

© Н.В. ПИНЕГИНА, 2016

УДК 616.132.2:616.155.2/3

DOI: 10.15275/kreatkard.2016.03.02

Лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы в патогенезе острого коронарного синдрома. Часть 2

Н.В. Пинегина

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России; ул. Делегатская, 20, стр. 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, а также 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 2

N.V. Pinegina

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of Ministry of Health of the Russian Federation;
ulitsa Delegatskaya, 20, stroenie1, Moscow, 127473, Russian Federation

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

Traditionally, the role of platelets in the pathogenesis of acute coronary syndrome (ACS), as suggested, is the thrombus formation at the site of an atherosclerotic plaque rupture. Formation of leukocyte-platelet complexes (LTC) can be a link between inflammation and thrombosis in the process of platelet activation in ACS. Although the increase in leukocyte aggregates with platelets in ACS was described earlier, the contribution of complex formation in the progression of atherosclerosis and plaque destabilization is unclear. It is also unknown whether the formation of LTC is a systemic phenomenon or plays a role in the pathogenesis of the local intracoronary inflammation in ACS. Also it is unclear whether leukocyte aggregates detected in peripheral blood are complexes with platelets or with 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.

Выявление комплексов лейкоцитов с тромбоцитарными экстраклеточными везикулами. Парадоксальная экспрессия CD45 и тканевого фактора активированными тромбоцитами

Известно, что активированные тромбоциты образуют экстраклеточные везикулы (ЭВ), которые несут на своей поверхности антигены, специфичные для тромбоцитов, такие как: CD42b, CD41/CD61 и P-selectin (CD62P) [1, 2]. Хотя тромбоцитарные ЭВ (ТЭВ) могут вырабатываться и у здоровых лиц, повышенный уровень ТЭВ выявляют при хронических воспалительных заболеваниях, таких как: ревматоидный артрит, системная красная волчанка и атеросклероз, а также при инфекциях и в 1-е сутки острого коронарного синдрома (ОКС) [3–5]. Повышенные уровни эндотелиальных ЭВ коррелируют с функцией эндотелия у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа [6].

Тромбоциты путем межклеточной коммуникации с лейкоцитами через ЭВ принимают участие в регуляции тромбообразования, ангиогенеза, воспаления и атерогенеза [7]. В частности, ТЭВ способны доставлять хемокин RANTES (CCL5) эндотелиальным клеткам, способствуя привлечению моноцитов в субэндотелий [8]. Описано два принципиально различных метода доставки содержимого ЭВ (белки, микро-РНК) к клеткам-мишеням: слияние с плазматической мембраной и рецептор-опосредованная передача сигнала [9]. Было показано, что ЭВ, связанные с моноцитом, могут поглощаться в течение 30–60 мин, что выявляли по снижению интенсивности экспрессии CD42b в моноцитарно-тромбоцитарных комплексах (МТК) [10]. Считается, что этот процесс играет важную роль в передаче сигнала между клетками на расстоянии.

В нескольких исследованиях была продемонстрирована способность ТЭВ связываться с гранулоцитами, моноцитами и лимфоцитами, образуя лейкоцитарно-

везикулярные комплексы (ЛВК) [7, 9, 11]. T. Granja et al. разработали и использовали в клинике цитометрический метод определения лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов, а также тромбоцитарных ЭВ и активированных тромбоцитов на основании размера и экспрессии специфических маркеров [12].

