

KRYSTYNA MAŚLANKA¹, HALINA MICHUR¹, GABRIELA SMOLEŃSKA-SYM²

Mikrocząstki błon komórkowych

Cell membrane microparticles

¹Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie
Kierownik: Prof. dr hab.n.med. Ewa Brojer

²Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie
Kierownik: Doc. dr hab.n.med. Magdalena Łętowska

STRESZCZENIE

Płytki krwi, erytrocyty, monocyty, limfocyty, a także komórki śródbłónka uwalniają pęcherzyki błonowe wielkości od 0,2–2 µm, które noszą nazwę mikrocząstek (MP – ang. microparticles). Podstawą tworzenia MP jest utrata asymetrii błony plazmatycznej w wyniku aktywacji komórek lub procesu apoptozy. Mikrocząstki posiadają antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek z których powstały. Najlepiej zostały poznane MP uwalniane z płytek krwi, ze względu na ich aktywność prokoagulacyjną oraz MP z komórek śródbłónka, które odgrywają zasadniczą rolę w procesie apoptozy. W warunkach fizjologicznych stężenie MP w osoczu jest niskie, ale wzrasta w wielu zespołach klinicznych. W pracy przedstawiono mechanizm powstawania MP i scharakteryzowano ich antygeny powierzchniowe. Ponadto omówiono metody wykrywania MP, ponieważ oznaczanie w osoczu ich stężenia może mieć duże znaczenie diagnostyczne.

SŁOWA KLUCZOWE: Mikrocząstki – Fosfolipidy błony komórkowej – Metody oznaczania mikrocząstek

SUMMARY

Platelets, erythrocytes, monocytes, lymphocytes, as well as endothelial can release from their cell membranes 0.2–2 µm vesicles called microparticles (MP). The background for MP formation is the loss of phospholipid asymmetry in the cell membrane as result of cell activation or apoptosis. Microparticles express cell surface antigens characteristic for cells of their origin. Best recognized are MP released from the platelets, due to their procoagulant activity, and MP from the endothelial cells, that play an essential part in the apoptosis process. In physiological conditions the MP concentration in plasma is low but their level is observed to increase in many clinical syndroms.

In this paper we discuss the mechanism of MP formation and the characteristics of their cell membrane antigens. Furthermore, we present the methods of MP detection because to determine their levels in plasma may have great diagnostic significance.

KEY WORDS: Microparticles – Cell membrane phospholipids – Methods of microparticles detection

WSTĘP

Obecnie wiadomo, że wszystkie krążące komórki krwi (płytki krwi, erytrocyty, granulocyty, monocyty, limfocyty), jak również komórki śródbłonka naczyń są zdolne do uwalniania pęcherzyków błonowych, które noszą nazwę mikrocząstek (MP – ang. microparticles). Mikrocząstki mogą być różnej wielkości od 0,2–2 μm . Najwięcej MP uwalniają płytki krwi, głównie w wyniku ich aktywacji oraz w procesie apoptozy. Ponadto z aktywowanych płytek krwi mogą uwalniać się także egzosomy, granule o średnicy 0,4–1 μm [1, 2, 3, 4]

W literaturze najwięcej jest doniesień, które dotyczą MP pochodzących z płytek krwi (PMP – ang. platelet-derived MP), ze względu na ich aktywność prokoagulacyjną. Już w 1946 r. Chargaff i West [5] sugerowali, że osocze pozbawione płytek, może zawierać czynnik, który przyspiesza tworzenie trombiny. Dopiero Wolf [6] w 1967 r. wykazał, że osocze poddane ultrawirowaniu, zawiera łatwo barwiące się Sudanem lipidy obecne we fragmentach błon komórkowych, które nazywał „pyłami płytek” (ang. platelet dust). Autor wykazał, że mają one właściwości prokoagulacyjne ponieważ uczestniczą w procesie tworzenia trombiny.

