

Received: 2012.10.08
Accepted: 2014.02.20
Published: 2014.04.10

Powstawanie, metabolizm i ewolucja płytek krwi

The formation, metabolism and the evolution of blood platelets

Joanna Saluk^{1,2}, Michał Bijak¹, Michał B. Ponczek¹, Barbara Wachowicz¹

¹ Katedra Biochemii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

² Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Katedra i Zakład Toksykologii Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Streszczenie

Płytki to najmniejsze, pozbawione jądra komórki krwi, które zawierają typowe organelle komórkowe, w tym mitochondria, dzięki czemu wykazują aktywny metabolizm. Płytki mają wysoce zorganizowany cytoszkielet, swoiste ziarnistości sekrecyjne oraz unikalny system receptorów błonowych warunkujący ich dużą reaktywność. Główną rolą płytek jest utrzymanie prawidłowej hemostazy, jednak pełnią one istotne funkcje również w stanach zapalnych, procesach odpornościowych, progresji nowotworów. Pozbawione jądra komórkowego płytki występują u przedstawicieli wszystkich gromad ssaków, co wydaje się cechą przystosowawczą. U pozostałych kręgowców podobne funkcje hemostatyczne pełnią duże jądrzaste trombocyty, które charakteryzują się jednak znacznie słabszą reaktywnością. Małe, reaktywne płytki krwi, pojawiające się w wyniku ewolucji u ssaków, umożliwiły szybsze formowanie skrzepów i wolniejszą utratę krwi w razie zranienia, ale jednocześnie zwiększyły ryzyko wystąpienia zakrzepowo-zatorowych chorób krążenia. Dziennie w organizmie człowieka powstaje około 1×10^{11} płytek krwi, które są wytwarzane w wyniku procesów różnicowania, dojrzewania oraz fragmentacji cytoplazmy dojrzałych megakariocytów. Powstawanie płytek krwi jest końcowym stadium różnicowania megakariocytów i następuje przez wyodrębnienie tzw. proplateletów będących bezpośrednimi prekursorami płytek. Pozbawione jądra komórkowego płytki krwi uznane są za komórki terminalnie zróżnicowane, które nie są zdolne do dalszych podziałów komórkowych. Jednak w bezjądrzastych płytkach krwi potwierdzona została synteza oraz transkrypcja mitochondrialnego DNA, a także synteza białka zachodząca w oparciu o mRNA pochodzące z megakariocytów. Badania opublikowane w 2012 r. dowodzą, że w czasie swojego życia płytki nie tylko są zdolne do aktywnego procesu syntezy białek, ale także, co wykazano po raz pierwszy, do tworzenia nowych komórek, które funkcjonalnie i strukturalnie są zbliżone do płytek, z których powstały.

Słowa kluczowe:

dojrzewanie i różnicowanie komórek • megakariocyty • płytki krwi • proplatetki

Summary

Platelets are the smallest, depleted of nucleus blood cells which contain a typical cellular organelles including the mitochondria, so that have active metabolism. Platelets possess the highly organized cytoskeleton, specific secretory granules and unique membrane receptors system responsible for their high reactivity. The key role of blood platelets is to maintain normal hemostasis, but they also play important roles in inflammation, immune processes and the cancer progression. The anucleated, small platelets occur in representatives of all clusters of mammals, so it seems to be an adaptation feature. In other vertebrates similar hemostatic functions are played by large nucleated platelets, which are much more weakly reactive.

	Small, reactive platelets, appearing in the evolution of mammals, allowed the formation of clots faster and slower blood loss in case of injury, but also increased the risk of thromboembolic and cardiovascular diseases. Daily the human body forms about 1×10^{11} platelets, which are produced by a process of differentiation, maturation and fragmentation of the cytoplasm of mature megakaryocytes. The emergence of platelets is the final stage of megakaryocyte differentiation and is followed by formation of the direct precursors called proplatelets. The anucleated platelets are regarded as terminally differentiated cells, which are not capable of further cell division. However, despite the absence of a nucleus, in blood platelets the synthesis and transcription of mitochondrial DNA and protein synthesis occurring on the basis of mRNA from megakaryocytes has been confirmed. However, recent studies published in 2012 show that the platelets are capable not only of the process of protein synthesis, but also of generation of new cells, which are functionally and structurally similar to the parent platelets.
Key words:	maturation and differentiation of cells • megakaryocytes • blood platelets • proplatelets
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1098145
Word count:	2727
Tables:	–
Figures:	1
References:	71

Adres autorki: dr hab. Joanna Saluk, Biochemii Ogólnej, BiOŚ, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; email: saluk@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **CCL5/RANTES** – chemokina CCL5 (regulated upon activation, normal t cell expressed and secreted), **CMP** – komórka progenitorowa należąca do wspólnej linii mieloidalnej i granulocytarnej (common myeloid progenitor), **COX-2** – cyklooksigenaza 2, **DMS** – sieć tzw. błon demarkacyjnych (demarcation membrane system), **HSC** – hematopoetyczna komórka pnia (hematopoietic stem cell), **IL-1 β** – interleukina 1 β , **LPS** – lipopolisacharyd, **MEP** – komórka progenitorowa megakaryocytów i erytrocytów (megakaryocyte/erythrocyte progenitor), **MMP** – metaloproteaza macierzy zewnątrzkomórkowej, **PAI-1** – inhibitor aktywatora plazminogenu, **PF4** – płytkowy czynnik 4 (platelet factor 4), **TF** – czynnik tkankowy (tissue factor), **TLR** – receptor typu Toll (toll like receptor), **vWF** – czynnik von Willebranda.

