

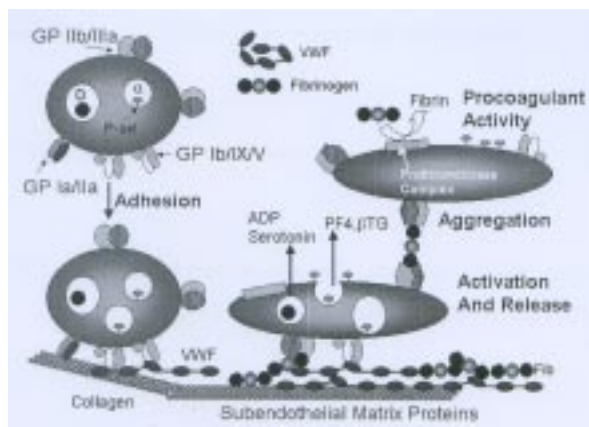
การตรวจวัดเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกายเพื่อเป็นตัวบ่งชี้การเกิดลิ่มเลือด Measurement of *in vivo* activated platelets as a thrombotic marker

สาวตรี เจียมพานิชกุล*

เกล็ดเลือด (platelet) เป็นเม็ดเลือดชนิดหนึ่ง ถูกสร้างขึ้นที่ไขกระดูก โดยการแตกมาจากส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเมกะคาริโอไซต์ (megakaryocyte) เกล็ดเลือดไม่มีนิวเคลียส และสามารถสร้างโปรตีนได้น้อยมาก แต่เป็นแหล่งสะสมของสารหลายๆ ชนิดที่มีผลต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือด (hemostasis) โดยปกติเกล็ดเลือด มีลักษณะรูปร่างกลมรี มีผิวหนูนูนทั้งสองข้าง (biconvex) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.5 ไมครอน หน้าที่ของเกล็ดเลือดที่สำคัญคือ การห้ามเลือด โดยอุดรูรั่วในหลอดเลือด ช่วยในกระบวนการแข็งตัวของเลือดให้ดีขึ้น และช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของเยื่อหลอดเลือด ในสภาวะปกติเกล็ดเลือดไม่เกาะติดกับชั้น endothelium ของหลอดเลือด เมื่อไรก็ตามเมื่อหลอดเลือดได้รับความเสียหายและเผยชั้น subendothelium ร่างกายจะมีการตอบสนองโดยการสร้างก้อน

hemostatic plug อุดเส้นเลือดบริเวณที่ได้รับ ความเสียหาย เพื่อให้เลือดหยุดไหล กระบวนการทำงานของเกล็ดเลือด ในการสร้าง hemostatic plug คือ สร้าง platelet plug ซึ่งมีกระบวนการตามลำดับดังนี้

(1) การเกาะติดของเกล็ดเลือด (platelet adhesion) โดยเกล็ดเลือดสามารถจะเคลื่อนที่มากเกาะกับชั้น subendothelium ของหลอดเลือดที่บริเวณที่ได้รับ ความเสียหาย (vascular injury) โดยอาศัยการจับกับส่วนคอลลาเจนผ่าน fibrinogen และ von Willebrand factor (vWf) เป็นสำคัญ เนื่องจากบนผิวเกล็ดเลือดจะมีตัวรับสำหรับ fibrinogen และ von Willebrand factor คือ GP IIb/IIIa และ GP Ib/IX/V complex ตามลำดับ (รูปที่ 1) นอกจากนี้เกล็ดเลือด ยังสามารถจับกับส่วนคอลลาเจนได้โดยตรงผ่าน GP Ia/IIa

