

Received: 2006.01.16
Accepted: 2006.04.19
Published: 2006.05.10

Płytki krwi jako regulatory procesów odpornościowych*

Platelet-mediated regulation of immunity

Ewa Ważna

Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Płytki krwi (PLT), czyli trombocyty, są otoczone błoną komórkową fragmentami megakariocytów, najmniejszymi, ale bardzo reaktywnymi składnikami krwi obwodowej, uczestniczącymi w procesie krzepnięcia i utrzymywaniu homeostazy. Mikropęcherzyki (PMV – platelet-derived microvesicles), zwane także mikrocząstkami (PMP – platelet-derived microparticles) są uwalnianymi z płytek krwi ważnymi mediatorami przekazywania sygnału do wnętrza komórki, między płytkami oraz między płytkami i innymi komórkami. Następnie modulują funkcje tych komórek. Powstają po stymulacji płytek krwi trombiną, kolagenem i innymi czynnikami. Pochodzenie mikrocząstek może być różne: w stanach zapalnych są to fragmenty aktywowanych płytek i leukocytów, natomiast w miażdżycy mogą to być fragmenty apoptotycznych komórek śródbłonna, limfocytów lub monocytów. Udowodniono ponadto, że płytki krwi są regulatorami odporności oraz mediatorami reakcji zapalnej. Na powierzchni płytek krwi są obecne receptory TLR (Toll-like receptors) odpowiedzialne za inicjowanie odpowiedzi układu odpornościowego. Rola płytek krwi w chorobie nowotworowej została udowodniona, ale konieczne są dalsze badania celem wyjaśnienia rzeczywistych mechanizmów rządzących tym zjawiskiem.

Słowa kluczowe:

płytki krwi • mikropęcherzyki uwalniane z płytek (PMV) • mikrocząstki uwalniane z płytek (PMP) • odporność • zapalenie • choroba nowotworowa

Summary

Platelets, essentially non-nucleated blood cells, are highly reactive components of the circulatory system. They have long been consigned solely to a role in thrombosis and hemostasis. Platelets release platelet-derived microvesicles (PMV), also known as platelet-derived microparticles (PMP). They are important but still under-appreciated mediators of intracellular cross-talk between platelets and other cells and modulate their function. They are formed after stimulation of platelets by an agonist, such as thrombin, collagen, and many others. Platelets can carry biological mediators; they can modulate immune responses and inflammatory events. Microparticles can be released from activated platelets and leukocytes in inflammatory events, but in atherosclerosis they can be released from apoptotic endothelial cells, lymphocytes, and monocytes. The markers of innate immunity expressed by platelets are Toll-like receptors (TLRs). The role of platelets in tumor progression and metastasis has been recognized, but the mechanism of their action remains still unclear.

Key words:

platelets • platelet-derived microvesicles (PMV) • platelet-microparticles (PMP) • immunity • inflammatory • neoplastic disease

* Praca subsydiowana z grantu PBZ-MIN-007/P04/2003 i tematu własnego Akademii Medycznej w Warszawie IMG/W1/2005.

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9103.pdf

Word count: 6114

Tables: –

Figures: –

References: 147

Adres autorki: lek. Ewa Ważna, Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie, ul. Nowogrodzka 59, 02-006 Warszawa; e-mail: ewawazna@vp.pl

PŁYTKI KRWI

Płytki krwi (PLT), czyli trombocyty, najmniejsze ze wszystkich komórkowych składników krwi obwodowej człowieka, powstające w szpiku kostnym, są otoczone błoną komórkową bezjądrowymi fragmentami megakariocytów. Zawierają ziarnistości odpowiedzialne za proces inicjacji krzepnięcia, fibrynolizę i skurcz naczyń krwionośnych.

Płytki krwi są odpowiedzialne za samoistne tamowanie krwawienia po uszkodzeniu tętniczki, drobnej żyły albo naczyń włosowatych.

Na powierzchni PLT są obecne białka adhezyjne, biorące udział m.in. w łączeniu się płytek między sobą. Szczególną rolę w tym zjawisku przypisuje się integralnie płytkowej $\alpha_{IIb}\beta_3$, zwanej również receptorem GP IIb/IIIa, należącej do grupy β_3 integrzyn, a której defekt ekspresji doprowadza do rzadko spotykanej, genetycznie uwarunkowanej, płytkowej skazy krwotocznej – trombastenii Glanzmana.

Cząsteczka $\alpha_{IIb}\beta_3$ pojawia się na płytkach krwi, megakariocytach, a także na komórkach czerniaka. Jej ligandami są: fibrynogen, czynnik von Willebranda, witronektyna, trombospondyna.

Uwalniane z płytek czynniki chemotaktyczne i czynniki wzrostu decydują o interakcji PLT z innymi komórkami, głównie granulocytami obojętnochłonnymi, monocytami, makrofagami, fibroblastami. Natomiast substancje naczynioruchowe i zwiększające przepuszczalność naczyń regulują przepływ krwi w obrębie ogniska zapalnego.

Istotną rolę w procesie zapalnym odgrywają prawdopodobnie PDGF (platelet-derived growth factor) oraz selektyna P. PDGF jest czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów i fibroblastów; pobudza proliferację komórek mięśni gładkich naczyń; stymuluje eozynofile do wytwarzania anionu nadtlenkowego. Za pośrednictwem autokrynych mechanizmów hamuje agregację płytek.

Selektyna P (CD62P), glikoproteina należąca do cząsteczek adhezyjnych z grupy selektyn, bierze udział w pierwszym odwracalnym etapie diapedezy, w którym leukocyty toczą się po powierzchni komórek śródbłonna. Jest przechowywana w ziarnistościach α płytek (oraz w ciałkach Weibela-Palade'a w komórkach śródbłonna). Następnie zostaje przetransportowana na powierzchnię błony cytoplazmatycznej płytek (lub komórek śródbłonna), a po stymulacji substancjami aktywującymi, łączy się z receptorem na neutrofilach lub monocytach. Pobudza te komórki i tworzy z nimi agregaty. Opisanym ligandem selektyny P jest cząsteczka PSGL-1, która jest także ligandem selek-

tyny E – endotelialnej. Czynniki martwicy nowotworów (TNF- α – tumor necrosis factor) oraz lipopolisacharyd (LPS) zwiększają syntezę *de novo* selektyny P, indukując ekspresję jej genu. Wytwarzanie selektyny P zwiększają również wirusy i *Rickettsia rickettsii*. Selektyna P może również odpowiadać za połączenie płytek z odsłoniętym w ścianie uszkodzonego śródbłonna kolagenem i następnie diapedezy (przechodzenie leukocytów i erytrocytów przez śródbłonek naczyń włosowatych i żyłek).

MPV – MIKROPEČHERZYKI UWALNIANE Z PŁYTEK

Krażące fragmenty błon komórkowych aktywowanych komórek eukariotycznych uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zwane mikropečherzykami (MV), bądź mikrocząstkami (MP) [7,11,27,28] są wykrywane w wielu płynach biologicznych, włączając krew obwodową [34,48,49,51,58,92]. Zjawisko uwalniania MV z aktywowanych płytek zostało dobrze udokumentowane [34,91]. Mikropečherzyki powstające z PLT (PMV, MV) lub też mikrocząstki powstające z PLT (PMP, MP) powstają po stymulacji płytek m.in. trombiną lub kolagenem [51]. W płytkach krwi następuje reakcja wazykulacji równoczesowa z utworzeniem prozakrzepowej powierzchni, powstaje wówczas ujemnie naładowana fosfolipidowa warstwa, następnie z powierzchni błonowej oddzielają się mikrocząstki. MP są nośnikami czynnika tkankowego (TF – tissue factor), tworzą nowe miejsca wbudowywania czynnika krzepnięcia VIIa i Va, wzmagają efektywność przejścia czynnika X w Xa i protrombiny w trombinę. Wielu autorów podkreśla znaczącą rolę MV, jako cząstek przekazujących sygnał do wnętrza komórki [4,33,64,113]. Być może ten sposób komunikowania rozwinął się bardzo wcześniej w ewolucji organizmów eukariotycznych, jeszcze przed pojawieniem się rozpuszczalnych mediatorów.

Pochodzenie mikrocząstek może być różne: w stanach zapalnych są to fragmenty aktywowanych płytek i leukocytów, natomiast w miażdżycy są to fragmenty apoptotycznych komórek śródbłonna, limfocytów lub monocytów.

PMV zawierają na swojej powierzchni liczne białka, podobne, lecz nie identyczne z białkami obecnymi w błonie komórkowej cząsteczek, z których pochodzą. Analiza uwalnianych mikrocząstek – MV wykazuje różnice w ich budowie zależne od procesu powstawania [34,51].

Na swojej powierzchni PMV mają liczne wyspecjalizowane receptory: glikoproteiny IIa/IIIa (CD41), Ib, IaIIa i selektynę P (CD62P) [4,64]. Ponadto mogą zawierać aktywne biologicznie lipidy, sfingozynę (S1P) oraz kwas arachidonowy (AA) [8,9,32,33]. Interakcja PMV z komórkami docelowymi wywołuje różnorodne biologiczne następstwa,

m.in. aktywację komórek śródbłonna, stymulację wydzielania cytokin, ekspresję czynnika tkankowego (TF – tissue factor) na powierzchni komórek śródbłonna [10,89,114] oraz chemotaksję monocytów [7,10].

Niedawno wysunięto hipotezę, że PMV mogą regulować proliferację, przeżycie i adhezję ludzkich prawidłowych i złośliwych komórek hemopoetycznych [4,64]; dodatkowo mogą brać czynny udział w zakażeniu wirusem HIV:

- (1) we wtargnięciu wirusa HIV do ustroju transportując receptor CXCR4 na powierzchnię komórek, które nie mają tego receptora na swojej powierzchni;
- (2) mogą spełniać rolę nośnika dla wirusa zawartego w ich wnętrzu – w mechanizmie zwanym „koniem trojańskim” [112,113].

Pod względem budowy można wyróżnić dwa rodzaje PMV (izolowane przy różnych gradientach wirowania) – pęcherzyki uwalniane z powierzchni błon komórkowych, relatywnie większe, wielkości około $100\text{ nm}^{-1}\text{ }\mu\text{m}$ [51,65] oraz egzosomy. Egzosomy, mniejsze cząstki (30–100 nm), uwalniane w trakcie fuzji α -ziarnistości płytkowych z błoną komórkową, gdzie funkcjonują jako pęcherzyki związane z błoną komórkową; po egzocytozie, uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej [28].

