

Fizjologiczna i patogeniczna aktywność mikrocząstek błon komórkowych

Physiopathological activity of cell membrane microparticles

Krystyna Maślanka

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie

Mikrocząstki (MP) są uwalniane z błon powierzchniowych większości komórek eukariotycznych. W pracy przedstawiono, na podstawie doniesień literatury światowej, różne rodzaje aktywności MP: prokoagulacyjną i antykoagulacyjną, efekt immunomodulacyjny, zdolność do adhezji i indukcji procesów zapalnych, udział w apoptozie, angiogenezie i przyjęciu przeszczepów komórek hematopoetycznych. Ponadto opisano wpływ MP na powstawanie wrodzonych zaburzeń czynności płytek krwi, hemoglobinopatii S, małopłytkowości indukowanej heparyną, posocznicy, zakrzepowej plamicy małopłytkowej, nocnej napadowej hemoglobinurii, cukrzycy, patologii w chorobach sercowo-naczyniowych, w zakrzepicy żył głębokich oraz zatorach pęcherzyków płucnych. Zwrócono także uwagę na znaczenie MP w składnikach krwi przygotowywanych do transfuzji.

Słowa kluczowe: fizjopatologia mikrocząstek, aktywność mikrocząstek, kliniczne znaczenie mikrocząstek

J. Transf. Med. 2010; 1: 9–17

Summary

Microparticles (MP) are released from cell membrane of most eukaryotic cells. Supported by data from world literature, this paper presents different kinds of MP activity: procoagulant and anticoagulant activity, immunomodulatory effect, capacity for adhesion and induction of inflammatory processes, participation in apoptosis, angiogenesis and engraftment of hematopoietic stem cell transplantation. Apart from the above, the presentation also describes MP contribution to pathogenesis: congenital bleeding disorders, haemoglobinopathy S, heparin-induced thrombocytopenia, thrombocytopenic purpura, diabetes, paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, cardiovascular diseases, deep venous thrombosis and pulmonary embolism. The significance of MP in blood components for transfusion is also stressed.

Key words: physiopathology of microparticles, activity of microparticles, clinical implication of microparticles

J. Transf. Med. 2010; 1: 9–17

Wstęp

Mikrocząstki błon komórkowych (MP, *micro-particles*), zwane także mikropecherzykami, wielkości 0,2–2,0 μm są uwalniane do osocza z błon komórkowych wszystkich elementów morfotycznych krwi, ze śródbłónka naczyń, a nawet z komórek nowotworowych. Niektórzy autorzy są zdania, że tym mianem powinno się nazywać tylko cząstki wielkości 0,05–1,00 μm , ponieważ większe mogą być trudno odróżnialne od płytek krwi, agregatów MP czy fragmentów apoptotycznych. Natomiast mniejsze mogą być mylone z egzosomami (fragmentami granuli płytek krwi), które są wielkości 0,04–0,08 μm . Mikrocząstki nie mają jądra komórkowego, ale na swojej powierzchni posiadają antygeny charakterystyczne dla komórek, z których powstały. Uwalnianie MP z komórek eukariotycznych jest normalnym fizjologicznym procesem, który zachodzi w czasie dojrzewania i starzenia się komórek [1, 2].

Zwiększone uwalnianie MP może zachodzić pod wpływem aktywacji komórek, na przykład w wyniku wiązania się składników dopełniacza czy kompleksów immunologicznych, działania cytokin, chemokin, czynników stresu, takich jak temperatura, zmiany ciśnienia osmotycznego, napięcia powstającego podczas przepływu w naczyniach lub pod wpływem czynników prowadzących do apoptozy komórek. Obecnie wiadomo, że zwiększona liczba MP jest wykrywana w osoczu chorych w przebiegu wielu chorób (np. w zakrzepicy żył głębokich, chorobach sercowo-naczyniowych, cukrzycy lub różnego typu infekcjach).

Badanie liczby krążących MP we krwi wydaje się być ważnym parametrem diagnostycznym, ale także może być pomocne w zrozumieniu udziału MP w patogenezie niektórych chorób [3]. Charakterystyka biochemiczna MP oraz metody ich wykrywania na podstawie danych pochodzących z literatury i własnych doświadczeń zostały omówione we wcześniejszej pracy [4].

W obecnej pracy zostanie przedstawiona aktywność MP *in vivo* oraz udział mikrocząstek w patogenezie niektórych chorób.

Aktywność mikrocząstek błon komórkowych

Aktywność prokoagulacyjna

Zdolność do tworzenia mikrocząstek płytkowych jest ważną częścią fizjologicznego procesu krzepnięcia. Aminofosfolipidy na powierzchni mikrocząstek płytkowych (PMP, *platelet microparticles*) i mikrocząstek z komórek śródbłónka (EMP, *endo-*

thelial microparticles) posiadają dużą liczbę miejsc wiążących dla osoczowych czynników krzepnięcia (IXa, VIII, Va i IIa). W związku z tym aktywacja białek krzepnięcia krwi może zachodzić nie tylko na całych płytkach, ale także na MP [5, 6]. Wiadomo, że czynnik Va w kompleksie z czynnikiem Xa tworzą kompleks protrombinazy, który w obecności jonów wapnia bierze udział w przekształceniu protrombiny do trombiny, głównego enzymu procesu krzepnięcia zmieniającego fibrynogen w fibrynę [7]. Udowodniono także, że czynnik von Willebranda (vWF, *von Willebrand's factor*) związany z EMP znacznie łatwiej wiąże się do receptorów vWF na płytkach niż rozpuszczalny vWF [8]. Ponadto wykazano, że na aktywność prokoagulacyjną PMP wpływa również obecność na ich powierzchni selektyny P, czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*), a na powierzchni MP z monocytów obecność glikoproteinowego ligandu-1 selektyny P (PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand 1*) [za: 2].

