., Forlow S.B., Smith D.F., Hyman M.C., Jung S. et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 2003; 9: 61–7.
  36. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., Valeri C.R., Furman M.I. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 104: 1533–7.
  37. Bouman H.J., Parlak E., Van Werkum J.W., Breet N.J., Ten Cate H., Hackeng C.M. et al. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8: 482–8.
  38. Michelson A.D., Barnard M.R., Hechtman H.B., Macgregor H., Connolly R.J., Loscalzoi J. et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.* 1996; 93: 11877–82.
  39. Marquardt L., Ruf A., Mansmann U., Winter R., Schuler M., Bugge F. et al. Course of platelet activation markers after ischemic stroke. *Stroke*. 2002; 33: 2570–4.
  40. Nagy B., Jr, Debreceni I.B., Kappelmayer J. Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers. *J. Int. Fed. Clin. Chem. Lab. Med.* 2012; 23: 1–11.
  41. Mody M., Lazarus A.H., Semple J.W., Freedman J. Preanalytical requirements for flow cytometric evaluation of platelet activation: choice of anticoagulant. *Transfus. Med.* 1999; 9: 147–54.
  42. Harding S.A., Din J.N., Sarma J., Jessop A., Weatherall M., Fox K.A.A. et al. Flow cytometric analysis of circulating platelet-monocyte aggregates in whole blood: methodological considerations. *Thromb. Haemost.* 2007; 98: 451–6.
  43. Majumder B., North J., Mavroudis C., Rakhit R., Lowdell M.W. Improved accuracy and reproducibility of enumeration of platelet – monocyte complexes through use of doublet-discriminator strategy. *Cytometry. Part B. Clin. Cytometry*. 2012; 82 (6): 353–9.
  44. White J.G., Escolar G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets*. 2000; 11: 56–61.
  45. Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P. Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 1985; 33: 845–53.
  46. Thavarajah R., Mudimbaimannar V., Rao U., Ranganathan K., Elizabeth J. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J. Oral. Maxillofac. Pathol.* 2012; 16: 400–5.
  47. Kingston J.K., Bayly W.M., Sellon D.C., Meyers K.M., Wardrop K.J. Effects of formaldehyde fixation on equ platelets using flow cytometric methods to evaluate markers of platelet activation. *Am. J. Vet. Res.* 2002; 63: 840–4.

Поступила 01.06.2016