PMV zbudowane są przede wszystkim z białek i lipidów, około 10% stanowią glikolipidy i glikoproteiny [28,51]. Gęstość PMV jest ściśle związana z ilością białek, które mogą być biochemicznie aktywnymi składnikami błony komórkowej – receptorami, cząsteczkami adhezyjnymi, transporterami błonowymi, enzymami, włączając metaloproteiny macierzy komórkowej (MMPs).

MMPs, charakteryzujące się obecnością dwuwartościowego kationu metalu w centrum aktywnym, stanowią dużą grupę enzymów proteolitycznych, degradujących łącznotkankowe podścielisko i ułatwiających progresję choroby nowotworowej – wzrost guza, angiogenezę oraz rozwój przerzutów odległych [15,29,98,119]. Ich rola w procesie nowotworowym polega prawdopodobnie na zdolności trawienia kolagenu typu IV i zależna jest od zdolności degradowania substratów wchodzących w skład macierzy pozakomórkowej, a także cytokin, chemokin, receptorów czynników wzrostu, cząsteczek adhezyjnych. Wzrost aktywności MMPs obserwowano w różnych rodzajach nowotworów, zwłaszcza metaloproteinaz typu błonowego (MT) w raku płuca [65,97,98,130].

PMV poprzez ich prozapalne działanie mogą się przyczyniać do rozwoju miażdżycy tętnic [126], ponadto obecność mikrocząstek wykazano w ostrych zespołach wieńcowych, podczas angioplastyki wieńcowej, w cukrzycy [72,88,134,137], ostrym udarze niedokrwinnym, chorobach naczyń obwodowych, rzucałce, chorobie Alzheimera [88], nocej napadowej hemoglobinurii i niedokrwistości aplastycznej [57], oraz małopłytkowej plamicy zakrzepowej [67].

Nieliczne wstępne doniesienia sugerują przyszłe terapeutyczne zastosowanie MP. U myszy chorych na hemofilię A zaobserwowano uwalnianie MP po infuzji selektyny P [56], a u chorych otrzymujących aktywowany czynnik VII (rFVIIa) wykazano przejściowe zwiększenie uwalniania MP pochodzenia płytkowego [116].

PŁYTKI KRWI JAKO REGULATORY PROCESÓW ODPORNOŚCIOWYCH

Nowe dane sugerują, że płytki krwi poza swoją dobrze udokumentowaną funkcją hemostatyczną mogą być aktywnymi składnikami wielu procesów tocących się w organizmie, m.in. aktywnego zapalenia, wpływając na wytwarzanie cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, a poprzez ekspresję cząsteczki CD154 mogą wpływać na układ odpornościowy. Wydaje się prawdopodobne, że poprzez cząsteczkę CD154 PLT indukują dojrzewanie komórek dendrytycznych – należących obok limfocytów B i makrofagów do grupy komórek prezentujących antygen.

CD154 (gp39, ligand CD40, CD40L) jest to cząsteczka należąca do nadrodziny białek TNF-podobnych, występująca przede wszystkim na powierzchni aktywowanych limfocytów T (CD4⁺) i komórek tucznych, a także limfocytów B i komórek NK. Szlakowi CD40-CD40L przypisuje się udział w aktywacji limfocytów B, ale także limfocytów T. Jednym z mechanizmów biorących udział w tym zjawisku jest na pewno pośrednie działanie CD40L, polegające na wzroście właściwości kostymulujących cząsteczek prezentujących antygen, ponadto sugeruje się również, że cząsteczka CD40L jest zdolna do przekazywania bezpośredniego sygnału do wnętrza limfocyta T.

Elzey i wsp. [31] w celu wyjaśnienia wpływu PLT na indukowanie i modyfikowanie odpowiedzi immunologicznej zaprojektowali doświadczenie na modelu mysim, w którym wykazano, że na aktywowanych płytkach krwi wzrasta ekspresja selektyny P, cząsteczek CD154 i pozostają one na płytkach około 8 godzin. Celem oceny wpływu PLT na pochodzące ze szpiku prekursorzy komórek dendrytycznych inkubowano je z aktywowanymi płytkami. Miarą oddziaływania aktywowanych płytek i komórek dendrytycznych było wytwarzanie interleukin: IL-6 i IL-12. Uzyskane wyniki sugerują, że PLT indukują CD154-zależne wytwarzanie IL-6 i IL-12 przez komórki dendrytyczne. Ponadto wykazano wzrost ekspresji cząsteczek B7.1, B7.2 oraz ICAM-1 na prekursorowych komórkach dendrytycznych, co wydaje się potwierdzać hipotezę, że aktywowane płytki poprzez CD154 indukują dojrzewanie komórek dendrytycznych.

W warunkach *in vivo* PLT z udziałem CD154 stymulują przełączenie klasy wytwarzanych przeciwciał z IgM/IgD na IgG lub inny typ przeciwciał wytwarzanych przez limfocyty B [108]. Limfocyty B wymagają obecności cząsteczki CD40 do zmiany klasy wytwarzanych przeciwciał [108]. Zarówno u myszy jak i u ludzi brak ligandu CD40 na powierzchni limfocytów B powoduje zespół nadmiernego wydzielania przeciwciał IgM, z możliwością niewielkiego wytwarzania przeciwciał klasy IgG, potwierdzając znaczącą rolę cząsteczki CD154 w przełączaniu klasy wytwarzanych przeciwciał [108].

Dożylne podanie myszom adenowirusa wywołuje zapalenie wątroby i śledziony [143]. Mysiom CD154^{-/-} podawano dożylnie typ 5 adenowirusa (z defektem replikacji), następnie po podaniu aktywowanych płytek stwierdzono zmianę klasy wytwarzanych przeciwciał z IgM na IgG [31].

Pytanie, czy płytkowa cząsteczka CD154 może wpływać *in vitro* na dojrzewanie prekursorów komórek dendry-

tycznych poprzez aktywowane limfocyty T (CD8⁺) było przedmiotem kolejnego doświadczenia przeprowadzonego przez Elzeja i wsp. Stwierdzono, że dożylna iniekcja aktywowanych płytek wzmacnia wytwarzanie interferonu γ (IFN- γ) przez limfocyty T, wzmacniając ich całkowitą aktywność lityczną [31].

Przedmiotem kolejnego eksperymentu było wyjaśnienie problemu, czy krążące, nieaktywne PLT są zdolne do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej. W doświadczeniu wykazano, że PLT łatwo przechodzą w stan nieaktywny, lecz mimo to utrzymują zdolność aktywacji po bodźcach fizjologicznych, a także, że dożylne podanie fragmentów adenowirusa aktywuje płytki bezpośrednio, podczas gdy były one niezdolne do aktywacji w warunkach *in vitro*; dodatkowo udowodniono, że indukują one wzrost ekspresji selektyny P na powierzchni płytek [31].

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że krążące PLT, aktywowane w odpowiedzi na infekcję wirusową mogą indukować zależną od cząsteczki CD154 zmianę klasy wytwarzanych przez limfocyty B przeciwciał (za którą odpowiada receptor Fc limfocytów B) oraz odpowiedź aktywnych limfocytów T CD8⁺ poprzez nasilenie ich litycznych właściwości wobec antygenów wirusowych. Wykazano zatem, że płytki krwi przez CD154 wzmacniają wtórną odpowiedź układu immunologicznego na podany wcześniej patogen [31].

Dane literaturowe i doświadczenia pozwalają na wysunięcie hipotezy, że PLT odgrywają ważną rolę w szybkim przekazywaniu sygnału do wnętrza komórek układu odpornościowego. Płytki krwi poprzez cząsteczkę CD154 powodują wzrost wytwarzania IgG w warunkach, w których liczba limfocytów T CD4⁺ jest zmniejszona. Wysunięto przypuszczenie, że w sytuacjach fizjologicznych, w których liczba limfocytów B oraz T i ich odpowiedź antygenowo swoista jest osłabiona, PLT przejmują ich funkcję i powodują przekazywanie sygnału do komórki wzbudzając silną odpowiedź humoralną [30].

Aby określić rolę płytek krwi w indukowaniu odpowiedzi zapalnej przeprowadzono doświadczenie, w którym za pomocą cytometrii przepływowej badano ekspresję receptorów TLR (Toll-like receptor) na ludzkich płytkach krwi [23].

TLR są grupą, co najmniej jedenastu receptorów biorących udział we wczesnej odpowiedzi układu odpornościowego na wnikające patogeny [22,23,142]. Rozpoznają one sekwencje charakterystyczne dla określonej grupy patogenów, np. TLR 1, 2, 4, 5 oraz 6 rozpoznają swoiste dla bakterii cząstki, takie jak: LPS, peptydoglikan, lipoproteina oraz flagelina. TLR 3, 7, 8 i 9 rozpoznają charakterystyczne sekwencje nukleotydowe [62,125,132].

Receptory TLR4 są obecne na różnych typach komórek: neutrofilach, makrofagach, komórkach nabłonka, komórkach śródbłonna oraz keratynocytach. Interesującym wydaje się to, że receptory TLR4 pojawiają się na komórkach dendrytycznych dopiero w odpowiedzi na LPS [1,3,55,96,107,115,128,135].

LPS jest głównym strukturalnym składnikiem błony komórkowej Gram-ujemnych bakterii pozwalającym komór-

kom gospodarza wykrywać wnikające patogeny. W rozpoznawanie LPS przez komórki ssaków zaangażowanych jest kilka mechanizmów (białka osocza – białko wiążące LPS i transportujące na powierzchnię komórki, aby połączyć LPS z cząsteczką CD14) [3,23,93,140]. Cząsteczka ta jest receptorem LPS, występującym w postaci rozpuszczalnej we krwi lub jako cząsteczka adhezyjna na powierzchni komórek hemopoetycznych.

Udowodniono, że myszy z brakiem cząsteczek (CD41⁺) na powierzchni swoich komórek mają 100-krotnie większe ryzyko zgonu z powodu sepsy. Aktywacja LPS zachodzi z udziałem receptorów TLR4 [23].

Wpływ płytek krwi na ekspresję receptora TLR4 oraz związek tego zjawiska z trombocytopenią po raz pierwszy wykazano w doświadczeniu przeprowadzonym przez Andonegui i wsp. Udowodniono wzrost ekspresji tego receptora, przy braku ekspresji selektyny P oraz silniejsze wiązanie płytek krwi z fibrynogenem [3].

Natomiast Montruccio i wsp. dowiedli, że płytki krwi nie są w stanie rozpoznać LPS, ponieważ nie mają na swojej powierzchni, ani receptora TLR4, ani cząsteczki CD14 – bezpośrednio wiążącej LPS [93].