Aktywność antykoagulacyjna

W warunkach fizjologicznych krążące MP mogą także pełnić funkcje antykoagulacyjne. Potwierdzają to wyniki badań wykonanych u zdrowych osób. Wykazały one, że MP z wyeksponowaną na swej powierzchni fosfatydyloseryną (PS, *phosphatidyl serine*) biorą udział w tworzeniu trombiny, która aktywuje białko C uczestniczące w degradacji czynników krzepnięcia Va i VIIIa [9].

Zdolność do adhezji i indukowania procesów zapalnych

Mikrocząstki płytkowe wiążą się częściej do granulocytów niż do limfocytów i indukują w obu rodzajach komórek zwiększenie ekspresji molekuly adhezyjnej CD11b oraz aktywności fagocytarnej. W badaniach *in vitro* na modelu zwierzęcym uszkodzonej tętnicy króliczej wykazano, że PMP przylegają do miejsca zranienia, a ich wiązanie się do powierzchni śródbłónka zachodzi poprzez integrynę $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ [10].

Obecnie wiadomo, że wiele krążących markerów zapalenia uważanych za rozpuszczalne w rzeczywistości jest związanych z MP, czego przykładem jest PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*). Natomiast na MP z komórek HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) stwierdzono wzrost ekspresji molekuly adhezyjnej ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule 1*) [11]. Wyniki innych badań *in vitro* wykazały, że MP, które powstały po stymulacji TNF- α (*tumor necrosis factor alfa*), komórek endotelialnych, nie tylko wiążą się do ludzkich monocytów poprzez ICAM-1, ale także

stymulują powstanie TF [12]. Wykazano także, że mikrocząstki uwalniane z komórek wielojądrzastych mogą indukować wyzwalanie cytokin prozapalnych z komórek śródbłonka [13]. Powyższe obserwacje świadczą dobitnie o udziale MP w procesach zapalnych.

Ponadto w badaniach *in vitro* Gasser i Schifferli udowodniono, że MP uwalniane w wyniku aktywacji z komórek jądrzastych mają zdolność wiązania dopełniacza, co ułatwia ich niszczenie [14]. Przypuszcza się, że w taki sam sposób może zachodzić usuwanie *in vivo* MP granulocytarnych. Zdolność wiązania składników dopełniacza posiadają także MP płytkowe [15].

Udział w apoptozie

W procesie apoptozy istotnym momentem jest wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i uaktywnienie enzymów proteolitycznych, które powodują degradację DNA i struktur białkowych, a także uwalnianie MP błonowych [1–3]. Wyniki badań Simaka i Novaka wykazały, że jest różny mechanizm powstawania MP z wyekspozowaną PS i fragmentów apoptotycznych [16]. Ciałka apoptotyczne także posiadają ekspresję PS, ale ich średnica jest większa niż MP i zawierają przeważnie fragmenty materiału jądrowego.

Udział w angiogenezie

W literaturze wskazuje się na istotną rolę MP komórek śródbłonka w tworzeniu naczyń. Dowodzą tego wyniki badań procesu angiogenezy w hodowli komórek HUVEC, w których stwierdzano zwiększoną liczbę MP śródbłonka [17]. W badaniach *in vitro* Kim i wsp. także potwierdzają udział MP uwalnianych z płytek krwi w procesie angiogenezy, a w badaniach Brill i wsp. wykazano to *in vivo* na szczurzym modelu chronicznego niedokrwienego zapalenia mięśnia sercowego [18, 19].

Udział w przyjęciu przeszczepów komórek hematopoetycznych

Mikrocząstki płytkowe mają zdolność wiązania się do hematopoetycznych komórek progenitorowych i tym samym wspomagają przyjęcie przeszczepu. Potwierdzają to badania *in vitro* i *in vivo* przeprowadzone przez Janowską-Wieczorek i wsp. [20]. Autorzy sugerują, że przeszczepiane komórki hematopoetyczne wchodzi w interakcje z płytkami krwi, wiążą PMP, które mogą przenosić wiele antygenów płytkowych typu integryn na powierzchnię przeszczepionych komórek i tym samym ułatwiać zasiedlenie komórek hematopoetycznych w szpiku. Wykazały to wyniki badań na myszach — gdy przeszczepiano myszom komórki oplaszczone

PMP, uzyskiwano ich szybsze przyjęcie niż wtedy, gdy były to komórki bez dodatku PMP. Autorzy wysuwają hipotezę, że ułatwienie przyjęcia przeszczepu może być spowodowane obecnością antygeny CD41 na komórkach krwi obwodowej z ekspresją CD34+, który pochodzi ze związanych do ich powierzchni MP płytkowych. Również Pihusch i wsp. w swoich badaniach zaobserwowali znaczny wzrost PMP z CD41+ u pacjentów po transplantacji szpiku [21].

Udział w przerzutach nowotworowych

Badania Janowskiej-Wieczorek i wsp. dowodzą, że komórki nowotworowe mogą wchodzić w interakcje z MP [22]. Na podstawie badań przeprowadzonych w hodowli ludzkich komórek nowotworowych płuc badacze wykazali, że MP z płytek krwi przenoszą integrynę CD41 i wzmagają fosforylację różnych kinaz. Dodatkowo PMP stymulują proliferację komórek nowotworowych, ich przyleganie do fibrynogeny i komórek śródbłonka, co może powodować wzrost inwazyjności komórek nowotworowych.

