

**UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI**

Monika Baj-Krzyworzeka

**INTERAKCJE MIKROFRAGMENTÓW BŁONOWYCH
POCHODZENIA PŁYTKOWEGO Z KOMÓRKAMI UKŁADU
HEMATO/LIMFOPOETYCZNEGO.**

Bibl. Medyczna CM UJ



1816027415

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Mariusz Z. Ratajczak
Zakład Transplantologii USD CMUJ w Krakowie

Zakład Immunologii Klinicznej Katedry Immunologii Klinicznej i Patologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. med. Marek Zembala

KRAKÓW 2002

Serdeczne podziękowania składam Prof. dr hab. med. Mariuszowi Ratajczakowi za zainteresowanie mnie tematem, wszechstronną pomoc w trakcie powstawania niniejszej pracy oraz ogromną życzliwość.

Dziękuję również Prof. dr hab. med. Markowi Zembali za wielką wyrozumiałość oraz umożliwienie mi wykonania przedstawianej pracy wspierane wieloma cennymi uwagami.

Ponadto dziękuję Zespołowi Profesora Mariusza Ratajczaka, a szczególnie dr Marcinowi Majce, dr Janinie Ratajczak i lek.med. Jackowi Kijowskiemu za ogromną życzliwość, cierpliwość i twórcze dyskusje wokół PMB.

1. SPIS TREŚCI

1.	SPIS TREŚCI.....	2
2.	WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	4
3.	WSTĘP	6
3.1.	Ogólna charakterystyka mikrofragmentów błonowych.....	6
3.2.	Mikrofragmenty błonowe pochodzące z płytek krwi (PMB)	7
3.3.	Mikrofragmenty błonowe uwalniane przez różne komórki.....	11
3.4.	Występowanie mikrofragmentów błonowych płytek krwi (PMB) w różnych stanach chorobowych	13
3.4.1.	Stany zapalne i miażdżyca	14
3.4.2.	Małopłytkowość	15
3.4.3.	Zabiegi chirurgiczne	16
3.4.4.	Choroby nowotworowe.....	16
3.4.5.	Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS)	17
3.5.	Potencjalne efekty biologiczne PMB	17
4.	CELE PRACY	21
5.	MATERIAŁY I METODY.....	22
5.1.	Izolacja płytek krwi.....	22
5.2.	Izolacja PMB.....	22
5.3.	Analiza cytofluorymetryczna PMB	23
5.4.	Hodowle komórkowe.....	24
5.5.	Izolacja komórek CD34 ⁺ CD4 ⁺ , CD8 ⁺ oraz CD19 ⁺	24
5.6.	Płynne hodowle komórek progenitorowych układu erytroidalnego i mieloidalnego	25
5.7.	Ocena klonogenności komórek CD34 ⁺ w obecności PMB	25
5.8.	Ocena klonogenności ustalonych linii komórkowych w obecności PMB	26
5.9.	Ocena proliferacji/przeżywalności ustalonych linii komórkowych oraz komórek progenitorowych CD34 ⁺ w obecności PMB	27
5.10.	Ocena wpływu PMB na aktywność kaspazy-3 w komórkach ustalonych linii hemato/limfopoetycznych	27
5.11.	Ocena przylegania PMB do komórek hematopoetycznych oraz ustalonych linii hemato/limfopoetycznych.....	27
5.12.	Badanie przylegania komórek CD34 ⁺ do SDF-1 β i komórek endotelialnych (HUVEC) oraz przylegania komórek wybranych linii komórkowych do fibrynogenu.	28
5.13.	Ocena chemotaksji komórek linii hemato/limfopoetycznych, komórek CD34 ⁺ oraz komórek jednojądrzastych szpiku kostnego do PMB i ich składników.....	29
5.14.	Ocena aktywności biologicznej wybranych składników białkowych i lipidowych obecnych w PMB	30
5.15.	Wykrywanie fosforylacji kinaz AKT, MAPK p42/44 oraz białek STAT 1, 3, 5, 6 w komórkach CD34 ⁺ oraz ustalonych liniach komórkowych po stymulacji PMB.....	30
5.16.	Wykrywanie obecności RANTES i SDF –1 w płytkach krwi i PMB	31
5.17.	Ocena obecności MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi i PMB	32
5.18.	Analiza komórek PB-1 inkubowanych z PMB przy użyciu mikroskopu konfokalnego	32
5.19.	Ocena ekspresji TF-mRNA w liniach komórkowych.....	32
5.20.	Analiza statystyczna.....	33

6.	WYNIKI	34
6.1.	Ekspresja antygenów pochodzenia płytkowego na powierzchni PMB	34
6.2.	Przyleganie PMB do powierzchni normalnych i transformowanych komórek hemato/limfopoetycznych	36
6.3.	PMB przylegają do powierzchni komórek a następnie mogą ulegać internalizacji	37
6.4.	Przyleganie płytek krwi i PMB do komórek ludzkich linii nowotworowych pochodzących z guzów litych	38
6.5.	Uwalnianie mikrofragmentów błonowych przez komórki hematopoetyczne	39
6.6.	Wpływ PMB na przyleganie hematopoetycznych linii komórkowych do fibrynogenu	39
6.7.	Wpływ PMB na przyleganie wczesnych komórek hematopoetycznych CD34 ⁺ do SDF-1 i komórek HUVEC	40
6.8.	PMB wywierają wpływ antyapoptotyczny na komórki ustalonych linii hematopoetycznych	40
6.9.	Wpływ PMB na proliferację/przeżywalność wczesnych komórek hematopoetycznych CD34 ⁺ oraz komórek wybranych linii hemato/limfopoetycznych	41
6.10.	Bezpośredni wpływ PMB na klonogenność wczesnych komórek hematopoetycznych CD34 ⁺ oraz komórek wybranych, ustalonych linii hemato/limfopoetycznych	42
6.11.	Wpływ PMB na chemotaksję komórek hematopoetycznych	43
6.12.	PMB bezpośrednio aktywują niektóre szlaki przenoszenia sygnału w komórce.	44
6.13.	Składniki biologicznie aktywne wchodzące w skład PMB	44
7.	DYSKUSJA	47
7.1.	Mikrofragmenty błonowe uwalniane przez płytki krwi	47
7.2.	Funkcje biologiczne białek receptorowych występujących na powierzchni PMB	49
7.3.	Modulacja chemotaksji komórek hemato/limfopoetycznych przez PMB	53
7.4.	Wpływ PMB na przyleganie komórek hemato/limfopoetycznych do komórek HUVEC, SDF-1 oraz fibrynogenu	54
7.5.	Modulacja przeżywalności i proliferacji komórek hemato/limfopoetycznych przez PMB	55
7.6.	Molekularne aspekty działania PMB na komórki docelowe	57
7.7.	Podsumowanie	60
8.	WNIOSKI	61
9.	STRESZCZENIE	63
10.	PIŚMIENNICTWO	66
11.	RYCINY I TABELLE	75

2. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AA (arachidonic acid) – kwas arachidonowy

ADP (adenosine diphosphate) - adenozyndifosforan

AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) - zespół nabytego niedoboru odporności

ATP (adenosine triphosphate) - adenozynotrifosforan

bFGF (basic fibroblast growth factor) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów

BFU-E (burst forming unit-erythroid) – wczesna komórka układu czerwono krwinkowego

C5b-9 (complement 5b-9) – kompleks składnika dopełniacza 5b-9

CD (cluster of differentiation lub cluster determinant) – kompleks różnicowania, determinanty powierzchniowe komórek

CFU-GM (colony forming units of granulocytes and macrophages) – wczesna komórka układu granulocytowo – makrofagowego tworząca *in vitro* kolonie granulocytowo - makrofagowe

CFU-Meg (colony forming units of megakaryocyte) – wczesna komórka układu megakariocytowego tworząca *in vitro* kolonie megakariocytowe

DIC (disseminated intravascular coagulation) – zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego

EGF (epithelial growth factor) – czynnik wzrostu komórek nabłonkowych

EPO (erythropoietin) - erytropoetyna

FACS (fluorescence – activated cell sorter) – cytofluorometr przepływowy

FBS (fetal bovine serum) – wołowa surowica płodowa

FCS (fetal calf serum) – cielęca surowica płodowa

fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)- N-formylometionylleucylofenyloalanina

G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów

GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

GP (glycoprotein) – glikoproteina

GPA (glycophorin A) – glikoforyna A (CD235a)

HD (Hodgkin disease) – ziarnica złośliwa (choroba Hodgkina)

HETE (hydroksyeicosatetraenoic acid) – kwas hydroeikozatetraenowy

HIV (human immunodeficiency virus) – ludzki wirus niedoboru immunologicznego

HPA (human platelet antigens) – swoiste antygeny płytkowe

HRP (horse radish peroxidase) - peroksydaza chrzanowa

ICAM (intercellular adhesion molecule) - cząsteczka adhezji międzykomórkowej

IL (interleukin) – interleukina

IMDM (Iscove modified DMEM) – medium hodowlane

ITP (immune thrombocytopenic purpura) - małopłytkowość o podłożu immunologicznym

LFA-1 (lymphocyte function –associated antigen) – antygen związany z czynnością limfocytów

MAPK (mitogen activated protein kinases) – aktywowane mitogenami kinazy białkowe

MB - mikrofragmenty błonowe

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) – monocytarny chemotaktyczny czynnik białkowy-1

MDC (macrophage-derived chemokine) – chemokina pochodzenia makrofagowego

MMP (metalloproteinase) – metaloproteinaza

NK (natural killer) – naturalna komórka cytotoksyczna NK

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

PCR (polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PF4 (platelet factor 4) - czynnik płytkowy 4

PGE1 (prostaglandin E1) – prostaglandyna E1

PDGF (platelet derived growth factor) –czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego

PKC (protein kinase C) – kinaza białkowa C

PLC (phospholipase C) – fosfolipaza C

PMB –mikrofragmenty błonowe pochodzenia płytkowego

PRP (platelets rich plasma) – plazma bogata w płytki krwi

PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand – 1) - CD162, ligand dla P-selektyny

RT –PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy

SCF (stem cell factor) - czynnik wzrostu pierwotnych komórek szpiku

SDF-1 (stromal derived factor –1) - czynnik pochodzenia stromalnego-1

SPP-1 (phosphate –1-sphingosine) - fosforan sfingozyny

STAT (signal transducers and activators of transcription) – białka sygnałowe grupy STAT

TF (tissue factor) - czynnik tkankowy

TGF β (transforming growth factor β) – transformujący czynnik wzrostu typu β

TNF (tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotworów

TNFR I (tumor necrosis factor receptor type I) – receptor dla TNF α typu I

TNFR II (tumor necrosis factor receptor type II) – receptor dla TNF α typu II

TpO (thrombopoietin) - trombopoetyna

VCAM (vascular cell adhesion molecule) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń

VEGF (vascular endothelial cell growth factor) czynnik wzrostu komórek śródbłónki naczyniowego

VLA (very late antigen)- antygen bardzo późny

3. WSTĘP

3.1. Ogólna charakterystyka mikrofragmentów błonowych

Komórki eukariotyczne uwalniają fragmenty błon komórkowych, czyli tzw. mikrofragmenty błonowe (MB). MB mogą uczestniczyć w wielu procesach zachodzących w organizmie w stanach zarówno fizjologii jak i patologii. Wydzielane są one przez komórki normalne jak i zmienione patologicznie podczas proliferacji, wydzielania białek na drodze egzocytozy lub w wyniku stymulacji czynnikami wzrostowymi, cytokinami, chemokinami czy też antygenami [Beaudoin 1991, Nomura i wsp. 1995, Nieuwland i wsp. 2000, Heijnen i wsp. 1999]. Dotychczas udokumentowano uwalnianie MB przez płytki krwi [George i wsp. 1982, Tans 1991], erytrocyty [Beaudoin Grondin G., 1991, Jimenez i wsp. 2001, Combes i wsp. 1999], limfocyty [Nieuwland i wsp. 2000], granulocyty [Mesri i wsp. 1998, 1999], monocyty [Nieuwland i wsp. 2000] oraz komórki nowotworowe [Wolfers i wsp. 2001, Ginestra i wsp. 1994].

Mikrofragmenty błonowe pod względem strukturalnym są nieliniarnymi fragmentami wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych błon, które wydzielane są do przestrzeni pozakomórkowej. MB tworzą micelle o średnicy zazwyczaj poniżej 1µm. Znajdując się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą one oddziaływać na komórki pośrednio (dzięki swoim komponentom) jak i przez bezpośrednie interakcje. MB zbudowane są z białek i lipidów, przy czym procentowa zawartość tych składników zależy od źródła ich pochodzenia. Wiadomo, że mogą one zawierać receptory powierzchniowe jak i białka cytoszkieletu. Lipidy wchodzące w skład MB to przede wszystkim glikolipidy i ujemnie naładowane fosfolipidy. Węglowodany stanowią do 10% masy MB i występują głównie w formie pochodnych glikolipidowych i glikoproteinowych [Beaudoin i wsp. 1991].

MB są wydzielane przez prawidłowe komórki w wyniku procesów takich jak fragmentacja błony komórkowej (np. komórki śródbłónka), egzocytozy (np. retikulocyty), “pączkowanie” (np. limfocyty) oraz uwalnianie ziarnistości sekrecyjnych (np. płytki krwi) [Beaudoin i wsp. 1991, Michelson i wsp. 2000a, Morgenstern, 1997]. To ostatnie zjawisko dotyczy głównie płytek krwi, których aktywacja i agregacja kończy się uwolnieniem szeregu ziarnistości i mediatorów biologicznych, w tym również i mikrofragmentów błonowych. Płytki krwi są istotnym źródłem MB w surowicy krwi. MB pochodzenia płytkowego początkowo nazywane były “kurzem płytkowym” i pod tą nazwą ukazywały się w publikacjach w latach 60 tych [Wolf

i wsp. 1967, George i wsp. 1982, Morgenstern, 1997]. Uwalnianie MB towarzyszy również dojrzewaniu erytrocytów i limfocytów [Beaudoin i wsp. 1991]. Mikrofragmenty błonowe uwalniane są także pod wpływem czynników stresu (temperatury, zmiany ciśnienia osmotycznego, napięcia powstającego podczas przepływu w naczyniach lub plastikowych przewodach podczas leukoferezy czy też dializy krwi), aktywacji cytokinami i chemokinami, jonoforami wapnia lub proteazami (trombina) [Barry i wsp. 1997, 1999]. Uwalnianie MB wiąże się ze zmianami płynności błony komórkowej i rozerwaniem ścisłego połączenia z cytoszkieletem [Morgenstern, 1997, Nomura i wsp. 1992]. Stwierdzono, że obserwowany u osób zdrowych stosunkowo niski poziom MB w surowicy ulega dramatycznemu podwyższeniu w różnych stanach chorobowych, np. stanach septycznych, uogólnionej miażdżycy, jak również wzrasta podczas procedur takich jak zabiegi chirurgiczne, leukofereza oraz dializa [Hughes i wsp. 2000, Gewaz i wsp. 1994, Gemmell i wsp. 1995].

3.2. Mikrofragmenty błonowe pochodzące z płytek krwi (PMB)

Płytki krwi w wyniku aktywacji zmieniają kształt, tworzą pseudopodia i uwalniają do otoczenia zawartość ziarnistości sekrecyjnych. Powstawanie PMB (płytkowe mikrofragmenty błonowe) jest często łączone z procesem sekrecji, bądź pączkowania pseudopodiów płytkowych. Hughes proces powstawania PMB dzieli na trzy etapy: tworzenie pseudopodium, formowanie pączka (ang. *bud*), czyli pierwotnego PMB i uwolnienie PMB. PMB po uwolnieniu nie są związane z płytką i krążą w surowicy krwi jako struktury niezależne [Hughes i wsp. 2000]. W tej formie mogą one oddziaływać na inne komórki.

Istnieje wiele teorii tłumaczących molekularny mechanizm powstawania PMB. Zwaal i wsp. uważa, że pod wpływem wzrastającego stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie płytki aktywacji ulega enzym, który katalizuje zmianę ułożenia fosfolipidów w obrębie błony komórkowej na drodze niezależnej od ATP (skramblaza fosfolipidowa, ang. *lipid scramblase*). Powoduje to zaburzenie asymetrii błony i przemieszczenie fosfatydyloseryny z wewnętrznej strony błony na zewnątrz, czemu towarzyszy uwalnianie fragmentów błony. Aktywacja skramblazy fosfolipidowej jest niezbędna aczkolwiek niewystarczająca do uwolnienia PMB i musi jej towarzyszyć aktywacja kalpajny [Zwaal i wsp. 1997, Pasquet i wsp. 1996]. Według Miyazaki, oprócz wymienionych czynników konieczne jest także wiązanie czynnika Willebranda do

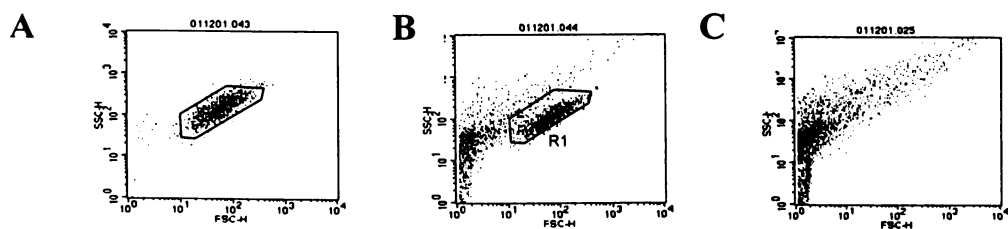
plytkowej GPIIb, a cały proces jest zależny do PKC [Miyazaki i wsp. 1996]. Gemmell z kolei sugeruje, że kluczowym ogniwem w powstawaniu PMB jest aktywacja glikoproteiny α_{IIb}/β_3 [Gemmell i wsp. 1993].

Poziom PMB w surowicy i plazmie zdrowych dawców jest równy odpowiednio 30-100 $\mu\text{g/ml}$ i $4,4^{+/-}3.2 \mu\text{g/ml}$ [$2-3 \times 10^7$ PMB/ml] [George i wsp. 1982, Jy i wsp. 1995] i ulega od 10 do 100 - krotnemu podwyższeniu podczas aktywacji płytek krwi [Jy i wsp. 1995]. Aktywatorami płytek, a tym samym czynnikami powodującymi zwiększenie stężenia PMB w surowicy są trombina, kolagen, jonofory wapnia (czynniki podnoszące poziom Ca^{2+} wewnątrz komórki), kompleks składników komplementu C5b-9 [Barry i wsp. 1997, 1999, Morgenstern, 1997]. Uwolnienie PMB w wyniku stymulacji trombiną następuje w ciągu kilku minut [Miyazaki i wsp. 1996]. Barry i wsp. podaje, że warunkach *in vitro* z 3×10^8 płytek krwi (ilość płytek, która występuje normalnie w 1 ml krwi obwodowej) można uzyskać 260 μg PMB [Barry i wsp. 1997]. Płytki ulegają aktywacji również po kontakcie z ligandami dla receptorów płytkowych obecnych na innych komórkach. Wykazano, że występujący na komórkach hematopoetycznych ligand P selektyny – CD162 jak i integryna Mac-1 mogą wiązać [Janowska-Wieczorek A., i wsp. 2001], a następnie aktywować płytki, które w wyniku aktywacji uwalniają PMB [Nomura i wsp. 2000c, de Bruijne-Admiraal i wsp. 1992, Piccardoni i wsp. 2001].

Jak wspomniano powyżej znanym czynnikiem aktywującym płytki i powstawanie PMB jest również napięcie (tzw. moduł ścinania) powstające podczas przepływu krwi przez chorobowo zwężone (np. w wyniku zmian miażdżycowych) naczynia krwionośne (ang. "*shear stress*") [Holme i wsp. 1997, Nomura i wsp. 2000]. PMB mogą również powstawać podczas leukoferezy, gdy płytki krwi krążą w plastikowych przewodach i aktywowane są podczas kontaktu z ich powierzchnią [Nomura i wsp. 2000a,b, Gemmell i wsp. 1995]. Wykazano też, że G-CSF, IL-6, SCF oraz TPO mogą wpływać na aktywację płytek a tym samym mogą modulować powstawanie PMB. PMB mogą powstawać również w warunkach *in vitro* podczas przechowywania płytek np. w bankach krwi w formie masy płytkowej [Bode i wsp. 1991, Nomura i wsp. 2000c]. Mogą one również powstawać podczas przechowywania preparatów świeżo mrożonej plazmy czy też krioprecypitatów [Nomura i wsp. 2000c]. Powstawanie PMB związane jest również z procesem starzenia się płytek krwi [Miyamoto i wsp. 1998, Jy i wsp. 1995, Bode i wsp. 1991].

W warunkach *in vitro* PMB uzyskiwane są w wyniku aktywacji płytek krwi poprzez trombinę lub trombinę i kolagen [Pasquet i wsp. 1996, Gemmell i wsp. 1993, Barry i wsp. 1999]. Równie dobrym stymulatorem jest jonofor wapnia A23187. Aktywacja płytek jest procesem zależnym od Ca^{2+} [Barry i wsp. 1999]. Nadsącz z aktywowanych płytek zawiera PMB, które można zagęścić poprzez wirowanie ($>20000g$). W innej metodzie izolacji PMB opisanej przez Pasqueta, nadsącz z aktywowanych płytek sedimentowano przez warstwę sukrozy otrzymując PMB o bardzo małym zanieczyszczeniu płytkami krwi [Pasquet i wsp. 1996a]. PMB uzyskuje się również stosując warunki analogiczne do panujących w zwężonych naczyniach w trakcie przepływu krwi np. podczas aktywacji płytek krwi siłą 10^8 dyn/cm^2 w krótkim czasie (1 minuta) [Nomura i wsp. 2000]. Potencjalnym źródłem PMB są również hodowane megakariocyty. Komórki te rosną w naczyniach hodowlanych np. podczas ekspansji *ex vivo* uwalniają PMB [Cramer i wsp. 1997, Battinelli i wsp. 2001]. W prezentowanej rozprawie postanowiono m.in. porównać różne metody pozyskiwania PMB.

PMB identyfikuje się przy pomocy cytometrii przepływowej [Abrams i wsp. 1990, Michelson i wsp. 2000, Nomura i wsp. 2000b, Pasquet i wsp. 1996a, Gemmell i wsp. 1997]. Rycina 1 przedstawia cytogram PMB uzyskanych z płytek krwi obwodowej stymulowanych trombiną. Zwraca uwagę fakt, że PMB są znacznie mniejsze od płytek krwi. Morfologiczną analizę PMB można prowadzić również przy pomocy mikroskopu konfokalnego, elektronowego skaningowego czy transmisyjnego [Nomura i wsp. 2000b, Hughes i wsp. 2000, Holme i wsp. 1994]. To właśnie dzięki mikroskopii elektronowej udało się wykazać, że po aktywacji płytek najwięcej PMB znajduje się w pobliżu pseudopodiów płytkowych [Hughes i wsp. 2000].



Ryc. 1. Ocena cytofluometryczna PMB uzyskanych z płytek krwi obwodowej w wyniku stymulacji trombiną (2U/ml). **A** – cytogram płytek krwi (region - R1). **B** – płytki (region R1) oraz powstające w wyniku stymulacji trombiną PMB. **C** – PMB powstałe w wyniku “rozpadu” aktywowanych trombiną płytek krwi.

Za pomocą cytometrii przepływowej można również określić przybliżoną liczbę PMB. Metodę ilościowej analizy PMB przy użyciu cytometru przepływowego przedstawił Matzdorff [Matzdorff i wsp. 2000]. Najczęściej jednak do ilościowej oceny PMB i MB stosuje się pomiar zawartego w nich białka [Merten i wsp. 1999, Holme i wsp. 1994]. W prezentowanej rozprawie posłużono się metodą Bradforda, która umożliwia pomiar białka całkowitego.

Opisano już, że PMB posiadają ekspresję niektórych antygenów płytkowych takich jak CD9, CD36 (GPIV), CD41/CD61 (GPIIb/IIIa), GPIaIIa, CD42a, CD42b (GPIb) oraz CD62P [Nomura i wsp. 2000b]. PMB posiadają również silną ekspresję fosfatydyloseryny i w związku z tym do ich izolacji stosuje się m.in. kuleczki magentyczne znakowane aneksyną V [Tzima i wsp. 2000]. Uważa się, że PMB uzyskiwane różnymi metodami mogą różnić się fenotypem, nie jest również wykluczone że różnice te są istotne funkcjonalnie [Pasquet i wsp. 1996a, Nomura i wsp. 2000b]. Opisano, że PMB indukowane A23187 są mniejsze i bardziej homogenne niż te, które się uzyskuje poprzez stymulację kompleksem C5b-9 białek dopełniacza [Holme i wsp. 1996]. Mają one ponadto w porównaniu do PMB uzyskanych poprzez stymulację płytek trombiną i kolagenem zwiększoną zdolność do przylegania do fibrynogenu [Sijander i wsp. 1996]. PMB uzyskiwane ze starzejących się płytek mają mniejszą ekspresję P-selektyny niż same płytki, aczkolwiek w dalszym ciągu jest to ekspresja umożliwiająca oddziaływanie międzykomórkowe [Miyamoto i wsp. 1998]. W celu wzbogacenia informacji dotyczących obecności różnych antygenów i receptorów na powierzchni PMB w przedstawianej rozprawie zbadano, czy PMB posiadają na powierzchni również inne markery pochodzenia płytkowego takie jak np. receptor chemokinowy CXCR4, receptor trombinowy PAR-1, czy też obecne na płytkach receptory dla $\text{TNF}\alpha$ (typ I i II). Oceniano również, czy na powierzchni PMB występują białka mogące potencjalnie pełnić funkcje ligandów np. chemokiny PF-4 i RANTES (zawarte w α -granulach płytkowych) lub znajdujący na powierzchni aktywowanych płytek antygen CD154 (ligand dla CD40) [Slupsky i wsp. 1998, Henn i wsp. 1998]. Ocenę ekspresji wybranych antygenów powierzchniowych badano w zależności od sposobu pozyskania PMB.

PMB wykazują właściwości zarówno pro- jak i antykoagulacyjne [Miyazaki i wsp. 1996, Tans i wsp. 1991]. Aktywność protrombinazowa PMB wynika z obecności fosfatydyloseryny i receptorów dla czynników VIII, Va i IX. Wiązanie czynnika VIII

przez PMB nie jest zależne od sposobu aktywacji płytek i nie zmniejsza się w czasie tak jak to ma miejsce w przypadku płytek krwi [Michelson i wsp. 2000, Gilbert i wsp. 1991]. Wynik ten potwierdza doniesienie Barry [Barry i wsp. 1997], że PMB mogą działać w oddaleniu od miejsca aktywacji płytek i to przez czas znacznie dłuższy niż aktywowane płytki. Aktywność prokoagulacyjna może być zmniejszana przez wiązanie anneksyny V, która wiążąc się do fosfatydyloseryny utrudnia jej działanie jako kofaktora w procesie krzepnięcia [Pasquet i wsp. 1996]. PMB mogą także działać przeciwkrzepliwie ponieważ wiążą białko S, będące kofaktorem inaktywacji czynnika V i VII przez aktywne białko C. [Tans i wsp. 1991, Holme i wsp. 1995]. Ocenia się, że aktywność pro- jak i antykoagulacyjna PMB stanowi około 20 do 30% aktywności płytek krwi. Nie wydaje się jednak aby istniał sposób indukowania PMB o określonym charakterze np. tylko prokoagulacyjnym lub tylko antykoagulacyjnym.

PMB mają dużą zdolność przylegania do komórek [Tans i wsp. 1991] jak i białek macierzy zewnątrzkomórkowej [Merten i wsp. 1999]. Dotychczas nie wiadomo jednak czy PMB przyłączone do powierzchni komórki podlegają 1] okresowemu przyleganiu, 2] trwałemu wbudowaniu w błonę czy 3] internalizacji do wnętrza komórki [Jy i wsp. 1995].

3.3. Mikrofragmenty błonowe uwalniane przez różne komórki

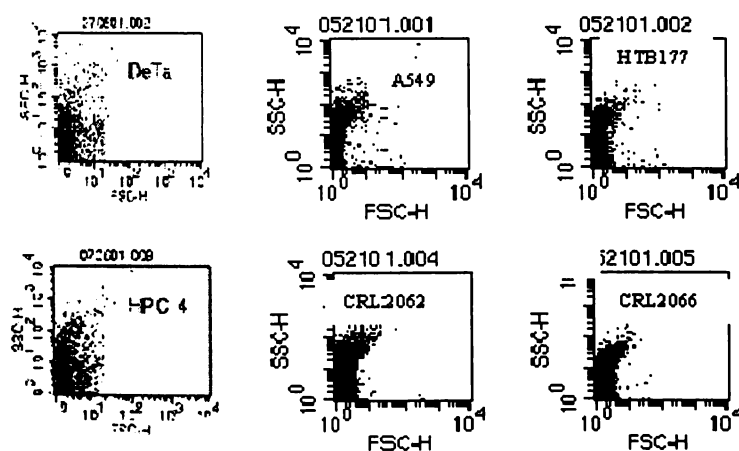
MB uwalniane są przez prawie wszystkie komórki eukariotyczne. Uważa się m.in., że uwalnianie MB przez retikulocyty i niedojrzałe erytrocyty wiąże się z procesem ich dojrzewania. MB pochodzące z tych komórek mogą zawierać receptory dla transferyny, fibronektyny czy insuliny. Uwalnianie MB przez komórki erytroidalne jest więc swoistego rodzaju fizjologicznym procesem pozbywania się przez dojrzały erytrocyt zbędnych białek powierzchniowych (ang. receptor shedding). Erytrocyty mogą ponadto uwalniać MB również podczas starzenia się, przy niedoborze ATP, czy podczas stymulacji Ca^{2+} lub jonoforami wapnia [Beaudoin i wsp. 1991, Chitambar i wsp. 1991].

Satta i wsp. wykazała, że stymulowane in vitro monocyty wydzielają mikrofragmenty błonowe, które posiadają dużą ekspresję czynnika tkanowego – 1 (ang. *tissue factor* - TF-1), fosfatydyloseryny, CD14, CD11a oraz CD18 (LFA-1) [Satta i wsp. 1994, Rauch i wsp. 2000]. Ponadto wykazano, że MB uwalniane przez monocytarną linię komórkową THP-1 zawierają IL-1 β [MacKenzie i wsp. 2001].

Również granulocyty mogą uwalniać MB w wyniku stymulacji (np. fMLP lub IL-8). MB pochodzące z tych komórek są bardzo heterogenne i mogą stymulować komórki HUVEC do produkcji IL-6 i IL-8 [Mesri i wsp.1998] Obecność MB o fenotypie CD66b⁺ wykazano w plazmie osób zdrowych jak i pacjentów cierpiących na uogólnione infekcje [Nieuwland i wsp. 2000].

MB uwalniane są także przez komórki endotelialne. Stwierdzono między innymi, że MB uwalniane przez te komórki w wyniku stymulacji czynnikiem martwicy nowotworów typu α (TNF α) mają zwiększoną w stosunku do komórek niestymulowanych ekspresję ICAM-1, $\alpha_v\beta_3$, TF i E-selektyny [Combes i wsp. 1999]. Wykazano także, że komórki śródbłónka stymulowane VEGF uwalniają MB zawierające MMP-2 i MMP-9 [Taraboletti i wsp. 2002]. Uwalnianie MB z komórek endotelialnych występuje również podobnie jak to ma miejsce w przypadku płytek krwi w wyniku aktywacji kompleksem C5b-9 białek dopełniacza, trombiną czy też jonoforami wapnia [Jimnez i wsp. 2001, Zwaal i wsp. 1997].

Źródłem MB są również komórki nowotworowe. MB pochodzące z niektórych linii nowotworowych np. raków sutka lub jajnika są źródłem metaloproteinaz [Dolo i wsp. 1994, 1998, 1999, Harayama i wsp. 1999, Ginestra i wsp. 1999]. Uważa się ponadto, że MB pochodzące z komórek nowotworowych mogą posiadać właściwości prokoagulacyjne [Dvorak i wsp. 1981, 1983]. Rycina 2 przedstawia ocenę cytofluorymetryczną MB pochodzących z ustalonych linii komórkowych raka płuca, trzustki i jelita grubego (badania własne).



Ryc. 2. Ocena MB w nadsączach uzyskanych z hodowli *in vitro* rosnących eksptencjalnie komórek ludzkich linii raka jelita grubego (DeTa), trzustki (HPC) i płuc (A549, HTB 177, CRL 2062 oraz CRL 2066).

3.4. Występowanie mikrofragmentów błonowych płytek krwi (PMB) w różnych stanach chorobowych

Opisano wiele stanów patologicznych przebiegających ze zmianami poziomu PMB. PMB indukowane w różnych jednostkach chorobowych mają bardzo podobne właściwości morfologiczne, ale przypuszczalnie pełnią różną rolę biologiczną w przebiegu schorzeń. Podwyższony poziom PMB obserwowano w stanach patologicznych związanych z aktywacją płytek takich jak posocznica, małopłytkowość pochodzenia immunologicznego, choroba Moschowitza (*thrombotic thrombocytopenic purpura*), zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego - DIC (ang. *disseminated intravascular coagulation*), miażdżyca, zawał mięśnia sercowego, dusznica bolesna, przejściowe niedokrwienie kończyn dolnych, zator tętnicy płucnej, mocznica, cukrzyca [Nomura i wsp. 1995], AIDS oraz u pacjentów poddanych zabiegom operacyjnym, [Nomura i wsp 2000a] plazmaferezie, leukoferezie oraz dializom [Holme i wsp. 1994, Gewaz i wsp. 1994, Mallat i wsp. 2000].

Z drugiej strony, opisano niewiele stanów klinicznych przebiegających z obniżeniem poziomu PMB. Przykładem może być izolowany defekt aktywności prokoagulacyjnej płytek opisany przez Castamana [Castaman i wsp. 1997]. Podobnie tzw. zespół Scotta charakteryzuje się obniżonym poziomem PMB w stosunku do kontroli zdrowych dawców [Zwaal i wsp. 1997]. Sprzeczne doniesienia dotyczą trombastenii Glanzmana. Gemmell uważa, że cechuje się ona zupełnym brakiem powstawiania PMB [Gemmell i wsp. 1993], Holme zaś przedstawia wyniki świadczące o możliwości ich indukcji [Holme i wsp. 1995]. Na uwagę zasługuje również fakt, że u wcześniaków zaobserwowano niższy poziom PMB niż u dorosłych czy dzieci rodzonych w terminie, co więcej ich PMB mają obniżoną ekspresję prokoagulacyjnego czynnika V/Va, co może tłumaczyć tendencję do występowania krwotoków dokomorowych w tej grupie pacjentów [Rajasekhar i wsp. 1994, 1997, Michelson i wsp. 2000].

W związku z powyższym PMB występują w ustroju zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych, mogą tym samym oddziaływać na szereg procesów biologicznych. Poniżej omówiony zostanie nieco szerzej problem występowania podwyższonych wartości PMB w różnych stanach chorobowych. Obecność wysokich stężeń PMB w surowicy u chorych zwiększa prawdopodobieństwo interakcji PMB z krążącymi komórkami układu hemato/limfopoetycznego.

3.4.1. Stany zapalne i miażdżyca

Podwyższony poziom PMB w surowicy krwi, który towarzyszy miejscowym jak i uogólnionym stanom zapalnym może mieć znaczenie w ich diagnostyce. W ognisku zapalnym PMB mogą oddziaływać z różnymi rodzajami komórek. Przede wszystkim, co wykazała Barry i wsp. PMB zwrotnie aktywują płytki, które agregują, wydzielają czynniki płytkowe i w wyniku aktywacji tworzą kompleksy z PMB [Barry i wsp. 1997]. PMB obecne w plazmie, które posiadają ekspresję czynników VII i VIIa, oddziałują z TF obecnym na powierzchni innych komórek np. monocytów [Nijziel i wsp. 2001]. Co więcej, aktywacja TF jest wspomagana obecnością fosfatydyloseryny na PMB. Monocyty podobnie jak limfocyty i neutrofile posiadają na błonach komórkowych ekspresję ligandów dla P-selektyny (CD162, CD15, oraz sjałowych pochodnych glikanów), dzięki którym zarówno aktywują płytki krwi jak i wiążą powstające z nich PMB. Na uwagę zasługuje fakt, że kontakt PMB z neutrofilami oraz monocytami powoduje aktywację tych komórek [Nijziel i wsp. 2001]. Co więcej aktywowane w ten sposób monocyty mają większą adhezję do komórek śródbłónka (HUVEC) *in vitro* [Barry i wsp. 1998], co wydaje się mieć znaczenie w rozwoju miażdżycy [Mallat i wsp. 1999]. Stwierdzono również, że i same PMB mogą przylegać do komórek śródbłónka, a także jak wykazano dla komórek HUVEC mogą aktywować *in vitro* komórki śródbłónka [Barry i wsp. 1998]. Oprócz tego, PMB mogą pośredniczyć w interakcjach monocytów i neutrofilów z macierzą zewnątrzkomórkową [Barry i wsp. 1998].