W eksperymencie Cognasse stwierdzono słabą ekspresję receptorów TLR 2, 4 oraz 9 na powierzchni płytek, natomiast znaczną ekspresję tych samych receptorów w cytoplazmie płytek CD41⁺. Wykazano znamienne statystycznie różnice ekspresji receptorów TLR na PLT aktywowanych i nieaktywowanych, wskazując na aktywowane płytki, jako na istotne elementy odpowiedzi immunologicznej [23].

PŁYTKI KRWI JAKO MEDIATORY REAKCJI ZAPALNEJ

W wielu badaniach eksperymentalnych wykazano, że PLT mają również właściwości prozapalne [102]. Liczba [50,63], aktywacja i agregacja PLT [25] wzrasta w chorobach zapalnych jelit. Sugeruje się, że mikrozawał jelita powodujący nieznaczne jego niedokrwienie może leżeć u podstaw patogenezы choroby Crohna [25,136].

Nieswoiste choroby zapalne jelit (choroba Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego) są przewlekłymi chorobami zapalnymi jelit, najprawdopodobniej o charakterze autoimmunologicznym, różnie umiejscowione w przewodzie pokarmowym, rozwijającymi się zwykle na tle predispozycji genetycznej.

Selektyna P, która ulega ekspresji na aktywowanych płytkach krwi stanowi podstawę do tworzenia agregatów płytek i leukocytów (PLAs). PLT mogą być aktywowane przez leukocyty [37]; leukocyty krążące jako agregaty PLAs (połączenia: płytek z granulocytami obojętnochołonnymi, płytek z monocytami, płytek z limfocytami) są częściej aktywowane niż krążące pojedyncze komórki [20,98,105]. We krwi krążącej zdrowych osób znajduje się niewielka liczba PLAs [80,106], ich liczba znacznie wzrasta w stanach patologicznych, takich jak: choroby mieloproliferacyjne [70], ostre zespoły wieńcowe [43,44,101], reumatoidalne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy [68] oraz posocznica [45]. Ponadto stężenie PLAs wzrasta u palaczy [78], podczas wysiłku fizycznego [81], u chorych he-

modalizowanych [46] w czasie angioplastyki wieńcowej [90] oraz operacji kardiochirurgicznych [109].

W doświadczeniu Irvinga i wsp. [63] celem określenia aktywacji PLT i granulocytów obojętnochłonnych użyto przeciwciał wyznakowanych fluoresceiną odpowiednio przeciwko selektynie P oraz selektynie L. Do wykrywania agregatów płytek i leukocytów wykorzystano cząsteczki adhezyjne charakterystyczne dla tych połączeń: CD42a oraz CD45. W badaniu oznaczano liczbę leukocytów, płytek krwi oraz parametry morfometryczne badanych składników krwi. U chorych z aktywną nieswoistą chorobą zapalną jelit (choroba Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego) wykazano zwiększoną liczbę PLAs, w porównaniu ze zdrowymi oraz z grupą pacjentów w okresie remisji, co może leżeć u podstaw patogenezy nieswoistych chorób zapalnych jelit i może odpowiadać za wiązanie granulocytów obojętnochłonnych przez selektynę P oraz cząsteczki adhezyjne CD11b/CD18.

Rolę płytek krwi i leukocytów w nieswoistych chorobach zapalnych jelit badano wielokrotnie. W chorobach zapalnych jelit dochodzi do znacznej aktywacji PLT oraz ich agregatów. Aktywowane płytki powodują aktywację neutrofilów i mogą się przyczyniać do wzrostu oddziaływań pomiędzy neutrofilami a komórkami śródbłonka. Aktywowane PLT mogą dodatkowo powodować niedokrwienie jelit przez tworzenie skrzeplin w drobnych naczyniach [25].

Kompleksy granulocytów obojętnochłonnych i płytek krwi łatwiej ulegają aktywacji, niż pojedyncze krążące neutrofile, powodując wzrost adhezji, zdolności do fagocytozy *Neisseria meningitidis* i wytwarzania toksycznych metabolitów [105]. Połączenie trombiny z płytkami krwi indukuje wytwarzanie cytokin [100] oraz ekspresję cząsteczek adhezyjnych CD11b oraz selektyny L [98].

Dotychczas opublikowano niewiele danych dotyczących roli PLAs w chorobach przewodu pokarmowego. Dootrzewnowe podanie szczurom toksyny A *Clostridium difficile* oraz *Helicobacter pylori* powoduje powstawanie PLAs [75,76], które można zahamować przeciwciałami przeciwko selektynie P, co jednocześnie powoduje ucieczkę albumin i migrację leukocytów [75]. Zjawisko to uwidacznia istotną rolę PLAs w zapalnych chorobach jelit.

W eksperymencie potwierdzono, że liczba płytek krwi i ekspresja selektyny P rośnie w chorobach zapalnych jelit [19,25], ponadto stwierdzono wzrost ekspresji selektyny P w grupie pacjentów z zapaleniem stawów, które często towarzyszy chorobom zapalnym jelit. Wyniki eksperymentów są sprzeczne z otrzymanymi wcześniej przez Collinsa i wsp. Różnice mogą wynikać z użycia do badań różnych antykoagulantów oraz różnego doboru pacjentów do poszczególnych grup badanych [84,109].

Potwierdzono, że w chorobach zapalnych jelit średnia objętość płytek krwi u pacjentów leczonych objawowo maleje, zwłaszcza w aktywnym okresie choroby [66,71], zjawisko to może być związane ze wzrostem aktywacji płytek krwi w tej grupie pacjentów.

Obecność selektyny L jest konieczna do aktywacji granulocytów obojętnochłonnych i tworzenia oddziaływań między granulocytami a komórkami śródbłonka oraz między

samymi neutrofilami [6,103]. Wyniki doświadczenia przeprowadzonego przez Irvinga – brak wzrostu ekspresji selektyny L w chorobach zapalnych jelit, są sprzeczne z otrzymanymi wcześniej przez Seidelina, który sugerował wzrost ekspresji selektyny L w chorobie Crohna.

Wykazano, że poziom PLAs jest większy u chorych z nieswoistymi zapalnymi chorobami jelit oraz w grupie ze współistniejącym zapaleniem stawów, w porównaniu z grupą kontrolną (zdrowymi ochotnikami). W trakcie inkubacji krwi tworzenie PLAs występuje częściowo pod wpływem spontanicznej aktywacji płytek krwi. Być może u pacjentów z chorobami zapalnymi jelit dochodzi w ten sposób do wytwarzania prozapalnych cytokin: TNF- α , IL-1, oraz PAF (platelet-activating factor) [79] i powstawania agregatów płytek z leukocytami. Po inkubacji krwi pacjentów ze współistniejącą artropatią zapalną liczba PLAs zwiększa się w porównaniu z grupą kontrolną, sugerując, że mimo braku agregacji *in vivo* płytki i leukocyty u pacjentów z zapalnymi chorobami jelit ze współistniejącą artropatią po inkubacji ulegają dużo łatwiej agregacji.

U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit otrzymujących azatioprynę (heterocykliczna pochodna 6-merkaptopuryny, o działaniu immunosupresyjnym), stwierdzono zmniejszenie agregatów PLAs, podobnie jak u pacjentów z zapaleniem stawów otrzymujących metotreksat (antagonista kwasu foliowego, hamujący aktywność reduktazy dihydrofolianowej katalizujący przemianę dihydrofolinu w tetrahydrofolian, antymetabolit, o działaniu przeciwnowotworowym i immunosupresyjnym) [63]. W związku z tym istnieje duże prawdopodobieństwo, że do badania zostali zakwalifikowani pacjenci z małą aktywnością procesu zapalnego. Wyniki otrzymane w grupie pacjentów z artropatią wskazują, że powstawanie PLAs nie jest swoiste dla procesu zapalnego, oraz że cząstki PLAs odgrywają dużo większą rolę w etiopatogenezie nieswoistych zapalnych chorób jelit niż w zapaleniu stawów. Nie znaleziono związku między formowaniem agregatów PLAs a klinicznymi markerami aktywności zapaleń jelit. Prawdopodobnie liczba PLAs nie ma związku z aktywnością procesu zapalnego. W aktywnym okresie choroby znacznie więcej PLAs ulega adhezji do śródbłonka naczyń, a więc w większym stopniu odzyskiwane są z krążenia.

Rola aktywowanych leukocytów w procesie powstawania PLAs nie jest do końca wyjaśniona. W jednym z licznych badań uzyskano zahamowanie adhezji aktywowanych płytek krwi do granulocytów obojętnochłonnych po stymulacji leukocytów N-formylo-metionyno-leucynylo-fenylaminą (fMLP) [111], podczas gdy w innych badaniach z użyciem fMLP stwierdzono zwiększoną liczbę agregatów PLAs [79]. Podanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko selektynie L nie hamuje tworzenia połączeń płytkowo-leukocytowych, a L-selektyna nie ulega ekspresji podczas tworzenia agregatów z granulocytów obojętnochłonnych i aktywowanych płytek krwi [111].

Niektóre z mechanizmów tworzenia PLAs omawiane powyżej mogłyby być wykorzystane w terapii celowanej. Interesującym wydaje się to, że u pacjentów otrzymujących azatioprynę stwierdza się mniej agregatów PLAs. Tiopuryny są analogami puryn, hamującymi syntezę adeniny i guanyiny [129]. Azatiopryna hamuje indukowaną płytkami agre-

gację poprzez fosforylację adenozyiny i w tym mechanizmie zmniejsza liczbę PLAs. Być może wpływ tiopuryn na PLAs może zostać wykorzystany do hamowania procesów zapalnych w tkankach.

Kwas acetylosalicylowy i jego pochodne oraz glikokortykosteroidy stosowane w nieswoistych chorobach zapalnych jelit *in vivo* hamują agregację płytek, ale nie wpływają na powstawanie PLAs [63].

Znaczenie PLT w patogenezie astmy oskrzelowej – przewlekłej zapalnej choroby oskrzeli, charakteryzującej się ich odwracalną obturacją, jest przedmiotem dyskusji. Istnieją jednak przesłanki wskazujące na udział aktywacji płytek w ciągu reakcji międzykomórkowych przyczyniających się do rozwoju reakcji zapalnej w astmie. Za wpływem PLT na patogenezę astmy przemawia m.in.: występowanie receptora IgE na powierzchni PLT, skrócenie czasu życia PLT u chorych na astmę z dużym stężeniem IgE, osłabienie agregacji PLT zachodzącej pod wpływem adrenaliny i ADP (adenozynodifosforan) w przebiegu astmy, wydłużenie czasu krwawienia u chorych na choroby alergiczne, a także zwiększenie stężenia serotoniny w osoczu chorych na choroby alergiczne (zmniejszenie wychwytu serotoniny przez PLT).