Opisane wcześniej wyniki badań wskazują na potencjalną patogenną aktywność PMP, na którą należy zwrócić uwagę przy podejmowaniu decyzji o transfuzjach krwi dla chorych z nowotworami. W celu lepszego udokumentowania tego spostrzeżenia niezbędne są dalsze badania.

Aktywność immunomodulacyjna

Mikrocząstki mogą ułatwiać wnikanie do komórek czynników zakaźnych, takich jak wirus HIV-1, co odbywa się na drodze przeniesienia między komórkami specyficznych receptorów [23]. Udowodniono, że chemokinowy receptor CCR5, główny koreceptor dla makrofago-tropowego HIV-1, jest uwalniany wraz z MP z powierzchni CCR5+ jednojądrzastych komórek krwi obwodowej; MP zawierające CCR5 mogą przenieść ten receptor do komórek CCR5+ i uczynić je CCR5+, co ułatwia wniknięcie wirusa HIV-1 do tych komórek. Podobną rolę pełnią MP w ułatwieniu transportu molekuly CD81, koreceptora aktywacji komórek B i T, co udowodniono w przypadkach infekcji wirusem wątroby typu C [24].

Innym przykładem, na podstawie którego wiadać, jak MP wpływają na czułość i odpowiedź gospodarza na patogeny, jest doświadczenie na myszach zakażonych zarodźcami malarii (*Plasmodium falciparum*). Myszy, u których zahamowano aktywację błony komórkowej prowadzącej do ujawnienia się na powierzchni MP fosfatydyloseryny, były całkowicie odporne na zakażenie malarią [25].

Interesujące były badania nad immunomodulującą aktywnością MP/egzosomów wyzwalanych

z komórek nowotworowych, które posiadają ekspresję specyficznych antygenów nowotworowych. Wyniki badań Taylor i Gercel-Taylor wykazały, że MP/egzosomy mogą wywoływać supresję sygnałów pochodzących z komórek T i wzmacniać apoptozę poprzez ekspozycję ligandu Fas [26].

Istnieją doniesienia, że MP krążące we krwi mogą być zdolne do przenoszenia choroby prionów [27].

Udział mikrocząstek w powstawaniu niektórych zespołów klinicznych

Udział MP w patogenezie niektórych zespołów klinicznych podsumowano w tabeli 1.

Wrodzone zaburzenia czynności płytek krwi

Zespół Scotta — jest spowodowany wrodzonym zaburzeniem aktywności prokoagulacyjnej płytek krwi i MP. Udowodniono, że w tym zespole, na skutek uszkodzenia zdolności przemieszczania się fosfatydyloseryny na zewnątrz błony komórkowej, upośledzona jest zdolność powstania PMP. Obserwowano także zmniejszenie miejsc wiążących czynnik Va oraz spadek zdolności tworzenia kompleksu protrombinazy [28].

Zespół Castamana — charakteryzuje się przedłużonym czasem krwawienia, co jest również związane z zahamowaniem tworzenia PMP [29].

Zespół Wiskotta-Aldricha (WAS, *Wiskott-Aldrich Syndrome*) — u chorych z tym zespołem występują ciężkie krwawienia spowodowane małopłytkowością. Cechą charakterystyczną są niezwykle małe płytki krwi, co wiąże się z mutacją białka WAS, które uczestniczy w tworzeniu cytoszkieletu komórek. Wykazano, że w płytkach WAS jest podwyższone stężenie Ca^{2+} , które ułatwia ekspozycję PS i wzmacnia uwalnianie PMP. Potwierdziły to wyniki badań *in vitro*, w których izolowane płytki WAS w porównaniu z płytkami kontrolnymi uwalniały dużą liczbę PMP [30]. Wiadomo, że komórki z wyeksponowaną PS łatwo ulegają fagocytozie [2].

Wrodzona niedokrwistość sierpowatokrwinkowa (hemoglobinopatia S)

Przyczyna choroby to mutacja punktowa w genie kodującym hemoglobinę, czego efektem jest słabe wysycenie tlenem hemoglobiny. Erytrocyty zawierają mniej jonów potasu, natomiast więcej jonów wapnia, które, jak wiadomo, stymulują powstawanie MP. W ostrej fazie choroby następuje zwiększone niszczenie śródbłonna i wzmacnia się proces krzepnięcia. W krążeniu chorych są wykrywane MP śródbłonna, płytek krwi, krwinek czerwonych i monocytów [31]. W badaniach Shet i wsp. wykazano, że w ostrym

Tabela 1. Udział MP w patogenezie niektórych zespołów klinicznych

Table.1. The contribution of MP in pathogenesis of some clinical syndroms

Nazwa choroby	Piśmiennictwo
Zespoły Scotta i Castamana	[28, 29]
Zespół Wiskotta-Aldricha	[30]
Wrodzona niedokrwistość sierpowatokrwinkowa (hemoglobinopatia S)	[31, 32]
Małopłytkowość indukowana leczeniem heparyną	[33]
Posocznica	[34–36]
Zakrzepowa plamica małopłytkowa	[37–41]
Nocna napadowa hemoglobinuria	[42–44]
Cukrzyca	[45–47]
Choroby układu sercowo-naczyniowego	[48–56]
Zakrzepica żył głębokich i pęcherzyków płucnych	[57, 58]

stadium choroby wzrasta liczba MP pochodzących z erytrocytów (CD235a+) i z monocytów (CD14+) [32]. Natomiast w przewlekłej fazie choroby występuje przewlekła aktywacja szlaku krzepnięcia, następuje aktywacja leukocytów, płytek krwi i uwalnianie MP z tych komórek. Wyniki badań tych autorów dowiodły również, że mikrocząstki wykrywane w przewlekłej fazie choroby posiadają ekspresję molekuł CD144 i CD105 (ICAM-1). Potwierdzono także bezpośrednią korelację między zwiększeniem liczby mikrocząstek CD144+ i CD105+ a zachodzącą hemolizą i wzrostem stężenia osoczowej LDH (*lactate dehydrogenase*) oraz liczbą retikulocytów.

