

UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim



Mateusz Dziemiańczuk

**Wzrost uwalniania mikrocząstek u pacjentów
z wybranymi chorobami rozrostowymi krwi oraz
ich korelacja z markerami układu hemostazy.**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Piotr Marek Radziwon

Klinika Hematologii z Pododdziałem Chorób Naczyń

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok 2021

„Żeby napisać jedno własne zdanie, trzeba przeczytać tysiące cudzych”

Ryszard Kapuściński

Panu prof. dr hab. n. med. Piotrowi Markowi Radziwon, mojemu Promotorowi, dziękuję za inspiracje do prowadzenia badań naukowych oraz za pomoc i poświęcony czas podczas realizacji pracy doktorskiej.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	4
1. WSTĘP	6
1.1. Mikrocząstki	6
1.1.1. Mechanizm wytwarzania mikrocząstek	6
1.1.2. Mikrocząstki jako potencjalne przekaźniki informacji	7
1.1.3. Udział mikrocząstek w hemostazie	8
1.1.4. Właściwości mikrocząstek	9
1.1.5. Metody oznaczania mikrocząstek – problematyka	10
1.1.6. Potencjalne zastosowanie mikropęcherzyków	11
1.1.7. Mikrocząstki w stanach patologicznych	13
1.1.7.1. Mikrocząstki w schorzeniach układu krwiotwórczego	13
1.2. Choroby rozrostowe układu krwiotwórczego	15
1.2.1. Czerwieńca prawdziwa	15
1.2.2. Nadpłytkowość samoistna	17
1.2.3. Przewlekła białaczka limfocytowa	17
1.2.4. Ostre białaczki	17
1.2.5. Szpiczak mnogi	17
2. CEL PRACY	19
3. MATERIAŁ I METODY	20
3.1. Charakterystyka grup badanych	20
3.2. Materiał badany	22
3.3. Metody	22
3.3.1. Morfologia krwi obwodowej	22
3.3.2. Analiza parametrów układu hemostazy	22
3.3.3. Oznaczenie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonna	23
3.3.4. Analiza statystyczna	24
4. WYNIKI	25
5. DYSKUSJA	38
6. WNIOSKI	44
7. STRESZCZENIE	45
8. BIBLIOGRAFIA	49

WYKAZ SKRÓTÓW

- ALL – ostra białaczka limfoblastyczna-(ang. acute lymphoblastic leukemia).
- AML – ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia)
- APL – ostra białaczka promielocytowa (ang. acute promyelocytic leukemia)
- APTT – Czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. Activated Partial Thromboplastin Time)
- CLL – przewlekła białaczka limfocytowa (ang. chronic lymphocytic leukemia)
- EDTA – wersenian dwusodowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy
- ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- EndMP – mikrocząstki pochodzenia śródbłonkowego
- ErMP – mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego
- ET – nadpłytkowość samoistna (ang. essentielle thrombocythemia)
- EV – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles)
- F1+2 – fragmenty protrombiny 1+2
- GMP – mikrocząstki pochodzenia granulocytarnego
- HCT – hematokryt
- HGB – stężenie hemoglobiny
- HR – wysokie ryzyko (ang. high risk)
- ISS – międzynarodowy system stopniowania dla szpiczaka mnogiego (ang. International Staging System)
- LR – niskie ryzyko (ang. low risk)
- MCH – średnia masa hemoglobiny w krwince (ang. Mean Corpuscular Hemoglobin)
- MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwince (ang. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
- MCV – średnia objętość erytrocyta (ang. Mean Corpuscular volume)
- MM – szpiczak mnogi (ang. Multiple Myeloma)
- MMP – mikrocząstki pochodzenia monocytarnego
- MP – mikrocząstki (ang. microparticles)
- MPV – średnia objętość trombocyta (ang. Mean Platelet Volume)
- MV – mikropęcherzyki (ang. microvesicles)
- ncRNA – niekodujące RNA (ang. non-coding RNA)
- NK – limfocyty T-NK (ang. Natural Killers)
- NTA – analiza śledzenia nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis)

PAP – kompleksy plazmina-antyplazmina
PC – fosfatydylocholina (ang. phosphatidylcholine)
PCT – trombokryt (ang. Plateletcrit)
PDW – wskaźnik anizocytozy płytek krwi (ang. Platelet Distribution Width)
PE – fosfatydyloetanolamina (ang. phosphatidylethanolamine)
PLT – liczba krwinek płytkowych (ang. Platelets)
PMP – mikrocząstki pochodzenia płytkowego
PS – fosfatydyloseryna (ang. phosphatidylserine)
PT – czas protrombinowy (ang. Prothrombin Time)
PV – czerwienica prawdziwa (ang. polycythemia vera)
Rai – stadium zaawansowania klinicznego CLL wg Rai'a
RBC – liczba krwinek czerwonych (ang. Red Blood Cells)
RDW-CV – odchylenie w objętości krwinek czerwonych (ang. Red Blood Cell
Distribution Width)
SM – sfingomielina (ang. sphingomyelin)
SR – standardowe ryzyko (ang. standard risk)
TAT – kompleksy trombina-antytrombina
WBC – liczba krwinek białych (ang. White Blood Cells)

1. WSTĘP

1.1. Mikrocząstki.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (*ang.* extracellular vesicles – EV), nazywane inaczej egzosomy, ektosomy, mikropęcherzyki (*ang.* microvesicles – MV), mikrocząstki błon komórkowych (*ang.* microparticles – MP), to kuliste, małe struktury uwalniane z błon biologicznych wielu rodzajów komórek pod wpływem czynników fizjologicznych jak i patologicznych. Mikrocząstki mają wielkość ok. 0,1-1,0 μm i są zbudowane z fragmentów komórek macierzystych zawierających białka błonowe oraz część zawartości cytoplazmatycznej i jądrowej. Mikrocząstki nie mają jądra komórkowego, ale na swojej powierzchni posiadają antygeny charakterystyczne dla komórek, z których powstały [1-8]. W latach 60-tych ubiegłego wieku Wolf po raz pierwszy zidentyfikował pewne małe struktury powstające na skutek aktywacji płytek w krwioobiegu, które to wykazywały charakter prokoagulacyjny. Zaproponował tym samym określenie tych struktur jako pył płytkowy (*ang.* „platelet dust”) [9]. Kolejnym autorem, który starał się doprecyzować opisany uprzednio przez Wolfa proces, był Johnstone, który skupił się na pęcherzykach wydzielanych w trakcie dojrzewania owczych retikulocytów *in vitro* [10]. Powyższe publikacje rozpatrywane są obecnie jako przełomowe w kontekście dalszych prac badawczych podejmujących temat funkcji mikropęcherzyków błonowych zarówno w stanach fizjologicznych jak i podczas chorób. Od tamtej pory EV były wykrywane w płynach ustrojowych takich jak krew obwodowa, mocz, ślina, eksprymat, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, wydzielina z oskrzeli czy żółć.

1.1.1. Mechanizm wytwarzania mikrocząstek.

W warunkach fizjologicznych, fosfolipidy błony komórkowej rozmieszczone są asymetrycznie. Fosfatydylocholina (*ang.* phosphatidylcholine – PC) i sfingomielin (*ang.* sphingomyelin – SM) znajdują się na zewnętrznej części błony, podczas gdy fosfatydyloseryna (*ang.* phosphatidylserine – PS) i fosfatydyloetanolamina (*ang.* phosphatidylethanolamine – PE) zlokalizowane są głównie po wewnętrznej części błony. Takie rozmieszczenie w układzie asymetrycznym kontrolowane jest poprzez grupę enzymów – flipazę, flopazę i skramblazę [11-14]. Flipaza jest odpowiedzialna za przeniesienie PE i PS z zewnętrznej warstwy błony komórkowej do wewnątrz, podczas gdy flopaza ma działanie dokładnie odwrotne [15]. Wzrost stężenia

wewnątrzkomórkowego wapnia inaktywuje flipazę aktywując w tym samym czasie flopazę i skramblazę prowadząc do reorganizacji fosfolipidów błony komórkowej [16-20]. Osłabienie włókien białkowych cytoszkieletu może inicjować wydzielanie mikropęcherzyków z błon komórkowych. Wykazano, że reorganizacja i wszelkie zmiany w budowie cytoszkieletu odgrywają ważną rolę w uwalnianiu mikrocząstek [21-23]. Mechanizm wydzielania oraz budowa biochemiczna EV zależy od takich czynników jak rodzaj i funkcje komórki, z której mikropęcherzyki pochodzą. Egzosomy i mikropęcherzyki posiadają niesamowicie szeroki i niejednorodny zakres transportowanych molekuł. Mimo, iż dotychczas zgromadzone dane są niezwykle cenne, wciąż niezbędne są dodatkowe badania i dowody aby wyjaśnić bardzo skomplikowane procesy biogenezy i umieszczania transportowanego „ładunku” w mikropęcherzykach. [24-29]. W ostatnich latach dokonano klasyfikacji EV, biorąc pod uwagę ich rozmiar i genezę, na egzosomy, mikropęcherzyki błonowe i ciała apoptotyczne. Egzosomy znajdują się w grupie pęcherzyków o średnicy 40-100 nm, z kolei mikropęcherzyki błonowe są większe i rozmiarami powinny oscylować w granicach 50-1000 nm średnicy. Biogeneza mikropęcherzyków następuje podczas pączkowania i rozszczepiania błony plazmatycznej na skutek różnego rodzaju aktywacji komórek lub podczas wczesnych etapów apoptozy [24, 30, 31]. W odróżnieniu od egzosomów i mikropęcherzyków, ciała apoptotyczne są od nich większe, a ich średnica to około 1-5 μm . Powstają one poprzez odrywanie pęcherzyków z błony komórkowej podczas procesu apoptozy [1, 15, 16, 24, 32]. Ze względu na wiele biofizycznych podobieństw pomiędzy tymi poszczególnymi rodzajami pęcherzyków, rozgraniczenie ich na poszczególne podgrupy stanowi pewną trudność. Bardzo pomocne w tym procesie są charakterystyczne markery różnicujące [17].

1.1.2. Mikrocząstki jako potencjalne przekaźniki informacji.

W wyniku stymulacji różnymi czynnikami, komórki krwi są zdolne do wydzielania mikropęcherzyków z błon komórkowych. Mikropęcherzyki błonowe, uwalniane z komórek jądrzastych, ze względu na ich zdolność do przenoszenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych (mikroRNA oraz DNA, które nie będzie obecne w mikropęcherzykach pochodzenia erytrocytarnego ze względu na brak jądra komórkowego), postrzegane są jako potencjalne przenośniki informacji w komunikacji międzykomórkowej zarówno między sąsiednimi komórkami jak i odległymi tkankami

[24]. Te właściwości sugerują, że MV mogą odgrywać ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej zarówno w stanach fizjologicznych jak i podczas choroby. Mogą również wpływać na rozwój fizjologicznych i patologicznych stanów w obrębie komórek krwi [33]. Jedno z przełomowych doniesień dotyczących pęcherzyków błonowych donosi, że kompleksy związane z pęcherzykami mogą brać udział w procesie rozprzestrzeniania antygenów, co prowadzi do ograniczenia odpowiedzi limfocytów T [34]. Niedobór wiedzy o molekularnych mechanizmach tworzenia mikropęcherzyków oraz, póki co, brak metod pozwalających na ingerowanie w transportowaną przez nie zawartość czy też zwiększenie wydzielania poszczególnych mikrocząstek, sprawia, że faktyczna ocena znaczenia mikropęcherzyków *in vivo* jest bardzo utrudniona [5].

Udowodniono, że mikropęcherzyki błonowe uwalniane są przez komórki takie jak krwinki płytkowe, monocyty, komórki śródbłonna, erytrocyty i granulocyty. W doniesieniach dotyczących wymiarów MV, obserwujemy ich różne średnie wartości średnicy [15, 35-37]. Dane spośród wielu badań wskazują na fakt, iż wielkość mikrocząstek błon komórkowych zależy od typu komórki, z której się wywodzą [35]. Zdecydowanie najmniejsze są mikrocząstki pochodzenia płytkowego (PMP), nieco większe są monocytarne (MMP), a zdecydowanie największymi są mikropęcherzyki pochodzenia granulocytarnego (GMP), i erytrocytarnego (ErMP). Mimo toczących się od lat badań próbujących wyjaśnić naturę powstawania mikrocząstek, temat ten wciąż pozostaje nie do końca rozwiązany. Istnieją doniesienia zdecydowanie pogłębiające zrozumienie mechanizmu wydzielania MP w wielu jednostkach chorobowych takich jak choroby naczyń, nowotwory, choroby zakaźne czy cukrzyca typu I jak i II [36].

1.1.3. Udział mikrocząstek w hemostazie.

O aktywności prokoagulacyjnej mikrocząstek świadczą między innymi badania, w których po stymulacji lipopolisacharydem wykazano zdolność monocytów do wydzielania mikrocząstek z powierzchniową ekspresją czynnika tkankowego [88]. W przypadku trombocytopenii indukowanej heparyną dochodzi do aktywacji krwinek płytkowych związanej z powstawaniem kompleksów immunologicznych, co skutkuje wydzielaniem mikrocząstek pochodzenia płytkowego. W przebiegu choroby, kompleksy immunologiczne mogą aktywować płytki krwi, komórki śródbłonna a także wydzielone mikrocząstki, które posiadają zwiększony potencjał prozakrzepowy.

W związku z tym u chorych na trombocytopenię indukowaną heparyną mogą występować groźne powikłania zakrzepowe [77]. U pacjentów z ostrą białaczką promielocytową (APL) wykazano nadmierną ilość mikrocząstek pochodzenia promielocytowego z ekspresją powierzchniową czynnika tkankowego. Spowodowało to zwiększenie wytwarzania trombiny oraz skrócenie czasu krzepnięcia. Uzyskane dane sugerują, że zbyt wysoka liczba mikrocząstek wykazujących działanie prozakrzepowe u pacjentów z APL może być ważnym ogniwem w patogenezie powikłań zakrzepowych oraz krwotocznych [95, 96]

1.1.4. Właściwości mikrocząstek.

Możliwość zahamowania wytwarzania mikropęcherzyków błonowych znajduje zastosowanie w procesie terapeutycznym w przebiegu wielu chorób, m.in. w leczeniu nowotworów [24, 35, 38, 39]. Komórki nowotworowe mają zdolność wydzielania zarówno mikropęcherzyków błonowych jak i egzosomów w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Pęcherzyki te mają na swojej powierzchni różne struktury antygenowe, postrzegane jako biomarkery [36]. Mając na uwadze powyższe, mikrocząstki mogą być stosowane w diagnostyce nowotworów. Jednym z przykładów mogą być pacjenci z rakiem żołądka, u których zaobserwowano wzrost wydzielanych mikrocząstek z krwinek płytkowych z obecnym antygenem CD41-a. Znaczący wzrost odnotowano w IV stadium raka żołądka w porównaniu ze stadium I czy II/III [40]. Mikrocząstki wydzielane z błon komórkowych mogą być istotnymi przekaźnikami w komunikacji międzykomórkowej ale także stanowić integralną część środowiska wewnątrzkomórkowego, co z kolei pokazuje szerszy horyzont i być może pozwoli zrozumieć przekaźnictwo sygnałów i molekuł między komórkami znacznie od siebie oddalonymi [8, 23]. W przypadku ludzkich erytrocytów uwolnione MV zarówno w stanie spoczynku (przechowywanie w 4 ° C), jak i poddane czynnikowi stymulującemu wykazały zdolność do przylegania do siebie, co może sugerować, że MV biorą udział w tworzeniu skrzepu, a także prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w agregacji stymulowanych erytrocytów. Udowodniono, że posiadające ujemny ładunek mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego wykazują aktywność prokoagulacyjną [41, 42]. Stosunkowo mało wiadomo natomiast na temat możliwej aktywności fibrynolitycznej ErMP. Problem ten wydaje się być szczególnie istotny, zwłaszcza mając na uwadze proces przechowywania koncentratów krwinek czerwonych, co zdecydowanie zwiększa ilość uwalnianych mikrocząstek [43]. Ze

względu na naturalne zdolności do transportowania i rozsiewania nieprawidłowych białek, lipidów, zmutowanych genów i zmienionych kwasów nukleinowych, mikropęcherzyki są zaangażowane w wiele chorób takich jak choroby neurodegeneracyjne [57, 58], choroby układu krążenia [59, 60] oraz w rozwoju nowotworów [61-63]. Wydzielanie i transport mikropęcherzyków z biologicznie aktywnych komórek wydaje się być zależny od kontekstu, więc sygnały otrzymywane przez daną komórkę mogą wywoływać przebudowę i regenerację tkanek w odpowiedzi na toczący się proces chorobowy [64]. Niektóre mikropęcherzyki wydzielane z komórek mikroorganizmów mogą pośredniczyć w interakcjach gospodarz-pasożyt i mieć wpływ na progresję choroby poprzez rozsiewanie czynników wirulencji [65]. Mikropęcherzyki pochodzące z komórek prezentujących antygen bądź komórek nowotworowych mogą wywierać znaczący wpływ w zakresie immunomodulacji, zarówno wprowadzając stan supresji jak i aktywując układ immunologiczny [64, 66, 67]. Istnieje również związek mikropęcherzyków z różnicowaniem komórek, podtrzymywaniem komórek macierzystych i określaniem losów komórek poprzez ułatwianie przekazywania informacji biologicznej z komórek dawcy do komórek biorców [68]. Ta rozwijająca się rola mikropęcherzyków częściowo może wynikać z ich zdolności do naśladowania właściwości komórek macierzystych w promowaniu wewnętrznych programów regeneracyjnych tkanek i procesów naprawczych w komórkach biorców w mechanizmie parakrynnym [68]. Interesującym jest fakt, że ładunek mikropęcherzyków jest charakterystyczny dla komórek z których pochodzą i prawdopodobnie reprezentuje specyficzne molekuly związane z daną jednostką chorobową. Badanie wnętrza mikropęcherzyków i transportowanych przez nie ładunków w przebiegu chorób może być bogatym źródłem informacji do przyszłych badań nad biomarkerami.

