

НАУКОВІ ОГЛЯДИ

Є.Ф. Барінов, І.А. Прилуцкая, О.Н. Сулаєва, А.М. Кит, Ю.І. Рябчук, С.А. Мамедалиєва

МЕХАНИЗМЫ ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ. ОБЗОР

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина

Реферат. Взаимодействия между клетками крови в виде формирования клеточных агрегатов наблюдаются при различных физиологических и патологических состояниях. Условием образования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов является активация, по крайней мере, одного типа клеток при действии широкого спектра регуляторов. Тромбоциты, благодаря экспрессии специфических адгезионных молекул, Toll-like рецепторов, секреции хемокинов, цитокинов и метаболитов арахидоновой кислоты, способны устанавливать сигнальные и адгезионные взаимосвязи с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами. Это не только обуславливает связь между процессами тромбогенеза и воспаления, но и определяет роль тромбоцитов в реализации специфического и неспецифического иммунитета. Последнее играет важную роль в развитии и прогрессировании многих заболеваний человека, что предусматривает стереотипность реакции периферической крови — с образованием тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов. Изучение специфики и механизмов тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий при разных заболеваниях позволит использовать анализ тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов для прогнозирования исхода патологического процесса и оценки эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: тромбоцит, лейкоцит, тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты, воспаление, гемостаз.

Современная концепция патогенеза большинства заболеваний сердечно-сосудистой системы базируется на констатации роли и изучения механизмов развития воспалительного процесса как в стенке сосудов, так и в периваскулярном регионе органов. Если ранее считали, что атеросклероз — это болезнь накопления липидов, то сегодня в первую очередь обсуждают роль воспаления, вовлеченного во все этапы патологического процесса: от начального — повреждения сосудистой стенки, до конечного — развития тромботических осложнений [1, 33]. Однако, констатируя развитие воспалительных изменений в стенке артерий при атеросклерозе, и обсуждая роль эндотелия, моноцитов и гладкомышечных клеток, исследователи зачастую обходят вниманием тромбоциты. Сходная ситуация имеет место в случае острого воспаления, сопровождающего, например, раневой процесс, а также — при синдроме дизрегенерации, развивающемся, например, в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта при язвенной болезни. Естественно возникает вопрос — участвуют ли тромбоциты в воспалительной реакции?

С одной стороны, тромбоциты входят в число показателей острой фазы воспаления при сепсисе, опухолях, кровотечениях, что отражает их

важное свойство — реактивность, и предполагает участие цитокинов (ИЛ-3, ИЛ-6 и ИЛ-11 и др.) в развитии тромбоцитоза при воспалении [1, 33]. С другой стороны, изменение количества тромбоцитов не является достаточным аргументом для подтверждения роли тромбоцитов в воспалительном процессе. Следует заметить, что воспаление сопровождается изменением не только количества, но и функционального статуса тромбоцитов.

Роль тромбоцитов в воспалении

Тромбоциты в настоящее время признаются многофункциональными форменными элементами крови, которые играют важную роль не только в гемостазе, но и в воспалительных и антимикробных процессах. При активации они секретируют широкий спектр провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста, и, хотя они не имеют ядра, в них происходит сигнал-зависимая трансляция резидуальной мРНК и, как следствие, *de novo* синтез белков, например, интерлейкина-1 (ИЛ-1).

В норме тромбоциты циркулируют в покое, их спонтанную активацию предупреждает эндотелий, являющийся источником ингибиторов тромбообразования — простагландина I₂ и оксида азота. Активация тромбоцитов происходит при повреждении эндотелия, снижении продукции физиологических антиагрегантов или экспозиции фактора фон Виллебранда. Тромбоциты являются мишенью многочисленных факторов, включая элементы внеклеточного матрикса (коллагены, протеогликаны, тенасцин, фибронектин, тканевой фактор); гуморальные факторы (адреналин, серотонин); паракринные регуляторы (метаболиты арахидоновой кислоты, пурины, фактор фон Виллебранда, фактор активации тромбоцитов); ферменты (коагуляционные факторы, протеазы из активированных полиморфно-ядерных лейкоцитов, включая катепсин G, металлопротеиназы — MMPs); хемокины или другие медиаторы воспаления. Независимо от природы, различные агонисты при активации тромбоцитов вызывают не только изменение их формы за счет ремоделирования цитоскелета и секрецию гранул, но и экспрессию гликопротеинов и Р-селектина на поверхности тромбоцитов. Активация тромбоцитов проявляется не только адгезией к эндотелию и агрегацией, ведущих к образованию тромба, но и сопровождается инициацией провоспалительных событий [39]. Изучение мо-

лекулярной биологии тромбоцитов в последние годы выявило ряд фактов, демонстрирующих возможность и важность их участия в воспалении. Несмотря на отсутствие ядра, тромбоциты способны не только к депонированию ряда биологически активных веществ, но и к их синтезу. Список активных агентов в тромбоцитах значимо расширился благодаря новым технологиям, включая протеомический и липидомический анализ, а также анализ транскриптов мРНК. К доказательствам участия тромбоцитов в воспалении можно отнести:

- способность секретировать хемокины и наличие рецепторов к ним на плазмолемме тромбоцитов [1, 33, 39];

- генерацию активных радикалов кислорода стимулированными тромбоцитами [1];

- присутствие на плазмолемме Toll-like рецепторов [1, 35];

- продукцию тромбоцитами липидных медиаторов воспаления и факторов разрешения воспалительного ответа [1];

- взаимодействие тромбоцитов с системой комплемента [1, 32];

- продукцию тромбоцитами антимикробных факторов и киноцидинов [1];

- секрецию металлопротеиназ тромбоцитами, что определяет их участие в ремоделировании сосудов и периваскулярных тканей [1, 15].