W stanach patologicznych przebiegających ze znacznym wzrostem stężenia PMB, mikrofragmenty błonowe pochodzenia płytkowego mogą oddziaływać na szereg procesów biologicznych. Wiadomo np., że PMB ułatwiają agregowanie leukocytów, wspomagają ich „toczenie” (ang. *rolling*) i „pętanie” (ang. *tethering*) po komórkach śródbłónka, a także umożliwiają interakcje leukocyt-leukocyt [Forlow i wsp. 2000]. Wydaje się, że PMB mogą pomagać komórkom w docieraniu do ogniska zapalnego, a poprzez eksponowanie na komórkach docelowych fosfatydyloseryny mogą zwiększać zdolność fagocytarną neutrofilów i makrofagów [Zwaal i wsp. 1997].

Z drugiej strony należy pamiętać, że w ognisku zapalnym, jak i osoczu pacjentów z posocznicą występują MB uwalniane przez wszystkie rodzaje komórek, które ulegają aktywacji w wyniku powstałego zapalenia. Dotyczy to granulocytów, monocytów, komórek śródbłónka czy limfocytów [Gawaz i wsp. 2000, Mallat i wsp.

2000, Jimnez i wsp. 2001]. Szczególnie te ostatnie mogą indukować wydzielanie chemokin, cytokin zapalnych jak również indukować syntezę TF *de novo* [Mesri i wsp. 1999]. Podniesiony poziom TF w MB pochodzących z monocytów jak i uwolnionych przez komórki mięśni gładkich naczyń może być przyczyną powstawania zakrzepów w naczyniach krwionośnych [Mallat i wsp. 2000, Schechter i wsp. 2000].

3.4.2. Małopłytkowość

Podwyższony poziom PMB obserwuje się u pacjentów z małopłytkowością o podłożu autoimmunologicznym (ang. *ITP - immune thrombocytopenic purpura*, samoistna plamica małopłytkowa) [Jy i wsp. 1992, Jimnez i wsp. 2001, Nieswandt i wsp. 2000] jak również w małopłytkowości indukowanej heparyną [Warkentin i wsp. 1994]. Podwyższony poziom PMB opisano także u chorych z małopłytkowością spowodowaną nieimmunizacyjnym niszczeniem płytek np. w przebiegu rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC) czy zakrzepowej plamicy małopłytkowej (choroba Moschowitz) [Nomura i wsp. 1999, Nieuwland i wsp. 2000].

U pacjentów z ITP wykazano obecność krążących przeciwciał przeciwko protrombinie, białku C, białku S, GPIIb2, HPA [Nieswandt i wsp. 2000, Zwaal i wsp. 1997, Maślanka 1990]. Występujące u tych pacjentów PMB stanowią dodatkową „powierzchnię ataku” dla tych przeciwciał, które opsonizują PMB i mogą wywoływać reakcję anafilaktyczną. W rezultacie prowadzi to do występowania krwawień. Powstawanie PMB w ITP wydaje się być procesem GPIIbIIIa zależnym [Nieswandt i wsp. 2000], aczkolwiek podawanie inhibitorów GPIIbIIIa (c7E3, DMP728, XJ757) nie hamuje powstawania PMB całkowicie [Matzdorff i wsp. 2000].

Małopłytkowość indukowana heparyną występuje u pacjentów poddawanych terapii heparynowej z równoczesnymi zabiegami zakładania pomostów naczyniowych, angioplastyką czy trwającym stanem zapalnym [Warkentin i wsp. 1994]. Wiązanie heparyno-zależnych IgG do płytkowego receptora FcγRII powoduje aktywację płytek oraz uwalnianie PMB [Sheriadan i wsp. 1986]. Osocze od pacjentów z trombocytopenią indukowaną heparyną stymuluje płytki zdrowych dawców do uwalniania PMB o właściwościach prokoagulacyjnych [Warkentin i wsp. 1994].

Przyczyną małopłytkowości mogą być również transuzje preparatów płytkowych [Maślanka i wsp. 1986, Uhrynowska i wsp. 1996]. Noumura i wsp. sugeruje,

że to właśnie PMB są odpowiedzialne za skutki uboczne transfuzji masy płytkowej u pacjentów z chorobami hematologicznymi [Nomura i wsp. 2000c].

Szczególnie dużo PMB bogatych w kalpainę zaobserwowano u chorych z syndromem Wiskott-Aldricha [Pasquet i wsp. 1996b].

3.4.3. Zabiegi chirurgiczne

Zabiegi naczyniowe (np. zakładania pomostów naczyniowych) prowadzą również do aktywacji płytek krwi. Płytki krwi „rozpoznają” bowiem miejsca przeszczepu jako obce, ulegają aktywacji i przylegają do ścianek naczyń. Równocześnie uwalniają one czynniki płytkowe i PMB, które mając duży potencjał prokoagulacyjny ułatwiają powstawanie zakrzepów. W rezultacie dochodzi do zwężenia a nawet zamknięcia naczyń krwionośnego. Wydaje się, że w przebiegu zwężenia tętnic i nawrotu zwężenia (restenosis) ważną rolę odgrywa oddziaływanie PMB i mięśni gładkich naczyń. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że PMB mogą stymulować proliferację komórek mięśni gładkich na drodze niezależnej od czynnika wzrostowego pochodzenia płytkowego (PDGF – ang. *platelet derived growth factor*). Zakłada się, że czynnikiem indukującym powstawanie PMB w tym przypadku może być podniesiony poziom cytokin prozapalnych w miejscu wykonanego zabiegu chirurgicznego [Weber i wsp. 2000, Miyamoto i wsp. 1998].

3.4.4. Choroby nowotworowe

Udział płytek w przerzutowaniu komórek nowotworowych w organizmie jest przedmiotem szeroko badanym i dobrze udokumentowanym. Możliwe, że płytki oplaszczając komórki nowotworowe czynią je „niewidzialnymi” dla komórek cytotoksycznych albo też ułatwiają im adhezję do białek macierzy zewnątrzkomórkowej [Honn i wsp. 1992, Borsig i wsp. 2001]. Istotnym elementem tych interakcji jest wydzielanie przez aktywowane płytki czynników wzrostowych (np. PDGF), które mogą stymulować rozwój metastaz. Płytki mogą równocześnie ulegać aktywacji w wyniku bezpośredniego kontaktu z komórką nowotworową [Borsig i wsp. 2001]. Wynikać to może z ekspresji TF na powierzchni większości komórek nowotworowych, jak również proteazy cysteinowej która, pobnie jak TF aktywuje czynnik X [Zhang i wsp. 1994, Hejna i wsp. 1999]. W wyniku aktywacji płytki uwalniają PMB, które mają właściwości prokoagulacyjne [Mallat i wsp. 1999, Holme

i wsp. 1994, Pasquet i wsp. 1996b] oraz mogą przylegać do powierzchni komórek nowotworowych [Lindenmeyer i wsp. 1997]. Wiadomo również, że komórki nowotworowe mogą uwalniać własne MB o aktywności protrombinazowej [Dvorak i wsp. 1981, 1983], a trombina jest uważana za czynnik stymulujący progresję nowotworów [Hejna i wsp. 1999, Mosesson, 2000]. Aktywność prokoagulacyjna zapewnia komórce nowotworowej również ochronę w postaci sieci fibrynowej, która stanowi swojego rodzaju przeszkodę mechaniczną hamującą dostęp komórek układu immunologicznego [Palumbo i wsp. 2000]. W osoczu pacjentów z chorobami nowotworowymi wykrywa się m.in. podwyższony poziom metabolitów kwasu arachidonowego (AA), który stanowi składnik PMB, a któremu to równocześnie przypisuje się charakter prometastatyczny [Hejna i wsp. 1999]. Można przyjąć, że ważną rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych mogą pełnić same PMB.

3.4.5. Zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS)

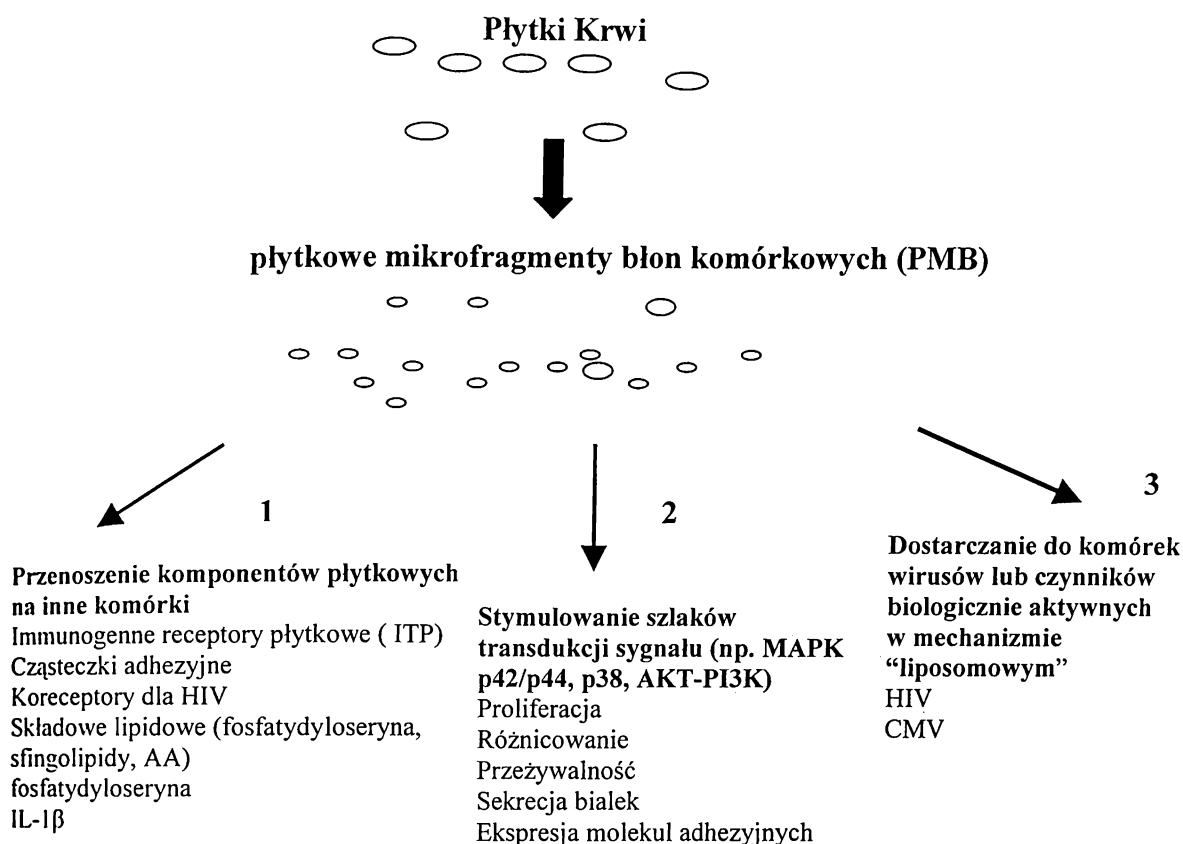
Poziom PMB w osoczu pacjentów z AIDS jest znacznie podniesiony w porównaniu do osób zdrowych. Można przypuszczać, że w przebiegu infekcji HIV, MB mogą przenosić receptor CD4 lub koreceptory chemokinowe CCR5 lub/i CXCR4, niezbędne do wniknięcia wirusa HIV, na komórki które w warunkach normalnych nie posiadają ich ekspresji. Zgodnie z powyższym, wykazano np., że MB uwalniane przez komórki mononuklearne krwi posiadają ekspresję CCR5 będącego koreceptorem dla szczepów makrofagotropowych HIV-1. Opłaszczenie komórek nie posiadających koreceptora CCR5, za pomocą MB pochodzenia monocytowego powodowało, że opłaszczone komórki zakażały się wirusem M-tropowym HIV [Mack i wsp. 2000]. Uważa się również, że w przebiegu AIDS, „znakowanie” limfocytów przez bogate w fosfatydyloserynę PMB prowadzi do dodatkowego ich niszczenia przez komórki fagocytykujące. PMB obecne są we krwi chorych na AIDS nawet wtedy gdy nie ma już krążących limfocytów T, a ich koncentracja jest trzykrotnie wyższa niż u osób zdrowych [Aupeix i wsp. 1997].

3.5. Potencjalne efekty biologiczne PMB

Uwalnianie PMB jest następstwem aktywacji płytek, a ich ciągłą obecność we krwi zdrowych dawców jak i pacjentów w przebiegu różnych chorób została dobrze udokumentowana w literaturze [Nomura i wsp. 2000, 1992, Beaudoin i wsp. 1991, de

Bruijne-Admiraal i wsp. 1992, Piccardoni i wsp. 2001]. Rycina 3 podsumowuje możliwe sposoby oddziaływania PMB na komórki docelowe.

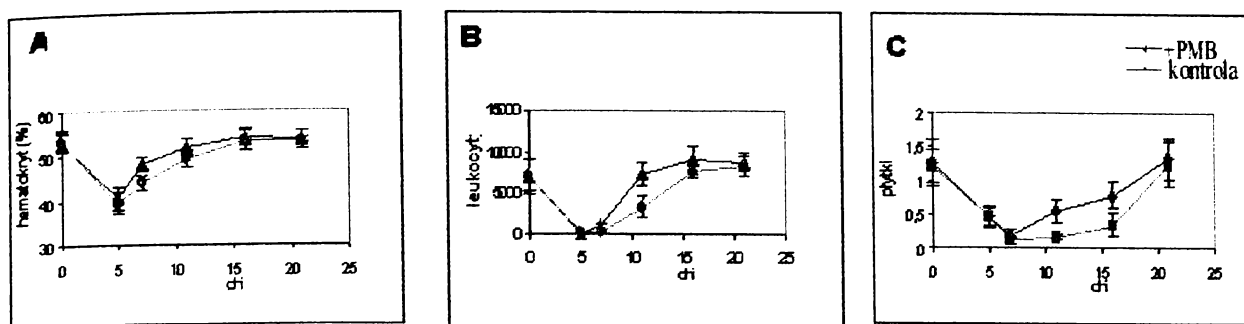
PMB jako fragmenty błony komórkowej o określonej strukturze antygenowej mogą służyć jako swoisty “przenośnik” białek błon komórkowych pomiędzy komórkami (ścieżka 1). Dotyczyć to może molekuł adhezyjnych, antygenów płytkowych rozpoznawanych przez przeciwciała przeciwpłytkowe, cytokin, receptorów chemokinowych i cytokinowych w tym również koreceptorów dla wirusa HIV. PMB jako bogate źródło fosfatydyloseryny mogą również powodować “znakowanie” komórek, które interpretowane jest przez komórki żerne jako sygnał do fagocytozy. PMB mogą również bezpośrednio aktywować komórki (ścieżka 2). Stymulacja różnych białek biorących udział w przenoszeniu sygnału z powierzchni komórki do jej wnętrza, indukowana białkami bądź lipidami zawartymi w PMB może wpływać na proliferację, różnicowanie oraz przeżywalność komórek. Stymulacja poszczególnych szlaków może również regulować wydzielanie szeregu białek przez komórki stymulowane PMB, takich jak np. metaloproteinazy, czynniki angiopoetyczne, czynniki wzrostowe i cytokiny. Można założyć, że PMB mogą również regulować ekspresję molekuł adhezyjnych i niektórych receptorów na powierzchni komórek docelowych. Ścieżka 3 przedstawia z kolei hipotetyczny udział PMB we wnikanii cząstek wirusowych do wnętrza komórek poprzez PMB. Niektóre z wirusów rozwijających się w megakariocytach (HIV lub CMV) mogłyby wykorzystywać ten mechanizm podczas zakażenia komórek (mechanizm konia trojańskiego). PMB jako micelle „transportowe” mogłyby również w ten sposób przenosić cytokiny jak i inne czynniki biologicznie aktywne (lipidy) do komórek, co miałoby szczególne znaczenie dla czynników o receptorach zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo [Lindemann i wsp. 2001, Giedrojć i wsp. 2000]. Nie można również wykluczyć, że składniki lipidowo-białkowe PMB wykorzystywane są metabolicznie przez komórki do których PMB wnikają.



Ryc. 3. Różne możliwości oddziaływania PMB na komórki docelowe i ich znaczenie w fizjologii i patologii.

PMB przyspieszają wszczepianie wczesnych komórek hematopoetycznych pochodzących z krwi mobilizowanej do szpiku

Mobilizacja komórek przed przeszczepem szpiku połączona z ich separacją z krwi obwodowej jest jednym z czynników powodujących powstawanie PMB. PMB powstają z płytek aktywowanych podczas mobilizacji i leukoferezy. Zespół nasz wykazał, że komórki CD34⁺ pochodzące z mobilizowanej krwi obwodowej ulegają opłaszczeniu przez PMB [Janowska –Wieczorek i wsp. 2001]. Obecność PMB na powierzchni wczesnych komórek krwiotwórczych zwiększa przyleganie tych komórek do śródbłona w szpiku kostnym i tym samym ułatwia wszczepienie opłaszczonych PMB komórek progenitorowych i macierzystych krwiotworzenia po przeszczepie [Janowska –Wieczorek i wsp. 2001).



Ryc. 4. Kinetyka odnowy parametrów krwi obwodowej u zwierząt poddanych przeszczepom krwiotwórczym.

Przeszczepy komórek jednojądrowych szpiku kostnego myszy opłaszczonych PMB powodowały szybsze wszepienie się komórek progenitorowych i macierzystych, co ujawnia się przyspieszoną o 3-5 dni odnową parametrów krwi obwodowej u zwierząt poddanych przeszczepom krwiotwórczym. **A** – kinetyka odnowy wartości hematokrytu (Ht). **B** – kinetyka odnowy wartości leukocytów. **C** – kinetyka odnowy wartości płytek krwi. Linia czerwona – myszy kontrolne, którym przeszczepiono komórki nieopłaszczone PMB. Linia czarna myszy, którym przeszczepiono komórki opłaszczone PMB.

Ryc. 4 obrazuje wyniki badań własnych świadczące, że PMB opłaszczając wczesne komórki hematopoetyczne szpiku myszy ułatwiają ich wszczepienie po dożylnym przetoczeniu letalnie napromienionym zwierzętom [Janowska-Wieczorek i wsp. 2001]. Z drugiej strony ponieważ, PMB składają się z biologicznie aktywnych lipidów i białek, mogą bezpośrednio stymulować komórki hematopoetyczne. Zbadanie wpływu PMB na wczesne komórki hematopoetyczne stało się jednym z tematów przedstawianej rozprawy.

Wczesne komórki hematopoetyczne, pobrane do przeszczepienia mogą być poddane również wpływowi PMB podczas krótkotrwałego przechowywania szczególnie w temperaturze 4°C. W warunkach tych dochodzi bowiem do aktywacji płytek krwi i powstawania PMB [Ruf i wsp. 1997].

PMB są ponadto stale obecne w surowicy, a stężenie ich wzrasta w szeregu wymienionych powyżej stanów patologicznych. Można więc przyjąć, że komórki hematopoetyczne są stale ekspozowane na PMB.

Ze względu na brak w literaturze opracowań zajmujących się bezpośrednim wpływem PMB na wczesne komórki hemato/limfopoetyczne, zagadnienie to stało się przedmiotem przedstawianej rozprawy doktorskiej.

4. CELE PRACY

Mikrofragmenty błonowe pochodzenia płytkowego (PMB) występują w surowicy osób zdrowych jak i cierpiących na różnego typu schorzenia i mogą oddziaływać na komórki układu hemato/limfopoetycznego. Stężenie PMB w surowicy wzrasta w szeregu sytuacjach klinicznych, a tym samym interakcja PMB z komórkami zwiększa się m.in. podczas: 1) przewlekłych stanów zapalnych, 2) mobilizacji/leukoferezy krwi obwodowej dla celów transplantologicznych oraz 3) krótkotrwałego przechowywania preparatów krwi lub szpiku kostnego. Chcąc bliżej poznać wpływ PMB na wczesne i bardziej zróżnicowane komórki hematopoetyczne sformułowano następujące cele pracy:

1]. Ocena fenotypu białek powierzchniowych mikrofragmentów błonowych pochodzenia płytkowego (PMB)

- ekspresja markerów (receptorów i ligandów) pochodzenia płytkowego na powierzchni PMB
- porównanie fenotypu PMB w zależności od metody ich otrzymywania
- przenoszenie różnych antygenów pochodzenia płytkowego przez PMB na komórki hemato/limfopoetyczne i nowotworowe

2]. Ocena wpływu PMB na chemotaksję, przyleganie, przeżywalność i proliferację:

- komórek ustalonych linii komórkowych wywodzących się z układu krwiotwórczego
- wczesnych komórek szpiku kostnego posiadających ekspresję antygenu CD34
- komórek różnicujących się i dojrzewających układu krwiotwórczego uzyskanych od zdrowych dawców.

3]. Zbadanie wpływu PMB na aktywację wybranych białek biorących udział w transdukcji sygnału w komórkach hematopoetycznych (MAPK p42/44, AKT, STAT-1, 3-, -5 oraz -6).

4]. Wstępna ocena udziału wybranych składników białkowych i lipidowych PMB w obserwowanych efektach biologicznych.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Izolacja płytek krwi

Krwinki płytkowe izolowano z krwi zdrowych dawców, którzy przez okres dwóch tygodni przed pobraniem krwi nie przyjmowali leków przeciwzapalnych mogących osłabić aktywację płytek. Jako antykoagulant stosowano 3.8% cytrynian sodu (1:10). Następnie krew wirowano z prędkością 150g przez 20 minut, a uzyskaną plazmę o wysokiej zawartości płytek (PRP –ang. *platelet rich plasma*) doprowadzano przy pomocy kwasu cytrynowego do pH 6,5. PRP wirowano następnie z prędkością 2000g przez 20 minut. Płytki przepłukiwano dwukrotnie buforem (113mmol/L NaCl, 4.3mmol/L K_2HPO_4 , 4.2mmol/L $NaHPO_4$, 24.4mmol/L NaH_2PO_4 i 5.5mmol/L glukozy, 1U/ml apyrazy i 1 μ mol/L PGE1) w celu pozbycia się fibrynogenu. Końcowo płytki zawieszano w buforze HEPES-Tyrode (138mmol/L NaCl, 2.8mmol/L KCl, 2mmol/L $CaCl_2$, 0.5mmol/L NaH_2PO_4 , 12 mmol/L $NaHCO_3$, 10 mmol/L glukoza i 10mmol/L Hepes, pH 7.4). Izolacja płytek wykonywana była w temperaturze pokojowej [Nomura i wsp. 2000, Barry i wsp. 1999] . Koncentrację płytek oceniano przy pomocy licznika komórkowego (Coulter Counter) [Barry i wsp. 1998, Tans i wsp. 1991]. W wybranych doświadczeniach stosowano również płytki uzyskane z PRP przez filtrowanie na kolumnie Sepharose CL2B buforem Hepes-Tyrode (Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) [Gemmel i wsp. 1993]. Stosowano także przeterminowane preparaty płytkowe uzyskane z banku krwi [Jy i wsp. 1995]. Izolacja płytek jak i ich przechowywanie odbywało się zawsze w obecności antybiotyków (penicyliny i streptomycyny).

5.2. Izolacja PMB

Płytki krwi bądź gotowe preparaty płytkowe stymulowano trombiną (2U/ml, 10 minut) [George, 1982), trombiną i kolagenem (0.1U/ml trombiny i 4 μ g/ml kolagenu, 10 minut) [Barry i wsp. 1999] lub jonoforem wapnia A23187 (1 μ M, 30 minut) [Forlow i wsp. 2000] w temperaturze 37°C. Stymulacje prowadzono w obecności 2mM $CaCl_2$ przy ciągłym mieszaniu. Następnie poprzez wirowanie 2000g przez 15 minut oddzielano płytki od nadsącza zawierającego mikrofragменты błonowe pochodzenia płytkowego (PMB). W celu uzyskania populacji PMB pozbawionej płytek, wirowanie powtarzano. Uzyskany supernatant wirowano następnie 24000g przez 60 minut

w temperaturze 4 C. Pelet zawierający PMB rozpuszczano w buforze Hepes (bez Ca^{2+} i Mg^{2+} , pH 7.4) [Barry i wsp. 1997, 1998]. Do niektórych doświadczeń (fenotypowanie PMB oraz linii komórkowych) używano również supernatantu uzyskanego bezpośrednio po dwukrotnym odwirowaniu płytek [Forlow i wsp. 2000]. Stosowano również sonifikację jako metodę fizycznego rozbijania płytek. Sonifikację prowadzono w łaźni sonifikacyjnej (Ultrasonic Cleaner 3510, Branson, Danbury, CT, USA) w temperaturze pokojowej przez 25 minut. Następnie rozbite płytki wirowano dwukrotnie 2000g przez 20 minut a uzyskany supernatant stosowano jako źródło PMB do dalszych doświadczeń.

Koncentrację białka w PMB oceniano metodą Bradforda zgodnie z zaleceniami producenta (BioRad, Hercules, CA, USA) [Merten i wsp. 1999, Weber i wsp. 2000]. Stężenie białka oznaczano przy długości fali 595 nm w czytniku kolorymetrycznym (Biotech Instruments Inc, Vermont USA).

Wielkość PMB uzyskiwanych w supernatancie po odwirowaniu płytek określano poprzez filtrowanie przez filtry o wielkości porów 0,2 μm i 0,45 μm (Millipore) [Mack i wsp. 2000]. Uzyskane PMB przechowywano w temperaturze -20°C.

5.3. Analiza cytofluorymetryczna PMB

PMB odróżniano od płytek na podstawie cytogramu FSC/SSC. Za pomocą cytometru przepływowego określano również fenotyp PMB (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) [Nomura i wsp. 2000b, Hughes i wsp. 2000]. Barwienia wykonywano w buforze PBS przy użyciu mysich antyludzkich przeciwciał bezpośrednio znakowanych fluorochromem przeciwko następującym determinantom: CD41-PE, PAR1-PE (Coulter Immunotech, Marsylia, Francja), CXCR4-PE, CD62-PE, Fas-PE, VLA-4-PE, VLA-5-PE (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego USA), TNFRI-PE, TNFRII-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) oraz przeciwciał nieskonjugowanych przeciwko CD40L (CD154) (Coulter Immunotech, Marsylia, Francja), PF4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), glikoforynie A (Coulter Immunotech, Marsylia, Francja), FasL (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego USA). W przypadku tych ostatnich jako przeciwciało drugorzędowe stosowano królicze antymysie IgG γ 1 PE (Sigma, St.Louis, MO, USA). W barwieniach, z uwagi na małe rozmiary PMB nie wykonywano standardowych płukań, a przeciwciało drugorzędowe dodawano bezpośrednio do PMB po 30 minutowej inkubacji z przeciwciałem

pierwszorzędowym. Wszystkie inkubacje z przeciwciałami prowadzono na lodzie. Analizę utrwalonych 1% paraformaldehydem PMB prowadzono w skali logarytmicznej (FSC, SSC oraz FL-1, FL-2) przy poziomie tła równym 10. W każdym eksperymencie ($n=10$) analizowano co najmniej 10^4 elementów zbieranych przy wolnym przepływie buforu. Ocena obejmowała określenie odsetka komórek wykazujących ekspresję badanej determinanty w odniesieniu do odpowiedniej kontroli izotypowej (lub przeciwciała drugorzędowego dla barwień pośrednich).

5.4. Hodowle komórkowe

Hodowle komórkowe prowadzono w medium RPMI (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) z 10% FBS (ang. *fetal bovine serum*) (Hyclone, Salt Lake City, UT, USA) w 37°C w atmosferze 5% CO₂ i wilgotności 95%. Komórki HL-60, Jurkat, UT-7 zostały zakupione w ATCC (Rockville, MD, USA). Komórki RS11846, Nalm6, HsSultan otrzymano od dr Lesliego Silbersteina (Harvard Medical School, Boston). Pozostałe linie hematopoetyczne rosnące w zawieszynie (L428, PB-1, Ryan, YT) jak i linie adherentne (ustalone linie raka piersi: HTB22, HTB26, HTB140, T47D, rabdomiosarcomy: SBCL-2, RD3, CW9019, RH30ATC, SMS-CTR, RH28, RABD, melanomy: WN1205, WM39, WM278, WM164, WM451) otrzymano od dr Mariusza Wąsika (Uniwersytet Pensylwania, Filadelfia). Linie komórkowe pasażowano 2-3 razy w tygodniu. Komórki adherentne w czasie pasażowania traktowano EDTA (0,02%) przez 10 minut, płukano i używano do eksperymentów.

W badaniach stosowano linie T-komórkowe (Jurkat, PB-1), B-komórkowe (HsSultan, Nalm6, RS11846), NK-komórkowe (YT), megakariocytowe (UT-7/TpO, UT-7), mieloidalne (HL-60), oraz linie HD (L428, Ryan).

Komórki endotelialne HUVEC izolowano w laboratorium dr Douglasa Cinesa (Uniwersytet Pensylwania, Filadelfia) z ludzkich sznurów pępowinowych jak opisano [Cines i wsp. 1998]. Uzyskane komórki endotelialne hodowano w medium (M199, FCS 10%, BBE 1 mg/ml, hEGF 1ng/ml, hydrokortyzon 1mg/ml, heparyna 10U/ml) na płytkach 96 dołkowych pokrytych fibronektyną.

5.5. Izolacja komórek CD34⁺ CD4⁺, CD8⁺ oraz CD19⁺

Komórki CD34⁺ izolowano ze szpiku zdrowych dawców oraz z grasic noworodków poddawanych operacjom serca ratującym życie (Children's Hospital of

Philadelphia, Filadelfia, USA). Izolację komórek CD34⁺ prowadzono z zastosowaniem kuleczek magnetycznych MiniMacs (Miltenyi, Biotec, Auburn, CA, USA) po wcześniejszym usunięciu komórek adherentnych. Również komórki CD19⁺ izolowano ze szpiku zdrowych dawców lub krwi obwodowej przy pomocy kuleczek magnetycznych. Komórki CD4⁺ i CD8⁺ izolowano z grasicy noworodków lub krwi obwodowej przy pomocy kuleczek magnetycznych (Miltenyi, Biotec, Auburn, CA). Czystość uzyskanych komórek sprawdzano przy pomocy FACScan. Stosowana metoda izolacji zapewnia uzyskanie komórek o czystości przekraczającej 95% [Majka i wsp. 2000a].

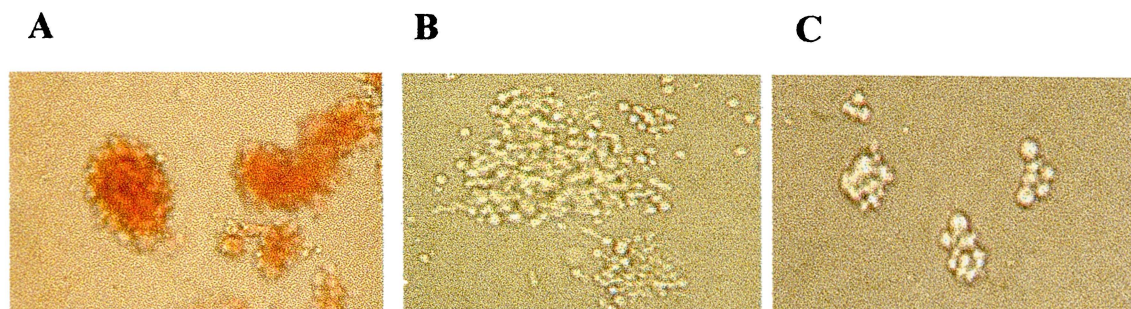
5.6. Płynne hodowle komórek progenitorowych układu erytroidalnego i mieloidalnego

Wzrost BFU-E uzyskiwano poprzez ekspansję komórek CD34⁺ w medium bezsurowiczym w obecności erytropoetyny (2U/ml) oraz SCF (10ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). W skrócie komórki CD34⁺ zawieszano w medium IMDM (Gibco BRL, Grand Island, NJ, USA) wzbogaconym w 25% syntetyczną surowicę zawierającą 1% BSA transferynę (270μg/ml), insulinę (20μg/ml), L-glutaminę (2mmol/l) oraz liposomy (Sigma, St.Luis, MO, USA) [Ratajczak J. i wsp. 1998]. Hodowlę prowadzono na płytkach 24-dołkowych w 37°C, 5%CO₂ przy wilgotności 95%. Komórki CD34⁺ wysiewano na płytki w stężeniu 0,1x10⁶/ml. Dojrzewanie BFU-E oceniano poprzez analizę cytofluorymetryczną ekspresji glikoforyny A (GPA). CFU- GM hodowano z komórek CD34⁺ w medium bezsurowiczym w obecności GM-CSF (5ng/ml) oraz IL-3 (10ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, NJ, USA). Dojrzewanie CFU-GM oceniano poprzez analizę ekspresji antygenów CD14 oraz CD15 (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, USA) [Ratajczak J i wsp. 1998c, Majka i wsp. 2001].

5.7. Ocena klonogenności komórek CD34⁺ w obecności PMB

Komórki CD34⁺ inkubowano przez 1 godzinę w medium zawierającym lub nie PMB (30μg/ml). Następnie komórki zawieszano w medium bezsurowiczym (IMDM wzbogacony w 50% surowicę syntetyczną) i hodowano w 1% metylocelulozie (Methocel MC, Fluka Biochemica, New Ulm, USA) w stężeniu 5x10⁴ / 0,5ml na studzienkę 24 dołkową. Wzrost komórek CFU-GM i BFU-E był stymulowany po 4 lub

7 dniach inkubacji liniowo specyficznymi czynnikami wzrostowymi - GM-CSF (5ng/ml), IL-3 (10ng/ml) dla CFU-GM i EPO (2U/ml), SCF (10ng/ml) dla BFU-E. Komórki CD34⁺ wysiewano w stężeniu 1x10⁴/ml [Ratajczak J. i wsp. 1998a,b]. Wszystkie rekombinowane cytokiny i czynniki wzrostowe zostały zakupione w R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, przy 5%CO₂ i wilgotności 95% przez dwanaście dni. Powstałe kolonie liczono przy użyciu mikroskopu świetlnego odwróconego (Olympus, Tokyo, Japan). Każdy eksperyment prowadzono w 6 powtórzeniach (n=2). Przeprowadzono również eksperymenty mające ocenić wpływ PMB na klonogenność komórek CD34⁺ w hodowli o zmniejszonym stężeniu czynników wzrostowych (do ¼ stężenia stosowanego w normalnych hodowlach, wykonano dwa eksperymenty w 6 powtórzeniach każdy). Na ryc. 5 przedstawiono zdjęcia z mikroskopu (powiększenie 200x) kolonii erytroidalnych, mieloidalnych i megakariocytarnych.



Ryc. 5. Wzrost kolonii erytroidalnych (A), mieloidalnych (B) i megakariocytowych (C) przez klonowane w metylocelulozie wczesne komórki hematopoetyczne szpiku kostnego posiadające ekspresję antygenu CD34.

5.8. Ocena klonogenności ustalonych linii komórkowych w obecności PMB

Wpływ PMB na klonogenność wybranych ustalonych linii hemato/limfopoetycznych oceniano w hodowli w medium bezsurowiczym (IMDM wzbogacony w 50% syntetyczną surowicę) mieszanym w stosunku 1:1 z metylocelulozą (końcowe stężenie metylocelulozy 1%, Methocel MC, Fluka Biochemica, New Ulm, USA, jak opisano powyżej). Komórki wysiewano w stężeniu 1000 komórek/0.5ml na studzienkę na płycie 24 dołkowej. Hodowle prowadzono przez cztery dni w temperaturze 37°C, przy 5% CO₂ i 95% wilgotności. Liczbę kolonii

oceniano przy użyciu odwróconego mikroskopu świetlnego. Wykonano cztery eksperymenty, każdy prowadzono w czterech powtórzeniach.