1.1.5. Metody oznaczania mikrocząstek - problematyka.

Warto również w tym miejscu wspomnieć, że ze względu na niewielkie rozmiary pęcherzyków i łatwość interferencji z innymi czynnikami, na interpretację uzyskanych wyników zawartości mikrocząstek może wpływać obecność artefaktów, etap przygotowania próbki, procedura izolacji materiału oraz metody analizy [44]. Ze względu na zmianę składu błony komórkowej, mikrocząstki pochodzące z tej samej komórki mogą zawierać różne białka lub składniki lipidowe. Prowadzone analizy proteomiczne ujawniły, że na spektrum białek znajdujących się w mikropęcherzykach

częściowo wpływają czynniki stymulujące, pod wpływem których doszło do wydzielania tych konkretnych mikrocząstek [23].

Istnieje wiele doniesień dotyczących stabilności mikropęcherzyków w materiale pobranym do analizy. W jednym z badań, wyizolowane mikropęcherzyki zarówno z osocza ubogopłytkowego jak i pozbawionego krwinek płytkowych przechowywano w temperaturze -40°C oraz -80°C przez ponad rok. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic nawet po 3 cyklach mrożenie-rozmrażanie [45]. W innych badaniach dotyczących stabilności nie zauważono różnic w ilości oraz rozmiarze wydzielanych mikrocząstek w materiale przechowywanym w temperaturze 4°C przez maksymalnie tydzień oraz w temperaturze -80°C przez okres 1-4 tygodni [46]. Przeprowadzono również badania porównując zastosowane antykoagulanty podczas pobierania materiału. Próbkę przechowywane były w temperaturze 4°C oraz w temperaturze pokojowej i poddane zostały analizie śledzenia nanocząstek (ang. NTA – nanoparticle tracking analysis). Całkowita ilość mikropęcherzyków wzrosła po 24h w próbkach z cytrynianem sodu i heparyną, podczas gdy materiał w próbkach z EDTA prezentował stabilną ilość mikrocząstek pochodzenia płytkowego i erytrocytarnego w temperaturze pokojowej przez 48h. Jak dotąd próbki z cytrynianem sodu są zalecane do zliczania MV i ich analizy funkcjonalnej. Probówki z EDTA mogą być rozwiązaniem dla rutynowych badań u pacjentów ze względu na utrzymywanie stabilnej liczby PMP i ErMP [47].

1.1.6. Potencjalne zastosowania mikropęcherzyków.

Element budowy, który sprawia, że mikropęcherzyki mogą być rozpatrywane w kontekście dostarczania leków to ich podobieństwo do liposomów. Oznacza to, że mikropęcherzyki pochodzące z danego organizmu mogą być stosowane jako konwencjonalne liposomy z korzyścią, gdy są podawane do tego samego organizmu *in vivo*. Mikropęcherzyki mogą transportować molekuly przez trudne do przejścia bariery, takie jak m.in. bariera krew-mózg. Z tego względu mikropęcherzyki mogą być użyte jako transportery leków bądź cząsteczek bioaktywnych i tworzyć wydajne systemy dostarczania [48-50]. Opisane zostały dwie strategie dotyczące ładowania małych cząsteczek i leków do mikropęcherzyków. Jedna z nich mówi o umiejscawianiu molekuł wewnątrz mikropęcherzyków po ich izolacji, a druga natomiast to propozycja ładowania mikropęcherzyków w trakcie ich genezy. Wymagane jest również znakowanie mikropęcherzyków w celu wykrycia lub zbadania wydajności dostarczania

ładunków oraz ekspresji białek w komórkach docelowych biorcy. Najczęstsze metody znakowania mikropęcherzyków to inkubacja z fluorescencyjnym barwnikiem lipofilowym, biotynylowanym radioizotopem, substratem lucyferazy, barwnikami fluorescencyjnymi skoniugowanymi ze streptawidyną lub innymi zmodyfikowanymi białkami [51].

Kiedy kwasy nukleinowe dostają się bezpośrednio do naszego organizmu, zostają usunięte z krążenia za pośrednictwem degradujących nukleaz lub poprzez nerki zanim dotrą do komórek docelowych. Istnieją doniesienia mówiące o tym, że różne rodzaje RNA mogą być transportowane wewnątrz mikropęcherzyków w komunikacji międzykomórkowej. To pozwala spojrzeć na mikropęcherzyki jako nowe, atrakcyjne i alternatywne rozwiązanie w kwestii terapeutycznego dostarczania miRNA do komórek docelowych [27]. W jednym z doniesień możemy znaleźć informację, że mikropęcherzyki wydzielane z embrionalnych komórek macierzystych, prawdopodobnie są użytecznymi narzędziami terapeutycznymi, które mogą być wykorzystane do przenoszenia mRNA, miRNA, białek i siRNA do komórek oraz mogą być istotnymi mediatorami sygnałowymi [52]. Wiadomo, że lipidy, białka, mRNA i miRNA dostarczane przez mikropęcherzyki zmieniają fenotyp komórek do których są dostarczane [24, 53]. Typowym przykładem zastosowania EV jako nośnika leku jest transport kurkuminy, związków chemioterapeutycznych paklitakselu i doksorubicyny do EV za pomocą elektroporacji. Po przeniesieniu EV do tkanek raka piersi wyniki wykazały, że EV hamują wzrost nowotworów bez powodowania żadnej toksyczności [54]. Mikropęcherzyki z kurkumina znajdują zastosowanie terapeutyczne w próbach klinicznych, stosowane jako inhibitory komórek szpikowych [55, 56].

Wzrasta zainteresowanie mechanizmem, jakim mikropęcherzyki mogą ułatwiać progresję nowotworu. Mikropęcherzyki wydzielane z komórek nowotworowych mogą przenosić onkogenne niekodujące RNA (eng. ncRNA – non-coding RNA) lub zmutowane geny, które mogą indukować nieprawidłową regulację genów w komórkach biorców, co może być związane z inicjacją procesu nowotworzenia [38, 69]. Podejrzewa się, że mikropęcherzyki mogą edukować niektóre komórki biorcy do przyjmowania fenotypu inicjującego nowotwór. Następnie takie komórki, mogą migrować do anatomicznie odrębnych miejsc, prowadząc do kolonizacji przedprzerzutowej [70]. Potencjał przerzutowy mikropęcherzyków jest w dużej mierze związany z ich zdolnością do przekazywania bioaktywnych molekuł o nieprawidłowej ekspresji, takich jak onkoproteiny, genomowy i mitochondrialny DNA nowotworu czy

zmutowane geny do odpowiednich komórek biorców [38, 61, 62, 71, 72]. Uważa się, że białka i kwasy nukleinowe zamknięte w krążących mikropęcherzykach są bardziej stabilne i odporne na działanie proteaz i nukleaz, naturalnie znajdujących się w płynach ustrojowych. Ochrona kwasów nukleinowych w mikropęcherzykach jest dużą zaletą w kwestii warunków przechowywania jak również wpływu niekorzystnych warunków fizycznych, takich jak zmiany temperatury i pH czy wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie próbki, dzięki czemu może być atrakcyjnym źródłem do rozwoju biomarkerów [73]. Stwierdzono, że krążące mikropęcherzyki u pacjentów z nowotworem mają inny profil antygenowy i znacznie różnią się od mikrocząstek u pacjentów z łagodnym stadium choroby lub zdrowych osób z grupy kontrolnej [74, 75].

1.1.7. Mikrocząstki w stanach patologicznych.

Opisywany jest związek mikrocząstek z wrodzonymi zaburzeniami czynności płytek krwi [76], hemoglobinopatią S, małopłytkowością indukowaną heparyną [77], posocznicą [78], zakrzepową plamicą małopłytkową, cukrzycą [79], zakrzepicą żył głębokich, zatorami pęcherzyków płucnych, miażdżycą oraz reumatoidalnym zapaleniem stawów. Mikrocząstki są też czynnikiem prognostycznym przetoczeń u chorych poddanych operacji wszczepienia pomostów sercowo-naczyniowych. Niskie stężenie mikrocząstek pochodzących z płytek krwi koreluje z wyższym ryzykiem krwotoku u chorych po urazach. Niezdolność płytek krwi do tworzenia mikrocząstek prowadzi do ciężkich krwawień u chorych z zespołem Scotta [76]. Obecność mikrocząstek w krążeniu może z kolei zwiększać ryzyko wystąpienia zakrzepicy u chorych na choroby krwi i choroby układu sercowo-naczyniowego. Sugeruje się, że usuwanie mikrocząstek przez nanofiltrację osocza do transfuzji może pomóc normalizować hemostatyczną aktywność osocza, unikając tym samym niepożądanych i niekontrolowanych skutków zakrzepowych [80].

1.1.7.1. Mikrocząstki w schorzeniach układu krwiotwórczego.

Poziom mikrocząstek we krwi był badany u pacjentów z zakrzepową plamicą małopłytkową. W badanym osoczu zaobserwowano podwyższone stężenie mikrocząstek związane z aktywnością kalpajny. Uszkodzenie śródbłonna uważa się za kluczowy element w patogenezie zakrzepowej plamicy małopłytkowej co prowadzi do aktywacji krwinek płytkowych i tworzenia bogatych w płytki zakrzepów w układzie drobnych naczyń krwionośnych. Rzeczywiście poziom

mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego (CD31+ CD42- oraz CD51+) był podwyższony u osób z ostrym stanem zakrzepowej plamicy małopłytkowej w porównaniu z grupą osób zdrowych, ale wartości wracały do normy w trakcie remisji [81].

Zaobserwowano również podwyższoną liczbę mikrocząstek o właściwościach prozakrzepowych, głównie wydzielanych z krwinek płytkowych (CD42+), u chorych na nocną napadową hemoglobinurię, bez względu na współistniejącą niedokrwistość aplastyczną, natomiast liczba mikrocząstek nie była podwyższona u chorych z samą niedokrwistością aplastyczną [82]. Co interesujące, mikrocząstki wydzielane z krwinek czerwonych (CD235a+) były wykrywane u tych pacjentów bardzo rzadko. Wykazano, że krwinki czerwone chorych na nocną napadową hemoglobinurię wydzielają znacznie mniej mikrocząstek w porównaniu do osób zdrowych. To sugeruje, że niektóre z białek związanych z glikofosfatydyloinozytolem, które nie występują u chorych na nocną napadową hemoglobinurię, odgrywają prawdopodobnie istotną rolę w wytwarzaniu mikrocząstek [83]. Inne badania wykazały podwyższone stężenie mikrocząstek u chorych na anemię sierpowatokrwinkową zarówno w stanie ostrym jak i stabilnym w porównaniu do osób zdrowych [84]. W przypadku hemoglobinopatii zaburzona jest równowaga jonowa erytrocytów; zawierają one zbyt mało jonów potasu a zdecydowanie więcej jonów wapniowych, które jak wiadomo stymulują wydzielanie mikrocząstek.

Wiadomym jest, że postępowanie przygotowujące do przeszczepu komórek krwiotwórczych powoduje gwałtowny spadek liczby krwinek płytkowych i znaki rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Spośród wszystkich faz postępowania przygotowawczego to chemioterapia powoduje silną i nieodwracalną aktywację krwinek płytkowych a także wydzielanie mikrocząstek płytkowych CD41+ [85]. U pacjentów z chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi zanotowano po przeszczepie znaczący wzrost wydzielania mikrocząstek pochodzenia płytkowego CD41+ [86]. Podwyższone stężenie mikrocząstek pochodzenia płytkowego zauważono również w trombocytopenii idiopatycznej [87].

W przypadku posocznicy zauważalny jest wzrost poziomu krążących mikrocząstek pochodzących z komórek śródbłonka, krwinek płytkowych oraz monocytów. Ich udział nie jest jednak do końca wyjaśniony [88]. Inne badania wykazały natomiast,

że mikrocząstki pochodzenia płytkowego pochodzące od chorych z ciężkimi infekcjami, ułatwiają chemotaksję monocytów oraz wzmagają ich adhezję do śródbłonna [89].

Badania Szczepański i wsp. wykazały po raz pierwszy, że mikropęcherzyki obecne w surowicach pacjentów z nowo zdiagnozowaną ostrą białaczką szpikową (AML) odgrywają rolę w regulacji aktywności komórek NK (ang. Natural Killers). Komórki blastyczne u nowo zdiagnozowanych pacjentów z AML mogą być źródłem mikropęcherzyków odpowiedzialnych za zahamowanie aktywności komórek NK [90]. Badanie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek blastycznych u chorych na AML wydaje się interesującym narzędziem diagnostycznym i prognostycznym, ze względu na dynamiczne i znaczące zmiany ilości krążących mikrocząstek w zależności od stadium choroby. Podwyższone stężenie mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego może wskazywać na uszkodzenia naczyniowe związane z nadkrzepliwością w trakcie AML. Natomiast u osób w remisji choroby zauważono znacząco niższy poziom krążących mikrocząstek [91].

U chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową (CLL) stwierdzono kilkakrotnie wyższą liczbę mikrocząstek pochodzących z limfocytów B (CD19) w porównaniu do osób zdrowych. W związku z tym wykazano, że komórki nowotworowe mogą powodować zwiększenie liczby krążących mikrocząstek [92]. Badanie Tsai i wsp. wykazały, że mikrocząstki pochodzące z komórek apoptotycznych są zaangażowane w proces chemotaksji makrofagów na skutek sygnałów wysyłanych przez komórki apoptotyczne [93]. Badania mikrocząstek w szpiczaku mnogim wykazały, że w porównaniu do osób zdrowych, liczba krążących mikrocząstek u chorych na szpiczaka jest zdecydowanie wyższa [94]. U pacjentów z ostrą białaczką promielocytową (APL) wykazano zwiększenie wytwarzania trombiny oraz skrócenie czasu krzepnięcia zależne od liczby MP z obecnym czynnikiem tkankowym na ich powierzchni [95, 96]. W związku z różną aktywnością mikrocząstek błon komórkowych i ich podwyższonym stężeniem w przebiegu wielu chorób, wydaje się, że mikrocząstki mogą mieć istotny potencjał diagnostyczny, jak również badanie ich liczby może być wykorzystywane w celu monitorowania stanu pacjenta.

1.2. Choroby rozrostowe układu krwiotwórczego.

Zaburzenia mieloproliferacyjne to grupa nowotworów krwi, w których szpik kostny wytwarza zbyt wiele nieprawidłowych krwinek czerwonych, białych krwinek lub płytek krwi, które gromadzą się we krwi. Rodzaj zaburzenia mieloproliferacyjnego zależy od tego, czy powstaje zbyt dużo czerwonych krwinek, białych krwinek lub płytek krwi. Czasami organizm wytwarza zbyt wiele więcej niż jednego rodzaju krwinek, ale zwykle jeden rodzaj krwinek jest dotknięty bardziej niż inne. Poniżej znajdują się skondensowane opisy jednostek chorobowych, które brane były pod uwagę w niniejszej dysertacji.