Однако, особого внимания заслуживают контактные взаимодействия между тромбоцитами и лейкоцитами, возможные благодаря наличию на тромбоцитах рецепторов адгезии к эндотелию и лейкоцитам [1, 25], и ведущие к формированию тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов (ТЛА).

ТЛА как биомаркеры заболеваний

На сегодняшний день однозначно доказано, что активированные тромбоциты в кровотоке связываются с лейкоцитами, причем тромбоциты могут взаимодействовать с лейкоцитами как в пристеночном потоке крови, так и формируя циркулирующие ТЛА. Взаимодействия между клетками крови в виде клеточных агрегатов или адгезии наблюдаются при различных физиологических и патологических состояниях. В цельной крови здоровых людей тромбоциты связаны с 3,2 % лимфоцитов, 4,1 % моноцитов и до 2,5 % гранулоцитов [25].

В зависимости от состава и превалирования тех или иных компонентов, принято выделять тромбоцитарно-лейкоцитарные и лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты. Условием образования ТЛА является активация, по крайней мере, одного типа клеток. То есть инициаторами формирования ТЛА могут быть как лейкоциты, так и тромбоциты. Специфика взаимодействия между ними определяется природой причинного фактора, спектром освобождаемых регуляторов и экспонируемых на поверхности форменных элементов крови молекул [34]. В любом случае, формирование ТЛА закономерно считают однозначным признаком активации тромбоцитов. Доказана связь между количеством циркулиру-

ющих ТЛА и выраженностью атеросклеротического повреждения при остром коронарном синдроме, инсульте и поражении периферических сосудов [25, 36]. Ряд исследователей считают повышение количества ТЛА в периферической крови ранним маркером острого инфаркта миокарда [14]. Формирование ТЛА после чрескожных коронарных вмешательств рассматривается как прогностический индекс острой повторной окклюзии [19, 37].

Однако имеющиеся в литературе доказательства чувствительности ТЛА, как биомаркера нарушения сердечно-сосудистого гомеостаза, не снимают вопрос и сомнения в отношении специфичности данного признака. Действительно, увеличение количества циркулирующих ТЛА показано при различных состояниях, включая сахарный диабет, муковисцидоз, бронхиальную астму, преэклампсию, плацентарную недостаточность, мигрень, системную красную волчанку, ревматоидный артрит. ТЛА присутствуют в крови во время гемодиализа, при синдроме полиорганной недостаточности при сепсисе, антифосфолипидном синдроме, воспалительных заболеваниях кишечника, миелопролиферативных заболеваниях, болезни Кавасаки и болезни Альцгеймера [25].

Очевидно, формирование ТЛА является стереотипным процессом, отражающим универсальную реакцию организма на повреждение. Несмотря на такой простой вывод, механизмы формирования агрегатов весьма сложны и до сих пор окончательно не изучены.

Механизмы образования ТЛА

Лейкоцитарно-тромбоцитарная агрегация вносит существенный вклад в миграцию клеток, развитие воспаления и тромбообразование. Активированные тромбоциты в кровотоке связываются с лейкоцитами, образуя ТЛА за счет быстрого обратимого взаимодействия Р-селектина на поверхности тромбоцита с лигандом Р-селектина (PSGL-1) на плазмолемме лейкоцитов [25]. Экспрессия тромбоцитарных маркеров активации, таких как Р-селектин и CD63, возрастает при разных заболеваниях [14, 36], что позволяет использовать Р-селектин как маркер внутрисосудистой активации тромбоцитов и воспаления. Однако недавние исследования показали, что ТЛА являются более стабильным маркером тромбоцитарной активации, чем Р-селектин, поскольку дегранулированные тромбоциты быстро теряют свои поверхностные антигены, включая Р-селектин [14, 36]. Тромбоциты передают модулирующие сигналы нейтрофилам, моноцитам и различным подклассам лимфоцитов через рецепторы адгезии и широкий спектр секретируемых растворимых медиаторов. В свою очередь, продуцируемые лейкоцитами регуляторы, в том числе протеазы, активные радикалы кислорода и оксид азота, могут модулировать тромбоцитарный ответ. Одним из медиаторов сигнальной взаимосвязи между тромбоцитами и лейкоцитами являются хемокины.