U myszy z ostrym zapaleniem wątroby niezależnie od prokoagulacyjnej funkcji aktywowane płytki biorą udział w redukcji wirusa w swoistych cytotoksycznych limfocytach T wątroby, a przez to zapobiegają niszczeniu organu i pogarszaniu jego funkcji [60].

ROLA PŁYTEK W PROGRESJI CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Sugeruje się, że PMV mogą ułatwiać wzrost guza pierwotnego, powstawanie przerzutów odległych oraz angiogenezę, ale mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko wciąż pozostają niepewne. Celem wyjaśnienia roli PMV w rozwoju guza nowotworowego i powstawaniu przerzutów zaprojektowano doświadczenie, w którym na pięciu ludzkich liniach komórkowych raka płuc (A549, CRL 2066, CRL 2062, HTB 183, HTB 177) oraz linii komórkowej Lewis – mysiego raka płuc (LCC) badano zdolność transportu komórek nowotworowych przez PMV na powierzchnię błon komórkowych, bezpośredni wpływ na aktywację i drogi przekazywania sygnału do wnętrza komórki, proliferację komórek, ekspresję czynników angiogenezy (także MMPs), chemoinwazję oraz adhezję [65].

PMV transportują płytkową integralną CD41 na powierzchnię większości komórek nowotworowych badanych linii komórkowych, a w komórkach nowotworowych stymulują kinazozależną fosforylację białek MAPK p42/44 i AKT, wzmagają ekspresję metaloproteinaz macierzy – typu-1 (MT1-MMP). PMV działają chemotaktycznie na 4 z 5 badanych linii komórkowych, powodując silną odpowiedź ze strony komórek A549 – stymulują ich proliferację, co wiąże się z powstawaniem przerzutów odległych, powodują nieprawidłową ekspresję cykliny D2 i wzmagają chemoinwazję (trans-Matrigel). Dodatkowo indukują ekspresję mRNA czynnika mającego właściwości naczyniotwórcze – metaloproteinazy 9 (MMP-9), śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń, interleukiny 8, czynnika wzrostu hepatocytów; wzmagają adhezję ludzkich żylnych, pę-

kowych komórek śródbłonka. Po dożylniej iniekcji mysich PMV opłaszczonych komórkami LLC wykazano znaczący wzrost częstości przerzutów w płucach i szpiku kostnym w porównaniu z grupą otrzymującą wyłącznie dożylną iniekcję komórek LLC [65].

Uważa się, że płytki krwi mogą się przyczyniać do progresji guza nowotworowego, tworzenia przerzutów odległych, oraz że wpływają na naczyniotworzenie [53,86,127,147]. Wyniki doświadczenia opisanego wyżej mogą potwierdzać udział płytek krwi – PMV oraz eksosomów w progresji choroby nowotworowej, powstawaniu przerzutów i angiogenezie. W warunkach doświadczalnych wykazano, że indukowana trombocytopenia być może zmniejsza powstawanie przerzutów nowotworowych [147].

Wydaje się, że PMV są ważnymi cząsteczkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórek, zwłaszcza do komórek nowotworowych, modulując ich funkcje. Zjawisko to jednak wymaga dalszych badań celem ustalenia wszystkich jego mechanizmów i rzeczywistego znaczenia w progresji choroby rozrostowej.

Powstawanie przerzutów odległych jest procesem wieloetapowym, gdzie komórki nowotworowe z ogniska pierwotnego rozsiewają się do narządów odległych drogą naczyń krwionośnych bądź chłonnych, a także szereg się przez ciągłość lub wzdłuż przebiegu nerwów. Komórka nowotworowa, aby mogła utworzyć przerzut musi pokonać tzw. kaskadę przerzutowania, na którą składają się: angiogeneza, przejście przez ścianę naczynia, przetrwanie/przeżycie w krwiobiegu, zatrzymanie w narządzie docelowym, przejście przez ścianę naczynia, proliferacja – powstanie przerzutu. Komórki nowotworowe tworzą przerzuty tylko w warunkach sprzyjających do przetrwania i dalszego wzrostu. Pokonanie przez komórkę nowotworową wszystkich barier przy przejściu przez błonę komórkową jest możliwe dzięki mutacji i uaktywnieniu genu kodującego kolagenazę IV, która wraz z innymi enzymami proteolitycznymi bierze udział w ich degradacji. Nową kolonię komórek są w stanie zapoczątkować tylko te, które zaczęły się dzielić, następnie w powstającym guzie musi się rozpocząć naczyniotworzenie, zapewniające dopływ substancji odżywczych dla intensywnie dzielących się komórek nowotworowych.

Bakewell i wsp. wysunęli przypuszczenie, że do powstawania przerzutów nowotworowych i osteolizy konieczna jest obecność integraliny β_3 [5], będącej heterodimerem, składającym się z dwóch podjednostek: $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb/IIIa) oraz $\alpha_v\beta_3$ (receptor witronektyny) [59]. $\alpha_v\beta_3$ ulega ekspresji na wielu komórkach: osteoklastach, PLT, megakariocytach, komórkach śródbłonka nerek i łożyska [16,54].

Myszy z delecją β_3 integraliny ($\beta_3^{-/-}$) użyto w doświadczeniu mającym na celu wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie odległych przerzutów oraz niszczenie kości [5]. Delecję integraliny β_3 , dziedziczną zgodną z prawami Mendla, cechuje dysfunkcja agregacji płytek, wrodzona skaza krwotoczna, a także wysoka śmiertelność okołoporodowa [52]. Zwierzęta charakteryzuje duża aktywność osteosklerotyczna z powodu osłabionej funkcji osteoklastów [38,87], przejawiająca się wzrostem masy kostnej zwierząt i zarastaniem jam szpikowych [87].

Celem badania było określenie roli PLT, ich agregacji oraz funkcji swoistych inhibitorów receptorów $\alpha_{IIb}\beta_3$ w powstawaniu przerzutów nowotworowych po przeszczepieniu szpiku kostnego u opisanych wyżej zwierząt.

Stwierdzono, że iniekcja komórek czerniaka B16 do lewej komory serca powoduje powstanie przerzutów osteolitycznych w ciągu 14 dni u 74% (26/35) myszy $\beta_3^{+/+}$ (podobna częstość charakteryzuje myszy heterozygotyczne $\beta_3^{+/-}$), natomiast organiczną chorobę kości stwierdza się tylko u 4% (1/24) myszy $\beta_3^{-/-}$. Obecność przerzutów w narządach trzewnych (otrzewnej, nadnerczach, jelicie, nerkach, skórze, wątrobie i mózgu) stwierdzono po podaniu linii komórek nowotworowych do układu krążenia. Nie wykazano różnic statystycznych w częstości występowania przerzutów do narządów trzewnych w obu badanych grupach ($\beta_3^{+/+}$ i $\beta_3^{-/-}$). Histomorfometryczna analiza kości beleczkowej wykazała, że bezpośrednie podanie komórek nowotworowych do kości piszczelowej powoduje jej znaczną destrukcję w grupie myszy $\beta_3^{+/+}$, w porównaniu do grupy kontrolnej, której wstrzyknięto roztwór soli fizjologicznej. Nie obserwowano destrukcji kości w grupie myszy $\beta_3^{-/-}$.

Z doświadczenia wynika, że myszy $\beta_3^{-/-}$ są chronione przed powstawaniem przerzutów osteolitycznych, także po bezpośrednim podaniu komórek nowotworowych do jamy szpikowej. Na tej podstawie autorzy doświadczenia wysunęli przypuszczenie, że u myszy $\beta_3^{-/-}$ nie powstają przerzuty nowotworowe z powodu nieprawidłowej funkcji osteoklastów bądź płytek krwi [5].

Aby wykluczyć, że za zjawisko oporności na powstawanie przerzutów u myszy $\beta_3^{-/-}$ mogą być odpowiedzialne inne rodzaje komórek zaplanowano kolejne doświadczenie, w którym myszom WT przeszczepiano szpik kostny myszy $\beta_3^{-/-}$ oraz myszom $\beta_3^{-/-}$ szpik kostny myszy WT, po uprzednim naświetlaniu biorców szpiku letalną dawką promieniowania γ , aby zniszczyć komórki szeregu hemopoetycznego. Szpik kostny przeszczepiano 3 tygodnie po napromienieniu, po normalizacji liczby krwinek oraz czasu krwawienia; następnie do lewej komory serca podano ponownie komórki czerniaka B16. W doświadczeniu udowodniono, że przeszczep szpiku kostnego u myszy $\beta_3^{-/-}$ chroni przed rozwojem przerzutów osteolitycznych w kościach, co potwierdza, że za brak powstawania przerzutów u myszy $\beta_3^{-/-}$ odpowiedzialne są płytki krwi, bądź wywodzące się z komórek hemopoetycznych osteoklasty.

Kolejnym etapem eksperymentu było wyjaśnienie, czy za opisane zjawisko u myszy $\beta_3^{-/-}$ odpowiada defekt osteoklastów, i czy za zjawisko to odpowiada defekt agregacji PLT. W badaniu wykorzystano myszy $scr^{-/-}$, z defektem osteoklastów, u których stwierdza się prawidłową agregację płytek krwi, mierzoną prawidłowym czasem krwawienia. Mysiom $scr^{-/-}$ oraz $scr^{+/+}$ (bez defektu osteoklastów) podano do lewej komory serca komórki czerniaka B16. W badaniu histomorfometrycznym wykazano obecność guza niszczącego kość beleczkową u myszy $\beta_3^{+/+}$, w porównaniu z grupą kontrolną, w grupie zwierząt $\beta_3^{-/-}$ uzyskano niewielką destrukcję kostną. Można zatem przypuszczać, że do powstania przerzutów nowotworowych i związanej z nimi osteolizy konieczna jest obecność prawidłowo funkcjonujących osteoklastów.

ML464 jest doustnie podawanym antagonistą mysich receptorów płytkowych GP IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), o okresie półtrwania 3 godziny, metabolizowanym w wątrobie do aktywnej postaci ML728. Po doustnym podaniu 100 mg/kg m.c. powoduje on agregację płytek, we krwi utrzymuje się około 10 godzin. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że zablokowanie receptora GP IIb/IIIa hamuje zależne od PLT łączenie z fibrynogenem [138]. Związek ten użyto w doświadczeniu, którego celem było określenie wpływu antagonistów receptorów płytkowych IIb/IIIa na powstawanie przerzutów nowotworowych u myszy $\beta_3^{+/+}$ [145]. Mysiom $\beta_3^{+/+}$ podano komórki czerniaka B16, aby wywołać u nich chorobę nowotworową; 30 minut przed podaniem komórek B16 w grupie badanej podano antagonistę receptora płytkowego GP IIb/IIIa w dawce 100 mg/kg m.c., a grupie kontrolnej placebo. U 35% (14/40) myszy wystąpiło śmiertelne krwawienie. U 6% (1/17) myszy otrzymujących placebo wystąpiły śmiertelne powikłania po podaniu komórek B16. W grupie zwierząt, które przeżyły wśród tych, które otrzymały inhibitor receptorów płytkowych GP IIb/IIIa wykazano znacznie niższą częstość przerzutów nowotworowych do kości (23%), w porównaniu do grupy, która otrzymała placebo (76%), a także mniej przerzutów do narządów miękkich w obu badanych grupach [5].