1.2.1. Czerwienica prawdziwa (PV) to choroba szpiku kostnego, która prowadzi do nieprawidłowego wzrostu liczby czerwonych krwinek. Liczba białych krwinek i płytek krwi może być również wyższa niż normalnie. PV to rzadkie zaburzenie, które występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet. Zwykle nie występuje u osób poniżej 40 roku życia. Problem jest często związany z defektem genu zwanym JAK2V617F. Przyczyna tego defektu genowego jest nieznana. Wada tego genu nie jest chorobą dziedziczną. W przebiegu PV zbyt wiele czerwonych krwinek w organizmie sprawia, że pacjent ma bardzo gęstą krew, która nie może normalnie przepływać przez małe naczynia krwionośne, co prowadzi do takich objawów, jak: kłopoty z oddychaniem w pozycji leżącej, niebieskawa skóra, zawroty głowy, pełne uczucie w lewym górnym brzuchu (z powodu powiększonej śledziony), swędzenie, szczególnie po ciepłej kąpieli, objawy zakrzepów krwi w żyłach w pobliżu powierzchni skóry (zapalenie żył) czy dzwonięcie w uszach (szum w uszach).

1.2.2. Nadpłytkowość samoistna (ET) wynika z nadprodukcji płytek krwi, które w przebiegu choroby nie funkcjonują prawidłowo, co sprawia, że częstymi problemami są skrzepy krwi i krwawienia. Nieleczona ET pogarsza się z czasem. Wiele osób z ET ma mutację genu (JAK2, CALR lub MPL). ET występuje najczęściej u osób w średnim wieku. Można go również zauważyć u młodszych ludzi, zwłaszcza kobiet poniżej 40 roku życia. Objawy nadpłytkowości oraz problemów zakrzepowych mogą obejmować dowolne z poniższych: ból głowy (najczęściej), mrowienie, chłód lub zasinienie dłoni i stóp, zawroty głowy lub oszołomienie, problemy ze wzrokiem, mini-udary (przemijające ataki niedokrwienne) lub udar.

- 1.2.3.** Przewlekła białaczka limfocytowa (CLL) jest najczęstszą białaczką u dorosłych. Często występuje w wieku średnim lub później i rzadko występuje u dzieci. Jest to rodzaj raka, który zaczyna się w komórkach, które stają się określonymi białymi krwinkami (zwanymi limfocytami) w szpiku kostnym. Ten proces nowotworowy zaczyna się w szpiku kostnym, ale następnie nieprawidłowe komórki trafiają bezpośrednio do krwi obwodowej. W CLL komórki białaczkowe często rozwijają się powoli. Wiele osób nie ma żadnych objawów przez co najmniej kilka lat. Z biegiem czasu komórki rosną i rozprzestrzeniają się na inne części ciała, w tym węzły chłonne, wątrobę i śledzionę.
- 1.2.4.** Ostra białaczka jest chorobą rozrostową układu krwiotwórczego. Formy ostrej białaczki obejmują ostrą białaczkę szpikową (AML) i ostrą białaczkę limfoblastyczną (ALL). Ostra białaczka limfoblastyczna częściej występuje u dzieci a szpikowa u dorosłych. Niektóre typowe objawy obejmują: powiększenie wątroby lub śledziony, łatwe powstawanie siniaków, krwawienie z dziąseł, ból kości lub stawów, gorączkę i dreszcze, częste infekcje, krwawienia z nosa, bledność skóry, duszność, ogólne osłabienie, nocne poty i obrzęk węzłów chłonnych. Diagnozę ostrej białaczki przeprowadza się na podstawie badania krwi i szpiku kostnego. Osoby, które wcześniej przeszły chemioterapię lub były narażone na promieniowanie bądź mają pewne zaburzenia genetyczne lub bliskich członków rodziny z ostrą białaczką mają większe ryzyko zachorowania na ten nowotwór.
- 1.2.5.** Szpiczak mnogi to nowotwór, który tworzy się z białych krwinek zwanych komórkami plazmatycznymi. Zdrowe komórki plazmatyczne pomagają zwalczać infekcje, wytwarzając przeciwciała rozpoznające i atakujące patogeny. W szpiczaku mnogim rakowe komórki plazmatyczne gromadzą się w szpiku kostnym i wypierają zdrowe komórki krwi. Zamiast produkować pomocne przeciwciała, komórki rakowe wytwarzają nieprawidłowe białka. Oznaki i objawy szpiczaka mnogiego mogą być różne i we wczesnym okresie choroby mogą nie występować. Objawy mogą obejmować: ból kości, szczególnie kręgosłupa lub klatki piersiowej, nudności, zaparcie, utrata apetytu, częste infekcje, utrata masy ciała, słabość lub drętwienie nóg oraz nadmierne pragnienie. Szpiczak mnogi prawie zawsze zaczyna się jako względnie łagodny stan zwany gammadatią monoklonalną o nieokreślonym znaczeniu (MGUS). MGUS, podobnie jak szpiczak mnogi, charakteryzuje się obecnością we krwi

białek M - wytwarzanych przez nieprawidłowe komórki plazmatyczne. Jednak w MGUS poziomy białek M są niższe i nie dochodzi do uszkodzenia organizmu. Czynniki, które mogą zwiększać ryzyko wystąpienia szpiczaka mnogiego, obejmują: postępujący wiek, większość osób jest diagnozowana w wieku około 60 lat. Płeć męska. Mężczyźni są bardziej narażeni na rozwój choroby niż kobiety. Czarna rasa. Osoby rasy czarnej są bardziej narażone na rozwój szpiczaka mnogiego niż ludzie innych ras. Historia rodzinna szpiczaka mnogiego. Jeśli brat, siostra lub rodzic ma szpiczaka mnogiego, istnieje zwiększone ryzyko zachorowania. Osobista historia gammapatii monoklonalnej o nieokreślonym znaczeniu (MGUS). Szpiczak mnogi prawie zawsze zaczyna się jako MGUS, więc posiadanie tego stanu zwiększa ryzyko.

Biorąc pod uwagę aktualne dane dostępne w piśmiennictwie, nie są znane czynniki warunkujące wzrost uwalniania MP z komórek krwi i śródbłonna w chorobach rozrostowych krwi. Otwarta pozostaje również kwestia ich wpływu na ryzyko zakrzepowo-zatorowe u tych chorych.

2. CEL PRACY

Określenie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonna oraz ich korelacji z wybranymi markerami układu hemostazy u pacjentów z wybranymi chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego przed rozpoczęciem leczenia.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Charakterystyka grup badanych

Zgodnie z założeniami projektu, wyodrębnionych zostało 5 grup badanych. Byli to pacjenci Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, u których rozpoznano chorobę rozrostową układu krwiotwórczego, przed wdrożeniem odpowiedniego leczenia. Pięćdziesięciu sześciu (56) pacjentów podzielono zgodnie z rozpoznaniem choroby (Tabela 1):

- Pacjenci z czerwienicą prawdziwą (n=12, M=5, K=7, mediana wieku: 61, zakres wieku 30-84), rozpoznanie choroby oparte na badaniach cytogenetycznych; mutacja genu JAK2 stwierdzona w 8/12 przypadków (67%),
- Pacjenci z nadpłytkowością samoistną (n=10, M=5, K=5, mediana wieku: 62, zakres wieku 42-85), rozpoznanie choroby oparte na badaniach cytogenetycznych, mutacja genu JAK2 stwierdzona w 10/10 przypadków (100%)
- Pacjenci z przewlekłą białaczką limfocytową (n=17, M=13, K=4, mediana wieku: 67, zakres wieku 59-79), rozpoznanie choroby oparte na badaniach cytometrycznych
- Pacjenci z ostrą białaczką mieloblastyczną (n=11, M=7, K=4, mediana wieku: 61, zakres wieku 18-70), rozpoznanie choroby oparte na badaniach mielogramu oraz badaniach cytometrycznych
- Pacjenci ze szpiczakiem mnogim (n=6, M=2, K=4, mediana wieku: 65, zakres wieku 59-80), rozpoznanie choroby oparte na badaniach mielogramu oraz trepanobiopsji

Tabela 1. Porównanie grup badanych pod kątem demografii, wyników morfologii, kryteriów rozpoznania i stopnia zaawansowania jednostki chorobowej.

Zmienne	Czerwieńca prawdziwa (12)	Nadpłytkowość samoistna (10)	Szpiczak mnogi (6)	Ostra białaczka mieloblastyczna (11)	Przewlekła białaczka limfocytowa (17)
Wiek (lata), mediana (min-max)	61 (30 - 84)	62 (42 - 85)	65 (59 - 80)	61 (18 - 70)	67 (59 - 79)
Kobiety (%)	58	50	67	36	23,5
RBC (10 ⁶ /ul) mediana (min-max)	6,84 (4,97 - 8,07)	5 (3,79 - 5,97)	3,61 (2, 54 - 6,99)	2,9 (0,73 - 3,52)	4,1 (2,2 - 5,07)
Hb (g/dl) mediana (min-max)	19 (15,5 - 21,2)	15,2 (9,1 - 17,3)	11,35 (7,6 - 16,8)	9,1 (2,1 - 11)	11,85 (6 - 15,5)
Hct (%) mediana (min-max)	57,30 (45,6 - 66)	45,25 (31,4 - 51,9)	33,45 (23,2 - 55,6)	27,3 (6,3 - 32,3)	38,3 (23 - 45,3)
WBC (10 ³ /ul) mediana (min-max)	8,84 (5,12 - 21,97)	8,1 (6,05 - 16,34)	5,89 (3,71 - 7,8)	14,3 (2,8 - 343,99)	57 (13,27 - 274,74)
PLT (10 ³ /ul) mediana (min-max)	383 (159 - 1169)	830,5 (433 - 1125)	228 (189 - 302)	70 (13 - 137)	135 (60 - 347)
podstawa rozpoznania:	cytogenetyka	cytogenetyka	-	-	-
JAK2	8/12 (67%)	10/10 (100%)	-	-	-
mielogram	-	-	tak	tak	-
trepanobiopsja	-	-	tak	-	-
cytometria	-	-	-	tak	tak
stopień zaawansowania	HR - 7	HR - 7	ISS1 - 2	HR - 5	Rai1 - 6
			ISS2 - 2		Rai2 - 4
	SR - 5	LR - 3	ISS3 - 2	SR - 6	Rai3 - 4
					Rai4 - 3

Legenda	
HR	High risk - wysokie ryzyko
SR	Standard risk - standardowe ryzyko
LR	Low risk - niskie ryzyko
ISS	International Staging System - Międzynarodowy System Stopniowania dla Szpiczaka mnogiego
Rai	Stadium zaawansowania klinicznego CLL wg Rai'a (0-4)

3.2. Materiał badany

Materiałem do badań była krew żylna pobrana na antykoagulant EDTA oraz cytrynian sodu, w dniu przyjęcia pacjentów do Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Morfologia krwi obwodowej, analiza parametrów układu hemostazy (PT, APTT, stężenie fibrynogenu oraz D-dimerów) oraz oznaczenie mikrocząstek zostało wykonane w świeżych próbkach krwi pacjentów (maksymalnie do 1 godziny od pobrania materiału). Pozostałe próbki, pobrane na cytrynian sodu, wirowano przez 15 minut przy 3000 obrotów/min (1469g) w celu uzyskania osocza, które następnie rozdzielano do kilku probówek typu eppendorf i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz (oznaczenie stężeń kompleksów TAT, PAP i F1+2). Grupę kontrolną stanowił materiał pobrany od zdrowych ochotników/dawców krwi (n=7, M=6, K=1, mediana wieku: 33, zakres wieku 23-51), który został przebadany w taki sam sposób jak materiał pochodzący od pacjentów.

3.2.1. Wszystkie procedury dotyczące niniejszego badania zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną UM w Białymstoku, numer zgody: R-I-002/38/2016.

3.3. Metody

3.3.1. Morfologia krwi obwodowej.

Morfologię krwi obwodowej w grupie kontrolnej i grupach badanych wykonano z próbki krwi pobranej na wersenian potasu przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego Sysmex XT 1800 (Japonia). Analizowane były parametry czerwonych krwinek, takie jak ilość krwinek czerwonych (RBC), stężenie hemoglobiny (HGB) oraz hematokryt (HCT) a także ilość krwinek białych (WBC) oraz krwinek płytkowych (PLT).

3.3.2. Analiza parametrów układu hemostazy.

W celu określenia stanu układu hemostazy zarówno w grupie kontrolnej jak i wszystkich grupach badanych, z osocza pochodzącego z świeżej próbki krwi pobranej na cytrynian sodu wykonywano analizy zgodnie z zaleceniami producenta. Czas protrombinowy (PT), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) oraz stężenie fibrynogenu przy użyciu koagulometru Ceveron Alpha (Technoclone, USA). Analizator działa w oparciu o zasadę pomiaru fotometrycznego. Ta metoda pozwala oznaczyć czas krzepnięcia poprzez optyczną detekcję zmiany mętności wywołanej tworzeniem włókien fibrynowych.

3.3.2.1. Oznaczenie stężenia D-dimerów.

Stężenie D-dimerów w osoczu oznaczano z zastosowaniem analizatora VIDAS (bioMerieux, Francja). Działanie analizatora oparte jest na zasadzie metody ELFA (enzymoimmunofluorescencja).

3.3.2.2. Oznaczenie kompleksów trombina-antytrombina, plazmina-antyplazmina i fragmentów protrombiny 1+2.

Kompleks trombina-antytrombina (TAT), plazmina-antyplazmina (PAP) oraz fragmenty protrombiny 1+2 (F1+2) oznaczono w dwóch powtórzeniach w osoczu z zastosowaniem testów immunoenzymatycznych (ELISA) (Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Thrombin/Antithrombin Complex (TAT), Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Plasmin/Antiplasmin Complex (PAP), Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Prothrombin Fragment 1+2 (F1+2), Cloud-Clone Corp., USA).

3.3.3. Oznaczenie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonna.

Liczba mikrocząstek (MP) pochodzenia płytkowego (PMP), leukocytnego (LMP), erytrocytnego (ErMP) oraz śródbłonkowego (EndMP) mierzona była metodą fluorescencji bezpośredniej z wykorzystaniem cytometru przepływowego BD FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). W celu oznaczenia ilości MP, świeżą próbkę krwi pobraną na cytrynian sodu odwirowywano w wirówce MPW 352 (MED.INSTRUMENTS, Polska) przez 5 minut z przyspieszeniem 5000g. Następnie osocze przeniesiono do czystej probówki, którą poddano wirowaniu przy tych samych warunkach co próbkę krwi. Po odwirowaniu nadsącz przeniesiono do probówki typu eppendorf i wirowano, w celu uzyskania pelletu komórkowego, przez 2 minuty z przyspieszeniem 17000g z zastosowaniem ultrawirówki Eppendorf MiniSpin Plus (Eppendorf AG, Germany). Po odwirowaniu osocze odciągnięto a pellet rozpuszczono w 440µl 10% buforu Annexin V Binding Buffer (Becton Dickinson, USA) (skład: bufor: woda destylowana przefiltrowana przy użyciu filtra Whatman 0.1µm, w stosunku objętościowym 1:9). Następnie do probówki dodano 60µl roztworu złożonego z 54µl 10% buforu Annexin V Binding Buffer oraz 6 µl Annexin V-FITC (Becton Dickinson, USA). Po wymiesznieniu roztworu 40µl powyższej mieszaniny przeniesiono do probówek zawierających określoną liczbę mikrokulek – BD TruCount (Becton Dickinson, USA). W celu znakowania odpowiednimi

przeciwciałami do próbek dodano po 5µl przeciwciał monoklonalnych charakterystycznych dla poszczególnych rodzajów mikrocząstek: anty-CD42b dla mikrocząstek pochodzenia płytkowego (PMP), anty-CD45 dla mikrocząstek pochodzenia leukocytarnego (LMP), anty-CD235 dla mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego (ErMP) oraz anty-CD144 charakterystycznych dla mikrocząstek pochodzących z komórek śródbłonka naczyń (EndMP). Tak przygotowane próbki TruCount inkubowane były w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie dodano 450µl schłodzonego 10% buforu Annexin V Binding Buffer. Próbkę wytrząsano przez 15 sekund i poddawano analizie z zastosowaniem cytometru przepływowego. Liczba mikrocząstek w badanej próbce została wyliczona ze wzoru:

$$\text{Bezwzględna liczba mikrocząstek}/\mu\text{l} = \frac{\text{ilość zdarzeń w danym regionie}}{\text{ilość zdarzeń w regionie kulek}} \times \frac{\text{bezwzględna ilość kulek w próbce}}{\text{objętość próbki badanej w }\mu\text{l}}$$

3.3.4. Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne zostały wykonane w programie MS Excel. Wartości zostały przedstawione jako średnie z uwzględnieniem odchyłeń standardowych. Wartości p z założeniem przedziału ufności 95% obliczane były z zastosowaniem testu T-Studenta. Liczone były także współczynniki wariancji dla poszczególnych parametrów. W celu sprawdzenia korelacji pomiędzy parametrami, obliczany został współczynnik korelacji.

