



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.2.009>



Шеламова Д.А.✉, Гайковая Л.Б., Евтеева Д.А.
Северо-Западный государственный медицинский университет
имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Оценка риска формирования сосудисто-тромбоцитарных нарушений и развития тромботических осложнений у пациентов с псориазом по уровню экспрессии адгезивного Р-селектина и тромбоцитарных экзосом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Гайковая Л.Б.; сбор материала – Шеламова Д.А.; обработка материала и выполнение лабораторных тестов – Шеламова Д.А.; статистическая обработка данных – Евтеева Д.А.; написание текста – Шеламова Д.А.; редактирование – Гайковая Л.Б.

Подана: 01.04.2023

Принята: 02.05.2023

Контакты: Darina.Shelamova@szgmu.ru

Резюме

Введение. Псориаз – мультифакторное, хроническое, иммунозависимое заболевание, в основе патогенеза которого лежит воспалительный процесс, приводящий к усилению агрегационных свойств тромбоцитов. Нарушение функциональной активности тромбоцитов приводит к развитию осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы. Активированные тромбоциты прилипают к стенке сосуда в месте повреждения эндотелия и инициируют образование тромба, что приводит к ишемии органа. Функциональная активность тромбоцитов может быть определена по экспрессии Р-селектина и количеству тромбоцитарных экзосом высокотехнологичным методом проточной цитометрии. Известно, что пациенты с псориазом подвергаются значительно большему риску сердечно-сосудистых и цереброваскулярных осложнений, чем лица в соответствующей популяции по возрасту и полу, для которых оценка риска осложнений является актуальной.

Цель. Оценить уровень экспрессии Р-селектина и количество тромбоцитарных экзосом у пациентов с псориазом в зависимости от тяжести состояния.

Материалы и методы. В исследование было включено 110 человек, в том числе лица контрольной группы. С помощью проточной цитометрии определяли функциональную активность тромбоцитов путем анализа экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов и количества тромбоцитарных экзосом в плазме крови. Результаты представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей (Ме [Q1–Q3]).

Результаты. У пациентов с псориазом средней степени тяжести определялось достоверное ($p < 0,02$) повышение количества тромбоцитов с экспрессией Р-селектина (1,8% [1,0–2,6]) по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе (0,9% [0,7–1,7]), у пациентов с тяжелым течением псориаза 3,2% [1,5–5,4]) ($p < 0,001$). При сравнительном анализе процентного содержания экзосом CD9+ и тромбоцитарных экзосом с фенотипом CD41+ было выявлено значимое повышение

количества экзосом CD9+ в целом у пациентов с псориазом 77,4 [65,1–85,7]% по сравнению с контрольной группой 52,85 [42,7–72,7]% ($p=0,029$) и экзосом тромбоцитарного происхождения CD41+ (37,3 [28,0–51,5]% относительно 10,1 [7,8–20,9]%, $p<0,001$) соответственно.

Заключение. Значительное увеличение количества тромбоцитов с экспрессией Р-селектина и экзосом тромбоцитарного происхождения у пациентов с псориазом может свидетельствовать об активации системы гемостаза и быть предиктором неблагоприятных тромботических событий.

Ключевые слова: псориаз, экзосомы, Р-селектин, тромбоциты, проточная цитометрия

Shelamova D.✉, Gaikovaya L., Evteeva D.
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
Saint Petersburg, Russia

Assessment of Vascular Platelet Disorders and Thrombotic Complications Risks in Patients with Psoriasis by Adhesive P-selectin and Platelet-Derived Exosomes Expression Levels

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design – Gaikovaya L.; material collection – Shelamova D.; material processing and laboratory testing – Shelamova D.; statistical data processing – Evteeva D.; text writing – Shelamova D.; editing – Gaikovaya L.