Pierwsze doniesienie o MP uwalnianych z ludzkich erytrocytów (EMP – ang. erythrocyte-derived MP) ukazało się w 1980 r. [cyt. wg Greenwalt i wsp. 7]. EMP mogą być nieraz mniejsze (około 0,15 μm średnicy), aniżeli opisane wyżej PMP. Po raz pierwszy w 1994 r. Satta i wsp. [8] opisali MP pochodzące z monocytów, po stymulacji lipopolisacharydem, a w 1999 r. Coombs i wsp. [9] MP pochodzące z komórek śródbłonka naczyniowego ludzkiej pępowiny (HUVEC – ang. human umbilical vein endothelial cells), po stymulacji TNF-alfa.

Obecnie wiadomo, że uwalnianie MP z komórek jest nie tylko naturalnym fizjologicznym procesem, który zachodzi w czasie dojrzewania i starzenia się komórek, ale że MP występują w dużych ilościach w osoczu w przebiegu wielu chorób (np w zakrzepicach żył głębokich i zatorach pęcherzyków płucnych, arteriosklerozie, chorobach układu sercowo-naczyniowego czy chorobach układowych takich jak cukrzyca) [1, 3, 10]. Są także doniesienia, że dłuższe przechowywanie składników krwi do transfuzji także prowadzi do uwalniania MP [11, 12].

Mechanizm powstawania mikrocząstek

Skład i asymetryczne ułożenie fosfolipidów w błonie plazmatycznej jest wysoce specyficzne. Fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydyloetanolamina (PE) występują głównie w wewnętrznej warstwie cytoplazmatycznej, a fosfatydylocholina (PC) i sfingomielina (SM) w warstwie zewnętrznej dwuwarstwy lipidowej. Asymetria błony utrzymuje się w komórkach spoczynkowych. W czasie aktywacji czy zaprogramowanej śmierci komórek, natępuje utrata tej asymetrii w wyniku przemieszczenia PS i PE z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Obecność PS na powierzchni błony komórkowej ułatwia makrofagom usuwanie apoptotycznych komórek czy fragmentów komórkowych [13].

W regulowaniu asymetrii fosfolipidów błony komórkowej i tworzeniu się MP bierze udział kilka enzymów takich jak: gelsolina [14], translokaza aminofosfolipidów [15], flopaza [16], skramblaza [17] i kalpaina [18]. Szczegółowy opis aktywności tych enzymów w powstawaniu MP został przedstawiony w Tabeli 1.

Tabela 1. Enzymy biorące udział w powstawaniu mikrocząstek błon komórkowych.

Table 1. Enzymes participating in cell membrane microparticle formation

Nazwa enzymu	Funkcja enzymu
Gelsolina	Specyficzna tylko dla płytek krwi. Bierze udział w oddzielaniu fragmentów włókien aktyny z cytoszkieletu płytek. Wpływa na wzrost Ca^{2+} w cytosolu.
Translokaza aminofosfolipidów	Transportuje aminofosfolipidy (PS i PE) z zewnętrznej warstwy błony do wnętrza komórki. Do transportu każdej cząsteczki fosfolipidów potrzebna jest jedna cząsteczka ATP. Wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} hamuje działanie translokazy.
Flopaza	Zależna od ATP. Transportuje fosfolipidy z wewnętrznej strony dwuwarstwy lipidowej na zewnątrz. Prawdopodobnie współdziała z translokazą aminofosfolipidów, ale dokładna funkcja tego białka nie jest jeszcze całkowicie poznana.
Skramblaza	Obecna w dużej ilości w błonie komórkowej płytek krwi. Wpływa na transport fosfolipidów poprzez błonę komórkową. Wzrost poziomu Ca^{2+} aktywuje skramblazę i hamuje działanie translokazy aminokwasów. Ten proces jest przyczyną utraty asymetrii fosfolipidów
Kalpaina	Rozbija włókna aktyny cytoszkieletu i ułatwia uwalnianie MP

W tworzeniu wszystkich rodzajów MP zasadniczą rolę odgrywa stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek. W czasie aktywacji komórek następuje wzrost poziomu Ca^{2+} wydzielanego przez cytoplazmatyczne retikulum, co prowadzi do uaktywnienia wyżej wymienionych enzymów, a efektem tego jest przemieszczanie się PS i PE z wewnętrznego do zewnętrznego listka dwuwarstwy lipidowej [15, 16, 17].