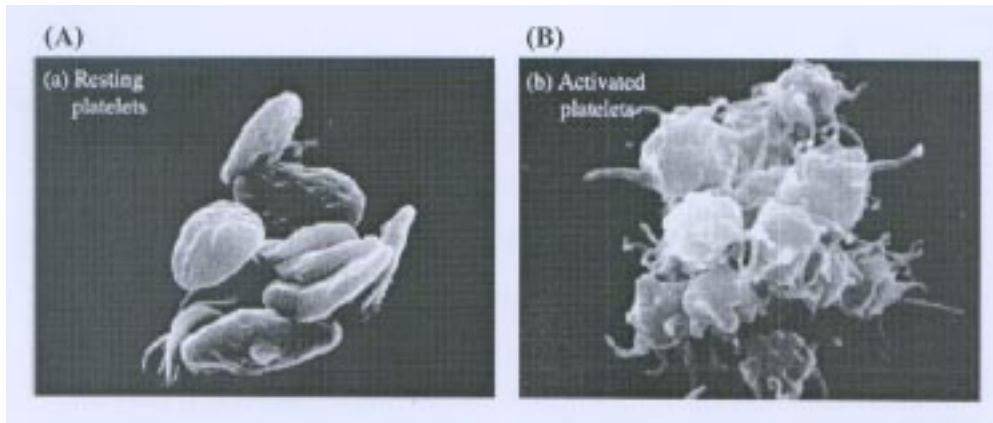


รูปที่ 1 แสดงการเกาะติดของเกล็ดเลือด, การกระตุ้นเกล็ดเลือด, การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและการหลั่งสารของเกล็ดเลือด³

* แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(2) การกระตุ้นเกล็ดเลือด (platelet activation) ภายหลังที่เกล็ดเลือดมีการยึดเกาะกับหลอดเลือดแล้ว เกล็ดเลือดก็จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและแผ่ตัว ดังรูปที่ 2 พร้อมกันนี้ dense granule และ α granule ก็จะมา รวมกันตรงกลางและปลดปล่อยสาร จาก Granule

(ตารางที่ 1) โดยพบว่า ADP จะถูกปล่อยออกมาจาก dense granule และมีความสำคัญในการทำให้เกล็ดเลือด เกิดการเกาะกลุ่ม ส่วน β thromboglobulin, platelet factor 4 และไฟบริโนเจน จะถูกหลั่งมาจาก α granule



รูปที่ 2 แสดงลักษณะรูปร่างเกล็ดเลือดปกติ (A) และเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (B)⁴

ตารางที่ 1 องค์ประกอบในแกรนูล (granule) ของเกล็ดเลือด²

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Electron dense granules
ADP, serotonin, calcium2. α granule
fibrinogen, factor V, platelet derived growth factor
platelet specific proteins, platelet factor 4,
β-thromboglobulin, albumin, fibronectin, thrombospondin3. Lysosome
Hydrolytic enzymes4. Peroxisomes
catalase |
|---|

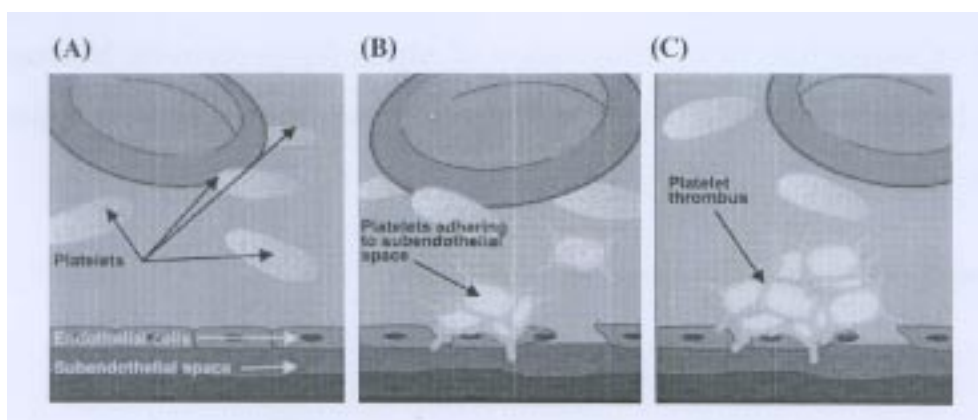
(3) การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) เป็นการจับกันของเกล็ดเลือดสามารถแบ่งได้ 2 ระดับคือ primary aggregation เป็นแบบ reversible เกิดขึ้นจากผลของ ADP ซึ่งได้จากการกระตุ้นของเกล็ดเลือด ส่วน secondary aggregation เป็นแบบ irreversible เกิดหลังจากที่เกล็ดเลือดปล่อยสารภายในออกมา

การหลั่งสารจากเกล็ดเลือด (release reaction หรือ secretion) เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจะหลั่งสารที่อยู่ใน dense granule, a granule และ lysosome ออกมาสู่ภายนอก สารเหล่านี้มีผลต่อเซลล์และเกล็ดเลือด ในกระบวนการ adhesion, aggregation และ secretion ซึ่งในที่สุดจะก่อให้เกิดก้อน platelet plug และต่อมาเกิด hemostatic plug ขึ้นเพื่ออุดบาดแผลบริเวณเส้นเลือดที่ได้รับความเสียหาย (รูปที่ 1)

บทบาทของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (Role of activated platelet)

เกล็ดเลือดมีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการเกิดลิ่มเลือด (thrombus formation; thrombogenesis)⁵ โดยเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelet) จะเป็นจุดสำคัญที่ทำให้เกิดลิ่มเลือด (thrombus) โดยเริ่มจากการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (รูปที่ 3) ต่อมาจะมีเม็ดเลือดขาวเข้ามารวมและมีไฟบรินเกิดขึ้นตามลำดับ ดังนั้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจึงเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิด

ก้อน thrombus (thrombus) ซึ่งก้อน thrombus หรือลิ่มเลือด มักจะเกิดขึ้นในเส้นเลือดขนาดใหญ่เช่น หลอดเลือดหัวใจ และหลอดเลือดสมอง ดังนั้นการกระตุ้นเกล็ดเลือดแบบผิดปกติ จะนำมาซึ่งบทบาทที่สำคัญในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับเส้นเลือดอีกหลายชนิด ได้แก่ atherosclerosis^{6,7}, coronary vascular disease^{8,9} โรคของเส้นเลือดสมอง cerebrovascular disease¹⁰ และโรคของเส้นเลือดอื่นๆ^{11,12} นอกจากภาวะ thrombotic state ดังนั้นการศึกษาบทบาทของเกล็ดเลือดจึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และการเกิดลิ่มเลือด ดังนั้นเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelet) จึงเป็นเป้าหมายที่มีความสำคัญต่อการรักษาโรคของหลอดเลือด โดยเฉพาะหลอดเลือดหัวใจที่จะนำไปสู่การเกิดโรคหัวใจ ในระยะเวลาที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเกิดขึ้นมากมาย เพื่อหาวิธีที่มีความไวและจำเพาะในการตรวจหาเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย เพื่อนำมาใช้ในการบ่งชี้ภาวะ prethrombotic หรือ thrombotic state โดยเบื้องต้น การศึกษาในทางคลินิกได้แสดงให้เห็นว่าเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะมีความสัมพันธ์กับโรคทางเส้นเลือด (vascular disorders) ได้แก่ unstable angina, peripheral vascular disease และ stroke เป็นต้น ดังนั้นการตรวจหาเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงมีประโยชน์ทั้งในด้านการบ่งชี้การเกิด thrombotic disorder และการประเมินวิธีการรักษาเพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น



รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนการเกิดลิ่มเลือดจากเกล็ดเลือด (A) เกล็ดเลือดที่อยู่ในกระแสเลือดตามปกติ (B) เกล็ดเลือดเกาะติดกับเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่ได้รับความเสียหาย หลังจากนั้นเกล็ดเลือดจะถูกกระตุ้น (C) การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในก้อนลิ่มเลือด¹³

