



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Stacjonarne Studia Doktoranckie

Biochemiczno-Biofizyczne

## **Angela Dzedzic**

NUMER ALBUMU: 5771

### **Molekularne mechanizmy wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w stwardnieniu rozsianym**

The molecular mechanisms of increased platelet pro-thrombotic activity of blood platelets in multiple sclerosis

Praca doktorska  
wykonana w Katedrze  
Biochemii Ogólnej  
Instytutu Biochemii  
Uniwersytetu Łódzkiego

Promotor:  
prof. dr hab. Joanna Saluk-Bijak

## SPIS TREŚCI

### CZEŚĆ TEORETYCZNA

<b>1. Ogólna charakterystyka płytek krwi.....</b>	<b>9</b>
1.1. Budowa płytek krwi.....	9
1.2. Ziarnistości płytek krwi.....	9
1.3. Receptory płytkowe.....	11
<b>2. Megakariocyty i powstawanie płytek krwi.....</b>	<b>15</b>
2.1. Charakterystyka megakariocytów.....	15
2.2. Powstawanie płytek krwi.....	15
<b>3. Cytoszkielek płytek krwi.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Markery aktywacji płytek krwi.....</b>	<b>23</b>
<b>5. Metoda cytometrii przepływowej w analizie płytek krwi.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Płytki krwi w chorobach neurodegeneracyjnych.....</b>	<b>30</b>
6.1. Pro-zakrzepowa aktywność płytek krwi w stwardnieniu rozsianym.....	30
6.2. Dysfunkcja mitochondriów w płytkach krwi.....	32
6.3. Płytkowe miRNA.....	34

### CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

<b>1. Uzasadnienie podjęcia tematu.....</b>	<b>37</b>
<b>2. Cel pracy.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Materiały i metody.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Materiały.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2. Metody.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1. Metody preparatywne.....</b>	<b>44</b>
3.2.1.1. Izolowanie płytek krwi metodą filtracji żelowej na złożu Sepharose 2B-BSA.....	44
3.2.1.2. Izolowanie płytek krwi metodą wirowania różnicowego.....	46
3.2.1.3. Izolowanie megakariocytów metodą separacji magnetycznej.....	47
3.2.1.4. Izolacja całkowitego RNA z płytek krwi i z megakariocytów.....	49
3.2.1.5. Synteza cDNA na matrycy mRNA.....	51
3.2.1.6. Synteza mikro cDNA na matrycy miRNA.....	52
3.2.1.7. Izolacja DNA z krwi pełnej.....	55
<b>3.2.2. Metody analityczne.....</b>	<b>58</b>
3.2.2.1. Analiza czynnościowa płytek krwi metodą cytometrii przepływowej.....	58
3.2.2.2. Cytofluorymetryczna ocena stopnia reaktywności płytkowego receptora P2Y <sub>12</sub> poprzez pomiar fosforylacji białek VASP.....	60
3.2.2.3. Pomiar ekspresji wybranych genów płytkowych na poziomie mRNA za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).....	62
3.2.2.4. Określenie profilu ekspresji miRNA płytek krwi i megakariocytów techniką mikromacierzy.....	65
3.2.2.5. Walidacja poziomu ekspresji wybranych miRNA z użyciem qPCR.....	69
3.2.2.6. Pomiar stężenia receptorów płytkowych, białek cytoszkieletu oraz fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA.....	71
3.2.2.7. Pomiar stężenia fibrynogenu w osoczu metodą ELISA.....	74
3.2.2.8. Identyfikacja potencjalnych PTMs fibrynogenu, $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS/MS).....	75
3.2.2.9. Sekwencjonowanie DNA techniką Illumina.....	79
3.2.2.10. Analiza zmian transbłonowego potencjału mitochondrialnego płytek krwi z zastosowaniem sondy JC-1.....	83
3.2.2.11. Określenie poziomu RFT w płytkach krwi z zastosowaniem sondy H <sub>2</sub> DCF-DA.....	84
3.2.2.12. Analiza statystyczna.....	85

<b>4. Wyniki</b> .....	<b>86</b>
<b>4.1. Ocena stanu czynnościowego płytek krwi</b> .....	<b>86</b>
4.1.1. Określenie stopnia aktywacji płytek krwi w krwi pełnej metodą cytometrii przepływowej ....	86
4.1.2. Pomiar stężenia receptorów P2Y <sub>12</sub> , PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA .....	92
4.1.3. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących P2Y <sub>12</sub> , PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR.....	95
4.1.4. Cytometryczne oznaczenie stopnia reaktywności płytkowego receptora P2Y <sub>12</sub> poprzez pomiar fosforylacji białek VASP .....	98
4.1.5. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących biomarkery miażdżycy w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR.....	100
<b>4.2. Analiza zmian molekularnych fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach</b> .....	<b>102</b>
4.2.1. Pomiar stężenia fibrynogenu w płytkach krwi, megakariocytach oraz w osoczu metodą ELISA .....	104
4.2.2. Oznaczenie poziomu mRNA dla genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -, $\beta$ - oraz $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach .....	106
4.2.3. Identyfikacja potencjalnych PTMs łańcuchów ( $\alpha$ -, $\beta$ - oraz $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS.....	108
4.2.4. Analiza zmian sekwencji genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -, $\beta$ - oraz $\gamma$ -) fibrynogenu .....	120
<b>4.3. Ocena molekularnych zmian <math>\beta</math>-tubuliny i <math>\beta</math>-aktyny, jako kluczowych białek cytoszkieletu płytek krwi i megakariocytów</b> .....	<b>126</b>
4.3.1. Pomiar stężenia $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA..	126
4.3.2. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących $\beta$ -tubulinę oraz $\beta$ -aktynę w płytkach krwi i megakariocytach metodą qPCR.....	128
4.3.3. Identyfikacja potencjalnych PTMs $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS .....	130
4.3.4. Analiza zmian sekwencji genu kodującego $\beta$ -tubulinę.....	135
<b>4.4. Ocena profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach</b> .....	<b>137</b>
4.4.1. Metoda mikromacierzy miRNA.....	137
4.4.2. Walidacja wyników mikromacierzy metodą qPCR.....	140
<b>4.5. Ocena funkcjonalności mitochondriów w płytkach krwi</b> .....	<b>142</b>
4.5.1. Ocena potencjału błony mitochondrialnej płytek krwi z zastosowaniem sondy JC-1 .....	142
4.5.2. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu tlenowego w płytkach krwi metodą qPCR.....	143
4.5.3. Oznaczenie poziomu RFT w płytkach krwi z zastosowaniem sondy H <sub>2</sub> DCF-DA .....	145
<b>5. Dyskusja</b> .....	<b>146</b>
<b>6. Wnioski</b> .....	<b>166</b>
<b>7. Streszczenie</b> .....	<b>167</b>
<b>8. Summary</b> .....	<b>169</b>
<b>9. Piśmiennictwo</b> .....	<b>171</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW:

<b>ABP</b>	(ang. <i>Actin Binding Protein</i> ) – białka związane z filamentami aktynowymi
<b>AC</b>	(ang. <i>Adenylyl Cyclase</i> ) – cyklaza adenylova
<b>ACD-A</b>	(ang. <i>Acid Citrate Dextrose A</i> ) – antykoagulant cytrynian trójsodowy-kwas cytrynowy-glukoza
<b>ADP</b>	(ang. <i>Adenosine Diphosphate</i> ) – adozynodifosforan
<b>AGs</b>	(ang. <i>Aggregates</i> ) – agregaty płytkowe
<b>APs</b>	(ang. <i>Analysed Peptides</i> ) – analizowane peptydy
<b>APC</b>	(ang. <i>Allophycocyanin</i> ) – alofikocyjanina
<b>APCs</b>	(ang. <i>Antigen Presenting Cells</i> ) – komórki prezentujące antygen
<b>ApoA1</b>	(ang. <i>Apolipoprotein A1</i> ) – apolipoproteina A1
<b>APTT</b>	(ang. <i>Activated Partial Thromboplastin Time</i> ) – czas częściowej tromboplastyny po aktywacji
<b>ATP</b>	(ang. <i>Adenosine Triphosphate</i> ) – adozynotrifosforan
<b>BBB</b>	(ang. <i>Brain-Blood Barrier</i> ) – bariera krew-mózg
<b>BDI</b>	(ang. <i>Beck Depression Inventory</i> ) – skala depresji Becka
<b>BMI</b>	(ang. <i>Body Mass Index</i> ) – wskaźnik masy ciała
<b>BSA</b>	(ang. <i>Bovin Serum Albumin</i> ) – surowicza albumina wołowa
<b>cAMP</b>	(ang. <i>cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate</i> ) – cykliczny adozyno-3',5'-monofosforan
<b>CD</b>	(ang. <i>Cluster of Differentiation</i> ) – klaster różnicowania
<b>CD40L</b>	(ang. <i>CD40 ligand</i> ) – ligand dla CD40
<b>Cdk4</b>	(ang. <i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i> ) – kinaza serynowo-treoninowa zależna od cykliny 4
<b>CDL</b>	Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej
<b>cDNA</b>	(ang. <i>Complementary DNA</i> ) – komplementarna nić DNA
<b>cGMP</b>	(ang. <i>cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate</i> ) – cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
<b>CI</b>	(ang. <i>Confidence Interval</i> ) – przedział ufności
<b>CLASP</b>	(ang. <i>CLIP-associating protein</i> )
<b>CLPs</b>	(ang. <i>Common Lymphoid Progenitors</i> ) – limfoidalna linia komórek progenitorowych
<b>CMPs</b>	(ang. <i>Common Myeloid Progenitors</i> ) – mieloidalna linia komórek progenitorowych
<b>CPDA-1</b>	(ang. <i>Citrate Phosphate Dextrose Adenine 1</i> ) – antykoagulant cytrynian-fosforan-dekstroza-adenina1
<b>CRP</b>	(ang. <i>C-Reactive Protein</i> ) – białko C-reaktywne
<b>Ct</b>	(ang. <i>Cycle Threshold</i> ) – cykl progowy
<b>CTAP-III</b>	(ang. <i>Connective Tissue Activating Peptide III</i> ) – peptyd 3 aktywujący tkankę łączną
<b>DCF</b>	(ang. <i>2',7'-dichlorofluorescein</i> ) - 2',7'-dichlorofluoresceina
<b>DMS</b>	(ang. <i>Demarcation Membrane System</i> ) – system błon demarkacyjnych
<b>DNA</b>	(ang. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ) – kwas deoksyrybonukleinowy
<b>dNTPs</b>	(ang. <i>Deoxyribonucleoide Triphosphate</i> ) – trifosforany deoksynukleozydowe
<b>DTT</b>	(ang. <i>Dithiothreitol</i> ) - ditiotreitól
<b>EAE</b>	(ang. <i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i> ) – model zwierzęcy autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego
<b>EB</b>	(ang. <i>End-Binding protein</i> )
<b>ECGF</b>	(ang. <i>Endothelial Cell Growth Factor</i> ) – czynnik wzrostu śródbłónka
<b>EDSS</b>	(ang. <i>Expanded Disability Status Scale</i> ) – rozszerzona skala niewydolności ruchowej
<b>EDTA</b>	(ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> ) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
<b>ELISA</b>	(ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ) – test immunoenzymatyczny
<b>EMPs</b>	(ang. <i>Endothelial Microparticles</i> ) – mikrocząstki śródbłónka
<b>EPO</b>	(ang. <i>Erythropoietin</i> ) – erytropoetyna
<b>ESI</b>	(ang. <i>Electro Spray Ionization</i> ) – elektrorozpylanie
<b>Evh-1</b>	(ang. <i>Ena/VASP-homology-1</i> ) – domena 1 homologii Ena/VASP