Submitted: 01.04.2023

Accepted: 02.05.2023

Contacts: Darina.Shelamova@szgmu.ru

Abstract

Introduction. Psoriasis is a multifactorial, chronic, immune-dependent disease, the pathogenesis of which is based on an inflammatory process leading to an increase in platelets aggregation properties. Impaired platelet functional activity results in cardiovascular complications. Activated platelets adhere to the vessel wall at the site of endothelial damage initiating blood clots formation causing ischemia. The functional activity of platelets can be determined by P the expression of P-selectin and by platelet-derived exosomes count using the high-tech method of flow cytometry. Patients with psoriasis are known to be at significantly higher risk of cardiovascular and cerebrovascular complications compared with subjects of corresponding age and gender populations for whom an assessment of complications risk is relevant.

Purpose. To assess the expression level of P-selectin and platelet-derived exosome counts in patients with psoriasis depending on their conditions severity.

Materials and methods. A total of 110 subjects were included in the study, comprising controls. Using flow cytometry, the functional activity of platelets was determined by analyzing the expression of P-selectin on the platelet surface and platelet-derived exosomes count in blood plasma. The results are presented as median, 25 and 75 percentiles (Me [Q1–Q3]).



Results. Patients with moderate psoriasis demonstrated a significant increase ($p < 0.02$) in platelets with P-selectin expression (1.8% [1.0–2.6]) compared to controls (0.9% [0.7–1.7]); patients with severe psoriasis showed an increase of 3.2% [1.5–5.4]) ($p < 0.001$). A comparative analysis of CD9+ exosomes and phenotype platelet-derived exosomes of CD41+ phenotype percentages revealed a significant increase in CD9+ exosomes in general in psoriasis patients by 77, 4 [65.1–85.7]% compared to 52.85 [42.7–72.7]% ($p = 0.029$) in controls, and in CD41+ platelet-derived exosomes (37.3 [28.0–51.5]% versus 10.1 [7.8–20.9]%, $p < 0.001$) respectively.

Conclusion. A significant increase in platelets with expression of P-selectin and platelet-derived exosomes in psoriasis patients may indicate activation of the hemostasis system and could be a predictor of adverse thrombotic events.

Keywords: psoriasis, exosomes, P-selectin, platelets, flow cytometry

■ ВВЕДЕНИЕ

Псориаз – хроническое иммуноопосредованное воспалительное заболевание кожи многофакторной природы, характеризуется эпидермальной гиперплазией из-за усиленной пролиферации кератиноцитов, расширения кровеносных сосудов в дерме и инфильтрации иммунными клетками [1]. Согласно глобальному исследованию ВОЗ, на 2016 г. около 125 миллионов человек страдают псориазом, однако его распространенность отличается в разных регионах: от 0,5% в некоторых частях Азии до 8% – в Норвегии [2]. В Российской Федерации, по данным официальной статистики, в 2018 г. уровень распространенности заболевания составил 242,4 случая на 100 тыс. населения. Наиболее высокая общая заболеваемость псориазом наблюдается в Северо-Западном, Приволжском и Дальневосточном федеральных округах, где зарегистрированы максимальные показатели [3]. Изучение патогенеза псориаза связано с его высокой распространенностью, длительным рецидивирующим течением, приводящим к инвалидизации пациентов, сочетанием кожных проявлений с висцеральной патологией, нарушением обмена веществ, иммунного статуса и высоким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [4].

В основе патогенеза многих ССЗ лежит процесс атеросклеротических изменений в стенке сосуда, тесно связанный с выраженностью окклюзионно-стенотических нарушений в сосудах и проявляющийся в виде фатальных осложнений ИБС, острого нарушения мозгового кровообращения по ишемическому типу или критической ишемии периферических сосудов. К прогрессированию атеросклероза и развитию его осложнений ведет нарушение функциональной активности тромбоцитов. Активированные тромбоциты прилипают к стенке сосуда в месте повреждения эндотелия и инициируют образование артериального тромба, что приводит к острой ишемии органа [5].