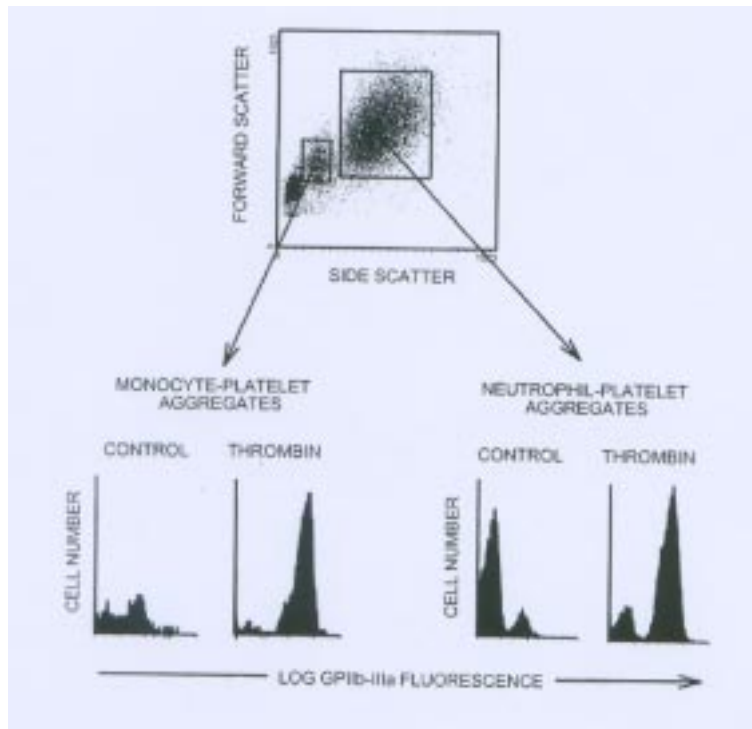
การตรวจเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นที่เกิดขึ้นในร่างกาย (Measurement of in VIVO activated platelet)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าเมื่อเกิดการกระตุ้นของเกล็ดเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดจากรูปร่างกลมเป็นมี pseudopod ยื่นออกมา มีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และการหลั่งสารที่อยู่ภายในเกล็ดเลือด ดังนั้นการที่จะตรวจหาปริมาณเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกายไม่ว่าจะโดยดูจากรูปร่างที่เปลี่ยนแปลง หรือการตรวจหาสารที่ถูกหลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นก็สามารถทำได้ แต่อย่างไรก็ตามการดูรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นนั้นต้องอาศัยความชำนาญและใช้กล้องที่มีคุณภาพสูง เช่น electron microscope¹⁴ ต่อมาพบว่าตัวบ่งชี้ (marker) ที่น่าเชื่อถือและสามารถบ่งชี้การเกิดเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกายได้ คือ การตรวจหาสารที่ถูกหลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น โดยสามารถตรวจได้ในเลือดหรือปัสสาวะ เช่น platelet factor 4, β thromboglobulin และ thromboxane A₂^{15,16} ถึงแม้ว่าการตรวจสารดังกล่าวจะมีประโยชน์ในงานวิจัย แต่ก็ไม่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในทางคลินิก เนื่องจากข้อจำกัดทางด้านเทคนิค เช่น ขั้นตอนในการเก็บส่งตรวจ, วิธีการตรวจ ตลอดจนถึงวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

จนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษามากมายเกี่ยวกับเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น พบว่า การติดต่อกันระหว่างเกล็ดเลือดและเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดลิ่มเลือดนั้นจะอาศัยโมเลกุลที่อยู่บนผิวเกล็ดเลือดเช่น adhesion molecule ที่จะแสดงออกเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น และได้มีการค้นพบ activated marker ชนิดหนึ่งที่สามารถบ่งชี้ว่าเกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดเกิดขึ้นในร่างกาย โมเลกุลดังกล่าวชื่อ

P-selectin จัดเป็นโปรตีนตัวรับในกลุ่ม selectin family¹⁷ บางครั้งเรียก Platelet activation dependent granule external membrane protein หรือ GMP140 (granule membrane protein) โดยปกติโมเลกุลดังกล่าวจะอยู่ที่ผิวของแอลฟาแกรนูล (α granule) และเยื่อหุ้ม Weibel-Palade bodies ของเซลล์บุผนังเส้นเลือด^{18,19} เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นพบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโมเลกุล P-selectin โดยจะย้ายมาอยู่บนเยื่อหุ้มเกล็ดเลือด^{20,21} ดังนั้นเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจะมีการแสดงออกของโมเลกุล P-selectin ที่เยื่อหุ้มเกล็ดเลือดเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและโมโนไซต์²² ดังนั้นการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโมเลกุล P-selectin จึงเป็นตัวบ่งชี้ว่าเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น²³ การตรวจวัดโมเลกุล P-selectin สามารถตรวจวัดได้โดยใช้ โมโนโคลนอล แอนติบอดี S12 และ KC4^{23,24} อีกตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงคือ โปรตีน GP IIb/IIIa complex ที่บริเวณเยื่อหุ้มเกล็ดเลือดเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวรับสำหรับไฟบริโนเจน (fibrinogen receptor) เพื่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด การเปลี่ยนแปลงและแสดงออกของตัวรับสำหรับไฟบริโนเจน ดังกล่าวนี้อาจตรวจวัดได้โดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี PAC-1^{25,26}