5.9. Ocena proliferacji/przeżywalności ustalonych linii komórkowych oraz komórek progenitorowych CD34⁺ w obecności PMB

Komórki CD34⁺ jak również komórki linii hodowano na płycie 96 dołkowej w medium RPMI z 0.5% BSA w obecności lub bez PMB (30µg/ml). Przeżywalność ustalonych linii komórkowych sprawdzano po 5, a komórek CD34⁺ po 2 dniach testem kolorymetrycznym MTT (The CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA). Powstający produkt barwny (proporcjonalny do liczby żywych komórek) oceniano przy pomocy czytnika Dynatech MR500 (Chantilly, VA, USA) przy długości fali 490 nm [Majka i wsp. 2001]. Wykonywano trzy eksperymenty w 6 powtórzeniach każdy.

5.10. Ocena wpływu PMB na aktywność kaspazy-3 w komórkach ustalonych linii hemato/limfopoetycznych

Komórki ustalonych linii PB-1, HsSultan oraz YT hodowano w medium RPMI bez surowicy w obecności lub bez PMB (30µg/ml) przez 96 godzin. Komórki linii UT-7 (zależna od TpO) hodowano bez czynnika wzrostowego przez 48 godzin w obecności lub bez PMB (30µg/ml). Po tym czasie komórki odpłukiwano i utrwalano 2% paraformaldehydem przez 10 minut, a następnie etanolem 70% przez 5 minut. Po odpłukaniu dodawano 10µl przeciwciała przeciwko aktywnej formie kaspazy-3 znakowanego fikoerytryną i inkubowano na lodzie przez 30 minut (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego USA). Płukano dwukrotnie i analizowano na cytofluorymetrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson). Zbierano po 10⁴ zliczeń. W każdym eksperymencie jako kontrolę stosowano komórki hodowane w RPMI z 10% FBS lub jak w przypadku UT-7 /TpO w obecności TpO [Kijowski i wsp. 2001]. Wykonano trzy niezależne eksperymenty.

5.11. Ocena przylegania PMB do komórek hematopoetycznych oraz ustalonych linii hemato/limfopoetycznych

Wiązanie PMB lub krwinek płytkowych do komórek CD34⁺, erytroblastów, mieloblastów, monocytów jak również linii komórkowych (rosnących w zawiesinie

i adherentnych) oceniano poprzez analizę cytofluorymetryczną. Komórki ustalonych linii inkubowano z PMB (30µg/ml) w PBS (Gibco, BRL, Grand Island NY, USA) z 2mM CaCl₂ w czasie od 10 minut do 2 godzin. Przeprowadzono również eksperymenty 24 godzinne. Inkubację prowadzono w probówkach niskoretencyjnych. Następnie komórki wirowano w 20 krotnie większej objętości PBS, barwiono z użyciem przeciwciał monoklonalnych i oceniano metodą cytofluorymetryczną obecność antygenów płytkowych (takich jak CD41, CD62, PAR1) na powierzchni opłaszczanych komórek. Równocześnie identycznej procedurze poddawano komórki kontrolne, które nie były inkubowane z PMB. Erytroblasty inkubowano z krwinkami płytkowymi i PMB w kolejnych dniach dojrzewania tj. od dnia 5 - 13 i oceniano na ich powierzchni ekspresję antygenów pochodzenia płytkowego. Opłaszczanie komórek CD34⁺, CD4⁺ oraz mieloblastów analizowano podobnie jak w przypadku linii komórkowych.

Do fenotypowania linii komórkowych używano przeciwciał znakowanych PE przeciwko CXCR4, CD41, CD62, PAR1, Mac-1 (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego USA) oraz nieskoniugowanych CD162 (Reaserch Diagnostic Inc., Flanders, NJ, USA), TF (American Diagnostica Parsippany, New Jersey, USA) a jako przeciwciało drugorzędowe stosowano IgGy1 PE (Sigma, St.Louis, MO, USA)..

5.12. Badanie przylegania komórek CD34⁺ do SDF-1β i komórek endotelialnych (HUVEC) oraz przylegania komórek wybranych linii komórkowych do fibrynogenu

Komórki CD34⁺ oraz komórki wybranych linii komórkowych znakowano metabolicznie w całonocnej hodowli w medium RPMI z 10%FBS zawierającym metioninę znakowaną S³² (NEN, Boston, MA, USA). Ponieważ stosowane RPMI nie zawierało metioniny, jedynym źródłem tego aminokwasu była metionina znakowana radioaktywnie. Nadmiaru izotopu pozbywano się poprzez dwukrotne płukanie komórek w PBS. Wyznakowane komórki inkubowano z PMB (30µg/ml) lub bez PMB przez 30 minut a następnie odpłukiwano z nadmiaru niezwiązanych PMB. Komórki (0.1x10⁶/ml) rozkładano następnie na płytkę 96 dołkową pokrytą fibrynogenem (10µg/ml, Sigma, St. Louis, CA, USA) lub SDF-1 (4µg/ml, Upstate, Lake Placid NY, USA) lub komórkami HUVEC. Inkubację prowadzono przez 4 godziny w inkubatorze (37°C, 5%CO₂, 95% wilgotności) a następnie kilkakrotnie odpłukiwano niezwiązane komórki. Liczbę komórek które przylegały do podłoża oceniano po ich lizie (2% SDS)

poprzez pomiar radioaktywności w poszczególnych studzienkach posługując się licznikiem scyntylacyjnym. Oceniano przyleganie komórek CD34⁺ do SDF-1 i HUVEC (n=2, w sześciu powtórzeniach każdy) oraz przyleganie ustalonych linii do fibrynogenu (n=4 w czterech powtórzeniach każdy).

5.13. Ocena chemotaksji komórek linii hemato/limfopoetycznych, komórek CD34⁺ oraz komórek jednojądrzastych szpiku kostnego do PMB i ich składników

Oceniano chemotaksję komórek PB-1, HL-60, Jurkat, YT, Ryan, L428, Nalm6, RS11846, HsSutlan, komórek CD34⁺, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i szpiku kostnego do PMB. PMB w stężeniu 30µg/ml zawieszano w RPMI zawierającym 0.5% BSA i dodawano do dolnej komory w płytce chemotaksyjnej (Transwell, Costar Corning, Cambridge, MA, USA). Stosowano płytki 24 dołkowe o średnicy 6.5 mm i wielkości porów w membranie - 5, 8 i 12 µm. Komórki (1x10⁵/100µl) podawano do górnej komory w objętości 100ul. Inkubację prowadzono w 37°C, 5% CO₂ przy wilgotności 95% przez 3 godziny. Czas eksperymentu został wybrany jako optymalny na podstawie wstępnych doświadczeń 2 - 24 godzinnych. Każdy eksperyment (n=5) wykonano w trzech powtórzeniach. Po inkubacji komórki z dolnej komory były zbierane, a ich liczbę określano poprzez analizę cytofluorymetryczną (FACScan, Becton Dickinson). Komórki zbierano w bramce wybranej na podstawie FSC i SSC podczas 20 sekund szybkiego przepływu buforu [Majka i wsp. 2000]. Liczbę komórek wykazujących chemotaksję przedstawiono jako procent komórek nałożonych do górnej komory płytki. Badano również chemotaksję wybranych linii (PB-1, YT) do niektórych składników PMB takich jak ATP (20µM), ADP (20µM) (Sigma, St. Louis, CA, USA), RANTES (100ng/ml), TGFβ (100ng/ml), PF4 (1µM, 100nM), IL-8 (100ng/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) SDF (30ng/ml), kwas arachidonowy (30µM) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), białek komplementu C3a i C5a (10µg/ml, Sigma St. Louis, CA, USA) (wykonano dwa eksperymenty, w dwóch powtórzeniach każdy).

5.14. Ocena aktywności biologicznej wybranych składników białkowych i lipidowych obecnych w PMB

W celu ustalenia czy aktywnym składnikiem PMB jest białko, PMB poddawano trawieniu proteinazami lub denaturacji cieplnej. PMB trawiono trypsyną (0.25%, Gibco BRL, Grand Island NY, USA) przez 30 minut w 37°C lub proteinazą K (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, 14mg/ml pH 7.4) przez 45 minut. Enzymy inaktywowano następnie przez inkubację 10 minut w 70°C. PMB denaturowano również przez 30 minut w 100°C lub 10 minut w 70°C. PMB filtrowano przez sączki pozwalające na rozdzielenie białek powyżej i poniżej 10kD oraz powyżej i poniżej 100kD (Millipore, Bedford, MA, USA). Uzyskane w ten sposób frakcje PMB używano w testach chemotaksji odnosząc uzyskane wyniki do chemotaksji prowadzonej do niemodyfikowanych PMB. Wszystkie eksperymenty wykonano 3 razy (w dwóch powtórzeniach każdy).

5.15. Wykrywanie fosforylacji kinaz AKT, MAPK p42/44 oraz białek STAT 1, 3, 5, 6 w komórkach CD34⁺ oraz ustalonych liniach komórkowych po stymulacji PMB

Fosforylację kinazy serynowo-treoninowej AKT, tyrozyno-treoninowej-MAPK p42/44 oraz białek STAT 1, 3, 5, 6 wykrywano metodą Western Blot. Komórki wybranych linii komórkowych hodowano przez 36 godzin w RPMI z dodatkiem 0,5% BSA a następnie stymulowano PMB (30µg/ml) przez 10 minut w 37°C. Fosforylację białek oceniano w odniesieniu do komórek nie poddawanych stymulacji. Komórki CD34⁺ izolowane z grasicy lub szpiku kostnego stymulowano (10 minut, PMB 30µg/ml) po 12 godzinnej hodowli w RPMI z dodatkiem 0,5% BSA. Po stymulacji komórki natychmiast wirowano, nadsącz odrzucano, a pelet lizowano na lodzie przez 10 minut buforem M-Per (Pierce, Rockford, IL, USA) z dodatkiem inhibitorów proteinaz i fosfataz (aprotynina 10mg/ml, pepstatin A 1mg/ml, leupeptin 10mg/ml, NaF 1M, pirogronian sodu 10mM, EDTA 500mM, PMSF 10mg/ml, Sigma, St. Louis, CA, USA). Wyizolowane białka denaturowano następnie w obecności β-merkaptioetanolu (Fluka Biochemica, New Ulm, USA) przez 10 minut w 70°C i rozdzielano w żelu z 10% SDS w buforze MOPS SDS (Novex Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) przy napięciu 200V przez 50 minut, a następnie przenoszono na membranę nitrocelulozową przez 60 minut przy napięciu 100V (Hybond ECL, Amersham Life Sci., Little

Chalfont, UK). Fosforylacja MAPKp42/44 (Tyr204/Thr202) i AKT (Ser473) oraz białek STAT 1, 3, 5, 6 była wykrywana z użyciem mysich przeciwciał monoklonalnych przeciwko p44/p42 MAPK oraz króliczych przeciwciał poliklonalnych przeciwko kinazie AKT i białkom STAT (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Jako przeciwciał drugorzędowych używano IgG kozich antykróliczych lub antymysich związanych z HRP (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA). Stosowano chemiluminescencyjny substrat dla HRP (ECL Reagent, Amersham Life Sci., Little Chalfont, Wielka Brytania), a membrany nitrocelulozowe poddawano ekspozycji na kliszę fotograficzną (Hyper film ECL, Amersham Life Sci., Little Chalfont, Wielka Brytania). Ilość rozdzielonych produktów białkowych oceniano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciwko białkom niefosforylowanym:anty MAPKp42/44 (#9102) anty AKT (#9272), anty STAT3 (#9132) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), anty STAT1 (#sc 464), anty STAT6 (#sc 1689) (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA) oraz anty STAT5 (#89) (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA). Jako marker wielkości stosowano Precision Protein Standard (BioRad, Hercules, CA, USA) [Holme i wsp. 1994, Majka i wsp. 2000c, Kijowski i wsp. 2001]. Wykonano 4 niezależne eksperymenty.

5.16. Wykrywanie obecności RANTES i SDF –1 w płytkach krwi i PMB

Obecność chemokin w płytkach krwi i PMB wykrywano metodą Western Blot. Krwinki płytkowe oraz PMB lizowano (z użyciem buforu jak wyżej) i określano stężenie białka metodą Bradforda. Białko denaturowano, a następnie 20µg lizatu rozdzielano w żelu z 10% SDS w buforze MES SDS (Novex Invitrogen, Carlsbad CA, USA) i przenoszono na membranę nitrocelulozową (Hybond ECL, Amersham Life Sci., Little Chalfont, Wielka Brytania). Obecność SDF-1 wykrywano przy użyciu koziego przeciwciała anty SDF-1/PBSF. RANTES wykrywano kozim przeciwciałem anty-RANTES (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Stosowano drugorzędowe przeciwciała antykozie związane z HRP (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA). Białko wykrywano z użyciem ECL Reagent jak opisano powyżej.

5.17. Ocena obecności MMP-2 i MMP-9 w płytkach krwi i PMB

Płytki krwi i PMB lizowano buforem M-Per (Pierce, Rockford, IL, USA) i oznaczano stężenie białka metodą Bradforda. Białko (20µg) rozdzielano w żelu 10% Tris-glicynowym z 0.1% żelatyną (Invitogen, Carlsbad CA, USA). Rozdział prowadzono przy napięciu 125V przez 90 minut. A następnie zymogram renaturowano (25% Triton X-100) i inkubowano przez 12 godzin z buforem wywołującym (Tris, NaCl, CaCl₂, Brij 35). Zymogram barwiono Coomassie Blue R-250 (0.1%) przez 30 minut, a następnie odbarwiano roztworem metanolu i kwasu octowego (50%metanol, 10% kwas octowy). Wszystkie stosowane odczynniki zakupiono w Novex invitogen, Carlsbad CA, USA. Zymogram fotografowano przy użyciu Gel Doc 2000 (BioRad, Hercules, CA, USA).

5.18. Analiza komórek PB-1 inkubowanych z PMB przy użyciu mikroskopu konfokalnego

PMB znakowano przy użyciu anty CD41-PE (Coulter Immunotech, Marsylia, Francja), a następnie dodawano je do hodowli komórek PB-1 w RPMI z 0.5% BSA i inkubowano przez 15 –120 minut. Prowadzono również hodowle PB-1 w medium RPMI z 0.5% BSA w obecności PMB znakowanych CD41- PE przez 3 dni. Po inkubacji nadmiar przeciwciała oraz niezwiązane PMB odpłukiwano, a komórki utrwalano w 1% paraformaldehydzie i wykonywano preparat cytospinowy. Analizę prowadzono w mikroskopie konfokalnym BioRad 1024-ES z Nikon Eclipse E-600. Równocześnie takiej samej procedurze poddawano komórki inkubowane lub hodowane z przeciwciałem anty CD41 (kontrola negatywna).

5.19. Ocena ekspresji TF-mRNA w liniach komórkowych

Obecność TF w komórkach linii nowotworowych oceniano za pomocą techniki RT-PCR. W skrócie RNA izolowano z komórek na kolumnach z membraną krzemionkową (Qiagen, Valencia CA, USA). Stężenie i czystość otrzymanego RNA oceniano przez pomiar absorbancji przy długości fali 260 i 280nm przy użyciu spektrofotometru (Beckman Coulter, Fullerton CA, USA..) RNA przepisywano na cDNA przy użyciu odwrotnej transkryptazy MMLV (Promega, Road-Madison, WI, USA) i niespecyficznych primerów (ang. *random primers*) (50 pmol). Uzyskane cDNA amplifikowano następnie przez 40 cykli z zastosowaniem specyficznych primerów dla

TF; 5' primer 5'-CTA CTG TTT CAG TGT TCAAGC AGT GA-3' oraz 3' primer 5'-CAG TGC AAT ATA GCA TTT GCAGTA GC-3' oraz β aktyny (5' primer 5'-GAC TAC CTC AAG ATC CTC-3' oraz primer 3' 5'-GTC CAC GTC ACA CTT CAT-3') przy użyciu Taq polimerazy (Promega, Road-Madison, WI, USA). Uzyskany produkt (283bp) jak również kontrolę pozytywną (305bp) rozdzielano w 2% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny [Majka i wsp. 2000d].

5.20. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu pakietów statystycznych programu Excell 2000. Stosowano niesparowany test t – Studenta o rozkładzie jedno lub dwu śladowym. Wyniki przedstawiano jako średnią arytmetyczną z powtórzeń $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Za granicę istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,01$.

6. WYNIKI

6.1. Ekspresja antygenów pochodzenia płytkowego na powierzchni PMB

Nomura i wsp. stwierdzili, że na powierzchni PMB występuje szereg markerów pochodzenia płytkowego takich jak: CD9, CD36 (GPIV), CD41 (GPIIb/IIIa), GPIaIIa, CD42a, CD42b (GPIb), CD62P [Nomura i wsp. 2000]. W przedstawianej pracy w celu lepszej charakterystyki PMB zbadano ekspresję w/w jak i innych determinant pochodzenia płytkowego takich jak receptory serepentynowe sprzężone z białkami grupy G (CXCR4 czy PAR1), receptory dla TNF α (RI i RII), receptor dla Fas-L (CD95), ligand dla CD40 (CD154), molekuly adhezyjne VLA-4, VLA-5 oraz czynnik płytkowy czwarty (PF4). Fenotyp PMB oceniano przy użyciu cytometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał bezpośrednio znakowanych fluorochromami. Jako kontrolę negatywną stosowano przeciwciało przeciwko glikoforynie A (CD235a), która jest swoistym markerem linii erytroidalnej, a tym samym nie ulega ekspresji na płytkach krwi ani na komórkach linii megakariocytowej. Reprezentatywną ocenę fenotypu PMB za pomocą cytometru przepływowego przedstawiono na Ryc. 6.

W prezentowanej pracy sprawdzono również czy fenotyp PMB zależy od sposobu aktywacji płytek. Płytki aktywowano za pomocą trombiny (2 U/ml), trombiny + kolagenu (2 U/ml+4 μ g/ml), jonoforu wapnia A23187 (2 μ M) oraz stosowano fizyczne rozbijanie płytek poprzez sonifikację (30 minut) (Ryc. 6). Skuteczność aktywacji sprawdzano poprzez barwienie przeciwciałami dla CD62P (marker aktywacji płytek) oraz peptydem PAC-1, który wiąże się z aktywowaną glikoproteiną α_{IIb}/β_3 (CD41). Na Ryc. 7 podsumowano badania nad fenotypem PMB otrzymywanych różnymi metodami.

Uzyskane wyniki wskazują, że PMB mają wysoka ekspresję determinant powierzchniowych: CD41, CD62, PAR1, CXCR4, CD154, PF4 aczkolwiek poziom ich ekspresji zależy od sposobu otrzymania PMB (Ryc. 6 i Ryc. 7). Z Ryc. 6 i 7 wynika, że PMB indukowane jonoforem wapnia w porównaniu do PMB otrzymanych za pomocą innych aktywatorów mają największą ekspresję wszystkich badanych antygenów płytkowych. Różnice w ekspresji antygenów płytkowych na PMB otrzymywanych za pomocą aktywatorów płytek nie są jednak istotne statystycznie ($p>0,1$). Ponieważ stymulacja płytek krwi trombiną i kolagenem jest najbardziej fizjologiczna, została ona

wykorzystana w większości przeprowadzonych eksperymentów do uzyskiwania PMB. Zwraca uwagę, że wyraźnie niższą ekspresję wszystkich badanych antygenów mają PMB pochodzące z przeterminowanych preparatów płytkowych, które powstawały w wyniku samoistnego rozpadu tych krwinek (Ryc. 7 – PMB up). Ekspresja antygenów była bowiem istotnie statystycznie niższa w odniesieniu do PMB uwalnianych po działaniu któregośkolwiek z aktywatorów płytek ($p < 0,01$). Stwierdzono ponadto, że oprócz receptorów płytkowych PMB (indukowane trombiną) wykazują również ekspresję takich białek jak TNF-RI, TNFR-II, VLA-4, VLA-5 a nie wykazują np. obecności ligandu dla CD95 (Fas L) (Ryc 8).

Z Ryc 6. wynika, że PMB posiadają na swej powierzchni oprócz receptorów pochodzenia płytkowego również PF-4, który jest jedną z chemokin występujących w α -ziarnistościach płytek krwi. Ponieważ α -ziarnistości płytek krwi są bogatym źródłem innej z chemokin jaką jest RANTES, zbadano czy PMB mogą być jej źródłem. Ocenę występowania tej chemokiny na powierzchni PMB wykonano techniką Western blot (Ryc 9). Stwierdzono, że PMB uzyskane z płytek krwi za pomocą stymulacji trombiną zawierają również RANTES. Nie wykazano natomiast obecności SDF-1 w płytkach krwi lub PMB (dane nie prezentowane).

Ponieważ opisano [Majka i wsp. 2000e], że megakariocyty posiadają ekspresję metaloproteinazy-9 (MMP-9), jednej z kluczowych metalloproteinaz biorących udział w angiogenezie, zbadano również czy MMP-9 jest obecna w PMB. Ekspresja metaloproteinaz w PMB mogłaby świadczyć o ich potencjalnym działaniu angiogennym. Ekspresję MMP oceniono czynnościowo za pomocą zymografii. Jak przedstawiono na Ryc. 10 PMB posiadają słabą ekspresję aktywnej MMP-9, przy braku MMP-2, co sugeruje, że PMB mogą odgrywać rolę w angiogenezie jako źródło aktywnej biologicznie MMP-9.

Podsumowując, w pierwszej części badań wykazano, że PMB posiadają na powierzchni ekspresję wielu receptorów pochodzenia płytkowego. Potwierdzono występowanie znanych i opisanych już markerów, jak i zaobserwowano nowe nie opisane do tej pory w literaturze determinanty (CXCR4, PAR-1, CD154, TNF-RI, TNF-RII, VLA-4 i VLA-5). Stwierdzono ponadto, że PMB oprócz białek receptorowych są nośnikiem niektórych ligandów (np. chemokiny – PF-4 oraz RANTES), jak i źródłem aktywnej metaloproteinazy-9.

6.2. Przyleganie PMB do powierzchni normalnych i transformowanych komórek hemato/limfopoetycznych

W celu zbadania czy PMB mogą przenosić receptory płytkowe na powierzchnię komórek układu hemato/limfopoetycznego ludzkie komórki CD34⁺, klonowane z BFU-E erytroblasty, klonowane z CFU-GM mieloblasty oraz izolowane monocyty i limfocyty (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺) inkubowano z PMB przez 15 minut w medium RPMI bez surowicy. Po odpłukaniu nadmiaru PMB, analizowano ekspresję wybranych antygenów płytkowych (CD41, CXCR4, CD62, PAR-1) na powierzchni tych komórek. Ryc. 11 przedstawia reprezentatywny wynik analizy cytofluorymetrycznej erytroblastów, mieloblastów oraz monocytów. Stwierdzono, że komórki te opłaszczają się PMB, chociaż wydajność opłaszczania zależy od pochodzenia komórek (monocyty>mieloblasty>erytroblasty). Wykazano ponadto, że nie wszystkie determinanty PMB widoczne są po inkubacji z PMB na komórkach docelowych. Komórki opłaszczane wykazują silną ekspresję CD41 i CD62 (Ryc 11), natomiast ekspresja PAR-1 była niewykrywana metodą cytofluorymetryczną na powierzchni tych komórek (Tabela 1), chociaż jak wykazano poprzednio (Ryc. 6) PMB posiadają wyraźną ekspresję tego receptora.

W Tabeli 1 podsumowano zmiany fenotypu wszystkich analizowanych w pracy normalnych komórek hematopoetycznych przed i po inkubacji z PMB. Szczególnie silne przyleganie PMB (ekspresja CD41 i CD62 po inkubacji z PMB) zaobserwowano w przypadku monocytów, mieloblastów (wiążących prawdopodobnie PMB poprzez CD15) jak i komórek CD34⁺ (wiążących PMB poprzez CD162). PMB przylegały również silnie do erytroblastów i limfocytów CD4⁺. Nie stwierdzono natomiast przylegania PMB do limfocytów B (CD19⁺).

Oceniono także przyleganie PMB do komórek ustalonych nowotworowych linii hemato/limfopoetycznych (Tabela 2). Uzyskane wyniki wskazują, że PMB silniej opłaszczają linie T komórkowe (PB-1, Jurkat) niż B komórkowe (Nalm6, HsSultan). Linie mieloidalne HL-60 i UT-7 jak również komórki linii YT (NK) po kontakcie z PMB wykazywały wysoką ekspresję CD41. Natomiast komórki pochodzące z chłoniaków Hodgkina (Ryan i L428) nie wykazywały po inkubacji z PMB ekspresji CD41, chociaż komórki Ryan wykazywały zwiększoną ekspresję CXCR4 i nabywały ekspresję PAR-1 (Tabela 2). Z przeprowadzonych badań wynika więc, że ustalone linie hemato/limfopoetyczne opłaszczają się PMB chociaż nie wszystkie antygeny płytkowe

przenoszone są na komórki docelowe z taką samą efektywnością. Odpowiedź na pytanie czy efektywność opłaszczania zależy od pochodzenia linii (mieloidalne, limfoidalne itp.) wymaga przeprowadzenia badań na większej liczbie linii komórkowych.

Wyniki opłaszczania komórek hemato/limfopoetycznych przez PMB (Tabela 1 i 2) korelowały z ekspresją receptorów wiążących/aktywujących płytki na komórkach opłaszczanych jakimi są CD162 i Mac-1 (Tabela 3). Jak wiadomo CD162 wiąże CD62 pochodzenia płytkowego, a Mac-1 występującą również na płytkach glikoproteinę GPIIb_α. [Yang J i wsp. 1999, Simon i wsp. 2000, Janowska-Wieczorek i wsp. 2001].

Podsumowując, w tej części badań wykazano, że normalne jak i transformowane komórki układu hemato/limfopoetycznego opłaszczają się PMB, chociaż efektywność tego procesu zależy od rodzaju komórek jak i ocenianego markera pochodzącego z PMB. Efektywność opłaszczania PMB korelowała ponadto z ekspresją CD162 i Mac-1 na komórkach, które inkubowano z PMB.

6.3. PMB przylegają do powierzchni komórek a następnie mogą ulegać internalizacji

Kolejnym zadaniem prezentowanej pracy było sprawdzenie co dzieje się z PMB po przyłączeniu do powierzchni komórek docelowych. PMB mogą bowiem teoretycznie 1) pozostawać na ich powierzchni, 2) ulegać złuszczeniu lub 3) być internalizowane.

Aby odpowiedzieć na te pytania linię T komórkową PB-1 opłaszczano znakowanymi fikoerytryną PMB (Tabela 2, 3). Znakowanie przeprowadzono poprzez inkubację PMB z przeciwciałem anti-CD41-PE. Komórki PB-1 po opłaszczeniu za pomocą „znakowanych” PMB hodowane były przez 30 minut, 3 godziny lub 72 godziny w medium bezsurowiczym. Po skończonej inkubacji komórki dwukrotnie płukano i przygotowywano z nich preparaty cytospinowe, które analizowano w mikroskopie konfokalnym. Równocześnie w identycznych warunkach prowadzono hodowlę komórek PB-1 bez PMB, do których dodawano przeciwciało anti-CD41-PE aby wykluczyć niespecyficzne wiązanie barwnika (kontrola ujemna).

Stwierdzono, że komórki PB-1 po 30 minutach były silnie opłaszczone PMB. Po 3 godzinach część PMB uległa odklejeniu od błony. Po 72 godzinnej hodowli PB-1 mają zdecydowanie bardziej zabarwione wewnątrz komórek niż błonę komórkową, co

może wskazywać, że PMB wnikają do wnętrza komórek (Ryc. 12). Równocześnie komórki PB-1 inkubowane lub hodowane bez PMB a z przeciwciałem anty CD41-PE nie emitowały żadnej fluorescencji. Mechanizm tego zjawiska polegający najprawdopodobniej na internalizacji i recyrkulacji błony wymaga jednak dalszych badań. Wyniki badania konfokalnego z użyciem znakowanych fluorochromem PMB sugerują, że PMB mogą wnikać do komórek, które opłaszczają. Również przy użyciu cytometrii przepływowej zaobserwowano, że ekspresja determinant płytkowych na komórkach opłaszczanych maleje z upływem czasu. Potencjalne biologiczne znaczenie tego zjawiska zostanie omówione w dyskusji.

6.4. Przyleganie płytek krwi i PMB do komórek ludzkich linii nowotworowych pochodzących z guzów litych

W Tabeli 4 przedstawiono ekspresję antygenów płytkowych na komórkach wybranych linii nowotworowych guzów litych po inkubacji z PMB. Inkubacje prowadzono w medium bezsurowiczym w obecności 1mM CaCl₂. Jak wynika z Tabeli 4 nie udało się wykazać obecności antygenów płytkowych na ocenianych komórkach linii nowotworowych po inkubacji z PMB. Korelowało to ze stosunkowo niską ekspresją CD162, jak i Mac-1 na tych komórkach (Tabela 4).

Uzyskane wyniki wskazują więc, że komórki guzów litych w przeciwieństwie do komórek linii hematopoetycznych nie opłaszczają się lub opłaszczają się bardzo słabo PMB.

Ważną rolę w aktywacji płytek krwi i powstawaniu PMB pełni czynnik pochodzenia tkankowego (ang. *tissue factor* – TF). TF aktywuje powstawanie trombiny, która z kolei aktywuje płytki. Ryc. 13 przedstawia wyniki badania ekspresji mRNA dla TF za pomocą RT-PCR w komórkach linii hematopoetycznych (Ryc. 16A) i guzów litych (Ryc. 16B). Jak wynika z przedstawionych danych mRNA dla TF ulega ekspresji we wszystkich badanych liniach nowotworowych, ale tylko niektórych liniach hematopoetycznych. Wyniki te zostały potwierdzone analizą cytofluorymetryczną TF na powierzchni badanych komórek (dane nie prezentowane). Oznacza to, że komórki nowotworowe guzów litych mogą prawdopodobnie aktywować płytki krwi.

6.5. Uwalnianie mikrofragmentów błonowych przez komórki hematopoetyczne

Uwalnianie MB nie jest cechą charakterystyczną tylko dla płytek. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że MB występują również w nadsączach z hodowli komórek CD34⁺, CFU-GM, CFU-Meg oraz BFU-E (Ryc 14). MB oceniano podobnie jak w przypadku PMB przy użyciu cytometru przepływowego. Nadsąca z hodowli po wcześniejszym odwirowaniu komórek barwiono przeciwciałami przeciwko antygenom charakterystycznym dla komórek z których pochodzą. MB obecne w podłożach hodowlanych z 11 dniowych hodowli BFU-E, CFU-GM oraz CFU-Meg wykazywały ekspresję CD34 oraz CXCR4, co wydaje się naturalną konsekwencją różnicowania się wczesnych progenitorów w kierunku poszczególnych linii hematopoetycznych. Różnicowaniu temu towarzyszyć może utrata antygenów charakterystycznych dla wczesnych komórek hematopoetycznych (antygen CD34 oraz receptor CXCR4), które mogą prawdopodobnie złączać się w postaci MB.

Stwierdzono, że MB uwalniane z megakarioblastów posiadały również ekspresję PAR1, a MB uwalniane z mieloblastów posiadały ekspresję receptora c-kit (dane nie przedstawione). Uzyskane wyniki badań wskazują więc, że MB są uwalniane przez normalne komórki hematopoetyczne i nie jest wykluczone, że pełnią ważną, niedocenianą do tej pory rolę w ich wzajemnym komunikowaniu się.

6.6. Wpływ PMB na przyleganie hematopoetycznych linii komórkowych do fibrynogenu

PMB przenoszą na komórki hematopoetyczne antygen CD41; glikoproteinę α_{IIIb}/β_3 , której fizjologicznym ligandem jest m.in. fibrynogen. W celu sprawdzenia, czy obecność PMB na powierzchni komórek hemato/limfopoetycznych zwiększy ich przyleganie do fibrynogenu komórki wybranych linii inkubowano z PMB przez 30 minut. płukano, a następnie inkubowano na płytkach hodowlanych pokrytych fibrynogenem.

Stwierdzono, że obecność PMB zwiększała przyleganie komórek do fibrynogenu. Szczególnie widoczne było to w przypadku komórek linii HL-60 i YT ($p < 0,01$) w porównaniu do komórek nie oplaszczonych PMB. Również pozostałe linie komórkowe takie jak PB-1, Jurkat, RS11846, HsSultan, Ryan po inkubacji z PMB wykazywały zwiększone, aczkolwiek nieistotne statystycznie, przyleganie do

fibrynogenu. Pozostałe linie komórkowe (UT-7, L428 i Nalm6) nie wykazywały różnic w przyleganiu do fibrynogenu (Ryc 15). Przedstawione wyniki w znacznym stopniu korelują z efektywnością przenoszenia CD41 przez PMB (Tabla 2).

Przedstawione powyżej wyniki wskazują więc, że PMB mogą zwiększać przyleganie komórek hemato/limfopoetycznych do miejsc, w których przebiega proces zapalny, które są bogate zarówno w złogi fibrynogenu jak i powstające z aktywowanych płytek PMB. PMB mogą więc pełnić ważną rolę w zatrzymaniu komórek immunokompetentnych w ognisku zapalnym.

6.7. Wpływ PMB na przyleganie wczesnych komórek hematopoetycznych CD34⁺ do SDF-1 i komórek HUVEC

W Tabeli 1 przedstawiono dane wskazujące, że wczesne ludzkie komórki hematopoetyczne posiadające na powierzchni ekspresję antygenu CD34 ulegają opłaszczeniu PMB. Przeniesienie antygenów płytkowych na komórki CD34⁺ może mieć ważne implikacje biologiczne. Ponieważ PMB mogą przenosić na komórki CD34⁺ molekuly adhezyjne oraz receptor CXCR4, sprawdzono czy komórki CD34⁺ opłaszczone PMB będą wykazywać zwiększone przyleganie do komórek śródbłonna i SDF-1. Jak wynika z Ryc. 16 komórki CD34⁺ opłaszczone PMB wykazywały zwiększone przyleganie zarówno do komórek HUVEC (Ryc. 16A) jak i naczyń hodowlanych pokrytych SDF-1 (Ryc. 16B). Różnice te były znamienne statystycznie ($p < 0,0001$).

Ze względu na fakt, że komórki śródbłonna w szpiku kostnym posiadają na powierzchni SDF-1, PMB, które zwiększają przyleganie CD34⁺komórek do HUVEC i SDF-1 mogą wpływać na zagnieżdżanie się komórek CD34⁺ po przeszczepie w szpiku kostnym. Fakt ten może tłumaczyć, dlaczego komórki CD34⁺uzyskane z tzw. mobilizowanej krwi obwodowej, które są silnie opłaszczone PMB, szybciej wszczepiają się po przetoczeniu pacjentom niż komórki aspirowane bezpośrednio ze szpiku kostnego [Champlin i wsp. 2000, Janowska-Wieczorek i wsp. 2001].

6.8. PMB wywierają wpływ antyapoptotyczny na komórki ustalonych linii hematopoetycznych

Komórki ustalonych linii komórkowych wprowadzano w apoptozę poprzez hodowlę w medium bez surowicy (PB-1, YT, HsSultan) lub pozbawionym czynnika

wzrostowego niezbędnego do ich przeżycia (UT-7 zależna od TpO). Po 48-96 godzinnej hodowli oceniano wewnątrzcytoplazmatyczny poziom aktywnej kaspazy-3. Zaobserwowano, że obecność PMB w hodowli znacznie zmniejsza odsetek komórek, wykazujących ekspresję aktywnej formy kaspazy-3, będącej markerem apoptozy. Na Ryc. 17A przedstawiono wpływ PMB na aktywność kaspazy 3 w komórkach UT-7/TpO. Ryc.17B przedstawia wpływ PMB na komórki linii PB-1, YT oraz HsSultan. Jak wynika z prezentowanych danych PMB silnie hamują apoptozę wszystkich badanych linii. Wynik przedstawiono jako średnią arytmetyczną uzyskaną w 3 niezależnych eksperymentach (dla PB-1, UT-7/TpO i HsSultan $p < 0,005$, dla YT $p < 0,01$).