<b>FAM</b>	(ang. <i>Fluorescein Amidite</i> ) – amidyna fluoresceiny
<b>FC</b>	(ang. <i>Fold Change</i> ) – krotność zmiany
<b>FDR</b>	(ang. <i>False Discovery Rate</i> ) – współczynnik fałszywych odkryć
<b>FITC</b>	(ang. <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> ) – izotiocyanian fluoresceiny
<b>FL</b>	(ang. <i>Fluorescence</i> ) – fluorescencja
<b>FSC</b>	(ang. <i>Forward Scatter</i> ) – czołowe rozproszenie światła widzialnego
<b>GAPDH</b>	(ang. <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> ) – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
<b>G-CSF</b>	(ang. <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> ) – czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów
<b>GDP</b>	(ang. <i>Guanosine Diphosphate</i> ) – guanozynodifosforan
<b>GMP</b>	(ang. <i>Granule Membrane Protein</i> ) – białko błony ziarnistej
<b>GMPs</b>	(ang. <i>Granulocyte/Macrophage Progenitors</i> ) – komórki prekursorowe granulocytów i makrofagów
<b>GPs</b>	(ang. <i>Glycoproteins</i> ) – glikoproteiny
<b>GPCRs</b>	(ang. <i>G-proteins Coupled Receptors</i> ) – receptory metabotropowe sprzężone z białkami G
<b>GTP</b>	(ang. <i>Guanosine Triphosphate</i> ) – guanozynotrifosforan
<b>H<sub>2</sub>DCF-DA</b>	(ang. <i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> ) – 2',7' diocjanu dihydrodichlorofluoresceiny
<b>HDAC-6</b>	(ang. <i>Histone Deacetylase Family Member 6</i> ) – członek rodziny deacetylaz histonów 6
<b>HG38</b>	(ang. <i>Human Genome build 38</i> ) – baza danych ludzkiego genomu nr 38
<b>HMWK</b>	(ang. <i>High-Molecular-Weight Kininogen</i> ) – wielkocząsteczkowy kininogen
<b>HPLC</b>	(ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
<b>HPR</b>	(ang. <i>High Platelet Reactivity, HPR</i> ) – płytki krwi z wysokim poziomem reaktywności
<b>HRP</b>	(ang. <i>Horseradish Peroxidase</i> ) – peroksydaza chrzanowa
<b>HSCs</b>	(ang. <i>Hematopoietic Stem Cells</i> ) – hematopoetyczne komórki macierzyste
<b>ICAM-2</b>	(ang. <i>Intercellular Adhesion Molecule 2</i> ) – wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna 2
<b>Ig</b>	(ang. <i>Immunoglobulin</i> ) – immunoglobulina
<b>IGF</b>	(ang. <i>Insulin-like Growth Factor</i> ) – insulinopodobny czynnik wzrostu
<b>IL</b>	(ang. <i>Interleukin</i> ) – interleukina
<b>INT</b>	(ang. <i>Signal Intensity</i> ) – intensywność sygnału
<b>IP<sub>3</sub></b>	(ang. <i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate</i> ) – trifosforan inozytolu
<b>JAK-2</b>	(ang. <i>Janus Kinase 2</i> ) – kinaza tyrozynowa JAK-2
<b>LC-MS-MS/MS</b>	(ang. <i>Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry</i> ) – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
<b>LIMP</b>	(ang. <i>Lysosomal Integral Membrane Protein</i> ) – integralne białko lizosomalne
<b>LPR</b>	(ang. <i>Low Platelet Reactivity, HPR</i> ) – płytki krwi z niskim poziomem reaktywności
<b>LTs</b>	(ang. <i>Leukotriens</i> ) – leukotrieny
<b>MAP</b>	(ang. <i>Microtubule-Associated Protein</i> ) – białko związane z mikrotubulami
<b>MAPKs</b>	(ang. <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ) – kinazy białkowe aktywowane mitogenami
<b>MBP</b>	(ang. <i>Myelin Basic Protein</i> ) – zasadowe białko mieliny
<b>MEPs</b>	(ang. <i>Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitors</i> ) – komórki prekursorowe megakariocytów i erytrocytów
<b>MFI</b>	(ang. <i>Mean Fluorescence Intensity</i> ) – średnia intensywność fluorescencji
<b>MFIc</b>	(ang. <i>MFI Corrected</i> ) – skorygowana średnia intensywność fluorescencji
<b>MI</b>	(ang. <i>Myocardial Infarction</i> ) – zawał mięśnia sercowego
<b>miRNA</b>	(ang. <i>microRNA</i> ) – mikroRNA
<b>MMP</b>	(ang. <i>Mitochondrial Membrane Potential</i> ) – potencjał błony mitochondrialnej
<b>MMPs</b>	(ang. <i>Matrix Metalloproteinases</i> ) – metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej
<b>MRI</b>	(ang. <i>Magnetic Resonance Imaging</i> ) – rezonans magnetyczny
<b>mRNA</b>	(ang. <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> ) – matrycowy kwas rybonukleinowy
<b>MS</b>	(ang. <i>Multiple Sclerosis</i> ) – stwardnienie rozsiane
<b>mtDNA</b>	(ang. <i>Mitochondrial DNA</i> ) – mitochondrialny DNA

<b>NAP-2</b>	(ang. <i>Neutrophil Activating Peptide 2</i> ) – peptyd aktywujący neutrofile 2
<b>NGS</b>	(ang. <i>Next Generation Sequencing</i> ) – sekwencjonowanie nowej generacji
<b>NK</b>	(ang. <i>Natural Killer</i> ) – komórki naturalnej cytotoksyczności
<b>NO</b>	(ang. <i>Nitric Oxide</i> ) – tlenek azotu
<b>OB</b>	Odczyn Biernackiego
<b>OCS</b>	(ang. <i>Open Canalicular System</i> ) – otwarty system kanalikowy
<b>OR</b>	(ang. <i>Odds Ratio</i> ) – iloraz szans
<b>OUN</b>	Ośrodkowy układ nerwowy
<b>PAF</b>	(ang. <i>Platelet-Activating Factor</i> ) – czynnik aktywujący płytki
<b>PAI</b>	(ang. <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i> ) – inhibitor aktywatora plazminogenu
<b>PAR</b>	(ang. <i>Protease-Activated Receptor</i> ) – receptor aktywowany przez proteazę
<b>PBMCs</b>	(ang. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ) – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
<b>PBS</b>	(ang. <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ) - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
<b>PDGF</b>	(ang. <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> ) – czynnik wzrostu pochodzący z płytek
<b>PE</b>	(ang. <i>Phycocerythrin</i> ) – fikoerytryna
<b>PerCP</b>	(ang. <i>Peridinin-Chlorophyll-Protein</i> ) – kompleks białek perydyna-chlorofil
<b>PF-4</b>	(ang. <i>Platelet Factor 4</i> ) – czynnik płytkowy 4
<b>PGE1</b>	(ang. <i>Prostaglandin E1</i> ) – prostaglandyna E1
<b>PGIs</b>	(ang. <i>Prostacyclins</i> ) – prostacykliny
<b>PGs</b>	(ang. <i>Prostaglandins</i> ) – prostaglandyny
<b>PI3K</b>	(ang. <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> ) – kinaza-3-fosfoinozytolu
<b>PIP<sub>2</sub></b>	(ang. <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i> ) – fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforan
<b>PKA</b>	(ang. <i>Protein Kinase A</i> ) – kinaza białkowa A
<b>PKG</b>	(ang. <i>Protein Kinase G</i> ) – kinaza białkowa G
<b>PLCs</b>	(ang. <i>Platelet-Leukocyte Complexes</i> ) – kompleksy płytkowo-leukocytarne
<b>PMPs</b>	(ang. <i>Platelet-derived Microparticles</i> ) – mikrocząstki pochodzenia płytkowego
<b>PMS</b>	(ang. <i>Progressive Multiple Sclerosis</i> ) – postępująca postać stwardnienia rozsianego
<b>PPMS</b>	(ang. <i>Primary-Progressive Multiple Sclerosis</i> ) – postać pierwotnie postępująca stwardnienia rozsianego
<b>PPP</b>	(ang. <i>Platelet-Poor Plasma</i> ) – osocze ubogopłytkowe
<b>PRI</b>	(ang. <i>Platelet Reactivity Index</i> ) – wskaźnik reaktywności płytek
<b>PRP</b>	(ang. <i>Platelet-Rich Plasma</i> ) – osocze bogatopłytkowe
<b>PSGL-1</b>	(ang. <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i> ) – ligand dla P-selektyny
<b>PT</b>	(ang. <i>Prothrombotic Time</i> ) – czas protrombinowy
<b>PTMs</b>	(ang. <i>Post-Translational Modifications</i> ) – modyfikacje potranslacyjne
<b>qPCR</b>	(ang. <i>Quantitative PCR</i> ) – ilościowy PCR
<b>R</b>	(ang. <i>Ratio</i> ) – stosunek względnych ilości peptydów
<b>RanBP</b>	(ang. <i>Ran-Binding Protein</i> )
<b>RANTES</b>	(ang. <i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i> )
<b>RFA</b>	Reaktywne formy azotu
<b>RFT</b>	Reaktywne formy tlenu
<b>RISC</b>	(ang. <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> ) – kompleks wyciszający translację
<b>RRMS</b>	(ang. <i>Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis</i> ) – postać rzutowo-remisyjna stwardnienia rozsianego
<b>RT</b>	(ang. <i>Retention Time</i> ) – czas retencji
<b>RT-PCR</b>	(ang. <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> ) – reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją
<b>S1P</b>	(ang. <i>Sphingosine-1-Phosphate</i> ) – sfingozyno-1-fosforan
<b>sCD40L</b>	(ang. <i>soluble CD40L</i> ) – rozpuszczalna forma CD40L
<b>sCD62P</b>	(ang. <i>soluble CD62P</i> ) – rozpuszczalna forma P-selektyny (CD62P)