Wydaje się więc, że pomiar MP w tym zespole klinicznym mógłby być przydatny do wykrycia progresji choroby lub oceny skuteczności leczenia.

Małopłytkowość indukowana leczeniem heparyną

Wiadomo, że tego typu małopłytkowość (HIT, *heparin-induced thrombocytopenia*) ma podłoże immunologiczne, ponieważ osoby leczone heparyną mogą wytwarzać przeciwciała klasy IgG przeciwko heparynie, które wiążą się do PF4 na powierzchni płytek krwi. Powstałe kompleksy immunologiczne heparyna-IgG-PF4 wiążą się następnie do receptora Fc płytek krwi, co prowadzi do aktywacji tych komórek i uwalniania MP płytkowych. Ponadto kompleksy immunologiczne mogą się wiązać do komórek śródbłonna i powodować ich aktywację. Zarówno zaktywowane płytki krwi, jak i komórki

śródbłonka oraz same MP posiadają zwiększoną aktywność prokoagulacyjną. W wyniku tych procesów u chorych mogą występować groźne powikłania zakrzepowe w układzie żylnym i tętniczym [33].

Posocznica

Krążące MP stwierdzane u chorych z posocznicą pochodzą z monocytów, płytek krwi i komórek śródbłonka. Udział MP w ciężkich infekcjach nie jest jednak dokładnie poznany.

Na aktywność prokoagulacyjną MP pochodzących z monocytów u chorych z posocznicą wskazują badania *in vitro* i *in vivo* Satta i wsp. [34]. Autorzy wykazali, że po kontakcie monocytów z bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS) mają one zdolność odszczepiania MP, na których stwierdzano ekspresję TF. Potwierdziły to także wyniki badań Nieuwland i wsp. [35], którzy wykazali *in vitro*, że powstanie trombiny z udziałem MP izolowanych od chorych z posocznicą meningokokową było hamowane, jeżeli próbki uprzednio inkubowano z MoAb skierowanymi do TF czy do VII czynnika krzepnięcia. Natomiast Barry i wsp. udowodnili, że PMP od chorych z ciężką infekcją ułatwiają chemotaksję monocytów i wzmagają ich adhezję do śródbłonka [36].

Zakrzepowa plamica małopłytkowa

Patogenetyczną podstawą powstania tego zespołu (TTP, *thrombotic thrombocytopenic purpura*) jest uszkodzenie śródbłonka i powstanie agregatów płytek krwi, wywołujących zakrzepy w naczyniach włosowatych i drobnych tętniczkach wszystkich narządów. Przyczyną powstawania zakrzepów w mikrokrążeniu jest obecność w osoczu olbrzymich multimerów vWF, który, wiążąc się z GP płytek krwi, powoduje ich agregację. U zdrowych osób te multimery, obecne głównie w komórkach śródbłonka, ulegają szybkiej proteolizie przez osoczkową metaloproteinazę. Wrodzone czy nabyte niedobory proteiny wywołują TTP [37].

Kelton i wsp. wykazali, zarówno w ostrej, jak i przewlekłej postaci TTP, wzrost liczby MP śródbłonka z ekspresją kalpajny na ich powierzchni [38]. Potwierdzono to w badaniach Jimenez i wsp., którzy zaobserwowali wzrost liczby MP śródbłonka o fenotypie CD31+, CD42- i CD51+ we krwi chorych z ostrą postacią TTP, w porównaniu z liczbą MP o tej charakterystyce u zdrowych osób [39]. Natomiast liczba MP powróciła do normy w okresie remisji. Autorzy sugerują, że krążące MP śródbłonka mogą być wczesnym markerem TTP, nawet przed wystąpieniem małopłytkowości i wzrostem stężenia LDH [40].

Aktywacja kalpajny jest silnie związana z wczesnym uwalnianiem MP w TTP [36]. Ten enzym, jak

się wydaje, uczestniczy w początkowym złuszczeniu MP płytek krwi z ekspresją GPI/IX. Wyniki badań *in vitro* Jy i wsp. wykazały, że MP śródbłonka u osób z TTP posiadają vWF i są zdolne do indukowania agregacji płytek w większym stopniu aniżeli wolny vWF [41]. Ponadto udowodniono, że osocze chorych z TTP jest zdolne do indukowania wzrostu adhezji molekuł adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*).

Nocna napadowa hemoglobinuria

Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH, *paroxysmal nocturnal haemoglobinuria*), PNH jest rzadkim zespołem hematologicznym, który charakteryzuje się wewnątrznaczyniowym niszczeniem erytrocytów z udziałem dopełniacza. Przyczyną choroby jest defekt błony komórkowej spowodowany mutacją genu *PIG-4* w komórce macierzystej, który prowadzi do utraty na kotwicy błonowej ekspresji glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Defekt ten dotyczy także płytek krwi i granulocytów. Najbardziej istotny klinicznie jest niedobór białek, regulujących aktywność dopełniacza na powierzchni komórek, które pełnią rolę inhibitorów komplementu: DAF (*decay accelerating factor*, CD55) i MIRL (*membrane inhibitor of reacting lysis*, CD59) [42].