В единичных исследованиях предпринимались попытки определить количество тромбоцитов, агрегировавших с лейкоцитом. Z. Xiao, P. Théroux использовали медиану интенсивности флюоресценции (МИФ) CD42a [13]. Они выявили, что в необработанной агонистами цельной крови содержится примерно 15% МТК, имеющих в своем составе до 3 тромбоцитов на 1 моноцит. С.L. Vox et al. также разработали элегантный метод определения количества тромбоцитов в комплексе с одним моноцитом при воздействии различных агонистов [14]. В их работе, напротив, было показано, что в цельной неактивированной крови с низким уровнем напряжения сдвига образуется примерно 4% МТК, содержащих менее 1 тромбоцита в своем составе. Количество молекул CD42b (на основании медианы интенсивности флюоресценции, МИФ), определяемых в комплексе с моноцитом, меньше, чем содержащееся на поверхности тромбоцита, что может быть обусловлено потерей этого маркера с мембраны активированного тромбоцита, а также тем, что в комплексе с моноцитом участвуют ТЭВ. По данным Z. Xiao, P. Théroux в цельной крови, активированной АДФ, количество МТК возрастает до 45%, и тромбоцитарная нагрузка увеличивается до 4 тромбоцитов на 1 моноцит [13]. Вновь данные С.L. Vox для активированной аденозиндифосфатом (АДФ) цельной крови противоречат этим выводам, так как МИФ маркера CD42a в комплексе с моноцитом не достигает уровня экспрессии этого маркера на поверхности покоящегося тромбоцита. Вероятно, здесь играют роль условия проведения эксперимента: Z. Xiao, P. Théroux инкубировали кровь с активатором

в статических условиях, что увеличивало количество МТК, тогда как С.Л. Vox разработала метод активации тромбоцитов при перемешивании в кювете коагулометра.

В работе З. Габбасова и соавт. было показано, что одновременно с увеличением хемилюминесценции богатой тромбоцитами плазмы у пациентов в острой фазе инфаркта миокарда выявлялись тромбоциты, несущие на своей поверхности лейкоцитарный антиген CD45 [15]. По-видимому, активированные тромбоциты получили этот антиген в процессе межклеточного взаимодействия с лейкоцитами или при помощи лейкоцитарных экстраклеточных везикул.

М. Brambilla et al. описали 5-кратное повышение уровня циркулирующих МТК, содержащих тканевой фактор (ТФ), у пациентов с нестабильной стенокардией по сравнению с контрольной группой [16]. При анализе мРНК, выделенной из богатой тромбоцитами плазмы, в группе нестабильной стенокардии отмечалось повышение экспрессии ТФ. Однако, как было убедительно показано в работе В. Østerud, J.O. Olsen, активированные тромбоциты в свободной от лейкоцитов культуре не экспрессируют ТФ [17]. Таким образом, активация и запуск коагуляционного каскада тромбоцитами происходит только после получения ими ТФ от моноцитов или эндотелиальных клеток при межклеточном взаимодействии или путем везикулярного транспорта. В патофизиологических условиях нагруженные ТФ экстраклеточные везикулы выделяются активированными моноцитами/эндотелием и, связываясь с активированными тромбоцитами, появляются на богатых фосфатидилсеринем участках плазматической мембраны тромбоцитов, приводя к усилению их тромбогенности [18].

В то же время обратный путь передачи ТФ от активированных тромбоцитов к моноцитам описан в работе Т. Scholz et al. [19]. Это явление подтверждается при наблюдении за пациентами с синдромом

Скотта, у которых нарушено образование тромбоцитарных экстраклеточных везикул, что приводит к замедлению процесса свертывания крови [20].

Лейкоцитарно-тромбоцитарные и лейкоцитарно-везикулярные комплексы при атеросклерозе и остром коронарном синдроме

Первое исследование, описывающее связь между лейкоцитарно-тромбоцитарными комплексами (ЛТК) и атеросклерозом, было опубликовано I. Ott et al. в 1996 г. [21]. Было показано, что у пациентов с нестабильной стенокардией отмечается повышенный уровень нейтрофильно-тромбоцитарных агрегатов по сравнению с сопоставимой группой пациентов со стабильной стенокардией. В дальнейшем, в нескольких исследованиях выявлена ассоциация распространенности тромбоза с повышенным уровнем лейкоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий при острой сердечно-сосудистой патологии. В нескольких клинических исследованиях выявляли повышенные уровни МТК у пациентов с ишемической болезнью сердца [13, 22–24] (см. таблицу).

В экспериментальных работах удаление нейтрофилов или тромбоцитов способствовало уменьшению размеров атеросклеротического поражения у мышей, склонных к развитию атеросклероза. Также процессы адгезии и инфильтрации нейтрофилами субэндотелия были опосредованы тромбоцитарным хемокином CCL5/RANTES [8]. Гетеротипические лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты накапливаются в местах образования тромбов и способствуют развитию острых сосудистых событий.