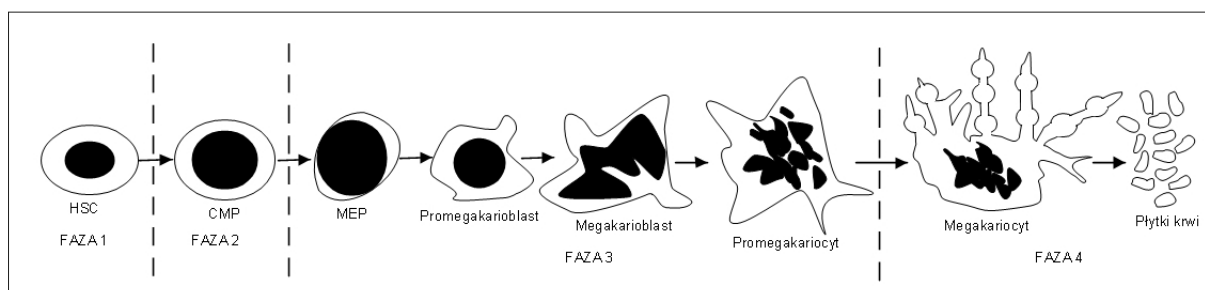
WSTĘP

W układzie krążenia dorosłego człowieka w warunkach fizjologicznych znajduje się około tryliona płytek krwi. Płytki krwi to swoiste komórki, które pozbawione są jądra komórkowego, ale zawierają typowe organelle komórkowe, w tym mitochondria. Charakteryzują się dużą reaktywnością i wykazują aktywny metabolizm. Mają dobrze zorganizowany cytoszkielet, unikalny systemem receptorów błonowych oraz swoiste ziarnistości sekrecyjne [63]. Poza główną rolę, jaką jest utrzymanie prawidłowej hemostazy, płytki pełnią inne istotne funkcje m.in. w stanach zapalnych, procesach odpornościowych, czy progresji nowotworów, a zaburzenia w ich powstawaniu oraz w funkcjonowaniu prowadzą do poważnych stanów patologicznych [3].

PŁYTKI JAKO ELEMENT EWOLUCJI

Bejądrzaste płytki są najmniejszymi elementami morfotycznymi krwi ssaków. Występowanie pozbawionych

jądra komórkowego płytek u przedstawicieli wszystkich gromad ssaków, zarówno łżyskowych, jak i torbaczy [2] oraz stekowców [17,31,60] wydaje się cechą przystosowawczą. W pozostałych gromadach kręgowców ich odpowiednikiem są duże jądrzaste trombocyty pełniące podobne funkcje hemostatyczne, jednak charakteryzujące się znacznie słabszą reaktywnością [58]. Małe płytki krwi, pojawiające się w wyniku ewolucji u ssaków, umożliwiły szybsze formowanie skrzepów, a co za tym idzie, wolniejszą utratę krwi w razie zranienia. Ta niewątpliwa korzyść adaptacyjna dla młodego osobnika, który lepiej przystosowany, unikając śmierci z powodu wykrwawienia, mógł przekazać swoje geny wraz z zestawem „udoskonalonej” hemostazy potomstwu, stała się zarazem piętnem dla osobników starych, które po spełnieniu roli reprodukcyjnej są bardziej narażone na zakrzepowo-zatorowe choroby krążenia. O ile selekcja naturalna promowała udoskonalanie funkcji płytek w okresie młodości przodków ssaków, o tyle zaburzenia z udziałem płytek krwi w okresie starości nie były poddane kontroli doboru naturalnego, prowadząc nawet do kumulowania się poten-



Ryc. 1. Cztery główne fazy dojrzewania i różnicowania megakariocytów oraz biogenezy płytek krwi (schemat). Faza 1: proliferacja hematopoetycznych komórek pnia. Faza 2: Różnicowanie komórek progenitorowych należących do wspólnej linii mieloidalnej i granulocytarnej. Faza 3: Wykształcenie komórek progenitorowych megakariocytów i erytrocytów oraz wieloetapowe dojrzewanie megakariocytów. Faza 4: Formowanie proplatek z dojrzałego megakariocytu oraz powstawanie płytek krwi

cialnie zgubnych mutacji. Obecnie, wraz z postępującym procesem starzenia, to dawne przystosowanie naraża nas ludzi na choroby cywilizacyjne zagrażające życiu, takie jak miażdżyca, choroba niedokrwienna czy zawały i udary.

TWORZENIE PŁYTEK KRWI

Każdego dnia w ludzkim organizmie powstaje około 1×10^{11} płytek krwi, które zostają wytworzone w wyniku złożonych procesów różnicowania, dojrzewania oraz fragmentacji cytoplazmy dojrzałych megakariocytów.

Pierwsze badania, potwierdzające udział megakariocytów jako komórek prekursorowych płytek krwi zostały opublikowane ponad 100 lat temu przez Wrighta [69], jednak mechanizm zaangażowany w proces tworzenia płytek krwi wciąż nie został jednoznacznie wyjaśniony. Megakariocytopoeza jest skomplikowanym procesem kontrolowanym przez złożony układ czynników transkrypcyjnych, hematopoetycznych czynników wzrostu, chemokin i innych cytokin oraz wzajemnych interakcji wielu cząstek i komórek, które wspólnie odgrywają znaczącą rolę w regulacji poszczególnych etapów tego procesu. W przebiegu megakariocytopoezy wyróżnia się stadium różnicowania linii komórkowej, proliferację oraz etap dojrzewania megakariocytów, kończący się powstawaniem płytek krwi [9,8,13,71].