4. WYNIKI

4.1. Oznaczenie morfologii krwi u pacjentów.

Parametry morfologii krwi u pacjentów w grupach badanych oraz kontrolnej przedstawia tabela 2. Wzrost liczby leukocytów w grupach badanych pacjentów z diagnozą PV, ET i CLL okazał się istotny statystycznie względem grupy kontrolnej. Obserwowane zmiany w liczbie erytrocytów w grupach badanych w porównaniu do grupy kontrolnej, okazały się istotne statystycznie w przebiegu PV, CLL, AML oraz MM. Zmiany w stężeniu hemoglobiny oraz wartości hematokrytu obserwowane były w przebiegu PV, CLL oraz AML i były istotne statystycznie względem grupy kontrolnej. Liczba płytek krwi uległa znamiennej statystycznie zmianie w przebiegu ET oraz AML w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 2. Porównanie parametrów morfologii krwi u pacjentów grup badawczych. Istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej zaznaczono czerwoną czcionką i podkreśleniem.

Grupy badane	WBC (tys./ μ l)	RBC (mln/ μ l)	HGB (g/dl)	HCT (%)	PLT (tys./ μ l)
Kontrola	5,92 \pm 0,9	5,11 \pm 0,4	14,41 \pm 0,9	42,80 \pm 2,5	255,50 \pm 54,3
PV	<u>8,58 \pm 2,4</u>	<u>6,60 \pm 1,1</u>	<u>18,54 \pm 1,7</u>	<u>56,25 \pm 6,2</u>	323,25 \pm 141,7
ET	<u>8,06 \pm 1,9</u>	4,75 \pm 0,7	14,01 \pm 2,5	42,14 \pm 7,3	<u>781,64 \pm 252,0</u>
CLL	<u>89,50 \pm 77,8</u>	<u>3,95 \pm 0,8</u>	<u>11,66 \pm 2,4</u>	<u>36,62 \pm 6,4</u>	156,00 \pm 84,5
AML	15,57 \pm 16,8	<u>2,95 \pm 0,4</u>	<u>9,07 \pm 1,1</u>	<u>27,26 \pm 3,4</u>	<u>71,40 \pm 32,4</u>
MM	5,70 \pm 1,2	<u>3,97 \pm 1,4</u>	11,65 \pm 3,4	35,56 \pm 11,0	205,38 \pm 61,7

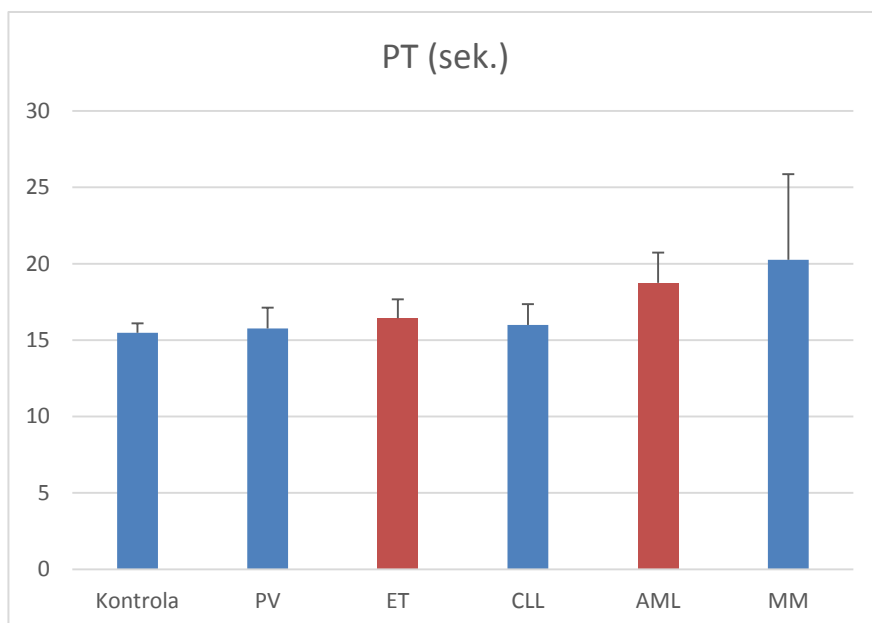
Kontrola – grupa kontrolna; PV – grupa pacjentów z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej; ET – grupa pacjentów z rozpoznaniem nadpłytkowości samoistnej; CLL – grupa pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej; AML – grupa pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki mieloblastycznej; MM – grupa pacjentów z rozpoznaniem szpiczaka mnogiego. WBC – liczba leukocytów; RBC – liczba erytrocytów; HGB – stężenie hemoglobiny; HCT – hematokryt; PLT – liczba trombocytów.

4.2. Badania markerów układu hemostazy.

Średnie czasy PT i APTT, stężenie fibrynogenu oraz D-dimerów w poszczególnych grupach przedstawiają ryciny 1-4. W zakresie analizy wyników uzyskanych z oznaczeń parametrów układu hemostazy odnotowano istotne statystycznie wydłużenie czasu PT w przebiegu ET oraz AML a także APTT w przebiegu PV

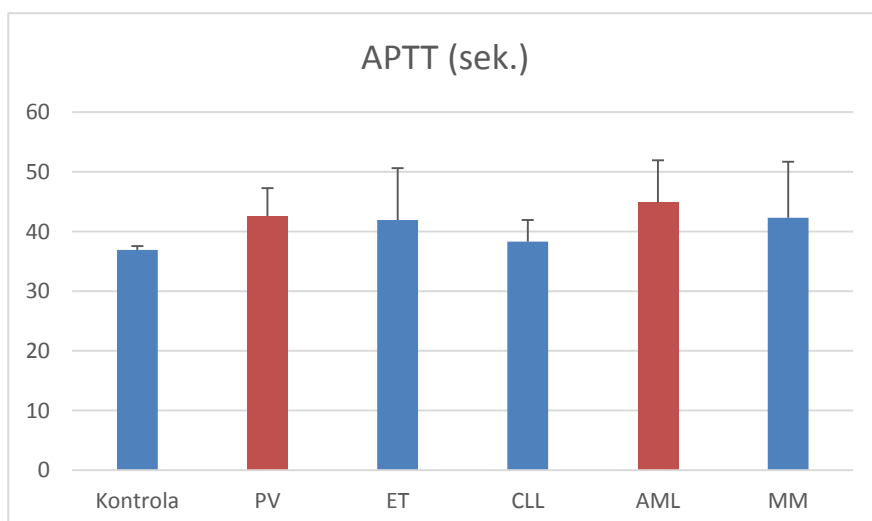
i AML. Stężenie fibrynogenu było znamienne statystycznie wyższe u pacjentów chorych na PV oraz CLL. Istotny statystycznie wzrost stężenia D-dimerów zaobserwowano w grupach badanych z PV, CLL, AML oraz MM.

Rycina 1. Średni czas PT w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych. Istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej zaznaczono czerwonym kolorem słupka.

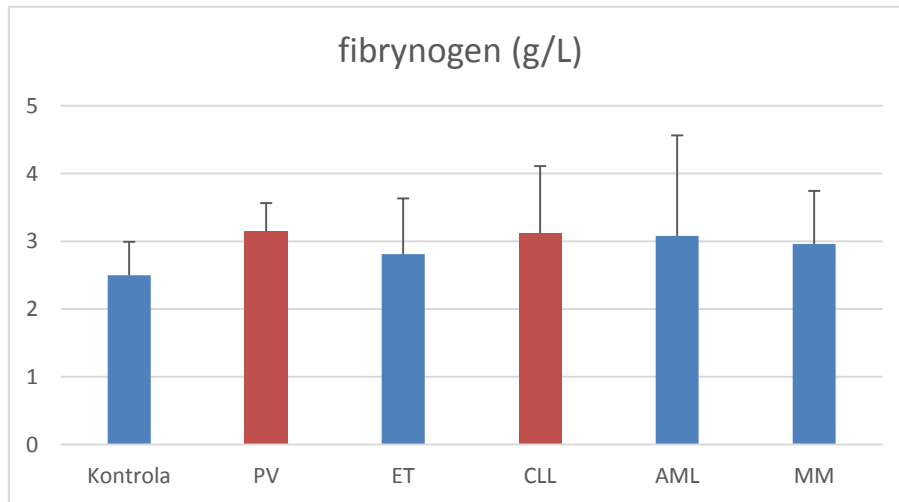


Kontrola – grupa kontrolna; PV – grupa pacjentów z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej; ET – grupa pacjentów z rozpoznaniem nadpłytkowości samoistnej; CLL – grupa pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki limfocytowej; AML – grupa pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki mieloblastycznej; MM – grupa pacjentów z rozpoznaniem szpiczaka mnogiego.

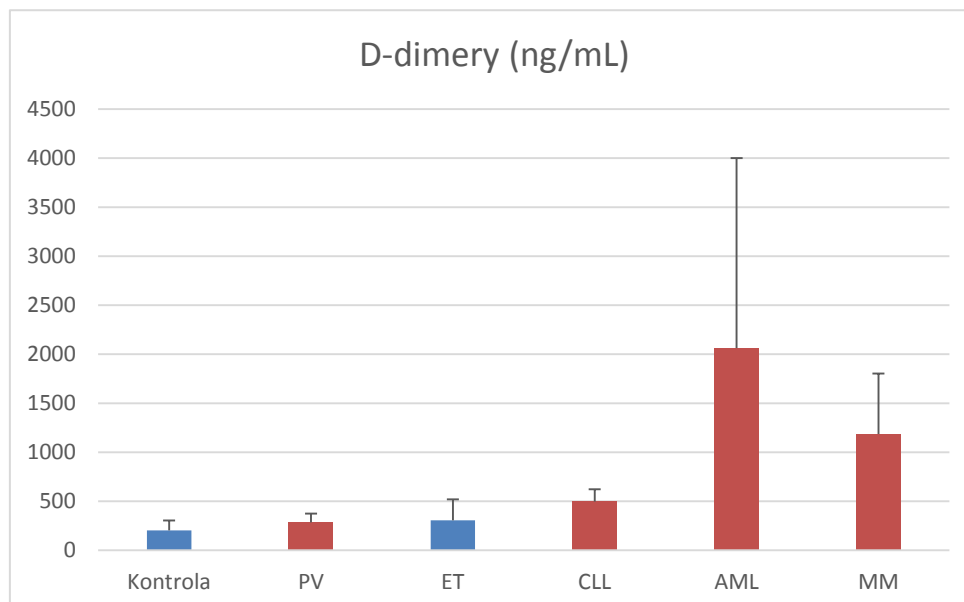
Rycina 2. Średni czas APTT w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych. Istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej zaznaczono czerwonym kolorem słupka.



Rycina 3. Średnie stężenie fibrynogenu w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych. Istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej zaznaczono czerwonym kolorem słupka.

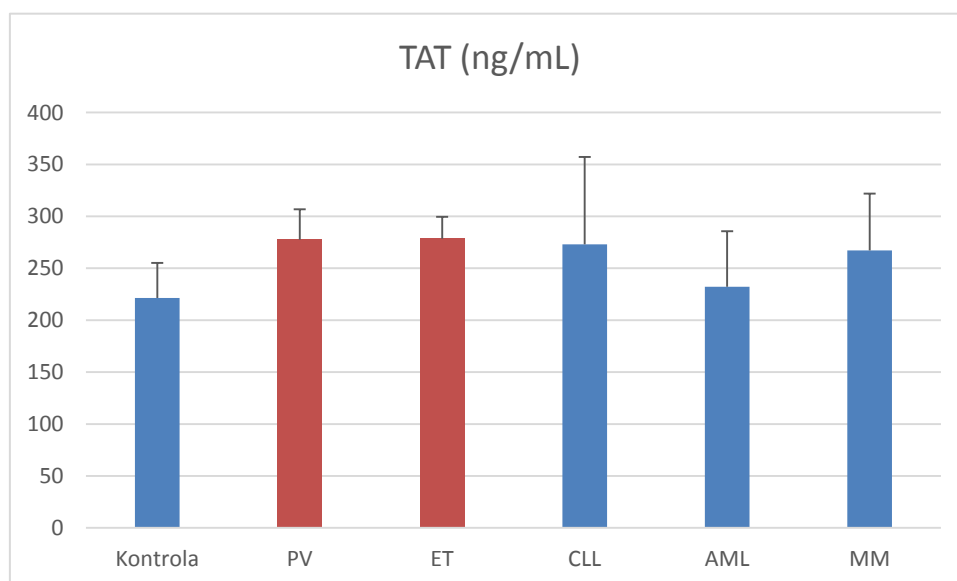


Rycina 4. Średnie stężenie D-dimerów w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych. Istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej zaznaczono czerwonym kolorem słupka.

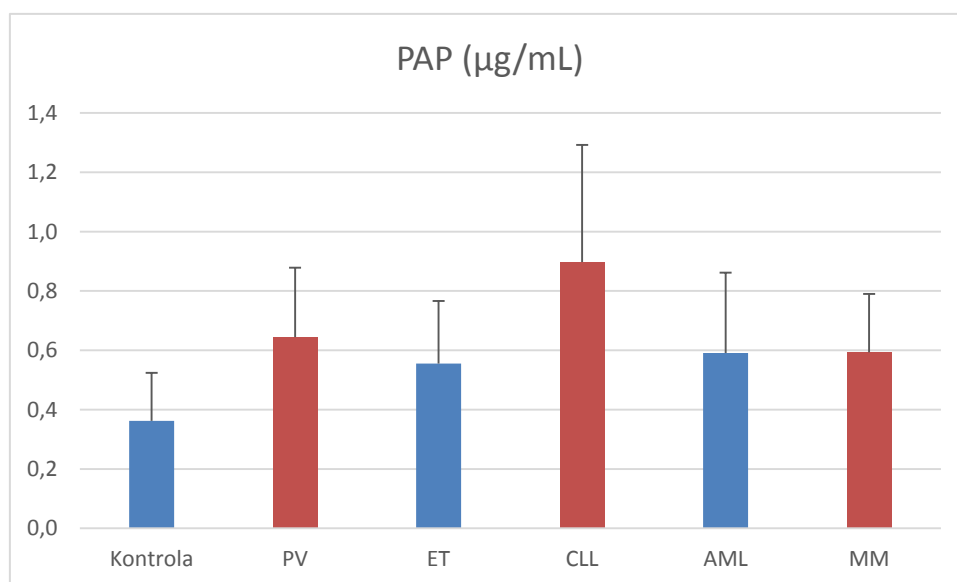


Stężenie kompleksów TAT było większe niż w grupie kontrolnej u chorych z rozpoznaniem PV oraz ET, stężenie PAP było podwyższone u chorych na PV, CLL, MM a stężenie F1+2 było niższe niż w grupie kontrolnej w przebiegu ET oraz AML.