<b>SIRT-2</b>	(ang. <i>Sirtuin-2</i> ) – sirtuina 2
<b>SLE</b>	(ang. <i>Systemic Lupus Erythematosus</i> ) – toczeń rumieniowaty układowy
<b>SNP</b>	(ang. <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> ) polimorfizm pojedynczego nukleotydu
<b>SPMS</b>	(ang. <i>Secondary-Progressive MS</i> ) – postać wtórnie postępująca MS
<b>SSC</b>	(ang. <i>Side Scatter</i> ) – boczne rozproszenie światła widzialnego
<b>TF</b>	(ang. <i>Tissue Factor</i> ) – czynnik tkankowy
<b>TFA</b>	(ang. <i>Trifluoroacetic Acid</i> ) – kwas trifluorooctowy
<b>TGF-β</b>	(ang. <i>Transforming Growth Factor β</i> ) – transformującego czynnika wzrostu β
<b>Th</b>	(ang. <i>T-helper</i> ) – limfocyty T-pomocnicze
<b>TLRs</b>	(ang. <i>Toll-Like Receptors</i> ) – receptory toll-podobne
<b>TMB</b>	(ang. <i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i> ) – 3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna
<b>t-PA</b>	(ang. <i>Tissue Plasminogen Activator</i> ) – tkankowy aktywator plazminogenu
<b>TPO</b>	(ang. <i>Thrombopoietin</i> ) – trombopoetyna
<b>TRAP</b>	(ang. <i>Thrombin Receptor-Activating Polypeptide</i> ) – polipeptyd aktywujący receptor dla trombin
<b>TSP</b>	(ang. <i>Thrombospondin</i> ) – trombospodyna
<b>TT</b>	(ang. <i>Thrombotic Time</i> ) – czas trombinowy
<b>TXA2</b>	(ang. <i>Thromboxane A2</i> ) – tromboksan A2
<b>UTR</b>	(ang. <i>Untranslated Region</i> ) – region nie podlegający translacji
<b>VASP</b>	(ang. <i>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</i> ) – białka stymulowane rozkurczaniem naczyń krwionośnych
<b>VCAM</b>	(ang. <i>Vascular Cell Adhesion Protein</i> ) – białko adhezyjne komórek naczyniowych
<b>vWF</b>	(ang. <i>von Willebrand Factor</i> ) – czynnik von Willebranda
<b>α2M</b>	(ang. <i>α2-macroglobulin</i> ) – α2-makroglobulina
<b>β-TG</b>	(ang. <i>β-Thromboglobulin</i> ) – β-tromboglobulina
<b>β-ME</b>	(ang. <i>β-Mercaptoethanol</i> ) – β-merkaptioetanol

# **CZEŚĆ TEORETYCZNA**



# 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PŁYTEK KRWI

---

## 1.1. Budowa płytek krwi

Płytki krwi to najmniejsze elementy morfotyczne krwi powstające w szpiku kostnym na drodze dojrzewania i różnicowania komórek macierzystych – megakariocytów. Średnica płytek krwi wynosi 2-3  $\mu\text{m}$ , podczas gdy ich średnia grubość to 0,5  $\mu\text{m}$ , a ich objętość około 7  $\mu\text{m}^3$  [1]. Fizjologiczne miano płytek krwi w organizmie człowieka zawiera się w zakresie referencyjnym 150 – 400 x 10<sup>9</sup> na litr krwi [2], z czego około 2/3 to pula płytek obecnych w krwiobiegu, zaś 1/3 jest przechowywana w śledzionie i stanowi tzw. pulę wymienialną [3]. W porównaniu do pozostałych elementów morfotycznych, płytki krwi mają stosunkowo krótką żywotność, ich przeciętna długość życia w organizmie człowieka wynosi od 5 do 9 dni. Stare bądź „zużyte” płytki krwi są wyłapywane przez makrofagi i niszczone na drodze fagocytozy w śledzionie i wątrobie (komórki Browicza-Kupffera) [4]. Występowanie małych, bezjądrzastych płytek u przedstawicieli wszystkich gromad ssaków wydaje się być cechą przystosowawczą. Małe płytki krwi mogą szybciej formować czop płytkowy, co bezpośrednio związane jest z ich fizjologiczną funkcją nakierowaną na zapobieganie wynaczynieniu krwi. Niestety, większa reaktywność bezjądrzastych płytek krwi niesie znamienne konsekwencje dla starszych osobników, które są przez to bardziej narażone na występowanie incydentów niedokrwienych [5, 6]. Istnieją liczne doniesienia, które wskazują, że pomimo braku jądra komórkowego płytki krwi syntetyzują białka w oparciu o transkrypty matrycowego kwasu rybonukleinowego (ang. *Messenger Ribonucleic Acid*, mRNA) pochodzące z końcowych etapów różnicowania megakariocytów [7-9]. Ocena ilościowa zawartości transkryptów w płytkach krwi wykazała, że mogą one zawierać około 2,2 x 10<sup>-15</sup> g mRNA, czyli ponad 12 tysięcy razy mniej niż w komórkach jądrzastych [10]. Szczegółowa charakterystyka transkryptomu płytek krwi przy zastosowaniu techniki mikromacierzy oligonukleotydowej wraz z seryjną analizą ekspresji genów wykazała, że płytki krwi zawierają tysiące par zasad zakodowanych fragmentów informacji pochodzących z megakariocytów [11]. Dotychczas opisano ponad 3000 transkryptów płytkowego mRNA, które w trakcie formowania się płytek krwi zostają przekazane z megakariocytów [12].

## 1.2. Ziarnistości płytek krwi

Hemostaza jest procesem bardzo dynamicznym, który obejmuje obecność pobudzonych receptorów błonowych, dwukierunkowe oddziaływania międzykomórkowe oraz sekrecję białek płytkowych i substancji zapalnych [13]. W cytoplazmie płytek krwi obecne są liczne swoiste ziarnistości sekrecyjne tj.:  $\alpha$ -ziarnistości,  $\delta$ -ziarnistości (gęste), lizosomy i peroksosomy, w których nagromadzone są biologicznie aktywne substancje, uwalniane na zewnątrz w wyniku aktywacji

platek krwi [14]. Do najliczniej występujących (około 10% całkowitej objętości płytek) zalicza się  $\alpha$ -ziarnistości, w liczbie 60-80 sztuk w obrębie jednej komórki [15]. W  $\alpha$ -ziarnistościach zmagazynowanych jest około 300 rozpuszczalnych białek adhezyjnych, odgrywających kluczową rolę w hemostazie pierwotnej, jak również duża ilość cząsteczek białkowych uczestniczących w gojeniu się ran, stanach zapalnych oraz angiogenezie [16]. Ziarnistości gęste są znacznie mniej licznymi organellami wydzielniczymi płytek krwi (3-8 sztuk obecnych w komórce) [15], ale zawarte w nich składniki odgrywają równie istotną rolę w hemostazie pierwotnej, m.in. inicjując cykl zwrotnej aktywacji płytek krwi [17]. Natomiast, wydzielanie zawartości lizosomalnych przez płytki może mieć kilka ważnych funkcji zewnątrzkomórkowych, takich jak wspomaganie fibrylizacji i degradacji składników macierzy pozakomórkowej (**Tab. 1**) [18].