U chorych z PNH stwierdza się w krążeniu MP, które pochodzą z płytek krwi, granulocytów i komórek śródbłonka, ale zdolność odszczepiania MP z erytrocytów jest uszkodzona [43]; PMP powstałe w wyniku aktywacji dopełniacza (C5b-9) posiadają wysoką ekspresję miejsc wiążących dla kompleksu protrombinazy, głównego enzymu procesu krzepnięcia krwi. Ta prozakrzepowa aktywność MP wyjaśnia incydenty zakrzepowe u chorych z PNH. Wraz z powstaniem PMP z błony płytek usuwane są również kompleksy C5b-9, dzięki czemu płytki unikają lizy [42]. U chorych z PNH obserwuje się wzrost MP śródbłonka z ekspresją CD54, CD144 i CD105. Wykrycie u pacjentów z PNH zwiększonej liczby MP z tymi markerami może wskazywać na przewlekłą aktywację śródbłonka naczyniowego, która prowadzi do przewlekłej hemolizy wewnątrz-naczyniowej [44].

Cukrzyca

Wzrost liczby krążących MP jest obserwowany w wielu chorobach układowych, zwłaszcza w cukrzycy. Sabatier i wsp. stwierdzali u chorych z cukrzycą typu 1, w porównaniu z badaniami kontrolnymi, podwyższoną liczbę MP płytkowych (CD41+), MP śródbłonka (CD51+) i całkowitą liczbę MP z PS+ oraz wzrost prokoagulacyjnej aktywności MP [45]. Natomiast u pacjentów z cukrzycą typu 2

tylko całkowita liczba MP z PS+ była istotnie wyższa, ale nie stwierdzano ich prokoagulacyjnej aktywności. Interesująca była obserwacja, że u chorych z cukrzycą typu 1 prokoagulacyjna aktywność MP z PS+ korelowała ze stężeniem glikozylowanej hemoglobiny, co sugeruje, że aktywność prokoagulacyjna jest związana z równowagą cukrową. Omoto i wsp. obserwowali także u chorych z cukrzycą typu 2 podwyższoną liczbę MP płytkowych (CD42+, CD41a+) oraz monocytarnych (CD14+), co wskazuje na aktywację komórek, z których powstały, i udział MP w niszczeniu śródbłonna [46]. Natomiast Morel i wsp. u chorych z cukrzycą typu 2 odnotowali wzrost MP śródbłonna (CD144+). Na podstawie tych obserwacji autorzy wysuwają hipotezę, że wysokie stężenie MP o takiej charakterystyce może przewidywać wystąpienie choroby wieńcowej [47].

Mikrocząstki w chorobach sercowo-naczyniowych

Krążące MP odzwierciedlają proces aktywacji komórek oraz niszczenia zarówno krążących, jak i stałych komórek układu naczyniowego. Wobec czego nie jest zaskoczeniem, że w chorobach naczyniowych mogą występować zmiany w składzie MP pochodzących z komórek krążących i komórek śródbłonna naczyń [48, 49].

Bernal-Mizrachi i wsp. obserwowali wzrost MP śródbłonna (CD31+, CD42-) u pacjentów z różnym nasileniem choroby wieńcowej [50]. Badacze stwierdzali także bezpośrednią korelację pomiędzy liczbą tego typu MP a obrazem naczyń w angiografii. Zwłaszcza zwężenie lewej tętnicy wieńcowej zstępującej było związane z dużą liczbą krążących MP śródbłonna, w porównaniu z liczbą MP u chorych ze zwężeniem prawej tętnicy wieńcowej. Natomiast Werner i wsp. zwrócili uwagę na MP śródbłonna o charakterystyce CD31+/aneksyna V+ w aspekcie niszczenia śródbłonna naczyń [51]. Wzrost liczby MP o takim fenotypie korelował z dysfunkcją śródbłonna, który oceniano w badaniach angiograficznych na podstawie obniżenia napięcia naczyń w następstwie wnikania acetylocholiny.

U chorych ze stabilną chorobą wieńcową Tan i wsp. wykazali wzrost liczby płytkowych MP (CD61+, CD42b+), co może być sygnałem stanu prozakrzepowego [52].

Lee i wsp. opisali wzrost stężenia PMP w przypadkach zamknięcia naczyń mózgowych prowadzących do udaru mózgu [53]. Autorzy tłumaczą wzrost poziomu PMP aktywacją płytek krwi w małych naczyniach.

Touat i wsp. obserwowali wzrost stężenia PMP u chorych z tętniakiem aorty brzusznej [54]. Auto-

rzy wykazali również, że na PMP był aktywny TF, co wskazuje, że płytki krwi mogą wchodzić w interakcje z MP pochodzącymi z monocytów, które mają ekspresję TF, a następnie mogą uczestniczyć w tworzeniu zakrzepu.

Van der Zee i wsp. opisali wzrost subpopulacji PMP, które posiadają ekspresję CD63 i selektyny P, u osób z chorobą tętnic obwodowych oraz z zawałem serca [55]. Badacze wykazali, że wzrost PMP (CD63+) bardzo precyzyjnie koreluje z wczesną fazą zawału serca i miażdżycą tętnic. Podobnie, Tan i wsp. stwierdzili wysokie stężenie PMP (CD62+, CD63+), ale u osób z chromaniem przystankowym oraz u chorych z incydentami niedokrwienia [56].

Zakrzepica żył głębokich i zator pęcherzyków płucnych

Udział MP w powstawaniu zatorów żylnych jest niepodważalny, ponieważ MP mogą działać w krążeniu jako powierzchnie do tworzenia protrombiny i tenazy. Heresi i wsp. [57] wykazali, że u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową występował wzrost MP śródbłonna (CD31+, CD51+, CD54+, CD62+) oraz MP z płytek krwi (CD42+), a u chorych z zatorem pęcherzyków płucnych dodatkowo stwierdzano na MP molekułę adhezyjną CD11b. Wykazano również, że MP mogą być nośnikami inhibitora TF, co oznacza, że mogą uczestniczyć w zmniejszaniu skłonności do tworzenia zakrzepów [58]. Autorzy nie odpowiadają na pytanie, jaka powinna być równowaga pomiędzy MP z ekspresją TF i MP z inhibitorem tego czynnika.