Czynniki wpływające na proces powstawania mikrocząstek

Do podstawowych mechanizmów, które wpływają na proces uwalniania się MP z powierzchni błon komórkowych należą aktywacja i apoptoza komórek.

W wyniku aktywacji komórek, najlepiej został poznany proces powstawania PMP. Wiadomo, że zaktywowane płytki wyzwalają PMP *in vitro* w obecności agonistów takich jak kolagen czy trombina i wiążą się do ich powierzchniowych receptorów. Te receptory przekazują dalej informację poprzez błonę komórkową, co powoduje wzrost poziomu Ca^{2+} , który ułatwia uwalnianie PMP [19]. Mikrocząstki mogą powstawać także z komórek, które są zaktywowane na skutek kontaktu z powierzchnią obcych ciał [20], po związaniu składników dopełniacza [21], czy pod wpływem niskiej temperatury [22].

Wydaje się, że integryna $\alpha\text{IIb}\beta_3$, która pośredniczy w oddziaływaniu płytek wzajemnie na siebie jak i na inne komórki, pełni istotną rolę w uwalnianiu PMP. Potwierdzają to badania płytek od pacjentów z trombastenią Glanzmanna (tj. z brakiem funkcjonalnej $\alpha\text{IIb}\beta_3$), które po stymulacji trombiną czy kolagenem uwalniają mniej PMP niż płytki od zdrowych osób, natomiast po aktywacji dopełniaczem wyzwalają podobną liczbę PMP, jak płytki kontrolne [23].

Starzenie się komórek jest procesem fizjologicznym, które prowadzi do apoptozy. Kluczowym momentem apoptozy jest wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i uaktywnienie kaspaz, enzymów proteolitycznych, co prowadzi do degradacji DNA, struktur białkowych i uwalniania MP. W przypadku płytek krwi, które nie posiadają jądra komórkowego, nie dochodzi do pełnej zaprogramowanej śmierci, łącznie z fragmentacją DNA, ale płytki posiadają wszystkie białka, które uczestniczą w procesie apoptozy (cytochrom C, prokapsaza 3, 8, 9) [24].

Charakterystyka antygenów mikrocząstek

Mikrocząstki posiadają antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek z których powstały. Tabela 2 przedstawia charakterystyczne antygeny które zidentyfikowano na MP. Większość z nich jest stosowana do rozróżniania MP w prowadzonych badaniach laboratoryjnych.

Tabela 2. Specyficzne antygeny służące do wykrywania MP
Table 2. Specific antigens used for MP identification

Pochodzenie MP	Antygen	CD (ang. cluster determinant)
Płytki krwi	GPIb α , β_3 integryna GPIIb, α II β integryna GPIIbIIIa, α II β_3 integryna GPIX GPIIIa, β_3 integryna P-selektyna	CD42b CD41 CD41a CD42a CD61 CD62P
Komórki śródbłonna	PECAM-1 GP 105-110 E selektyna α_v integryna S-Endo/Muc 18 VE-kaderyna Endoglina	CD31 CD34 CD62E CD51 CD146 CD144 CD105
Erytrocyty	Glikoforyna A	CD235a
Leukocyty	LCA, T200,B220	CD45
Monocyty	LPS-R	CD14
Granulocyty	CGM6	CD66b, CD67
T _h limfocyty	T4	CD4
T _s limfocyty	T8, Leu-2	CD8
B limfocyty	B1, Bp35	CD20