Многочисленные исследования, связанные с изучением комплексной клинко-патогенетической оценки сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза у пациентов с различными формами псориаза, показали, что нарушения сосудисто-тромбоцитарного гемостаза широко распространены у пациентов с псориатической болезнью и составляют 77,5% от числа всех обследованных; при этом у 26,8% пациентов

имеются значительные гемостазиологические расстройства, а у 22,5% они отсутствуют [6]. В проведенных нами ранее исследованиях также были выявлены значительные изменения в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза: повышение функциональной активности тромбоцитов по результатам стандартной агрегатометрии методом Борна. При этом достоверных различий в количестве тромбоцитов ($PLT \times 10^9/l$) и среднем объеме тромбоцитов (RDW, фл) отмечено не было [7]. Однако учитывая ведущую роль тромбоцитов в патогенезе псориаза, важным остается изучение их функций на молекулярном и рецепторном уровне.

Процесс активации тромбоцитов отражается в повышении уровня экспрессии Р-селектина и образовании большого количества экзосом тромбоцитарного происхождения [8].

Р-селектин (CD62P) представляет собой трансмембранный белок 1-го типа, который относится к классу молекул клеточной адгезии. В α -гранулах тромбоцитов Р-селектин присутствует в неактивной форме. Когда тромбоциты активируются, молекула Р-селектина быстро перемещается из α -гранул и путем слияния с плазматической мембраной экспрессируется на поверхности тромбоцита [9].

Экзосомы (CD9+) – микроскопические внеклеточные везикулы диаметром 30–100 нм, которые могут продуцироваться различными клетками организма, включая тромбоциты, лейкоциты, лимфоциты, эритроциты и эндотелиальные клетки [10]. Тромбоцитарные экзосомы являются потенциально прокоагулянтными, поскольку они выделяют отрицательно заряженные фосфолипиды, содержат активированные факторы свертывания Va и Ха, а также тканевой фактор и связаны с тромботическими заболеваниями [11].

В настоящее время метод проточной цитометрии дает возможность проанализировать не только активацию тромбоцитов, их агрегацию и взаимодействие с лейкоцитами, но также образование тромбоцитарных экзосом [12].

В связи с широким распространением нарушений сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у пациентов с псориазом и противоречивыми данными по эффективности использования лабораторных методов их выявления представляется актуальной оценка функциональной активности тромбоцитов современным методом проточной цитометрии.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить уровень экспрессии Р-селектина на тромбоцитах и количество тромбоцитарных экзосом и у пациентов с псориазом в зависимости от тяжести заболевания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 80 пациентов с вульгарным псориазом в прогрессирующей и стационарной стадии (40 женщин и 40 мужчин) с течением средней тяжести (среднее значение индекса тяжести поражения ($n=33$) PASI – 17 ± 5 , DLQI – 7 ± 2) и тяжелым ($n=47$, PASI – 30 ± 7 , DLQI – 16 ± 3), находившихся на стационарном лечении в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» и СПб ГБУЗ «Городской кожно-венерологический диспансер». Средний возраст пациентов составил 48 ± 15 лет. Контрольная группа включала 30 добровольцев без заболеваний кожи и была сопоставима по полу и возрасту с группой пациентов. Все обследованные дали информированное согласие на участие в исследовании. Забор



венозной крови у пациентов осуществлялся в день поступления в дерматологическую клинику с соблюдением правил преаналитического этапа.

Всем обследованным проводилась оценка экспрессии Р-селектина на поверхности тромбоцитов с использованием моноклонального антитела CD62P, флуоресцентно меченного фикоэритрином (PE, Beckman Coulter, США), в качестве индуктора активации тромбоцитов использовали АДФ в концентрации 20 мкмоль/л, и количества внеклеточных микровезикул (CD9) – экзосом с помощью набора реагентов Exo-FACS (HansaBioMed Life Sciences, Эстония) и флуоресцентно меченных антител к поверхностным маркерам клеток CD41 (тромбоциты) (Beckman Coulter, США) на проточном цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США).