Mikrocząstki w składnikach krwi przygotowywanych do transfuzji

Obecność znacznej liczby MP, głównie pochodzenia płytkowego, stwierdzano w świeżo mrożonym osoczu (FFP, *fresh frozen plasma*) i krioprecypitacie. Liczba uwalnianych MP korelowała z liczbą płytek krwi w FFP [59]. Prawdopodobnie uwalnianie MP z płytek krwi następowało w czasie cyklu zamrażania i rozmrażania składników krwi. Liczba PMP w FFP była 250 razy wyższa w porównaniu z liczbą PMP wykrywanych w świeżym osoczu. W badaniach tych wykazano, że PMP w FFP i krioprecypitacie mogą wspomagać efekt hemostatyczny tych składników krwi [60].

W koncentratkach krwinek płytkowych (KKP) także następuje uwalnianie MP oraz wzrost aktywności czynnika PF3, który manifestuje prokoagulacyjną aktywność [61]. Wyniki badań KKP, przygotowanych ze spulowanych płytek od dawców, wykazywały wzrost PMP (CD41+) w preparatach

przechowywanych w okresie 2–5 dni, ale w następnych dniach uwalnianie PMP było na tym samym poziomie [62]. Inni badacze także przedstawiają obserwacje dotyczące wzrostu liczby PMP (CD42+ CD41+) w KKP w czasie 5 dni ich przechowywania [63]. Interesujące są spostrzeżenia Devine i wsp. — w preparatach KKP poddanych filtracji uwalnianie PMP jest wyższe niż w KKP niepoddanych filtrowaniu [64].

Rubin i wsp. [65] badali uwalnianie MP erytrocytarnych w czasie przechowywania koncentratów krwinek czerwonych (KKCz). Badacze wykazali, że w czasie przechowywania krwi w temperaturze 4°C następuje sukcesywny wzrost liczby MP uwalnianych z erytrocytów. W 50. dniu przechowywania KKCz wzrost MP erytrocytarnych był 20-krotnie wyższy w porównaniu z dniem, w którym otrzymano preparat.

Badano także wpływ różnych rodzajów tworzyw sztucznych na powstawanie MP płytkowych.

Wyniki badań Gemmell wykazały, że uwalnianie PMP (CD41+) z krwi pełnej (KP) przechowywanej w pojemnikach polipropylenowych było wyższe w porównaniu z KP przechowywaną w pojemnikach poliwinylowych [66]. Zwiększone uwalnianie PMP na skutek aktywacji płytek krwi w wyniku kontaktu ze ścianą pojemnika potwierdzono także w badaniach Bode i wsp. [67]. W innych obserwacjach tych badaczy zaobserwowano wpływ temperatury na uwalnianie PMP. Płytki krwi przechowywane w temperaturze 4°C wydzielają znacznie więcej PMP, a aktywność PF3 była wyższa w osoczu niż w czasie przechowywania w temperaturze 22°C [68]. Natomiast wyniki badań Geldermana i wsp. wykazały, że w koncentratach krwinek płytkowych otrzymanych metodą aferezy w 6. dniu ich przechowywania stwierdza się istotny wzrost MP pochodzących z płytek krwi (CD41a+), leukocytów (CD45+), erytrocytów (CD235a+) i komórek śródbłonka (CD105+ CD45-) oraz MP z ekspresją TF [69].

Biorąc pod uwagę opisywaną w pracy różnorodną biologiczną aktywność MP, niezbędne są dalsze obserwacje, aby odpowiedzieć na pytanie, czy istnieje związek pomiędzy niekorzystnymi efektami transfuzji a obecnością MP w przetaczanych składnikach krwi.

Postęp w transfuzjologii prowadzi do coraz większego bezpieczeństwa przetaczanych składników krwi i eliminuje lub redukuje niekorzystne efekty transfuzji.

Badania potencjalnych patogennych efektów MP w składnikach krwi i badania nad uwalnianiem MP w przygotowywanych do transfuzji składnikach krwi są więc bardzo ważne.

Korzyści diagnostyczne i lecznicze wynikające z badania krążących mikrocząstek błon komórkowych

Jak dotychczas, ocena liczby MP w różnych stanach chorobowych nie przekłada się w pełni na diagnostyczną i terapeutyczną strategię leczenia tych chorób. Należy jednak podkreślić, że badania MP pomogły w zrozumieniu patofizjologicznych mechanizmów różnych chorób, zwłaszcza niedokrwistości sierpowatokrwinkowej, zakrzepowej płamicy małopłytkowej, niektórych wrodzonych skaz krwotocznych czy nocnej napadowej hemoglobinurii.

Prozakrzepowa aktywność krążących MP w różnych stanach chorobowych może się bezpośrednio przyczyniać do rozwoju choroby, a więc badania MP mogą mieć dużą wartość diagnostyczną. Przykładem przydatności badania MP jest oznaczanie mikrocząstek u chorych z hemoglobinopatią S, u których wykrycie wzrostu krążących EMP wskazuje na przewlekłe uszkodzenie śródbłonka naczyń, który charakteryzuje tę chorobę. Pomiar EMP w tym zespole może być więc ważnym narzędziem w ocenie efektu stosowanej terapii.

Interesujące jest spostrzeżenie Simaka i Geldermana, z którego wynika, że u chorych z małopłytkowością immunologiczną i stwierdzoną niską liczbą płytek, a podwyższoną liczbą PMP, obserwuje się zadawalający efekt hemostatyczny [3].