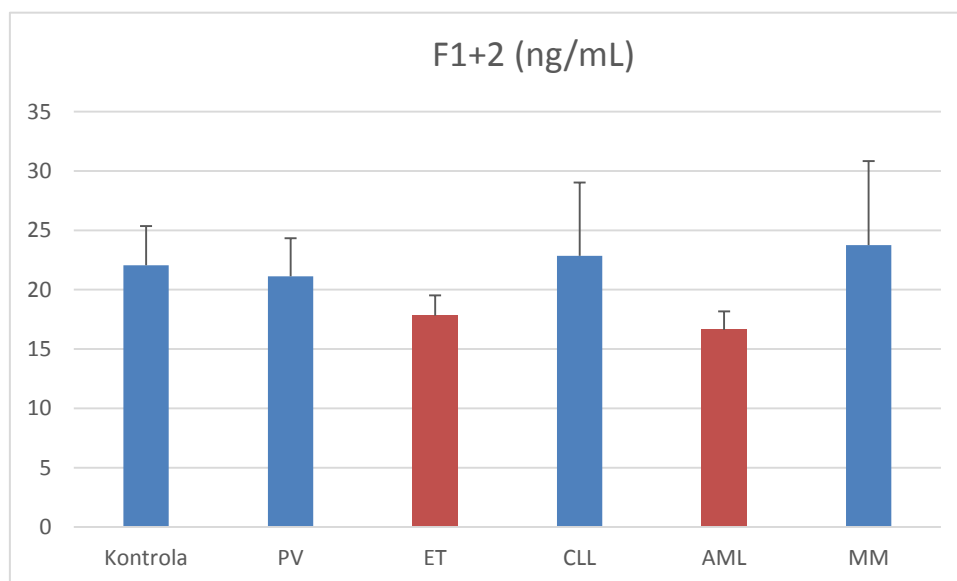
Rycina 5. Średnie stężenie kompleksów TAT w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych.



Rycina 6. Średnie stężenie kompleksów PAP w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych

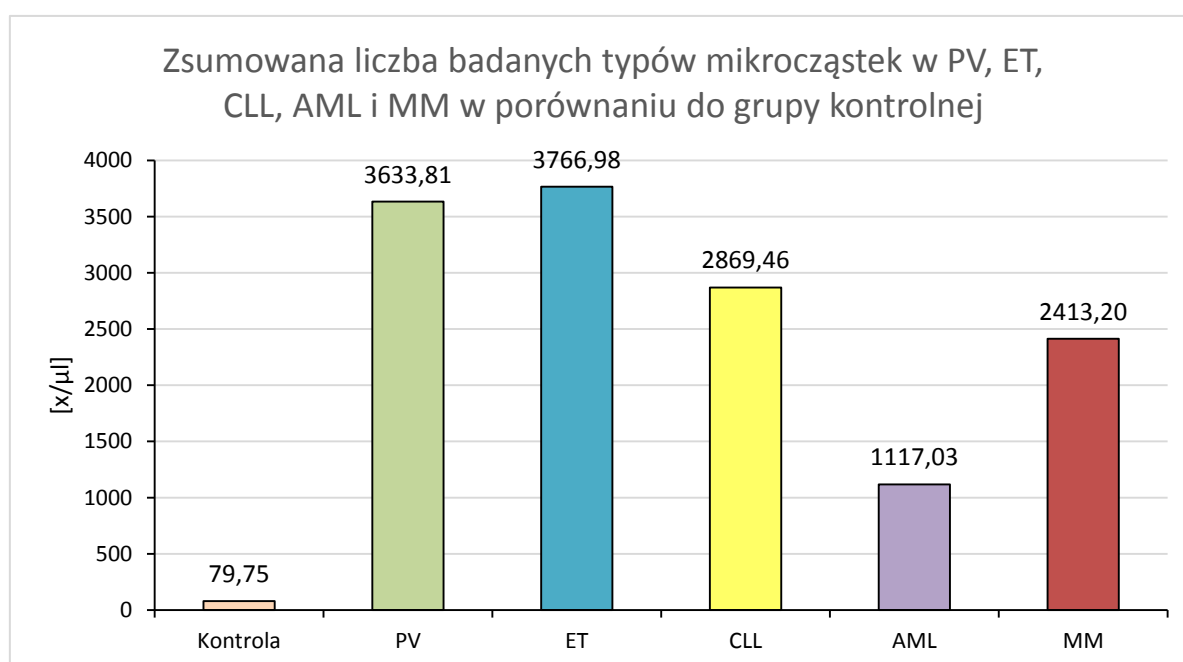


Rycina 7. Średnie stężenie fragmentów protrombiny F1+2 w osoczu krwi grupy kontrolnej oraz pięciu grup badanych



4.3. Oznaczenie liczby mikrocząstek pochodzenia płytkowego, erytrocytarnego, śródbłonkowego oraz leukocytnego.

Rycina 8. Zsumowana liczba badanych rodzajów mikrocząstek bez podziału na typ komórek, z których pochodzą, we wszystkich badanych jednostkach chorobowych w odniesieniu do grupy kontrolnej. Istotności statystyczne na poziomie $p < 0,05$ w porównaniu do grupy kontrolnej zaobserwowano w każdej grupie badanej.



	Kontrola	PV	ET	CLL	AML	MM
Całkowita liczba komórek krwi (mln/μl)	5,37	6,93	5,58	4,17	3,04	4,32

Rycina 9. Porównanie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłónka w badanych jednostkach chorobowych. Zaznaczone zostały istotności statystyczne pomiędzy poszczególnymi typami mikrocząstek.

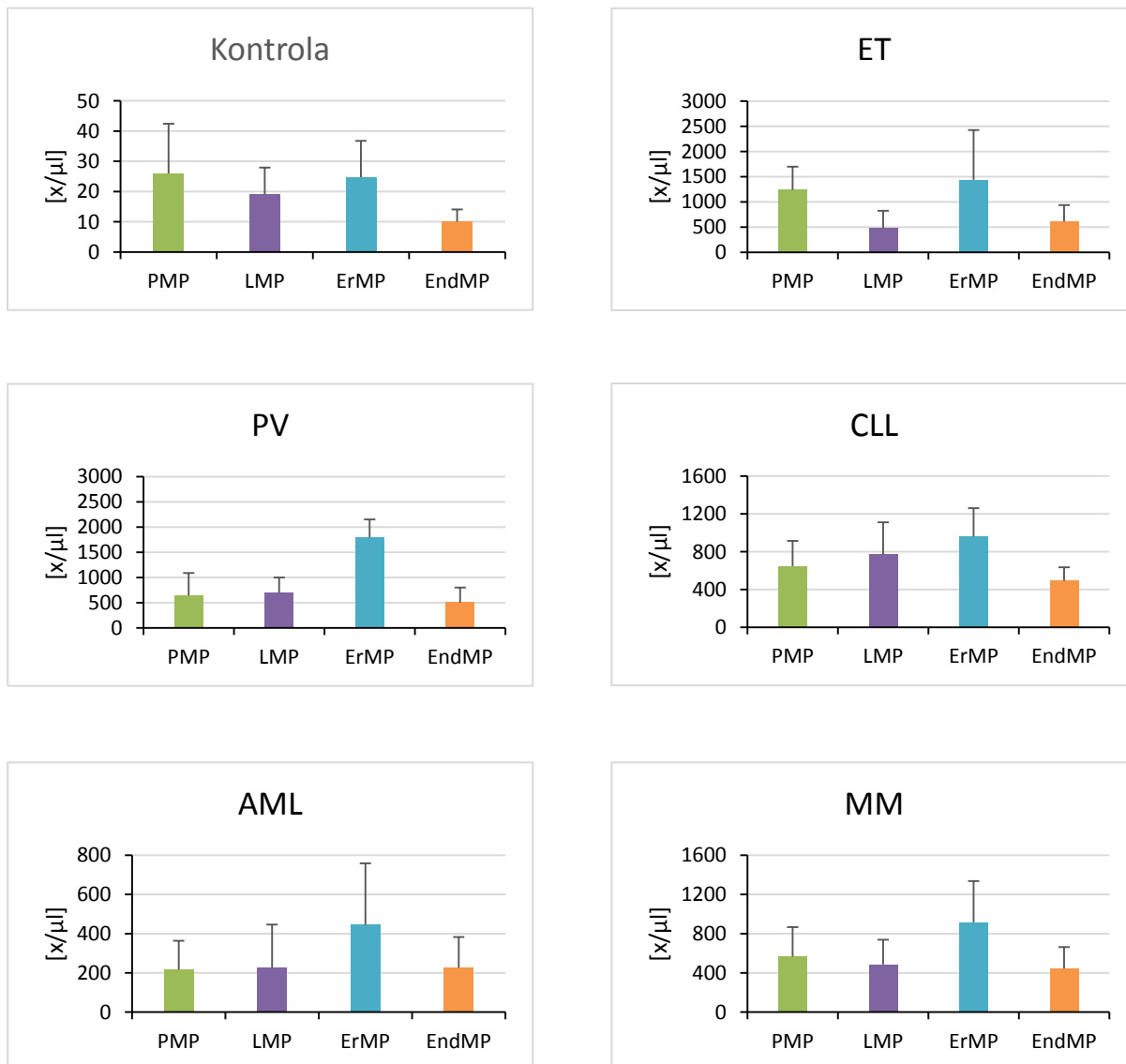
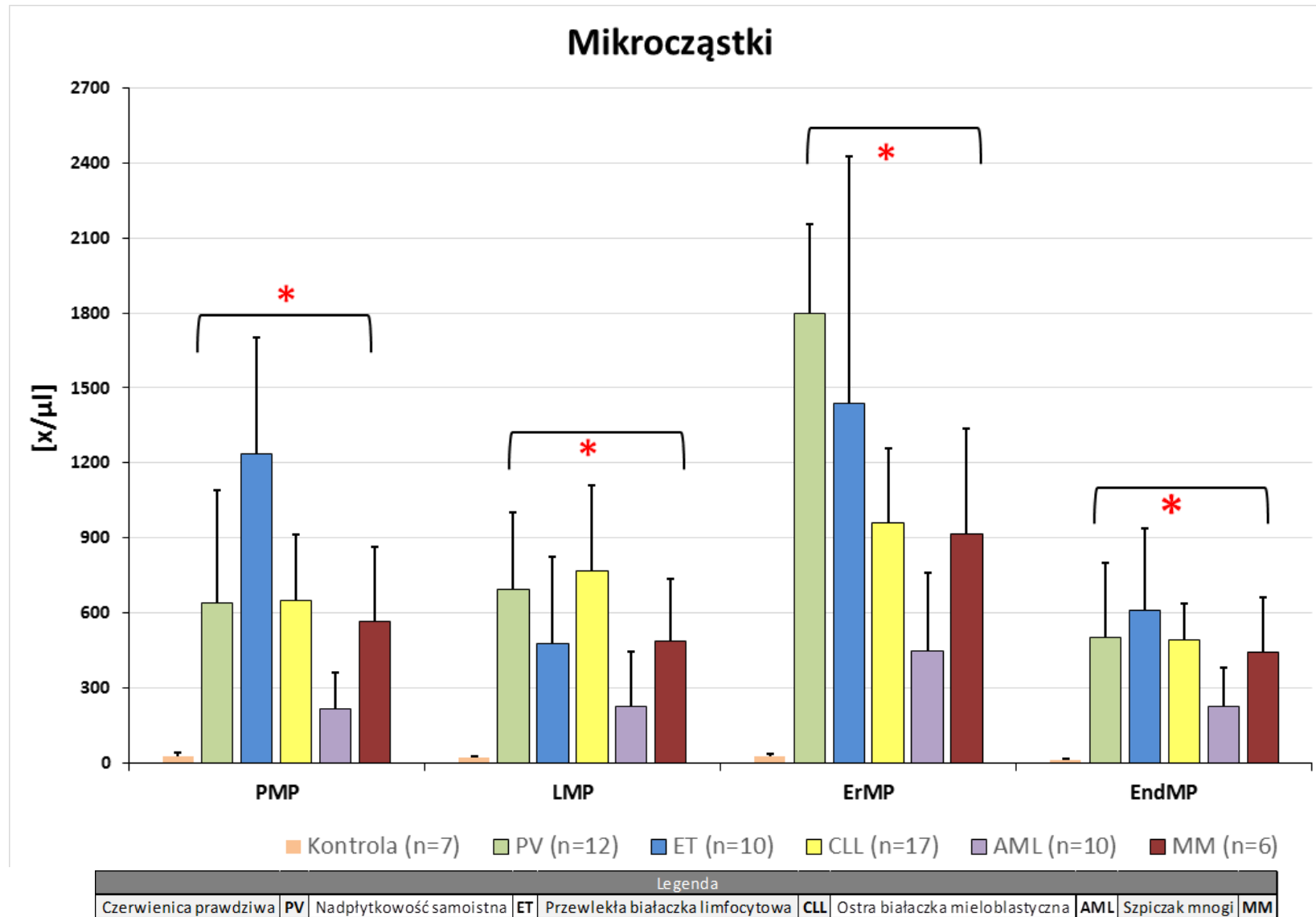


Tabela 3. Zawartość procentowa poszczególnych typów mikrocząstek w obrębie grup badawczych.

Mikrocząstki (%)				
Grupy badane	PMP	LMP	ErMP	EndMP
Kontrola	32,57	23,76	31,06	12,60
PV	17,67	19,06	49,45	13,82
ET	32,87	12,73	38,14	16,26
CLL	22,59	26,79	33,46	17,15
AML	19,42	20,37	39,94	20,27
MM	24,38	24,24	30,96	20,42



Rycina 10. Zestawienie liczby wszystkich badanych typów mikrocząstek we wszystkich grupach badawczych w odniesieniu do grupy kontrolnej z uwzględnieniem istotności statystycznej na poziomie $p < 0,05$.

We wszystkich badanych jednostkach chorobowych wykazano istotny statystycznie wzrost ilości wszystkich badanych typów mikrocząstek w odniesieniu do grupy kontrolnej. W przypadku PV obserwowano znacznie zwiększoną ilość mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego, natomiast w ET stwierdzono dominujący wzrost odsetka procentowego mikrocząstek pochodzenia płytkowego w stosunku do pozostałych populacji mikrocząstek. W przypadku CLL, AML oraz MM zaobserwowano wzrost mikrocząstek pochodzących ze wszystkich badanych komórek, przy czym największy odsetek procentowy stanowiły mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego.

4.4. Korelacje

4.4.1. Sprawdzone zostały korelacje całkowitej liczby mikrocząstek z wszystkimi badanymi parametrami układu hemostazy. W tabeli nr 4 przedstawione zostały wartości r, kolorem zielonym zaznaczono wyniki istotne statystycznie na poziomie $p > 0,05$, podkreśleniem oznaczono korelacje ujemne.

Tabela 4. Wartości r dla korelacji pomiędzy parametrami hemostazy a całkowitą liczbą MP.

Grupy badane	MP vs PT	MP vs APTT	MP vs fibrynogen	MP vs D-dimery	MP vs TAT	MP vs PAP	MP vs F1+2
Czerwienica prawdziwa	0,38	0,65	-0,61	<u>-0,05</u>	0,22	0,09	0,20
Nadpłytkowość samoistna	<u>-0,45</u>	-0,67	0,19	0,70	-0,61	0,07	0,40
Przewlekła białaczka limfocytowa	0,64	<u>-0,01</u>	0,20	0,32	<u>-0,03</u>	0,15	<u>-0,16</u>
Ostra białaczka mieloblastyczna	0,38	0,54	<u>-0,14</u>	<u>-0,13</u>	<u>-0,16</u>	<u>-0,21</u>	<u>-0,04</u>
Szpiczak mnogi	<u>-0,10</u>	0,05	<u>-0,11</u>	<u>-0,20</u>	<u>-0,65</u>	-0,78	0,03

Analiza korelacji wykazała, że w przebiegu czerwienicy prawdziwej wzrost całkowitej liczby mikrocząstek koreluje z wydłużeniem APTT i z obniżeniem stężenia fibrynogenu. W przypadku nadpłytkowości samoistnej wraz ze wzrostem liczby MP zauważalne było skrócenie APTT i wzrost stężenia D-dimerów. W przebiegu przewlekłej białaczki limfocytowej widoczna była silna korelacja pozytywna liczby mikrocząstek i wydłużenia czasu protrombinowego.

4.4.2. Korelacje dla poszczególnych rodzajów mikrocząstek z parametrami hemostazy bez podziału na jednostki chorobowe.

Tabela 5. Wartości r korelacji liczby poszczególnych rodzajów mikrocząstek we wszystkich badanych grupach chorych z parametrami hemostazy, kolorem zielonym została zaznaczona istotność statystyczna na poziomie $p < 0,05$.