Содержание рецепторов CD62P на поверхности тромбоцитов определяли с применением прямых моноклональных антител CD62P-PE (Beckman Coulter, США). Цитометрическое исследование проводили в цельной венозной крови, разведенной в 10 раз однократным фосфатным буфером (1хPBS). Для окрашивания флуоресцентно меченными антителами разведенную кровь в объеме 10 мкл инкубировали с 10 мкл CD62P-PE в течение 10 мин. при комнатной температуре. Для активации тромбоцитов одновременно с антителами добавляли 20 мкмоль АДФ. В качестве отрицательного контроля использовали антитела к мышиному иммуноглобулину, меченные FITC и PE (Beckman Coulter, США). Реакцию останавливали добавлением 500 мкл 1хPBS, и образцы анализировали на проточном цитофлуориметре. Экспрессию CD62P на поверхности тромбоцитов оценивали как долю клеток, меченных CD62P-PE, до и после индукции 20 мкмоль АДФ.

Для анализа микрочастиц отбор проб крови проводили в препрандиальный период путем пункции кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 мин.) в положении обследуемого сидя с помощью двухкомпонентных систем для взятия крови в одноразовые полипропиленовые пробирки типа Vacuette. В качестве антикоагулянта пробирка содержала ЭДТА-K2. Образцы центрифугировали для получения бестромбоцитной плазмы при 3500 g в течение 15 мин. при комнатной температуре. Содержание тромбоцитарных микрочастиц в исследуемых образцах оценивали как процент частиц, несущих на своей поверхности биохимический маркер принадлежности к тромбоцитам – гликопротеин $\alpha 2b$ (CD41), а также экзосомальный маркер – белок семейства тетраспанинов CD9, меченных соответствующими флуорохромами (фенотип CD41+(PE)/CD9+(FITC)). Результат учитывали в процентах позитивных событий. Полученные результаты сравнивали с группой контроля.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программного пакета The jamovi project (2021). jamovi (Version 1.6) [Computer Software]. Числовые значения представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентиля (Me [C25–C75]). Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений. Для сравнения двух независимых переменных использовали тест Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе функциональной активности тромбоцитов в группе пациентов с псориазом средней степени тяжести определялось достоверное ($p < 0,02$) повышение количества тромбоцитов с экспрессией Р-селектина до активации АДФ 20 мкмоль/л (1,8% [1,0–2,6]) по сравнению с аналогичным показателем

в контрольной группе (0,9% [0,7–1,7]), достоверных различий в количестве тромбоцитов с экспрессией Р-селектина после активации АДФ 20 мкмоль/л между группами выявлено не было (табл. 1).

При анализе функциональной активности тромбоцитов у пациентов с тяжелым течением псориаза было выявлено статистически значимое повышение тромбоцитов с экспрессией Р-селектина до активации АДФ 20 мкмоль/л (3,2% [1,5–5,4]) по сравнению с контролем ($p<0,001$), достоверных различий в количестве тромбоцитов с экспрессией Р-селектина после активации АДФ 20 мкмоль/л между группами также не было выявлено (табл. 2).

Сравнительный анализ функции тромбоцитов у пациентов средней степени тяжести и с тяжелым течением псориаза показал, что достоверных различий выявлено не было, но имелась тенденция к повышению экспрессии Р-селектина в 1,7 раза у пациентов с тяжелым течением.

При сравнительном анализе количества внеклеточных микрочастиц – экзосом (CD9, %) у пациентов с псориазом по сравнению с контрольной группой было выявлено статистически значимое повышение (77,4% [65,1–85,7]) против (52,8% [42,7–72,7]), $p=0,029$ (табл. 3).

При анализе количества внеклеточных микрочастиц – экзосом по клеточной принадлежности установлено, что у пациентов с псориазом преобладали экзосомы тромбоцитарного происхождения (CD41) (37,3% [28,0–51,5]) по сравнению с содержанием таковых у пациентов контрольной группы (10,1% [7,8–20,9]), $p<0,001$ (табл. 4).