Несмотря на то что образование ЛТК при ОКС продемонстрировано более 15 лет назад, роль тромбоцитарно-клеточных комплексов в патогенезе ОКС остается неясной. Является ли повышенное комплексобразование с активированными тромбоцитами системной реакцией, или имеет место интракоронарное образование ЛТК,

Клинические исследования лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов при сердечно-сосудистых заболеваниях и ассоциированных состояниях

Заболевание	Тип тромбоцитарно-клеточного комплекса	Результаты	Год
Нестабильная стенокардия	НТК	4,4-кратное повышение уровня НТК у пациентов с нестабильной стенокардией по сравнению с группой стабильной стенокардии. НТК содержали повышенный уровень CD11b, маркера активации нейтрофилов [21]	1996
Стабильная стенокардия после ЧКВ	ЛТК	У пациентов с повышенным уровнем ЛТК после ЧКВ в отдаленном периоде чаще возникали ОИМ, НС, рестеноз стента, необходимость проведения АКШ [24]	1996
Стабильная стенокардия	МТК	2,5-кратное повышение МТК по сравнению с контрольной группой. При добавлении агонистов АДФ или TRAP уровень МТК возрастал [23]	1998
Коронарный синдром X (до и после физической нагрузки)	МТК	Реактивность тромбоцитов и повышенные уровни МТК определялись у пациентов с КСХ в покое по сравнению со здоровыми добровольцами. После инкубации с аденозином или после физической нагрузки у пациентов с КСХ индуцированная агонистами реактивность тромбоцитов и уровни МТК снижались [25]	2009
Острый инфаркт миокарда	МТК	GP1Ib/IIIa-блокатор абциксимаб уменьшал МТК и снижал экспрессию Mac-1 на моноцитах [26] 2-кратное повышение МТК у пациентов с ОИМ по сравнению с НС и контрольной группой. Ранняя детекция комплексов (через 4 ч от развития болей) у пациентов с нормальным уровнем креатинфосфокиназы МВ [22]	1999 2001
Острый коронарный синдром	МТК, НТК	2-кратное повышение МТК и НТК при ОКС по сравнению с группой здоровых добровольцев. Снижение уровня МТК и НТК через 24 ч после приема клопидогрела [13]	2004
Ишемический инсульт	МТК, НТК	Положительная корреляция между долей CD62P-экспрессирующих лейкоцитов и долей НТК и МТК в острой фазе, а также с долей ЛТК в восстановительной фазе ишемического инсульта [27]	2004
Атеросклероз периферических артерий	МТК	Снижение экспрессии CD62P на тромбоцитах и Mac-1 на моноцитах и количества МТК и sICAM-1 на терапии клопидогрелом [28]	2003
Хроническая болезнь почек (после трансплантации почки)	ЛТК	Снижение уровней pCD40L, pCD62P, PAC-1, CD11b, sCD40L, меньше ЛТК на терапии клопидогрелом (4 нед) [29]	2005
Сахарный диабет 2-го типа (без ИБС)	ЛТК	Снижение ЛТК, тромбоцитарного CD62P и sRANTES. Без влияния на уровни pCD154 и sCD40L и E-селектин на терапии клопидогрелом (28 дней) [30]	2006
Сахарный диабет, ИБС	НТК	Повышение НТК на 50% у женщин, болеющих диабетом с ИБС, по сравнению с женщинами без ИБС. У женщин с диабетом значительно повышен уровень НТК после активации тромбоцитов по сравнению с мужчинами-диабетиками [31]	2003
Гиперлипидемия	МТК, НТК	МТК в 4 раза выше и НТК в 2,5 раза выше у пациентов с гиперлипидемией, чем у здоровых добровольцев [32]	2005

Примечание. АКШ – аортокоронарное шунтирование; ИБС – ишемическая болезнь сердца; КСХ – коронарный синдром X; НТК – нейтрофильно-тромбоцитарные комплексы; НС – нестабильная стенокардия; ОИМ – острый инфаркт миокарда; ОКС – острый коронарный синдром; ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство.