6.9. Wpływ PMB na proliferację/przeżywalność wczesnych komórek hematopoetycznych CD34⁺ oraz komórek wybranych linii hemato/limfopoetycznych

Ponieważ PMB mogą opłaszczać wczesne komórki hematopoetyczne posiadające antygen CD34 (Tabla 2) sprawdzono, czy poza modulowaniem przylegania (Ryc. 16) mogą one również wywierać wpływ na proliferację/przeżywalność tych komórek.

W celu sprawdzenia wpływu PMB na przeżywalność komórek progenitorowych szpiku, komórki te hodowano przez 48 godzin w medium bezsurowiczym wzbogacanym lub nie w PMB w stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$. Różnicę w proliferacji /przeżywalności komórek hodowanych bez/w obecności PMB oceniano testem kolorymetrycznym MTT. Jak przedstawiono na Ryc 18A. obecność PMB w sposób powtarzalny i istotny statystycznie zwiększała proliferację/przeżywalność komórek CD34⁺ ($p < 0,0001$).

Podobnie obecność PMB (30 $\mu\text{g/ml}$) w medium hodowlanym zwiększała proliferację/przeżywalność komórek wybranych linii hemato/limfopoetycznych (Ryc. 18B), które hodowano w medium bezsurowiczym wzbogaconym jedynie w 0.5% BSA. PMB zwiększały proliferację/przeżywalność komórek w sposób istotny statystycznie w przypadku linii Jurkat ($p < 0,0001$), PB-1 ($p < 0,003$), HL-60 ($p < 0,0001$), YT ($p < 0,0001$), Ryan ($p < 0,0003$), HsSultan ($p < 0,0001$), Nalm6 ($p < 0,0001$), RS11846 ($p < 0,0001$). Nie zaobserwowano natomiast znamionnego wpływu PMB w przypadku linii UT-7 i L428.

6.10. Bezpośredni wpływ PMB na klonogenność wczesnych komórek hematopoetycznych CD34⁺ oraz komórek wybranych, ustalonych linii hemato/limfopoetycznych

Komórki CD34⁺ są frakcją heterogenną i tylko 3-5% tych komórek posiada potencjał klonogeny, a więc należy do przedziału komórek progenitorowych. Ponieważ PMB zwiększały przeżywalność całej populacji komórek CD34⁺ (Ryc 18 A), postanowiono zbadać, czy PMB zwiększają również przeżywalność tych komórek CD34, które są komórkami klonogennymi.

Komórki CD34⁺ opłaszczane lub nieopłaszczane PMB hodowano w podłożu zawierającym syntetyczną surowicę i metylocelulozę, ale nie zawierającym czynników wzrostowych przez 4 lub 7 dni. W tym okresie część komórek w hodowlach pozbawionych czynników wzrostowych ulegała apoptozie. Po 4 lub 7 dniach do hodowli dodawano liniowo specyficzne czynniki wzrostowe i stymulowano wzrost klonogeny komórek progenitorowych, które przeżyły okres prowadzonej przez 4 lub 7 dni inkubacji. Po 12 dniach hodowli liczono utworzone kolonie (Ryc 19A). Za pomocą powyższej strategii doświadczalnej możliwa była ocena wpływu PMB na przeżywalność komórek CD34⁺, które są komórkami progenitorowymi dla poszczególnych linii hematopoetycznych.

Uzyskane wyniki wskazują, że komórki progenitorowe występujące we frakcji komórek CD34⁺ przeżywały lepiej po opłaszczaniu PMB i tworzyły po dodaniu czynników wzrostowych więcej kolonii BFU-E i CFU-GM niż komórki nie eksponowane na PMB. Istotny statystycznie wzrost liczby kolonii stwierdzono wtedy, gdy czynniki wzrostowe dodawane były w czwartym dniu hodowli (w przypadku BFU-E $p < 0,002$, dla CFU-GM $p < 0,005$). Tendencja ta utrzymywała się również, gdy czynniki dodawano w 7 dniu hodowli aczkolwiek różnice w liczbie utworzonych kolonii nie były istotne statystycznie (Ryc 19A). Wyniki te wskazują, że PMB zwiększają przeżywalność wczesnych komórek progenitorowych CD34⁺.

Celem sprawdzenia czy PMB mogą bezpośrednio zwiększać proliferację komórek progenitorowych, komórki CD34⁺ hodowano w podłożu zawierającym metylocelulozę i sztuczną surowicę i stymulowano je liniowo specyficznymi czynnikami do wzrostu CFU-GM, BFU-E i CFU-Meg. Używając optymalnych dawek czynników wzrostowych nie stwierdzono jednak ich bezpośredniego wpływu na stymulującego wzrost kolonii hematopoetycznych [Janowska-Wieczorek i wsp. 2001]. Wzrost ten jednak był widoczny gdy użyto ¼ normalnej dawki czynników

wzrostowych (Ryc 19B). Wpływ PMB na klonogenność CFU-GM i BFU-E hodowanych w obecności $\frac{1}{4}$ normalnej dawki czynników wzrostowych był znamieny statystycznie (dla BFU-E $p < 0,001$, dla CFU-GM $p < 0,0001$). W przypadku CFU-Meg różnica ta nie była jednak istotna statystycznie

Przeprowadzone badania wykazały również, że PMB zwiększają klonogenność komórek wybranych linii hemato/limfopoetycznych hodowanych w warunkach bezsurowiczych w metylocelulozie (Ryc 20A, B). Istotne statystycznie różnice w liczbie tworzonych kolonii wykazano dla linii PB-1 ($p < 0,0001$), YT ($p < 0,0001$) i Nalm6 ($p < 0,01$). Pozostałe linie tj Jurkat, L428, HsSultan, HL-60, RS11846, UT-7 również tworzyły więcej kolonii w obecności PMB, aczkolwiek wpływ ten nie był statystycznie znamieny (Ryc. 20C).

Z badań przeprowadzonych w tej części rozprawy wynika, że PMB stymulują proliferację zarówno normalnych hematopoetycznych komórek progenitorowych jak i komórek wielu ustalonych linii limfo/hematopoetycznych (Ryc. 18, 19, 20).

6.11. Wpływ PMB na chemotaksję komórek hematopoetycznych

Zaobserwowano, że spośród wszystkich ocenianych linii, komórki PB-1, YT, Ryan, Jurkat i HL-60 wykazują chemotaksję do PMB (odpowiednio $31\% \pm 16\%$, $30\% \pm 15\%$, $9\% \pm 3\%$, $5\% \pm 1\%$ i $5\% \pm 2\%$). Linia wyprowadzona z komórek chłoniaka Hodgkina - L428 oraz linie B komórkowe (Nalm6, HsSultan, RS11846) nie posiadały chemotaksji do PMB (Ryc. 21). Dawkę PMB jako potencjalnego chemoatraktanta ($30 \mu\text{g/ml}$) ustalono jako optymalną na podstawie wyników wstępnych (Ryc. 22). Na Ryc 23 przedstawiono obraz mikroskopowy komórek PB-1 i YT, które wykazywały chemotaksję do PMB.

W prowadzonych badaniach stwierdzono również, że komórki linii Jurkat i PB-1 wykazują silną chemotaksję do SDF-1, chemokiny wydzielanej przez komórki podścieliska szpiku kostnego [Majka i wsp. 2000]. Sprawdzono więc, czy PMB wywierają efekt synergistyczny z SDF-1 na chemotaksję tych komórek (Ryc 24). Stwierdzono, że obecność PMB znacznie zwiększa chemotaksję PB-1 i Jurkat do suboptymalnych (30 ng/ml) dawek SDF-1 (Ryc. 24E oraz Ryc. 24J). PMB mogą więc modulować chemotaksję komórek hemato/limfopoetycznych działając same bądź w synergii z innymi chemoatraktantami, w tym przypadku z SDF-1.

W dalszej części badań określono wpływ PMB na chemotaksję normalnych ludzkich komórek hematopoetycznych. Jak przedstawiono na Ryc. 25B komórki

CD34⁺ szpiku kostnego (podobnie jak komórki CD34⁺ izolowane z krwi mobilizowanej lub grasicy-dane nie prezentowane) wykazują słabą chemotaksję do PMB (ok. 4% komórek). PMB wykazują jednak silne działanie chemotaktyczne na komórki CD34⁺ działając synergistycznie z suboptymalnymi dawkami SDF-1 (około 36%, Ryc 25E).

Oceniając wpływ PMB na chemotaksję komórek jednojądrzastych szpiku kostnego (Ryc 26) stwierdzono, że PMB są chemoatraktantem dla komórek z bramki granulocytarnej (Ryc 26A), monocytarnej (Ryc 26B) oraz znacznie słabiej - limfocytarnej (Ryc 26C). Wykazano więc, że PMB są silnym chemoatraktantem nie tylko dla komórek ustalonych linii hemato/limfopoetycznych, ale również prawidłowych komórek hematopoetycznych oraz to, że PMB mogą działać synergistycznie z innymi czynnikami chemotaktycznymi.

6.12. PMB bezpośrednio aktywują niektóre szlaki przenoszenia sygnału w komórce

W przedstawionych powyżej badaniach pokazano, że PMB regulują/modulują szereg procesów biologicznych w ludzkich komórkach hematopoetycznych. W związku z powyższym zbadano czy PMB mogą aktywować w komórkach hematopoetycznych szlaki przenoszenia sygnału odpowiedzialne za regulację proliferacji, przeżywalności, adhezji i chemotaksji tych komórek (MAPK p42/44, AKT, STAT 1-6). Wyniki tych badań przedstawiono na Ryc 27 i podsumowano w Tabeli 5.

Z Ryc. 27A wynika, że PMB stymulują fosforylację MAPK p42/44 i kinazy serynowo-treoninowej AKT w normalnych ludzkich komórkach CD34⁺ jak i w komórkach szeregu ustalonych linii komórkowych. MAPK p42/44 były aktywowane szczególnie silnie w komórkach PB-1, YT i Ryan. Kinaza serynowo-treoninowa AKT z kolei w komórkach PB-1, HL-60 i Ryan. Wyniki przedstawione w Tabeli 5 wskazują, że w przeciwieństwie do MAPK p42/44 i kinazy AKT, białka STAT słabo ulegały fosforylacji po stymulacji komórek za pomocą PMB.

6.13. Składniki biologicznie aktywne wchodzące w skład PMB

PMB, jako fragmenty błony komórkowej stanowią „mozaikę” białek i lipidów. W celu wyjaśnienia, które z tych składników są biologicznie aktywne w PMB,

w pierwszej kolejności wykonano eksperymenty polegające na wyeliminowaniu komponentów białkowych. Chcąc bliżej ocenić rolę składników białkowych PMB, poddawano je denaturacji cieplnej lub trawieniu proteazami. W celu ustalenia wielkość molekularnej biologicznie aktywnych białek, PMB sączono z kolei przez filtry odcinające białka o masie 10 i 100kD. Jako model doświadczalny oceniający aktywność biologiczną „modyfikowanych” PMB przyjęto chemotaksję komórek PB-1 i YT. Upřednio stwierdziliśmy, że komórki te wykazywały silną chemotaksję do niemodyfikowanych PMB (Ryc. 21 i 23). Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w Tabeli 6.

Z uzyskanych danych wynika, że PMB poddane denaturacji cieplnej (100°C, 30min) tracą w 50% działanie chemotaktyczne wobec komórek PB-1 i w 80% działanie chemotaktyczne wobec komórek YT (w porównaniu do PMB nie denaturowanych). Trawienie PMB proteinazami (trypsyną lub proteinazą K) redukuje chemotaksję do 30% w przypadku komórek PB-1 i do 20% dla komórek YT. Żadna z badanych linii nie wykazuje chemotaksji do składników białkowych PMB o masie poniżej 10kD (filtrowanych przez sączek odcinający molekuly powyżej 10kD), co pozwala przypuszczać, że chemoatraktantem nie są np. chemokiny uwalniane przez kompleksy białkowe. Interesujące jest to, że frakcje PMB >10 kD i >100kD są silnym chemoatraktantem dla obu linii. Przy czym w przypadku PB-1 jest to chemotaksja stale niższa (o 30%) w porównaniu do PMB niefiltrowanych. Ciekawą obserwacją jest również znaczne zwiększenie chemotaksji do PMB filtrowanych przez sączki >10kD i >100kD - w przypadku komórek linii YT (Tabela 6).

Próbowano również scharakteryzować udział w obserwowanych efektach biologicznych poszczególnych składników PMB. Zgodnie z powyższym oceniano czy komórki linii PB-1 i YT wykazują chemotaksję do czynników wchodzących w skład PMB takich jak: PF-4, TGFβ-1, RANTES, IL-8, ATP, ADP, AA. Odpowiedź chemotaktyczną linii PB-1 i YT do tych związków analizowano w odniesieniu do chemotaksji tych komórek do PMB lub samego medium hodowlanego (Tabela 7).

Stwierdzono jednocześnie, że żadna z badanych linii nie wykazywała znaczącej chemotaksji do PF4, IL-8, ATP, ADP, czy składowych komplementu C3a i C3b (Tabela 7). Równocześnie wykazano, że PB-1 wykazywały chemotaksję do następujących czynników obecnych w płytkach: TGFβ-1 (na poziomie ok. 1/6 odpowiedzi chemotaktycznej w porównaniu do PMB), AA (na poziomie ok 1/3 odpowiedzi chemotaktycznej w porównaniu do PMB). W odróżnieniu od komórek

PB-1, komórki YT odpowiadały chemotaktycznie tylko do RANTES (ok. 1/5 w porównaniu do PMB).

Przedstawione wyniki należy traktować jako dane wstępne wymagające dalszych badań z zastosowaniem bardziej zaawansowanych technik analizy chemicznej i fizycznej. Niemniej wydaje się, że już w chwili obecnej można zasugerować, iż PMB stanowią mieszaninę czynników aktywnych wśród których znaczny procent aktywności przypada zarówno na białka jak i na lipidy. Badania mające bliżej zidentyfikować aktywnie biologicznie składniki PMB są obecnie w toku i będą przedmiotem odrębnej publikacji.

7. DYSKUSJA

7.1. Mikrofragmenty błonowe uwalniane przez płytki krwi

Aktywowane komórki eukariotyczne uwalniają fragmenty błon wewnętrz- i zewnątrzkomórkowych, które mogą oddziaływać na inne komórki [George i wsp. 1982, Tans i wsp. 1991, Beaudoin i wsp. 1991, Jimenez i wsp. 2001, Combes i wsp. 1999, Nieuwland i wsp. 2000, Mesri i wsp. 1998, 1999, Wolfers i wsp., 2001, Ginestra i wsp. 1994]. Szczególnym przykładem komórek uwalniających MB są płytki krwi [George i wsp. 1982, Tans i wsp. 1991, Barry i wsp. 1997]. Pochodzące z płytek krwi MB (PMB) występują w surowicy zdrowych dawców, a ich stężenie ulega kilkakrotnemu podwyższeniu u osób cierpiących na przewlekłe stany zapalne, małopłytkowość, choroby nowotworowe, zakażenie HIV czy poddawanych zabiegom chirurgicznym [Nomura i wsp. 1995, Holme i wsp. 1994, Gewaz i wsp. 1994, Mallat i wsp. 2000, Castaman i wsp. 1997, Aupeix i wsp. 1997]. Fakt, że PMB są stałym składnikiem krwi zarówno w stanach fizjologii jak i patologii stał się powodem mojego zainteresowania ich wpływu na komórki układu hemato- i limfopoetycznego.

Opisano, że PMB mogą aktywować zarówno płytki krwi jak również inne komórki np. granulocyty czy monocyty pojawiające się w ognisku zapalnym [Barry i wsp. 1998, Nijziel i wsp. 2001, Forlow i wsp. 2000, Gawaz i wsp. 2000, Mallat i wsp. 2000, Jimnez i wsp. 2001]. Wiadomo też, że PMB mają właściwości prokoagulacyjne i mogą działać nawet w znacznym oddaleniu od miejsca uwolnienia z aktywowanych płytek krwi [Miyazaki i wsp. 1996, Tans i wsp. 1991]. Co więcej opisano, że PMB mogą przyczyniać się do rozwoju miażdżycy, jak również uważane są za przyczynę skutków ubocznych przetoczeń preparatów krwiopochodnych [Mallat i wsp. 1999, Nomura i wsp. 2000c]. PMB obecne są również w przechowywanych preparatach krwi jak i preparatach pobranych do przeszczepu komórek szpiku kostnego lub mobilizowanej krwi obwodowej [Janowska-Wieczorek i wsp. 2001].

W warunkach *in vivo* do aktywacji płytek, a tym samym do powstawania PMB dochodzi pod wpływem różnych czynników takich jak trombina, chemokiny i cytokiny. składniki dopełniacza (C5-9b), czy też podczas kontaktu płytek z innymi komórkami [Pasquet i wsp. 1996, Gemmell i wsp. 1993, Barry i wsp. 1999]. Do powstania trombiny z protrombiny w szlaku zewnątrzpochodnym kaskady krzepnięcia niezbędna jest aktywność czynnika tkankowego (TF). Jest on kofaktorem katalizowanej przez

czynnik VII przemiany czynnika X do Xa. Jak wykazano w przedstawianej pracy źródłem TF mogą być komórki nowotworowe, które jak wykazano mają ekspresję zarówno mRNA dla TF, jak i odpowiedniego białka na powierzchni komórek. Obecność TF na powierzchni komórek nowotworowych przy równoczesnej obecności protrombiny w surowicy może powodować aktywację płytek krwi i uwalnianie PMB. Z literatury wiadomo, że również komórki endotelium w wyniku stymulacji VEGF wykazują zwiększoną ekspresję TF, co wzmacnia adhezję płytek do endotelium [Wada i wsp. 1995, Zucker i wsp. 1998, Verheul i wsp. 2000]. Ekspresja TF na monocytach znacznie wzrasta po kontakcie z płytkami [Nijziel i wsp. 2001]. Wykazano również, że MB uwalniane przez komórki nowotworowe i monocyty mają ekspresję TF [Beaudoin i wsp. 1991, Satta i wsp. 1994]. Krążący TF związany z MB może inicjować aktywację występujących we krwi płytek [Rauch i wsp. 2000]. Inny mechanizm aktywacji płytek *in vivo* związany jest z obecnymi w miejscu zapalnym chemokinami np. SDF-1 czy MDC; które same lub w obecności ADP mogą aktywować krążące płytki krwi [Kowalska i wsp. 2000]. Wydaje się więc prawdopodobne, że również SDF-1 obecny na powierzchni komórek śródbłonna może aktywować płytki. Aktywowane płytki krwi uwalniają zawartość ziarnistości sekrecyjnych oraz PMB [Morgenstern, 1997, Beaudoin i wsp. 1991]. Na powierzchni płytek pojawia się CD62P i fosfatydyloseryna. Ta ostatnia wzmacnia działanie TF, który skuteczniej katalizuje (wraz z czynnikiem VII) przemianę X do Xa wchodzącego w skład kompleksu protrombinazy [Zwaal i wsp. 1997]. Obecność CD62P umożliwia dalsze interakcje płytek z innymi komórkami np. leukocytami, które wykazują ekspresję CD162 czy CD15 [de Bruijne-Admiraal i wsp. 1992, Laszik i wsp. 1996]. Kontakt receptorowy pomiędzy płytką krwi i komórką docelową może prowadzić do aktywacji płytki i uwalniania PMB jak również aktywacji szlaków przekazu sygnału w komórkach docelowych. Również PMB mogą przylegać do powierzchni leukocytów poprzez układ CD62/CD162 i indukować ich aktywację. Ligandem dla CD62P jest również CD15 – marker linii mieloidalnych [de Bruijne-Admiraal i wsp. 1992]. Monocyty jak i mieloblasty pochodzące z ekspansji wykazują ekspresję zarówno CD162, CD15 jak i Mac-1. Ligandem dla tego ostatniego na powierzchni płytek i PMB jest z kolei GPIIb α [Simon i wsp. 2000, Nomura i wsp. 2000]. Przyleganie aktywowanych płytek lub PMB do komórek hematopoetycznych poprzez P-selektynę jest zależne od Ca²⁺ [Jy i wsp. 1995].

Tak więc, że istnieje szereg potencjalnych sposobów interakcji płytek krwi z komórkami eukariotycznymi.

Celem przedstawianej pracy było określenie wpływu PMB na komórki hemato/limfopoetyczne. Ponieważ krążące we krwi obwodowej komórki układu hemato/limfopoetycznego mają ciągły kontakt z PMB, postanowiono przede wszystkim zbadać czy obecność PMB wpływa na podstawowe funkcje biologiczne takie jak: przeżywalność, proliferacja, chemotaksja i przyleganie hematopoetycznych komórek progenitorowych jak i komórek ustalonych linii hemato/limfopoetycznych. Przedstawiana praca miała również odpowiedzieć na pytanie, które z antygenów płytkowych są obecne na PMB i w jakim stopniu mogą oddziaływać z komórkami docelowymi. Przeprowadzono również wstępną analizę wybranych składników białkowych i lipidowych, które mogą odpowiadać za aktywność biologiczną PMB.

7.2. Funkcje biologiczne białek receptorowych występujących na powierzchni PMB

Fakt powstawania PMB z aktywowanych płytek krwi jest znany od dawna [George i wsp. 1982]. Jednak efekty biologiczne PMB zaczęto badać dopiero na początku lat 90 tych kiedy to Abrams i wsp. zaproponowali FACS jako metodę analizy tak drobnych fragmentów błonowych [Abrams i wsp. 1990]. Do chwili obecnej opisano na powierzchni PMB obecność głównych antygenów płytkowych takich jak CD9, CD36 (GPIV), CD41 (GPIIb/IIIa), GPIaIIa, CD42a, CD42b (GPIb) oraz CD62P [Nomura i wsp. 2000b]. Wyniki prezentowane w rozprawie wskazują na obecność, na powierzchni PMB również szeregu innych białek receptorowych i ligandów płytkowych.

W przedstawianej pracy wykazano, że fenotyp PMB nie zależy w sposób istotny statystycznie od sposobu ich otrzymywania *in vitro*. Tak więc płytki aktywowane agonistami takimi jak jonofor wapnia, trombina czy też kolagen uwalniają PMB mające ekspresję podobnych antygenów. Zdecydowanie najsilniejszym aktywatorem płytek okazał się jonofor wapnia A23187. Istotne różnice w fenotypie zaobserwowano jedynie w przypadku PMB pochodzących z przeterminowanych preparatów płytkowych. PMB pochodzące z tych preparatów posiadały słabą ekspresję badanych antygenów. Wydaje się to uzasadnione, gdyż płytki te uwalniają fragmenty błonowe nie w wyniku aktywacji, ale podczas procesu „apoptotycznego rozpadu”. W badaniach przyjęto, że najbardziej fizjologicznym sposobem otrzymywania PMB jest stymulacja płytek trombiną i kolagenem, i takie właśnie PMB były używane

w prezentowanych doświadczeniach. W badaniach stosowano PMB w stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$, co odpowiada stężeniu PMB występującemu w surowicy (4-200 $\mu\text{g/ml}$) [George i wsp. 1982, Jy i wsp. 1995].

W przedstawianych badaniach stwierdzono po raz pierwszy, że PMB posiadają na powierzchni wysoką ekspresję receptora chemokinowego CXCR4 (receptora dla SDF-1 i koreceptora dla T- tropowego HIV), jak i ekspresję CD154 (ligandu receptora CD40). Obecność tych białek ma potencjalnie ważne znaczenie biologiczne. Zgodnie z prezentowanymi wynikami PMB mogą „przenosić” na komórki docelowe receptor CXCR4, a tym samym powodować, że komórki te będą mogły wiązać swoisty ligand CXCR4 jakim jest SDF-1. Ponieważ SDF-1 jest obecny na śródbłonkach naczyń w szpiku kostnym oraz jest wydzielany przez fibroblasty szpiku kostnego i węzłów chłonnych, CXCR4 przenoszony przez PMB może powodować, że komórki które wykazują jego ekspresję na powierzchni będą miały zwiększoną adhezję do śródbłoka pokrytego SDF-1 oraz będą wykazywały tropizm do szpiku kostnego i węzłów chłonnych. Może to mieć znaczenie korzystne jak np. ułatwiać wszczepienie wczesnych komórek hematopoetycznych po przeszczepie. Hipoteza ta została potwierdzona przez nasz zespół w modelu zwierzęcym. Stwierdziliśmy, że mysie wczesne komórki hematopoetyczne opłaszczane PMB ulegały szybszemu wszczepieniu do szpiku niż komórki nieopłaszczane. [Janowska-Wieczorek i wsp. 2001].

Przenoszenie CXCR4 przez PMB na komórki nowotworowe może mieć również działanie niekorzystne. PMB przenoszące CXCR4 na powierzchnię komórek nowotworowych mogą zwiększać ich potencjał metastatyczny do węzłów chłonnych i szpiku kostnego, które jak wiadomo są źródłem α -chemokiny SDF-1. Wstępne wnioski naszego zespołu wskazują, że PMB mogą rzeczywiście wpływać na tworzenie przerzutów.

CXCR4, który jest koreceptorem dla wirusa T-tropowego HIV po przeniesieniu przez PMB na powierzchnię innych komórek może także zwiększać pulę komórek, które potencjalnie mogą zostać zakażone tym wirusem [praca w przygotowaniu]. Podobny mechanizm został opisany w przypadku MB pochodzących z monocytów, które mogą przenosić koreceptor chemokinowy CCR5 z monocytów na komórki CCR5 ujemne i tym samym zwiększać pulę komórek mogących potencjalnie zostać zakażonych wirusem M-tropowym HIV [Mack i wsp. 2000].

Innym białkiem, które ulega ekspresji na PMB jest CD154 – ligand dla receptora CD40. Występowanie CD154 na PMB może mieć ważne implikacje biologiczne. Na modelu zwierzęcym, wykazano bowiem, że podawanie rozpuszczalnej formy CD154 przyspiesza odnowę układu hematopoetycznego po przeszczepieniu szpiku kostnego [Funakoshi i wsp. 1997]. Dotyczy to zarówno zwiększenia liczby progenitorów np. B komórkowych w szpiku, jak i przyspieszenia ich dojrzewania. CD154(CD40L) przyspiesza również odbudowę linii megakariocytowej i mieloidalnej [Funakoshi i wsp. 1997]. Należy nadmienić, że CD40 jest obecny na powierzchni komórek CD34⁺ szpikowych, jak również na komórkach limfoidalnych, a jak wykazano w przedstawianej pracy PMB przylegają do tych komórek. Równocześnie obecność CD154 na powierzchni PMB jak i aktywowanych płytek wpływa na aktywację komórek endotelium które posiadają ekspresję CD40. Efektem interakcji CD154/CD40 jest zwiększenie ekspresji molekuł adhezyjnych i TF na komórkach endotelium, co powoduje aktywację płytek i prowadzi do uwalniania większych ilości PMB, co może odgrywać istotną rolę w rozwoju miażdżycy [Henn i wsp. 1998, Slusky i wsp. 1998, Schonbeck i wsp. 2000].

W prezentowanej pracy wykazano również, że PMB efektywnie przenoszą kompleks integrynowy α_{IIb}/β_3 (CD41) na komórki hematopoetyczne. Funkcjonalność tego przeniesienia sprawdzano poprzez badanie adhezji komórek opłaszczonych PMB do jednego z ligandów dla CD41 jakim jest fibrynogen. Przedstawione wyniki pozwalają wnioskować, że przeniesiony CD41 jest receptorem funkcjonalnym i umożliwia komórkom przyleganie do fibrynogenu, co jest szczególnie istotne w miejscach zapalnych, bogatych zwykle w fibrynogen i PMB. Należy zaznaczyć, że zjawisko „przenoszenia receptorów” dotyczy nie tylko normalnych komórek hematopoetycznych, ale również ustalonych linii komórkowych zarówno hematopoetycznych jak i limfopoetycznych.

Przyleganie PMB do normalnych komórek hemato/limfopoetycznych może być szczególnie nasilone u pacjentów cierpiących na przewlekłe stany zapalne, u których poziom PMB jest podwyższony [Nieuwland i wsp. 2000].

PMB są również źródłem szeregu czynników biologicznie aktywnych np. kwasu arachidonowego i jego pochodnych, które mogą wpływać na komórki docelowe [Barry i wsp. 1997, 1998]. W przedstawianej pracy wykazano, że PMB zawierają m.in. β -chemokinę RANTES i PF4. Zarówno RANTES jak i PF4 są znanymi czynnikami chemotaktycznymi dla monocytów (RANTES) oraz neurofilów (PF-4), istotnymi

w przebiegu reakcji zapalnej [Jakóbisiak, 1995]. Równocześnie podkreśla się rolę PF4 w oddziaływaniach pomiędzy neutrofilami i komórkami śródbłónka [Petersen i wsp. 1999]. Jak wiadomo z literatury i badań własnych PMB przylegają zarówno do neutrofilów jak i komórek śródbłónka [Jy i wsp. 1995, Barry i wsp. 1998] Wydaje się jednak, że oprócz PF4, PMB zawierają również inne czynniki aktywujące neutrofile. Lindmann i wsp. wykazali np., że płytki krwi są źródłem IL-1 β , nie jest wykluczone, że ta właśnie cytokina może być również przenoszona przez PMB [Lindmann i wsp. 2001]. Identyfikacja wszystkich czynników, które potencjalnie mogą być przenoszone przez PMB wymaga jednak dalszych badań.

Rola PMB jak i płytek w rozwoju choroby nowotworowej nie jest do końca wyjaśniona, ale przedstawione wyniki wskazują, że PMB mogą działać prometastatyczne. Stwierdzono bowiem, że PMB są źródłem metaloproteinazy-9 (MMP-9). MMP-9 jest znanym czynnikiem biorącym udział w regulacji migracji komórek i angiogenezie [Majka i wsp. 2000c, Fernandez-Patron i wsp. 1999]. Ponieważ komórki nowotworowe mogą aktywować płytki krwi [Lindenmeyer i wsp. 1997], PMB powstające więc z aktywowanych przez nowotwór płytek mogą tym samym dostarczać komórkom nowotworowym MMP-9 i zwiększać ich potencjał metastatyczny. Wykazano też, że interakcja CD40L (pochodzącego z limfocytów T) z CD40 na komórkach endotelialnych indukuje ekspresję *de novo* metaloproteinaz (m.in. MMP-2, 9) w tych ostatnich [Mach i wsp. 1999]. Nie jest wykluczone, że podobne skutki wywiera aktywacja komórek endotelialnych po kontakcie z PMB.

Przenoszenie poprzez PMB antygenów płytkowych na inne komórki hematopoetyczne może mieć ponadto inne konsekwencje. PMB są bowiem źródłem antygenów płytkowych rozpoznawanych przez przeciwciała przeciwpłytkowe (np. anty CD41, GPIb/IX, GPIa/IIa GPV i GPIV), co może doprowadzić do niszczenia komórek, które przylączyły PMB na drodze np. zależnej od komplementu lub ich sekwestracji w śledzionie poprzez fragment Fc przeciwciał. Sytuacja taka może mieć miejsce u pacjentów z małopłytkowością pochodzenia immunologicznego (ITP) [Warkentin i wsp. 1994, Zwaal i wsp. 1997]. W prezentowanej pracy wykazano np., że PMB efektywnie przenoszą antygeny płytkowe na powierzchnię erytroblastów. PMB „znakują” również komórki erytroidalne fosfatydyloseryną, która powoduje, że komórki są rozpoznawane przez fagocyty jako apoptotyczne. Mechanizm ten może częściowo tłumaczyć częste występowanie niedokrwistości i leukopenii u pacjentów z małopłytkowością [Aupeix i wsp. 1997].

PMB mogą przylegać do powierzchni komórek docelowych poprzez kontakt ligand/receptor. Adhezja ta jest procesem szybkim – antygeny płytkowe pojawiają się na komórkach już po 15 minutach inkubacji. Po 2-3 godzinach ekspresja ich spada, a po kilkudziesięciu godzinach w mikroskopie konfokalnym można zaobserwować sygnał pochodzący od PMB gromadzonych we wnętrzu komórek. Świadczyć to może o internalizacji PMB. Mechanizm tego zjawiska wymaga dalszego badania, jednak już teraz można wyobrazić sobie konsekwencje wnikania PMB do wnętrza komórek. PMB mogą dostarczać komórkom składniki lipidowe jak również w przypadku gdy pochodzą z megakariocytów/płytek zakażonych wirusami (HIV lub CMV) mogą ułatwiać wnikanie cząstek wirusa do komórek docelowych (mechanizm „konia trojańskiego”).

7.3. Modulacja chemotaksji komórek hemato/limfopoetycznych przez PMB

PMB mogą wpływać na różne aspekty biologii komórek hematopoetycznych. Barry i wsp. wykazała m.in., że PMB są czynnikiem chemotaktycznym dla komórek linii monocytarnej U-937 [Barry i wsp. 1998]. W prezentowanych badaniach stwierdzono, że PMB są silnym chemoatraktantem nie tylko dla linii U937, ale również dla szeregu innych linii hemato/limfopoetycznych (T-, NK-komórkowych i mieloidalnych), a przede wszystkim prawidłowych monocytów, mieloblastów oraz wczesnych komórek CD34⁺ izolowanych ze szpiku kostnego, grasicy czy krwi mobilizowanej. Szczególnie silną chemotaksję do PMB zaobserwowano w przypadku komórek PB-1 i YT (do 30%) oraz granulocytów szpikowych. PMB zwiększały ponadto chemotaksję komórek CD34⁺ oraz linii T-limfocytowych do α -chemokiny jaką jest SDF-1. Zauważono, że linie komórkowe, które mają stosunkowo słabą chemotaksję do PMB odpowiadają silną chemotaksją do PMB + SDF-1. Szczególnie silny synergizm w odpowiedzi do PMB+SDF-1 zaobserwowano w przypadku linii PB-1 oraz Jurkat. Ponieważ SDF-1 reguluje migrację oraz zagnieżdżanie się komórek hematopoetycznych do szpiku kostnego, grasicy i węzłów chłonnych, PMB, których stężenie wzrasta podczas infekcji mogą zwiększać jego działanie, szczególnie podczas ostrych i przewlekłych stanów zapalnych [Naiyer i wsp. 1999].

Identyfikacja składnika/składników PMB, który tak znacznie wzmacnia odpowiedź do niskich dawek SDF-1 wymaga dalszych badań. W kontekście przeprowadzonych badań można jednak przypuszczać, że PMB obecne w surowicy

mogą modulować zagnieżdżanie się do narządów hemato/limfopoetycznych zarówno komórek immunokompetentnych jak i wczesnych komórek hematopoetycznych „mobilizowanych” przez stan zapalny do krwi obwodowej. Synergistyczne działanie PMB i SDF-1 może być również jednym z ważnych czynników regulujących wszczepianie przeszczepianych komórek krwiotwórczych do szpiku kostnego [Janowska-Wieczorek i wsp. 2001]. Nie można wykluczyć, że również inne czynniki jak MDC czy RANTES mogą działać synergistycznie z PMB, szczególnie, że ten ostatni jest obecny w PMB.

Barry jako główny czynnik PMB odpowiedzialny za chemotaktyczne działanie uważa kwas arachidonowy (AA), który będąc jednym z głównych składników PMB, podobnie jak stymulacja za pomocą PMB indukuje na drodze zależnej od PKC ekspresję COX-2 w monocytach [Barry i wsp. 1997, 98]. Z własnych badań wynika, że istotnie w przypadku niektórych linii komórkowych np. PB-1 kwas arachidonowy może być jednym z czynników chemotaktycznych. W przypadku innych linii komórkowych AA nie miał tak istotnego znaczenia. Uzyskane wyniki skłaniają więc do poszukiwania innych składowych PMB, które wpływać mogą na chemotaksję komórek. Przeprowadzone wstępne doświadczenia w przypadku linii PB-1 i YT wykluczają istotną rolę takich składników PMB jak: PF4, IL-8, TGF- β , składowych komplementu C3a, C5a. Równie niewielkie znaczenie wydają się mieć puryny (ATP, ADP). Na obecnym etapie badań nie można jednak wykluczyć, że mogą one działać synergistycznie z SDF-1.