Таблица 1. Хемокины тромбоцитов и их рецепторы

Тромбоцитарный хемокин	Общепринятое название	Рецепторы на клетках-мишенях	Тромбоцитарные рецепторы к хемокинам
CXCL1	GRO α	CXCR2>CXCR1	CCR1
CXCL4	PF4	CXCR3B, GAG	CCR3
CXCL4L1	PF4alt	не известен	CCR4
CXCL5	ENA-78	CXCR2	CXCR4
CXCL7	NAP-2	CXCR2>CXCR1	CX3CR1
CXCL8	IL8	CXCR1, CXCR2	
CXCL12	SDF-1 α	CXCR4	
CCL2	MCP-1	CCR2	
CCL3	MIP-1 α	CCR1, 2, 3	
CCL5	Rantes	CCR1, 3, 4, 5	
CCL17	TARC	CCR4, CCR8	

Примечание: Согласно номенклатуре, выделяют 2 основные группы хемокинов – CC и CXC. Эти символы относятся к аминокислотным остаткам, Cys-Cys или Cys-X-Cys, где X представлен любой другой аминокислотой. Суффиксы L и R используются для обозначения лиганда или рецептора, соответственно.

Хемокины – как фактор коактивации тромбоцитов и лейкоцитов

Одним из классов регуляторов, обеспечивающих коактивацию и взаимостимуляцию тромбоцитов и лейкоцитов, являются хемокины. Хемокины тромбоцитов разнообразны (таблица 1) и включают CC хемокины (RANTES, MCP-1, MIP-1 α , TARC) и CXC хемокины (тромбоцитарный фактор-4, ENA-78, GRO β), а также β -тромбоглобулина (преобразованный в CXC хемокин NAP-2 нейтрофильным катепсином G), CD40L и TREM-1 лиганд [38]. При тесных взаимодействиях мембран лейкоцитов и тромбоцитов эти посредники могут активировать родственные рецепторы и вызывать немедленный и/или отсроченный ответ в иммунных клетках. Вместе эти сигналы индуцируют немедленный ответ в лейкоцитах, включая полную активацию интегринов и прочную адгезию, хемотаксис и миграцию, секрецию гранул и продукцию активных радикалов кислорода.

Одним из наиболее важных хемокинов тромбоцитов считается RANTES, который связывается с эндотелием при атеросклеротическом поражении и образует хемотрактантную поверхность для моноцитов [38]. RANTES совместно с P-селектином принимают участие в индукции экспрессии моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) [39], способствуя привлечению и рекрутированию моноцитов в зону повреждения сосудистой стенки.

На сегодняшний день на поверхности тромбоцитов идентифицировано более 50 видов рецепторов к хемокинам, которые представлены низкомолекулярными белками (7-12 kDa). Одним из недавних открытий стал CXCR4, рецептор к фактору, выделенному из стромальных клеток 1 α – CCR4 (*stromal derived factor* – SDF-1 α /CXCL12), который активируется хемокином, выделяемым макрофагами (MDC/CCL22) [28]. Кроме того, тромбоциты имеют рецепторы к хемокинам CCR1, CCR2, и CX3CR1, которые активируются RANTES (CCL5), MCP-1 (CCL2),

и CX3CL1, соответственно. Хемокиновые рецепторы сопряжены с G $_i$ -типом белков и медируют слабую активацию тромбоцитов [28]. Однако они способны потенцировать эффекты других стимулов. Есть масса доказательств, что секреция и презентация хемокинов тромбоцитами, как и активация тромбоцитов хемокинами, играет важную роль в развитии атеросклеротического поражения сосудов [28].

Тканевой фактор в модуляции тромбоцитарно-лейкоцитарных отношений

Тканевой фактор (ТФ) относится к семейству рецепторов к цитокинам II класса, и, следовательно, активируется при связывании с цитокинами. Помимо этого, ТФ может связывать фактор VIIa коагуляционной системы плазмы крови, что важно для промоции каскада свертывающей системы плазмы крови и ведет к активации сигнальных процессов в клетке-носителе ТФ, определяя важную роль последнего в таких биологических процессах, как ангиогенез, пролиферация и апоптоз. Классическими носителями ТФ, то есть клетками, экспрессирующими данный многофункциональный рецептор-регулятор, являются стромальные клетки – фибробласты и миофибробласты, а также эндотелий и гладкие миоциты. В норме форменные элементы крови не экспрессируют ТФ, однако при действии медиаторов воспаления в лейкоцитах зарегистрирована инициация синтеза и экспозиции ТФ на плазмолемме [24]. Помимо моноцитов/макрофагов, возможность экспрессии ТФ доказана для эозинофилов и нейтрофилов. Важно, что для нейтрофилов эссенциальными индукторами экспрессии ТФ являются P-селектин, экспрессируемый на поверхности тромбоцитов, и fMLP [24] или компонент комплемента C5a [32].

Нужно отметить, что факт экспрессии ТФ нейтрофилами является одной из наиболее дискуссионных проблем в иммунологии и гемостазиологии. Контраргументом вышеупомянутым исследованиям, продемонстрировавшим присут-

стии мРНК ТФ в нейтрофилах [24], является гипотеза о возможности получения нейтрофилами ТФ от моноцитов в результате трансфера с помощью микрочастиц [7]. Действительно, активация моноцитов сопровождается повышением образования микрочастиц, содержащих ТФ. Однако прямых доказательств моноцитарного происхождения ТФ в нейтрофилах пока нет. Аналогичной дилеммой является также факт присутствия ТФ в тромбоцитах. Показано наличие ТФ как на поверхности тромбоцитов, так и появление ТФ в супернатанте активированных тромбоцитов, отражающее, по сути, факт секреции ТФ тромбоцитами [3]. Кроме того, в ряде исследований показано присутствие мРНК и пре-мРНК ТФ в тромбоцитах [3], что предусматривает возможность самостоятельной экспрессии ТФ тромбоцитами. Однако, если роль экспрессии ТФ моноцитами в патогенезе различных заболеваний уже доказана, то значение нейтрофильного и тромбоцитарного ТФ *in vivo* остается темой для дальнейшего исследования.