приводящее к активации моноцитов, экспрессии тканевого фактора и локальному воспалению, — неизвестно. Однако ЛТК могут быть связующим звеном между тромбоцитарным и клеточным воспалением при ОКС [33]. Впервые повышенные уровни МТК при ОКС описала группа исследователей в 2001 г. [22]. Среди пациентов, поступивших в кардиореанимацию с загрудинной болью, у больных с диагностированным острым инфарктом миокарда уровень МТК был $11,6 \pm 11,4\%$, тогда как у пациентов с нестабильной стенокардией — $6,4 \pm 3,6\%$.

У пациентов с ОКС не только повышается общее количество МТК, но и выявляется повышение популяции комплексов, содержащих ТФ, по сравнению с пациентами со стабильной стенокардией и контрольной группой [16]. В работе J. Wang et al. повышенные уровни циркулирующих МТК у пациентов с ОКС коррелировали с повышением интерлейкина-6 (IL-6) и растворимого P-селектина [34].

Также ЛТК были предложены в качестве надежного и чувствительного маркера протромботического состояния у пациентов со стабильной стенокардией и распространенным атеросклерозом [23]. При исследовании способности различных субпопуляций моноцитов образовывать комплексы с тромбоцитами у пациентов со стабильной стенокардией достоверных различий не было найдено [35]. Также достоверно повышенные уровни МТК выявляются в острой стадии ишемического инсульта по сравнению с контрольными группами [27]. Повышенные уровни МТК и лиганда CD40 показали высокую прогностическую значимость неблагоприятного клинического исхода у пациентов с ишемическим инсультом [36]. Повышенную реактивность тромбоцитов и образование ЛТК также наблюдали при симптоматическом атеросклерозе сонных артерий [37]. Таким образом, данные клинических и экспериментальных исследований указывают на важную, но до сих пор не выяс-

ненную роль тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий при атеротромбозе.

Влияние терапии на лейкоцитарно-тромбоцитарные комплексы

Широкое распространение тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов в патогенезе различных заболеваний предполагает разработку и стандартизацию методов их детекции для диагностики и лечения различных патологий. В обзоре W.C. Schrottmaier et al. представлено разнообразие патологических реакций, опосредуемых ЛТК и благоприятный эффект терапии аспирином и/или клопидогрелом [38]. В обзоре V. Nagy et al. скрупулезно освещены исследования влияния ингибиторов P-селектина и PSGL-1 рецептора, антитромбоцитарных препаратов и статинов на различные маркеры активации тромбоцитов и клиническое течение ОКС и стабильных форм атеросклероза [39]. В том числе в некоторых исследованиях оценивали уровень лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов, и было выявлено снижение моноцитарно-тромбоцитарных агрегатов через 24 ч после приема клопидогрела [13]. Празугрел также достоверно снижал уровень гетеротипических агрегатов и уровней циркулирующего лиганда CD40 [40].

Тем не менее в исследованиях влияния ингибиторов GPIIb/IIIa-рецепторов не были получены столь убедительные данные. Так, в статье, опубликованной в 2002 г., эптифибатид дозозависимо достоверно увеличивал количество МТК при инкубировании крови здоровых добровольцев, однако не оказывал влияние на образование НТК [41]. Этот феномен можно объяснить преимущественным связыванием нейтрофилов с тромбоцитами через GPIIb/IIIa-рецепторы и фибриноген, в то время как при образовании комплексов с моноцитами играет роль взаимодействие P-селектина и PSGL-1. При этом GPIIb/IIIa-блокатор абциксимаб уменьшал количество МТК и снижал экспрессию Mac-1 на моноцитах у пациентов с острым инфарктом

миокарда [26]. Целесообразно также изучить влияние различных препаратов на динамику образования/распада лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов при атеротромбозе.