Mikrocząstki uwolnione z płytek krwi posiadają wspólne z nimi receptory glikoproteinowe, między innymi ekspresję GPIIb α , kompleksu GPIIb/IIIa (integryna α IIb β 3 –CD41a) czy P-selektynę (CD62P) [25, 26]. Badania w warunkach *in vitro* wykazały, że PMP uwolnione z płytek krwi aktywowanych kolagenem czy trombiną, ekspozują integrynę α IIb β 3 i mają zdolność wiązania fibrynogenu, a więc mogą uczestniczyć w tworzeniu zakrzepów [27]. Natomiast PMP powstałe z płytek po aktywacji składnikami dopełniacza (C5b-9) ekspozują tę samą integrynę, do której jednak nie wiąże się fibrynogen [28]. Na PMP nie stwierdza się ekspresji CD42, natomiast jest ona wykazywana na nieaktywowanych płytkach krwi, dlatego ta molekula może służyć jako marker obecności płytek krwi, które zanieczyszczają populację PMP w badaniach cytometrycznych [29]. Interesujące są obserwacje Majka i wsp. [30], którzy wykazali na PMP od osób HPA-1a dodatnich (HPA – ang. human platelet antigens) obecność tego wysoko immunogennego antygenu HPA-1a płytek krwi.

Mikrocząstki uwalniane z komórek śródbłonna posiadają ekspresję: molekuly adhezyjnej PECAM-1 (CD31), integryny α v (CD51), antygenu S-Endo/Muc 18 (CD146), E-selektyny (CD62E), antygenu śródbłonna naczyń – VE-kadheryny (CD144) i Endogliny (CD105) [31, 32]. Wg Simaka i Geldermana [1] najlepszą kombinacją antygenów, które identyfikują MP śródbłonna jest układ antygenów CD105⁺/CD144⁺. Wykazano, że wzrost populacji MP o takiej charakterystyce może być wskaźnikiem uszkodzenia śródbłonna naczyń, a co za tym idzie wskazuje na predyspozycję u chorego do rozwoju powikłań zakrzepowych. Ponadto na MP pochodzących z komórek śródbłonna stwierdza się ekspresję multimerów czynnika von Willebranda i komórek prionowych [3, 33]. Jimenez i wsp. [34] wykazali, że MP śródbłonna, mogą mieć różny zestaw markerów, który zależy od tego czy powstają w wyniku aktywacji komórek czy apoptozy.

Mikrocząstki uwalniane z krwinek czerwonych posiadają glikoforynę A (CD235a), która jest głównym markerem MP erytrocytarnych. Na MP izolowanych z przechowywanej krwi, wykrywano antygeny grupowe A, B, H oraz P₁, D, c, e i Fy^a, natomiast ekspresja antygenów M i N była słaba [10].

Wspólny antygen leukocytny (CD45) służy do identyfikacji MP pochodzących z krwinek białych. Przeciwciała monoklonalne skierowane do CD14, CD66c, CD4, CD8 i CD20 służą do wykrywania MP pochodzących odpowiednio, z monocytów, granulocytów, Th, Ts i B limfocytów [35].

Należy dodać, że niektóre rozpuszczalne antygeny pochodzące z jednego rodzaju komórek z którego powstały MP, mogą przylegać do MP pochodzących z innych komórek. Ponadto MP mogą przenikać przez błonę komórkową do drugich komórek i w konsekwencji uwalniać MP z zaadoptowanym obcym antygenem. Tego typu sytuacja występuje w przypadku PMP, na których można stwierdzać ekspresję czynnika tkankowego (TF – tissue factor) i w związku z tym mogą one uczestniczyć w procesie uszkodzenia naczyń [1].

Metody izolacji i wykrywania mikrocząstek

Wiadomo, że MP uczestniczą w patologii wielu chorób, dlatego niezbędne było opracowanie metod ich identyfikacji w celach diagnostycznych.

Opisanych zostało kilka metod analizy MP, które opierały się głównie na badaniach MP płytkowych. Jedną z pierwszych była metoda opisana w 1982 r. George i wsp. [36] którzy otrzymali PMP, poddając osocze lub surowicę wirowaniu przy $35\ 000 \times g$ przez 20 min., po uprzednim usunięciu z nich elementów morfotycznych krwi. Uzyskane PMP po odpowiednim przygotowaniu, poddawali rozdzielności elektroforetycznej, a następnie zastosowali przeciwciała monoklonalne anty-GPIIb/IIIa znakowane ^{125}J . W badaniu autoradiograficznym wykazali, że w surowicy jest większa liczba PMP aniżeli w osoczu i że ich liczba zależy od siły i czasu wirowania. Chociaż metoda ta nie znalazła większego zastosowania do badań MP to zwróciła uwagę na sposób ich izolacji, która w dużej mierze zależy od siły i czasu odwirowywania elementów morfotycznych krwi.