Возвращаясь к вопросу о моноцитарном ТФ, нельзя не вспомнить исследования Niemetz and Marcus [27], которые еще в 70-х годах прошлого столетия продемонстрировали роль тромбоцитов в стимуляции экспрессии ТФ в мононуклеарных клетках. Интересно, что аналогичный эффект на моноциты оказывала стимуляция бактериальным липополисахаридом (LPS). Моноцитарная экспрессия ТФ прямо пропорциональна количеству и активности тромбоцитов [2]. При этом прием антиромбоцитарных препаратов (аспирина или клопидогреля) снижает экспрессию ТФ в моноцитах [9]. Закономерно, что коинкубация тромбоцитов и моноцитов с арахидоновой кислотой приводит к повышению экспрессии ТФ в моноцитах. Последнее связывают с продуктами липоксигеназной ветви метаболизма арахидоновой кислоты, включая 12-гидрокси-эйкозатетраеновую кислоту (12-НЕТЕ). В дополнение к 12-НЕТЕ, другой хорошо известный тромбоцитарный регулятор-хемокин – тромбоцитарный фактор (PF4) – также усиливает экспрессию ТФ в стимулированных моноцитах [8].

Примечательно, что в дополнение к индукции ТФ, тромбоцитарно-моноцитарные взаимодействия сопровождаются увеличением экспрессии MCP-1 и интерлейкина-8, что дополнительно может вызывать коактивацию нейтрофилов [4]. При этом не исключается и обратный эффект – возможность модуляции гранулоцитами экспрессии ТФ и характера тромбоцитарно-моноцитарных взаимодействий. Так, высвобождение гранулоцитарного лизосомального фермента катепсина G, который индуцирует активацию тромбоцитов, приводит к увеличению моноцитарного ТФ [17]. Интересно, что, помимо клеточного, существует и свободный пул ТФ, называемый «blood borne» ТФ [16], присутствие которого в крови связывают с микрочастицами. Как известно, большинство эукариотических клеток при стимуляции или индукции апоптоза образуют микрочастицы. TF-позитивные микро-

частицы обнаружены в свежих образцах крови здоровых лиц, их количество намного выше у пациентов с онкологическими заболеваниями, интоксикацией и сердечно-сосудистой патологией [31].

Обязательным условием накопления ТФ в участках повреждения сосуда играет взаимодействие P-селектина со своим лигандом PSGL-1. Предполагается, что микрочастицы лейкоцитарного происхождения, несущие ТФ и PSGL-1, связываются с P-селектином на поверхности активированных тромбоцитов и тем самым способствуют прогрессирующему росту тромба [11]. Не исключено, что взаимодействие P-селектина с PSGL-1 обеспечивает передачу микрочастиц, богатых ТФ, тромбоцитам в процессе образования тромба [11]. Характерно, что инкубация тромбоцитов с моноцитами стимулирует в тромбоцитах экспрессию ИЛ-1 β , ИЛ-6, и TNF α [6]. При этом, как известно, ИЛ-1 β и ИЛ-6 являются мощными активаторами лейкоцитов и эндотелиальных клеток, инициируя в них провоспалительный каскад, включая продукцию медиаторов воспаления. К тому же, TNF α является мощным воспалительным фактором, индуцирующим активацию клеток и апоптоз [33].

Активированные тромбоциты также стимулируют продукцию матриксных металлопротеиназ-9 (MMP-9) в моноцитах [15]. MMP-9 разрушает фибриллярный коллаген в атеросклеротических бляшках и способствует снижению ее стабильности [15].

Рецепторные механизмы взаимодействия тромбоцитов с лейкоцитами

Адгезионные взаимодействия между тромбоцитами и лейкоцитами реализуются через ряд рецепторов/контррецепторов [25]. Начальная адгезия тромбоцитов к лейкоцитам происходит через тромбоцитарный P-селектин, который связывается с PSGL-1 на поверхности лейкоцитов [25]. Формирование молекулярной пары «P-селектин – PSGL-1» считается ключевым событием в инициации адгезии и эссенциальным условием формирования более прочных соединений посредством интегринов. Связывание PSGL-1 вызывает конформационные изменения $\beta 2$ интегринов нейтрофилов, включая Mac-1 (известный также как интегрин $\alpha M\beta 2$ и CD11b/CD18), что усиливает адгезию нейтрофилов к тромбоцитам [30]. Аналогичным образом, в моноцитах и лимфоцитах связывание с тромбоцитами усиливает адгезию $\beta 1$ и $\beta 2$ интегринов в моноцитах (Mac-1) и способствует хомингу лимфоцитов при реализации иммунных реакций [5]. Стабилизация ТЛА происходит через связывание лейкоцитарного поверхностного Mac-1 к тромбоцитарному гликопротеину Ib (GPIb). Кроме того, лейкоцитарный Mac-1 связывается с тромбоцитарным поверхностным интегрином $\alpha 1\beta 3$ (лигандом которого в процессе тромбогенеза является фибриноген) и/или с тромбоцитарной поверхностной молекулой адгезии 3 (JAM-3). Кроме того, молекулы адгезии JAM A и C на поверхности активированных тромбоцитов медируют прикрепление к рецепторам адгезии LFA-1 и Mac-1 на лейкоцитах [5, 30].