Obecne w szpiku kostnym megakariocyty stanowią 1% populacji wszystkich występujących tam komórek [64]. Podobnie jak inne komórki krwiotwórcze, megakariocyty pochodzą od hematopoetycznych komórek pnia (hematopoietic stem cell - HSC) [28], które tracąc zdolność podziałów, a następnie właściwości multipotentne stają się unipotentnymi komórkami prekursorowymi. Komórki prekursorowe należą do wspólnej linii mieloidalnej i granulocytarnej (common myeloid progenitor - CMP). Powstawanie megakariocytów jest ściśle związane z różnicowaniem erytroidalnej linii komórkowej. Bipotentna komórka prekursorowa tzw. megakariocytowy/erytroidowy protoplasta (megakaryocyte/erythrocyte progenitor - MEP) ulega proliferacji prowadzącej do powstania megakariocytów (ryc.1). Opisywane jest również bezpośrednie różnicowanie się megakariocytów z pominięciem

prekursora CMP. Późną fazą różnicowania megakariocytów jest dojrzewanie ich prekursora, tj. promegakarioblastu, któremu towarzyszy endomitoza, prowadząca do poliploidalności [6].

Proces dojrzewania oraz różnicowania megakariocytów podlega zarówno pozytywnej, jak i negatywnej regulacji przez czynniki transkrypcyjne, głównie Runx1, Gata1, Fli1 i c-Myb. Niedobór tych czynników zaburza proces dojrzewania megakariocytów oraz powoduje związane z tym nieprawidłowości w liczbie powstających płytek [24]. Mechanizmy tworzenia płytek zależne są od transdukcji sygnału indukowanego przez cytokiny. Najważniejszą cytokiną hematopoetyczną odgrywającą główną rolę w proliferacji i różnicowaniu megakariocytów jest trombopoetyna, wykazująca homologię do erytropoetyny [14]. Oddziaływanie trombopoetyny z megakariocytowym receptorem c-MPL aktywuje cytoplazmatyczną kinazę tyrozynową JAK2, co indukuje przekazywanie sygnału poprzez szlaki zależne od STAT, MAPK i PI3K [11,16,68]. Aktywacja białek sygnałowych powoduje stopniowe rozrastanie się megakariocytu, syntezę białek płytkowych oraz utratę zdolności proliferacji, prowadzącej do powstania jądra poliploidalnego na skutek kolejnych procesów endomitozy [6]. Termin endomitoza w odniesieniu do procesu dojrzewania megakariocytów wprowadzony został ze względu na podziały odpowiedzialne za ich poliploidalność, gdyż sądzono, iż jest ona wynikiem zaburzonej kariokinezy, zachodzącej bez rozpadu błony jądrowej [48]. Jednak badania przebiegu cyklu komórkowego megakariocytów wykazały zaburzenia późnej fazy cytokinezy [15,34,40,66]. Podczas replikacji chromosomów pęka otoczka jądrowa, ale powstające wrzeciona mitotyczne nie oddzielają się od siebie. Dopiero ponowne wytworzenie otoczki jądrowej powoduje powstanie poliploidalnych jąder komórkowych. Mechanizm odpowiedzialny za wadliwy przebieg tego etapu podziału nie jest jeszcze całkowicie poznany. Wynikiem nieprawidłowej cytokinezy jest powstanie komórek wielojądrowych, jednak w przypadku megakariocytów zaburzeń cytokinezy może także towarzyszyć niewłaściwy przebieg kariokinezy [6]. Poliploidalność megakariocytów może być sposobem na wzmocnienie ich metabolizmu oraz zwiększenie ekspresji genów poprzez amplifikację. Dzięki temu zachodzi konieczność do powstawania płytek,

wzmoczona synteza białek oraz intensywne tworzenie systemu błon, swoistych ziarnistości oraz organelli komórkowych [47]. Wzrostowi ploidalności megakariocytów towarzyszy istotne zwiększenie objętości cytoplazmy, co ma bezpośrednie znaczenie w procesie tworzenia płytek. Znaczny wzrost objętości megakariocyta jest wynikiem wielokrotnej endomitozy prowadzącej do zwiększenia ilości DNA nawet do 64 razy, a także jest rezultatem gromadzenia wielu substancji oraz struktur niezbędnych do wytwarzania płytek krwi. Dojrzały megakariocyt jest największą komórką szpiku kostnego, a liczba powstających z niego płytek zależna jest od stopnia jego ploidalności [38]. Z każdego dojrzałego megakariocyta może powstać 1000-3000 płytek krwi [20,59]; niektórzy autorzy podają, że liczba płytek może dochodzić do 5000 [32]. Kończąc fazę dojrzewania megakariocyty rozpoczynają proces różnicowania zmierzający do wytworzenia płytek krwi [38].