**Tabela 1.** Zawartość ziarnistości płytek krwi (zmodyfikowano wg [19])

<b>Ziarnistości-<math>\alpha</math></b>	
<b>Białka adhezyjne</b>	<b>fibrynogen, fibronektyna, witronektyna, czynnik von Willebranda</b> (ang. <i>von Willebrand Factor</i> , vWF), <b>trombospodyna</b> (ang. <i>Thrombospondin</i> , TSP)
<b>Cytokiny i chemokiny</b>	<b>RANTES</b> (ang. <i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i> ) <b>peptyd 3 aktywujący tkankę łączną</b> (ang. <i>Connective Tissue Activating Peptide III</i> , CTAP-III) <b>peptyd aktywujący neutrofile</b> (ang. <i>Neutrophil Activating Peptide 2</i> , NAP-2) <b>interleukiny</b> (ang. <i>Interleukin</i> , IL): <b>IL-1<math>\beta</math></b> oraz <b>IL-8</b>
<b>Proteoglikany</b>	<b>czynnik płytkowy 4</b> (ang. <i>Platelet Factor 4</i> , PF-4), <b><math>\beta</math>-tromboglobulina</b> (ang. <i><math>\beta</math>-Thromboglobulin</i> , $\beta$ -TG), <b>glikoproteiny</b> (ang. <i>Glycoproteins</i> , GPs) bogate w serynę
<b>Czynniki krzepnięcia i fibrylizacji</b>	<b>czynniki krzepnięcia</b> : I, V, XI oraz XII, <b>białko S oraz białko C</b> <b>wielkocząsteczkowy kininogen</b> (ang. <i>High-Molecular-Weight Kininogen</i> , HMWK) <b>tkankowy aktywator plazminogenu</b> (ang. <i>Tissue Plasminogen Activator</i> , t-PA)
<b>Mitogeny</b>	<b>czynnik wzrostu pochodzący z płytek</b> (ang. <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> , PDGF) <b>czynnik wzrostu śródbłonna</b> (ang. <i>Endothelial Cell Growth Factor</i> , ECGF) <b>insulinopodobny czynnik wzrostu</b> (ang. <i>Insulin-like Growth Factor</i> , IGF)
<b>Inhibitory proteaz</b>	<b><math>\alpha</math>2-antytrypsyna, <math>\alpha</math>2-antyplazmina, <math>\alpha</math>2-makroglobulina</b> (ang. <i><math>\alpha</math>2-macroglobulin</i> , $\alpha$ 2M) <b>inhibitor kolagenaz, inhibitor aktywatora plazminogenu</b> (ang. <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i> , PAI)
<b>Białka błonowe</b>	CD62P, GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPIV, GPVI, osteonektyna, immunoglobuliny typu G (ang. <i>Immunoglobulins G type</i> , IgG), IgA, IgM, albumina, plazminogen
<b>Ziarnistości gęste</b>	
<b>Nukleotydy adeninowe /guaninowe</b>	<b>adenozynodifosforan</b> (ang. <i>Adenosine Diphosphate</i> , ADP) <b>adenozynotrifosforan</b> (ang. <i>Adenosine Triphosphate</i> , ATP) <b>guanozodifosforan</b> (ang. <i>Guanosine Diphosphate</i> , GDP) <b>guanozotrifosforan</b> (ang. <i>Guanosine Triphosphate</i> , GTP)
<b>Aminy biogenne</b>	<b>serotonina, histamina</b>
<b>Fosfoinozytyle /polifosforany</b>	<b>1,4,5-trisfosforan inozytoli</b> (ang. <i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate</i> , IP <sub>3</sub> ) <b>fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan</b> (ang. <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i> , PIP <sub>2</sub> )
<b>Jony dwuwartościowe</b>	<b>Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup></b>
<b>Ziarnistości lizosomalne</b>	
<b>Proteazy</b>	<b>karboksypeptydazy (A i B), katepsyny (D i E), kolagenaza, kwaśne hydrolazy</b>
<b>Glikohydrolazy</b>	<b>heparynaza, <math>\beta</math>-galaktozydaza, <math>\beta</math>-D-acetyloglukozaminidaza</b>
<b>Białka błonowe</b>	<b>integralne białko lizosomalne</b> (ang. <i>Lysosomal Integral Membrane Protein</i> , LIMP)

Pobudzone płytki krwi są również źródłem rozpuszczalnych mediatorów lipidowych. Zalicza się do nich metabolity kwasu arachidonowego, takie jak prostaglandyny (ang. *Prostaglandins*, PGs), leukotrieny (ang. *Leukotriens*, LTs), tromboksan A2 (ang. *Thromboxane* A2, TXA2), a także czynnik aktywujący płytki (ang. *Platelet-Activating Factor*, PAF) czy sfingozyno-1-fosforan (ang. *Sphingosine-1-Phosphate*, S1P) [20].

### 1.3. Receptory płytkowe

Płytki krwi charakteryzują się dużą reaktywnością w odpowiedzi na działanie bodźców środowiskowych, dzięki obecności unikalnego systemu receptorów błonowych. Fizjologiczna funkcja płytek krwi jest zależna od stanu ich pobudzenia przy udziale odpowiednich receptorów, które odgrywają kluczową rolę w transdukcji sygnału w procesie aktywacji płytek [21]. Rola receptorów płytkowych jest kluczowa w hemostatycznej aktywności płytek krwi. Adhezja, aktywacja, agregacja płytek krwi oraz oddziaływania międzykomórkowe z leukocytami i komórkami śródbłónka są możliwe właśnie dzięki obecności receptorów powierzchniowych. Wkład receptorów płytkowych w powstawanie interakcji międzykomórkowych przedstawia **Ryc. 1**. Do najważniejszych receptorów płytkowych zalicza się:

#### Receptory dla białek adhezyjnych:

- integryny ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  oraz  $\alpha_L\beta_2$ ),
- selektyny (P-selektyna),
- glikoproteiny, w tym receptory bogate w leucynę (kompleks GPIb/IX/V) oraz białka należące do nadrodziny immunoglobulin (receptor dla kolagenu GPVI).

#### Receptory metabotropowe sprzężone z białkami G (ang. *G-proteins Coupled Receptors*, GPCRs):

- receptory dla trombiny (PAR-1 i PAR-4),
- receptory dla ADP (P2Y<sub>1</sub> i P2Y<sub>12</sub>) [22].

Receptory integrynowe są najobficiej występującymi receptorami na powierzchni płytek krwi i posiadają największe znaczenie fizjologiczne. Integryny to heterodimeryczne receptory dla białek adhezyjnych, zawierające dwie podjednostki:  $\alpha$  oraz  $\beta$ . Płytki krwi posiadają na swojej powierzchni sześć rodzajów receptorów integrynowych [23]. Istotnym białkiem adhezyjnym obecnym w ścianie naczynia krwionośnego jest kolagen, dla którego jednym z receptorów płytkowych jest integryna  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa/IIa), odgrywająca niezbędną rolę w procesie adhezji płytek krwi do uszkodzonej ściany naczynia krwionośnego. GPIa/IIa składa się z podjednostki  $\alpha_2$  (150 kDa) oraz  $\beta_1$  (130 kDa) [24]. Receptor ten zależny jest od jonów  $Mg^{2+}$  i występuje na powierzchni niezaktywowanych płytek, w liczbie od 2000 do 4000 kopii na płytkę [25]. Przyłączenie kolagenu do podjednostki  $\alpha$  wywołuje zmiany konformacyjne receptora, dochodzi do dimeryzacji cząsteczki i aktywacji integryny  $\alpha_2\beta_1$ . Proces adhezji płytki

prowadzi w konsekwencji do wewnątrzkomórkowej aktywacji enzymatycznej przemiany kwasu arachidonowego, która skutkuje, zmianą kształtu komórki, degranulacją ziarnistości oraz tworzeniem agregatów komórkowych [26].

Integryna  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb/IIIa), znana również jako kompleks CD41/CD61, jest swoistym i najliczniejszym receptorem integrynowym płytek krwi. Spoczynkowe komórki ekspozują od 80000 do 100000 cząsteczek nieaktywnej formy receptora GPIIb/IIIa na swojej powierzchni [27]. Masa cząsteczkowa podjednostki  $\alpha_{IIb}$  wynosi 140 kDa, natomiast podjednostki  $\beta_3$  około 105 kDa. Obecność sekwencji aminokwasowych RGD (Arg-Gly-Asp) oraz KQAGDV (Lys-Glu-Ala-Gly-Asp-Val) umożliwia zwiążanie się fibrynogenu, jak również innych białek adhezyjnych (vWF, witronektyna, TSP oraz fibronektyna) z aktywną postacią receptora GPIIb/IIIa, warunkując proces adhezji i agregacji płytek [28]. Przyłączenie dimerycznej cząsteczki fibrynogenu do dwóch aktywnych receptorów GPIIb/IIIa obecnych na powierzchni sąsiadujących ze sobą płytek krwi prowadzi do utworzenia agregatów płytkowych (ang. *Aggregates*, AGs) [29].

Pozostałe receptory integrynowe, takie jak  $\alpha_5\beta_1$  (CD49e/CD29) oraz  $\alpha_6\beta_1$  (CD49f/CD29) odgrywają uzupełniającą rolę w fizjologii płytek krwi, ułatwiając odpowiednio adhezję płytek do fibronektyny i lamininy [30, 31]. Obecność integryny  $\alpha_L\beta_2$  (CD102), znanej również jako wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna 2 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 2*, ICAM-2), umożliwia adhezję płytek do granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilii) oraz odpowiada za tworzenie się kompleksów płytkowo-leukocytarnych (ang. *Platelet-Leukocyte Complexes*, PLCs) [32]. Ponadto, płytki krwi ekspozują na swojej powierzchni od 50 do 100 kopii receptora  $\alpha_v\beta_3$  (CD51/CD61), które w obecności jonów dwuwartościowych  $Mg^{2+}$  lub  $Mn^{2+}$  pośredniczą w adhezji płytek do witronektyny, fibrynogenu, vWF, protrombiny i TSP [21, 33].

GPIb/IX/V to receptor adhezji płytek krwi z rodziny glikoprotein bogatych w leucynę o łącznej masie cząsteczkowej równej 442 kDa, który uczestniczy w adhezji płytek za pośrednictwem vWF oraz łączy się z receptorem CD11/CD18 obecnym na neutrofilach [34]. Do ligandów dla GPIb/IX/V zalicza się również trombinę oraz czynniki krzepnięcia XI i XIIa [35]. Zwiążanie się receptora GPIb/IX/V z ligandem zapoczątkowuje proces adhezji płytek krwi oraz przyczynia się do indukcji wewnątrzkomórkowych szlaków aktywacji poprzez fosforylację reszt tyrozynowych białek oraz wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  [36].