	MP vs PT	MP vs APTT	MP vs fibrynogen	MP vs D-dimery	MP vs TAT	MP vs PAP	MP vs F1+2
ErMP	0,14	-0,04	0,06	0,08	-0,16	-0,05	0,02
EndMP	0,33	0,19	-0,27	-0,08	-0,03	0,20	0,00
PMP	0,18	0,21	-0,21	-0,15	0,10	0,18	0,04
LMP	0,13	-0,05	-0,07	-0,01	-0,17	-0,09	0,08

Zaobserwowano istotną statystycznie dodatnią korelację liczby EndMP i czasu protrombinowego oraz ujemną korelację EndMP i stężenia fibrynogenu.

4.4.3. Korelacje parametrów czerwonych z liczbą mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego – dla wszystkich badanych grup chorych oraz osobno dla grupy z czerwienią prawdziwą-

Tabela 6. Wartości r korelacji liczby mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego we wszystkich badanych grupach chorych z poszczególnymi parametrami czerwonych. MCV – średnia objętość erytrocyta; MCH – średnia masa hemoglobiny w krwince; MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwince; RDW-CV – odchylenie w objętości krwinek czerwonych.

	ErMP vs MCV	ErMP vs MCH	ErMP vs MCHC	ErMP vs RDW-CV
Wszyscy pacjenci	0,16	0,05	-0,15	0,00
Grupa z czerwienią prawdziwą	-0,32	-0,24	0,14	-0,11

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji między liczbą mikrocząstek pochodzenia erytrocytarnego a wskaźnikami czerwonych.

4.4.4. Korelacje wskaźników płytkowych z liczbą mikrocząstek pochodzenia płytkowego – dla wszystkich badanych grup chorych oraz osobno dla grupy z nadpłytkowością samoistną.

Tabela 7. Wartości r korelacji liczby mikrocząstek pochodzenia płytkowego we wszystkich badanych grupach chorych z poszczególnymi z poszczególnymi wskaźnikami płytkowymi, kolorem zielonym zaznaczona została istotność statystyczna na poziomie $p < 0,05$. PDW – wskaźnik anizocytozy płytek krwi; MPV – średnia objętość trombocyta; PCT – trombokryt.

	PMP vs PDW	PMP vs MPV	PMP vs PCT
Wszyscy pacjenci	-0,05	0,00	0,56
Grupa z nadpłytkowością samoistną	0,16	0,31	0,69

Zaobserwowano dodatnią korelację między liczbą mikrocząstek pochodzenia płytkowego a trombokrytem zarówno biorąc pod uwagę wyniki pochodzące od wszystkich pacjentów ($r=0,56$) jak i w osobno w grupie pacjentów z nadpłytkowością samoistną ($r=0,69$).

4.4.5. Korelacje liczby określonych MP z liczbą komórek z których powstają.

Tabela 8. Wartości r korelacji liczby określonych rodzajów mikrocząstek z liczbą komórek z których są uwalniane we wszystkich badanych grupach chorych, kolorem zielonym została zaznaczona istotność statystyczna na poziomie $p < 0,05$

	PLT vs PMP	WBC vs LMP	RBC vs ErMP
Czerwieńca prawdziwa	0,74	0,64	0,07
Nadpłytkowość samoistna	0,69	0,21	-0,31
Przewlekła białaczka limfocytowa	0,34	0,08	-0,46
Ostra białaczka mieloblastyczna	-0,18	0,46	0,21
Szpiczak mnogi	-0,56	-0,87	-0,04
Wszyscy pacjenci	0,59	0,18	-0,02

Zaobserwowano istotne statystycznie dodatnie korelacje między mikrocząstkami pochodzenia płytkowego a liczbą płytek krwi u pacjentów z rozpoznaniem PV oraz ET. W przypadku zależności LMP i WBC, widoczna jest dodatnia korelacja w czerwienicy prawdziwej i ujemna korelacja w przebiegu szpiczaka mnogiego. Nie zaobserwowano istotności statystycznej

w relacji RBC vs ErMP. Zliczając mikrocząstki wszystkich pacjentów bez uwzględniania podziału na grupy badawcze, widoczna jest dodatnia korelacja przy liczbie płytek krwi i mikrocząstek pochodzenia płytkowego ($r=0,59$, $p<0,05$).

4.4.6. Pomędzy zsumowaną liczbą wszystkich badanych typów mikrocząstek a całkowitą liczbą komórek krwi istnieje korelacja dodatnia ($r=0,88$) z uwzględnieniem istotności statystycznej na poziomie $p<0,05$.

5. DYSKUSJA

Wyniki wykonanych badań wykazały znaczący i statystycznie istotny wzrost uwalniania mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonna u chorych na rozrostowe choroby układu krwiotwórczego. We wszystkich badanych jednostkach chorobowych (ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka limfocytowa, szpiczak mnogi, czerwienica prawdziwa, nadpłytkowość samoistna) liczba mikrocząstek była wielokrotnie wyższa w porównaniu do liczby stwierdzanej w grupie kontrolnej. Wyniki te są w dużej mierze zgodne z innymi badaniami, w których stwierdzono, że pacjenci z ET mieli większą liczbę MP z markerami charakterystycznymi dla płytek krwi i śródbłonna niż osoby zdrowe, oraz że podwyższona liczba MP u chorych na ET wiązała się ze zwiększonym wytwarzaniem trombiny [105]. Ghosh i wsp. stwierdzili, że u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową, całkowita liczba badanych mikrocząstek jest istotnie statystycznie wyższa niż u zdrowych osób [92]. Badania Benameur i wsp. wykazały, że w przebiegu szpiczaka mnogiego całkowita liczba MP była znamienne statystycznie wyższa niż w kontroli [94]. Zwiększoną liczbę mikrocząstek pochodzenia płytkowego zauważono także w przebiegu trombocytopenii idiopatycznej [87].

Analiza zawartości procentowej poszczególnych rodzajów mikrocząstek w danych jednostkach chorobowych wykazała, że mikrocząstki pochodzenia erytrocytarnego stanowią największy odsetek spośród analizowanych typów mikrocząstek we wszystkich badanych jednostkach chorobowych, co może być spowodowane faktem, iż czerwone krwinki są najliczniejszą grupą komórek we krwi obwodowej. W PV jest ich zdecydowanie najwięcej (49,45%), z kolei w ET zawartość procentowa ErMP wynosiła 38,14% a drugą wiodącą grupą były mikrocząstki pochodzenia płytkowego – 32,87%. W przebiegu CLL grupą mikrocząstek, której zaraz po ErMP było najwięcej, były mikrocząstki pochodzenia leukocytnego – 26,79%. W przebiegu białaczek ostrych, poza ErMP, pozostałe typy mikrocząstek pozostawały na porównywalnym poziomie między 19,42% a 20,37%. W przypadku szpiczaka, zawartość procentowa PMP oraz LMP była porównywalna na poziomie ok. 24%, a najmniej było mikrocząstek pochodzących z komórek śródbłonna naczyń. Analizując powyższe, dostrzegłem, że duży udział procentowy spośród badanych typów mikrocząstek, oprócz ErMP, mają te mikrocząstki, które pochodzą z komórek objętych chorobą rozrostową krwi. Co ciekawe, najmniejszą liczbę mikrocząstek wśród badanych grup chorych stwierdzono w grupie ostrej białaczki szpikowej. Jednocześnie w tej grupie obserwowana była najmniejsza liczba komórek krwi. Z kolei najwięcej komórek krwi obserwowano w grupie chorych z PV i ET, w których stwierdzano najwyższą liczbę mikrocząstek. Nie

można wykluczyć, że liczba komórek krwi u osób z rozrostową chorobą układu krwiotwórczego może być jednym z czynników, które mają wpływ na liczbę uwalnianych mikrocząstek. Analiza korelacji wykazała dodatnią zależność między całkowitą liczbą komórek krwi a zsumowaną liczbą wydzielanych mikrocząstek ($r=0,88$). W analizowanym piśmiennictwie nie znalazłem publikacji, w których badano wszystkie typy mikrocząstek wydzielanych z komórek krwi i śródbłonna w przebiegu chorób hematologicznych i oceniano ich wzajemne stosunki procentowe oraz korelacje z całkowitą liczbą komórek krwi. Wykonana analiza korelacji poszczególnych typów mikrocząstek z liczbą komórek z których się wywodzą wykazała istotnie statystycznie dodatnie korelacje między mikrocząstkami pochodzenia płytkowego a liczbą płytek krwi u pacjentów z rozpoznaniem PV ($r=0,74$) oraz ET ($r=0,69$). Dodatkowo w PV zaobserwowana została dodatnia korelacja między liczbą leukocytów a liczbą mikrocząstek pochodzenia leukocytarnego ($r=0,64$). W przebiegu MM, stwierdzona została ujemna korelacja liczby leukocytów i liczby powstających z nich mikrocząstek ($r= -0,87$). U chorych z przewlekłą białaczką limfocytową, wykazujących znacznie podwyższoną liczbę leukocytów, dominującą populacją mikrocząstek były LMP, aczkolwiek nie wykazano korelacji liczby leukocytów z liczbą pochodzących z nich mikrocząstek. Zliczając mikrocząstki wszystkich pacjentów bez uwzględniania podziału na grupy badawcze, widoczna jest dodatnia korelacja liczby płytek krwi z liczbą mikrocząstek pochodzenia płytkowego ($r=0,59$). W piśmiennictwie brak jest podobnych badań.

Uzyskane wyniki badań we wszystkich badanych grupach chorych wykazały zaburzenia układu hemostazy. U chorych na czerwienicę prawdziwą widoczne było wydłużenie czasu APTT, wzrost stężenia fibrynogenu, D-dimerów, kompleksów TAT i PAP. Dodatkowo w PV zaobserwowano dodatnią korelację całkowitej liczby MP z APTT oraz ujemną korelację ze stężeniem fibrynogenu. W przebiegu ET wydłużony był czas protrombinowy, zwiększone stężenie TAT oraz zmniejszone stężenie fragmentów protrombiny F1+2. Widoczna była korelacja ujemna całkowitej liczby MP z APTT oraz korelacja dodatnia ze stężeniem D-dimerów. W grupie pacjentów z CLL zaobserwowane zostało wyższe stężenie fibrynogenu, D-dimerów oraz kompleksów PAP. Widoczna była także korelacja dodatnia między czasem PT a całkowitą liczbą mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonna. W przebiegu AML zaobserwowano wydłużenie czasów PT oraz APTT a także wyższe stężenie D-dimerów i obniżone stężenie kompleksów F1+2 w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie pacjentów ze szpiczakiem mnogim istotnie statystycznie było wyższe stężenie D-dimerów oraz kompleksów PAP w odniesieniu do grupy kontrolnej. W dostępnym

piśmiennictwie brak jest podobnych analiz i korelacji. Wielu autorów skupiało się na aktywności czynnika tkankowego i fosfatydyloseryny [128-130] zakładając prokoagulacyjne właściwości mikrocząstek. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że mikrocząstki, oprócz ewentualnej wartości diagnostycznej i predykcyjnej, mogą stanowić nowy czynnik ryzyka występowania zakrzepicy u chorych na choroby rozrostowe krwi [97, 98, 103]. Zapobieganie powikłaniom zakrzepowym i/lub krwotocznym jest kluczowym elementem postępowania w przebiegu chorób nowotworowych, w tym także hematologicznych, dlatego właściwe zaklasyfikowanie chorych do odpowiedniej kategorii ryzyka ma kluczowe znaczenie dla osiągnięcia celów terapeutycznych [99-102]. Niedawno przeprowadzona analiza prospektywna wykazała, że podwyższone stężenie MP w osoczu było trafnym narzędziem do przewidywania ryzyka wystąpienia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej u pacjentów z nowo rozpoznanym rakiem dróg żółciowych trzustki. Wcześniejsze badania sugerowały również, że fosfatydyloseryna w błonie komórkowej erytrocytów i płytek krwi, a także laktadhedryna wraz z mikrocząstkami były kluczowymi czynnikami rozwoju incydentów zakrzepowych u chorych na czerwień prawdziwą [104]. W badaniu Taniguchi 2017 wykazano, że poziomy prokoagulacyjnych MP były istotnie wyższe u pacjentów z chorobami rozrostowymi krwi z historią zakrzepicy niż u pacjentów bez zakrzepicy, co może sugerować predykcyjny charakter badania liczby mikrocząstek pochodzenia np. płytkowego [106]. Są także doniesienia wskazujące, że dla podwyższona liczba mikrocząstek może być korzystna dla pacjenta z białaczką i małopłytkowością. Wykazano, że chorzy z wysokim poziomem PMP nie mają zaburzeń krwotocznych mimo małej liczby płytek krwi [107]. Wykonane badania własne wykazały, że u chorych na choroby rozrostowe układu krwiotwórczego, od których materiał pobierany był w dniu przyjęcia na oddział z podejrzeniem choroby rozrostowej, jest znacznie podwyższona w porównaniu do osób zdrowych liczba mikrocząstek oraz nieprawidłowe wartości niektórych markerów hemostazy. Wzajemne działania i interakcje czynników krzepnięcia, inhibitorów, mikrocząstek i innych składników osocza wpływają na ogólną hemostatyczną charakterystykę osocza, jednak nadmiar MP może mieć szkodliwe działanie prozakrzepowe i prozapalne oraz modyfikować funkcje naczyniowe. Dowiedziono, że mikrocząstki pochodzenia płytkowego mają 100-krotnie wyższą aktywność prokoagulacyjną niż same płytki krwi [108]. Przeprowadzonych zostało kilka eksperymentów w celu zbadania roli krążących MP jako potencjalnych biomarkerów aktywności AML i predyktorów trombogenności u pacjentów z tym rodzajem nowotworu [109, 110]. Mikrocząstki u pacjentów z AML wykazują ekspresję białek błonowych komórek blastycznych i mogą służyć jako biomarkery dynamiki białaczki [111]. Podwyższone

poziomy MP pochodzących z komórek śródbłonna i ich aktywność prokoagulacyjna mogą wskazywać na uszkodzenie naczyń związane ze stanem nadkrzepliwości spotykanym w przebiegu AML. Istnieją badania, które donoszą, że w przebiegu AML, u dwóch na trzech pacjentów przed wdrożeniem chemioterapii, duża liczba komórek białaczkowych koreluje ze stosunkowo niskim odsetkiem mikrocząstek pochodzenia płytkowego [110, 111, 113]. Ponadto nowo zdiagnozowani pacjenci z AML wykazywali znacznie wyższą liczbę uwalnianych MP w ich osoczu w porównaniu do zdrowych osób, co jest całkowicie zgodne z wynikami badań własnych. W przebiegu szpiczaka mnogiego wykazano, z zastosowaniem modelu mysiego, znaczny wzrost całkowitej liczby krążących mikrocząstek w porównaniu z grupą kontrolną. Krążące MP pochodziły głównie z leukocytów oraz erytrocytów [113]. Przewlekła białaczka limfocytowa z komórek B (CLL) jest głównie charakteryzowana jako klonalne zaburzenie limfocytów B. We wcześniejszych doniesieniach wykazano, że całkowita liczba MP w CLL była znacznie wyższa niż u zdrowych osób. Wykazano także, że w CLL, MP aktywują kinazę białkową B (AKT) w komórkach zrębu szpiku kostnego CLL [112, 114].