Mechanizmy biogenezy płytek krwi budziły od dawna kontrowersje, a koncepcje na ich temat były odmienne. Pierwotna hipoteza zakładała tworzenie płytek krwi w wyniku tzw. modelu fragmentacji, tj. przez rozpad megakariocytów przedostających się do włosowatych naczyń krwionośnych płuc [55]. W 1991 r., na podstawie prac Radleya i wsp. [46] powstała teoria, która następnie została potwierdzona wynikami kolejnych badań, wskazująca na wytwarzanie z megakariocytów tzw. proplatek, tj. sznurów płytek otoczonych wspólną błoną komórkową, które w naczyniach krwionośnych szpiku kostnego rozpadają się tworząc pojedyncze płytki krwi [25,27]. Powstawanie płytek krwi jest końcowym stadium różnicowania megakariocytów. W pierwszym etapie różnicowania megakariocytów ich cytoplazma zostaje wyposażona w wytworzony *de novo* złożony system błon komórkowych, stanowiących podstawę do tworzenia specjalistycznych ziarnistości płytek krwi. Powstaje rozbudowana sieć tzw. błon demarkacyjnych (demarcation membrane system - DMS) [70]. Istniało kilka hipotez dotyczących źródła pochodzenia oraz sposobu powstawania DMS. Według Yamada, który w 1957 r. jako pierwszy opisał obecność DMS, był to system błon powstający w wyniku fuzji drobnych pęcherzyków błonowych tworzących się w miejscach późniejszego wytworzenia DMS [70]. Następne hipotezy wskazywały na pochodzenie błon demarkacyjnych z układu błonowych kanalików powstających z wewnątrzkomórkowych błon plazmatycznych megakariocytów [4,54,61]. Mahaut-Smith i wsp. dowiedli, że nowo powstający system błon demarkacyjnych pochodzi z zewnątrzkomórkowej błony megakariocyta i zostaje utworzony w wyniku jej wpuklenia do wnętrza komórki [36]. Najnowsze badania biochemiczne potwierdzają, że błony stanowiące DMS mają cechy zewnętrznej błony komórkowej otaczającej megakariocyty oraz proplatek [51]. Na podstawie tych obserwacji powstała koncepcja tzw. „flow-model”, popierana przez wielu badaczy [25,36,45,51], według której zewnętrzna błona megakariocyta wpukla się do wnętrza komórki (in-flow), mimo gęstej sieci białek cytoszkieletu w cytoplazmie, a kiedy powstające proplatek zaczynają się wydłużać, błona rozciąga się (out-flow) otaczając ich powierzchnię. Tworzona we wnętrzu megakariocyta siatka błon demarkacyjnych złożona jest z cystern i tubuli, które są połączone z błoną cy-

toplazmatyczną komórki, a jednocześnie mają otwarte kanalizki, zapewniające kontakt komórki ze środowiskiem zewnętrznym. Tworzący się układ kanalików otwartych służy w dojrzałych płytkach krwi do uwalniania zawartości ziarnistości do środowiska pozakomórkowego w wyniku aktywacji [36,41]. Na tym etapie powstają różne kompartmenty komórkowe różnicujące specjalistyczne wydzielnicze ziarnistości płytkowe: lizosomy, ziarnistości osmofilne o dużej gęstości elektronowej oraz α -ziarnistości, które w postaci pęcherzyków błonowych przemieszczają się wzdłuż mikrotubuli [35]. Intensywnie syntetyzowane w tym czasie swoiste białka płytkowe są gromadzone w α -ziarnistościach (czynniki von Willebranda (vWF), płytkowy czynnik 4 (PF4)) lub eksponowane na powierzchni megakariocytów (niektóre receptory płytkowe np. receptory integrynowe fibrynogenu $GP\alpha_{IIb}\beta_3$, czy GPIb dla vWF). Pewna pula białek, które są obecne w dojrzałych płytkach krwi, jest na tym etapie wychwytywana z osocza w procesie endocytozy i/lub pinocytozy, a następnie gromadzona w ziarnistościach α . Wśród tych białek znajdują się m.in. czynniki regulatorowe angiogenezy [26,30]. Zorganizowana fragmentacja cytoplazmy dojrzewającego megakariocyta, zawierającego wszystkie elementy konieczne do powstania płytek, prowadzi do wyodrębnienia tzw. proplatek, prekursorów w procesie powstawania płytek [47]. Tworzenie proplatek rozpoczyna się od pojedynczego miejsca w megakariocycie, w którym powstają początkowo szerokie wypustki, do których przenika cytoplazma oraz system błon wewnętrznych dojrzalego megakariocyta [42]. W fazie tej megakariocyty tworzą struktury przypominające pseudopodia, tj. długie fragmenty cytoplazmy, wyglądające jak sznury koralu zbliżonych wielkości do płytek krwi, które połączone są cienkimi mostkami cytoplazmatycznymi [57] (ryc.1). Następnie wypustki pseudopodialne wydłużają się i zwężają do rozmiaru proplatek o średnicy 2-4 μm [42] osiągając długość 0,5-1 mm [21]. Jest to faza formowania proplatek, zachodząca z szybkością około 0,85-1 $\mu m/min$ i trwająca 4-10 godzin [21,26]. Jądra komórkowe megakariocyta są usuwane z komórki na zewnątrz, gdzie ulegają fagocytozie przez makrofagi. Cytoplazma megakariocyta zostaje przekształcona w sieć wydłużonych proplatek. Jest to proces związany z całkowitą reorganizacją cytoszkieletu przez depolimeryzację aktyny i polimeryzację tubuliny [43,49]. Wiązki mikrotubul złożone z dimerów $\alpha\beta$ -tubuliny stanowią główny system napędzający wydłużanie proplatek dzięki zależnemu od dyneiny wzajemnemu przemieszczaniu się włókien mikrotubulowych względem siebie. Ponadto są odpowiedzialne za zmianę szerokości wypustek cytoplazmatycznych, a także tworzą ścieżki, po których organelle komórkowe oraz ziarnistości przenikają (z szybkością 0,1-0,2 $\mu m/min$) do miejsc, w których są gromadzone, w obrębie powstających proplatek [49]. Zarówno swoiste ziarnistości płytkowe, jak i inne organelle komórkowe, w tym mitochondria, a także mRNA przedostają się za ich pośrednictwem do powstających płytek krwi [14]. Na końcach proplatek pęczki mikrotubul tworzą pętlę powodującą powstawanie napęcznień, z których uwalniane są płytki krwi. Fragmentacja złożonych struktur, jakimi są proplatek, związana jest z tworzeniem dodatkowych zagięć i rozgałęzień z udziałem aktyny, co prowadzi do uwolnienia kilku tysięcy płytek krwi z powie-