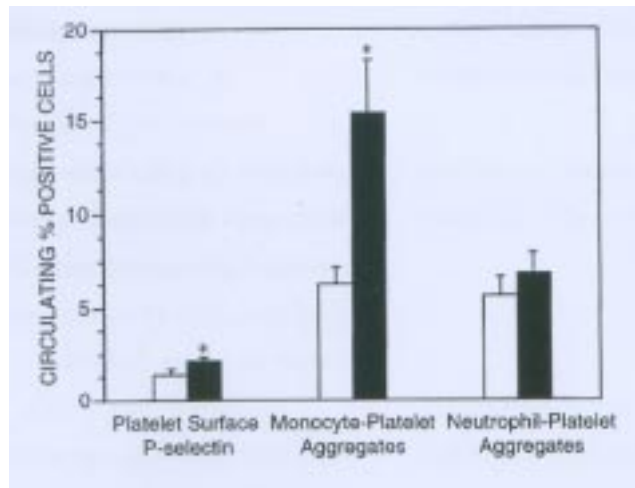
การศึกษาล่าสุดพบว่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกับเม็ดเลือดขาว (platelet-leukocyte aggregate) มีความสัมพันธ์และบ่งชี้ว่ามีเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นเกิดขึ้นในร่างกาย²⁷ โดยแสดงลักษณะการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกับเม็ดเลือดขาวดังรูปที่ 4 โดย flow cytometry พบว่าเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นโดยใช้ thrombin จะพบปริมาณของ monocyte-platelet aggregate และ neutrophil-platelet aggregate ได้มากกว่าเกล็ดเลือดที่ไม่ถูกกระตุ้นซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของการเกิด monocyte-platelet aggregate และ neutrophil-platelet aggregate ในเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยใช้ thrombin เปรียบเทียบกับเกล็ดเลือดที่ไม่ถูกกระตุ้น²⁸

การวิจัยเมื่อเร็วๆ นี้พบว่าผู้ป่วยที่เป็น acute coronary syndrome ไม่เพียงแต่จะมีการเพิ่มขึ้นของ homotypic aggregation หรือ การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเท่านั้น แต่พบว่ายังมีการเกาะกลุ่มระหว่างเกล็ดเลือดกับเม็ดเลือดขาว (heterotypic aggregation) เพิ่มขึ้นด้วยในกระแสเลือด (รูปที่ 5) การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกับเม็ดเลือดขาวนี้ จะเกิดขึ้นเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นและปล่อยสารที่อยู่ใน granule ออกมา จากนั้นเกล็ดเลือดจะเกาะติดเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด จากการวิจัยต่อมาพบว่า การเกาะกลุ่มระหว่างเกล็ดเลือดกับเม็ดเลือดขาวดังกล่าวยังสามารถเกิดขึ้นในภาวะการอักเสบ (inflammation) ด้วย²⁹ โดยพบว่าเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น จะมีการแสดงออกของ P-selectin บนผิวเกล็ดเลือดซึ่ง P-selectin จะจับกับตัวรับคือ P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) ที่แสดงออกบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว การจับกันดังกล่าวจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ CD11b/CD18 (Mac-1) บนเม็ดเลือดขาว³⁰ ซึ่งจะส่งเสริมการจับกันของเกล็ดเลือดกับเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นและความสำคัญของการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกับ

เม็ดเลือดขาว (platelet-leukocyte aggregates) ในโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือด (vascular disease) ถูกสนับสนุนโดยงานวิจัยที่ว่า การให้ recombinant PSGL-1 ในสัตว์ที่มี vascular injury ซึ่งจะจับกับ P-selectin บนเกล็ดเลือด ไม่ทำให้เกิด platelet-leukocyte aggregate และสามารถลดโอกาสการเกิด myocardial reperfusion injury ได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า platelet-leukocyte aggregates น่าจะเป็น marker ที่มีความไวสำหรับตรวจหา platelet activation มากกว่าการแสดงออกของ P-selectin ที่ผิวเซลล์เนื่องจากเกล็ดเลือดที่มีการหลั่งสารออกมาจะมีการสูญเสียโมเลกุล P-selectin ที่ผิวเซลล์ ซึ่งการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Michelson และคณะ³¹ ซึ่งพบว่า monocyte-platelet aggregates เป็น marker ที่มีความไวต่อการตรวจหา platelet activation มากกว่า surface P-selectin และการศึกษาของ Sarma และคณะ³² เกี่ยวกับ platelet-leukocyte aggregates ในผู้ป่วย atherothrombosis และ acute coronary syndromes โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็น acute coronary syndrome เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่เป็น noncardiac