Изучение молекулярных механизмов активации интегринов лейкоцитов показало, что связывание Р-селектина с PSGL-1 приводит к SFK-зависимому фосфорилированию Nef-связанного фактора 1 (Naf-1), который связан с цитоплазматическим доменом PSGL-1. Фосфорилированный Naf-1 рекрутирует фосфотидилинозитол-3-киназу p85-p110 δ , которая затем медирует активацию Mac-1 [30]. Кроме того, SFK-опосредованный *outside-in* сигнал, который преобразуется с помощью Mac-1 и приводит к фосфорилированию богатой пролином тирозинкиназы-2 (Puk2), необходим для стабилизации интегриновой адгезии [10, 30]. Прикрепление лейкоцитов к тромбоцитарному Р-селектину не только вызывает быструю активацию β 2 интегрина, но также запускает отсроченный ответ, который включает в себя экспрессию генов и синтез белка; это имеет основополагающее значение для приобретения лейкоцитами воспалительного фенотипа. Отсроченный ответ требует согласованных действий *outside-in* сигнализации, которая передается с помощью рецепторов адгезии (в основном PSGL-1 и β 2-интегрины) и сигналов, преобразованных хемокиновыми или цитокиновыми рецепторами. Например, Р-селектин и RANTES оказывают согласованное действие на моноциты, вызывая активацию NF- κ B и стимулируя синтез MCP-1 и ИЛ-8 [39].

Продолжительное взаимодействие с активированными тромбоцитами вызывает экспрессию индуцибельной формы циклооксигеназы (ЦОГ-2) в моноцитах [6] за счет активации NF- κ B при связи Р-селектина с PSGL-1. Стабилизации mPHK ЦОГ-2, трансляции фермента и активации метаболизма арахидоновой кислоты в моноцитах способствует эффект ИЛ-1 β , который также синтезируется при тромбоцитарно-моноцитарных взаимодействиях. Описанный эффект взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов на ЦОГ-2 и продукцию провоспалительных эйкозаноидов демонстрирует потенциальный механизм, посредством которого тромбоцитарно-моноцитарная агрегация может способствовать развитию хронического воспаления и ишемической болезни сердца.

Специфика тромбоцитарно-моноцитарных взаимодействий

В последнее десятилетие были описаны два других адгезионных белка, имеющие отношение к клеточным взаимодействиям — CD40 и CD40 лиганд (CD40L, или CD154). Последний экспонируется на поверхности тромбоцитов после стимуляции и может взаимодействовать с его контррецептором CD40, присутствующим на моноцитах/макрофагах и лимфоцитах. Взаимодействие CD40L-CD40 не только способствует клеточной адгезии, но и вызывает дифференцировку моноцитов в макрофаги, что сопровождается активацией секреции хемокинов и цитокинов, активацией рецепторов адгезии и протеаз [22]. Связывание CD40 также ведет к освобождению матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов (MMP-2 и MMP-9), которые способствуют деградации внеклеточного матрикса и ремоделированию тка-

ней в зоне воспаления [15]. При этом MMP-2 оказывает стимулирующий эффект на активность тромбоцитов, тогда как эффект MMP-9 — ингибирующий [15]. CD40L также способствует освобождению костимулирующих сигналов для антиген-презентирующих клеток. Механизм передачи сигнала с CD40 включает несколько сигнальных путей. Среди них, в первую очередь, стоит отметить активацию тирозинкиназ, фосфоинозитид-3-киназы и фосфолипазы $C\gamma$ 2. Конечным итогом запуска сигнальных каскадов является активация специфических транскрипционных факторов, включая NF- κ B и NF- κ B-подобный транскрипционный фактор [22].

Специфика тромбоцитарно-нейтрофильных взаимодействий

В реализации взаимодействий тромбоцитов с нейтрофилами идентифицирована дополнительная пара рецептор/контррецептор. Это нейтрофильный поверхностный TREM-1 и тромбоцитарный поверхностный TREM-1 лиганд [18]. TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells) — триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках. Эта молекула была описана в 2000 г. и вскоре была обнаружена на тромбоцитах. Начальные исследования показали провоспалительную роль TREM, в дальнейшем в отношении TREM-2 были выявлены противоположные свойства и участие в противовоспалительных событиях. Поверхностная тромбоцитарная экспрессия TREM-1 лиганда не активируется активацией тромбоцитов, и связывание TREM-1 с TREM-1 лигандом на тромбоците не приводит к активации тромбоцитов. Взаимодействие между TREM-1 и TREM-1 лигандом не является обязательным для образования тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов, но приводит к увеличению активации нейтрофилов, определяющейся активацией респираторного взрыва и высвобождением интерлейкина 8 [18].