lających się końców proplatek [21,25]. Najnowsze badania dowodzą, że płytki powstają w wyniku fragmentacji cytoplazmy powstałych proplatek, które dzięki mniejszym rozmiarom, w porównaniu z megakariocytami, mogą przenikać do krwi obwodowej [27]. Fragmenty megakariocytów, które znajdują się w naczyniach krwionośnych są 10-100 razy większe niż uwolnione płytki krwi, co świadczy o występowaniu fazy przejściowej w procesie powstawania płytek krwi z dojrzałych megakariocytów [19]. Uwalnianie płytek do krwi musi zachodzić we krwi obwodowej tak, aby zapobiec uwięzieniu płytek w strukturach szpiku kostnego [27]. Megakariocyty uwalniają heterogeniczne cząstki będące dojrzewającymi proplatekami do naczyń włosowatych szpiku kostnego. Dalsza morfogeneza prowadząca do powstania płytek odbywa się już we krwi obwodowej [19]. Megakariocyty obecne w szpiku kostnym przylegają do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak witronektyna, fibronektyna lub czynnik von Willebranda, co hamuje dojrzewanie megakariocytu i promuje powstawanie proplatek. Proplateki mogą przenikać warstwę śródbłonkową, a to wymaga syntezy metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie MMP2 i MMP9. Dzięki wewnątrznaczyniowym siłom ścinania krwi przepływającej w tętniczkach płucnych, które są odwrotnie proporcjonalne do wielkości naczyń, proplateki ulegają fragmentacji do płytek krwi [62]. Dowodem na poparcie tej hipotezy może być to, że mniejsza liczba megakariocytów obserwowana jest w naczyniach przedpłucnych, w porównaniu z naczyniami zapłucnymi, natomiast w przypadku liczby płytek krwi obecnych w naczyniach, zależność ta jest odwrotna [19,22]. Istnieją również doniesienia, które wskazują na obecność w naczyniach krwionośnych niewielkiej liczby dojrzałych megakariocytów, które migrują w celu uwolnienia płytek krwi [65]. Oddzielanie poszczególnych płytek krwi możliwe jest dzięki współdziałaniu systemu DMS, mikrotubuli oraz filamentów aktyny, które uczestniczą wspólnie w tworzeniu sieci kanałów błonowych, a także w transporcie płytkowych organeli komórkowych oraz spliceosomów, umożliwiających syntezę białek w płytkach krwi [10,49,51]. W dojrzewających megakariocytach stwierdzono obecność wielu rybosomów potrzebnych do syntezy białek płytkowych, które wraz z licznymi mitochondriami oraz cząsteczkami mRNA, za pośrednictwem mikrotubuli, przedostają się do powstających płytek krwi [14].

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ POWSTAJĄCYCH PŁYTEK W OPARCIU O MOLEKULARNE DZIEDZICTWO

Płytki, które ulegają aktywacji pod wpływem licznych agonistów, wydzielają wiele białek o określonych funkcjach, istotnych szczególnie w hemostazie czy procesach zapalnych, których uwalniania i/lub ekspresji nie obserwuje się w płytkach spoczynkowych. Ta obserwacja stała się przesłanką do badań nad zdolnością płytek krwi do syntezy białek. Badania Linemann i wsp. dowiodły, że w pobudzonych płytkach krwi odbywa się m.in. synteza prozapalnej IL-1 β [33]. Pozbawione jądra płytki są zdolne do syntezy białka w wyniku przekazywania sygnału i modyfikacji przez splicing pre-mRNA. Dojrzewanie mRNA w pobudzonych płytkach krwi odbywa się pod

wpływem ich aktywacji wywołanej trombiną, która jest silnym fizjologicznym agonistą płytek, a także na skutek działania endotoksyny bakterii Gram-ujemnych – lipopolisacharydu (LPS) [10,56]. LPS jest bezpośrednim aktywatorem płytek krwi, który nie wywołuje natychmiastowej odpowiedzi tych komórek, ale działając poprzez obecne na powierzchni płytek receptory TLR (Toll like receptor) powoduje wzrost wrażliwości płytek na działanie innych agonistów. W obecności rozpuszczalnej postaci receptora CD14, który jest białkiem prezentującym LPS receptorom TLR, LPS zwiększa adhezję płytek do białek adhezyjnych oraz powoduje reorganizację cytoskieletu i degranulację ziarnistości [72]. Aktywacja płytek z udziałem LPS prowadzi do zwiększonej ekspresji receptorów GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ i CD40L oraz selektyny P, przez co płytki krwi, w wyniku interakcji z leukocytami, uczestniczą w rozwoju reakcji zapalnych [3]. Indukcja prozakrzepowej aktywności płytek krwi przez LPS nie jest tak wyraźna jak po działaniu typowych agonistów płytek i ogranicza się przede wszystkim do wzrostu ich wrażliwości na działanie silnych agonistów, takich jak trombina. Jednak w obecności rozpuszczalnego receptora CD14 to właśnie LPS jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za stymulowanie w płytkach krwi dojrzewania pre-mRNA, takich białek jak IL-1 β oraz cyklooksygenaza 2 (COX-2), a także za translację i akumulację obu tych białek [3].