U chorych z TTP stosuje się zabiegi leczniczej plazmaferezy, podczas których razem z osoczem chorego usuwane są także MP. Ten fakt wskazuje na większe korzyści płynące z wymiany osocza u tych chorych niż z przetoczenia osocza. U niektórych pacjentów z posoczną korzyści wynikające ze stosowania zabiegów leczniczej plazmaferezy mogą także wynikać z usuwania MP.

W przyszłości można także myśleć o terapeutycznym efekcie stosowania samych MP u chorych z krwawieniami. George i wsp. uważają, że obecność PMP w krioprecypitacie może wyjaśniać terapeutyczny efekt tego składnika krwi u chorych opornych na transfuzje płytek [59].

Błajchman opisał korzystny efekt hemostatyczny po transfuzji długo przechowywanych płytek krwi. Efekt ten mógł być spowodowany wzrostem liczby PMP uwalnianych w czasie przechowywania [70]. Obserwacje te są interesujące w kontekście opracowywania nowych technik, które zmierzają do przedłużenia okresu przechowywania płytek krwi do 7 dni lub nawet dłużej [71].

W świetle doniesień, które przedstawiono w niniejszym artykule, widać, że w ostatnich latach rośnie zainteresowanie badaniami mikrocząstek,

dlatego należy mieć nadzieję, że w przyszłości oznaczenie MP w osoczu chorych z różnymi zespołami klinicznymi znajdzie większe zastosowanie.

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy N N401215734.

Piśmiennictwo

1. Gelderman M.P., Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol. Biol.* 2008; 484: 79–93.
2. Piccin A., Murphy W.G., Smith O.P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007; 21: 157–171.
3. Simak J., Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Trans. Med. Rev.* 2006; 20: 1–26.
4. Maślanka K., Michur H., Smoleńska-Sym G. Mikrocząstki błon komórkowych. *Acta Haemat. Pol.* 2009; 40: 481–491.
5. Berckmans R.J., Neuiwland R., Boing A.N., Romijn F.P., Hack A., Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* 2001; 85: 639–646.
6. Hamilton K.K., Hattori R., Esmon C.T., Sims P.J. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 3809–3814.
7. Łopaciuk S. Fizjologia hemostazy. W: Dmoszyńska A., Robak T. (red.). *Podstawy hematologii.* Wydawnictwo CZELEJ, Lublin 2003; 95–113.
8. Jy W., Jimenez J.J., Mauro L.M. i wsp. Endothelial microparticles induce formation of platelet aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *Thromb. Haemost.* 2005; 3: 1301–1308.
9. Tans G., Rosing J., Thomassen M.C. i wsp. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelet and platelet-derived microparticles. *Blood* 1991; 77: 2641–2648.
10. Merten M., Pakala P., Thiagarajan P. i wsp. Platelet microparticles promote platelet interactions with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* 1999; 99: 2577–2582.
11. Barry O.P., Pratico D., Savani R.C. i wsp. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 2118–2127.
12. Sabatier F., Roux V., Anfosso F. i wsp. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 3962–3970.
13. Mesri M., Altieri D.C. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 23111–23118.
14. Gasser O., Schifferli J.A. Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocyte in the presence of complement. *Exp. Cell Res.* 2005; 307: 381–387.
15. Wiedmer T., Hall S.E., Ortel T.L., Kane W.H., Rosse W.F., Sims P.J. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 82: 1192–1196.
16. Simak J., Novak J. Ceramide mediated release of membrane microparticles from endothelial cells is controlled by caspase 1 activity and in contrast to executive apoptotic blebbing is kinase independent. *Blood* 2003; 102: 805a (abstract).
17. Mezentsy A., Merks R.M., O’Riordan E. i wsp. Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: The role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 289: H1106–H1114.
18. Kim H.K., Song K.S., Chung J.H. i wsp. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br. J. Haematol.* 2004; 124: 376–384.
19. Brill A., Dashevsky O., Rivo J. i wsp. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc. Res.* 2005; 67: 30–38.
20. Janowska-Wieczorek A., Majka M., Kijowski J. i wsp. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98: 3143–3149.
21. Pihusch R., Wegner H., Salat C. i wsp. Flow cytometric findings in platelets of patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30: 381–387.
22. Janowska-Wieczorek A., Wysoczyński M., Kijowski J. i wsp. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer.* 2005; 113: 752–760.
23. Mack M., Kleinschmidt A., Bruhl H. i wsp. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles. A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* 2000; 6: 769–775.
24. Fritzsching B., Schwer B., Kartenbeck J. i wsp. Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J. Immunol.* 2002; 169: 5531–5537.
25. Combes V., Coltel N., Alibert M. i wsp. ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: Potential pathogenic role of microparticles in neuropathology. *Am. J. Pathol.* 2005; 166: 295–302.
26. Taylor D.D., Gercel-Taylor C. Tumor-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br. J. Cancer.* 2005; 92: 305–311.
27. Hunter N., Foster J., Chong A. i wsp. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.* 2002; 83: 2897–2905.
28. Sims P.J., Wiedmer T., Esmon C.T. 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; 264: 17049–17057.
29. Castaman G., Yu-Feng I., Battistin E. i wsp. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br. J. Haematol.* 1997; 96: 458–463.
30. Shcherbina A., Rosen F.S., Remold-O’Donnell E. Pathological events in platelets of Wiscott-Aldrich syndrome patients. *Br. J. Haematol.* 1999; 106: 875–883.
31. Wojciorowski J.K. *Aspekty genetyczne hematologii.* W: Dmoszyńska A., Robak T. (red.). *Podstawy hematologii.* Wydawnictwo CZELEJ, Lublin 2003; 23–53.
32. Shet A.S., Aras O., Gupta K., Hass M.J. i wsp. Sicle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocyte. *Blood* 2003; 102: 2678–2683.
33. Warkentin T.E. Heparin-induced thrombocytopenia IgG-mediated platelet activation, platelet microparticle generation, and altered procoagulant/anticoagulant balance in the pathogenesis of thrombosis and venous limb gangrene complicating heparin-induced thrombocytopenia. *Tranf. Med. Rev.* 1996; 10: 249–258.