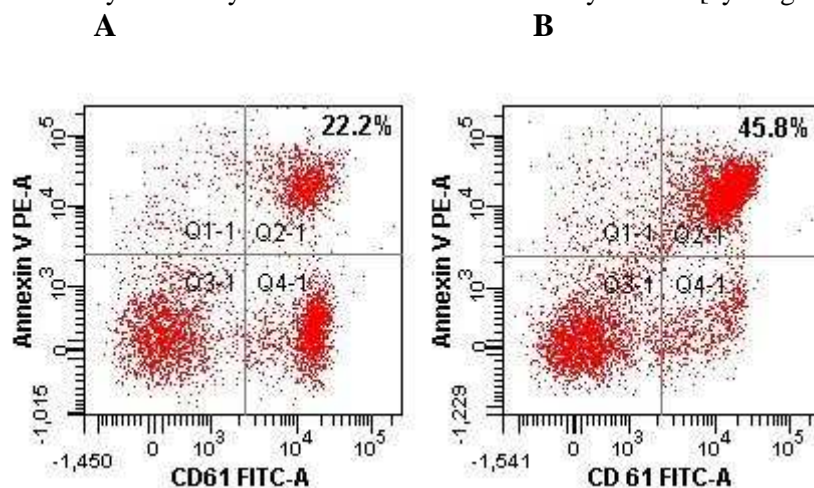
Z przeglądu prac dotyczących metod izolacji MP wynika, że autorzy w pierwszej kolejności pozbywali się elementów morfotycznych z bogatopłytkowego osocza (PRP-ang. platelet rich plasma), stosując wirowanie przy $1300\text{--}1550 \times g$ przez 10-20 min. Następnie w celu otrzymania osadu MP osocze wirowano przy $17\ 500\text{--}18\ 000 \times g$ przez 20-30 min. [9, 33, 37, 38].

Tabela 3. Metody badania MP
Table 3. Methods of MP detection

Metoda	Opis metody	Literatura
Rozdział elektroforetyczny białek MP, uzyskanych z osocza przy wysokiej sile wirowania.	Western blotting: zastosowanie MoAb anty-GPIIb/IIIa znakowanych ^{125}J , analiza autoradiogramu.	George i wsp. 1982 r. (36)
Badanie cytometryczne	Zastosowanie: aneksyny V, mającej powinowactwo do PS na powierzchni MP i przeciwciał skierowanych do swoistych antygenów MP.	Thiagarajan & Tait w 1991 r. (39).
ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) Ocena ilościowa	Płytki testowa opłaszczona aneksyną V lub przeciwciałami skierowanymi do swoistych antygenów MP. Pomiar całkowitej ilości fosforu lub aktywności fosfolipidów anionowych.	Miyamoto i wsp. 1998 (40), Nomura 2004 (37)

Tabela 3 przedstawia dotychczas stosowane metody badania MP (chronologicznie do czasu ich opisania w literaturze). Obecnie podstawową metodą z wyboru do oceny liczby MP są badania w cytometrze przepływowym. Po raz pierwszy cytometryczne badania MP zostały opisane w 1991 r. przez Thiagarajan & Tait [39]. Pozwalają one na ocenę dużej liczby MP (kilka tysięcy), uzyskanie informacji o rozmiarze MP, co odzwierciedlają parametry „forward scatter” i ich granularności -parametry „side scatter”.