W bejądrzastych płytkach krwi potwierdzona została synteza oraz transkrypcja mitochondrialnego DNA [1], a także synteza białka zachodząca w oparciu o mRNA pochodzące z megakariocytów. Dotychczas opisano prawie 5000 transkryptów płytkowego mRNA, które w czasie tworzenia płytek zostają przekazane z megakariocytów [50]. Porównanie płytkowego proteomu z transkryptomem wykazało, że aż 69% wszystkich białek płytkowych znajduje swoje odzwierciedlenie w płytkowym mRNA [39]. Płytki krwi syntetyzują wiele białek zaangażowanych w proces hemostazy (COX), czynnik tkankowy (TF), inhibitor aktywatora plazminogenu (PAI-1), czynniki kontaktu XI i XIII oraz inhibitor białka C), a także w stan zapalny (cytokiny: IL-1 β , CCL5/RANTES) oraz glikoproteiny błonowe (GPIb, GPIIa, GPIIb), białka kurczliwe (aktyna, miozyna) oraz białka adhezyjne (fibrynogen, trombospondyna, czynnik von Willebranda) [67,7,12,18,29,23,37,44]. Dzięki obecności stabilnych transkryptów mRNA płytki krwi zdolne są do przeprowadzania ciągłej syntezy białek nie tylko w krwiobiegu, ale również podczas przechowywania w koncentratkach płytkowych służących do transfuzji [63].

Pozbawione jądra komórkowego płytki krwi należą do komórek terminalnie zróżnicowanych, które nie są zdolne do dalszych podziałów komórkowych. Uwalniane do krwiobiegu płytki krwi, powstające z proplatek, w wyniku fragmentacji cytoplazmy megakariocytu, pozostają we krwi przez 9-11 dni. Jednak badania opublikowane w 2012 r. przez Schwertza i wsp. [53] dowodzą, że w czasie swojego życia płytki nie tylko zdolne do są aktywnego procesu syntezy białek, ale także, co wykazano po raz pierwszy, do tworzenia nowych komórek, które funkcjonalnie i strukturalnie zbliżone są do pły-

tek, z których powstały [52]. Badania prowadzone przez kilka dni w warunkach *ex vivo*, w tzw. koncentratkach płytkowych, wykazały, że w przechowywanych koncentratkach rośnie liczba aktywnych funkcjonalnie płytek. Powstawanie tzw. płytek potomnych odbywa się w sposób analogiczny do tworzenia płytek z propłytek i jest poprzedzone wzrostem objętości cytoplazmy, replikacją DNA mitochondrialnego oraz wzmoczoną syntezą białek komórkowych, która następnie zachodzi również w nowo powstających płytkach. Zmiany morfotyczne płytek, związane z tworzeniem wydłużonych struktur, prowadzą do powstania kilku płytek potomnych z jednej płytki macierzystej, a główną rolę odgrywa w tym procesie sieć mikrotubuli odpowiedzialna za wydłużanie struktur, z których zostają wytworzone potomne płytki [52]. Wstępne badania przeprowadzone przez Schwertza i wsp. nie zostały jeszcze potwierdzone przez inne, niezależne ośrodki badawcze. Płytki krwi są szczególnie wrażliwymi i wysoce reaktywnymi komórkami, które żyją krótko i giną w wyniku procesu apoptozy. Sposób ich izolowania oraz przechowywania może mieć istotne znaczenie do oceny procesu generowania płytek potomnych. Przypadkowa aktywacja płytek w czasie ich otrzymywania może zahamować (podobnie jak stymulacja trombiną, czy LPS *Escherichia coli* [52]) powstawanie płytek potomnych, przez co proces ten może nie

być zaobserwowany przez badaczy. Najnowsze badania sugerują zatem, że płytki są zdolne do dostosowywania swojego fenotypu w odpowiedzi na bodźce środowiska zewnętrznego, co może mieć znaczące implikacje kliniczne, zwłaszcza w transfuzjologii.

Jeśli krążące w krwiobiegu płytki zdolne są w warunkach *in vivo* wytwarzać płytki potomne, tak jak w układach *ex vivo* [52] oraz w świeżo izolowanym ludzkim osoczu [5], to ta nieznana dotychczas zdolność płytek krwi do proliferacji może być istotna w procesie trombopoetyzy człowieka. Autorzy badań [52] wskazują, że dalsza trombopoetyza, zachodząca w krwiobiegu może wyjaśnić to, iż niewielka populacja megakariocytów jest w stanie zapewnić w sposób ciągły w organizmie tak dużą liczbę płytek. Powstawanie płytek potomnych z już istniejących może mieć podstawowe znaczenie zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w stanach patologicznych. Wstępne badania wykazały, że powstające płytki mają analogiczną strukturę wewnątrzkomórkową oraz w podobny sposób mogą reagować na działanie agonistów. Zawierają wszystkie typowe organelle komórkowe oraz wykazują ekspresję kluczowych białek płytkowych. Jednak wiele tych właściwości, jak chociażby zdolność prozakrzepowa, a także czas życia i podatność na proces apoptozy wymagają dalszych badań [52].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Agam G., Bessler H., Djaldetti M.: In vitro DNA and RNA synthesis by human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 425: 41-48
- [2] Barbour R.A.: The leukocytes and platelets of a marsupial, *Trichosurus vulpecula*. A comparative morphological, metrical and cytochemical study. *Arch. Histol. Jpn.*, 1972; 34: 311-360
- [3] Beaulieu L.M., Freedman J.E.: The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb. Res.*, 2010; 125: 205-209
- [4] Behnke O.: An electron microscope study of the megakaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J. Ultrastruct. Res.*, 1968; 24: 412-443
- [5] Behnke O., Forer A.: From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur. J. Haematol.*, 1998; 61: 3-23
- [6] Bluteau D., Lordier L., Di Stefano A., Chang Y., Raslova H., Debili N., Vainchenker W.: Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J. Thromb. Haemost.*, 2009; 7: 227-234
- [7] Booth N.A., Simpson A.J., Croll A., Bennett B., MacGregor I.R.: Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br. J. Haematol.*, 1988; 70: 327-333
- [8] Cantor A.B., Katz S.G., Orkin S.H.: Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. *Mol. Cell Biol.*, 2002; 22: 4268-4279
- [9] Cantor A.B., Orkin S.H.: Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, 2002; 21: 3368-3376
- [10] Denis M.M., Tolley N.D., Bunting M., Schwert H., Jiang H., Lindemann S., Yost C.C., Rubner F.J., Albertine K.H., Swoboda K.J., Fratto C.M., Tolley E., Kraiss L.W., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Weyrich A.S.: Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*, 2005; 122: 379-391
- [11] Drachman J.G., Rojnuckarin P., Kaushansky K.: Thrombopoietin signal transduction: studies from cell lines and primary cells. *Methods*, 1999; 17: 238-249
- [12] Fink L., Holschermann H., Kwapiszewska G., Muiyal J.P., Lenge mann B., Bohle R.M., Santoso S.: Characterization of platelet-specific mRNA by real-time PCR after laser-assisted microdissection. *Thromb. Haemost.*, 2003; 90: 749-756
- [13] Friedman A.D.: Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*, 2002; 21: 3377-3390
- [14] Geddis A.E.: Megakaryopoiesis. *Semin. Hematol.*, 2010; 47: 212-219
- [15] Geddis A.E., Kaushansky K.: Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation. *Cell Cycle*, 2006; 5: 538-545
- [16] Geddis A.E., Linden H.M., Kaushansky K.: Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002; 13: 61-73
- [17] Geraghty D.P., Griffiths J., Stewart N., Robertson I.K., Gust N.: Hematologic, plasma biochemical, and other indicators of the health of Tasmanian platypuses (*Ornithorhynchus anatinus*): predictors of mucormycosis. *J. Wildl. Dis.*, 2011; 47: 483-493
- [18] Glenister K.M., Payne K.A., Sparrow R.L.: Proteomic analysis of supernatant from pooled buffy-coat platelet concentrates throughout 7-day storage. *Transfusion*, 2008; 48: 99-107
- [19] Handagama P.J., Feldman B.F., Jain N.C., Farver T.B., Kono C.S.: Circulating proplatelets: isolation and quantitation in healthy rats and in rats with induced acute blood loss. *Am. J. Vet. Res.*, 1987; 48: 962-965