Wyniki uzyskane przez Roś i wsp. wskazują na zaburzenia hemostazy u pacjentów z ET [123]. Znamienne wydłużony był czas APTT i podwyższona liczba płytek krwi. W badaniach własnych liczba płytek krwi była także istotnie statystycznie wyższa w odniesieniu do grupy kontrolnej, natomiast czas APTT był wydłużony jednak bez znamienności statystycznej, za to statystycznie istotnie przedłużony był czas protrombinowy. Zarówno w cytowanej pracy jak i w badaniach własnych obserwowane było podwyższone stężenie kompleksów TAT wskazujące na zwiększoną trombinogenezę. Podobnie zgodne są również obserwacje wyższych stężeń kompleksów PAP w odniesieniu do grupy kontrolnej. W przebiegu ET oraz PV Falanga i wsp. [126] a także Arellano-Rodrigo i wsp. [127] zaobserwowali wzrost stężenia D-dimerów oraz kompleksów trombina-antytrombina. Badania własne są zgodne z obserwacjami innych autorów w tych jednostkach chorobowych. Z dużą ostrożnością należy interpretować wyniki badań układu krzepnięcia krwi u chorych na czerwienicę. Czynnikiem, który może mieć istotny wpływ na wyniki badań jest wysoki hematokryt. Dostępne są doniesienia przedstawiające analizę porównawczą badań próbek pacjentów z podwyższonym hematokrytem, określanym jako wyższy niż 55-62% [128,129]. Mierzone czasy krzepnięcia (PT i APTT) okazały się statystycznie istotnie dłuższe, co może być tłumaczone rozcieńczeniem próbki przez roztwór antykoagulantu w próbówce, aczkolwiek nie przekładało się na kliniczne implikacje [128, 129]. Według Silva i wsp. nie ma wskazań do dostosowywania zawartości antykoagulantu w próbkach do badań pacjentów z PV,

u których hematokryt nie przekracza 62% [129]. Z kolei wg Marlar i wsp. taka korekta stężenia cytrynianu powinna być dokonywana już przy hematokrycie powyżej 55% [128]. W niniejszym badaniu wykonywaliśmy badania hemostazy stosując standardową metodę oznaczania z użyciem automatycznego koagulometru oraz probówek systemu zamkniętego, z dodatkiem roztworu cytrynianu sodu o stężeniu 3,2%. Stąd też stwierdzone wydłużenie APTT oraz podwyższone stężenie fibrynogenu należy analizować z większą ostrożnością. Znane są doniesienia wskazujące na wydłużenie czasu PT oraz APTT u chorych na szpiczaka mnogiego [124]. W badaniach własnych również obserwowano było wydłużenie tych czasów krzepnięcia jednakże różnice nie osiągnęły znamienności statystycznej. Jednym z możliwych czynników wpływających na brak uzyskania tej istotności może być względnie mała liczebność grupy w badaniach. Zarówno w badaniach własnych jak i w opracowaniu Gogia i wsp. zaobserwowano został znamienny statystycznie wzrost stężenia D-dimerów [124]. U chorych z AML wykonane badania wykazały wydłużenie czasów PT i APTT oraz istotny statystycznie wzrost stężenia D-dimerów. Analogiczne wyniki były już publikowane, a zaobserwowane wydłużenie PT i wzrost stężenia D-dimerów uznano za istotny marker predykcyjny [125].

Chociaż mikrocząstki krwi po raz pierwszy opisano ponad trzy dekady temu, nie ma jeszcze zgody co do ich dokładnej definicji i roli patofizjologicznej. Odnotowano rosnące zainteresowanie pochodzącymi z komórek krwi i śródbłonka mikrocząstkami, a badania wykazały ich kluczową rolę w odpowiedziach hemostatycznych i zapalnych, a także ich potencjał jako markerów choroby [121, 122]. W zakresie diagnostyki, pobierania i oznaczania mikrocząstek problematyczny jest fakt braku standaryzacji pobrania, przetwarzania, wirowania, przechowywania i oznaczania. Wieloetapowe ultrawirowanie i cytometria przepływowa są najczęściej stosowanymi technikami ich izolacji i identyfikacji. Ultrawirowanie jest najpowszechniejszą metodą izolacji MP z osocza lub surowicy [115-117]. Ze względu na swoją wielkość, MP mogą tworzyć osad (pellet komórkowy) na dnie próbówki po zastosowaniu dużej siły odśrodkowej [118-120].

Na przestrzeni lat opublikowano różne sposoby postępowania, wciąż jednak jest pole do rozszerzania wiedzy w tym zakresie oraz analizowania porównawczo poszczególnych metod przygotowania i pobrania próbki, co pozwoliłoby na większą standaryzację oznaczeń, umożliwiającą większą porównywalność wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach. Bazując na własnych doświadczeniach oraz aktualnie dostępnej literaturze wybrana została izolacja MP poprzez kilkietapowe wirowanie z zastosowaniem ultrawirówki. Dotychczas

przeprowadzane analizy porównawcze wykazują, że jest to metoda dość prosta i szybka a dająca zadowalające efekty przy identyfikacji MP z zastosowaniem cytometrii przepływowej.

Niemniej jednak procesy tworzenia MP są obecnie coraz lepiej poznane i coraz częściej uznaje się, że MP mogą stanowić markery aktywności choroby. Ponadto dokonuje się postęp w zrozumieniu etapów uzyskiwania składników krwi, które mogą indukować uwolnienie MP, których przetoczenie wraz ze składnikiem krwi może mieć wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo transfuzji. Przyszłe badania pomogą określić rolę subpopulacji MP w chorobach zapalnych. Wiedza ta może stymulować rozwój nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na uwalnianie lub działanie MP. Mikropęcherzyki, które obejmują mikrocząstki i egzosomy, służą jako „nośnik” lub transporter, który przenosi cząsteczki regulatorowe między komórkami w stanach fizjologicznych i patologicznych, a zatem odgrywa kluczową rolę w zakrzepicy, zapaleniu, angiogenezie i dysfunkcji naczyniowej, która wpływa na rokowanie w różnych zaburzeniach hematologicznych. Stan nadkrzepliwości związany z zaburzeniami hematologicznymi może być częściowo uzależniony od wzrostu całkowitej liczby MP. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe są również zaangażowane w procesy angiogenne, które mogą odgrywać znaczącą rolę w komunikacji mikrośrodowiska szpiku kostnego i mogą wpływać na przeżycie bądź apoptozę komórek w odległych narządach, takich jak śledziona i wątroba w nowotworach hematologicznych. Te mikropęcherzyki wpływają również na procesy przerzutowe i rozwój oporności wielolekowej.

Biorąc pod uwagę złożoność funkcji, jaką mogą odgrywać mikrocząstki, nadal pozostaje kwestią sporną, czy są one przyczyną czy konsekwencją, aktywnymi czy biernymi uczestnikami. Niemniej jednak mikrocząstki pełniące rolę niezwykle „czujników” biologicznych są bardzo atrakcyjnymi obiektami badawczymi, które mogą znaleźć zastosowanie w spersonalizowanych strategiach terapeutycznych.

6. WNIOSKI

- 6.1. Choroby rozrostowe krwi stymulują uwalnianie mikrocząstek z komórek krwi i śródbłonna.
- 6.2. Liczba uwalnianych mikrocząstek w chorobach rozrostowych zależy między innymi od liczby komórek krwi w osoczu.
- 6.3. W chorobach rozrostowych krwi najczęściej mikrocząstek jest uwalnianych z komórek, których dotyczy rozrost nowotworowy.
- 6.4. Choroby rozrostowe krwi takie jak czerwienica prawdziwa, nadpłytkowość samoistna, przewlekła białaczka limfocytowa, ostra białaczka mieloblastyczna i szpiczak mnogi indukują zaburzenia układu hemostazy.

7. STRESZCZENIE

7.1. WSTĘP

Mikrocząstki błon komórkowych to kuliste, małe struktury uwalniane z błon biologicznych wielu rodzajów komórek pod wpływem czynników fizjologicznych jak i patologicznych. Mikrocząstki mają wielkość ok. 0,1-1,0 μm i są zbudowane z fragmentów komórek macierzystych zawierających białka błonowe oraz część zawartości cytoplazmatycznej i jądrowej. Mikrocząstki nie mają jądra komórkowego, ale na swojej powierzchni posiadają antygeny charakterystyczne dla komórek, z których powstały. W związku z różną aktywnością mikrocząstek błon komórkowych i ich podwyższonym stężeniem w przebiegu wielu chorób, wydaje się, że mikrocząstki mogą mieć istotny potencjał diagnostyczny, jak również badanie ich liczby może być wykorzystywane w celu monitorowania stanu pacjenta. Celem pracy było określenie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonka oraz ich korelacji z wybranymi markerami układu hemostazy u pacjentów z wybranymi chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego przed rozpoczęciem leczenia.

7.2. MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań była krew żylna pobrana w dniu przyjęcia pacjentów do Kliniki Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wykonane zostały oznaczenia morfologii krwi obwodowej, analiza parametrów układu hemostazy (PT, APTT, stężenie fibrynogenu oraz D-dimerów, PAP, TAT, F1+2) oraz określenie liczby mikrocząstek pochodzących z komórek krwi i śródbłonka. Wyodrębnionych zostało 5 grup badanych. Pięćdziesięciu sześciu (56) pacjentów podzielono zgodnie z rozpoznaniem choroby: pacjenci z PV (n=12), ET (n=10), CLL (n=17), AML (n=11), MM (n=6). Morfologię krwi obwodowej oznaczano przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego. PT, APTT, stężenie fibrynogenu oraz D-dimerów oznaczono przy użyciu automatycznych analizatorów. Oznaczenie kompleksów TAT, PAP i F1+2 oznaczono z zastosowaniem testów ELISA. Liczba MP pochodzenia płytkowego, leukocytarnego, erytrocytarnego oraz śródbłonkowego mierzona była metodą fluorescencji bezpośredniej z wykorzystaniem cytometru przepływowego z zastosowaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych charakterystycznych dla poszczególnych rodzajów mikrocząstek: anti-CD42b dla PMP, anti-CD45 dla LMP, anti-CD235 dla ErMP oraz anti-CD144 dla EndMP.

7.3. WYNIKI

Odnotowano istotne statystycznie wydłużenie czasu PT w przebiegu ET oraz AML a także APTT w przebiegu PV i AML. Stężenie fibrynogenu było znamienne statystycznie wyższe u pacjentów chorych na PV oraz CLL. Istotny statystycznie wzrost stężenia D-dimerów zaobserwowano w grupach badanych z PV, CLL, AML oraz MM. Stężenie kompleksów TAT było większe u chorych z rozpoznaniem PV oraz ET, stężenie PAP było podwyższone u chorych na PV, CLL, MM a stężenie F1+2 było niższe niż w grupie kontrolnej w przebiegu ET oraz AML. We wszystkich badanych jednostkach chorobowych wykazano istotny statystycznie wzrost ilości wszystkich badanych typów mikrocząstek w odniesieniu do grupy kontrolnej. W przypadku PV obserwowano znacznie zwiększoną ilość ErMP, natomiast w ET stwierdzono dominujący wzrost PMP w stosunku do pozostałych populacji mikrocząstek. W grupach CLL, AML oraz MM zaobserwowano wzrost mikrocząstek pochodzących ze wszystkich badanych komórek, przy czym największy odsetek procentowy stanowiły ErMP. Analiza korelacji wykazała, że w przebiegu PV wzrost całkowitej liczby mikrocząstek koreluje z wydłużeniem APTT i z obniżeniem stężenia fibrynogenu. W przypadku ET wraz ze wzrostem liczby MP zauważalne było skrócenie APTT i wzrost stężenia D-dimerów. W przebiegu CLL widoczna była silna korelacja pozytywna liczby mikrocząstek i wydłużenia PT. Zaobserwowano dodatnią korelację liczby EndMP i PT oraz ujemną korelację EndMP i stężenia fibrynogenu. Zaobserwowano dodatnią korelację między liczbą PMP a PCT. Zaobserwowano istotne statystycznie dodatnie korelacje między PMP a PLT u pacjentów z rozpoznaniem PV oraz ET. W przypadku zależności LMP i WBC, widoczna jest dodatnia korelacja w PV i ujemna korelacja w przebiegu MM. Widoczna jest dodatnia korelacja PLT i PMP ($r=0,59$, $p<0,05$). Widoczna jest dodatnia korelacja między zsumowaną liczbą MP a całkowitą liczbą wszystkich komórek krwi ($r=0,88$, $p<0,05$).

7.4. WNIOSKI

Choroby rozrostowe krwi stymulują uwalnianie mikrocząstek z komórek krwi i śródbłonna. Liczba uwalnianych mikrocząstek w chorobach rozrostowych zależy między innymi od liczby komórek krwi w osoczu. W chorobach rozrostowych krwi najwięcej mikrocząstek jest uwalnianych z komórek, których dotyczy rozrost nowotworowy. Choroby rozrostowe krwi indukują zaburzenia układu hemostazy.

SUMMARY

7.1. INTRODUCTION

Cell membrane microparticles are spherical, small structures released from biological membranes of many types of cells under the influence of physiological and pathological factors. The microparticles are about 0.1-1.0 μm in size and are composed of fragments of stem cells containing membrane proteins and part of the cytoplasmic and nuclear content. Microparticles do not have a cell nucleus, but on their surface they have antigens characteristic of the cells of origin. Due to the different activity of cell membrane microparticles and their increased concentration in the course of many diseases, it seems that microparticles may have a significant diagnostic potential, and the examination of their number may be used to monitor the patient's condition. The aim of the study was to determine the number of microparticles derived from blood and endothelial cells and their correlation with selected markers of the haemostatic system in patients with selected haematopoietic malignancies before treatment.

7.2. MATERIAL AND METHODS

The material for the research was venous blood collected on the day of admission of patients to the Department of Hematology of the Medical University in Białystok. Peripheral blood counts, analysis of hemostatic system parameters (PT, APTT, concentration of fibrinogen, D-dimers, PAP, TAT and F1+2) and determination of the number of microparticles from blood cells and endothelium were performed. Five groups of respondents were distinguished. Fifty-six (56) patients were classified according to disease diagnosis: patients with PV (n = 12), ET (n = 10), CLL (n = 17), AML (n = 11), MM (n = 6). Blood morphology was measured using an automatic hematology analyzer. PT, APTT, concentration of fibrinogen and D-dimers were determined using automatic analyzers. Determination of the TAT, PAP and F1+2 complexes was determined using ELISA tests. The number of MPs of platelet, leukocyte, erythrocyte and endothelial origin was measured by direct fluorescence using a flow cytometer using specific monoclonal antibodies characteristic for individual types of microparticles: anti-CD42b for PMP, anti-CD45 for LMP, anti-CD235 for ErMP and anti-CD144 for EndMP.

7.3. RESULTS

There was a statistically significant increase in PT in the course of ET and AML, as well as in APTT in the course of PV and AML. The concentration of fibrinogen was statistically significantly higher in patients with PV and CLL. A statistically significant increase in the concentration of D-dimers was observed in the groups of subjects with PV, CLL, AML and MM. The concentration of TAT complexes was higher in patients diagnosed with PV and ET, the concentration of PAP was increased in patients with PV, CLL, MM, and the concentration of F1+2 was lower than in the control group in the course of ET and AML. In all investigated diseases, a statistically significant increase in the amount of all investigated types of microparticles in relation to the control group was demonstrated. In the case of PV, a significantly increased amount of ErMP was observed, while in ET, a dominant increase in PMP was found in relation to the remaining populations of microparticles. In CLL, AML and MM groups, an increase in microparticles from all tested cells was observed, with ErMP constituting the highest percentage. Correlation analysis showed that in the course of PV, an increase in the total number of microparticles correlates with an increase in APTT and a decrease in fibrinogen concentration. In the case of ET, along with the increase in the number of MPs, a shortening of APTT and an increase in D-dimer concentration were noticeable. There was a strong positive correlation between the number of microparticles and PT elongation in the course of CLL. A positive correlation between the number of EndMP and PT was observed, and a negative correlation between EndMP and the concentration of fibrinogen. A positive correlation was observed between the number of PMP and PCT. Statistically significant positive correlations between PMP and PLT were observed in patients diagnosed with PV and ET. In the case of the relationship between LMP and WBC, there is a positive correlation in PV and a negative correlation in the course of MM. There is a positive correlation between PLT and PMP ($r = 0.59$, $p < 0.05$). There is a positive correlation between the number of MPs and the total number of all blood cells ($r = 0.88$, $p < 0.05$).