34. Satta N., Toti F., Feugeas O. 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: 3245–3255.
35. Nieuwland R., Berckmans R.J., Mc Gregor S. i wsp. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930–935.
36. 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.
37. Zawilska K. *Plytkowe skazy krwotoczne*. W: Dmoszyńska A., Robak T. (red.). *Podstawy hematologii*. Wydawnictwo CZELEJ. Lublin 2003; 399–424.
38. Kelton J.G., Warkentin T.E., Hayward C.P., Murphy W.G., Moore J.C. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood* 1992; 80: 2246–2251.
39. Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M. i wsp. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura. Finding from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 81–90.
40. Galli M., Grassi A., Barbui T. Platelet derived microvesicles in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Thromb. Haemost.* 1996; 75: 427–431.
41. Jy W., Horstman L.L., Jimenez J.J., Ahn Y.S. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 2004; 2: 1850–1851.
42. Żupańska B., Konopka L., Robak T., Dwilewicz-Trojaczek J., Bogdanik I., Pyl H. Nocna napadowa hemoglobinuria — analiza 27 chorych. *Acta Hematol. Pol.* 2002; 33: 361–369.
43. Simak J., Rolada K., Risitano A.M. i wsp. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Brit. J. Haematol.* 2004; 125: 804–813.
44. Hugel B., Socie G., Vu T. i wsp. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 10: 3451–3456.
45. Sabatier F., Darmon P., Hugel B. i wsp. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840–2845.
46. Omoto S., Nomura S., Shouzu A. i wsp. Detection of monocyte-derived microparticles in patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45: 550–555.
47. Morel O., Hugel B., Jesel L. i wsp. Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus. *Thromb. Haemost.* 2004; 91: 345–353.
48. Lynch S.F., Lulam C. Plasma microparticles and vascular disorders. *Brit. J. Haematol.* 2007; 137: 36–48.
49. Simak J., Gelderman M.P., Yu H., Wright V., Bard A.E. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J. Tromb. Haemost.* 2006; 4: 1296–1302.
50. Bernal-Mizrachi L., Jy W., Jimenez J.J. i wsp. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J.* 2003; 145: 962–970.
51. 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 diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 112–116.
52. Tan K.T., Tayebjee M.H., Macfadyen R.J., Lip G.Y., Blann A.D. Elevated platelet microparticles in stable coronary artery disease are unrelated to disease severity or to indices of inflammation. *Platelets* 2005; 16: 368–371.
53. Lee Y.J., Jy W., Horstman L.L. i wsp. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multi-infarct dementias. *Thromb. Res.* 1993; 72: 295–304.
54. Touat Z., Olivier V., Dal J., Huisse M.H. i wsp. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am. J. Pathol.* 2006; 168: 1022–1030.
55. van der Zee P.M., Biro E., Ko Y., de Winter R.J. i wsp. P-selectin and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin. Chem.* 2006; 52: 657–664.
56. Tan K.T., Tayebjee M.H., Lynd C. i wsp. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers. *Ann. Med.* 2005; 37: 61–67.
57. Heresi G.A., Chirinos J.A., Velasquez H. i wsp. Elevated endothelial microparticles (EMP) and activation markers of platelet and leukocytes in venous thromboembolism (VTE). *Blood* 2003; 102: 804a.
58. Wakefield T.W., Henke P.K. The role of inflammation in early and late venous thrombosis: are there clinical implications? *Semin. Vasc. Surg.* 2005; 18: 118–129.
59. George J.N., Pickett E.B., Heinz R. Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate. *Blood* 1986; 68: 307–309.
60. Lawrie A.S., Harrison P., Cardigan R.A., Mackie I.J. The characterization and impact of microparticles on haemostasis within fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2008; 95: 197–204.
61. Solberg C., Osterud B., Little C. Platelet storage lesion: formation of platelet fragments with platelet factor 3 activity. *Thromb. Res.* 1987; 48: 559–565.
62. Divers S.G., Kannan K., Stewart R.M. i wsp. Quantitation of CD62, soluble CD62, and lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion* 1995; 35: 292–297.
63. Wang C., Mody M., Herst R. i wsp. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus. Sci.* 1999; 20: 129–139.
64. Devine D.V., Bradley A.J., Maurer E. i wsp. Effects of prestorage white cell reduction on platelet aggregate formation and the activation state of platelets and plasma enzyme systems. *Transfusion* 1999; 39: 724–734.
65. 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.
66. Gemmell C.H. Flow cytometry evaluation of material-induced platelet and complement activation. *J. Biomater. Sci. Polym.* 2000; 11: 1197–1210.
67. Bode A.P., Orton S.M., Frye M.J., Udis B.H. Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood* 1991; 77: 887–895.
68. Bode A.P., Knapp C.L. Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation. *Transfusion* 1994; 34: 609–696.
69. Gelderman M.P., Carter L.B., Simak J. High counts of potentially pathogenic cell membrane microparticles in apheresis platelets. *Blood* 2004; 104: 988a.
70. Blajchman M.A. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1: 1637–1641.
71. McCullough J., Vesole D.H., Benjamin R.J. i wsp. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004; 104: 1534–1541.