Таблица 1
Экспрессия Р-селектина у пациентов с псориазом средней степени тяжести и лиц контрольной группы
Table 1
Expression of P-selectin in patients with moderate psoriasis and controls

Лабораторный показатель	Пациенты с псориазом Me (C25–C75)	Контрольная группа Me (C25–C75)	p
Количество Р-селектина до активации АДФ 20 мкмоль/л, %	1,8 [1,0–2,6]	0,9 [0,7–1,7]	<0,001
Количество Р-селектина после активации АДФ 20 мкмоль/л, %	59,0 [51,4–70,1]	61,1 [58,9–66,3]	0,214

Таблица 2
Экспрессия Р-селектина у пациентов с тяжелым течением псориаза и лиц контрольной группы
Table 2
Expression of P-selectin in patients with severe psoriasis and controls

Лабораторный показатель	Пациенты с псориазом Me (C25–C75)	Контрольная группа Me (C25–C75)	p
Количество Р-селектина до активации АДФ 20 мкмоль/л, %	3,2 [1,5–5,4]	0,9 [0,7–1,7]	<0,001
Количество Р-селектина после активации АДФ 20 мкмоль/л, %	59,0 [54,3–68,7]	61,1 [58,9–66,3]	0,441



Таблица 3
Количество экзосом различного клеточного происхождения у пациентов с псориазом и контрольной группы
Table 3
Number of exosomes of various cellular origins in patients with psoriasis and in controls

Клеточный маркер	Пациенты с псориазом Me (C25–C75)	Контрольная группа Me (C25–C75)	p
C9+ (% событий) Экзосомы	77,4 [65,1–85,7]	52,85 [42,7–72,7]	0,029

Таблица 4
Количество экзосом тромбоцитарного происхождения у пациентов с псориазом и лиц контрольной группы
Table 4
Number of platelet-derived exosomes in patients with psoriasis and in controls

Клеточный маркер	Пациенты с псориазом Me (C25–C75)	Контрольная группа Me (C25–C75)	p
CD41+ (% событий) Тромбоцитарные экзосомы	37,3 [28,0–51,5]	10,1 [7,8–20,9]	<0,001

Проведенное исследование показало, что у пациентов с псориазом имеет место значимое увеличение количества тромбоцитов с экспрессией Р-селектина до активации, что свидетельствует об активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза и зависит от степени тяжести заболевания.

Сделанные нами наблюдения согласуются с данными Tamagawa-Mineoka et al. (2010), которые указывали на активацию тромбоцитов у пациентов с псориазом по сравнению со здоровыми людьми, а также отмечали, что определение Р-селектина приобретает большое значение, поскольку он оказывает провоспалительное действие, опосредуя адгезию и свертывание иммунных клеток на прикрепленных тромбоцитах, высвобождение тромбоцитарных хемокинов [13]. По мнению Jurate Garbaravičienė et al. (2010), активация тромбоцитов является не только признаком атеросклеротических осложнений, но и кожных воспалительных заболеваний [14]. Chandrashekar L. et al. (2015) показали, что повышенная экспрессия Р-селектина на тромбоцитах связана с тяжестью заболевания у пациентов с псориазом, предполагая, что тромбоциты могут влиять на инфильтрацию лейкоцитов в кожу, связывая лейкоциты через Р-селектин при псориазе [15].

Учитывая, что показатели содержания тромбоцитов в крови пациентов с псориазом не дают полной информации о состоянии системы гемостаза, оценка активации тромбоцитов может быть маркером длительности персистирующего воспаления, ведущего к развитию осложнений сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с псориазом.