U pacjentów z uogólnioną chorobą nowotworową (w tym z przerzutami do kości) farmakologiczna blokada osteoklastów gospodarza bifosforanami zmniejsza destrukcję kostną, związaną z rozrostem guza [24]. Brak osteolizy i przerzutów nowotworowych w kościach u myszy $\beta_3^{-/-}$ oraz $scr^{-/-}$ pozwala przypuszczać, że osteoklasty są ważnymi komórkami w rozwoju procesu nowotworowego w kościach, wskazując na Scr oraz $\alpha_{IIb}\beta_3$ jako na potencjalnie terapeutyczne czynniki przeciwnowotworowe. W przeciwieństwie do myszy $scr^{-/-}$, u myszy $\beta_3^{-/-}$ brak rozwoju przerzutów w kościach zależy również od hamowania migracji komórek nowotworowych do kości. Może to wskazywać, że powstanie przerzutów nowotworowych nie jest uwarunkowane wyłącznie dysfunkcją osteoklastów, lecz może wymagać obecności integryny β_3 na powierzchni komórek gospodarza. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, ze względu na brak powstawania przerzutów nowotworowych u biorców szpiku w opisanym doświadczeniu. Procentowy odsetek przerzutów nowotworowych po przeszczepieniu szpiku jest niższy niż przerzutów trzewnych, być może ze względu na niekorzystne dla wzrostu nowotworów mikrośrodowisko kości [5].

Bakewell i wsp. wykazali, że antagoniści mysich receptorów płytkowych GP IIb/IIIa spełniają ochronną rolę w powstawaniu przerzutów nowotworowych, zarówno w kościach, jak i w narządach trzewnych, uniemożliwiając interakcje między płytkami, ale też między płytkami i komórkami guza nowotworowego. Funkcję płytek krwi w chorobie nowotworowej badano wielokrotnie. W kilku badaniach wykazano krzyżowe reakcje płytek z antygenami komórek nowotworowych, co mogło powodować progresję choroby nowotworowej [39,73]. Natomiast część autorów podkreśla korzystny wpływ inhibitorów receptorów płytkowych GP IIb/IIIa – ML464 w niszczeniu połączeń płytek krwi z guzem nowotworowym. Możliwych jest kilka interakcji płytek z guzem nowotworowym odpowiedzialnych za powstawanie przerzutów nowotworowych:

- komórki nowotworowe łączą się z płytkami, które ulegają adhezji do uszkodzonego śródbłonka naczyń i w ten sposób przyczyniają się do powstawania przerzutów odległych;

- agregacja PLT z komórkami nowotworowymi prowadzi do parakrynej regulacji proliferacji i wzrostu komórek nowotworowych;
- antygeny komórek nowotworowych opłaszczone PLT mogą być chronione przed rozpoznawaniem przez układ immunologiczny gospodarza;
- komórki nowotworowe opłaszczone PLT oraz skrzep mogą mechanicznie rozsiewać komórki nowotworowe w organizmie [5].

Myszy otrzymujące inhibitor receptora płytkowego GP IIb/IIIa oraz myszy $\beta_3^{-/-}$ są chronione przed powstawaniem przerzutów nowotworowych w kościach, natomiast u myszy $\beta_3^{-/-}$ po podaniu ML464 stwierdzono dodatkowo mniejszy odsetek przerzutów narządowych. Różnica ta może wynikać z tego, że:

- powstawanie przerzutów trzewnych zależy w większym stopniu od naczyńotworzenia, niż w przypadku przerzutów do kości; za regulację angiogenezy u myszy $\beta_3^{-/-}$ odpowiada śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń za pośrednictwem „up” regulacji;
- nieswoista aktywacja ML464 może wpływać na przerzutowanie;
- do doświadczenia z użyciem antagonistów receptorów GP IIb/IIIa użyto innego szczepu myszy (C57B6), niż do pozostałych doświadczeń (C57B6/129) [5].

WPLYW PMV NA HEMOPOEZĘ

PMV wywołują wiele działań biologicznych, aktywując różne komórki docelowe poprzez ich białka powierzchniowe np.: CD154, RANTES i/lub PF-4 [7,10] oraz lipidy: sfingozynę SIP, kwas arachidonowy [32,94,124,139,141], modulują aktywność biologiczną poprzez transport cząsteczek adhezyjnych, receptorów czynników wzrostu i chemokin.

W fizjologicznych warunkach we krwi obwodowej poza komórkami krwi obwodowej są również obecne krążące PMV. W wielu badaniach udowodniono, że liczba krążących PMV rośnie w stanach patologicznych, takich jak: posocznica [98], trombocytopenia wywołana heparyną (HIT) [58], a także podczas leukoferezy [7,26,30], oraz że leukofereza powoduje gęste opłaszczenie prekursorowych komórek hemopoetycznych cząsteczkami PMV [64].

Na podstawie tych obserwacji wysunięto przypuszczenie, że PMV mogą spełniać istotną rolę w hemopoizie, a także, że są ważnymi cząsteczkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału niezbędnego do aktywacji komórek hemopoetycznych.

Celem wyjaśnienia wpływu PMV na hemopoizę Baj-Krzyworzeka i wsp. przeprowadzili doświadczenie, w którym:

- (1) fenotypowano ekspresję różnych cząsteczek adhezyjnych na ludzkich PMV;
- (2) badano zależny od PMV transport cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek hemopoetycznych;
- (3) badano bezpośredni wpływ na chemotaksję, adhezję, przeżycie i proliferację prawidłowych i nowotworowych ludzkich komórek hemopoetycznych;
- (4) badano przekazywanie sygnału do komórek aktywowane przez PMP (MAPK p42/44, PI-3K-AKT, białko Jak-STAT) [4].

Używając FACS wykazano, że na powierzchni PMV poza cząsteczką CD41 (integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$) oraz CD62P (selektyna P) znajdują się jeszcze inne cząsteczki adhezyjne: receptor chemokin CXCR4, receptor trombiny PAR-1, antygen CD154 (ligand cząsteczki CD40), płytkowy czynnik 4 (PF-4), ponadto cytokinowe receptory: TNF-RI, TNF-RII, CD95. W zależności od czynnika aktywującego płytki na powierzchni PMV pojawiają się określone cząsteczki adhezyjne, charakterystyczne dla czynnika aktywującego. Wykazano, że kilka z wymienionych wyżej receptorów może być transportowanych na powierzchnię prawidłowych i nowotworowych komórek hemopoetycznych z udziałem PMV [51]. PMV działają chemotaktycznie na prekursorowe komórki hemopoety (samodzielnie lub ze sfingozyną 1 i kwasem arachidonowym) [12,32,95,124,141]. Na kilku eksperymentalnych modelach stwierdzono, że nienasycone kwasy tłuszczowe mogą być czynnikami wyzwajającymi apoptozę [124] oraz inhibitorami proliferacji komórek [139]. Wyniki otrzymane przez Baj-Krzyworzeka wskazują, że aktywność PMV jest związana z obecnością białek wysokocząsteczkowych, natomiast biologiczne efekty powodowane przez PMV zostają tylko częściowo zmniejszone po inaktywacji cieplnej, a także po trawieniu trypsyną wskazując, że poza białkowymi komponentami PMV także lipidy wchodzące w ich skład są odpowiedzialne za ich aktywność biologiczną [4].

PMV wzmagają proliferację i adhezję ludzkich prekursorowych komórek krwiotwórczych do fibrynogenu (włączając w to komórki CD34⁺). Zjawisko to zachodzi najprawdopodobniej z udziałem cząsteczki adhezyjnej CD41 (integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$). Ponadto hamują apoptozę tych komórek, dzięki białkom i/lub aktywnym lipidom PMV. Jednym z wielu czynników odpowiedzialnych za pobudzanie proliferacji ludzkich prekursorowych komórek krwiotwórczych jest prawdopodobnie cząsteczka CD40 ligand (CD154), obecna na powierzchni PMV, która być może odpowiada za powrót czynności układu immunologicznego oraz hemopoizy po przeszczepieniu szpiku kostnego. PMV dodatkowo aktywują kaskadę przekazywania sygnału do wnętrza komórki poprzez cząsteczki MAPK p42/44, PI-3K-AKT (w nowotworowych i prawidłowych komórkach hemopoizy), białko STAT, co skutkuje proliferacją i przeżyciem komórek [32,94,124,139,141].

Na podstawie tych obserwacji sugeruje się, że PMV obecne w dużym stężeniu w tkankach, w których toczy się aktywny proces zapalny działają chemotaktycznie na komórki układu odpornościowego – monocyty, komórki NK, limfocyty T, limfocyty B i modyfikują adhezję fibrynogenu do ludzkich komórek hemo/limfopoetycznych [4].

SELEKTyna P, CZYNNIK TKANKOWY, RECEPTORY PŁYTKOWE GP IIb/IIIa

Aktywacja płytek krwi powoduje nie tylko agregację płytek, ale także adhezję płytek do monocytów i neutrofilów, w której główną rolę odgrywa selektyna P (CD62P). Selektyna P obecna na powierzchni aktywowanych płytek łączy się ze swoim ligandem PSGL-1, obecnym na powierzchni leukocytów [42,110,122]. Poza CD62P oraz PSGL-1, inne cząsteczki adhezyjne takie jak: fibrynogen, integryna β_2 biorą udział w adhezji płytek do leukocytów [74,122]. Połączenie płytek z leukocytami powoduje zmianę funkcji komórek, zaczynają one wytwarzać leukotrieny oraz prozapalne cytokiny [85,131,138].

Na powierzchni aktywowanych płytek i PMV są obecne różne receptory, umożliwiające oddziaływanie z innymi komórkami [13,121]. Wykryto obecność czynnika tkankowego (TF – tissue factor), który jest najważniejszym czynnikiem inicjującym wewnątrzznaczyniowe krzepnięcie [17,118,120,146]. TF bierze udział w powstawaniu czynnika VII/VIIa i aktywnego kompleksu czynnika X. W fizjologicznych warunkach TF nie jest obecny we krwi obwodowej, natomiast ekspresję TF na powierzchni monocytów i komórek śródbłonna wzmacnia obecność endotoksyn bakteryjnych oraz cytokin prozapalnych. TF nie ma na granulocytach obojętnochłonnych [18,100], chociaż istnieją sprzeczne dane sugerujące, że adhezja płytek z neutrofilami powoduje wzrost ekspresji TF na ich powierzchni [42,100,146]. Wzrost TF w osoczu obserwuje się w pewnych stanach klinicznych, np. w ostrych zespołach wieńcowych, posocznicy [35,76,123,133].