7.4. Wpływ PMB na przyleganie komórek hemato/limfopoetycznych do komórek HUVEC, SDF-1 oraz fibrynogenu

Opisano, że PMB zwiększają przyleganie monocytów do komórek śródbłonna [Barry i wsp. 1998]. W prezentowanej pracy wykazano, że PMB zwiększają również przyleganie wczesnych komórek CD34⁺ do komórek HUVEC. Podobne wyniki uzyskano w przypadku linii komórkowych YT i Ryan (dane nie prezentowane). Barry i wsp. wykazała, że stymulacja komórek HUVEC mikrofragmentami błony płytkowej przez 5 godzin powoduje selektywny wzrost ekspresji molekuly adhezyjnej ICAM-1, ale nie VCAM-1, P- czy E-selektyny [Barry i wsp. 1998]. Z obserwacji własnych wynika, że PMB przenoszą obecne na ich powierzchni molekuly adhezyjne na inne komórki, ale nie stymulują ich syntezy *de novo* na komórkach docelowych. Inkubacja

6-godzinna linii komórkowych ATL-2 i YT z PMB nie prowadziła jednak do indukcji syntezy molekuł adhezyjnych na liniach docelowych.

PMB inkubowane z komórkami hematopoetycznymi opłaszczają je i umożliwiają im przyleganie do fibrynogenu lub SDF-1. Istotnie statystycznie różnice w przyleganiu do fibrynogenu zaobserwowano w przypadku opłaszczonych linii HL-60 i YT. Pozostałe linie po opłaszczaniu wykazywały podobną tendencję, ale bez istotności statystycznej. Zwiększone przyleganie komórek pokrytych PMB do różnych substratów może odgrywać ważną rolę w miejscach bogatych w fibrynogen np. w ogniskach zapalnych jak również w tworzeniu przerzutów przez nowotwór. Receptory przenoszone biernie przez PMB z płytek krwi na komórki docelowe takie jak: integryny płytkowe lub CXCR4 mogą pełnić w tych procesach ważną funkcję [Janowska-Wieczorek i wsp. 2001] Otwartą kwestią pozostaje współdziałanie PMB z cytoszkieletem komórki opłaszczanej. Z literatury wynika, że PMB mogą zawierać białka cytoszkietowe płytek krwi [Morgenstern, 1997, Nomura i wsp. 1992]. To czy receptory po przeniesieniu na komórki docelowe przez PMB zostają w pełni włączone zarówno do struktury cytoszkietu komórki oraz to czy efektywnie przyłączają białka biorące udział w przenoszeniu sygnału wymaga dalszych badań.

7.5. Modulacja przeżywalności i proliferacji komórek hemato/limfopoetycznych przez PMB

W przedstawianej pracy wykazano po raz pierwszy, że PMB pozytywnie modulują przeżywalność komórek CD34⁺ jak również komórek wielu linii hematopoetycznych. W kilkudziesięciogodzinnej hodowli w medium bezsurowiczym znacznie więcej komórek CD34⁺ przeżywa, jeśli wcześniej zostały eksponowane na PMB. Różnica ta jest istotna statystycznie. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w wynikach Brunetti i wsp, którzy wykazali, że sączone supernatanty ze stymulowanych płytek działają antyapoptotycznie na PMN krwi obwodowej. Autorzy tej pracy za główny płytkowy czynnik hamujący apoptozę uważają TGFβ, nie biorąc jednak pod uwagę innych potencjalnie aktywnych biologicznie składników PMB ani PMB jako mediatorów efektów biologicznych [Brunetti i wsp. 2000].

W prezentowanych badaniach po raz pierwszy wykazano, że PMB mogą również stymulować proliferację komórek. Zgodnie z powyższym komórki CD34⁺ eksponowane na PMB tworzą więcej kolonii erytroidalnych i mieloidalnych



w porównaniu do komórek nie stymulowanych PMB. Wydaje się, że na klonogenność hematopoetycznych komórek progenitorowych może mieć wpływ CD154 (CD40L), który jest obecny na PMB, a został opisany jako czynnik stymulujący odnowę linii mieloidalnej [Funakoshi i wsp. 1997]. Nie można również wykluczyć, że inne składniki PMB takie jak np. fosforan sfingozyny mogą także działać troficznie na komórki hematopoetyczne. Wiadomo bowiem, że związek ten może stymulować proliferację np. komórek śródbłonna [English i wsp. 2001]. Z przeprowadzonych badań wynika, że PMB zwiększają również proliferację komórek ustalonych linii hematopoetycznych. Większość badanych w pracy linii komórkowych zdecydowanie lepiej tworzyła kolonie w medium półpłynnym, jeżeli była ekspozycja na PMB. PMB zwiększały również przeżywalność tych komórek w 5 dniowych hodowlach w mediach pozbawionych surowicy. Równocześnie PMB wywierają efekt antyapoptotyczny, co wykazano analizując poziom ekspresji aktywnej formy kaspazy-3 w komórkach ustalonych linii hematopoetycznych wprowadzanych w apoptozę poprzez usunięcie z ich środowiska surowicy lub czynnika troficznego.

Poza wymienionymi TGF- β i fosforanem sfingozyny, postulowano również, że za obserwowane efekty mogą być odpowiedzialne inne biologicznie aktywne lipidy np. kwas arachidonowy. Stwierdzono bowiem, że AA będący składnikiem PMB, w pewnych dawkach jest niezbędny do wzrostu i życia komórek nowotworowych [Korystow i wsp. 1998]. Może być on także niezbędny w niektórych etapach różnicowania progenitorów mieloidalnych [Roberts i wsp. 1999]. PMB, które aktywują *in vivo* monocyty (np. w miejscu zapalnym), mogą również pośrednio prowadzić do wzrostu stężenia AA zwiększając jego wydzielanie przez te komórki [Locati i wsp. 1994, Triggiani i wsp. 1995]. AA jest związkiem nietrwałym i bardzo szybko ulega przemianom katalizowanym przez peroksydazę (do 15-HETE), 12-lipoksygenazę (12-HETE) lub 5-oksygenazę (do leukotrienów) [Brash i wsp. 2001, Sala i wsp. 1997]. Produkty przemiany AA na drodze katalizowanej przez 12-lipoksygenazę (12-HETE: hydroksyeikozatetraenoan) mogą wspomagać proliferację linii mieloidalnej i erytroidalnej [Desplat i wsp. 2000]. Co więcej wykazano, że obecność 12 HETE w hodowli zwiększała wrażliwość komórek progenitorowych na niskie stężenia czynników wzrostowych np. w przypadku EPO powodowała wzrost liczby receptorów na powierzchni komórek bądź molekuł biorących udział w przekazie sygnału od receptora dla erytropoetyny [Desplat i wsp. 2000]. Podobnie stwierdzono, że niektóre pochodne kwasów tłuszczowych (np. kwasu masłowego) mogą również stymulować

proliferyację erytroblastów [Boosalis i wsp. 2001]. Obserwacje te znajdują potwierdzenie w przedstawianych wynikach badań własnych, w których obecność PMB w hodowli w przypadku obniżenia stężenia czynników wzrostowych nie zmniejszała liczby powstających kolonii. Ewentualny bezpośredni wpływ PMB na ekspresję receptorów dla czynników hematopoetycznych bądź białek sygnałowych, wymaga jednak dalszych badań. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono natomiast, że PMB stymulują w komórkach CD34⁺ kinazy stresowe MAPK p42/44 i kinazę serynowo-treoninową AKT. Fosforylacja tych białek towarzyszy z kolei proliferacji komórek.

Należy również pamiętać, że opisano szereg przykładów w których bioaktywne lipidy mogą z kolei hamować klonogenność i proliferację komórek hematopoetycznych. Stwierdzono m.in. że fosfatydylocholina i nienasycone kwasy tłuszczowe (m.in. kwas arachidonowy) pośrednio hamują proliferację limfocytów [Zurier i wsp. 1999]. Rizzo dowodzi nawet, że w przypadku komórek przewlekłej białaczki szpikowej, AA powoduje ich apoptozę na drodze niezależnej od syntezy wolnych rodników tlenowych czy pochodnych AA [Rizzo i wsp. 1999].

W chwili obecnej trudno jest zidentyfikować konkretny czynnik PMB odpowiedzialny ze stymulację proliferacji komórek hematopoetycznych a wyniki badań raczej skłaniają do szukania grupy takich czynników. Troficzny wpływ PMB na komórki może mieć znaczenie nie tylko w aspekcie komórek hematopoetycznych. PMB prawdopodobnie mogą również stymulować proliferację innych komórek np. endotelialnych czy nowotworowych. Wykazano, że płytki mogą stymulować komórki śródbłonna do proliferacji [Mallat i wsp. 1999], a z własnych niepublikowanych badań wstępnych wynika, że PMB mają bardzo podobne działanie wobec komórek HUVEC. Proliferyacja komórek śródbłonna jest jednym z etapów angiogenezy. Znajduje to potwierdzenie w badaniach klinicznych, gdzie ustalono, że wzrost liczby płytek krwi u pacjentów cierpiących na choroby nowotworowe rokuje niekorzystnie [Hejna i wsp. 1999]. Wpływ płytek i PMB na proliferację i tworzenie naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym wymaga dalszych badań.

7.6. Molekularne aspekty działania PMB na komórki docelowe

W przeprowadzonych w prezentowanej rozprawie badaniach wykazano, że PMB bezpośrednio oddziałują na komórki hemato/limfopoetyczne, co znajduje

potwierdzenie w aktywacji szeregu szlaków przewodzenia sygnału. Z danych literaturowych wiadomo np., że PMB mogą indukować w komórkach linii monocytarnej U-937 fosforylację MAPK p42/p44, MAPK p38 oraz JNK1 [Barry i wsp.1998]. Prezentowane w pracy wyniki potwierdziły i rozszerzyły te obserwacje. Stwierdzono bowiem, że PMB nie tylko aktywują komórki szeregu ustalonych linii hemato/limfopoetycznych, ale również powodują fosforylację MAPKp42/44 i AKT w normalnych wczesnych komórkach hematopoetycznych posiadających antygen CD34. Badania te tłumaczą na poziomie molekularnym obserwowany wpływ PMB na przeżywalność i klonogenność powyższych komórek. Podobne obserwacje poczyniono na ustalonych liniach komórkowych. Zgodnie z powyższym w niektórych badanych liniach (Jurkat, PB-1, YT, Ryan, Nalm 6) obserwowano aktywację p42/p44 MAPK, co korelowało ze wzrostem klonogenności tych linii po kontakcie z PMB. Obserwowano również fosforylację kinazy AKT w przypadku linii PB-1, Jurkat, YT, HL-60, Nalm6 i Ryan. Żadna z badanych linii nie wykazywała fosforylacji STAT3, a jedynie w komórkach Nalm6 PMB indukowały fosforylację STAT5. STAT6 ulegał słabej fosforylacji po kontakcie z PMB w liniach L428, PB-1 i YT. Wydaje się więc, że białka STAT nie biorą istotnego udziału w stymulacji komórek przez PMB.

Poznanie molekularnych mechanizmów przekazu sygnału wymaga dalszych badań obejmujących identyfikację receptorów przez które działają PMB. Z uwagi na brak zidentyfikowanego aktywnego czynnika lub grupy aktywnych czynników poprzez które działają PMB (chemokina, cytokina, bioaktywny lipid?) trudno jest w tej chwili określić jaki jest to receptor lub grupa receptorów. Niemniej jednak poprzez selektywne wyłączanie niektórych grup receptorów można będzie z pewnością uzyskać więcej informacji. Inkubacja komórek docelowych z toksyną PTx (Pertusini toxin) przed ekspozycją na PMB pozwoli ustalić, jaką rolę biologiczną odgrywają związki działające przez receptory serpentynowe (ang. *seven transmembrane span receptors*) związane z białkami $G\alpha_i$ (np. chemokiny, czy niektóre biologicznie aktywne lipidy takie jak fosforan sfingozyny). Zastosowanie z kolei herbimycyny A blokującej przekazywanie sygnału przez receptory o aktywności kinaz tyrozynowych pozwoli ocenić ewentualny udział czynników wzrostowych lub cytokin wchodzących w skład PMB.

Celem przeprowadzonych badań było również uzyskanie wstępnych danych dotyczących pochodzenia składników biologicznie aktywnych obecnych w PMB. Zgodnie z powyższym oceniano udział składników białkowych i lipidowych

w obserwowanych efektach biologicznych PMB. Udział białek oceniano poddając PMB denaturacji, trawieniu enzymami proteolitycznymi oraz sączeniu przez filtry molekularne. Stwierdzono, że denaturacja białek zarówno termiczna jak i enzymatyczna pozbawiała PMB jedynie części aktywności biologicznej. Zniszczenie w PMB komponentów białkowych wrażliwych na temperaturę i trawienie enzymami proteolitycznymi redukowało o około 50% efekt chemotaktyczny PMB dla komórek PB-1 i YT. Sugeruje to, że efekty chemotaktyczne zależą w dużej mierze od obecności w PMB czynnika białkowego opornego na działanie wysokiej temperatury bądź bioaktywnych lipidów. W celu weryfikacji tej teorii sprawdzono chemotaksję badanych linii do termoopornych składników komplementu – C3 i C5. Badane komórki nie wykazywały jednak chemotaksji do tych związków. Za chemotaktyczny składnik PMB wobec komórek linii monocytarnej U937 Barry i wsp. uważają kwas arachidonowy [Barry i wsp. 1997]. Uzyskane wyniki własne wskazują jednak, że kwas arachidonowy nie odgrywa istotnej roli w chemotaksji komórek PB-1 i YT (Tabela 7).

Wyniki frakcjonowania PMB na frakcje o masie <10kD, >10kD i >100kD mogą sugerować, że czynnikiem aktywnym nie jest czynnik o masie <10kD, lecz czynnik, który jest związany z dużymi molekułami. Największą chemotaksję zaobserwowano bowiem do frakcji >10 i >100kD PMB. Nie wyklucza to jednak wpływu chemokin bądź innych małych cząsteczek lipidowych, które mogą tworzyć kompleksy z większymi białkami. Potwierdzeniem mogą być eksperymenty w których stwierdzono, że poddane proteolizie PMB stanowią silniejszy chemoatraktant dla linii komórkowych niż PMB nie poddawane proteolizie (dane nie prezentowane). Ponieważ badane linie odpowiadają do PMB w różnym stopniu, jak również wykazują chemotaksję do różnych potencjalnych składników PMB wydaje się uzasadnione stwierdzenie, że PMB stanowią bardzo złożoną strukturę i na obecnym etapie badań nie zidentyfikowano czynnika który w pełni tłumaczyłby wszystkie obserwowane efekty biologiczne. Poszukiwać należy więc raczej grupy składników biologicznie aktywnych. Różne składniki mogą z kolei działać różnie na poszczególne procesy biologiczne (prolifracja, chemotaksja, stymulacja komórek itp.). Badania te wymagają zastosowania bardziej zaawansowanej analizy chemicznej w zakresie lipidów (chromatografia lub spektroskopia) jak i białek (proteomiksy). Dokładna identyfikacja biologicznie aktywnych składników PMB może pozwolić z kolei na opracowanie strategii hamujących ich udział w procesach zapalnych czy też angiogenezie

nowotworów. Identyfikacja tych czynników może również potencjalnie pozwolić na odkrycie związków, które mogą działać troficznie na komórki hemato/limfopoetyczne.

7.7. Podsumowanie

Uwalnianie MB jest procesem związanym z odnową błony komórkowej każdej żywej komórki. Proces ten ulega znacznemu nasileniu w stanach patologicznych, dlatego też u osób cierpiących na posocznicę identyfikuje się w surowicy MB pochodzenia płytkowego, monocytowego, granulocytowego, endotelialnego i limfocytowego. Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy pozwalają spojrzeć na MB nie tylko jako na „niepotrzebne”, „zużyte” fragmenty błonowe, ale również jak na mediatory nieznanego dotychczas sposobu komunikowania się komórek. Co cenniejsze – zrozumienie roli PMB w organizmie może pomóc w wyjaśnieniu wielu trudnych procesów fizjologicznych i patologicznych. Uważam, że prowadzone przez mnie badania otwierają nowy rozdział w poznawaniu biologii i wzajemnych oddziaływań komórek hemato/limfopoetycznych, w którym to PMB odgrywają istotną i niedocenianą do tej pory rolę.

8. WNIOSKI

W prezentowanych badaniach zidentyfikowano i opisano nową rolę jaką pełnią PMB w regulacji hemato/limfopoety. Uzyskane wyniki wskazują, że PMB odgrywają ważną rolę w interakcjach pomiędzy komórkami układu krwiotwórczego. Dalsza analiza biologicznie czynnych składników PMB może doprowadzić do poznania/identyfikacji nowych czynników mogących regulować hemato/limfopoetę.

Przeprowadzone i przedstawione w prezentowanej rozprawie wyniki badań pozwalają na sformułowanie następujących wniosków.

1]. Płytki krwi stymulowane agonistami uwalniają PMB, które wykazują ekspresję szeregu białek receptorowych jak i potencjalnych ligandów pochodzenia płytkowego. Potwierdzono występowanie na ich powierzchni receptorów integrynowych CD41 oraz CD62P, oraz stwierdzono występowanie nowych markerów receptorowych takich jak: PAR1, CXCR4, CD154, TNFR-I, TNFR-II, CD95, VLA4 i VLA5. PMB wykazują ponadto ekspresję niektórych białek pochodzenia płytkowego takich jak: PF-4, RANTES oraz MMP-9.

2]. Wiele spośród zidentyfikowanych receptorów płytkowych jest przenoszonych za pośrednictwem PMB na inne komórki. Niektóre z nich jak np. CD41 lub CXCR4 po przeniesieniu przez PMB na komórki hematopoetyczne są funkcjonalne i jak wykazano umożliwiają np. adhezję tych komórek do podłoża pokrytych fibrynogenem lub SDF-1.

3]. PMB znajdujące się na powierzchni komórek docelowych mogą ulegać stopniowo internalizacji. PMB mogą w ten sposób dostarczać do komórki białka lub bioaktywne lipidy.

4]. PMB działają silnie chemotaktycznie na prawidłowe komórki hematopoetyczne (CD34⁺, granulocyty i monocyty) oraz na komórki szeregu ustalonych linii nowotworowych (T i NK komórkowych). PMB wykazują ponadto synergistyczny efekt z SDF-1 w działaniu chemotaktycznym na wczesne komórki układu krwiotwórczego posiadające antygen CD34.

5]. Stwierdzono ponadto, że PMB działają troficznie na komórki układu krwiotwórczego. Zwiększają one m.in. proliferację i przeżywalność wczesnych komórek klonogennych posiadających antygen CD34⁺ oraz wywierają efekt antyapoptotyczny na komórki wielu ustalonych linii hemato/limfopoetycznych.

6]. Na poziomie molekularnym PMB bezpośrednio aktywują we wczesnych komórkach hematopoetycznych CD34⁺ jak i komórkach ustalonych linii hemato/limfopoetycznych kinazy stresowe MAPK p42/44, kinazę serynowo/treoninową AKT.

7] Źródłem aktywności biologicznej PMB są zarówno lipidy jak i białka o dużej masie bądź też kompleksy białek z lipidami. Czynniki te działając osobno lub razem odpowiadają za właściwości biologiczne PMB. Identyfikacja biologicznie aktywnych składników PMB wymaga dalszych badań i może potencjalnie prowadzić do zidentyfikowania nowych regulatorów hemato/limfopoety.

9. STRESZCZENIE

Aktywowane komórki eukariotyczne uwalniają drobne fragmenty błon komórkowych nazywane mikrofragmentami błonowymi (MB). Podobne struktury uwalniane są między innymi przez aktywowane płytki krwi obwodowej. Stwierdzono, że stężenie MB w surowicy krwi podnosi się w wielu stanach patologicznych takich jak ostre i przewlekłe stany zapalne, uogólniona miażdżyca czy małopłytkowość. Stężenie ich wzrasta również u pacjentów dializowanych oraz poddanych zabiegowi leukoferezy. Wykazano również, że MB pochodzenia płytkowego (PMB) opłaszczają wczesne komórki hematopoetyczne krążące we krwi podczas tzw. mobilizacji, co powoduje, że komórki te łatwiej wszczepiają się po przeszczepieniu.

Uważa się, że płytkowe mikrofragmenty błonowe krążące we krwi mogą 1] przylegać do komórek hematopoetycznych i przenosić na ich powierzchnię szereg receptorów występujących na płytkach krwi bądź 2] bezpośrednio stymulować komórki hematopoetyczne za pomocą różnych fragmentów białkowych oraz pochodnych lipidowych, które wchodzi w ich skład. Biorąc pod uwagę, że komórki hematopoetyczne zarówno w stanach fizjologii jak i patologii eksponowane są na MB pochodzenia płytkowego, celem prezentowanej rozprawy stała się ocena ich wpływu na różne aspekty hematopoezy. Zgodnie z powyższym oceniano wpływ MB pochodzenia płytkowego na: 1] chemotaksję prawidłowych i nowotworowych komórek układu krwiotwórczego, 2] adhezję tych komórek do różnych elementów mikrośrodowiska krwiotwórczego, 3] proliferację i przeżywalność, oraz 4] oceniano aktywację/fosforylację wybranych białek biorących udział w przewodzeniu sygnałów z pobudzonych receptorów powierzchniowych komórki do jej wnętrza. Dokonano również wstępnej analizy wybranych składników białkowych i lipidowych wchodzących w skład PMB, które mogłyby odpowiadać za obserwowane efekty biologiczne.

W przeprowadzonych badaniach posłużono się MB pochodzenia płytkowego, które uzyskiwano z aktywowanych za pomocą stymulacji trombiną i kolagenem płytek krwi obwodowej. Oceniano wpływ PMB na wczesne komórki CD34⁺ oraz komórki jednojadrzaste szpiku pozyskane od zdrowych dawców, a także komórki szeregu ustalonych linii mieloidalnych i limfoidalnych (T-, B-, NK-komórkowych). W badaniach wykorzystano szereg technik badawczych takich jak: cytometria przepływowa, badanie chemotaksji, ocena proliferacji/przeżywalności i apoptozy.

adhezji komórek, klonogenne testy proliferacyjne, analiza ekspresji mRNA (RT-PCR) oraz ekspresji i fosforylacji białek (Western Blot, zymografia).

Uzyskane wyniki wskazują, że MB pochodzenia płytkowego mogą bezpośrednio oddziaływać na komórki układu krwiotwórczego i regulować/modulować szereg aspektów dotyczących ich biologii. Stwierdzono, że PMB posiadają na powierzchni szereg molekuł adhezyjnych (CD41, CD61, CD62P, VLA-4, VLA-5), receptorów (CXCR4, PAR-1, TNFR-I, TNFR-II, CD95), potencjalnych ligandów (CD40L, PF-4 oraz RANTES) oraz zawierają metalloproteinazę-9 (MMP-9). Wiele spośród wymienionych receptorów jest przenoszonych przez PMB na powierzchnię komórek hematopoetycznych. Wykazano m.in., że komórki układu krwiotwórczego po inkubacji z PMB nabywają ekspresję receptora chemokinowego CXCR4 (koreceptor dla wirusa T-tropowego HIV). Niektóre z przenoszonych receptorów zachowywały aktywność biologiczną i tak np. komórki, które nabywały po inkubacji z PMB ekspresję integryny α_{IIb}/β_3 (CD41) lub receptora chemokinowego CXCR4 wykazywały adhezję do swoistych ligandów, jakimi są odpowiednio fibrynogen i stromalny czynnik wzrostowy - 1 (SDF-1). Zaobserwowano, że PMB po adhezji do komórek docelowych mogą 1] pozostawać związane ze strukturami błony powierzchniowej, 2] uwalniać się z błony komórkowej lub 3] ulegać internalizacji.

MB pochodzenia płytkowego okazały się ponadto silnym chemoatraktantem dla zarówno prawidłowych jak i nowotworowych komórek układu krwiotwórczego. Wykazywały m.in. działanie synergistyczne z SDF-1 (α -chemokina) na chemotaksję wczesnych komórek hematopoetycznych posiadających antygen CD34. W przeprowadzonych badaniach wykazano po raz pierwszy, że PMB w warunkach bezsurowiczych zwiększały przeżywalność jak i proliferację zarówno wczesnych normalnych komórek hematopoetycznych posiadających antygen CD34 jak i wielu nowotworowych linii komórkowych wywodzących się z układu krwiotwórczego. Wykazano również, że PMB hamują apoptozę w niektórych ustalonych liniach komórkowych. Obserwowane efekty biologiczne znalazły potwierdzenie w badaniach fosforylacji białek biorących udział w przewodzeniu sygnału w komórkach hematopoetycznych. Stymulacja szeregu linii komórkowych, jak i komórek CD34⁺ poprzez PMB powodowała fosforylację kinaz stresowych MAPK p42/44, kinazy serynowo-treoniowej AKT, oraz białek STAT.

Wstępna analiza składników wchodzących w skład PMB, które mogłyby odpowiadać za obserwowane efekty biologiczne sugeruje, że źródłem aktywności

biologicznej PMB są zarówno białka o dużej masie jak i wchodzące w skład PMB lipidy. Przeprowadzone badania wskazują, że MB pochodzenia płytkowego wpływają na szereg właściwości biologicznych komórek układu hematopoetycznego. Ponieważ, jak wykazano w prezentowanej pracy, MB uwalniane są nie tylko przez płytki krwi, ale również przez inne komórki układu krwiotwórczego (CD34⁺, mieloblasty, megakarioblasty i erytroblasty) MB można prawdopodobnie przypisać ważną rolę w wymianie informacji i wzajemnych oddziaływaniach międzykomórkowych. Poznanie tych nowych mechanizmów oraz zidentyfikowanie biologicznie aktywnych składników MB (działających pojedynczo lub wspólnie) otworzy nowy rozdział w badaniu regulacji krwiotworzenia, a także umożliwi opracowanie nowych protokołów leczniczych umożliwiających kontrolowanie wpływu MB na różne aspekty hemato-i limfopoezy.

10. PIŚMIENNICTWO

1. Abrams C.S., Ellison N., Budzynski A.Z., Shattil S.J., "Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans" (1990) *Blood*, 75, 128-138
2. Andre P., Hartwell D., Hrachovinova I., i wsp.. "Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood" (2000) *PNAS*, 97, 13835-13840
3. Aupeix K., Hugel B., Martin T., i wsp. "The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection" (1997) *J.Clin.Invest.*, 99, 1546-1554
4. Barry O.P., FitzGerald G.A., "Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles" (1999a) *Thromb. Haemost.* 82, 794-800
5. Barry O.P., Kazanietz M.G., Pratico D., FitzGerald G.A., "Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway"(1999b) *J.Biol.Chem.* 274, 7545-7556
6. Barry O.P., Kazanietz M.G., Pratico D., FitzGerald G.A., "Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway" (1999c) *J. Biol. Chem.*, 274, 7545-7556
7. Barry O.P., Pratico D., Lawson J.A., FitzGerald G.A., "Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles" (1997) *J.Clin.Invest.* 99, 2118-2127
8. Barry O.P., Pratico D., Savani R.C., FitzGerald G.A., "Modulation of monocyte-endothelial cell interaction by platelet microparticles" (1998) *J.Clin.Invest.* 102, 136-144
9. Battinelli E., Willoughby S.R., Foxall T., Valri C.R., Loscalzo J., "Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide" (2001) *PNAS*, 98, 14458-63
10. Beaudoin A.R., Grondin G., "Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena" (1991) *Biochem.Biophys.Acta*, 1071, 203-219
11. Bode AP., Orton S.M., Frye M.J., Udis B.J., "Vesiculation of platelets during in vitro aging".(1991) *Blood*, 77, 887-95
12. Bombeli T., Schwartz B.R., Harlan J.M., "Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa – dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha v \beta 3$ integrin and GPIb?" (1998) *J. Exp.Med.* 187, 329-339
13. Boosalis M.S., Bandyopadhyay R., Bresnick E.H., Pace B.S., Van DeMark K., Zhang B., Faller D.V., Perrine S.P., "Short-chain fatty acid derivatives stimulate cell proliferation and induce STAT-5 activation" (2001) *Blood* 97, 3259-67
14. Borsig L., Wong R., Feramisco J., Nadeau D.R., Varki N.M., Varki A., "Heparin and cancer revisited :Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins and tumor metastasis" (2001) *PNAS*, 98, 3352-3357
15. Brash A.R. "Arachidonic acid as a bioactive molecule" (2001) *J.Clin.Invest.* 107, 1339-1345

16. Brunetti M., Martelli N., Manarini S., Mascetra N., Musiani P., Cerletti C., Aiello F.B., Evangelista V., "Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role of TGFbeta-1." (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 478-483
17. Castaman G., Yu-Feng L., Baattistin E., Rodeghiero F., "Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation" (1997) *Br.J.Haemat.* 96, 458-463
18. Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, i wsp.. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. (2000) *Blood*; 5:3702-3709
19. Chitambar C.R., Loebel A.L., Noble N.A., "Shedding of transferrin receptor from rat reticulocytes during maturation *in vitro*: soluble transferrin receptor is derived from receptor shed in vesicles" (1991) *Blood* 78, 2444-50
20. Cines DB, Pollak ES, Buck CA "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders". (1998) *Blood*. 91:3527-3561
21. Combes V., Simone A.C., Grau G.E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat-George F.. "In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant"(1999a). *Clin. Invest.* 104, 93-102
22. Cramer E.M., Norol F., Guichard J., Breton-Gorius J., Vainchenker W., Masse J.M., Debili N., "Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand" (1997), *Blood*, 89(7), 2336-46
23. De Bruijne-Admiraal L.G., Modderman P.W., i wsp.. "P-selectin mediates Ca²⁺ dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry" (1992) *Blood*, 80, 134-142
24. Dolo V., Ginestra A., Chersi G., Nagase H., Vittorelli M.L., "Human breast carcinoma cells cultured in the presence serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities" (1994), *J Submicrosc Cytol Pathol.* 26, 173-180
25. Dolo V., Ginestra A., Cassara D., Violini S., Lucania G., Torrisi M.R., Nagase H., Canevari S., Pavan A., Vittorelli M.L., "Selective lokalization of matrix metalloproteinase 9, betal integrins and human lymphocyte antigens class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells" (1998) *Cancer Res* 58, 4468-74
26. Dolo V., D'Ascenzo S., Violini S., Pompucci L., Festuccia C., Ginestra A., Vittorelli M.L., Canevari S., Pavan A., "Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro" (1999) *Clin. Exp. Metastasis.* 17, 131-4
27. Dvorak H.F., Quay S.C., Orestein N.S., Dvorak A.M., Hahn P., Bitzer A.M., "Tumor shedding and coagulation" (1981) *Science* 212, 923-4
28. Dvorak H.F., Van DeWater L., Bitzer A.M., Dvorak A.M., Anderson D., Harvey V.S., Bach R., Davis G.L., "Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by culture tumor cells" (1983) *Cancer Res* 43, 4434-42
29. English D., Garcia J.G.N., Brindley D.N., "Platelet-released phospholipids link haemostasis and angiogenesis" (2001), *Cardiovascular Res.*, 49, 588-599
30. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, Sawicki G, Wozniak M, Radomski MW, Davidge ST., "Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2." (1999) *Thromb. Haemost.* 82(6), 1730-5
31. Forlow S.B., McEver R.P., Nollert M.U., "Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow" (2000) *Blood*, 95, 1317-1323

32. Funakoshi S., Taub D.D., Anver M.R., Raziuddin A., Asai O., Reddy V., Rager H., Fanslow W.C., Longo D.L., "Immunologic and hematopoietic effects of CD40 stimulation after syngeneic bone marrow transplantation in mice" (1997) *J. Clin. Invest.* 3, 484-491
33. Gawaz M., Bogner C., "Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet-leukocyte interaction during hemodialysis" (1994) *Clin. Investig.* 72, 424-429
34. Gawaz M., Brand K., Dickfeld T., Pogatsa-Murray G., Page S., Bogner C., Koch W., Schomig A., Neuman F., „Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin – 1 dependent mechanism. Implications for atherogenesis." (2000) *Atherosclerosis* 148, 75-85
35. Gawaz M., Neumann F.J., Dickfeld T., i wsp., "Vitronectin receptor ($\alpha v\beta 3$) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells" (1997) *Circulation* 96, 1809-1818
36. Gemmell C.H., Ramirez S.M., Yeo E.L., Sefton M.V., "Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events" (1995) *J Lab Clin Med.* 125(2):276-87
37. Gemmell C.H., Sefton M.V., Yeo E.L., "Platelet-derived microparticles formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect." (1993) *J Biol Chem* 268, 14586-14589
38. Gemmell C.H., Yeo E.L., Sefton M.V., "Flow cytometric analysis of material-induced platelet activation in a canine model: elevated microparticle levels and reduced platelet life span." (1997) *J Biomed Mater Res.* 37(2):176-81.
39. George J.N., Thoi L.L. McManus L.M. Reimann T.A., "Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum" (1982), *Blood*, 60, 834-840
40. Giedrojć J., Klimiuk M., Janczarek B., Zabicki D., Kloczko J., „Interaction of platelets with monocytes with regard to arachidonic acid metabolites" (2000) *Przegl. Lek.* 57, 459-64
41. Gilbert G.E., Sims P.J., Wiedmer T., Furie B., Furie B.C., Shattil S.J., „Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII" (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 17261-17268
42. Ginestra A., Miceli D., Dolo V., Romano F.M., Vittorelli M.L., „Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker" (1999) *Anticancer Res.* 19, 3439-45
43. Harayama T., Ohuchi E., Aoki T., Sato H., Seiki M., Okada Y., „Shedding of membrane type 1 matrix metalloproteinase in a human breast carcinoma cell line" (1999) *Jpn J Cancer Res.* 90, 942-50
44. Heijnen H.F.G. , Schiel A.E., Fijnheer R. Geuze H.J., Sixma J.J., "Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules." (1999), *Blood*, 94, 3791-3799
45. Hejna M., Raderer M., Zielinski C.C., "Inhibition of metastasis by anticoagulant" (1999) *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 22-36
46. Henn V., Slupsky J.R., Grafe M., Anagnostopoulos I., Forster R., Muller-Berghaus G., Kroczyk R.A. "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells" (1998), *Nature*, 391, 591-4
47. Holme P.A. Orvim U., Hamers M.J.A.G., Solum N.O., Brosstad F.R., Barstad R.M., Sakariassen K.S., "Shear-induced platelet activation and platelet microparticle

- formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis”(1997), *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 17, 646-653
48. Holme P.A., Roger M., Solum N.O., Brosstad A.M., Hovig L.T., “Glycoprotein IIb-IIIa on platelet-derived microparticles, and microparticles structures studied by electron microscopy, confocal laser microscopy and crossed radio-immunoelectrophoresis” (1996) *Platelets*, 7, 207-214
 49. Holme P.A., Solum N.O., Brosstad F., Egberg N., Lindahl T.L., “Stimulated Glanzmann’s thrombasthenia platelets produce microvesicles” (1995), *Thromb. Haemost.* 74, 1533-1540
 50. Holme P.A., Solum N.O., Brosstad F., i wsp.. “Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting” (1994) *Thromb. Haemost.*, 72, 666-671
 51. Honczarenko M., Douglas R.S., Mathias C., Lee B., Ratajczak M.Z., Silberstein L.E., “SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells.(1999) *Blood*; 94(9):2990-8
 52. Honn K.V., Tang D.G., Crissman J.D. “Platelets and cancer metastasis” (1992) *Cancer and Metastasis Rev.* 11, 325
 53. Hughes M., Hayward C.P.M., Warkentin T.E., Horsewood P., Chorneyko K.A., Kelton J.G., “Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia” (2000), *Blood*, 96, 188-194
 54. Jakóbisziak M., (1995) „Immunologia”, Wydawnictwo Naukowe PWN
 55. Janowska-Wieczorek A., Majka M., Kijowski J., Baj-Krzyworzeka M., Reza R., Turner R., Ratajczak J., Kowalska M.A., Ratajczak M.Z., (2001) “Platelet-derived microparticles (PMPs) bind to hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) and enhance their engraftment” *Blood*. 2001, 98, 3143-9
 56. Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M., Horstman L.L., Ahn Y.S., “Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease”. (2001) *Br.J. Haematol.*, 112, 81-90
 57. Jy W., horstman L.L., Arce M., Ahn Y.S., “Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias” (1992), *J.Lab.Clin.Med.* 119, 331-2
 58. Jy W., Mao W., Horstman L.L., i wsp.. “Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro” (1995) *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 21, 217-231
 59. Korystow Y.N., Shaposhnikova V.V. Levitman M.Kh., Kudryavtsev A.A., Kublik L.N., Narimanow A.A., Orlova O.E., (1998) *FEBS Letters* 431, 224-226
 60. Kowalska M.A., Rao A.K., Disa J., “High concentrations of exogenous arachidonate inhibit calcium mobilization in platelets by stimulation of adenylate cyclase” (1988) *Biochem.J.*, 253, 255-262
 61. Kowalska M.A., Ratajczak M.Z., Majak M., Jin J., Kunapuli S., Brass L., Poncz M., “Stromal cell-derived factor –1 and macrophage-derived chemokine: 2 chemokines that activate platelets” (2000) *Blood*, 96, 50-57
 62. Laszik Z., Jansen P.J., Cummings R.D., i wsp.. “P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells” (1996) *Blood*, 88, 3010-3021