Выявленное в ходе исследования значительное повышение содержания экзосом в целом и экзосом тромбоцитарного происхождения, способствующих формированию межклеточных связей и адгезии между клетками крови и стенки сосудов, а также усилению пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, свидетельствует

об активации системы свертывания крови и может быть предиктором неблагоприятных тромботических событий при псориазе [16]. В своих исследованиях Nolan J.P. et al. (2017) показали, что тромбоцитарные экзосомы, помимо активации системы свертывания крови, могут увеличивать адгезию лейкоцитов к эндотелию и способствовать активации лейкоцитов путем модулирования взаимодействий лейкоцитов с лейкоцитами и лейкоцитов с эндотелиальными клетками [17].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение тромбоцитов с экспрессией Р-селектина, внеклеточных микрочастиц – экзосом в целом и тромбоцитарного происхождения в том числе методом проточной цитометрии у пациентов с псориазом может отражать активацию системы гемостаза, риска развития тромботических осложнений, а также тяжесть течения заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Vičić M., Kaštelan M., Brajac I., Sotošek V., Massari L.P. Current Concepts of Psoriasis Immunopathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21):11574. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222111574>
2. World Health Organization. *Global Report on Psoriasis: World Health Organization*, 2016. Accessed December 1, 2021. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204417>
3. Tsai T.F., Wang T.S., Hung S.T. Epidemiology and comorbidities of psoriasis patients in a national database in Taiwan. *J. Dermatol. Sci.* 2011;63(1): 40–46. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.03.002
4. Mansouri B., Kivelevitch D., Natarajan B. Comparison of coronary artery calcium scores between patients with psoriasis and type 2 diabetes. *JAMA Dermatol.* 2016;152.
5. Borissoff J.I., Spronk H.M., ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl. J. Med.* 2011;364(18):1746–1760.
6. Usova S. *Clinical and pathogenetic assessment of vascular-platelet hemostasis disorders in various forms of psoriasis* (PhD Thesis). 2004;105. (in Russian)
7. Gaykovaya L., Shelamova D., Gulordava M., Ermakov A., Zamyatina K. Indicators of vascular-platelet hemostasis disorders in patients with psoriasis on standard therapy. *Modern achievements of chemical and biological sciences in preventive and clinical medicine: a collection of scientific papers of the All-Russian Scientific and Practical conference with international participation*. 2020;236–243. (in Russian)
8. Van der Zee P.M., Biro E., Ko Y., de Winter R.J., Hack C.E., Sturk A. P-selection and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarct. *Clin. Chem.* 2006;52:657–664.
9. McEver R.P., Beckstead J.H., Moore K.L., Marshall-Carlson L., Bainton D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92–99.
10. Biasucci L.M., Porto I., Di Vito L., De Maria G.L., Leone A.M., Tinelli G. Differences in microparticle release in patients with acute coronary syndrome and stable angina. *Circ J.* 2012;76:2174–2182.
11. Nieuwland R., Berckmans R.J., Rotteveel-Eijkman R.C. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation.* 1997;96:3534–3541.
12. Kailashiy J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal. Biochem.* 2018;546:78–85.
13. Tamagawa-Mineoka R. Platelet activation in patients with psoriasis: Increased plasma levels of platelet-derived microparticles and soluble P-selectin. *J Am Acad Dermatol.* 2010;62(4):621–626. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.06.053>
14. Garbaraviciene J., Diehl S., Varwig D., Bylaite M. *Platelet P-selectin reflects a state of cutaneous inflammation: possible application to monitor treatment efficacy in psoriasis*. 21 July 2010. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01095.x>
15. Chandrashekhara L., Rajappa M., Revathy G. Is enhanced platelet activation the missing link leading to increased cardiovascular risk in psoriasis? *Clin Chim Acta.* 2015;446:181–185. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.04.023>
16. Lipets E., Vlasova O., Urnova E. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and Xia induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients. *PLoS One.* 2014;9:e87692. doi: 10.1371/journal.pone.0087692
17. Nolan J.P., Jones J.C. Detection of platelet vesicles by flow cytometry. *Platelets.* 2017;28(3):256–262. doi: 10.1080/09537104.2017.1280602