7.4. CONCLUSIONS

Haematological malignancies stimulate the release of microparticles from blood cells and endothelium. The number of microparticles released in proliferative diseases may depend on the number of blood cells in the plasma. In haematological malignancies, most microparticles are released from cells affected by neoplastic growth. Haematological malignancies induce disturbances in the hemostatic system.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Gould, S.J. i wsp., *As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2013. 2.
2. Gyorgy, B., i wsp., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68(16): p. 2667-88.
3. Hess, C., i wsp., *Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units*. J Immunol, 1999. 163(8): p. 4564-73.
4. Holme, P.A., i wsp., *Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting*. Thromb Haemost, 1994. 72(5): p. 666-71.
5. Raposo, G. i wsp., *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. 200(4): p. 373-83.
6. Trams, E.G., i wsp., *Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of microvesicles*. Biochim Biophys Acta, 1981. 645(1): p. 63-70.
7. Zaborowski, M.P., i wsp., *Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study*. Bioscience, 2015. 65(8): p. 783-797.
8. Cocucci, E., i wsp., *Shedding microvesicles: artefacts no more*. Trends Cell Biol, 2009. 19(2): p. 43-51.
9. Wolf, P., *The nature and significance of platelet products in human plasma*. Br J Haematol, 1967. 13(3): p. 269-88.
10. Johnstone, R.M., i wsp., *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J Biol Chem, 1987. 262(19): p. 9412-20.
11. Kim, D.K., i wsp., *EVpedia: A community web resource for prokaryotic and eukaryotic extracellular vesicles research*. Semin Cell Dev Biol, 2015. 40: p. 4-7.
12. Devaux, P.F., i wsp., *How lipid flippases can modulate membrane structure*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1778(7-8): p. 1591-600.
13. Bevers, E.M. i wsp., *Phospholipid scramblase: an update*. FEBS Lett, 2010. 584(13): p. 2724-30.
14. Bevers, E.M., i wsp., *Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1439(3): p. 317-30.
15. Żmigrodzka, M., i wsp., *The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression*. Tumour Biol, 2016. 37(11): p. 14391-14401.
16. Lang, F., i wsp., *Eryptosis, a window to systemic disease*. Cell Physiol Biochem, 2008. 22(5-6): p. 373-80.
17. Tissot, J.D., *Blood microvesicles: From proteomics to physiology*. Translational Proteomics, 2013. 1(1): p. 38 - 52.
18. Nguyen, D.B., i wsp., *Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. 28(5): p. 847-56.
19. Daleke, D.L., *Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane*. Curr Opin Hematol, 2008. 15(3): p. 191-5.
20. Daleke, D.L., *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. J Lipid Res, 2003. 44(2): p. 233-42.
21. Gonzalez, L.J., i wsp., *The influence of membrane physical properties on microvesicle release in human erythrocytes*. PMC Biophysics, 2009. 2(1): p. 7.
22. Kalra, H., i wsp., *Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing*. Int J Mol Sci, 2016. 17(2): p. 170.

23. Ratajczak, J., i wsp., *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication*. *Leukemia*, 2006. 20(9): p. 1487-95.
24. Kanada, M., i wsp., *Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(12): p. E1433-42.
25. Freyssinet, J.M. i wsp., *Formation of procoagulant microparticles and properties*. *Thromb Res*, 2010. 125 Suppl 1: p. S46-8.
26. Frydrychowicz, M., i wsp., *Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer*. *Scand J Immunol*, 2015. 81(1): p. 2-10.
27. Lee, Y., i wsp., *Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy*. *Hum Mol Genet*, 2012. 21(R1): p. R125-34.
28. Horstman, L.L. i wsp., *Platelet microparticles: a wide-angle perspective*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999. 30(2): p. 111-42.
29. Flaumenhaft, R., *Formation and fate of platelet microparticles*. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. 36(2): p. 182-7.
30. Nguyen, D.B., i wsp., *Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells*. *Cell Physiol Biochem*, 2016. 38(3): p. 1085-99.
31. Inal, J.M., i wsp., *Blood/plasma secretome and microvesicles*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1834(11): p. 2317-25.
32. Foller, M., i wsp., *Erythrocyte programmed cell death*. *IUBMB Life*, 2008. 60(10): p. 661-8.
33. Yanez-Mo, M., i wsp., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. *J Extracell Vesicles*, 2015. 4: p. 27066.
34. Raposo, G., i wsp., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. *J Exp Med*, 1996. 183(3): p. 1161-72.
35. Alchinova, I., i wsp., *Comparison of the size of membrane microparticles of different cellular origin by dynamic light scattering*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2016. 470: p. 322-325.
36. Wu, Z.H., i wsp., *Membrane microparticles and diseases*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013. 17(18): p. 2420-7.
37. Wu, Y.W., i wsp., *Smart blood cell and microvesicle-based Trojan horse drug delivery: Merging expertise in blood transfusion and biomedical engineering in the field of nanomedicine*. *Transfus Apher Sci*, 2016. 54(2): p. 309-18.
38. Al-Nedawi, K., i wsp., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(5): p. 619-24.
39. Zhou, W., i wsp., *Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis*. *Cancer Cell*, 2014. 25(4): p. 501-15.
40. Kim, H.K., i wsp., *Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor*. *Eur J Cancer*, 2003. 39(2): p. 184-91.
41. Steffen, P., i wsp., *Stimulation of human red blood cells leads to Ca²⁺-mediated intercellular adhesion*. *Cell Calcium*, 2011. 50(1): p. 54-61.
42. Kaestner, L., i wsp., *Lysophosphatidic acid induced red blood cell aggregation in vitro*. *Bioelectrochemistry*, 2012. 87: p. 89-95.
43. Levin, G., i wsp., *Impact of microparticles derived from erythrocytes on fibrinolysis*. *J Thromb Thrombolysis*, 2016. 41(3): p. 452-8.
44. Iraci, N., i wsp., *Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles*. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(2): p. 171.

45. Jayachandran, M., i wsp., *Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood*. J Immunol Methods, 2012. 375(1-2): p. 207-14.
46. Kong, F., i wsp., *Impact of collection, isolation and storage methodology of circulating microvesicles on flow cytometric analysis*. Exp Ther Med, 2015. 10(6): p. 2093-2101.
47. Wisgrill, L., i wsp., *Peripheral blood microvesicles secretion is influenced by storage time, temperature, and anticoagulants*. Cytometry A, 2016. 89(7): p. 663-72.
48. Alvarez-Erviti, L., i wsp., *Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes*. Nat Biotechnol, 2011. 29(4): p. 341-5.
49. Balazs, D.A. i wsp., *Liposomes for use in gene delivery*. J Drug Deliv, 2011. 2011: p. 326497.
50. van der Meel, R., i wsp., *Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field*. J Control Release, 2014. 195: p. 72-85.
51. Kotmakci, M. i wsp., *Extracellular Vesicles as Natural Nanosized Delivery Systems for Small-Molecule Drugs and Genetic Material: Steps towards the Future Nanomedicines*. J Pharm Pharm Sci, 2015. 18(3): p. 396-413.
52. Yuan, A., i wsp., *Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles*. PLoS One, 2009. 4(3): p. e4722.
53. van Dommelen, S.M., i wsp., *Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery*. J Control Release, 2012. 161(2): p. 635-44.
54. Tian, Y., i wsp., *A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy*. Biomaterials, 2014. 35(7): p. 2383-90.
55. Lener, T., i wsp., *Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper*. J Extracell Vesicles, 2015. 4: p. 30087.
56. Sun, D., i wsp., *A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes*. Mol Ther, 2010. 18(9): p. 1606-14.
57. Rajendran, L., i wsp., *Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(30): p. 11172-7.
58. Vella, L.J., i wsp., *The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases*. Eur Biophys J, 2008. 37(3): p. 323-32.
59. Buzas, E.I., i wsp., *Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2014. 10(6): p. 356-64.
60. Osteikoetxea, X., i wsp., *Extracellular vesicles in cardiovascular disease: are they Jedi or Sith?* J Physiol, 2016. 594(11): p. 2881-94.
61. Skog, J., i wsp., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. 10(12): p. 1470-6.
62. Al-Nedawi, K., i wsp., *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(10): p. 3794-9.
63. Nawaz, M., i wsp., *Microvesicles in Gliomas and Medulloblastomas: An Overview*. Journal of Cancer Therapy, 2014. 5: p. 182-191.
64. Fatima, F. i wsp., *Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy*. Chin J Cancer, 2015. 34(12): p. 541-53.
65. Schwab, A., i wsp., *Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis*. Front Microbiol, 2015. 6: p. 1132.

66. Fatima, F. i wsp., *Nexus between extracellular vesicles, immunomodulation and tissue remodeling: for good or for bad?*, in *Ann Transl Med.* 2017. p. 139.
67. Nawaz, M., i wsp., *Extracellular vesicles in ovarian cancer: applications to tumor biology, immunotherapy and biomarker discovery.* *Expert Rev Proteomics*, 2016. 13(4): p. 395-409.
68. Nawaz, M., i wsp., *Extracellular Vesicles: Evolving Factors in Stem Cell Biology.* *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 1073140.
69. Fatima, F. i wsp., *Vesiculated Long Non-Coding RNAs: Offshore Packages Deciphering Trans-Regulation between Cells, Cancer Progression and Resistance to Therapies.* *Noncoding RNA*, 2017. 3(1).
70. Peinado, H., i wsp., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.* *Nat Med*, 2012. 18(6): p. 883-91.
71. Balaj, L., i wsp., *Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences.* *Nat Commun*, 2011. 2: p. 180.
72. Morello, M., i wsp., *Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA.* *Cell Cycle*, 2013. 12(22): p. 3526-36.
73. Nawaz, M., i wsp., *The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers.* *Nat Rev Urol*, 2014. 11(12): p. 688-701.
74. Graves, L.E., i wsp., *Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles.* *Cancer Res*, 2004. 64(19): p. 7045-9.
75. Rank, A., i wsp., *Circulating microparticles in patients with benign and malignant ovarian tumors.* *Anticancer Res*, 2012. 32(5): p. 2009-14.
76. Sims, P.J., 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(29): p. 17049-57.
77. 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.* *Transfus Med Rev*, 1996. 10(4): p. 249-58.
78. Reid, V.L. i wsp., *Role of microparticles in sepsis.* *Br J Anaesth*, 2012. 109(4): p. 503-13.
79. Sabatier, F., i wsp., *Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles.* *Diabetes*, 2002. 51(9): p. 2840-5.
80. Chou, M., i wsp., *Nanofiltration to remove microparticles and decrease the thrombogenicity of plasma: In vitro feasibility assessment.* *Transfusion*, 2015. 55: p. 2433-2444.
81. Jimenez, J.J., i wsp., *Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease.* *Br J Haematol*, 2001. 112(1): p. 81-90.
82. Hugel, B., i wsp., *Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia.* *Blood*, 1999. 93(10): p. 3451-6.
83. Simak, J., i wsp., *Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.* *Br J Haematol*, 2004. 125(6): p. 804-13.
84. Shet, A.S., i wsp., *Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes.* *Blood*, 2003. 102(7): p. 2678-83.
85. Pihusch, R., i wsp., *Platelet flow cytometric findings in patients undergoing conditioning therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* *Ann Hematol*, 2002. 81(8): p. 454-61.

86. Pihusch, R., i wsp., *Flow cytometric findings in platelets of patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2002. 30(6): p. 381-7.
87. Jy, W., i wsp., *Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias*. J Lab Clin Med, 1992. 119(4): p. 334-45.
88. Satta, N., 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(7): p. 3245-55.
89. Barry, O.P., i wsp., *Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles*. J Clin Invest, 1998. 102(1): p. 136-44.
90. Szczepanski, M.J., i wsp., *Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1*. Haematologica, 2011. 96(9): p. 1302-9.
91. Tzoran, I., i wsp., *Disease dynamics in patients with acute myeloid leukemia: new biomarkers*. Exp Hematol, 2015. 43(11): p. 936-43.
92. Ghosh, A.K., i wsp., *Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression*. Blood, 2010. 115(9): p. 1755-64.
93. Tsai, W.H., i wsp., *CX3CL1(+) Microparticles Mediate the Chemoattraction of Alveolar Macrophages toward Apoptotic Acute Promyelocytic Leukemic Cells*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2014. 33(3): p. 594-604.
94. Benameur, T., i wsp., *Plasma cells release membrane microparticles in a mouse model of multiple myeloma*. Micron, 2013. 54-55: p. 75-81.
95. Ma, G., i wsp., *Increased promyelocytic-derived microparticles: a novel potential factor for coagulopathy in acute promyelocytic leukemia*. Ann Hematol, 2013. 92(5): p. 645-52.
96. Gheldof, D., i wsp., *Microparticle bearing tissue factor: a link between promyelocytic cells and hypercoagulable state*. Thromb Res, 2014. 133(3): p. 433-9.
97. Hultcrantz, M., i wsp., *Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study*. J Clin Oncol. 2015. 33(20):2288–95.
98. Borowczyk, M., i wsp., *The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms*. Thromb Res. 2015. 135(2):272–80.
99. Imai, M., i wsp., *Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms*. Int J Hematol. 2017. 105(6):743–7.
100. Ma, W., i wsp., *MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders*. Diagn Mol Pathol. 2011. 20(1):34–9.
101. Kim, SY., i wsp., *CALR, JAK2, and MPL mutation profiles in patients with four different subtypes of myeloproliferative neoplasms: primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myeloproliferative neoplasm, unclassifiable*. Am J Clin Pathol. 2015. 143(5):635–44.
102. Casini, A., i wsp., *Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: risk assessment and risk-guided management*. J Thromb Haemost. 2013. 11(7):1215–27.
103. Barbui, T., *How to manage thrombosis in myeloproliferative neoplasms*. Curr Opin Oncol. 2011. 23(6):654–8.
104. Mallat, Z., i wsp., *Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes*. Circulation 2000. 101(8):841–43.

105. Morel, O., i wsp., *Sustained elevated amounts of circulating procoagulant membrane microparticles and soluble GPV after acute myocardial infarction in diabetes mellitus*. Thromb Haemost. 2004. 91(2):345–53.
106. Taniguchi, Y., I wsp. *Elevated plasma levels of procoagulant microparticles are a novel risk factor for thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms*. Int J Hematol. 2017. 106(5):691-703.
107. Matijevic, N., i wsp., *Multiple levels of degradation diminish hemostatic potential of thawed plasma*. J Trauma 2011. 70 p. 71-79
108. Sinauridze, E.I., i wsp., *Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets*. Thromb Haemost. 2007. 97 p. 425-434
109. Ku, GH., I wsp. *Venous thromboembolism in patients with acute leukemia: incidence, risk factors, and effect on survival*. Blood 2009. 113:3911–7.
110. Van Aalderen, MC., i wsp., *Procoagulant myeloblast-derived microparticles in AML patients: changes in numbers and thrombin generation potential during chemotherapy*. J Thromb Haemost. 2011. 9:223–6.
111. Tzoran, I., i wsp., *Disease dynamics in patients with acute myeloid leukemia: new biomarkers*. Exp Hematol. 2015. 43:936–43.
112. Ghosh, AK., i wsp., *Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression*. Blood 2010. 115:1755–64.
113. Hong, C.S., i wsp., *Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia*. Front. Immunol. 2014. 5, 160.
114. Caligaris-Cappio, F., *Biology of chronic lymphocytic leukemia*. Rev Clin Exp Hematol. 2000. 4:5–21.
115. George, JN., i wsp., *Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum*. Blood 1982. 60(4):834–40
116. Dinkla, S., I wsp., *Gateway to understanding microparticles: standardized isolation and identification of plasma membrane-derived vesicles*. Nanomedicine (Lond). 2013. 8(10):1657–68.
117. Shet, AS., *Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes*. Blood 2003. 102(7): 2678–83.
118. Muller, L., i wsp., *Isolation of biologically-active exosomes from human plasma*. J. Immunol. Methods 2014. 411, 55–65.
119. Rosa-Fernandes, L., I wsp., *A Perspective on Extracellular Vesicles Proteomics*. Front Chem. 2017. 5, 102.
120. Kang, H., I wsp., *Methods to isolate extracellular vesicles for diagnosis*. Micro Nano Syst. Lett. 2017. 5, 15.
121. Poncelet, P., i wsp. *Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles* Transfus Apher Sci, 2015. 53 (2), pp. 110-126
122. Amiral, J., i wsp., *The diagnostic usefulness of capture assays for measuring global/specific extracellular microparticles in plasma* Transfus Apher Sci. 2015. 53 (2) pp. 127-136
123. Rość, D., i wsp., *Zaburzenia hemostazy w nadpłytkowości samoistnej [Haemostatic disturbances in essential thrombocytosis]*. Przegl Lek. 2007. 64(3):121-3.
124. Gogia, A., i wsp., *Hemostatic Abnormalities in Multiple Myeloma Patients*. Asian Pac J Cancer Prev. 2018. 19(1):127-130.
125. Lad ,DP., i wsp., *Complications and management of coagulation disorders in leukemia patients*. Blood Lymphat Cancer 2017. 7:61-72

126. Falanga, A., i wsp., *Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera*. *Blood* 2000. 15;96(13):4261-6.
127. Arellano-Rodrigo, E., i wsp., *Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden*. *Am J Hematol.* 2009. 84(2):102-8.
128. Owens, AP., i wsp., *Microparticles in hemostasis and thrombosis*. *Circ Res.* 2011. 108(10):1284-1297.
129. Mooberry, MJ., i wsp., *Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis*. *Cytometry A.* 2016. 89(2):111-122.
130. Nomura, S., i wsp., *Clinical significance of procoagulant microparticles*. *J Intensive Care* 2015. 3, 2