Selektyny to grupa receptorów obecnych nie tylko na płytkach krwi, ale także na komórkach śródbłonna oraz leukocytach. Wśród nich, swoista dla płytek krwi jest P-selektyna (CD62P), glikoproteina o masie cząsteczkowej 140 kDa, która znana jest również jako białko błony ziarnistej (ang. *Granule Membrane Protein*, GMP) [37]. Jest ona obecna w błonie

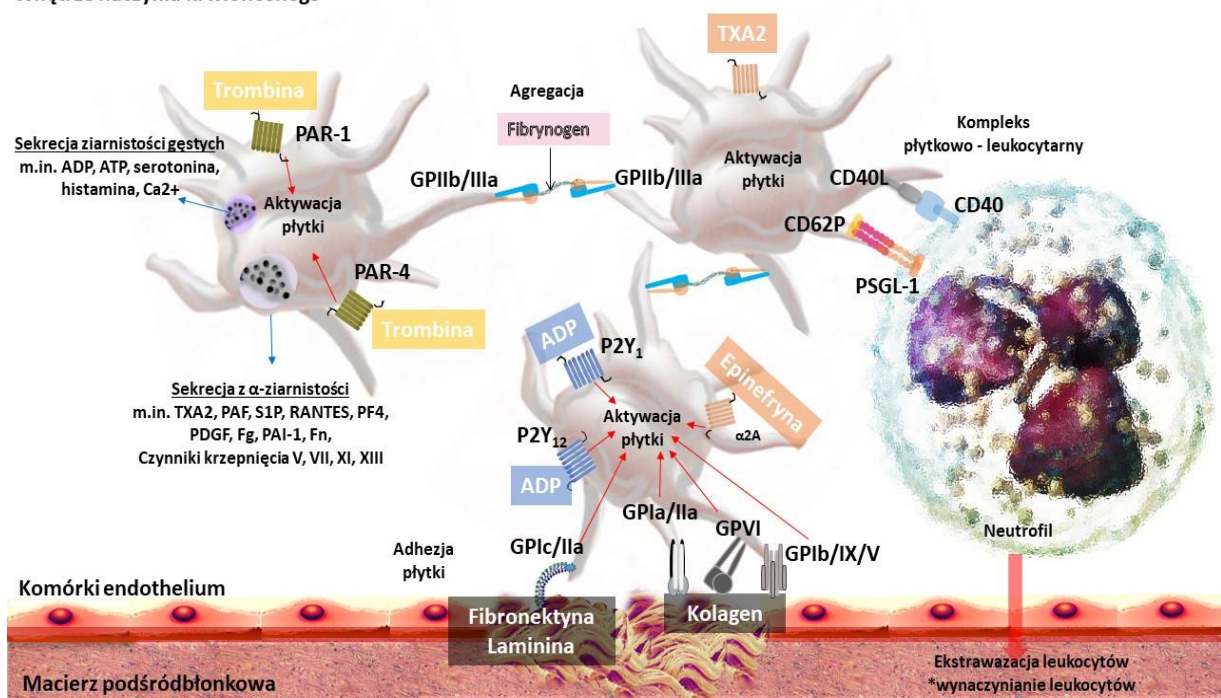
$\alpha$ -ziarnistości w spoczynkowych płytkach krwi, a po ich aktywacji ulega translokacji na powierzchnię błony komórkowej. Aktywacja płytek powoduje powierzchniową ekspresję około 13000 cząsteczek P-selektyny, która stanowi swoisty marker aktywacji płytek *in vivo* [38]. P-selektyna pośredniczy w interakcjach płytek z neutrofilami i monocytami, dzięki obecności na ich powierzchni liganda dla tej glikoproteiny (ang. *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1*, PSGL-1) [39].

Ważnym receptorem płytkowym należącym do rodziny GPCRs jest receptor P2Y<sub>12</sub> dla ADP. Przekazanie sygnału za pośrednictwem receptora metabotropowego wymaga udziału dodatkowego czynnika sprzęgającego, którym jest jedno z białek G. Mechanizm transdukcji sygnału za pośrednictwem receptora P2Y<sub>12</sub> dotyczy głównie aktywności cykazy adenylowej (ang. *Adenylyl Cyclase*, AC) oraz aktywacji fosfolipazy C, będących tzw. efektorami, których aktywacja prowadzi do zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu wtórnych przekaźników. Aktywacja za pośrednictwem receptora P2Y<sub>12</sub> prowadzi do wydzielania zawartości gęstych ziarnistości płytkowych [40] oraz zmiany konformacji receptora dla fibrynogenu – GPIIb/IIIa [41], co ma znaczenie w tworzeniu skrzepliny [42]. Receptor P2Y<sub>12</sub> jest kluczowy dla nieodwracalnej agregacji płytek krwi indukowanej przez ADP. Ponadto, P2Y<sub>12</sub> odgrywa ważną rolę w tworzeniu i stabilizacji skrzepu płytkowego w miejscu formowania się blaszek miażdżycowych [43]. W wyniku degranulacji ziarnistości gęstych uwalniany zostaje ADP, który powoduje zarówno para- jak i autokrynną aktywację płytek przy udziale receptora P2Y<sub>12</sub> [44]. Receptor P2Y<sub>12</sub> stanowi istotny cel terapii przeciwzakrzepowej. Wykazano, że leczenie antagonistami receptora P2Y<sub>12</sub> powoduje obniżenie ekspozycji P-selektyny na powierzchni płytek, zmniejsza tworzenie się PLCs oraz hamuje ekspresję integryny GPIIb/IIIa [45].

Trombina to proteaza serynowa osocza, która jest kluczowym agonistą płytek krwi. Funkcjonalne receptory dla trombiny należą do rodziny GPCRs i noszą nazwę receptorów aktywowanych przez proteazę (ang. *Protease-Activated Receptor*, PAR) [46]. Ludzkie płytki krwi posiadają na swojej powierzchni dwa rodzaje takich receptorów: PAR-1 oraz PAR-4, a aktywacja jednego z nich jest wystarczająca do wywołania całkowitej aktywacji płytek, wyrażonej jako degranulacja wewnątrzkomórkowych ziarnistości oraz agregacja płytek [47]. Przy czym PAR-1 pośredniczy w aktywacji płytek nawet w obecności niskich stężeń trombiny, natomiast PAR-4 jest zaangażowany w aktywację płytek wyłącznie przy wysokich stężeniach trombiny [47]. Receptory PAR mają rzadko spotykany mechanizm aktywacji, który następuje dzięki proteolitycznemu odcięciu zewnątrzkomórkowego N-końcowego fragmentu [48]. Interakcja trombiny z PAR-1 skutkuje zapoczątkowaniem kilku dróg przekaźnictwa sygnału wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem białek G (*Gα12/13*, *Gαq* i *Gαi/z*), prowadzących do syntezy TXA<sub>2</sub> [49], uwolnienia ADP [50], serotoniny oraz adrenaliny [51], wzrostu ekspresji GPIIb/IIIa [52], aktywacji selektyny P oraz ligandu

dla cząsteczki CD40 (ang. *CD40 ligand*, CD40L) [53]. Działanie PAR-4 jest podobne, ale dużo wolniejsze oraz wymaga dodatkowej aktywacji podjednostki G $\alpha$ i [54]. Receptor PAR-1 może być również aktywowany przez specyficzny polipeptyd aktywujący receptor dla trombiny (ang. *Thrombin Receptor-Activating Polypeptide*, TRAP). Istnieje kilka typów polipeptydów TRAP, które są zdolne do wywołania pełnej aktywacji receptora, a stosowanie ich ma na celu ocenę potencjalnego działania trombiny na płytki w warunkach, w których efekty aktywności samej proteinazy mogą być trudne w interpretacji (np. krew pełna, czy osocze krwi) [55]. Na powierzchni płytek znajdują się ponadto takie receptory jak: receptory dla TXA<sub>2</sub>, epinefryny, receptory TLRs (ang. *Toll-Like Receptors*) [56], dla PGs [57] oraz dla prostacyklin (ang. *Prostacyclins*, PGIs) [58].

#### Wnętrze naczynia krwionośnego



**Rycina 1. Interakcje pomiędzy płytkami krwi, leukocytami i komórkami śródbłonna, udział kluczowych płytkowych receptorów powierzchniowych w oddziaływaniach komórkowych.** Oddziaływania międzykomórkowe prowadzą do wydzielania licznych mediatorów lipidowych (TXA<sub>2</sub>, PAF, S1P), cząsteczek zapalnych (RANTES, PF-4), białek pro-zakrzepowych (fibrinogen, fibronektyna) oraz czynników krzepnięcia pochodzących z płytek krwi, które wpływają na aktywność pro-zakrzepową i prozapalną płytek krwi. Uszkodzenie warstwy śródbłonna indukuje hemostatyczną aktywność płytek krwi. Receptory płytek odgrywają kluczową rolę na każdym etapie procesu hemostazy w trakcie formowania się czopu płytkowego, od adhezji, aktywacji po homo- i hetero-agregację płytek krwi, jak również za pośrednictwem P-selektyny i cząsteczek CD40L płytki rekrutują leukocyty (głównie neutrofile i monocyty) w miejsce uszkodzonego naczynia krwionośnego, stymulują do wydzielania cytokin pro-zapalnych oraz ułatwiają ekstrawazację leukocytów z naczyń krwionośnych przyczyniając się do rozwoju stanu zapalnego.