Направления исследований

В периферической крови тромбоциты находятся как в свободном состоянии, так и в виде комплексов с моноцитами, гранулоцитами и даже с эритроцитами, и процессы комплексообразования приводят к их функциональной активации. Повышенный уровень лейкоцитарно-тромбоцитарных комплексов играет роль в патогенезе сердечно-сосудистых и целого ряда других заболеваний, таких как тромбоз глубоких вен ног, серповидно-клеточная анемия, синдром системной воспалительной реакции, септическая полиорганная недостаточность, антифосфолипидный синдром, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, миелопролиферативные заболевания и болезнь Альцгеймера [38]. В то же время функция этих циркулирующих комплексов до сих пор не ясна. В местах сосудистого повреждения ЛТК имеют прокоагулянтную активность. На поверхности моноцитов и нейтрофилов в комплексах с тромбоцитами экспрессировано большое количество тканевого фактора, фактора свертывания F_{Xa} и фибриногена. Вероятно, ЛТК выполняют роль управляемых средств доставки этих ключевых компонентов свертывающей системы к месту сосудистого повреждения [42]. Эритроцитарно-тромбоцитарные комплексы были обнаружены в ядре атеросклеротических бляшек методом сканирующей электронной микроскопии в экспериментальной мышинной модели атеросклероза [43].

Несмотря на большое клиническое значение комплексообразования в активации тромбоцитов, цитометрические методы их детекции плохо стандартизированы. Многочисленные методы оценки ЛТК, описанные в литературе, были предложены для снижения вклада *in vitro* активации тром-

боцитов во избежание получения недостоверно высоких результатов. Было показано, что метод забора крови, выбор антикоагулянта, методики фиксации образца, лизис эритроцитов, центрифугирование и отмывка клеток оказывают значительное влияние в первую очередь на процент моноцитарно-тромбоцитарных комплексов. В настоящее время предпочтительными считаются методики, использующие цитометрию цельной крови, минимизирующие вклад *in vitro* комплексообразования. Разведение образца и скорость анализа образца на проточном цитометре также имеют значение. Так, различные группы исследователей оценивают процентное содержание МТК в крови здоровых добровольцев от $3,72 \pm 1,39\%$ [44] до $12,3 \pm 3,3\%$ [45]. Такой большой разброс в значениях объясняется в том числе одновременной регистрацией событий тромбоцитов и лейкоцита в неразбавленной крови.

Для снижения частоты совпадающих событий могут использоваться высокие разведения (200–400-кратные). В этом случае число одновременных событий снижается до 1–5% от общего количества комплексов, однако при этом требуется большее время для регистрации необходимого количества событий, и комплексы могут распадаться. Был предложен метод анализа данных проточной цитометрии на основе ширины флуоресцентного сигнала CD61 (маркер тромбоцитов), однако полученные результаты содержания моноцитарно-тромбоцитарных комплексов в крови здоровых добровольцев ($2,57 \pm 0,31\%$) значительно ниже представленных в других исследованиях [46]. Вероятно, при использовании этого метода из анализа отсекаются не только одновременные события, но и комплексы лейкоцита с несколькими тромбоцитами, что делает результат недостоверным.

Нами был разработан и в настоящее время тестируется метод мягкой фиксации цельной крови, при котором сведены к минимуму эффекты *in vitro* активации тромбо-

цитов и моноцитов, а также метод регистрации и анализа данных проточной цитометрии, позволяющий избежать потери ЛТК.

Более 10 лет проводят клинические исследования, в которых в том числе оценивают тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты и тромбоцитарные ЭВ. Среди исследуемых препаратов только применение пероральных антиагрегантов приводило к значимому снижению ЛТК у пациентов с атеротромбозом, в то время как применение блокатора GPIIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов эптифибатида (*in vitro*) приводило к увеличению содержания МТК.

Целесообразно также изучить влияние различных препаратов на динамику образования/распада лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов при атеротромбозе. Необходимо также более детально изучить комплексы лейкоцитов с тромбоцитарными везикулами, поскольку, по последним литературным данным, этот путь межклеточной коммуникации также приводит к иммуноактивации.

Заключение

В результате активации тромбоцитов в периферическом кровотоке происходят процессы иммуноактивации, усиливающие местное воспаление, микрососудистое повреждение и тромбообразование, опосредованное в том числе тромбоцитарно-лейкоцитарными взаимодействиями. В зависимости от уровня активации комплексобразование с тромбоцитами может запускать провоспалительные реакции в моноцитах, способствуя их аккумуляции в субэндотелии. В контексте ОКС образование ЛТК является ранним чувствительным маркером атеротромбоза. Насколько формирование ЛТК и местный уровень воспаления способствуют микрососудистой дисфункции и влияют на результаты лечения у пациентов с ОКС, еще предстоит определить в ходе дальнейшего изучения этого феномена. Будущие исследования должны быть направлены на понимание роли тромбоцитарно-лейкоцитарных агре-

гатов в патогенезе сосудистых заболеваний, их применение в качестве диагностического инструмента, а также на разработку возможных терапевтических последствий ингибирования их формирования.