W tym badaniu stosuje się aneksynę V (białko o ciężarze 35–36kDa), która w obecności jonów Ca^{2+} , wiąże się selektywnie do ujemnie naładowanych fosfolipidów, głównie fosfatydyloseryny obecnej na MP, podstawowego markera wszystkich rodzajów MP. Z uwagi na fakt, że MP pochodzą z różnych komórek, do ich oceny należy użyć dodatkowego markera, który jest charakterystyczny dla danych komórek (tabela 2). Zwykle aneksyna V jest znakowana fikoerytryną (PE), a przeciwciała do identyfikacji pochodzenia MP izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Stosując przeciwciała skierowane do kilku antygenów komórkowych, sprzężone z różnymi chromoforami, jest możliwość charakterystyki dużej liczby antygenów na pojedynczej MP. Jakkolwiek analiza cytometryczna MP nie jest łatwa, to metoda ta jest ciągle „złotym standardem” ich identyfikacji. Ryc. 1 ilustruje przykład oznaczenia cytometrycznego MP uwalnianych z płytek krwi, w czasie przechowywania składników krwi przeznaczonych do transfuzji. Natomiast tabela 4 przedstawia, na podstawie badań cytometrycznych, liczbę MP uwalnianych z różnych komórek do osocza zdrowych osób [cyt. wg 1].



Ryc. 1. Analiza cytometryczna odsetka mikrocząstek uwalnianych z płytek krwi, barwionych aneksyną V-PE i CD61-FITC, w koncentracje krwinek czerwonych: A) w dniu pobrania (22,2%), B) po 7 dniach od pobrania (45,8%)

Fig. 1. Flow cytometry analysis of micoparticles released from platelets and stained with annexinV-PE and CD61-FITC in erythrocyte concentrates: A) on blood collection day (21,7%), B) on day 7 following blood collection (45,8%)

Należy także wspomnieć o metodzie enzymatycznej ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay), w której do wykrywania MP stosuje się mikropłytki testowe opłaszczone aneksyną V lub przeciwciałami charakterystycznymi dla antygenów komórkowych MP [37, 40]. Zaletą tej techniki jest możliwość badania dużej liczby próbek. Jednakże aneksyna V może wiązać się w niespecyficzny sposób do mikropłytki testowej, dlatego metoda ta znalazła ograniczone zastosowanie. W teście ELISA można oceniać MP ilościowo stosując pomiary całkowitej ilości fosforu lub fosfolipidów anionowych [37].

Tabela 4. Liczba MP w osoczu zdrowych osób [cyt. wg 1]**Table 4.** MP count in normal human plasma

Pochodzenie MP	Fenotyp MP	Liczba MP (μ l)
Płytki krwi	CD41 ⁺	625 \pm 72
	CD61 ⁺ PS ⁺	237 (116-565)
Erytrocyty	CD235a ⁺ PS ⁺	30 \pm 10
	CD235 ⁺ PS ⁺	1340 (1079-1468)
Leukocyty	CD45 ⁺	14 \pm 2,6
Monocyty	CD14 ⁺	2 \pm 0,3
Granulocyty	CD66b ⁺	9 \pm 1,2
Komórki endotelium	CD144 ⁺ PS ⁺	7,5 \pm 2,5
	CD51 ⁺	14 \pm 2,3
	CD31 ⁺ CD42	870 \pm 70

Obecnie nie ma wystandaryzowanych poszczególnych technik badania MP i każde laboratorium prowadzące takie oznaczania ma opracowane własne metody i normy wykrywania MP.

Wykonanie dokładnych badań MP nie jest proste, ponieważ jak wyżej wspomniano MP są uwalniane w czasie aktywacji komórek, stąd aby wyniki badań były powtarzalne i porównywalne, należy zwracać uwagę na: 1) miejsce pobrania próbki (z żyły przeramienia, czy z dostępu centralnego), 2) rozmiar igły, 3) odrzucenie pierwszej pobranej próbki krwi, 4) sposób pobrania (strzykawka zwykła czy próżniowa, próbówka plastikowa), 5) typ antykoagulantu (cytrynian sodu mniej aktywuje komórki niż EDTA czy heparyna), 6) zmiany temperatury (próbki krwi nie powinny być chłodzone, przegrzewane), 7) mieszanie próbek (stres związany z mieszaniem może indukować wyzwalamie MP z komórek krwi). Dopuszcza się przetrzymywanie próbek krwi w temperaturze pokojowej, w połączeniu z bardzo ostrożnym i delikatnym mieszaniem, 8) możliwie krótki czas pomiędzy pobraniem i izolacją (najlepiej mniej niż 1 godzina).