## 2. MEGAKARIOCYTY I POWSTAWANIE PŁYTEK KRWI

---

### 2.1. Charakterystyka megakariocytów

Megakariocyty to duże komórki o średnicy 50-100  $\mu\text{m}$ , które u zdrowych osób stanowią niewielki odsetek (około 1%) populacji wszystkich komórek obecnych w szpiku kostnym, charakteryzujące się obecnością wielopłaszczyznowego poliploidalnego jądra komórkowego [59]. Megakariocytopoeza stanowi złożony proces, na który mają wpływ liczne czynniki transkrypcyjne, hematopoetyczne czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny, jak również wzajemne interakcje międzykomórkowe. Proces megakariocytopoezy składa się z trzech głównych etapów: (1) różnicowania linii komórkowej, (2) proliferacji oraz (3) dojrzewania megakariocytów, które zakończone jest wytworzeniem płytek krwi [60]. Z jednego megakariocytu może powstać od 5000 do 10000 płytek krwi. Zdrowy organizm może średnio wyprodukować do  $10^{11}$  płytek dziennie, a poziom tej produkcji może wzrosnąć nawet 20-krotnie w stanach zapalnych [61].

Podobnie jak pozostałe komórki krwiotwórcze, megakariocyty pochodzą od hematopoetycznych komórek macierzystych (ang. *Hematopoietic Stem Cells*, HSCs), które stanowią mniej niż 0,1% wszystkich komórek jądrzastych [62]. Komórki HSCs w trakcie hematopoezy tracą właściwości multipotentne oraz zdolność do proliferacji, stając się unipotentnymi komórkami prekursorowymi. W kolejnym etapie HSC dzielą się na dwie główne linie komórek progenitorowych: limfoidalną (ang. *Common Lymphoid Progenitors*, CLPs), z której rozwijają się limfocyty i komórki naturalnej cytotoxyczności (ang. *Natural Killer*, NK) oraz mieloidalną (ang. *Common Myeloid Progenitors*, CMPs) [63]. Z linii CMPs powstają komórki prekursorowe megakariocytów i erytrocytów (ang. *Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitors*, MEPs) oraz granulocytów i makrofagów (ang. *Granulocyte/Macrophage Progenitors*, GMPs). Erytrocyty i megakariocyty posiadają wspólną komórkę prekursorową MEP, a sygnały regulujące ostateczne oddzielenie się tych linii nie są do końca poznane [64]. W późnej fazie różnicowania dochodzi do dojrzewania prekursora megakariocytów, tj. promegakarioblastu, któremu towarzyszy endomitoza. W wyniku zmian ultrastrukturalnych w obrębie tej komórki przechodzi ona w tzw. promegakariocyt charakteryzujący się obecnością ziarnistości oraz kwasochłonną cytoplazmą. Za dojrzałą komórkę tej linii komórkowej uważa się megakariocyt [65].

### 2.2. Powstawanie płytek krwi

W przeciwieństwie do innych komórek jednojądrzastych, w późnej fazie różnicowania megakariocyty podlegają wspomnianemu wcześniej procesowi endomitozy, podczas którego dochodzi do intensywnej replikacji kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *Deoxyribonucleic*

*Acid*, DNA), z pominięciem trzeciej fazy podziału komórki (anafazy) oraz zaburzeniem procesu późnej cytokinezy, co w rezultacie powoduje zwielokrotnienie zawartości jądrowego DNA. Stopień ploidyacji nie jest ściśle zsynchronizowany z dojrzewaniem komórkowym, dlatego na każdym etapie występują różne stopnie ploiddii [66]. Wzrostowi ploidalności megakariocytów towarzyszy znaczący wzrost objętości cytoplazmy, co ma bezpośredni wpływ na proces tworzenia się płytek. Większość megakariocytów przechodzi średnio trzy cykle endomitotyczne żeby osiągnąć zawartość DNA równą 16N. Niemniej jednak niektóre megakariocyty są zdolne uzyskać dużo większą zawartość DNA, dochodzącą nawet do 256N [67]. Istnienie zjawiska poliploidalności megakariocytów może być sposobem na zwiększenie ich aktywności metabolicznej. Intensywna poliploidyacja megakariocytów ma wpływ na funkcjonalność genów, gdyż prawdopodobną rolą amplifikacji jest zwiększenie wydajności syntezy białek. Wykazano, że wszystkie allele badanych genów kodujących czynniki transkrypcyjne Fli-1 oraz Fog-1, zaczynają być aktywne transkrypcyjnie dopiero w megakariocytach posiadających od 4N do 32N [68]. Mechanizmy, które regulują endomitozę nie są w pełni poznane, jednakże stwierdza się, że zaangażowane w ten proces są cykliny, których prawidłowa ekspresja jest niezbędna dla normalnej proliferacji komórek [69, 70]. Cykliny regulują aktywność kinaz cyklinozależnych i wpływają tym samym na długość trwania poszczególnych faz cyklu komórkowego oraz decydują o tym, czy komórka może wejść w kolejne stadium rozwoju [71]. Kompleks cyklina D/Cdk4 (kinaza serynowo-treoninowa zależna od cykliny 4, ang. *Cyclin-Dependent Kinase 4*) stanowi złożoną strukturę białkową, która jest silnie związana z regulacją cyklu komórkowego. Wykazano, że w megakariocytach nadekspresja kompleksu cyklina D/Cdk4 powoduje znaczący wzrost wielkości megakariocytów oraz istotnie zwiększa zawartość DNA w tych komórkach [72]. Zarówno proces późnego różnicowania jak i dojrzewania megakariocytów podlega regulacji przez czynniki wzrostu oraz czynniki transkrypcyjne (głównie Runx-1, Gata-1, Fog-1, Fli-1, Tali-1 i Nfe-2). Niedostatek tych czynników zakłóca proces prawidłowego dojrzewania megakariocytów, co powoduje nieprawidłowości w liczbie powstających płytek [73]. W trakcie dojrzewania megakariocytów stwierdzono obecność w komórce bardzo dużej liczby rybosomów potrzebnych do syntezy białek płytkowych, które wraz z cząsteczkami mRNA oraz licznie występującymi mitochondriami, przedostają się do powstających płytek krwi za pośrednictwem białek cytoszkieletu oraz rozbudowanego systemu tzw. błon demarkacyjnych (ang. *Demarcation Membrane System*, DMS), powstającego we wnętrzu dojrzewającego megakariocyty [74]. Cytoplazma megakariocyty zostaje wyposażona w wytworzony *de novo* złożony system błon wewnątrzkomórkowych, stanowiących podstawę do tworzenia



specjalistycznych ziarnistości płytek krwi, wyodrębnionych poprzez rozbudowaną sieć błon demarkacyjnych dzielących wewnątrz megakariocytu na liczne kompartmenty [75]. Powstający przy tym układ kanalików otwartych służy w dojrzałych płytkach krwi do uwalniania zawartości z ziarnistości pobudzonych komórek do środowiska pozakomórkowego [76]. Swoiste białka płytkowe intensywnie syntetyzowane w dojrzewających megakariocytach są następnie gromadzone w  $\alpha$ -ziarnistościach (vWF oraz PF-4) lub eksponowane na powierzchni megakariocytów (receptory płytkowe np. GPIIb/IIIa czy GPIb). Ponadto, określona pula białek obecnych w dojrzałych płytkach krwi, jest na tym etapie wychwytywana z osocza w procesie endocytozy i/lub pinocytozy, a następnie magazynowana w  $\alpha$ -ziarnistościach. Wśród tych białek znajdują się m.in. czynniki regulatorowe angiogenezy [77]. W trakcie dojrzewania megakariocytu dochodzi do zaniku inhibitorów apoptozy oraz pojawienia się czynników promujących ten proces tj. kaspazy-3 i kaspazy-9, transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (ang. *Transforming Growth Factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) oraz tlenku azotu (ang. *Nitric Oxide*, NO), które zapoczątkowując apoptozę megakariocytu pobudzają proces tworzenia płytek krwi [78].

Kluczową cytokiną hematopoetyczną odgrywającą główną rolę w proliferacji i różnicowaniu megakariocytów jest trombopoetyna (ang. *Thrombopoietin*, TPO), wykazująca homologię do erythropoetyny (ang. *Erythropoietin*, EPO) [79]. TPO odpowiada za prawidłowe powstawanie i uwalnianie płytek, ale również za ich właściwą aktywację i funkcjonowanie. Oddziaływanie TPO z megakariocytowym receptorem c-MPL aktywuje cytoplazmatyczną kinazę tyrozynową JAK-2 (ang. *Janus Kinase 2*) [80], co indukuje przekazywanie sygnału poprzez szlaki zależne od kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs) [81] oraz od kinazy-3-fosfoinozytolowej (ang. *Phosphoinositide 3-Kinase*, PI3K) [82]. Działanie TPO wspomagane jest na każdym etapie przez cytokiny, takie jak: IL-3, IL-6 [83], IL-11, IL-12 [84], EPO lub czynnik stymulujący powstawanie kolonii granulocytów (ang. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) [85]. Mechanizmy biogenezy płytek krwi wskazują na wytwarzanie tzw. propłytek z megakariocytów tj. sznurów płytek otoczonych wspólną błoną komórkową, które w drobnych naczyniach krwionośnych obecnych w szpiku kostnym rozpadają się tworząc pojedyncze płytki krwi [100].

Formowanie się płytek krwi zachodzi na terenie przestrzeni zatokowych szpiku kostnego oraz w płucach, gdzie dojrzałe megakariocyty docierają z prądem krwi żyłnej przez prawy przedsionek serca do naczyń włosowatych płuc. W trakcie kontaktu ściany naczynia z przeciskającym się przez naczynie włosowate megakariocytem dochodzi do rozpadu komórki i fragmentacji jego cytoplazmy z wytworzeniem płytek krwi. Płytki krwi nabierają pełnej

dojrzałości morfologicznej i czynnościowej w śledziona [86, 87]. Dowodem przemawiającym za takim sposobem formowania płytek jest obecność mniejszej ilości megakariocytów w naczyniach przedpłucnych, w porównaniu do naczyń zapłucnych, a co więcej, w przypadku liczby płytek krwi zależność ta jest odwrotna [88].