63. Lindemann S., Tolley N.D., Dixon D.A., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A., Weyrich A.S., "Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis" (2001) *JCB*, 154(3) 485-490
64. Lindenmeyer F., Legrand Y., Menashi S., "Upregulation of MMP-9 expression in MDA-MB231 tumor cells by platelet granular membrane". (1997) *FEBS Lett.*, 418, 19-22
65. Locati M., Zhou D., Luini W., Evangelista V., Mantovani A., Sozzani S., "Rapid induction of arachidonic acid release by monocyte chemotactic protein-1 and related chemokines" (1994) *J.Biol. Chem.* 269, 4746-4753
66. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P., "T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation" (1999) *Am J Pathol.* 154, 229-38
67. Mack M., Kleeinschmidt A., Bruhl H., i wsp.. "Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection" (2000) *Nature Medicine*, 6, 769-775
68. MacKenzie A., Wilson H.L. Kiss-Toth E., Dower S.K., North R.A., Surprenant A., "Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicles shedding" (2001) *Immunity* 15, 825-32
69. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ "Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner"(2001). *Blood* 97:3075-85
70. Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J, Kowalska M.A., Vilaire G., Pan Z.K., Honczarenko M., Marquez L.A., Poncz M., Ratajczak M.Z., "Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis" (2000e) *Blood*. 96, 4142-51
71. Majka M., Ratajczak J., Kowalska MA., Ratajczak MZ., "Binding of stromal derived factor-1alpha (SDF-1alpha) to CXCR4 chemokine receptor in normal human megakaryoblasts but not in platelets induces phosphorylation of mitogen-activated protein kinase p42/44 (MAPK), ELK-1 transcription factor and serine/threonine kinase AKT" (2000c) *Eur J Haematol.*64, 164-72
72. Majka M., Ratajczak J., Lee B., Honczarenko M., Douglas T., Kowalska M.A., Silberstein L., Gewirtz A.M., Ratajczak M.Z., "The role of HIV-related chemokine receptors and chemokines in human erythropoiesis in vitro". (2000d) *Stem Cells*. 18, 128-38
73. Majka M., Rozmysłowicz T, Ratajczak J., Dobrovsky A., Pietrzkowski Z., Gaulton GN., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak MZ., "The limited infectability by R5 HIV of CD34(+) cells from thymus, cord, and peripheral blood and bone marrow is explained by their ability to produce beta-chemokines".(2000a), *Exp Hematol* 28, 1334-42
74. Majka M., Rozmyslowicz T., Honczarenko M., Ratajczak J., Wasik M.A., Gaulton G.N., Ratajczak M.Z., „Biological significance of the expression of HIV-related chemokine coreceptors (CCR5 and CXCR4) and their ligands by human hematopoietic cell lined" (2000b) *Leukemia*, 14, 1821-32
75. Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg G., Freyssinet J.M., Tedgui A., "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes" (2000) *Circulation*, 101, 841-848

76. Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Freyssinet J.M., Tedgui A "Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity". (1999) *Circulation*, 99, 348-353
77. Maślanka K., „Przeciwciała skierowane przeciwko krwinkom płytkowym jako przyczyna małopłytkowości u ludzi” (1990) rozprawa habilitacyjna
78. Maślanka K., Walewska I., Scharf R., Michalewska B., Żupańska B., "Post-transfusion thrombocytopenic purpura associated with alloimmunization with Zw alpha (PIA1) platelet antigen" (1986) *Acta Haematol Pol.* 1, 744-55
79. Matzdorff Z.C., Kuhnel G., Kemkes-Matthes B., i wsp.. "Effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors on CD62P expression, platelet aggregates, and microparticles in vitro" (2000) *J.Lab.Clin.Med.*, 135, 247-255
80. McCarty O.J., Mousa S.A., Bray P.F., Konstantopoulos K. "Immobilized platelets support human coloncarcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesiom under dynamic flow conditions" (2000) *Blood*, 96, 1789-1797
81. Merten M., Pakala R., Thiagarajan P., "Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIa/IIIb –dependent mechanism" (1999) *Circulation*, 99, 2577-2582
82. Mesri M., Altieri D.C., "Endothelial cell activation by leukocyte microparticles" (1998) *J.Immunol.*, 161, 4382-4387
83. Mesri M., Altieri D.C., "Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway" (1999) *J. Biol.Chem.* 274, 23111-23118
84. Michelson A.D., Barnard M.R., Krueger L.A., i wsp.. "Evaluation of platelet function by flow cytometry" (2000a) *Methods*, 21, 259-270
85. Michelson A.D., Rajasekhar D., Bednarek F.J., Barnard M.R., "Platelet and platelet-derived microparticle surface factor V/Va binding in whole blood: differences between neonates and adults" (2000b) *Thromb. Haemost.*, 84, 689-694
86. Miyamoto S., Kowalska M.A., Marcinkiewicz C., i wsp.. "Interaction of leukocytes with platelet microparticles derived from outdated platelet concentrates" (1998) *Thromb.Haemost.*, 80 (6), 982-8
87. Miyazaki Y., Nomura S., Miyake T., i wsp.. "High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles" (1996) *Blood*, 88, 3456-3464
88. Morgenstern E. "Human platelet morphology/ultrastructure" w "Platelets and their function" (1997) ed. Franz von Bruchhausen and Ulrich Walter, Handb. Exp. Pharm. Vol 126, Spriger Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
89. Mosesson M.W., "Introduction:fibrinogen as a determinant of the metastatic potential of tumor cells" (2000) *Blood*, 96, 3301
90. Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., Barrera J.L. Mohar A., Verastegui E., Zlotnik A "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis". (2001) *Nature*, 410, 50-56
91. Naiyer A.J., Jo D.Y., Ahn J., Mohle R., Peichev M., Lam G., Silverstein R.L., Moore M.A.S., Rafii S., "Stromal derived factor-1- induced chemokinesis of cord blood CD34+ cells (long-term culture-initiating cells)through endothelial cells is mediated by E-selectin" (1999) *Blood*, 94, 4011-4019

92. Nieswandt B., Bergmeier W., Rackebandt K., i wsp.. "Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice" (2000) *Blood*, 96, 2520-2527
93. Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S., i wsp.. "Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis" (2000) *Blood*, 95, 930-935
94. Nijziel M., Van Oerle R., Van't Veer C., Van Pampus E., Lindhout T., Hamulyak K., "Tissue factor activity in human monocytes is regulated by plasma: implications for the high and low responder phenomenon" (2001) *Br.J. Haematol.*, 112, 98-104
95. Nomura S., Imamura A., Okuno M., i wsp.. "Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines" (2000a) *Thromb. Res.* 98, 257-268
96. Nomura S., Kagawa H., Ozaki Y., i wsp.. "Relationship between platelet activation and cytokines in systemic inflammatory response syndrome patients with hematological malignancies" (1999) *Thromb. Res.* 95, 205-213
97. Nomura S., Nakamura T., Cone J., i wsp.. "Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation" (2000b) *Cytometry*, 40, 173-181
98. Nomura S., Okamae F., Abe M., Hosokawa M., Yamaoka M., Ohtani T., Onishi S., Matsuzaki T., Teraoka A., Ishida T., Fukuhara S., "Platelets expressing P-selectin and platelet-derived microparticles in stored platelet concentrates bind to PSGL-1 on filtrated leukocytes" (2000c) *Clin Appl Thromb Hemost.* 6, 213-221
99. Nomura S., Suzuki m., Katsura K., i wsp.. "Platelet derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus" (1995) *Atherosclerosis.* 116. 235-240
100. Nomura S., Suzuki M., Kido H., Yamaguchi K., Fukuroi T., Yanabu M., Soga T., Nagata H., Kokawa T., Yasunaga K., "Differences between platelet and microparticle glycoprotein IIb/IIIa" (1992) *Cytometry*, 13, 621-629
101. Osumi K., Ozeki Y., Saito S., Nagamura Y., Ito H., Kimura Y., Ogura H., Nomura S., "Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles" (2001) *Thromb Haemost* 85, 326-330
102. Palumbo J.D., Kombrinck K.W., Drew A.F., i wsp.. "Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells" (2000) *Blood*, 96, 3302-3309
103. Pasquet J.M., Dachary-Prigent J., Nurden A.T., "Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets" (1996a) *Eur.J.Biochem.* 239, 647-654
104. Pasquet J.M., Toti F., Nurden A.T., Dachary-Prigent J., "Procoagulant activity and active calpain in platelet-derived microparticles" (1996b), *Thrombosis Research*, 82, 509-522
105. Petersen F., Bock L., Flad H.D., Brandt E., "Platelet factor-4 induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8" (1999) *Blood* 12, 4020-4028
106. Rajasekhar D., Barnard M.R., Bednarek F.J., Michelson A.D., "Platelet hyporeactivity in very low birth weight neonates" (1997) *Thromb. Haemost.* 77, 1002-1007
107. Rajasekhar D., Kestin A.S., Bednarek F.J., Ellis P.A., Barnard M.R., Michelson A.D., "Neonatal platelets are less reactive than adult platelets to physiological agonists in whole blood" (1994) *Thromb Haemost.* 72(6), 957-63

108. Ratajczak J., Machaliński B., Samuel A., Pertusini E., Majka M., Czajka R., Ratajczak MZ "A novel serum free system for cloning human megakaryocytic progenitors (CFU-Meg). The role of thrombopoietin and other cytokines on bone marrow and cord blood CFU-Meg growth under serum free conditions".(1998a) *Folia Histochem Cytobiol.*; 36, 61-6
109. Ratajczak J., Marlicz W., Machaliński B., Pertusini E., Czajka R., Ratajczak MZ "An improved serum free system for cloning human "pure" erythroid colonies. The role of different growth factors and cytokines on BFU-E formation by the bone marrow and cord blood CD34+ cells". (1998b) *Folia Histochem Cytobiol*;36, 55-60
110. Ratajczak J., Zhang Q., Pertusini E., Wojczyk B.S., Wasik MA., Ratajczak M.Z., "The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions--comparison to other cytokines and growth factors".(1998c) *Leukemia*. 12(3):371-81
111. Rauch U., Bondermann B., Bohrmann B., Badimon J.J., Himer J., Riederer M.A., Nemerson Y., "Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor". (2000). *Blood*, 96, 170-175
112. Rizzo M.T., Regazzi E., Garau D., Akard L., Dugan M., Boswell H.S., Rizzoli V., Carlo-Stella C., "Induction of apoptosis by arachidonic acid in chronic myeloid leukemia cells" (1999) *Cancer Research* 59, 5047-5053
113. Roberts P.J., Mollapour E., Watts M.J., Linch D.C., "Primitive myeloid cells express high levels of phospholipase A2 activity in the absence of leukotriene release:selective regulation by stem cell factor involving the MAP Kinase pathway" (1999) *Blood*, 94, 1261-1272
114. Ruf A., Frojmovic M.M., Patscheke H., "Platelet aggregation" w "Platelets and their function" (1997)ed. Franz von Bruchhausen and Ulrich Walter, Handb. Exp. Pharm. Vol 126, Spriger Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
115. Sala A., Zarini S., Bolla M., "Leukotrienes:lipid bioeffectors of inflammatory reactions" (1998) *Biochemistry*, 63, 84-92
116. Satta N., Toti F., Feugeas O., "Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide" (1994) *J.Immunol.*, 153, 3245-3255
117. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. "CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells" (2000) *Am. J.Pathol.* 156(1), 7-14
118. Sheridan D., Carter C., Kelton J.G., "A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia" (1986) *Blood* 67, 27-30
119. Siljander P., Carpen O., Lassila R., "Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis" (1996), *Blood* 87, 4651-63
120. Simon D.I., Chen Z., Xu H Li C., Dong J., McIntire L.V., Ballantyne C.M., Zhang L., Furman M.I. "Platelet glycoprotein Ib_α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)" (2000), *J.Exp.Med.*, 192, 193-204
121. Slupsky J.R., Kalbas M., Willuweit A., Henn V., Krocze R.A., MullerBerghaus G., "Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40" (1998) *Thromb. Haemost.*, 80, 1008-14
122. Tans G., Rosing J., Thomassen M.C., i wsp.. "Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet- derived microparticles" (1991) *Blood*, 77, 2641-2648

123. Taraboletti G., D'Ascenzo S., Borsotti P., Giavazzi R., Pavan A., Dolo V., "Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells" (2002) *Am. J. Pathol.* 160, 673-80
124. Triggiani M., Oriente A., Seeds M.C., Bass D.A., Marone G., Chilton F.H., "Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool." (1995) *J.Exp. Med.* 182, 1181-1190
125. Tzima E., Walker J.H., "Platelet annexin V: the ins and outs" (2000) *Platelets*, 11, 245-251
126. Uhrynowska M., Żupańska B., "Platelet-specific antibodies in transfused patients"(1996) *Eur J Haematol.* 56,248-51
127. Verheul H.W., Jorna A.S., Hoekman K., Broxterman H.J., Gebbink M., Pinedo H.M "Vascular endothelial growth factor- stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets" .(2000) *Blood* 96, 4216-4221
128. Wada H., Wakita Y., Shiku H., „Tissue factor expression in endothelial cells in health and disease"(1995) *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 6, S26-31
129. Warkentin T.E., Hayward C.P., Boshkov L.K., "Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia" (1994) *Blood*, 84, 3691-3699
130. Weber A., Koppen H.O., Schror K., "Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism" (2000), *Thromb. Res.* 98, 461-466
131. Wolf P., "The nature and significance of platelet products in human plasma." (1967) *Br.J.Haematol.* 13, 269-88
132. Wolfers J., Lozier A., Raposo G, Regnault A., Thery C., Amigorena S., Zitvogel L.,"Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming" (2001) *Nature Med.* 7(3):297-303
133. XieG.L., Nomura S., Fukuhara S., „Anexinn V expression and membrane vesiculation during activation of leukemic cell lines" (1997) *Haemostasis* 27, 259-268
134. Yang J., Furie B.C., Furie B., "The biology of P-selectin glycoprotein ligands-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interacton" (1999) *Thromb. Haemost.* 81, 1-7
135. Yatomi Y., Ruan F., Hakomori S., Igarashi Y., "Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets" (1995) *Blood*, 86, 193-202
136. Zhang Y., Deng Y., Luther T., i wsp. "Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice" (1994) *J.Clin. Invest.* 94, 1320-1327
137. Zucker S., Mirza H., ner C.E., Lorenz A.F., Drews M.H., Bahou W.F., Jesty J., "Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells:conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation" (1998) *Int. J. Cancer* 75, 780-786
138. Zwaal R.F.A., Schroit A.J., "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells" (1997) *Blood*, 89, 1121-1132

11. RYCINY I TABELE

Ryc. 1. Ocena cytofluorymetryczna PMB uzyskanych z płytek krwi obwodowej w wyniku stymulacji trombiną (2U/ml).

Ryc. 2. Ocena MB w nadsączach uzyskanych z hodowli *in vitro* rosnących ekspotencjalnie komórek ludzkich linii raka jelita grubego (DeTa), trzustki (HPC) i płuc (A549, HTB 177, CRL 2062 oraz CRL 2066).

Ryc. 3. Różne możliwości oddziaływania PMB na komórki docelowe i ich znaczenie w fizjologii i patologii.

Ryc. 4. Kinetyka odnowy parametrów krwi obwodowej u zwierząt poddanych przeszczepom krwiotwórczym.

Ryc. 5. Wzrost kolonii erytroidalnych (A), mieloidalnych (B) i megakariocytowych (C) przez klonowane w metylocelulozie wczesne komórki hematopoetyczne szpiku kostnego posiadające ekspresję antygenu CD34.

Ryc 6. Ekspresja markerów płytkowych na powierzchni PMB uzyskanych za pomocą różnych stymulacji.

Ryc. 7. Fenotyp PMB uzyskiwanych za pomocą stymulacji trombiną (PMBt), trombiną + kolagenem (PMB t/c), jonoforem wapnia A23187 (PMB A23187) oraz poprzez sonifikację (PMBs).

Ryc. 8. Ekspresja CD95, CD95L, TNF-RI, TNF-RII oraz molekuł adhezyjnych VLA-4 i VLA-5 na PMB indukowanych trombiną.

Ryc. 9. Ekspresja RANTES w płytkach krwi i PMB.

Ryc. 10. Ekspresja MMP-9 w PMB.

Ryc 11. Ekspresja CD41, CD62 i CXCR4 na ludzkich komórkach:hematopoetycznych.

Ryc. 12. Komórki PB-1 inkubowane z PMB znakowanymi anty CD41-PE.

Ryc.13. - Ekspresja TF- mRNA w liniach komórkowych.

Ryc.14. Fenotyp MB uzyskanych z nadsączy hodowlanych: komórek CD34⁺, erytroblastów, megakaryoblastów oraz mieloblastów.

Ryc. 15. Wpływ PMB na przyleganie wybranych ludzkich linii hemato/limfopoetycznych do fibrynogenu.

Ryc. 16. Przyleganie komórek CD34⁺ opłaszczonych lub nie na PMB/płytkami krwi do śródbłonna (HUVEC) oraz do płytek hodowlanych pokrytych SDF-1β.

Ryc 17. Wpływ PMB na ekspresję aktywnej kaspazy-3 w komórkach ustalonych linii.

Ryc. 18. Wpływ PMB na proliferację/przeżywalność komórek CD34⁺ oraz ustalonych linii komórkowych.

Ryc. 19. Wpływ PMB (30µg/ml) na przeżywalność i klonogenność progenitorowych komórek CD34⁺.

Ryc. 20. Wpływ PMB na tworzenie kolonii przez hemato/limfopoetyczne linie komórkowe hodowane w metylocelulozie.

Ryc. 21 Chemotaksja komórek wybranych linii hemato/limfopoetycznych do PMB (30µg/ml).

Ryc 22. Chemotaksja wybranych linii komórkowych (YT, PB-1, Jurkat) do wzrastających stężeń PMB (2-60µg/ml).

Ryc 23. Obraz mikroskopowy chemotaksji wybranych linii komórkowych do PMB lub medium kontrolnego.

Ryc.24. Chemotaksja wybranych linii komórkowych do PMB, suboptymalnej dawki SDF-1 oraz PMB + suboptymalnej dawki SDF-1.

Ryc 25. Chemotaksja komórek CD34⁺ do PMB, SDF-1 oraz PMB +SDF-1.

Ryc 26. Chemotaksja komórek jednojądrzastych szpiku kostnego do PMB.

Ryc 27. Aktywacja szlaków przekazu sygnału w komórkach CD34 oraz ustalonych liniach komórkowych po stymulacji PMB.

Tabela 1. Ekspresja wybranych białek powierzchniowych pochodzenia płytkowego po inkubacji normalnych komórek hematopoetycznych z PMB.

Tabela 2. Oplaszczanie wybranych linii hemato/limfopoetycznych przez PMB.

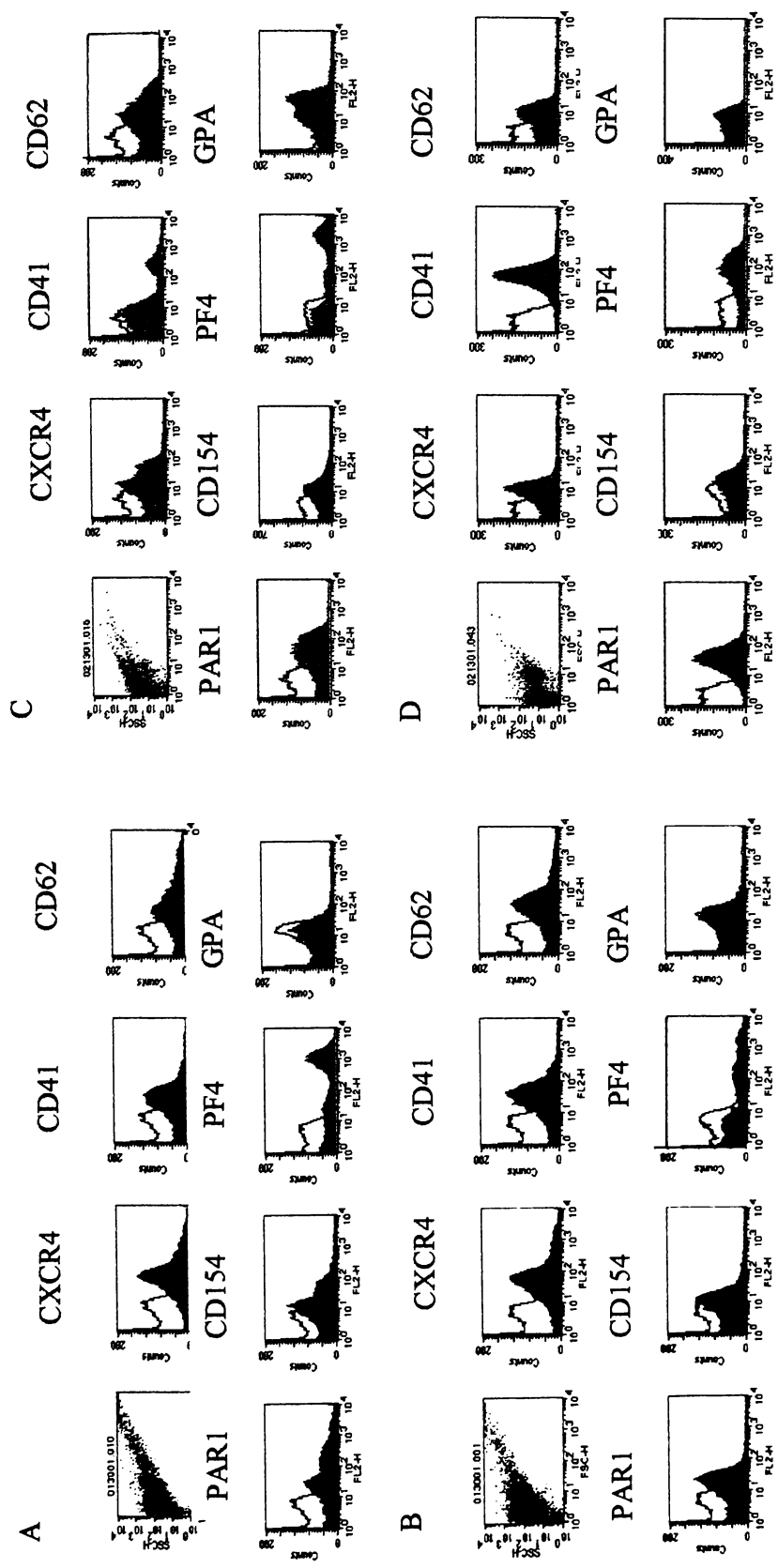
Tabela 3. Ekspresja CD162 i Mac-1 na komórkach hemato/limfopoetycznych których oplaszczanie przez PMB oceniano w Tabeli 2 i 3.

Tabela 4. Ekspresja wybranych białek powierzchniowych pochodzenia płytkowego po inkubacji komórek linii nowotworowych z PMB.

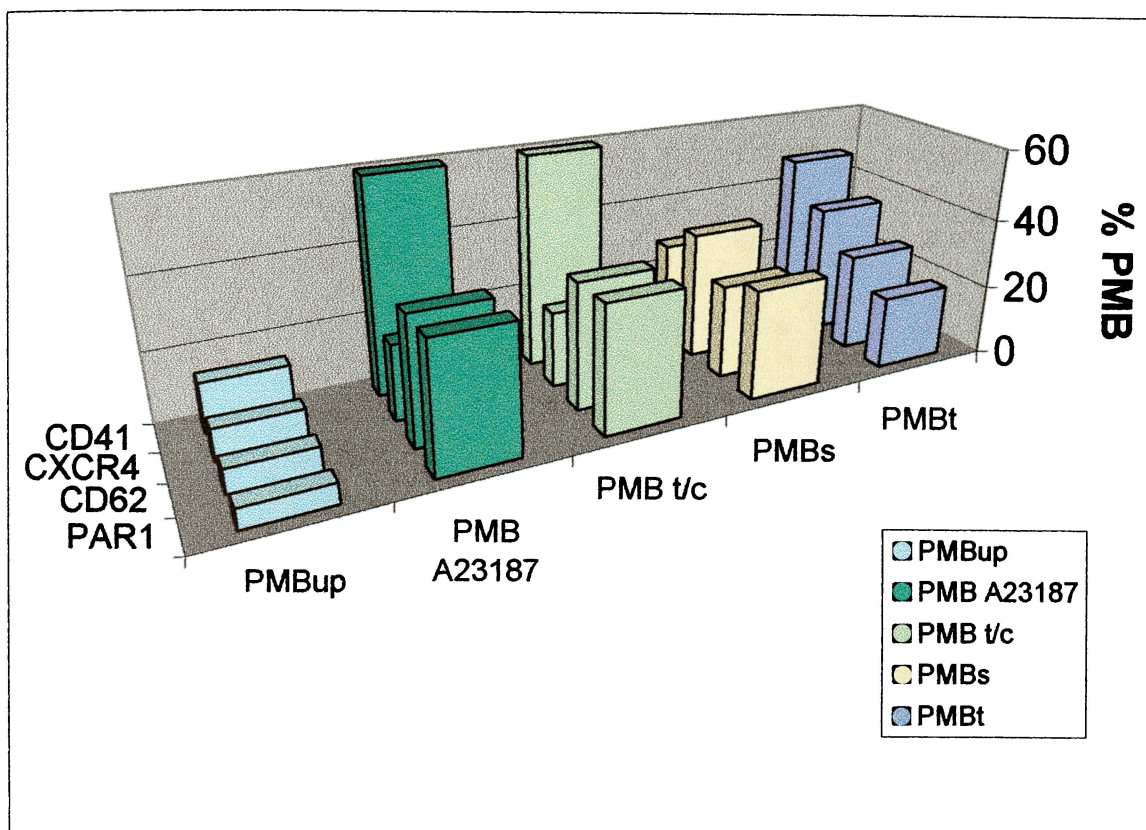
Tabela 5. Fosforylacja białek biorących udział w przekazie sygnału w komórkach stymulowanych PMB.

Tabela 6.Wpływ modyfikacji PMB na aktywność chemotaktyczną linii komórkowych PB-1 i YT.

Tabela 7. Chemotaksja wybranych linii komórkowych do potencjalnych składników PMB.

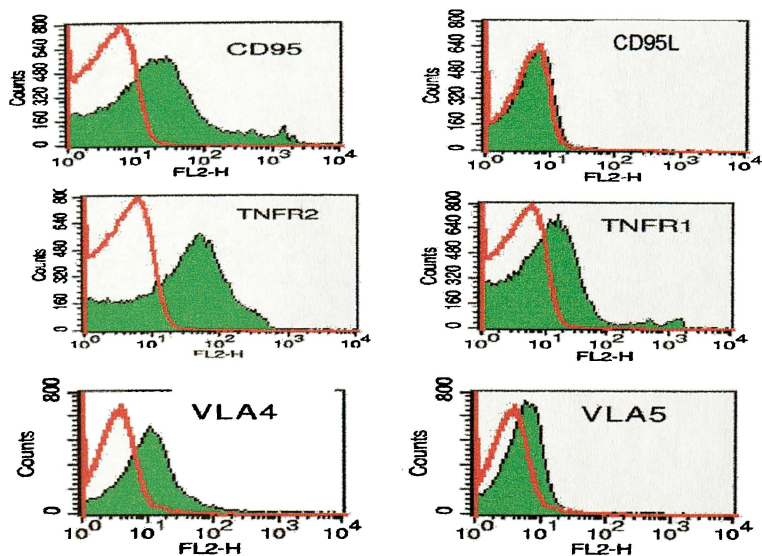


Ryc 6. Ekspresja markerów płytkowych na powierzchni PMB uzyskanych za pomocą różnych stymulacji. **A** - trombiną, **B** - trombiną i kolagenem, **C** – za pomocą sonifikacji, **D** – stymulacji jonoforem wapnia A23187. Czerwona linia oznacza kontrolę izotypową. Przedstawiono wynik jednego reprezentatywnego eksperymentu z dziesięciu wykonanych.

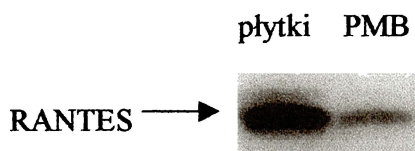


Ryc. 7. Fenotyp PMB uzyskiwanych za pomocą stymulacji trombiną (PMBt), trombiną + kolagenem (PMB t/c), jonoforem wapnia A23187 (PMB A23187) oraz poprzez sonifikację (PMBs).

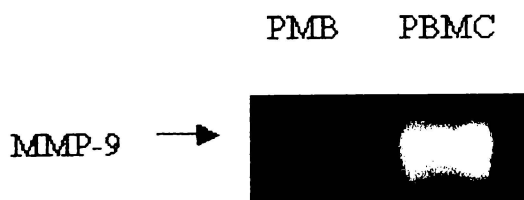
Na rycinie przedstawiono odsetek PMB, które w badaniu cytofluorymetrycznym wykazywały ekspresję CD41, CXCR4, CD62, PAR1. Na rycinie przedstawiono również dane dotyczące fenotypu PMB uzyskanych z nadsączów tzw. przeterminowanych preparatów płytkowych (PMB up). Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z 10 niezależnych eksperymentów. Istotne statystycznie różnice w ekspresji markerów płytkowych zaobserwowano pomiędzy PMBup a pozostałymi PMB ($p < 0,01$)



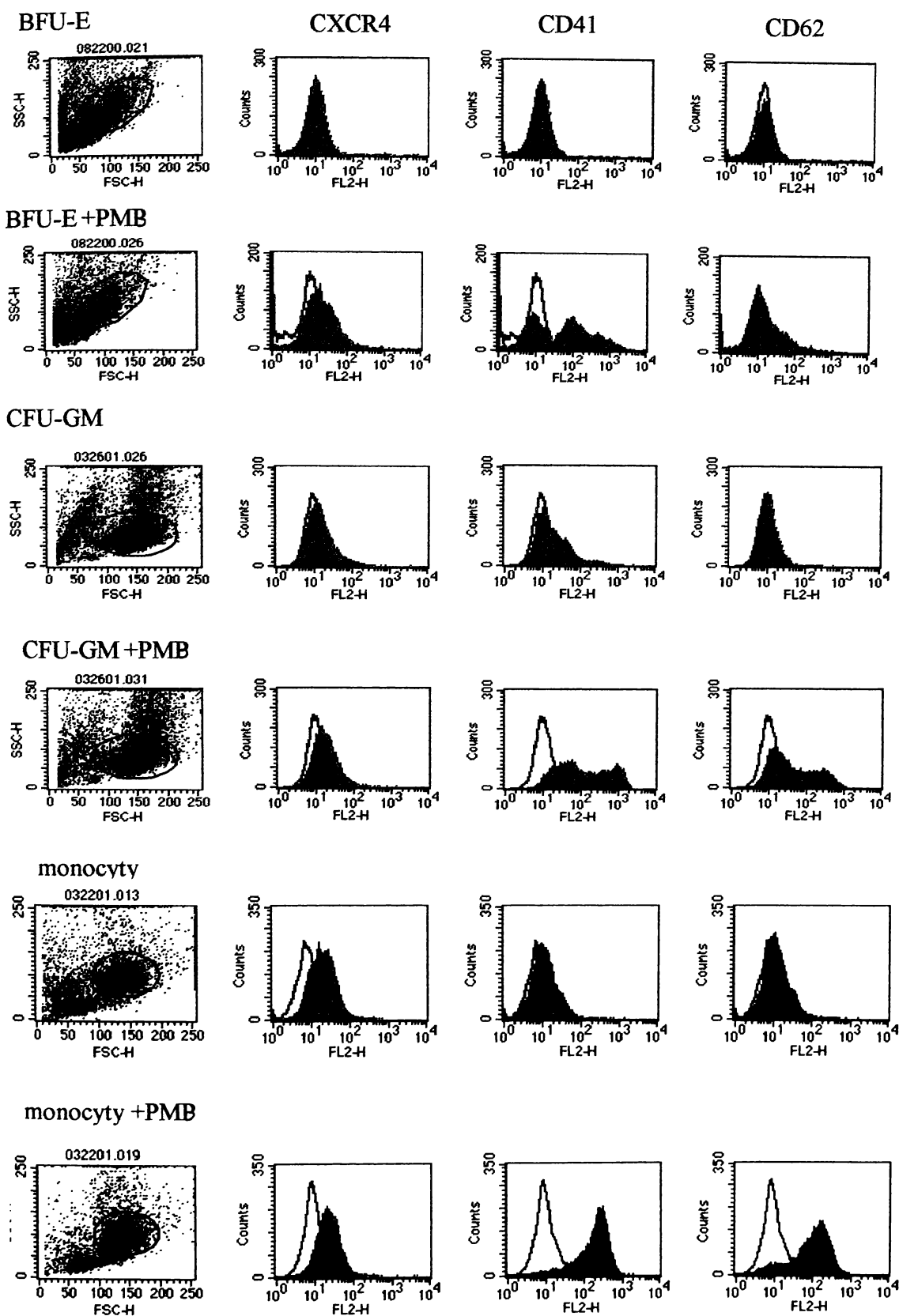
Ryc. 8. Ekspresja CD95, CD95L, TNF-RI, TNF-II oraz molekuł adhezyjnych VLA-4 i VLA-5 na PMB indukowanych trombiną.



Ryc. 9. Ekspresja RANTES w płytkach krwi i PMB (20 μ g białka) oceniana metodą Western Blot.

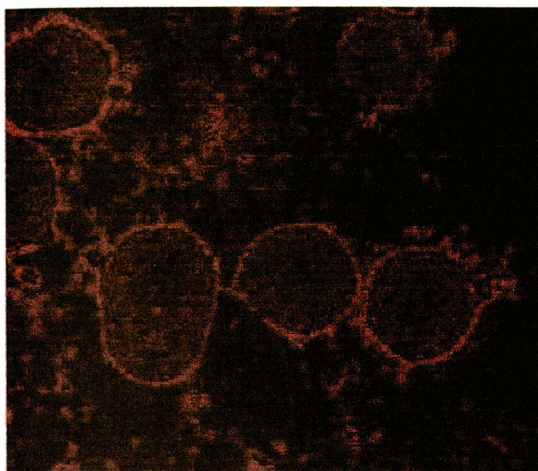
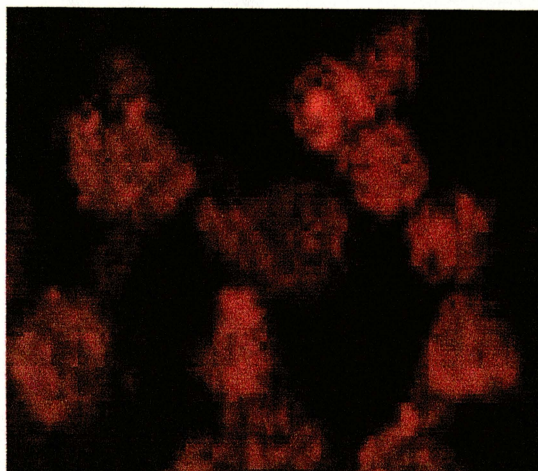


Ryc. 10. Ekspresja MMP-9 w PMB. Jako kontrolę dodatnią użyto białko izolowane z leukocytów krwi obwodowej (PBMC). Badanie przeprowadzono metodą zymografii.