Кроме активации нейтрофилов, TREM-1 также экспрессируется на моноцитах [20]. Таким образом, функциональные последствия связывания моноцитарного поверхностного TREM-1 с тромбоцитарным поверхностным TREM-1 лигандом также требуют дальнейшего исследования. Одним из наиболее показательных примеров роли TREM-1/TREM-1 лиганд является TREM-1-опосредованная активация тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов при сепсисе [20], в связи с чем обсуждается возможность таргетной коррекции взаимодействий в этой паре рецептор/контррецептор при лечении сепсиса. Изучение взаимодействий TREM-1/TREM-1 лиганда может также оказаться полезным при других воспалительных заболеваниях, сопровождающихся образованием моноцитарно-тромбоцитарных и нейтрофильно-тромбоцитарных агрегатов.

Наконец, тромбоцитарно-нейтрофильные взаимодействия могут способствовать иммунной защите, стимулируя образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) [12]. Основной функцией НВЛ является захват и уничтоже-

ние патогенов [12]. НВЛ образуются за счет активации нейтрофилов в процессе, называемом нетоз. НВЛ – особый вид ловушки, образованный деконденсированными волокнами хроматина с антимикробными факторами, освобожденными из гранул. Наиболее важным специфическим отличием является наличие во внеклеточном пространстве нейтрофильной ДНК. НВЛ образуются нейтрофилами при контакте с патогенами, такими как бактерии, грибки, вирусы и простейшие, а также при взаимодействии с активированными тромбоцитами или химическими соединениями (на-пример, форбол-12-миристат-13-ацетат, медиаторы воспаления) [12].

Молекулярные механизмы, связывающие продукцию АФК с деконденсацией хроматина и его объединением с антимикробными белками, пока недостаточно изучены. Высвобождение НВЛ изолированными нейтрофилами человека происходит через 2-4 часа после стимуляции микробами или активаторами протеинкиназы С. При стимуляции нейтрофилов тромбоцитами, активированными ЛПС, НВЛ высвобождаются намного быстрее (предполагается, что это происходит при сепсисе).

После стимуляции хроматин нейтрофилов деконденсируется. Дальнейшие события описаны в виде феномена «перемешивания» эухроматина и гетерохроматина [12]. Этот процесс опосредуется ферментами, хранящимися в азурофильных гранулах, ней-трофильной эластазой и миелопероксидазой, которые перемещаются в ядро посредством пока неизвестных механизмов. При этом нейтрофильная эластаза разрушает гистон H1 и коровые гистоны, что приводит к деконденсации хроматина, которая усиливается миелопероксидазой, независимо от ферментативной активности последней [29]. Кроме того, во время образования НВЛ гистон H3 подвергается модификации – цитруллинизации («*citullination*») – суть которой заключается в преобразовании остатков аргинина в цитруллин [21]. Цитруллинизация гистонов катализируется пептидил-*аргинин-деиминазой* 4 (PAD4), которая локализована в ядре нейтрофилов. Впоследствии ядерная оболочка дезинтегрируется, хроматин распространяется внутри клетки и смешивается с антимикробными факторами. Наконец, клеточная мембрана разрушается, выпуская НВЛ [21].

Поскольку нетоз сопровождается дезинтеграцией ядерной и клеточной мембран для выпуска НВЛ, предполагают, что ключевую роль в реализации нетоза играет индукция ремоделирования цитоскелета нейтрофилов, а одним из индукторов может быть Мас-1 [26]. Тем не менее, точные стимулы и механизмы, участвующие в выборе дальнейшего ответа (фагоцитоз, апоптоз или нетоз) все еще неизвестны. Во время активации нейтрофилы продуцируют большое количество АФК посредством НАДФН оксидазы. Доказано, что АФК также инициируют образование НВЛ [12]. Например, нейтрофилы пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) не мо-

гут продуцировать НВЛ. Это связано с тем, что при данной патологии вследствие мутации ограничена активность НАДФН-оксидазы. Интересно, что лечение нейтрофилов H_2O_2 при ХГБ восстанавливает их способность образовывать НВЛ [12]. Таким образом, при активации нейтрофилов тромбоцитами через Р-селектин-PSGL-1 с вовлечением Мас-1 и активацией респираторного взрыва запускается образование НВЛ.

В свою очередь, НВЛ могут захватывать и активировать тромбоциты [23]. Благодаря сетевидной структуре, НВЛ связывают тромбоциты прямо или косвенно, обеспечивая поддержание их агрегации [23]. Связывание тромбоцитов с НВЛ опосредовано через Toll-like рецепторы [35], а также может осуществляться за счет электростатических взаимодействий между гистонами НВЛ и фосфолипидами или олигосахаридами плазмолеммы тромбоцитов. Показано также, что взаимодействия тромбоцитов с НВЛ могут быть опосредованы молекулами адгезии при участии фактора фон Виллебранда, фибронектина или фибриногена [23, 13]. Кроме того, тромбоциты, связанные с НВЛ, могут быть активированы компонентами НВЛ, особенно гистонами, через стимуляцию тока кальция [13] или нейтрофильными протеазами, которые протеолитически активируют тромбоцитарные рецепторы. Этот процесс может ускоряться, так как активированные тромбоциты вызывают дальнейшую стимуляцию нейтрофилов и образование НВЛ [13].