### **3. CYTOSZKIELET PŁYTEK KRWI**

---

Cytoszkielec płytki krwi odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu dyskoidalnego kształtu komórki w warunkach spoczynkowych oraz jest odpowiedzialny za zmianę jej kształtu następującą podczas aktywacji. Ważny dla utrzymania struktury komórki i integralności błony plazmatycznej jest cytoszkielec podbłonowy, oddziałujący zarówno z systemem filamentów odpowiedzialnym za elastyczność komórki, jak i z białkami integralnymi błony komórkowej odpowiadając za umocowanie receptorów powierzchniowych. Glikoproteinowe receptory powierzchniowe, jak np. kompleks GPIb/IX/V, poprzez wiązanie z filamentami cytoszkieletu powodują jego stabilizację [114]. Adhezja płytek krwi do elementów uszkodzonej ściany naczynia krwionośnego oraz homo- i hetero- agregacja komórek, zachodzące przy udziale receptorów powierzchniowych, wiążą się z aktywacją prowadzącą do fosforylacji białek cytoszkieletu. Reorganizacja cytoszkieletu powoduje zmianę kształtu płytek krwi z dyskoidalnego na kolczasty sferocyt oraz pociąga za sobą degranulację ziarnistości płytkowych, z których uwalniane są liczne związki biologicznie aktywne, w tym o charakterze pro-zakrzepowym i pro-zapalnym [89].

Cytoszkielec płytkowy składa się z polimerów aktyny i tubuliny wraz z białkami oddziałującymi na strukturalny zrąb cytoszkieletu. Białka cytoszkieletu stanowią dużą część proteomu płytek krwi. Morfologia spoczynkowych płytek krwi utrzymywana jest przez cytoszkielec podbłonowy złożony głównie ze spektryny, adducyny, filamentów aktynowych i białek związanych z aktyną. Na zmianę kształtu przez płytki wpływają dwa główne czynniki: polimeryzacja monomerów aktyny oraz depolimeryzacja zwojów mikrotubuli [90].

Aktyna (42 kDa) należy do wysoce konserwatywnych i wielofunkcyjnych białek globularnych, które tworzą tzw. mikrofilamenty aktynowe będące podstawowym elementem budulcowym cytoszkieletu komórkowego. Szacuje się, że w każdej płytce krwi znajduje się około 2000 filamentów o średniej długości filamentu 1  $\mu\text{m}$ . U kręgowców zidentyfikowano trzy główne izoformy aktyny:  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -aktynę. Filamenty  $\alpha$ -aktyny znajdują się głównie w tkance mięśniowej, zaś  $\beta$ - wraz z  $\gamma$ -aktyną współtworzą strukturę cytoszkieletu komórek [91, 92]. Aktyna jest zdecydowanie najobficiej występującym białkiem w płytkach krwi,

stanowiącym aż 15-20% całkowitej masy białka komórkowego. W trakcie aktywacji komórki następuje gwałtowne zwiększenie formowania polimerów aktyny wraz ze wzrostem ich długości poprzez zmiany organizacji włókien aktyny. W spoczynkowych płytkach krwi dochodzi do polimeryzacji zaledwie 30% aktyny, a po ich aktywacji zawartość polimerów wzrasta do 70% [93, 94]. Włókna aktynowe w niepobudzonych płytkach zorganizowane są w sztywne rusztowanie cytoplazmatyczne, które usieciowane jest krzyżowo oraz równoległe, dzięki obecności białek wiążących filamety aktynowe [95]. Polimeryzacja aktyny napędza dynamiczną włóknistą strukturę komórkową do wytworzenia bogatych w aktynę wypustek tzw. lamelli- i pseudopodiów, umożliwiających przemieszczanie się komórek [96].

Każdy etap zmiany kształtu płytek wymaga udziału wielu białek związanych z filamentami aktynowymi (ang. *Actin Binding Protein*, ABP), do których należą: białka wiążące monomery aktyny (profilina, kompleks Arp2/3), białka „zapeczkujące”/tnące filament aktynowy (gelsolina, CapZ, tymozyna  $\beta$ 4, tensyna oraz adducyna), białka wiążące się wzdłuż filamentu aktynowego (stabilizujące: tropomiozyna, troponina); (destabilizujące – kofilina), białka wiążące filament aktynowy (równoległe: spektryna, fimbryna,  $\alpha$ -aktynina; krzyżowo: filamina), białka wiążące filament aktynowy do błony komórkowej (transbłonowa cząsteczka CD44 oraz białka z rodziny ERM czyli ezryna, radyksyna i moezyna) [97-99].

Do istotnych białek będących regulatorami dynamiki cytoszkieletowej filamentów aktynowych należą białka stymulowane rozkurczaniem naczyń krwionośnych (ang. *Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*, VASP). Białka VASP (50 kDa) posiadają wysoce konserwatywną strukturę składającą się z N-końcowej domeny 1 homologii Ena/VASP (ang. *Ena/VASP-homology 1*, EVH-1), centralnego regionu bogatego w prolinę i C-końcowej domeny EVH-2. Domena centralna umożliwia fizyczne oddziaływanie VASP z profiliną, białkiem wiążącym aktynę [100]. VASP są kluczowymi białkami odpowiedzialnymi za reorganizację cytoszkieletu oraz regulują zdarzenia adhezyjne, które inicjują proces agregacji płytek [101]. VASP pierwotnie zostały wyizolowane z płytek krwi, gdzie wykazano ich bardzo wysoką ekspresję (około 78000 kopii w pojedynczej komórce) [102]. Białka VASP stanowią główny substrat dla kinazy białkowej A (ang. *Protein Kinase A*, PKA) oraz kinazy białkowej G (ang. *Protein Kinase G*, PKG), które przez fosforylację reszt aminokwasowych wpływają na ograniczenie zmian konformacyjnych receptora GPIIb/IIIa i co za tym idzie, wykazują hamujący wpływ na agregację płytek krwi. Fosforylacja VASP następuje w trzech obszarach: na resztach Ser<sup>157</sup> i Ser<sup>239</sup> oraz Thr<sup>278</sup> i jest regulowana przez szlak cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu (ang. *cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate*, cAMP) oraz cyklicznego

guanozyno-3',5'-monofosforanu (ang. *cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate*, cGMP) [103, 104]. Wykazano, że fosforylacja białek VASP w pozycji Ser<sup>157</sup> koreluje ze zmniejszoną aktywnością GPIIb/IIIa i zahamowaniem agregacji płytek krwi [105]. Defosforylacja VASP następuje po stymulacji płytek zależnej od receptora purynergicznego P2Y<sub>12</sub>. Pobudzenie receptora P2Y<sub>12</sub> przez ADP powoduje zahamowanie wytwarzania cAMP, wpływając tym samym na zmniejszenie fosforylacji białek VASP. Poziom fosforylacji/defosforylacji VASP odzwierciedla odpowiednio hamowanie/aktywację receptora P2Y<sub>12</sub> [106].

Tubuliny należą do nadrodziny białek o aktywności GTPazy. W celu utworzenia jednej mikrotubuli potrzebnych jest od 13 do 15 protofilamentów złożonych z heterodimerów  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -tubuliny. W płytkach krwi występują oba izomery tubuliny:  $\alpha$ - oraz  $\beta$ -tubulina. Analiza proteomiczna płytek krwi wykazała, że  $\beta$ -tubulina znajduje się w większej ilości w porównaniu do  $\alpha$ -tubuliny [107]. Przy czym stwierdzono obecność kilku izoform ludzkiej  $\beta$ -tubuliny w płytkach krwi, są to:  $\beta$ 1 (TUBB1),  $\beta$ 2A (TUBB2A),  $\beta$ 2B (TUBB2B),  $\beta$ 2C (TUBB2C),  $\beta$ 3 (TUBB3),  $\beta$ 4 (TUBB4),  $\beta$ 5 (TUBB5),  $\beta$ 6 (TUBB6) i  $\beta$ 8 (TUBB8) [108].  $\beta$ 1-tubulina jest główną izoformą występującą wyłącznie w megakariocytach i płytkach krwi [109]. Cząsteczka  $\beta$ 1-tubuliny (50 kDa) składa się z 451 aminokwasów i można w niej wyróżnić część N-końcową złożoną z 113 aminokwasów, która bierze udział w wiązaniu i hydrolizie GTP, podczas gdy część środkowa i fragment C-końcowy są odpowiedzialne za interakcje między cząsteczkami tubuliny i wiązanie białek oddziałujących na mikrotubule, takich jak białko związane z mikrotubulami (ang. *Microtubule-Associated Protein*, MAP). Izoforma  $\beta$ 1-tubuliny jest niezbędna dla formowania mikrotubul w płytkach krwi. Co więcej, wykazano, że megakariocyty traktowane lekami powodującymi depolimeryzację mikrotubul, takimi jak winkrystyna czy nocodazol, nie tworzą proplatek. Myszy pozbawione  $\beta$ 1-tubuliny charakteryzowały się małopłytkowością spowodowaną defektem wytwarzania proplatek. Natomiast, mutacje genu *TUBB1* kodującego  $\beta$ 1-tubulinę prowadzą do wadliwego wytwarzania płytek krwi z niefunkcjonalnymi dimerami  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny, których nie można włączyć w strukturę mikrotubul [110]. Jednakże, niewiele wiadomo na temat roli poszczególnych izoform  $\alpha$ -tubuliny. Ostatnie doniesienia wykazały wzrost ekspresji  $\alpha$ 4A-tubuliny w późnych stadiach różnicowania megakariocytów, co może wskazywać na uczestnictwo tej izoformy w tworzeniu proplatek [111].