Aktywacja płytek jest czynnikiem niezbędnym do ekspresji TF na monocytach. Ekspresja TF na monocytach wymaga obecności CD62P. Interakcja między płytkami a monocytami aktywuje ekspresję genu i syntezę TF *de novo* [41]. Ostatnie badania wskazują, że płytki i PMV mają zdolność transportu TF na powierzchnię monocytów [118,144,146].

Obserwacje chorych po przeszczepieniu macierzystych komórek krwiotwórczych wykazały, że czynnik tkankowy (TF) był związany głównie z pulą jednojądrowych komórek krwi, ale w fazie ostrej leukopenii z pulą płytek krwi [116].

Celem wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za interakcję PMV z monocytami oraz ekspresję TF Scholz i wsp. [144] zaplanowali doświadczenie, w którym badano wpływ antagonisty receptora IIb/IIIa – eptifibatidu na powstawanie połączeń między płytkami krwi a leukocytami oraz ekspresję leukocytarnego czynnika wzrostu. Używając cytometrii przepływowej, po 30 min ekspozycji krwi ludzkiej na kolagen, określano ilościowo liczbę połączeń płytkowo-neutrofilowych (P/N) oraz płytek z monocytami (P/M). Dla P/M charakterystyczny był 2,5-krotny wzrost ekspresji TF na monocytach, natomiast na P/N ekspresja TF zmieniła się tylko o 10%. Eptifibatid hamuje powstawanie połączeń monocytów z PLT w stężeniu 1,5 µg/ml, które przez większość autorów jest uważane za stężenie farmakologiczne.

Płytki krwi mają na swojej powierzchni TF, który wykrywany jest również na powierzchni monocytów, po połączeniu monocytów z płytkami krwi przez CD62P. Przeciwciała przeciwko CD62P hamują nie tylko ekspresję TF na powierzchni monocytów, po ekspozycji krwi na kolagen [17,144], ale także hamują powstawanie trombiny i fibryny po aktywacji płytek [17,144]. W doświadczeniu obserwowano wzrost połączeń PLT z monocytami oraz ekspresji TF po podaniu antagonisty receptora płytkowego GP IIb/IIIa – eptifibatidu, w zależności od dawki leku. Otrzymane wyniki mogą sugerować, że powstawanie połączeń PLT z monocytami oraz ekspresja TF na powierzchni monocytów mogą być odpowiedzialne za brak efektu przeciwkrzepliwego po zastosowaniu doustnych antagonistów receptorów GP IIb/IIIa (np.: orbofiban, xemilofiban, sibrafin) u ludzi, ponieważ w badaniach *in vivo* wykazano, że zjawisko może być odpowiedzialne za formowanie skrzepliny, mimo podania leku z grupy inhibitorów receptorów GP IIb/IIIa [21].

Lösche i wsp. [83] określali zależność między płytkami krwi, monocytami i neutrofilami, a także zależność między aktywacją leukocytów i ekspresją czynnika tkankowego. Po inkubacji bogatopłytkowego osocza z kolagenem, używając FACS (fluorescence activated cell sorting) analizowano obecność CD42a oraz TF (antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla płytek na monocytach i neutrofilach). W przeprowadzonym doświadczeniu, podobnie jak i w wielu innych badaniach doświadczalnych, stwierdzono obecność TF na płytkach krwi po aktywacji kolagenem. W porównaniu do grupy kontrolnej wykazano znaczący wzrost liczby cząsteczek CD42a na powierzchni monocytów i granulocytów obojętnochłonnych. Wykazano dwukrotny wzrost ekspresji TF na monocytach, jednocześnie nie uzyskując ekspresji TF na powierzchni granulocytów obojętnochłonnych. Obecność przeciwciał anti-CD42a znacznie zmniejsza ekspresję cząsteczki CD42a oraz TF na powierzchni monocytów.

W obecności różnych antagonistów receptorów GP IIb/IIIa dochodzi do zwiększonej agregacji płytek krwi do leukocytów mierzonej zwiększoną ekspresją cząsteczek CD42a na neutrofilach i monocytach [83,144]. Przyleganie płytek krwi do leukocytów powoduje aktywację leukocytów [36,131], niezależną od obecności selektyny P, lecz wyłącznie od aktywacji płytek krwi „odsłoniętym” kolagenem.

Przedmiotem doświadczenia zaplanowanego przez Zhao i wsp. [145] było również tworzenie połączeń między płytkami i leukocytami oraz udział cząsteczek adhezyjnych: CD62P, TF oraz CD40 ligand (CD40L) w kształtowaniu tych oddziaływań. Badano obecność CD62P, TF oraz CD40L przy połączeniach leukocytów z płytkami krwi w obecności antagonisty receptora płytkowego GP IIb/IIIa – MK-852 oraz wpływ EDTA na ukształtowane wcześniej połączenia. Używając cytometrii przepływowej wykazano zwiększoną ekspresję wszystkich badanych cząsteczek adhezyjnych po połączeniu płytek krwi z leukocytami, zwiększoną w przypadku połączeń monocytowo-płytkowych. Zauważono znaczny wzrost tworzenia połączeń leukocytów z płytkami w obecności inhibitora receptorów płytkowych GP IIb/IIIa, poprzez hamowanie agregacji płytek krwi i możliwość wiązania się płytek z innymi komórkami. Dodanie EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, czyli kwas etylenodiaminotetraoctowy) powodowało wyparcie leukocytów z połączeń PLT z leukocytami, podobny wynik uzyskano dla cząsteczek adhezyjnych w tych połączeniach, natomiast nie wykazano wpływu EDTA na połączenia selektyny P oraz CD40L między PLT. Wcześniejsze badania wskazują, że do tworzenia połączeń płytek z leukocytami z udziałem selektyny P wymagana jest obecność jonów Ca^{2+} [47,69]. Połączenie jonów Ca^{2+} z selektyną P powoduje konformacyjne zmiany w domenie lektynowej, uwalniając leukocyty na adhezję. Dodanie do badanego materiału EDTA powoduje rozerwanie połączeń między leukocytami a płytkami krwi; natomiast niewielka liczba wcześniej utworzonych połączeń pozostaje nierozzerwana i wykrywa się ją za pomocą cząsteczki CD42a. Wskazuje to, że selektyna P oraz jony Ca^{2+} powodują powstawanie niezależnych połączeń płytek z leukocytami. Zależną od jonów Ca^{2+} adhezję płytek i monocytów krwi obserwuje się u chorych z ostrym zespołem wieńcowym [117].

PODSUMOWANIE

Coraz więcej danych wskazuje, że PLT odgrywają rolę nie tylko w krzepnięciu krwi, ale także w regulacji odp-

wiedzi immunologicznej i nowotworzeniu. Konieczne są dalsze badania, które mogą doprowadzić do opracowa-

nia nowych form immunomodulacji w oparciu o oddziaływanie na PLT.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abreu M.T., Thomas L.S., Arnold E.T., Lukasek K., Michelsen K.S., Arditi M.: TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J. Endotoxin. Res.*, 2003; 9: 322–330
- [2] Amirkhosravi A., Alexander M., May K., Francis D.A., Warnes G., Biggerstaff J., Francis J.L.: The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb. Haemost.*, 1996; 75: 87–95
- [3] Andonegui G., Kerfoot S.M., McNaghy K., Ebbert K.V., Patel K.D., Kubus P.: Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 2005; 106: 2417–2423
- [4] Baj-Krzyworzeka M., Majka M., Pratico D., Ratajczak J., Vilaire G., Kijowski J., Reca R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z.: Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol.*, 2002; 30: 450–459
- [5] Bakewell S.J., Nestor P., Prasad S., Tomasson M.H., Dowland N., Mehrotra M., Scarborough R., Kanter J., Abe K., Phillips D., Weibaecker K.N.: Platelet and osteoclast beta3 integrins are critical for bone metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 14205–14210
- [6] Bargatze R.F., Kurk S., Butcher E.C., Jutila M.A.: Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J. Exp. Med.*, 1994; 180: 1785–1792
- [7] Barry O.P., FitzGerald G.A.: Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb. Haemost.*, 1999; 82: 794–800
- [8] 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. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7545–7556
- [9] Barry O.P., Pratico D., Lawson J.A., FitzGerald G.A.: Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2118–2127
- [10] Barry O.P., Pratico D., Savani R.C., FitzGerald G.A.: Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.*, 1998; 102: 136–144
- [11] Beaudoin A.R., Grondin G.: Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cell: different cellular phenomena. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1071: 203–219
- [12] Berndt M.C., Shen Y., Doppeide S.M., Gardiner E.E., Andrews R.K.: The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb. Haemost.*, 2001; 86: 178–188
- [13] Bode A.P., Hickerson D.H.: Characterization and quantitation by flow cytometry of membranous microparticles formed during activation of platelet suspensions with ionophore or thrombin. *Platelets*, 2000; 11: 259–271
- [14] Brash A.R.: Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J. Clin. Invest.*, 2001; 107: 1339–1345
- [15] Brinckerhoff C.E., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2002; 3: 207–214
- [16] Brooks P.C., Clark R.A., Cheresh D.A.: Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 1994; 264: 569–571
- [17] Camera M., Frigerio M., Toschi V., Brambilla M., Rossi F., Cottell D.C., Maderia P., Parolari A., Bonzi R., De Vincenti O., Tremoli E.: Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23: 1690–1696
- [18] Camerer E., Kolsto A.B., Prydz H.: Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb. Res.*, 1996; 81: 1–41
- [19] Carty E., MacEay M., Rampton D.S.: Inhibition of platelet activation by 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2000; 14: 1169–1179
- [20] Celi A., Pellegrini G., Lorenzet R., De Blasi A., Ready N., Furie B.C., Furie B.: P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 8767–8771
- [21] Chew D.P., Bhatt D.L., Sapp S., Topol E.J.: Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation*, 2001; 103: 201–206
- [22] Chuang T., Ulevitch R.J.: Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1518: 157–161
- [23] Cognasse F., Hamzeh H., Chavarin P., Acquart S., Genin C., Garraud O.: Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell. Biol.*, 2005; 83: 196–198
- [24] Coleman R.E.: Future directions in the treatment and prevention of bone metastases. *Am. J. Clin. Oncol.*, 2002; 25(Suppl.1): S32–S38
- [25] Collins C.E., Cahill M.R., Newland A.C., Rampton D.S.: Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1994; 106: 840–845
- [26] Combes V., Simon 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. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 93–102
- [27] Dainiak N.: Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation, and growth. *Blood*, 1991; 78: 264–276
- [28] Denzer K., Kleijmeer M.J., Heijnen H.F., Stoorvogel W., Geuze H.J.: Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell. Sci.*, 2000; 19: 3365–3374
- [29] Egeblad M., Werb Z.: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 161–174
- [30] Elzey B.D., Grant J.F., Sinn H.W., Nieswandt B., Waldschmidt T.J., Ratliff T.L.: Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4⁺ T cells for enhanced germinal center formation. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 78: 80–84
- [31] Elzey B.D., Tian J., Jensen R.J., Swanson A.K., Lees J.R., Lentz S.R., Stein C.S., Nieswandt B., Wang Y., Davidson B.L., Ratliff T.L.: Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*, 2003; 19: 9–19
- [32] English D., Garcia J.G., Brindley D.N.: Platelet-released phospholipids link haemostasis and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.*, 2001; 49: 588–599
- [33] English D., Welch Z., Kovala A.T., Harvey K., Volpert O.V., Brindley D.N., Garcia J.G.: Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.*, 2000; 14: 2255–2265
- [34] Escola J.M., Kleijmeer M.J., Stoorvogel W., Griffith J.M., Yoshie O., Geuze H.J.: Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 20121–20127
- [35] Esmon C.T.: Inflammation and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, 2003; 1: 1343–1348
- [36] Evangelista V., Manarini S., Sideri R., Rotondo S., Martelli N., Piccoli A., Totani L., Piccardoni P., Vestweber D., de Gaetano G., Cerletti C.: Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*, 1999; 93: 876–885
- [37] Evangelista V., Rajtar G., de Gaetano G., White J.G., Cerletti C.: Platelet activation by fMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes: the activity of cathepsin G is not prevented by antiproteinases. *Blood*, 1991; 77: 2379–2388
- [38] Feng X., Novack D.V., Faccio R., Ory D.S., Aya K., Boyer M.I., McHugh K.P., Ross F.P., Teitelbaum S.L.: A Glanzmann's mutation in beta 3 integrin specifically impairs osteoclast function. *J. Clin. Invest.*, 2001; 107: 1137–1144
- [39] Francis J.L., Amirkhosravi A.: Effect of antihemostatic agents on experimental tumor dissemination. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2002; 28: 29–38
- [40] Forlow S.B., McEver R.P., Nollert M.U.: Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 2000; 95: 1317–1323
- [41] Furie B., Furie B.C.: P-selectin induction of tissue factor biosynthesis and expression. *Haemostasis*, 1996; 26(Suppl.1): 60–65
- [42] Furie B., Furie B.C.: The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb. Haemost.*, 1995; 74: 224–227