- [20] Harker L.A., Finch C.A.: Thrombokinetik in man. *J. Clin. Invest.*, 1969; 48: 963-974
- [21] Hartwig J.H., Italiano J.E. Jr.: Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2006; 36: 99-103
- [22] Howell W.H., Donahue D.D.: The production of blood platelets in the lungs. *J. Exp. Med.*, 1937; 65: 177-203
- [23] Hu C.J., Baglia F.A., Mills D.C., Konkle B.A., Walsh P.N.: Tissue-specific expression of functional platelet factor XI is independent of plasma factor XI expression. *Blood*, 1998; 91: 3800-3807
- [24] Ichikawa M., Asai T., Saito T., Seo S., Yamazaki I., Yamagata T., Mitani K., Chiba S., Ogawa S., Kurokawa M., Hirai H.: AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.*, 2004; 10: 299-304
- [25] Italiano J.E.Jr., Lecine P., Shivdasani R.A., Hartwig J.H.: Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol.*, 1999; 147: 1299-1312
- [26] Italiano J.E.Jr., Richardson J.L., Patel-Hett S., Battinelli E., Zaslavsky A., Short S., Ryeom S., Folkman J., Klement G.L.: Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*, 2008; 111: 1227-1233
- [27] Junt T., Schulze H., Chen Z., Massberg S., Goerge T., Krueger A., Wagner D.D., Graf T., Italiano J.E.Jr., Shivdasani R.A., von Andrian U.H.: Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 2007; 317: 1767-1770
- [28] Kaushansky K.: Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood*, 2008; 111: 981-986
- [29] Kieffer N., Guichard J., Farcet J.P., Vainchenker W., Breton-Gorius J.: Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur. J. Biochem.*, 1987; 164: 189-195
- [30] Klement G.L., Yip T.T., Cassiola F., Kikuchi L., Cervi D., Podust V., Italiano J.E., Wheatley E., Abou-Slaybi A., Bender E., Almog N., Kieran M.W., Folkman J.: Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*, 2009; 113: 2835-2842
- [31] Lewis J.H., Phillips L.L., Hann C.: Coagulation and hematological studies in primitive Australian mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968; 25: 1129-1135
- [32] Li H., Zhao H., Wang D., Yang R.: microRNA regulation in megakaryocytopoiesis. *Br. J. Haematol.*, 2011; 155: 298-307
- [33] 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 1beta synthesis. *J. Cell Biol.*, 2001; 154: 485-490
- [34] Lordier L., Jalil A., Aurade F., Larbret F., Larghero J., Debili N., Vainchenker W., Chang Y.: Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*, 2008; 112: 3164-3174
- [35] Louache F., Debili N., Cramer E., Breton-Gorius J., Vainchenker W.: Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. *Blood*, 1991; 77: 311-316
- [36] Mahaut-Smith M.P., Thomas D., Higham A.B., Usher-Smith J.A., Hussain J.F., Martinez-Pinna J., Skepper J.N., Mason M.J.: Properties of the demarcation membrane system in living rat megakaryocytes. *Biophys. J.*, 2003; 84: 2646-2654
- [37] Martincic D., Kravtsov V., Gailani D.: Factor XI messenger RNA in human platelets. *Blood*, 1999; 94: 3397-3404
- [38] Mattia G., Vulcano F., Milazzo L., Barca A., Macioce G., Giampaolo A., Hassan H.J.: Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. *Blood*, 2002; 99: 888-897
- [39] McRedmond J.P., Park S.D., Reilly D.F., Coppinger J.A., Maguire P.B., Shields D.C., Fitzgerald D.J.: Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol. Cell. Proteomics*, 2004; 3: 133-144
- [40] Nagata Y., Muro Y., Todokoro K.: Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J. Cell Biol.*, 1997; 139: 449-457
- [41] Nakao K., Angrist A.A.: Membrane surface specialization of blood platelet and megakaryocyte. *Nature*, 1968; 217: 960-961
- [42] Patel S.R., Hartwig J.H., Italiano J.E.Jr.: The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115: 3348-3354
- [43] Patel S.R., Richardson J.L., Schulze H., Kahle E., Galjart N., Drabek K., Shivdasani R.A., Hartwig J.H., Italiano J.E.Jr.: Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*, 2005; 106: 4076-4085
- [44] Podmore A., Smith M., Savidge G., Alhaq A.: Real-time quantitative PCR analysis of factor XI mRNA variants in human platelets. *J. Thromb. Haemost.*, 2004; 2: 1713-1719
- [45] Radley J.M., Haller C.J.: The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*, 1982; 60: 213-219
- [46] Radley J.M., Rogerson J., Ellis S.L., Hasthorpe S.: Megakaryocyte maturation in long-term marrow culture. *Exp. Hematol.*, 1991; 19: 1075-1078
- [47] Raslova H., Roy L., Vourc'h C., Le Couedic J.P., Brison O., Metivier D., Feunteun J., Kroemer G., Debili N., Vainchenker W.: Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. *Blood*, 2003; 101: 541-544
- [48] Ravid K., Lu J., Zimmet J.M., Jones M.R.: Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J. Cell. Physiol.*, 2002; 190: 7-20
- [49] Richardson J.L., Shivdasani R.A., Boers C., Hartwig J.H., Italiano J.E.Jr.: Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*, 2005; 106: 4066-4075
- [50] Schubert P., Devine D.V.: De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox Sang.*, 2010; 99: 112-122
- [51] Schulze H., Korpel M., Hurov J., Kim S.W., Zhang J., Cantley L.C., Graf T., Shivdasani R.A.: Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 2006; 107: 3868-3875
- [52] Schwartz H., Koster S., Kahr W.H., Michetti N., Kraemer B.F., Weitz D.A., Blaylock R.C., Kraiss L.W., Greinacher A., Zimmerman G.A., Weyrich A.S.: Anucleate platelets generate progeny. *Blood*, 2010; 115: 3801-3809
- [53] Schwartz H., Rowley J.W., Tolley N.D., Campbell R.A., Weyrich A.S.: Assessing protein synthesis by platelets. *Methods Mol. Biol.*, 2012; 788: 141-153
- [54] Shaklai M., Tavassoli M.: Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J. Ultrastruct. Res.*, 1978; 62: 270-285
- [55] Sharnoff J.G., Scardino V.: Pulmonary megakaryocytes in human fetuses and premature and full-term infants. *Arch. Pathol.*, 1960; 69: 139-141
- [56] Shashkin P.N., Brown G.T., Ghosh A., Marathe G.K., McIntyre T.M.: Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J. Immunol.*, 2008; 181: 3495-3502
- [57] Shivdasani R.A.: Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells*, 2001; 19: 397-407
- [58] Stalsberg H., Prydz H.: Studies on chick embryo thrombocytes. ii. function in primary hemostasis. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1963; 143: 291-299