Таким образом, тромбоциты, благодаря экспрессии специфических адгезионных молекул, TLRs, секреции хемокинов, цитокинов и метаболитов АК, способны устанавливать сигнальные и адгезионные взаимосвязи с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами. Это не только определяет их роль в реализации специфического и неспецифического иммунитета, но также формирует связь между процессами тромбогенеза и воспаления. Последнее играет важную роль в развитии и прогрессировании многих заболеваний человека, что предусматривает стереотипность реакции периферической крови – с образованием тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов. Изучение специфики и механизмов тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий при разных заболеваниях позволит использовать анализ ТЛА для прогнозирования исхода патологического процесса и оценки эффективности проводимой терапии.

E.F. Barinov, I.A. Prylutska, O.N. Sulaieva, A.M. Kit, Yu.I. Ryzbchuk, S.A. Mamedalieva

Mechanisms of Platelet-Leucocyte Interactions under Physiological and Pathological Conditions

The formation of blood cell aggregates occurs under various physiological and pathological conditions. Platelet-leukocyte aggregates are formed under acti-

vation even one type of cells and modulated with a wide range of regulators. Platelets, because of the expression of specific adhesion molecules, Toll-like receptors, secretion of chemokines, cytokines and arachidonic acid metabolites are able to interact with neutrophils, monocytes and lymphocytes. Platelets play important role in innate and adaptive immunity reactions as well as make a bridge between the processes of thrombogenesis and inflammation. The latter plays an important role in the development and progression of many human diseases, which involves stereotypical reaction of peripheral blood with the formation of platelet-leukocyte aggregates. Investigation of the specificity and mechanisms of platelet-leukocyte interactions in various diseases is thought to be useful to predict an outcome of the pathological process and evaluate the effectiveness of the therapy. (Arch. Clin. Exp. Med. – 2014. – Vol. 23, No. 2. – P. 202-209)

Keywords: platelet, leukocyte, platelet-leukocyte aggregates, inflammation, hemostasis

Е.Ф. Барінов, І.О. Прилуцька, О.М. Сулаєва,
А.М. Кіт, Ю.І. Рябчук, С.А. Мамедалієва

Механізми тромбоцитарно-лейкоцитарних взаємодій в нормі та за умов патології

Взаємодії між клітинами крові у вигляді формування клітинних агрегатів спостерігаються при різних фізіологічних та патологічних станах. Умовою утворення тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів є активація, принаймні, одного типу клітин при дії широкого спектра регуляторів. Тромбоцити, завдяки експресії специфічних молекул адгезії, Toll-like рецепторів, секреції хемокінів, цитокінів і метаболітів арахідонової кислоти, здатні встановлювати сигнальні та адгезійні контакти з нейтрофілами, моноцитами і лімфоцитами. Це не тільки формує зв'язок між процесами тромбогенеза та запалення, але й визначає роль тромбоцитів у реалізації специфічного і неспецифічного імунітету. Останнє відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні багатьох захворювань людини, що передбачає стереотипність реакції периферичної крові – з утворенням тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів. Вивчення специфіки та механізмів тромбоцитарно-лейкоцитарних взаємодій при різних захворюваннях дозволить використовувати аналіз тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів для прогнозування результату патологічного процесу та оцінки ефективності проведеної терапії. (Арх. клін. експ. мед. – 2014. – Т. 23, № 2. – С. 202-209)

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сулаєва О. Тромбогенез в нормі и при патологии. Роль тромбоцитов / О. Сулаєва, Э. Барінов, А. Гнило-рыбов – LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. – 416 с.
2. Amirkhosravi A. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay / A. Amirkhosravi, M. Alexander, K. May // Thromb. Haemost. – 1996. – Vol. 75, No 1. – P. 87-95.