Ryc 11. Ekspresja CD41, CD62 i CXCR4 na ludzkich komórkach hematopoetycznych.

A - erytroblastach uzyskanych z rosnących in vitro BFU-E, **B** - mieloblastach uzyskanych z rosnących in vitro CFU-GM oraz **C** - monocytach izolowanych z krwi obwodowej. Rycina przedstawia wynik reprezentatywnego eksperymentu (n=3).

A**B**

Ryc. 12. Komórki PB-1 inkubowane z PMB znakowanymi anty CD41-PE

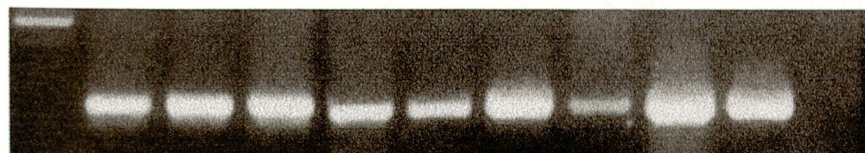
A – inkubacja przez 30 minut, **B** –inkubacja przez 72 godziny. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



TF ((283bp)

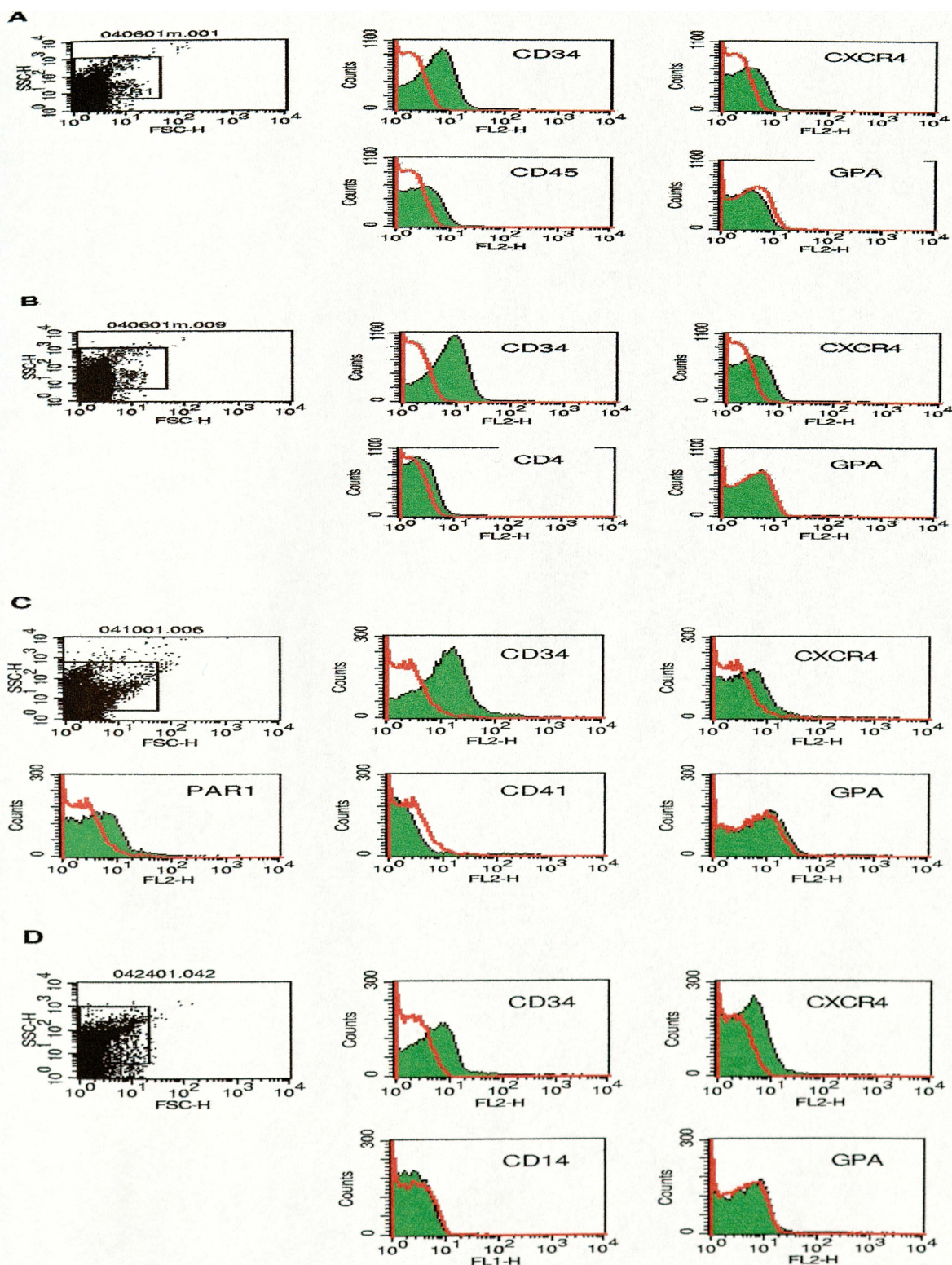
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



TF (283bp)

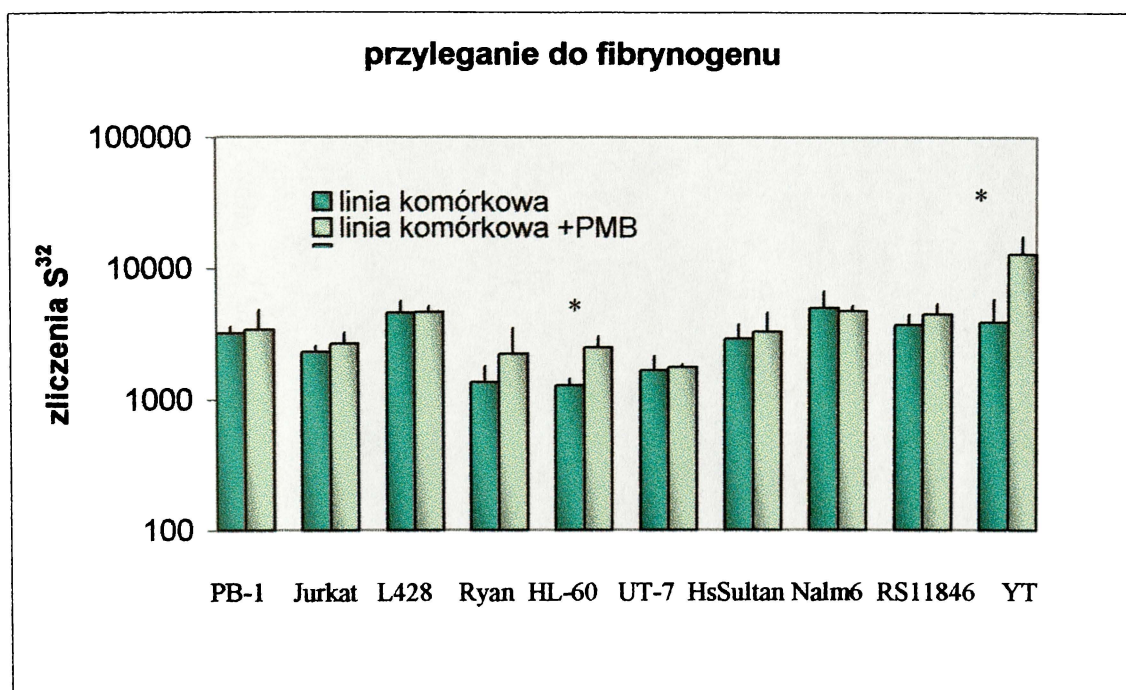
Ryc.13. - Ekspresja TF- mRNA w liniach komórkowych.

A –linie komórkowe hemato/limfopoetyczne: 1-YT, 2-PB-1, 3-UT-7, 4-Jurkat, 5-NALM, 6-HsSultan, 7-RS11846, 8-L428, 10-Ryan, 11-HL-60 oraz **B** - linie komórkowe pochodzące z guzów litych - 1- T47D, 2-HTB22, 3-WM278, 4-WM39, 5-WM451, 6-SBCI-2, 7-HTB140, 8-HTB26, 9 –WM164. Kontrole negatywne oznaczono 9 (**A**) i 10 (**B**).

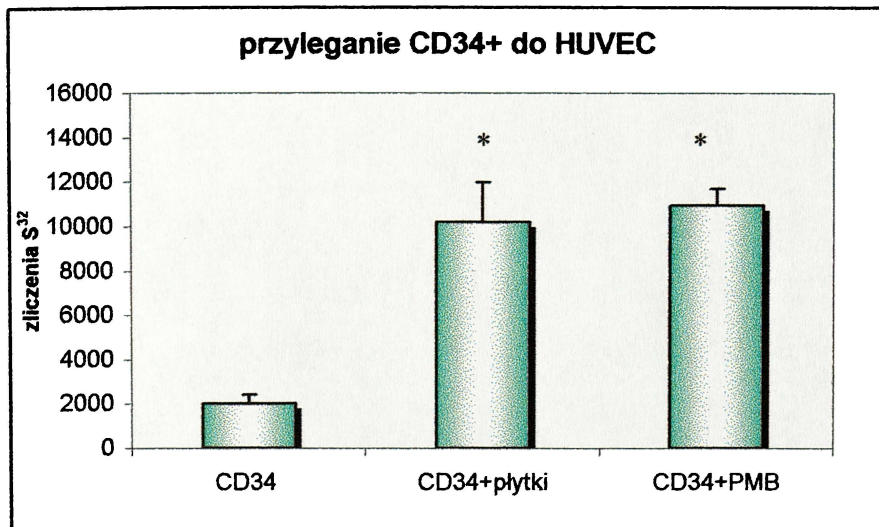
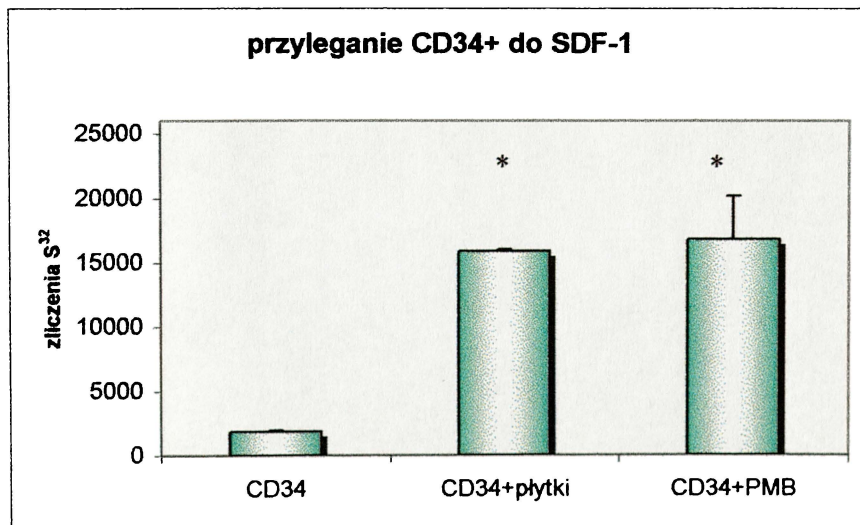


Ryc.14. Fenotyp MB uzyskanych z nadszycy hodowlanych.

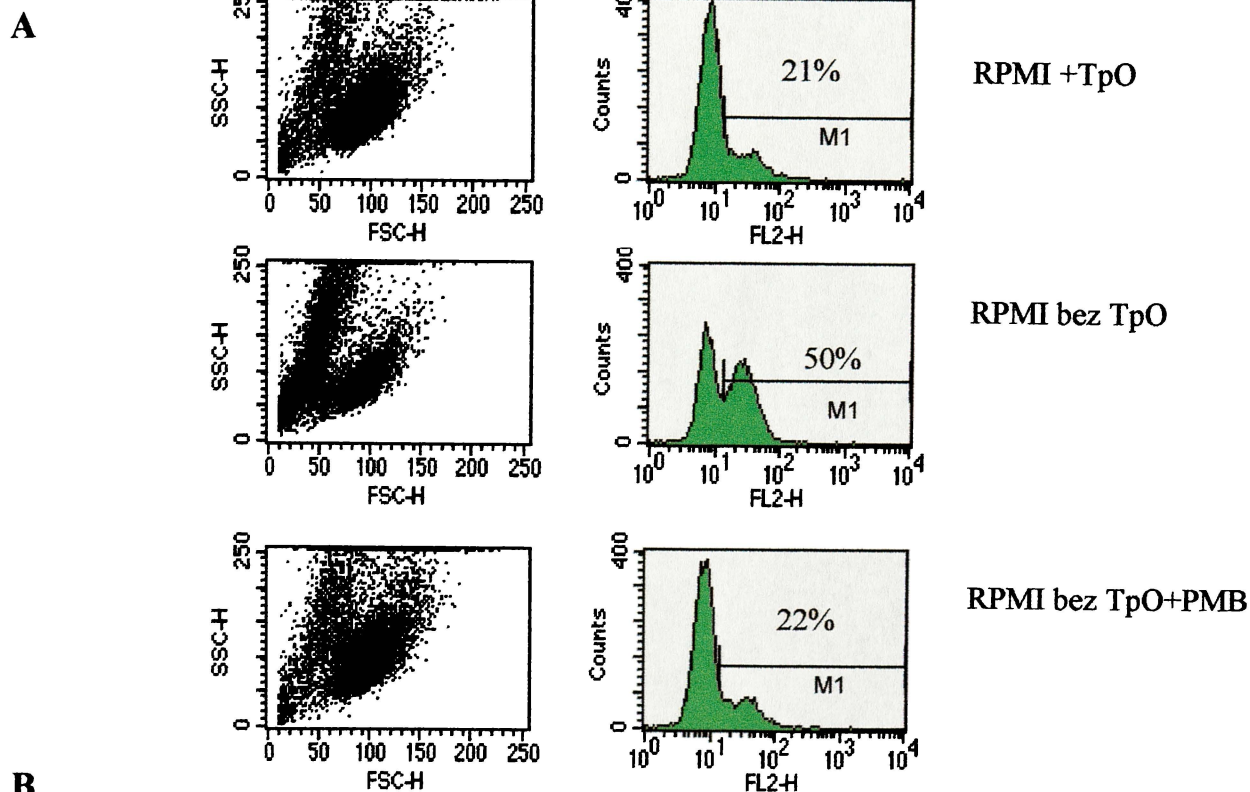
A –komórek CD34⁺, **B** - pochodzących z ekspansji *in vitro* erytroblastów, **C** - pochodzących z ekspansji *in vitro* megakaryoblastów, **D** - pochodzących z ekspansji *in vitro* mieloblastów. Badanie wykonano trzykrotnie uzyskując zbliżone wyniki.



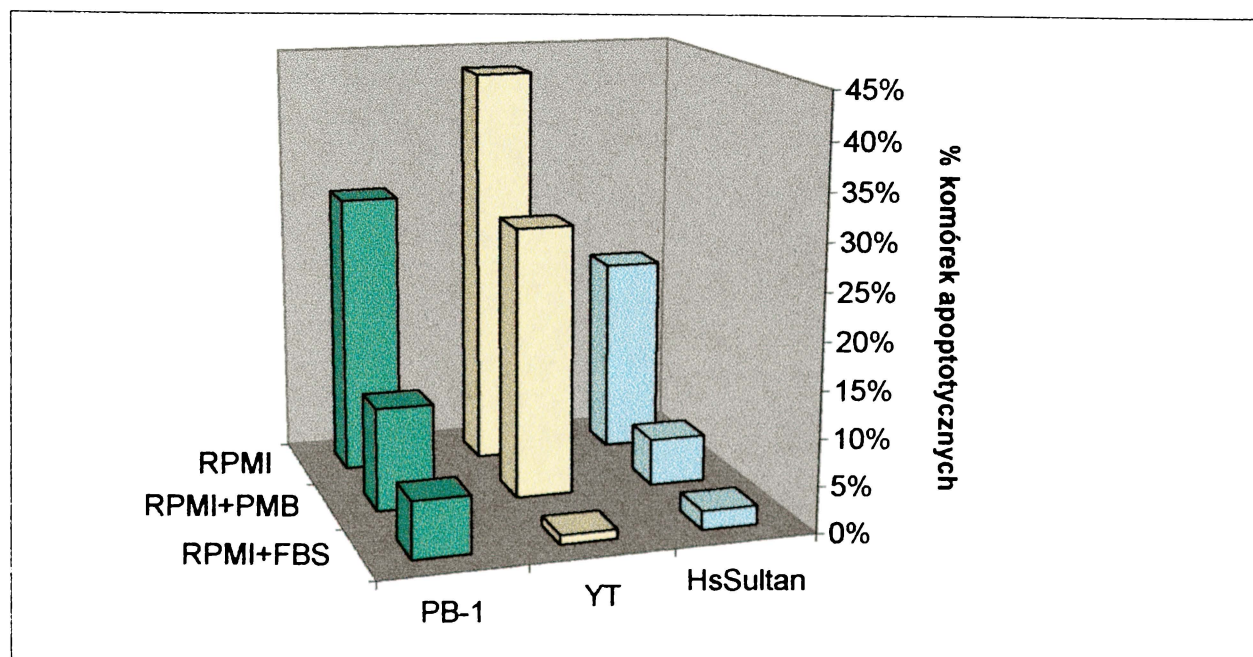
Ryc. 15. Wpływ PMB na przyleganie wybranych ludzkich linii hemato/limfopoetycznych do fibrynogenu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ($\pm$ SD) z czterech niezależnie wykonanych eksperymentów. Symbolem * oznaczono istotność statystyczną ($p < 0,01$). Zliczenia S^{32} przedstawiono w skali logarytmicznej.

A**B**

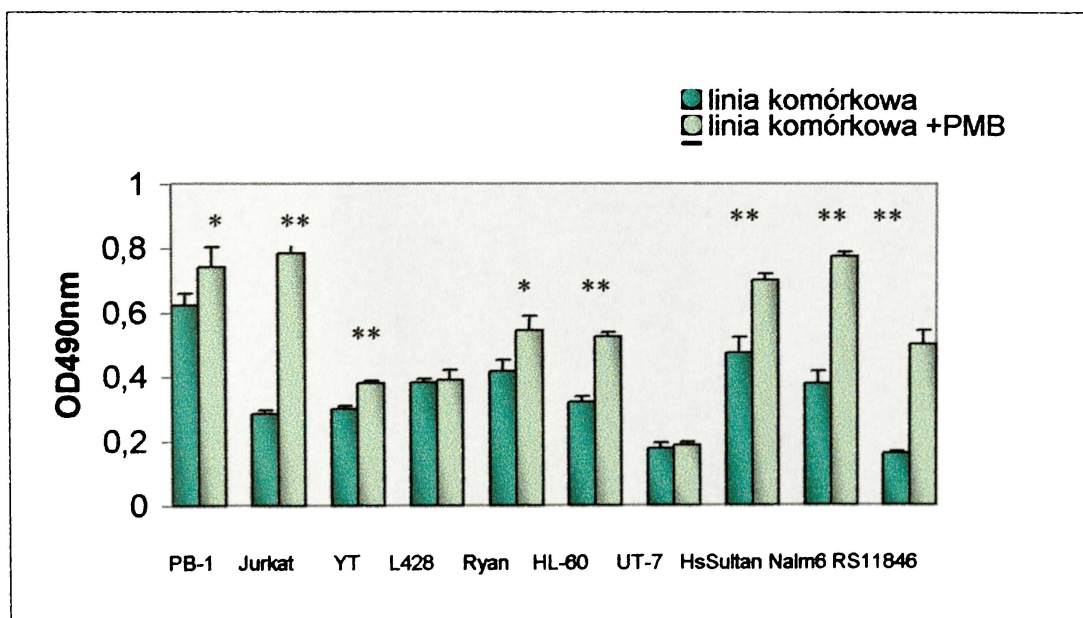
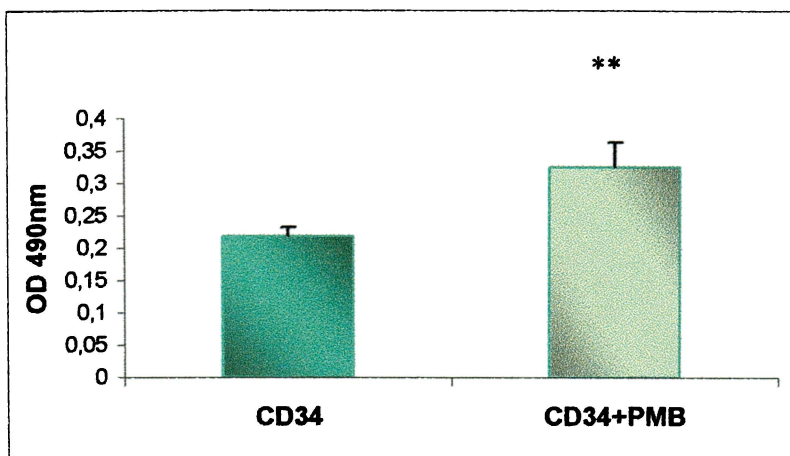
Ryc. 16. Przyleganie komórek CD34⁺ opłaszczonych lub nie na PMB/plytkami krwi do śródbłónka (HUVEC) oraz do płytek hodowlanych pokrytych SDF-1 β (A) płytki hodowlane pokryte HUVEC, (B). płytek hodowlanych pokrytych SDF-1 β Symbolem * oznaczono istotność statystyczną ($p < 0,0001$). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną z dwóch niezależnych eksperymentów wykonanych w 6 powtórzeniach ($\pm$ SD)



B

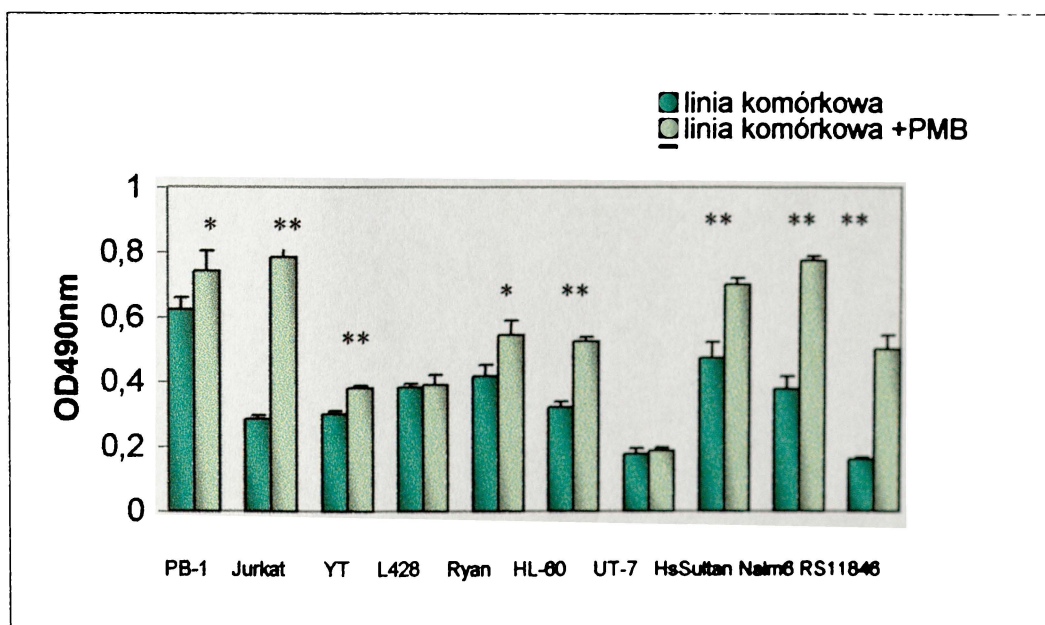
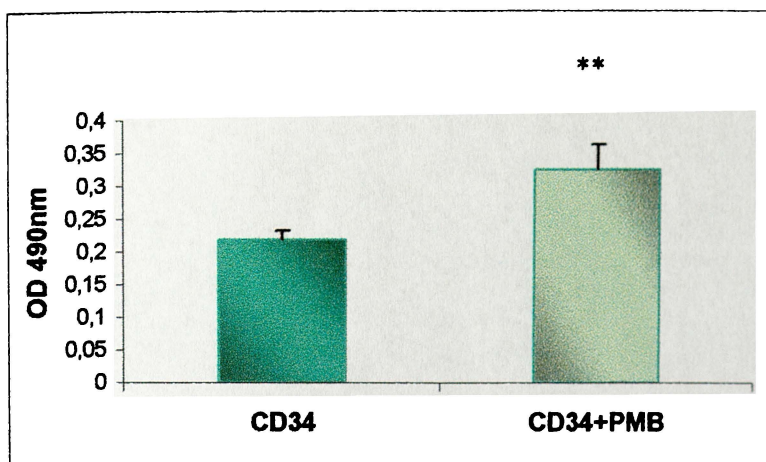


Ryc 17. Wpływ PMB na ekspresję aktywnej kaspazy-3 w komórkach ustalonych linii.
A – komórki UT-7(TpO) hodowano w RPMI z 10%FBS zawierającym TpO lub RPMI z 10%FBS bez TpO oraz w RPMI z 10%FBS bez TpO, w obecności PMB (30µg/ml), **B**-odsetek komórek linii PB-1, YT, HsSultan wykazujących aktywność kaspazy –3 w zależności od warunków prowadzonej hodowli (RPMI z 10% FBS, RPMI oraz RPMI wzbogacony w PMB, 30µg/ml). Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z trzech niezależnych eksperymentów.



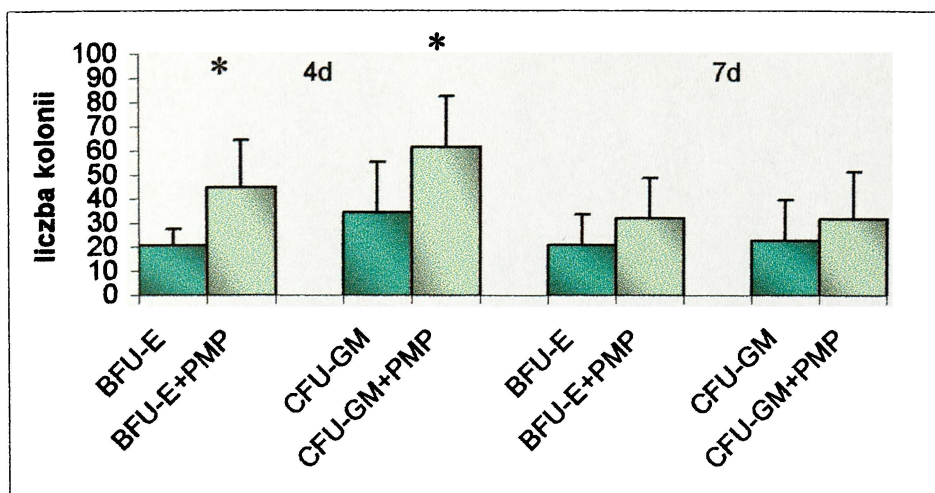
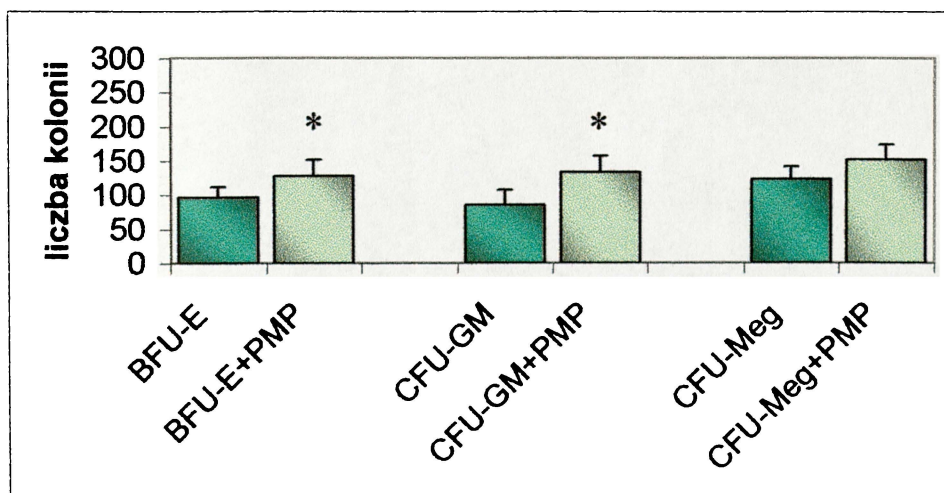
Ryc. 18. Wpływ PMB na proliferację/przeżywalność komórek CD34⁺ oraz ustalonych linii komórkowych.

(A) komórki CD34⁺ (B). wybrane ustalone linie hematopoetyczne Proliferację /przeżywalność oceniano testem kolorymetrycznym (MTT). Symbolem ** oznaczono różnice istotne statystycznie $p < 0,0001$, symbolem* oznaczono $p < 0,003$. Wyniki przedstawiono jako średnie ($\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów prowadzonych w 6 powtórzeniach każdy.



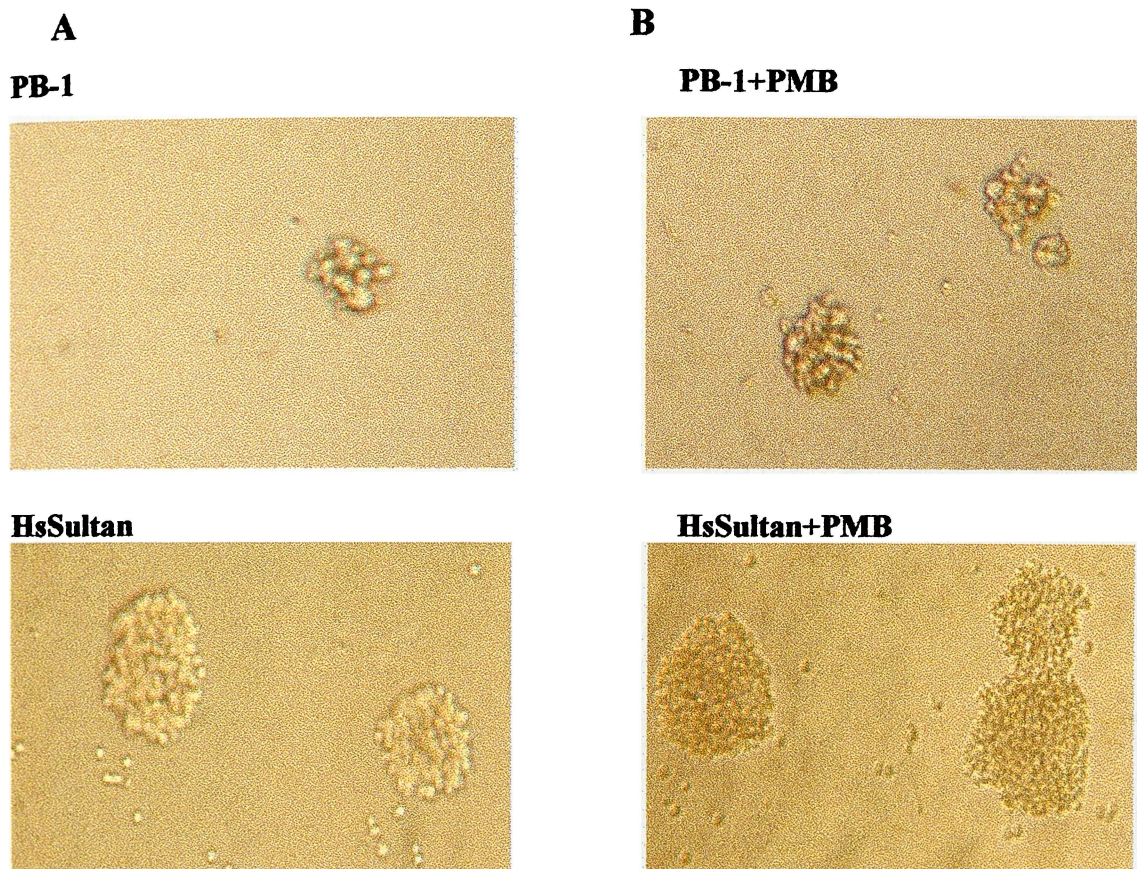
Ryc. 18. Wpływ PMB na proliferację/przeżywalność komórek CD34⁺ oraz ustalonych linii komórkowych.

(A) komórki CD34⁺ (B). wybrane ustalone linie hematopoetyczne Proliferację/przeżywalność oceniano testem kolorymetrycznym (MTT). Symbolem ** oznaczono różnice istotne statystycznie $p < 0,0001$, symbolem* oznaczono $p < 0,003$ Wyniki przedstawiono jako średnie ($\pm$ SD) z trzech niezależnych eksperymentów prowadzonych w 6 powtórzeniach każdy.