- [59] Stenberg P.E., Levin J.: Mechanisms of platelet production. *Blood Cells*, 1989; 15: 23-47
- [60] Tanaka Y., Eishi Y., Morris B.: Splenic hemopoiesis of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*): evidence of primary hemopoiesis in the spleen of a primitive mammal. *Am. J. Anat.*, 1988; 181: 401-405
- [61] Tavassoli M.: Fusion-fission reorganization of membrane: a developing membrane model for thrombocytopoiesis in megakaryocytes. *Blood Cells*, 1979; 5: 89-99
- [62] Tavassoli M., Aoki M.: Migration of entire megakaryocytes through the marrow-blood barrier. *Br. J. Haematol.*, 1981; 48: 25-29
- [63] Thon J.N., Italiano J.E.: Platelet formation. *Semin. Hematol.*, 2010; 47: 220-226
- [64] Travlos G.S.: Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.*, 2006; 34: 548-565
- [65] Trowbridge E.A., Martin J.F., Slater D.N.: Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation. *Thromb. Res.*, 1982; 28: 461-475
- [66] Vitrat N., Cohen-Solal K., Norol F., Guichard J., Cramer E., Vainchenker W., Wendling F., Debili N.: Compared effects of Mpl ligand and other cytokines on human MK differentiation. *Stem Cells*, 1998; 16: 37-51
- [67] Weber A.A., Przytulski B., Schumacher M., Zimmermann N., Gams E., Hohlfeld T., Schror K.: Flow cytometry analysis of platelet cyclooxygenase-2 expression: induction of platelet cyclooxygenase-2 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Br. J. Haematol.*, 2002; 117: 424-426
- [68] Wolber E.M., Jelkmann W.: Thrombopoietin: the novel hepatic hormone. *News Physiol. Sci.*, 2002; 17: 6-10
- [69] Wright J.H.: Die Entstehung der Blutplättchen. *Virchow's Arch.*, 1906; 186: 55-63
- [70] Yamada E.: The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat. (Basel)*, 1957; 29: 267-290
- [71] Ye M., Graf T.: Early decisions in lymphoid development. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007; 19: 123-128
- [72] Zielinski T., Wachowicz B., Saluk-Juszczak J., Kaca W.: Polysaccharide part of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide may be responsible for the stimulation of platelet adhesion to collagen. *Platelets*, 2002; 13: 419-424

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.