Dodanie inhibitorów enzymów w czasie pobrania krwi (proteaz czy fosfolipaz) może mieć korzystny wpływ na metodę izolacji niestabilnych populacji MP, czy wrażliwych na proteolizę antygenów MP. Jednak nie ma jeszcze dostatecznych dowodów, które to potwierdzają.

Innym zagrożeniem, które wpływa na ocenę liczby MP, jest możliwość ich utraty w czasie samego procesu otrzymywania osadu MP z krwi czy z PRP, a także w czasie płukania, które stosuje się przy znakowaniu fluorochromami antygenów MP. Ponadto jest ryzyko, że MP uwalniają się z komórek w czasie procesu wirowania.

Rozpatrywane jest stosowanie mrożonych próbek osocza do analizy MP. Simak i wsp. (1) rekomendują mrożenie osocza, pozbawionego elementów morfotycznych krwi, w ciekłym azocie lub -70°C i przechowywanie go nawet kilka tygodni. Isototne jest szybkie rozmrożenie w 37°C wraz z delikatnym mieszaniem i schłodzenie próbki do 10°C . Szybkie rozmrożenie w 37°C zapobiega tworzeniu się dużych kryształów lodu, a przedłużona inkubacja w tej temperaturze może doprowadzić do zniszczenia MP i degradacji wrażliwych antygenów. Badania Simak i wsp. [41] oraz Shet i wsp. [42], wykazały jednak, że nie ma istotnych różnic w badaniach cytometrycznych MP

w próbkach badanych bezpośrednio czy po mrożeniu. Jednakże powinno się unikać powtórnego mrożenia i rozmrażania próbek, ponieważ można uzyskać fałszywy wzrost liczby MP w badanej próbce.

Pomimo trudności opisanych powyżej, badania liczby MP są coraz częściej stosowane jako dodatkowy parametr diagnostyczny w wielu zespołach klinicznych.

Fizjologiczne i patologiczne znaczenie MP będzie przedmiotem oddzielnej publikacji.

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy nr NN401215734

PIŚMIENNICTWO

1. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially agents and diagnostic markers. *Transfusion*. 2006; **20**: 1-26.
2. Horstman LL, Wenche J, Jimenez J. J, Bidot C, Ahn Y.S. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Kio J Med*. 2004; **53**: 210-230.
3. Piccin A, Murphy W.G., Smith O.P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Review*. 2007; **21**: 157-171.
4. Nieuwland R, Sturk A. Platelet-derived microparticles, rozdział 20, w *Platelets*, 2-ed edition, redak. Michelson A.D. Elsevier Science, USA, 2002, 403-413.
5. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*. 1946; **166**: 189-197.
6. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Brit. J. Haematol.* 1967; **13**: 269-288.
7. Greenwalt TJ, Steane EA, Lau FO, Sweeney-Hammond K. Aging of the human erythrocyte. In: *Immunology of the erythrocyte*. 43 rd ed. New York: A.R.Liss; 1980, p.195-212.
8. Satta N, Toti F, Feugesas O, Bohbot A i wsp. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 1994; **153**: 2639-2642.
9. Coombs V, Simon ACG, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F i wsp.. *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J.Clin. Invest.* 1999; **104** (1): 93-102.
10. Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion*, 2005; **46** (1): 143-152.
11. Keuren JFW, Magdeleyns EJP, Govers-Riemslog JWP et al. Effect of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Brit. J. Haematol.* 2006; **134**: 307-313.
12. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot J.D., Lion N. Microparticles in stored red blood cells; an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang.* 2008; **95**: 288-297.
13. Schroit A.J, Tanaka Y, Madsen J, Fidler I.J. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidyl-serine and possible implication of membrane phospholipid asymetry. *Biol.Cell*, 1984; **51** (2): 227-239.
14. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament serving. *Nature*. 1993; **364**: 685-692.
15. Beleznav Z, Zachowski A, Devaux PF, Navazo MP, Ott P. ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry*. 1993; **32**: 3146-3152.

16. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J.Bio.Chem.* 1992; **267**: 19412-19417.
17. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Mechanism and function of change in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochim.Soc. Trans.* 1993; **21**: 248-253.
18. Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CP, Murphy WG, Moore JC. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood.* 1992; **80**: 2246-2251.
19. Holme PA, Orvim U, Hamers MJ et al. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 1997; **17**: 646-653
20. Gemmell CH, Ramirez SM, Yeo EL et al. Platelet activation in whole blood by artificial surfaces: Identification of platelet-derived microparticles and activated platelet binding to leukocytes as material-induced activation events. *J.Lab. Clin Med.*, 1995, **125**: 276-287.
21. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL i wsp. Complement –induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 1993; **82**: 1192-1196.
22. Bode AP, Knupp CL. Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation. *Transfusion.* 1994; **34**: 690-696.
23. Holme PA, Solum NO, Brosstad F et al. Stimulated Glanzmann,s thrombasthenia platelets produced microvesicles. Microvesiculation correlates better to exposure of procoagulant surface than to activation of GPIIb-IIIa. *Thromb. Haemost.*, 1995; **74**: 1533-1540.
24. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev.Cytol.*, 1980; **68**: 251-306.
25. Schwarz M, Katagiri Y, Kotani M I wsp. Reversibility versus persistence of GpIIb/IIIa blocker-induced conformational change of Gp IIb/IIIa (alpha Iibbeta 3, CD41/CD61). *J.Pharmacol. Exp.Ther.*, 2004; **308**:1002-1011.
26. George JN, Pickett EB, Saucerman S i wsp. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J.Clin.Invest.* 1986; **78**: 340-348.
27. Tschoepe D, Spangenberg P, Esser J i wsp. Flow-cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets. *Cytometry.* 1990; **11**: 652-656.
28. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT i wsp. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: An isolated defect in platelet procoagulant activity. *J.Biol.Chem.* 1989; **263**: 17049-17056.
29. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit. Rev. Oncol.Hematol.* 1999; **30**: 111-142.
30. Majka M, Kijowski J, Lesko E i wsp. Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells- implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochem, Cytobiol.* 2007; **45**: 27-32.
31. Mutin M, Dignat-George F, Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens.* 1997; **50**: 449-458.
32. Horstman LL, Jy W, Ahn. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosc.* 2004; **9**: 1118-1135.
33. Simak J, Holada K, D'Agnillo F I wsp. Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma. *Transfusion*, 2002; **42**: 334-342.

34. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM i wsp. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activatin and apoptosis. *Thromb. Res.* 2003; **109**: 175-180.
35. Bodin S, Tronchere H, Payrastre B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation process. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003; **1610**: 237-257.
36. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*, 1982; **60**: 834-840.
37. Nomura S. Measuring circulating cell derived microparticles. *J Thromb. Haemost.*, 2004; **2**(10): 1847-1848.
38. Biro E, Nieuwland R, Stirk A. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J.Thromb Haemost.*, 2004; **2** (10): 1843-1844.
39. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelet and platelet-derived microparticles. *J.Bio.Chem.* 1991; **266** (36): 24302-24307.
40. Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds LH, Niewiarowski S. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GpIIb/IIIa. *Thromb. Haemost.* 1998; **80** (2): 225-230.
41. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Brit. J. Haematol.* 2004, **125** (6): 804-813.
42. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N et al. Siecle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003; **102** (7): 2678-2683.

Praca wpłynęła do Redakcji 20.04.2009 r. i została zakwalifikowana do druku 30.04.2009 r.

Adres do korespondencji:

Krystyna Maślanka
Instytut Hematologii i Transfuzjologii
ul. Chocimska 5
00-957 Warszawa