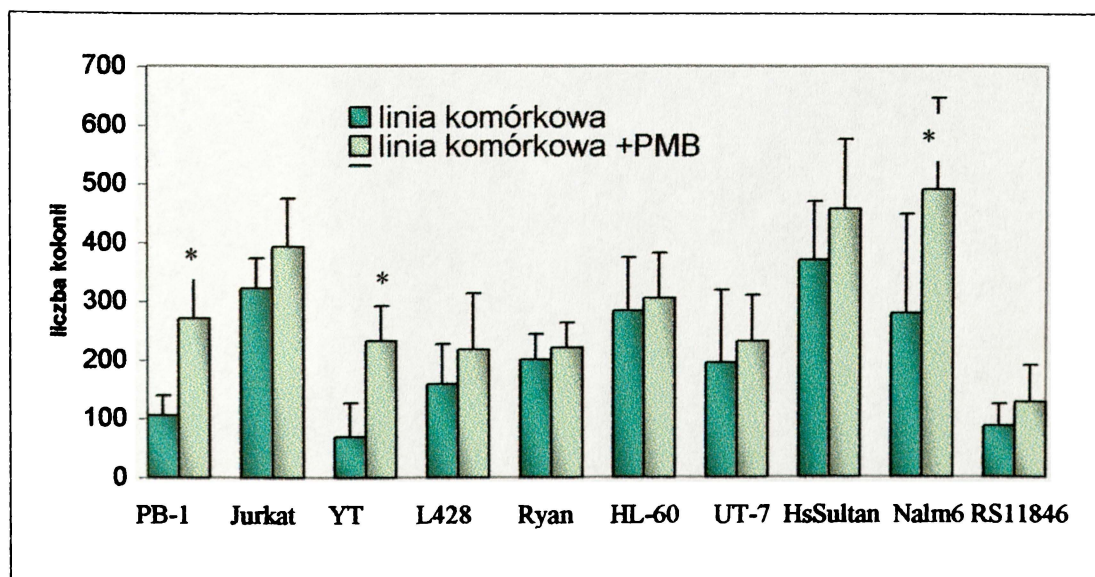
A**B**

Ryc. 19. Wpływ PMB (30µg/ml) na przeżywalność i klonogenność progenitorowych komórek CD34⁺

A – komórki CD34 hodowano bez czynników wzrostowych przez 4 lub 7 dni (4d lub 7d) w obecności lub bez PMB. Po tym czasie dodawano liniowo specyficzne czynniki wzrostowe i liczono liczbę kolonii. **B** – komórki progenitorowe CD34⁺ stymulowano do wzrostu klonalnego za pomocą ¼ optymalnej dawki czynników wzrostowych w obecności lub bez PMB. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne liczby kolonii uzyskanych w dwóch niezależnych eksperymentach prowadzonych w 6 powtórzeniach. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (**A**: dla BFU-E $p < 0,002$, dla CFU-GM $p < 0,005$, **B** dla BFU-E $p < 0,001$, dla CFU-GM $p < 0,0001$)



C

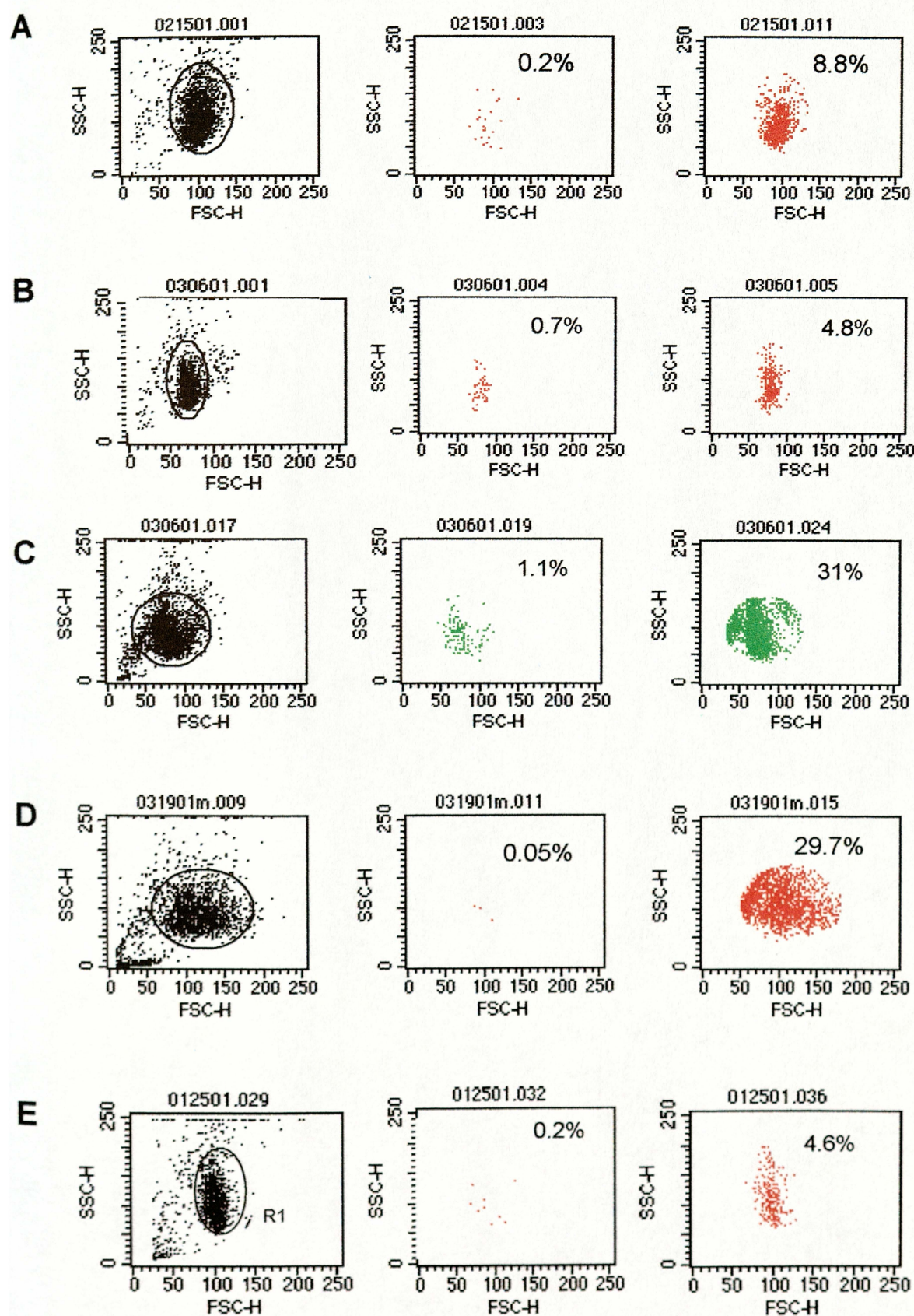


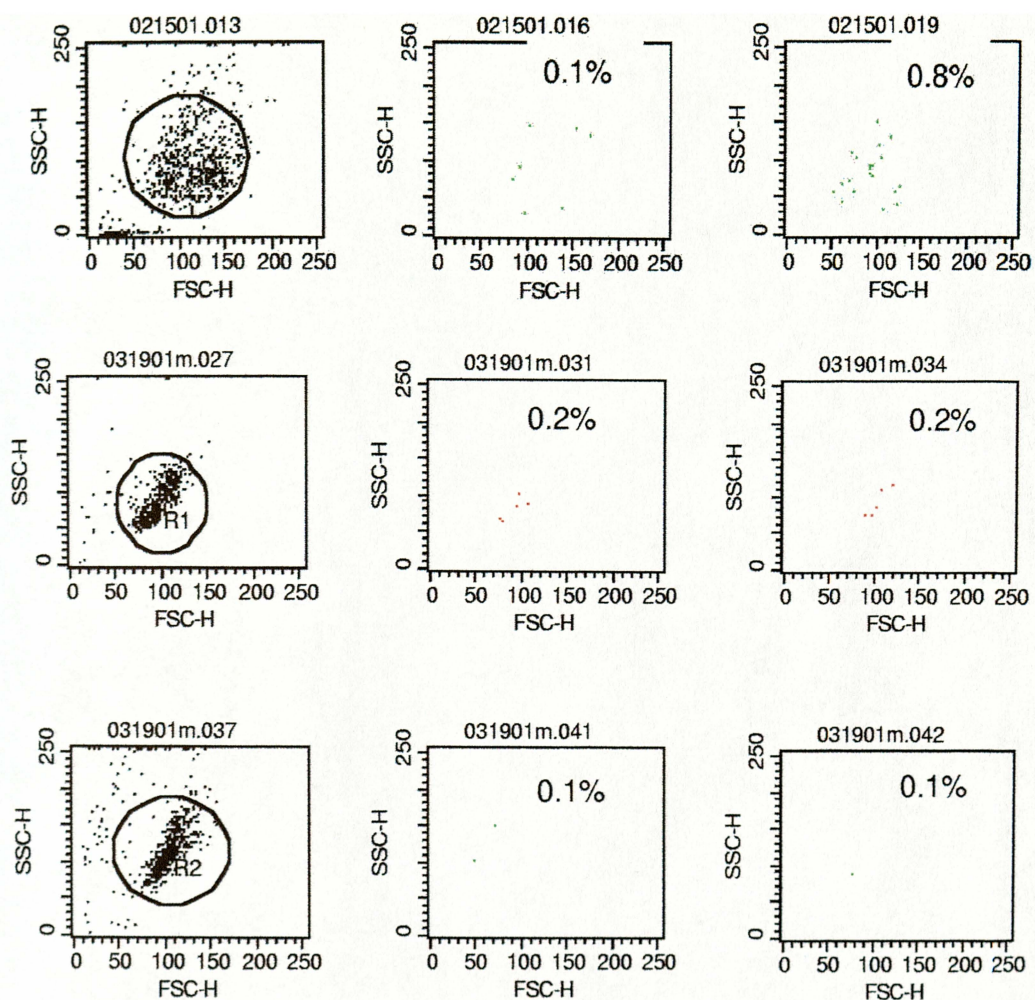
Ryc. 20. Wpływ PMB na tworzenie kolonii przez hemato/limfopoetyczne linie komórkowe hodowane w metylocelulozie.

A - obraz mikroskopowy kolonii utworzonych przez komórki linii T-komórkowej (PB-1) i B-komórkowej (HsSultan). **B** - obraz mikroskopowy kolonii utworzonych przez te linie w obecności PMB (powiększenie 200x). Przedstawiono reprezentatywny obraz tworzonych kolonii. **C** - wpływ PMB na wszystkie badane linie komórkowe. Symbolem * oznaczono różnice istotne statystycznie (dla PB-1 $p < 0,0001$, dla YT $p < 0,0001$, dla Nalm6 $p < 0,01$). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ SD z czterech niezależnych eksperymentów.

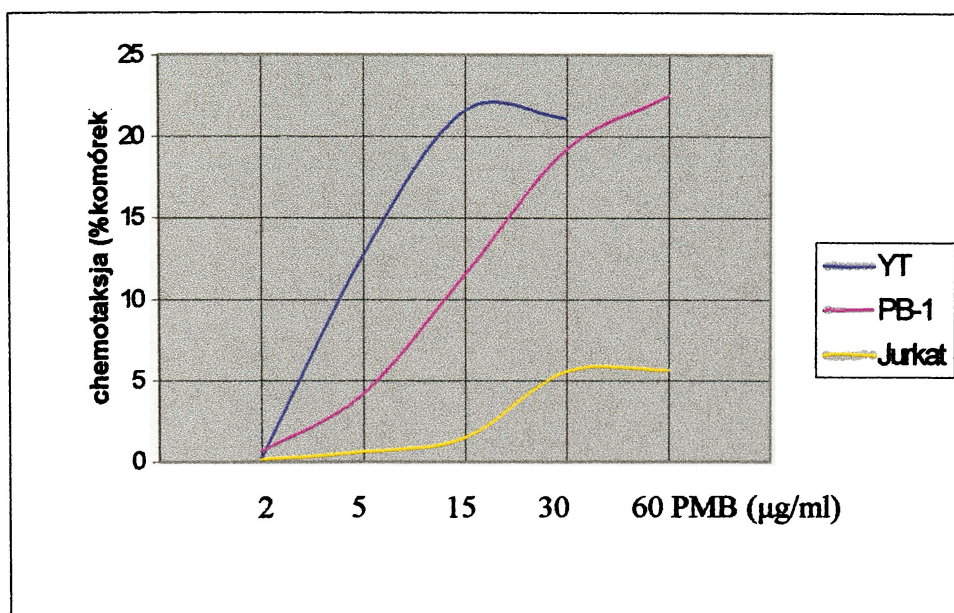
kontrola

PMB 30 μ g/ml

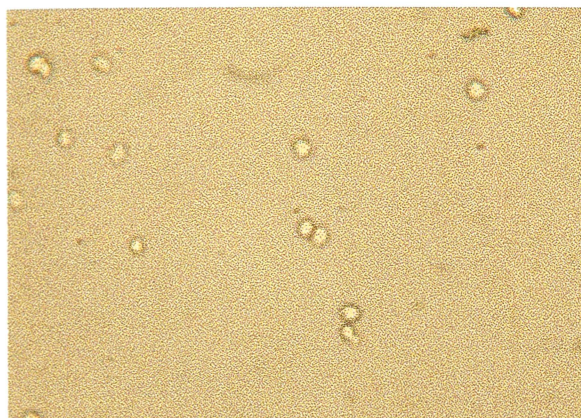
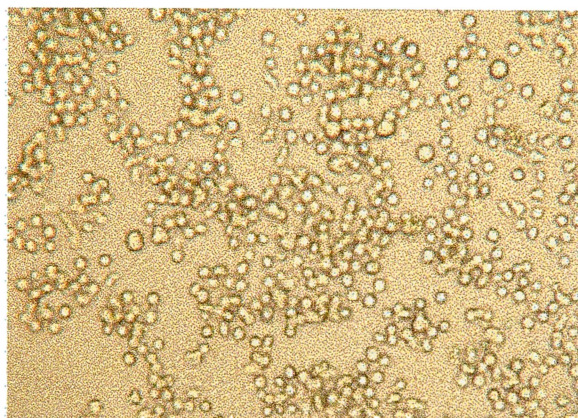
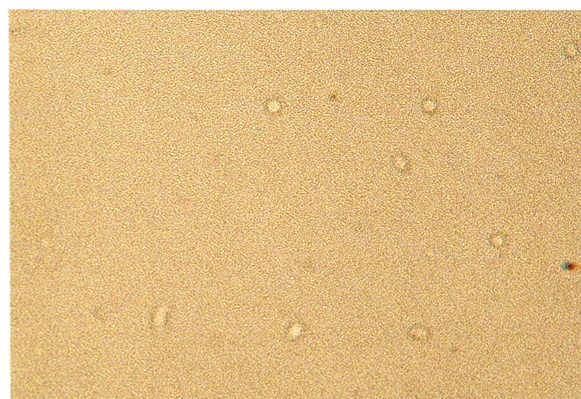
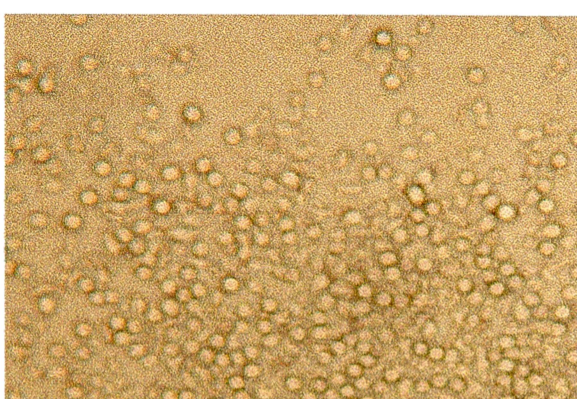




Ryc. 21 Chemotaksja komórek wybranych linii hemato/limfopoetycznych do PMB (30 μ g/ml). **A** –Ryan, **B**- Jurkat, **C**-PB-1, **D** –YT, **E** –HL-60, **F**- L428, **G**- Nalm6, **H**- HsSultan. Odsetek komórek, które wykazywały chemotaksję do PMB oceniano za pomocą cytometru przepływowego. Rycina przedstawia wyniki jednego reprezentatywnego eksperymentu z pięciu wykonanych.

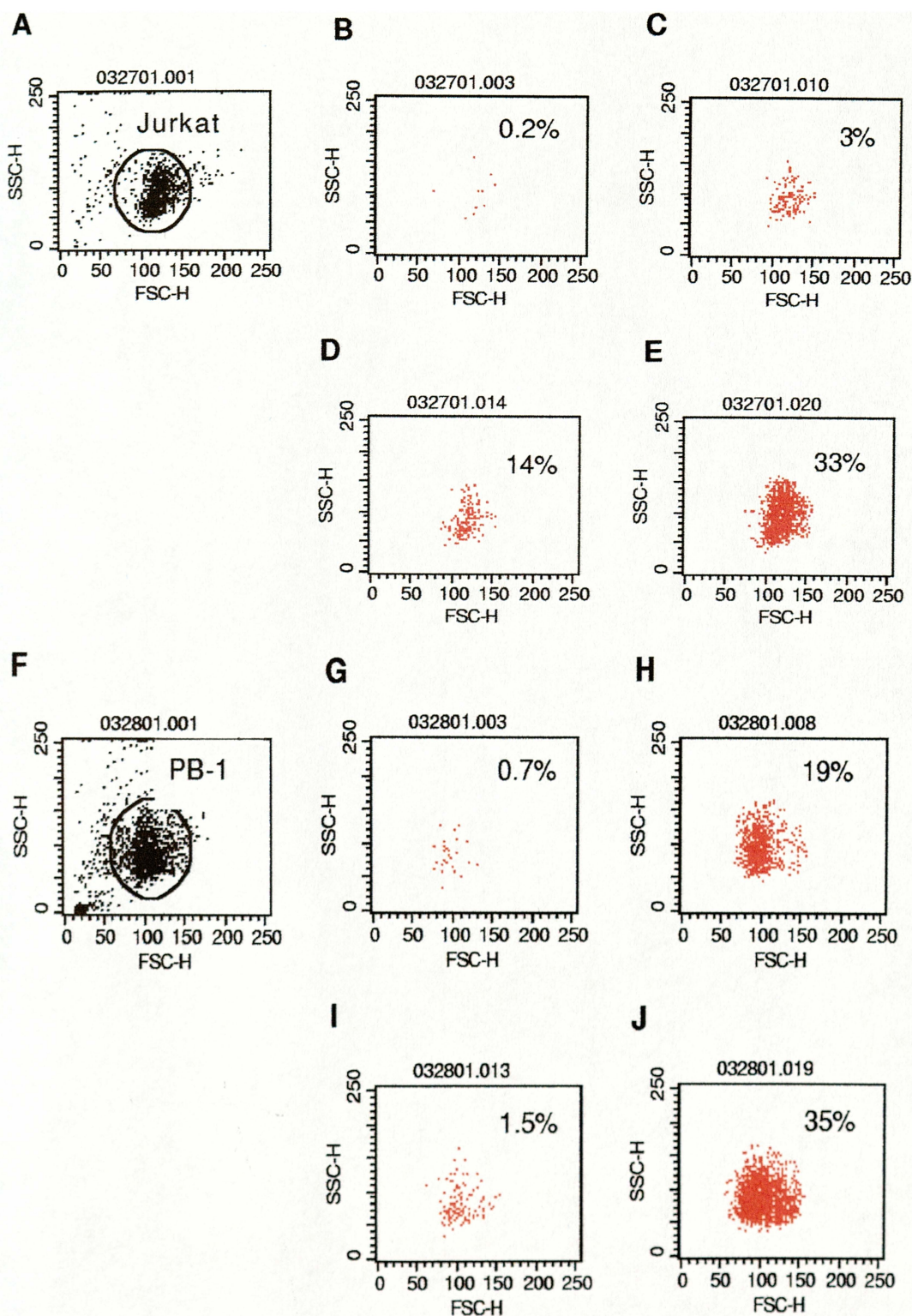


Ryc 22. Chemotaksja wybranych linii komórkowych (YT, PB-1, Jurkat) do wzrastających stężeń PMB (2-60µg/ml). Badanie posłużyło do ustalenia optymalnej dawki PMB, którą wykorzystywano do dalszych badań.

A**B****C****D**

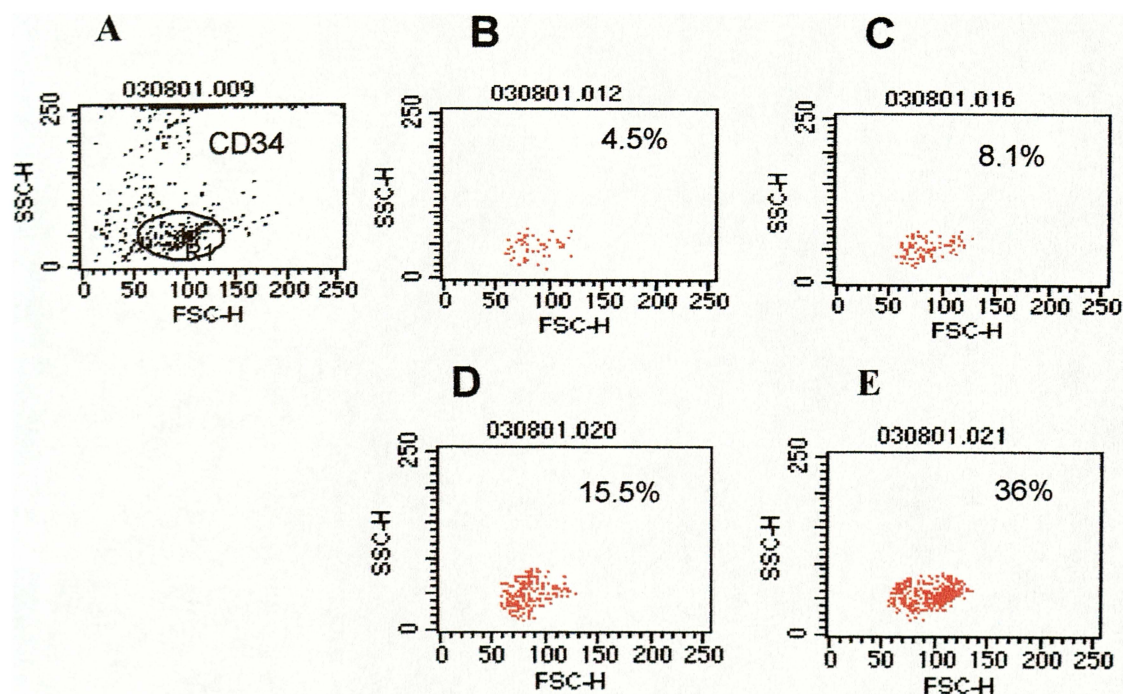
Ryc 23. Obraz mikroskopowy chemotaksji wybranych linii komórkowych do PMB lub medium kontrolnego.

A - chemotaksja komórek linii YT do RPMI, **B** - chemotaksja komórek YT do PMB (30µg/ml) w RPMI, **C** - chemotaksja komórek PB-1 do RPMI, **D** - chemotaksja PB-1 do PMB (30µg/ml) w RPMI.



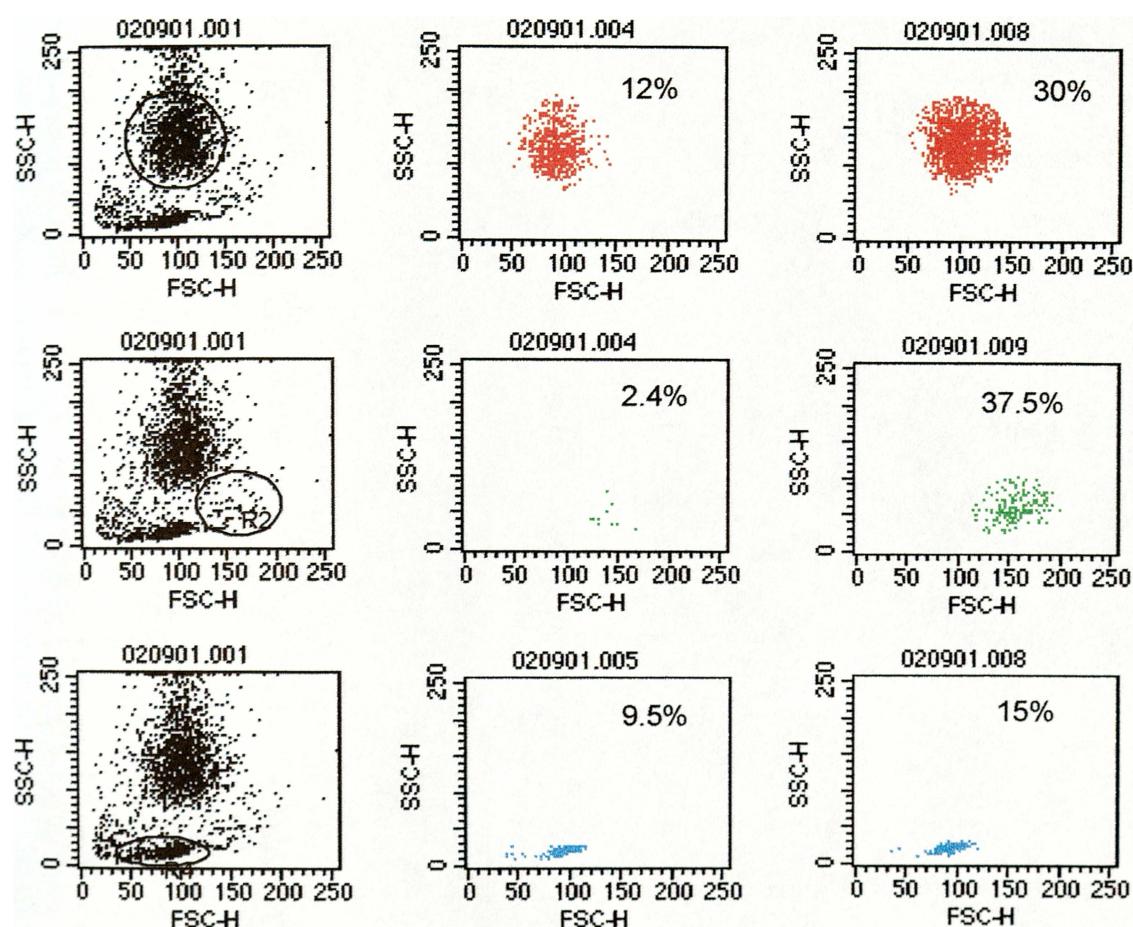
Ryc.24. Chemotaksja wybranych linii komórkowych (Jurkat i PB-1) do PMB, suboptymalnej dawki SDF-1 oraz PMB i suboptymalnej dawki SDF-1.

(C i H)-chemotaksja do PMB, (D i I) chemotaksja do suboptymalnej dawki SDF-1 (30 ng/ml) (E i J) –chemotaksja do PMB + suboptymalnej dawki SDF-1 (30 ng/ml). (B i G) przedstawiają chemotaksję linii komórkowych do medium bez PMB. PMB stosowano w stężeniu 30µg/ml. Przedstawiono reprezentatywny wyniki z jednego z czterech eksperymentów.



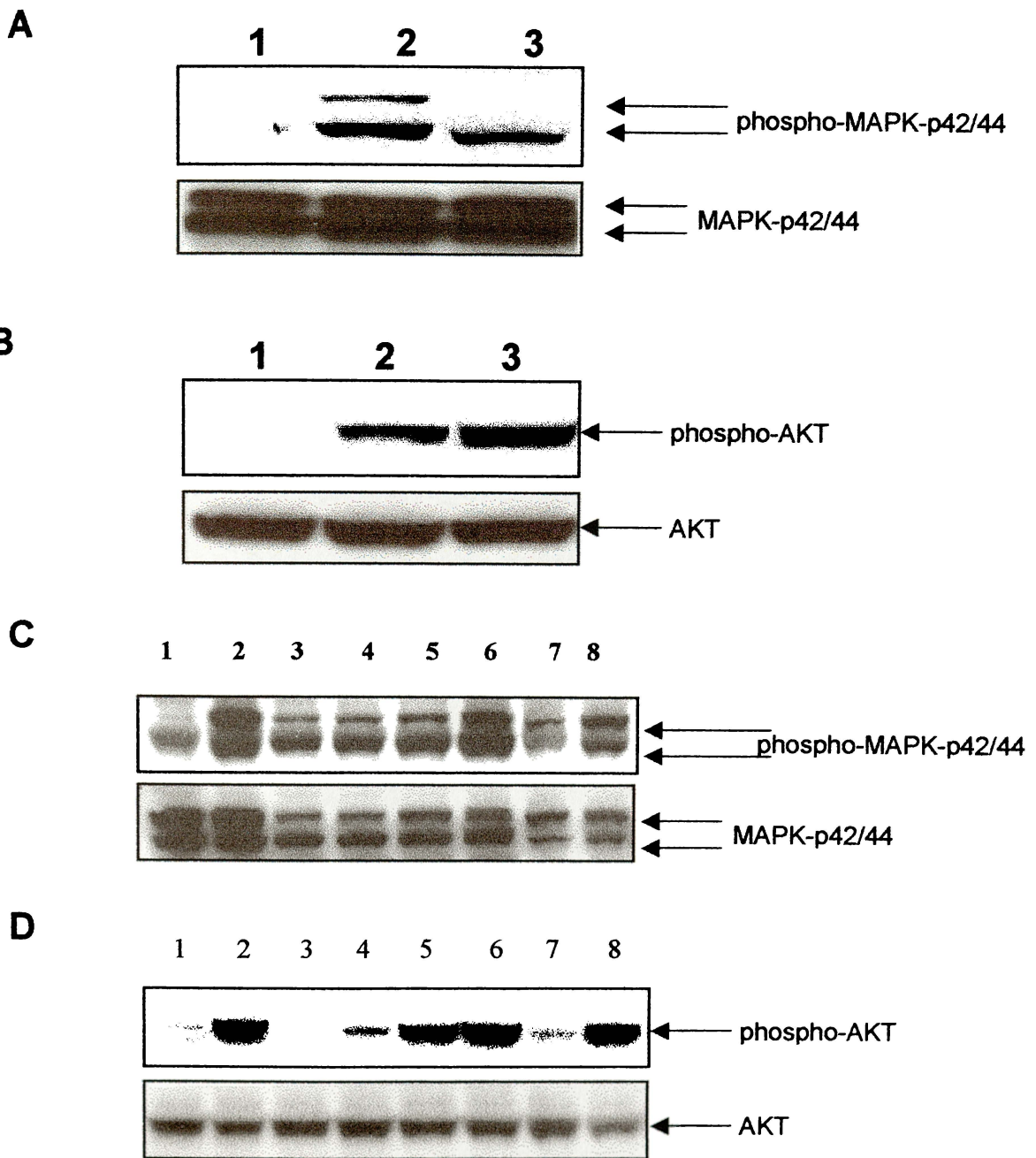
Ryc 25. Chemotaksja komórek CD34⁺ do PMB, SDF-1 oraz PMB +SDF-1.

A - cytogram CD34⁺ uzyskanych ze szpiku. **B** – chemotaksja komórek CD34⁺ do medium (kontrola negatywna), **C** – chemotaksja CD34⁺ do PMB (30µg/ml), **D** – chemotaksja komórek CD34⁺ do suboptymalnej dawki SDF-1 (30ng/ml) oraz **E** – chemotaksja komórek CD34⁺ do suboptymalnej dawki SDF-1 (30ng/ml) + PMB (30µg/ml). Przedstawiono reprezentatywny wynik badań (n=3)



Ryc 26. Chemotaksja komórek jednojądrzastych szpiku kostnego do PMB (30µg/ml).

A – chemotaksja komórek z bramki granulocytarnej, **B** –monocytarnej, **C** –limfocytarnej. Kolumna po stronie lewej przedstawia cytogram, kolumna środkowa przedstawia chemotaksję komórek do medium (kontrola negatywna), kolumna po prawej stronie przedstawia chemotaksję komórek do PMB. Przystawiono wynik jednego reprezentatywnego eksperymentu z czterech wykonanych.



Ryc 27. Aktywacja szlaków przekazu sygnału w komórkach CD34 oraz ustalonych liniach komórkowych po stymulacji PMB. **A** - fosforylacja MAPK p42/44 w komórkach CD34⁺ szpiku kostnego stymulowanych 10 min. PMB. Pozycja 1 – komórki niestymulowane, pozycja 2 – komórki stymulowane SDF-1 (300 ng/ml), pozycja 3 – komórki stymulowane PMB (30 µg/ml). **B** – fosforylacja AKT w komórkach CD34⁺ szpiku kostnego stymulowanych PMB. Pozycja 1 – komórki niestymulowane, pozycja 2 – komórki stymulowane SDF-1 300 ng/ml, pozycja 3 – komórki stymulowane PMB (30 µg/ml). **C** i **D** – ludzkie linie hemato/limfopoetyczne niestymulowane (pozycja 1, 3, 5 and 7) oraz stymulowane przez 10 min PMB (30 µg/ml) (pozycja 2, 4, 6 and 8). Pozycja 1 i 2 – komórki PB-1, Pozycja 3 i 4 – komórki HL-60, Pozycja 5 i 6 – komórki YT oraz pozycja 7 i 8 – komórki Ryan.

Tabela 1

Ekspresja wybranych białek powierzchniowych pochodzenia płytkowego po inkubacji normalnych komórek hematopoetycznych z PMB (n=3).

Komórki	przed inkubacją z PMB				po inkubacji z PMB			
	CD41	CXCR4	CD62	PAR1	CD41	CXCR4	CD62	PAR1
CD34	-	+++	+	+	+++	+++	+	+
CD4	-	+++	+	+	++	+++	+	+
CD8	-	-	b.d	-	+	-	b.d	-
CD19	-	+++	b.d	-	-	+++	b.d	-
BFU-E (eksp)	-	-	-	-	+++	++	+	-
CFU-GM (eksp)	-	++	+	-	+++	++	+++	-
CFU-M (eksp)	-	+	+	-	+++	++	++	-
CFU-G (eksp)	+	+++	-	-	+++	+++	+++	-
monocyty	-	++	-	-	+++	++	+++	-

(+) oznacza ekspresję determinanty poniżej 15%, (++) oznacza ekspresję determinanty poniżej 50%, (+++) oznacza ekspresję determinanty powyżej 50%, (-) oznacza brak ekspresji na poziomie detekcji cytometru przepływowego, (b.d) - brak danych, (eksp) oznacza komórki pochodzące z ekspansji komórek CD34+ *in vitro*

Tabela 2
Oplaszczanie wybranych linii hemato/limfopoetycznych przez PMB (n=3).

komórki	przed inkubacją z PMB				po inkubacji z PMB			
	CD41	CXCR4	CD62	PAR1	CD41	CXCR4	CD62	PAR1
PB-1	-	+++	-	++	+++	+++	+++	++
Jurkat	-	+++	-	-	+	+++	-	++
Ryan	-	+	bd	-	-	+++	bd	+
L428	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++
UT-7	+	-	-	+	++	+	+	+
HL-60	-	+++	-	-	++	+++	++	+
YT	-	-	+	+++	++	-	+	+++
Nalm6	-	+++	-	-	+	+++	+	-
HsSultan	-	+++	-	-	+	+++	+	-

(+) oznacza ekspresję determinanty poniżej 15%, (++) oznacza ekspresję poniżej determinanty 50%. (+++) oznacza ekspresję determinanty powyżej 50%, (-) oznacza brak ekspresji na poziomie detekcji cytometru przepływowego, (b.d) - brak danych, (eksp) oznacza komórki pochodzące z ekspansji komórek CD34+ *in vitro*

Tabela 3.

Ekspresja CD162 i Mac-1 na komórkach hemato/limfopoetycznych których opłaszczenie przez PMB oceniano w Tabeli 2 i 3 (n=3).

Komórki	CD162	Mac-1
CD34+	++	-
erytroblasty	++	-
mieloblasty	+++	+++
monocyty	+++	+++
PB-1	+++	-
Jurkat	+++	-
Ryan	+++	-
L428	-	-
UT-7	+++	+++
HL-60	+++	+
YT	+++	-
Nalm6	-	-
HsSultan	+++	-

(+) oznacza ekspresję determinanty poniżej 15%, (++) oznacza ekspresję determinanty poniżej 50%. (+++) oznacza ekspresję powyżej determinanty 50%, (-) oznacza brak ekspresji na poziomie detekcji cytometru przepływowego

Tabela 4

Ekspresja wybranych białek powierzchniowych pochodzenia płytkowego po inkubacji komórek linii nowotworowych z PMB (n=2).

Badana linia komórkowa			Komórki przed inkubacją			Komórki po inkubacji		
	CD162	Mac1	CXCR4	CD41	CD62	CXCR4	CD41	CD62
HTB22	+	-	+	+	-	+	-	-
T47D	-	-	-	-	-	++	-	+
HTB26	+	-	-	-	-	-	-	-
HTB140	+/-	-	-	-	-	-	-	-
SBCL-2	+	-	-	-	-	-	-	-
RD3	-	-	-	-	-	+	-	-
CW9019	+	-	++	-	-	++	-	-
RH30ATC	-	-	+++	-	-	+++	-	-
SMS-CTR	-	-	+	-	-	+	-	-
RH28	-	-	+++	-	-	+++	-	-
RABD	-	-	-	-	-	-	-	-
WM1205	-	-	-	-	-	-	-	-
WM39	-	-	-	-	-	-	-	-
WM278	-	-	-	-	-	+/-	-	-
WM164	-	-	-	-	-	-	-	-
WM451	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) oznacza ekspresję determinanty poniżej 15%, (++) oznacza ekspresję determinanty poniżej 50%, (++++) oznacza ekspresję determinanty powyżej 50%, (-) oznacza brak ekspresji na poziomie detekcji cytometru przepływowego

Tabela 5.
Fosforylacja białek biorących udział w przekazie sygnału w komórkach
stymulowanych PMB (n=4).

komórki	MAPK p42/44	AKT	STAT1	STAT3	STAT5	STAT 6
PB-1	+	+	+	c	c	+/-
HL-60	c ⁺	+	-	-	-	-
YT	+	+	-	c	-	+/-
Ryan	+	+	+	c	-	-
L428	-	-	+/-	-	-	+
NALM-6	+	+	-	-	+	-
RS11846	-	-	c	-	-	-
Jurkat	+	+	-	-	-	-

(+) oznacza fosforylację, (c) oznacza białko fosforylowane konstytutywnie, (+/-) oznacza bardzo słabą fosforylację, (-) oznacza brak fosforylacji

Tabela 6

Wpływ modyfikacji PMB na aktywność chemotaktyczną linii komórkowych PB-1 i YT (n=3).

chemoatraktant	PB-1(%komórek)	YT(%komórek)
medium (kontrola)	1±0,5	0,4±0,12
PMB 30µg/ml	30±16,0	25±15,0
<10kD	0,4±0,01	0,2±0,26
>10kD	22±0,02	67±25,6
>100kD	18±0,1	64±47,5
PMB denaturowane cieplnie	14±1,0	4,4±1,3
PMB trawione proteinazami	11±4,0	6,0±2,4

Tabela 7

Chemotaksja wybranych linii komórkowych do potencjalnych składników PMB (n=2).

Chemoatraktant	PB-1 (%komórek)	YT (%komórek)
PF4	0,51±0,0	0,5±0,0
IL-8	0,44±0,2	0,9±0,004
ATP	0,5±0,0	0,45±0,002
ADP	2,0±1,0	0,25±0,0
RANTES	0,1±0,0	6±0,02
Kwas arachidonowy	10±5,0	1±0,9
C3, C5	0,0±0,0	0,0±0,0
TGFβ-1	4,75±0,01	3±1