รูปที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณของ P-selectin บนผิวเกล็ดเลือด, monocyte-platelet aggregate และ neutrophil-platelet aggregate ระหว่างผู้ป่วย coronary artery disease (กราฟแท่งสีดำ) และคนปกติ (กราฟแท่งสีขาว) โดยวิธี flow cytometry ข้อมูลแสดงเป็น mean $\pm$ SEM, จำนวน 19 คน²⁸

chest pain โดยใช้ flow cytometry จากการตรวจ platelet-leukocyte aggregates พบว่าในผู้ป่วย acute coronary syndromes มีระดับของ platelet-monocyte aggregate เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดและจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้โมโนโคลนอล แอนติบอดีต่อ PSGL-1 ซึ่งจะยับยั้ง P-selectin แสดงให้เห็นว่าการจับของเกล็ดเลือดกับโมโนไซต์เกิดขึ้นจาก P-selectin กับ PSGL-1

ดังนั้นจากความรู้เกี่ยวกับความสำคัญของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นปัจจุบันจึงมีผู้สนใจศึกษาหาวิธีการตรวจวัดเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นที่เกิดขึ้นในร่างกายให้ได้เร็วและน่าเชื่อถือเพื่อใช้บ่งชี้ภาวะ prethrombotic state และ thrombotic state ซึ่งนำมาซึ่งการเกิดพยาธิสภาพของโรคทางหลอดเลือด

เอกสารอ้างอิง

1. Kamath S, Blann AD, Lip GYH. Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J*. 2001; 22: 1561-1571.
2. Wencel-Drake JD, Dahlback B, White JG, Ginsberg MH. Ultrastructural localization of coagulation factor V in human platelets. *Blood*. 1986; 68: 244-249.
3. <http://referencelab.clevelandclinic.org> (Access 02/01/2006).
4. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs*. 2002; 1: 273-288.
5. Hoak JC. Platelet and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1988; 14: 202-205.
6. Mustard JF, Packham MA. The role of blood and platelets in atherosclerosis and the complications of atherosclerosis. *Throm Diathesis Haemorrhage* 1975; 33: 444-456.
7. Mustard JF, Packham PM, Rowsell HC, Jorgensen L. The role of thrombogenic factors in atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1968; 149: 848-859.
8. Duguid JB. Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* 1946; 58: 207-212.
9. Cahill MR, Newland AC. Platelet activation in

- coronary artery disease. *Br J Biomed Sci* 1993; 50: 221-234.
10. Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Bugge F, Patscheke H, *et al*. Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. *Thromb Haemost* 1998; 80: 298-301.
11. White JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 25-29.
12. Falk E, Fernandez-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol* 1995; 75: 3B-11B.
13. <http://www.kup.at/journals/abbildungen/gross/749.html> (Access 02/01/2006).
14. Holmsen H. Significance of testing platelet functions *in vitro*. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 3-8.
15. Catella F, Healy D, Lawson JA, FitzGerald G. 11-Dehydro-thromboxane B2: A quantitative index of thromboxane A2 formation in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5861-5865.
16. Fitzgerald DJ, Catella F, Roy L, FitzGerald GA. Marked platelet activation *in vivo* after intravenous streptokinase in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1988; 77: 142-150.
17. Johnston GI, Bliss G, Newman PJ, McEver RP. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of adhesion receptors for leukocytes. *J Biol Chem* 1990; 265: 21381-21385.
18. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R *et al*. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 1989; 59: 305-312.
19. McEver RP. The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 87-105.
20. McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 1990; 16: 73-80.
21. Johnston GI, Kurosky A, McEver RP. Structural and biosynthetic studies of the granule membrane protein, GMP-140 from human platelets and endothelial cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 1816-1823.
22. Crovello CS, Furie BC, Furie B. Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J Biol Chem* 1993; 268: 14590-14593.
23. Hsu-Lin SC, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259: 9121-9126.
24. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein bind only to activated platelets. *J Biol Chem* 1984; 259: 9799-9804.
25. Shattil SJ, Hoxie J, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation." *J Biol Chem* 1985; 260: 11107-11114.
26. Shattil SJ, Brass LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987; 262: 992-1000.
27. Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: bridge thrombosis and inflammation. *Circulation* 2002; 105: 2130-2132.
28. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC *et al*. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-

- platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. JACC 1998; 3: 352-358.
29. Arber N, Berliner S, Pras E, Arber L, Fishelson Z, Kahn Y *et al*. Heterotypic leukocyte aggregation in the peripheral blood of patients with leukemia, inflammation and stress. Nouv Rev Fr Hematol 1991; 33:251-255.
30. Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Otto I, Gawaz M, Schomig 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: 1420-1426.
31. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. 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: 1533-1537.
32. Sarma J, Laan KA, Alam S, Jha A, Fox KA, Dransfield I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. Circulation. 2002; 105: 2166-2171.