- [43] Furman M.I., Barnard M.R., Krueger L.A., Fox M.L., Shilale E.A., Lessard D.M., Marchese P., Frelinger A.L. III, Michelson A.D.: Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2001; 38: 1002–1006
- [44] Furman M.I., Benoit S.E., Barnard M.R., Valeri C.R., Borbone M.L., Becker R.C., Hechtman H.B., Michelson A.D.: Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1998; 31: 352–358
- [45] Gawaz M., Fateh-Moghadam S., Pilz G., Gurland H.J., Werdan K.: Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1995; 25: 843–851
- [46] Gawaz M.P., Mujais S.K., Schmidt B., Gurland H.J.: Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney Int.*, 1994; 46: 489–495
- [47] Geng J.G., Moore K.L., Johnson A.E., McEver R.P.: Neutrophil recognition requires a Ca(2+)-induced conformational change in the lectin domain of GMP-140. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 22313–22318
- [48] George J.N., Thoi L.L., McManus L.M., Reimann T.A.: Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*, 1982; 60: 834–840
- [49] Ginestra A., Miceli D., Dolo V., Romano F.M., Vittorelli M.L.: Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res.*, 1999; 19: 3439–3445
- [50] Harries A.D., Fitzsimons E., Fifield R., Dew M.J., Rhoades J.: Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease. *Br. Med. J.*, 1983; 286: 1476
- [51] Heijnen H.F., 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. *Blood*, 1999; 94: 3791–3799
- [52] Hodivala-Dilke K.M., McHugh K.P., Tsakiris D.A., Rayburn H., Crowley D., Ullman-Cullere M., Ross F.P., Collier B.S., Teitelbaum S., Hynes R.O.: Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.*, 1999; 103: 229–238
- [53] Honn K.V., Tang D.G., Chen Y.Q.: Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1992; 18: 392–415
- [54] Hood J.D., Cheresh D.: A role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 91–100
- [55] Horne M.W., Normark B.H., Vandewalle A., Normark S.: Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 1225–1235
- [56] Hrachovinova I., Cambien B., Hafezi-Moghadam A., Kappelmayer J., Camphausen R.T., Widom A., Xia L., Kazazian H.H. Jr, Schaub R.G., McEver R.P., Wagner D.D.: Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat. Med.*, 2003; 9: 1020–1025
- [57] Hugel B., Socie G., Vu T., Toti F., Gluckman E., Freyssinet J.M., Scrobohaci M.L.: Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*, 1999; 93: 3451–3456
- [58] Hughes M., Hayward C.P., Warkentin T.E., Horsewood P., Chorneyko K.A., Kelton J.G.: Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 2000; 96: 188–194
- [59] Hynes R.O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002; 110: 673–687
- [60] Iannaccone M., Sitia G., Isogawa M., Marchese P., Castro M.G., Lowenstein P.R., Chisari F.V., Ruggeri Z.M., Guidotti L.G.: Platelets mediate cytotoxic T lymphocyte-induced liver damage. *Nat. Med.*, 2005; 11: 1167–1169
- [61] Imler J.L., Hoffmann J.A.: Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell. Biol.*, 2001; 11: 304–311
- [62] Irving P.M., Macey M.G., Shah U., Webb L., Langmead L., Rampton D.S.: Formation of platelet-leukocyte aggregates in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2004; 10: 361–372
- [63] Janowska-Wieczorek A., Majka M., Kijowski J., Baj-Krzyworzeka M., Reza R., Turner A.R., Ratajczak J., Emerson S.G., Kowalska M.A., Ratajczak M.Z.: Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, 2001; 98: 3143–3149
- [64] Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer*, 2005; 113: 752–760
- [65] Jaremo P., Sandberg-Gertzen H.: Platelet density and size in inflammatory bowel disease. *Thromb. Haemost.*, 1996; 75: 560–561
- [66] 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. *Br. J. Haematol.*, 2001; 112: 81–90
- [67] Joseph J.E., Harrison P., Mackie I.J., Isenberg D.A., Machin S.J.: Increased circulating platelet-leukocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol.*, 2001; 115: 451–459
- [68] Jung T.W., Spycher M.O., Nydegger U.E., Barandun S.: Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood*, 1986; 67: 629–636
- [69] Kaplar M., Kappelmayer J., Kiss A., Szabo K., Udvardy M.: Increased leukocyte-platelet adhesion in chronic myeloproliferative disorders with high platelet counts. *Platelets*, 2000; 11: 183–184
- [70] Kapsoritakis A.N., Koukourakis M.I., Sfiridaki A., Potamianos S.P., Kosmadaki M.G., Koutroubaki I.E., Kouroumalis E.A.: Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. *Am. J. Gastroenterol.*, 2001; 96: 776–781
- [71] Karparkin S., Pearlstein E., Ambrogio C., Collier B.S.: Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction *in vitro* and metastasis formation *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 1988; 81: 1012–1019
- [72] Koga H., Sugiyama S., Kugiyama K., Watanabe K., Fukushima H., Tanaka T., Sakamoto T., Yoshimura M., Jinnouchi H., Ogawa H.: Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2005; 45: 1622–1630
- [73] Kuijper P.H., Gallardo Torres H.I., Lammers J.W., Sixma J.J., Koenderman L., Zwaginga J.J.: Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions. *Thromb. Haemost.*, 1998; 804: 443–448
- [74] Kurose I., Granger D.N., Evans D.J. Jr, Evans D.G., Graham D.Y., Miyasaka M., Anderson D.C., Wolf R.E., Cepinskas G., Kvietys P.R.: Helicobacter pylori-induced microvascular protein leakage in rats: role of neutrophils, mast cells, and platelets. *Gastroenterology*, 1994; 107: 70–79
- [75] Kurose I., Pothoulakis C., LaMont J.T., Anderson D.C., Paulson J.C., Miyasaka M., Wolf R., Granger D.N.: Clostridium difficile toxin A-induced microvascular dysfunction. Role of histamine. *J. Clin. Invest.*, 1994; 94: 1919–1926
- [76] Leatham E.W., Bath P.M., Toole J.A., Camm A.J.: Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Br. Heart J.* 1995; 73: 10–13
- [77] Lehr H.A., Weyrich A.S., Saetzler R.K., Jurek A., Arfors K.E., Zimmerman G.A., Prescott S.M., McIntyre T.M.: Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99: 2358–2364
- [78] Li N., Goodall A.H., Hjendahl P.: A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leukocyte aggregates. *Br. J. Haematol.*, 1997; 99: 808–816
- [79] Li N., Goodall A.H., Hjendahl P.: Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. *Cytometry*, 1999; 35: 154–161
- [80] Li N., Wallen N.H., Hjendahl P.: Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation*, 1999; 100: 1374–1379
- [81] Lindmark E., Tenno T., Siegbahn A.: Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocyte tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2000; 20: 2322–2328
- [82] Lösche W., Scholz T., Temmler U., Oberle V., Claus R.A.: Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*, 2004; 15: 109–115
- [83] Macey M., Azam U., McCarthy D., Webb L., Chapman E.S., Okrongly D., Zelmanovic D., Newland A.: Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyrindamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin. Chem.*, 2002; 48: 891–899
- [84] Maugeri N., Evangelista V., Celardo A., Dell'Elba G., Martelli N., Piccardoni P., de Gaetano G., Cerletti C.: Polymorphonuclear leukocyte-platelet interaction: role of P-selectin in thromboxane B2 and leukotriene C4 cooperative synthesis. *Thromb. Haemost.*, 1994; 72: 450–456
- [85] McCarty O.J., Mousa S.A., Bray P.F., Konstantopoulos K.: Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. *Blood*, 2000; 96: 1789–1797