3. Camera M. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs / M. Camera, M. Frigerio, V. Toschi // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – Vol. 23, No 9. – P. 1690-1696.
4. Christersson C. Tissue factor and IL8 production by P-selectin-dependent platelet-monocyte aggregates in whole blood involves phosphorylation of Lyn and is inhibited by IL10 / C. Christersson, M. Johnell, A. Siegbahn // J. Thromb. Haemost. – 2008. – Vol. 6, No 6. – P. 986-994.
5. da Costa Martins P. A. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins / P. A. da Costa Martins, J. M. van Gils, A. Mol // J. Leukoc. Biol. – 2006. – Vol. 79, No 3. – P. 499-507.
6. Dixon D. A. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling / D. A. Dixon, N. D. Tolley, K. Bemis-Standoli // J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 116, No 10. – P. 2727-2738.
7. Egorina E. M. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer / E. M. Egorina, M. A. Sovershaev, J. O. Olsen // Blood. – 2008. – Vol. 111, No 3. – P. 1208-1216.
8. Engstad C. S. A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes / C. S. Engstad, K. Lia, O. Rekdal // J. Leukoc. Biol. – 1995. – Vol. 58, No 5. – P. 575-581.
9. Evangelista V. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation / V. Evangelista, S. Manarini, G. Dell'Elba // Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 94, No 3. – P. 568-567.
10. Evangelista V. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets / V. Evangelista, Z. Pamuklar, A. Piccoli // Blood. – 2007. – Vol. 109, No 6. – P. 2461-2469.
11. Falati S. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin / S. Falati, Q. Liu, P. Gross // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 197, No 11. – P. 1585-1598.
12. Fuchs T. A. Extracellular DNA traps promote thrombosis / T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, No 36. – P. 15880-15885.
13. Fuchs T. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann // J. Cell Biol. – 2007. – Vol. 176, No 2. – P. 231-241.
14. Furman M. I. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction / M. I. Furman, M. R. Barnard, L. A. Krueger // J. Am. Coll. Cardiol. – 2001. – Vol. 38, No 4. – P. 1002-1006.
15. Galt S. W. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets / S. W. Galt, S. Lindemann, D. Medd // Circ. Res. – 2001. – Vol. 89, No 6. – P. 509-516.
16. Giesen P. L. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis / P. L. Giesen, U. Rauch, B. Bohrmann // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96, No 5. – P. 2311-2315.
17. Halvorsen H. Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets / H. Halvorsen, J. O. Olsen, B. Штеруд // J. Leukoc. Biol. – 1993. – Vol. 54, No 4. – P. 275-282.
18. Haselmayer P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation / P. Haselmayer, L. Grosse-Hovest, P. von Landenberg // Blood. – 2007. – P. 110, No 3. – P. 1029-1035.
19. Jurk K. Activated monocytes capture platelets for heterotypic association in patients with severe carotid artery stenosis / K. Jurk, M. A. Ritter, C. Schriek // Thromb. Haemost. – 2010. – Vol. 103, No 6. – P. 1193-1202.
20. Klesney-Tait J. The TREM receptor family and signal integration / J. Klesney-Tait, I. R. Turnbull, M. Colonna // Nat. Immunol. – 2006. – Vol. 7, No 12. – P. 1266-1273.

21. *Leshner M.* PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures / M. Leshner, S. Wang, C. Lewis // *Front. Immunol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 307. doi: 10.3389/fimmu.2012.00307.
22. *Li G.* CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury / G. Li, J. M. Sanders, M. H. Bevard // *Am J Pathol.* – 2008. – Vol. 172, No 4. – P.1141-52.
23. *Ma A.* Platelets, neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis / A. Ma, P. Kubes // *J. Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 6, No 3. – P. 415–420.
24. *Maugeri N.* Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation / N. Maugeri, M. Brambilla, M. Camera // *J. Thromb. Haemost.* – 2006. – Vol. 4, No 6. – P. 1323-1330.
25. *Michelson A. D.* Platelets 2nd ed. / A. D. Michelson. – San Diego: Elsevier / Academic Press. – 2007. – 1343 p.
26. *Neeli I.* Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils / I. Neeli, S. N. Khan, M. Radic // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180, No 3. – P. 1895–1902.
27. *Niemetz J.* The stimulatory effect of platelets and platelet membranes on the procoagulant activity of leukocytes / J. Niemetz, A. J. Marcus // *J. Clin. Invest.* – 1974. – Vol. 54, No 6. – P. 1437-1443.
28. *Offermanns S.* Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors / S. Offermanns // *Circulation Research.* – 2006. – Vol. 99, No 12. – P. 1293-1304.
29. *Papayannopoulos V.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K. D. Metzler, A. Hakkim // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 191, No 3. – P. 677–691.
30. *Piccardoni P.* Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin / P. Piccardoni, R. Sideri, S. Manarini // *Blood.* – 2001. – Vol. 98, No 1. – P. 108–116.
31. *Puddu P.* The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases / P. Puddu, G. M. Puddu, E. Cravero // *Can J Cardiol.* – 2010. – Vol. 26, No 4. – P. 140-145.
32. *Ritis K.* A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways / K. Ritis, M. Doumas, D. Mastellos // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 177, No 7. – P. 4794-802.
33. *Ross R.* Atherosclerosis—an inflammatory disease / R. Ross // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – Vol. 340, No 2. – P. 115–126.
34. *Ruef J.* The complement factor properdin induces formation of platelet-leukocyte aggregates via leukocyte activation / J. Ruef, P. Kuehnl, T. Meinertz // *Platelets.* – 2008. – Vol. 19, No 5. – P. 359–364.
35. *Semeraro F.* Extracellular histones promote thrombin generation through platelet- dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4 / F. Semeraro, C. T. Ammollo, J. H. Morrissey // *Blood.* – 2011. – Vol. 118, No 7. – P. 1952–1961.
36. *Shoji T.* Platelet activation is associated with hypoadiponectinemia and carotid atherosclerosis / T. Shoji, H. Koyama, S. Fukumoto // *Atherosclerosis.* – 2006. – Vol. 188, No 1. – P. 190–195.
37. *Tantry U. S.* Hypercoagulability, platelet function, inflammation and coronary artery disease acuity: results of the Thrombotic RiSk Progression (TRIP) study / U. S. Tantry, K. P. Bliden, T. A. Suarez // *Platelets.* – 2010. – Vol. 21, No 5. – P. 360-367.
38. *von Hundelshausen P.* RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium / P. von Hundelshausen, K. S. Weber, Y. Huo // *Circulation.* – 2001. – Vol. 103, No 13. – P. 1772–1777.
39. *Weyrich A. S.* Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes / A. S. Weyrich, M. R. Elstad, R. P. McEver // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 97, No 6. – P. 1525–1534.

Надійшла до редакції: 12.05.2014