Благодарность

Работа Н.В. Пинегиной выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации, договор № 14.B25.31.0016.

Литература/References

1. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. *Pulm. Circ.* 2013; 3: 329–40.
2. Morel O., Jesel L., Freyssinet J.M., Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 15–26.
3. Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Bernimoulin M., Stern J.N., Ponomarev E.D., Duckett L. et al. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell. Biol.* 2013; 14: 23.
4. Vagida M., Grivel J.-C., Arakelyan A., Ryazankina N., Lebedeva A., Shpektor A. et al. Platelet-derived extracellular vesicles in blood of patients with acute coronary syndrome. *J. Extracell. Vesicles.* 2015; 4: 126.
5. Vagida M.S., Arakelyan A., Lebedeva A.M., Grivel J.-C., Shpektor A.V., Vasilieva E.Yu. et al. Analysis of extracellular vesicles using magnetic nanoparticles in blood of patients with acute coronary syndrome. *Biochemistry.* 2016; 81: 382–91.
6. Feng B., Chen Y., Luo Y., Chen M., Li X., Ni Y. Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2010; 208: 264–9.
7. Loyer X., Vion A.C., Tedgui A., Boulanger C.M. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ. Res.* 2014; 114: 345–53.
8. Mause S.F., Von Hundelshausen P., Zernecke A., Koenen R.R., Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 1512–8.
9. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell. Biol.* 2013; 200: 373–83.
10. Passacuale G., Vamadevan 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.
11. Forlow S.B., McEver R.P., Nollert M.U. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet

- microparticles under flow. *Blood*. 2000; 95: 1317–23.
12. Granja T., Schad J., Sch P., Fischer C., Helene H., Rosenberger P. et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes – a new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thromb. Res.* 2015; 136: 786–96.
 13. Xiao Z., Thérroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 43: 1982–8.
 14. Box C.L., Yates C., Chimen M., Harrison M., Nash G., Watson S. et al. The formation of monocyte-platelet aggregates in stirred whole blood in response to different platelet agonists. *Atherosclerosis*. 2014; 232: 257–422, e1–e104.
 15. Gabbasov Z., Ivanova O., Kogan-Yasny V., Ryzhkova E., Saburova O., Vorobyeva I. et al. Activated platelet chemiluminescence and presence of CD45+ platelets in patients with acute myocardial infarction. *Platelets*. 2014; 25: 405–8.
 16. Brambilla M., Camera M., Colnago D., Marenzi G., De Metrio M., Giesen P.L. et al. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 947–53.
 17. Østerud B., Olsen J.O. Human platelets do not express tissue factor. *Thromb. Res.* 2013; 132: 112–5.
 18. Del Conde I., Shrimpton C.N., Thiagarajan P., Lo A. Tissue-factor – bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005; 106: 1604–11.
 19. Scholz T., Temmler U., Krause S., Heptinstall S., Lösche W. Transfer of Tissue Factor from Platelets to Monocytes: Role of Platelet-Derived Microvesicles and CD62P. *Thromb. Haemost.* 2002; 88: 1033–9.
 20. Sims P.J., Wiedmer T., Esmon C.T., Weiss H.J., Shattil S.J. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. studies in scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 17049–57.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Furman M.I., Benoit S.E., Barnard M.R., Valeri C.R., Borbone M.L., Becker R.C. et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 31: 352–8.
 24. 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.
 25. Aurigemma C., Scalone G., Fattorossi A., Sestito A., Lanza G.A., Crea F. Adenosine inhibition of adenosine diphosphate and thrombin-induced monocyte-platelet aggregates in cardiac syndrome X. *Thromb. Res.* 2009; 24: 116–20.
 26. Neumann F.J., Zohlh ofer D., Fakhoury L., Ott I., Gawaz M., Sch mig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; 34: 1420–6.
 27. McCabe D.J.H., Harrison P., Mackie I.J., Sidhu P.S., Lawrie A.S., Watt H. et al. Platelet degranulation and monocyte – platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br. J. Haematol.* 2004; 125: 777–87.
 28. Klinkhardt U., Bauersachs R., Adams J., Graff J. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003; 73: 232–41.
 29. Graff J., Harder S., Wahl O., Scheuermann E.-H., Gossmann J. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2005; 78: 468–76.
 30. Harding S.A., Sarma J., Din J.N., Maciocia P.M., Newby D.E., Fox K.A.A. Clopidogrel reduces platelet-leukocyte aggregation, monocyte activation and RANTES secretion in type 2 diabetes mellitus. *Heart*. 2006; 92: 1335–7.
 31. Tuttle H.A., Davis-Gorman G., Goldman S., Copeland J.G., McDonagh P.F. Platelet-neutrophil conjugate formation is increased in diabetic women with cardiovascular disease. *Cardiovasc. Diabetol.* 2003; 2: 1–16.
 32. Sener A., Ozsavci D., Oba R., Demirel G.Y., Uras F., Yardimci K.T. Do platelet apoptosis, activation, aggregation, lipid peroxidation and platelet-leukocyte aggregate formation occur simultaneously in hyperlipidemia? *Clin. Biochem.* 2005; 38: 1081–7.
 33. Wang Y., Li Z., Wang W. Platelet-leukocyte interaction in atherosclerosis and atherothrombosis: what we have learnt from human studies and animal models. *J. Cardiol. Ther.* 2014; 1: 92–7.
 34. Wang J., Zhang S., Jin Y., Qin G., Yu L., Zhang J. Elevated levels of platelet – monocyte aggregates and related circulating biomarkers in patients with acute coronary syndrome. *Int. J. Cardiol.* 2007; 115: 361–5.