- [86] McHugh K.P., Hodivala-Dilke K., Zheng M.H., Namba N., Lam J., Novack D., Feng X., Ross F.P., Hynes R.O., Teitelbaum S.L.: Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 433-440
- [87] Mesri M., Altieri D.C.: Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 23111-23118
- [88] Michelson A.D., Furman M.I.: Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr. Opin. Hematol.*, 1999; 6: 342-348
- [89] Mickelson J.K., Lakkis N.M., Villarreal-Levy G., Hughes B.J., Smith C.W.: Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1996; 28: 345-353
- [90] Miyamoto S., Kowalska M.A., Marcinkiewicz C., Marcinkiewicz M.M., Mosser D., Edmunds L.H. Jr., Niewiarowski S.: Interaction of leukocytes with platelet microparticles derived from outdated platelet concentrates. *Thromb. Haemost.*, 1998; 80: 982-988
- [91] Miyamoto S., Marcinkiewicz C., Edmunds L.H. Jr., Niewiarowski S.: Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb. Haemost.*, 1998; 80: 225-230
- [92] Montruccio G., Bosco O., Del Sorbo L., Fascio Pecetto P., Lupia E., Goffi A., Omede P., Emanuelli G., Camussi G.: Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopoly-saccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.*, 2003; 90: 872-881
- [93] Morales-Ruiz M., Lee M.J., Zollner S., Gratton J.P., Scotland R., Shiojima I., Walsh K., Hla T., Sessa W.C.: Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 19672-19677
- [94] Morowitz D.A., Allen L.W., Kirsner J.B.: Thrombocytosis in chronic inflammatory bowel disease. *Ann. Intern. Med.*, 1968; 68: 1013-1110
- [95] Muzio M., Bosio D., Polentarutti N., D'amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A.: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.*, 2000; 164: 5998-6021
- [96] Nash G.F., Turner L.F., Scully M.F., Kakkar A.K.: Platelets and cancer. *Lancet Oncol.*, 2002; 3: 425-430
- [97] Nawrocki B., Polette M., Marchand V., Monteau M., Gillery P., Tournier J.M., Birembaut P.: Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *Int. J. Cancer.*, 1997; 72: 556-564
- [98] Neumann F.J., Marx N., Gawaz M., Brand K., Ott I., Rokitta C., Sticherling C., Meinel C., May A., Schomig A.: Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*, 1997; 95: 2387-2394
- [99] Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S., Boing A.N., Romijn F.P., Westendorp R.G., Hack C.E., Sturk A.: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 2000; 95: 930-935
- [100] Osterud B., Rao L.V., Olsen J.O.: Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb. Haemost.*, 2000; 83: 861-867
- [101] Ott I., Neumann F.J., Gawaz M., Schmitt M., Schomig A.: Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*, 1996; 94: 1239-1246
- [102] Page C.P.: Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology*, 1989; 17: 51-59
- [103] Palecanda A., Walcheck B., Bishop D.K., Jutila M.A.: Rapid activation-independent shedding of leukocyte L-selectin induced by cross-linking of the surface antigen. *Eur. J. Immunol.*, 1992; 22: 1279-1286
- [104] Pearlstein E., Ambrogio C., Karparkin S.: Effect of antiplatelet antibody on the development of pulmonary metastases following injection of CT26 colon adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma, and B16 amelanotic melanoma tumor cells into mice. *Cancer Res.*, 1984; 44: 3884-3887
- [105] Peters M.J., Dixon G., Kotowicz K.T., Hatch D.J., Heyderman R.S., Klein N.J.: Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br. J. Haematol.*, 1999; 106: 391-399
- [106] Peters M.J., Heyderman R.S., Hatch D.J., Klein N.J.: Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1997; 209: 125-135
- [107] Pivarcsi A., Bodai L., Rethi B., Kenderessy-Szabo A., Koreck A., Szell M., Beer Z., Bata-Csorgoo Z., Magocsi M., Rajnavolgyi E., Dobozy A., Kemeny L.: Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int. Immunol.*, 2003; 15: 721-730
- [108] Renshaw B.R., Fanslow W.C. III, Armitage R.J., Campbell K.A., Liggitt D., Wright B., Davison B.L., Maliszewski C.R.: Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1994; 180: 1889-1900
- [109] Rinder C.S., Bonan J.L., Rinder H.M., Mathew J., Hines R., Smith B.R.: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood*, 1992; 79: 1201-1205
- [110] Rinder H.M., Bonan L., Rinder C.S., Ault K.A., Smith B.R.: Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood*, 1991; 78: 1730-1737
- [111] Rinder H.M., Tracey J.L., Rinder C.S., Leitenberg D., Smith B.R.: Neutrophil but not monocyte activation inhibits P-selectin-mediated platelet adhesion. *Thromb. Haemost.*, 1994; 72: 750-756
- [112] Rozmyslowicz T., Majka M., Kijowski J., Gaulton G.N., Ratajczak M.Z.: A new role of platelet- and megakaryocyte-derived microparticles (MP) in HIV infection. *Blood*, 2001; 98: 786a
- [113] Rozmyslowicz T., Majka M., Kijowski J., Murphy S.L., Conover D.O., Poncz M., Ratajczak J., Gaulton G.N., Ratajczak M.Z.: Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS*, 2003; 17: 33-42
- [114] Sabatier F., Roux V., Anfoso F., Camoin L., Sampol J., Dignat-George F.: Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells *in vitro* induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*, 2002; 99: 3962-3970
- [115] Sabroe I., Jones E.C., Usher L.R., Whyte M.K., Dower S.K.: Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.*, 2002; 168: 4701-4710
- [116] Salaj P., Marinov I., Markova M., Pohlreich D., Cetkovsky P., Hrachovinova I.: Thrombelastography monitoring of platelet substitution therapy and rFVIIa administration in haemato-oncological patients with severe thrombocytopenia. *Prague Med. Rep.*, 2004; 105: 311-317
- [117] Sarma J., Laan C.A., Alam S., Jha A., Fox K.A., Dransfield I.: Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation*, 2002; 105: 2166-2171
- [118] Scholz T., Temmler U., Krause S., Heptinstall S., Losche W.: Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb. Haemost.*, 2002; 88: 1033-1038
- [119] Seiki M.: Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.*, 2003; 194: 1-11
- [120] Siddiqui F.A., Desai H., Amirkhosravi A., Amaya M., Francis J.L.: The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets*, 2002; 13: 247-253
- [121] Solum N.O.: Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999; 19: 2841-2846
- [122] Spangenberg P., Redlich H., Bergmann I., Losche W., Gotzrath M., Kehrel B.: The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb. Haemost.*, 1993; 70: 514-521
- [123] Suefuji H., Ogawa H., Yasue H., Kaikita K., Soejima H., Motoyama T., Mizuno Y., Oshima S., Saito T., Tsuji I., Kumeda K., Kamikubo Y., Nakamura S.: Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.*, 1997; 134: 253-259
- [124] Surette M.E., Fonteh A.N., Bernatchez C., Chilton F.H.: Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 757-763
- [125] Takeda K., Kaisho T., Akira S.: Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003; 21: 335-376
- [126] Tan K.T., Lip G.Y.: The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.*, 2005; 94: 488-492
- [127] Taucher S., Salat A., Gnani M., Kwasny W., Mlineritsch B., Menzel R.C., Schmid M., Smola M.G., Stierer M., Tausch C., Galid A., Steger G., Jakesz R., Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group: Impact of pretreatment thrombocytosis on survival in primary breast cancer. *Thromb. Haemost.*, 2003; 89: 1098-1106
- [128] Tavener S.A., Long E.M., Robbins S.M., McRae K.M., Van Remmen H., Kubek P.: Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ. Res.*, 2004; 95: 700-707
- [129] Thomas G., Skriniska V.A., Lucas F.V.: The influence of glutathione and other thiols on human platelet aggregation. *Thromb. Res.*, 1986; 44: 859-866

- [130] Tokuraku M., Sato H., Murakami S., Okada Y., Watanabe Y., Seiki M.: Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis. *Int. J. Cancer.*, 1995; 64: 355–359
- [131] Tsuji T., Nagata K., Koike J., Todoroki N., Irimura T.: Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J. Leukoc. Biol.*, 1994; 56: 583–587
- [132] Underhill D.M.: Toll-like receptors: networking for success. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33: 1767–1775
- [133] Vickers J., Russwurm S., Dohrn B., Portele T., Spangenberg P., Reinhart K., Losche W.: Monocyte tissue factor (CD142) and Mac-1 (CD11b) are increased in septic patients. *Thromb. Haemost.*, 1998; 79: 1219–1220
- [134] Vidal C., Spaulding C., Picard F., Schaison F., Melle J., Weber S., Fontenay-Roupie M.: Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thromb. Haemost.*, 2001; 86: 784–790
- [135] Visintin A., Mazzoni A., Spitzer J.H., Wyllie D.H., Dower S.K., Segal D.M.: Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.*, 2001; 166: 249–255
- [136] Wakefield A.J., Sawyerr A.M., Dhillon A.P., Pittilo R.M., Rowles P.M., Lewis A.A., Pounder R.E.: Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet*, 1989; 2: 1057–1062
- [137] Werner N., Wassmann S., Ahlers P., Kosiol S., Nickenig G.: Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006; 26: 112–116
- [138] Weyrich A.S., Elstad M.R., McEver R.P., McIntyre T.M., Moore K.L., Morrissey J.H., Prescott S.M., Zimmerman G.A.: Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.*, 1996; 97: 1525–1534
- [139] Williams J.R., Leaver H.A., Ironside J.W., Miller E.P., Whittle I.R., Gregor A.: Apoptosis in human primary brain tumours: actions of arachidonic acid. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 1998; 58: 193–200
- [140] Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C.: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990; 249: 1431–1433
- [141] Wu D., Huang C.K., Jiang H.: Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J. Cell. Sci.*, 2000; 113: 2935–2940
- [142] Zhang D., Zhang G., Hayden M.S., Greenblatt M.B., Bussey C., Flavell R.A., Ghosh S.: A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 2004; 303: 1522–1526
- [143] Zhang Y., Chirmule N., Gao G.P., Qian R., Croyle M., Joshi B., Tazelaar J., Wilson J.M.: Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol. Ther.*, 2001; 3: 697–707
- [144] Zhao L., Bath P.M., Fox S., May J., Judge H., Losche W., Heptinstall S.: The effects of GPIIb-IIIa antagonists and a combination of three other antiplatelet agents on platelet-leukocyte interactions. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2003; 19: 178–186
- [145] Zhao L., Bath P.M., May J., Losche W., Heptinstall S.: P-selectin, tissue factor and CD40 ligand expression on platelet-leukocyte conjugates in the presence of a GPIIb/IIIa antagonist. *Platelets*, 2003; 14: 473–480
- [146] Zillmann A., Luther T., Muller I., Kotzsch M., Spannagl M., Kauke T., Oelschlagel U., Zahler S., Engelmann B.: Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 281: 603–609
- [147] Zucker S., Pei D., Cao J., Lopez-Otin C.: Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2003; 54: 1–74