35. Czepluch F.S., Kuschicke H., Dellas C., Riggert J., Hasenfuss G., Sch K. Increased proatherogenic monocyte – platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J. Intern. Med.* 2014; 275: 144–54.
36. Lukasik M., Dworacki G., Kufel-Grabowska J., Watala C., Kozubski W. Upregulation of CD40 ligand and enhanced monocyte-platelet aggregate formation are associated with worse clinical outcome after ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.* 2012; 107: 346–55.
37. McCabe D.J.H., Harrison P., Mackie I.J., Sidhu P.S., Purdy G., Lawrie A.S. et al. Increased platelet count and leucocyte–platelet complex formation in acute symptomatic compared with asymptomatic severe carotid stenosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2005; 76: 1249–54.
38. 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.
39. Nagy B., Jr, Kerényi A., Clemetson K.J., Kappel-mayer J. Potential Therapeutic Targeting of Platelet-Mediated Cellular Interactions in Atherosclerosis and Inflammation. *Curr. Med. Chem.* 2012; 19: 518–31.
40. Rainger G.E., Chimen M., Harrison M.J., Yates C.M., Harrison P., Watson S.P. et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets.* 2015; 26: 507–20.
41. Scholz T., Zhao L., Temmler U., Bath P., Heptinstall S., Wolfgang L. The GPIIb / IIIa antagonist eptifibatide markedly potentiates platelet – leukocyte interaction and tissue factor expression following platelet activation in whole blood in vitro. *Platelets.* 2002; 13: 401–6.
42. Barnard M.R., Linden M.D., Frelinger A.L., Li Y., Fox M.L., Furman M.I. et al. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3: 2563–70.
43. Barr J., Barr J., Meurice M., Motto D. Scanning Electron Microscopy Study of Endothelial Injury and Thrombus Formation in WT and VWF Deficient Mice. *Blood.* 2009; 114: 3062.
44. Bournazos S., Rennie J., Hart S.P., Fox K.A.A., Dransfield I. Monocyte functional responsiveness after PSGL-1-mediated platelet adhesion is dependent on platelet activation status. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 1491–8.
45. 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.
46. 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.* 2012; 82 (6): 353–9.

Поступила 14.09.2016