Istnieje duża ilość białek wiążących mikrotubule, które zaangażowane są w tzw. aktywność ruchową, są to białka motoryczne, takie jak dyneina, dynaktyna oraz kinezyna. Praca dyneiny jest regulowana przez dynaktynę, zaś cały kompleks dyneinowo-

dynaktynowy uczestniczy w ślizganiu się mikrotubul podczas tworzenia się propłytek lub w trakcie zmiany kształtu płytki [112]. Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  zwiększa aktywność dyneiny, tym samym zmniejszając wpływ kinezy, wprawiając w ruch mikrotubule powoduje rozszerzenie cewki mikrotubuli. Po rozszerzeniu i centralizacji mikrotubul, cewka ostatecznie ulega depolimeryzacji, co umożliwia zmianę kształtu komórki. Kinezy są białkami o funkcji motorycznej, które uczestniczą w kierowanym przez mikrotubule transporcie struktur pęcherzykowych zawierających zawartość ziarnistości płytkowych w celu ich egzocytozy [113]. Chociaż mechanizmy regulujące dynamikę procesu polimeryzacji mikrotubul są mało poznane, to ostatnie dane wskazują, że czynność mikrotubul jest regulowana przez geny kodujące białka takie jak: EB (ang. *End-Binding protein*), CLASP (ang. *CLIP-Associating Protein*), czy RanBP (ang. *Ran-Binding Protein*), których wzmożona ekspresja została wykazana w płytkach krwi człowieka [114]. W warunkach spoczynkowych liczba dimerów tubuliny przypadających na płytkę krwi wynosi około 250000, z czego 55% obecnych jest w postaci spolimeryzowanej. Chociaż badania struktury cewki mikrotubuli płytek krwi wykazały, że cewka obwodowa składa się z pojedynczej mikrotubuli (zwinętej od 8 do 12 razy), nowsze badania sugerują, że nawet w spoczynku, brzeżne pasmo płytki zawiera wiele bardzo dynamicznych mikrotubuli o mieszanej polaryzacji. W trakcie aktywacji płytki cewki mikrotubuli kurczą się, ulegając fragmentacji poprzez depolimeryzację [115].

Modyfikacje potranslacyjne (ang. *Post-Translational Modifications*, PTMs) są dynamicznymi i często odwracalnymi procesami, w których dodanie grupy chemicznej do reszt aminokwasowych białka wywołuje zmiany we właściwościach funkcjonalnych białka. Tubulina, podobnie jak większość białek, może podlegać PTMs, które generują pewnego rodzaju różnorodność mikrotubul. Najbardziej istotne PTMs, które mogą wystąpić w tubulinie to acetylacja, fosforylacja, detyrozynacja/tyrozynacja, poliglutamylacja i poliglikacja [116]. PTMs są jednym z czynników, które wpływają na właściwości polimeru tubuliny i umożliwiają mikrotubulom dostosowanie się do różnych funkcji, które pełnią w komórkach. W płytkach krwi zdolność do rearanżacji cewki mikrotubuli wydaje się być związana z występowaniem PTMs tubuliny. Podczas gdy stabilne mikrotubule charakteryzują się acetylacją [117] i detyrozynacją, bardziej dynamiczne mikrotubule są deacetylowane [118]. Co ważne, większość płytek krwi zawiera zarówno dynamiczne, jak i stabilizowane mikrotubule, ale wydaje się, że liczebność każdej z izoform różni się w obrębie danej płytki [115]. Na poziomie funkcjonalnym stan acetylacji mikrotubuli może regulować aktywność motoryczną mikrotubul [119]. Enzymy zaangażowane w deacetylację lizyny w pozycji 40 ( $\text{Lys}^{40}$ ) to: członek 6 rodziny

deacetylaz histonów (ang. *Histone Deacetylase Family Member 6*, HDAC-6) oraz sirtuina 2 (ang. *Sirtuin-2*, SIRT-2) [120]. Po aktywacji płytek mikrotubule podlegają deacetylacji, w której pośredniczy HDAC-6. Chociaż deacetylacja nie jest kluczowa dla zmiany kształtu płytek, zdolność HDAC-6 do zapobiegania hiperacetylacji tubuliny wpływa na zdolność rozpościerania się tych komórek [121]. Ponadto, PTMs uczestniczą w modulowaniu dynamiki mikrotubul po aktywacji płytek krwi. W pobudzonych płytkach krwi prążek brzeżny ulega silnej poliglutamylacji, co umożliwia mobilizację białek motorycznych, takich jak dyneina, w celu uzyskania zmiany kształtu obserwowanej podczas aktywacji tych komórek [122]. Co więcej, w dojrzałych megakariocytach i proplętkach, poliglutamylacja mikrotubul jest ważna dla indukcji tworzenia się prążka brzeżnego [123] i ma wpływ na wydłużanie proplętek i degranulację [124].

Zmiany ilościowe i/lub strukturalne w cząsteczkach białek cytoszkieletu płytkowego mogą odpowiadać za zmianę w biologicznej aktywności płytek np. sprzyjając tworzeniu się czopu płytkowego w miejscu uszkodzonego naczynia krwionośnego. Jednakże, wzmożone właściwości pro-zakrzepowe płytek krwi mogą prowadzić do okluzji naczynia krwionośnego, a w konsekwencji do wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych [125]. Przebudowa cytoszkieletu jest ściśle regulowanym procesem, w którym depolimeryzacja białek zwiększa plastyczność szkieletu komórki i jest wymagana do zmiany kształtu, zaś polimeryzacja przywraca jego sztywność, która jest niezbędna do agregacji i retrakcji skrzepu. Patologiczna zmiana dynamiki cytoszkieletu płytek krwi może zatem upośledzić ich czynność hemostatyczną [126, 127]. Wykazano, że nasilona ekspresja receptora GPIIb/IIIa wynikająca z mutacji w genie *ITGB3* indukuje nieprawidłowe formowanie się cytoszkieletu, co finalnie prowadzi do upośledzonego tworzenia się płytek krwi oraz wpływa na ich funkcjonalność [128]. Sieć białek cytoszkieletu umożliwia również utrzymanie pozycji organelli wewnątrzkomórkowych oraz odpowiedzialna jest za ukierunkowany transport w obrębie komórki, dzięki czemu zmiana kształtu pobudzonych płytek pociąga za sobą degranulację ziarnistości płytkowych [109]. Otwarty system kanalikowy (ang. *Open Canalicular System*, OCS) to sieć cystern i kanalików, która zajmuje około 50% całej objętości komórki i ma bezpośredni kontakt z błoną komórkową, przez co może odgrywać ważną rolę w zmianie kształtu płytek krwi [90]. OCS ułatwia transport zawartości z ziarnistości płytkowych, jak również odgrywa istotną rolę w zmianach morfologicznych, krytycznych dla prawidłowego przebiegu procesów agregacji i adhezji płytek krwi [129, 130].

#### 4. MARKERY AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

---

Markery aktywacji płytek krwi są przydatnymi narzędziami do określenia funkcjonalności płytek, dla oceny parametrów klinicznych i ryzyka wystąpienia incydentów niedokrwienia w wielu stanach patologicznych. Płytki krwi należą do wielofunkcyjnych komórek hemostazy stanowiąc istotny element układu krążenia i ważny cel strategii terapeutycznych [131].

Aktywacja płytek krwi odgrywa istotną rolę w chorobach o podłożu zakrzepowozatorowym, jednakże stanowi kluczowe ogniwo łączące procesy pro-zakrzepowe z rozwojem stanu zapalnego, odpowiedzi immunologicznej, a także metastazy [132, 133]. Stan pobudzenia płytek charakteryzują zmiany czynnościowe i strukturalne, których oszacowanie i monitorowanie pozwala na śledzenie postępu choroby oraz określenie rokowania i korzyści z zastosowania terapii anti-płytkowej. Kluczowym narzędziem diagnostycznym jest właściwie dobrany marker aktywacji. Obecnie zidentyfikowanych zostało kilkanaście markerów aktywacji płytek krwi będących antygenami powierzchniowymi oraz czynnikami osoczymi pochodzenia płytkowego [134-139].

W wyniku pobudzenia płytki krwi eksponują na swojej powierzchni liczne cząsteczki receptorowe i ligandy, które ułatwiają wzajemne interakcje z innymi płytkami, leukocytami oraz komórkami śródbłonna [140]. Część biomolekuł, które ulegają ekspresji na powierzchni pobudzonych płytek krwi znalazło zastosowanie jako swoiste markery procesu aktywacji. Jednym z nich jest P-selektyna (CD62P). W wyniku pobudzenia płytki krwi eksponują dużą liczbę cząsteczek CD62P, które są szybko mobilizowane z błony  $\alpha$ -ziarnistości na powierzchnię komórki. Istotne znaczenie ma fakt, że w stanie spoczynku płytki krwi magazynują P-selektynę wewnątrz komórki, a poziom jej powierzchniowej ekspresji jest dobrym wskaźnikiem stopnia aktywacji płytek. CD62P należy do antygenów, które są tylko czasowo eksponowane na powierzchni pobudzonej komórki, ulegając następnie proteolitycznemu rozszczepieniu (tzw. złuszczeniu) do osocza. Schemat wydzielania rozpuszczalnej formy P-selektyny (ang. *Soluble CD62P*, sCD62P) do osocza nie jest jednoznaczny i wskazuje zarówno na jej okresowe wyrzuty, jak i ciągły rozpad na powierzchni płytek krwi [141]. Stężenie sCD62P mierzone w osoczu odzwierciedla stan czynnościowy płytek w krążeniu. Obecność sCD62P w osoczu uznana jest za marker obrazujący stan całkowitej aktywacji (zużycia) krążących płytek [142, 143]. W odróżnieniu od powierzchniowej P-selektyny, jej rozpuszczalna forma cechuje się znacznie dłuższym czasem półtrwania, dzięki czemu może stanowić bardziej wiarygodne narzędzie do oceny kondycji płytek *in vivo* [144].

Ekspozycja CD62P na powierzchni pobudzonych płytek krwi pośredniczy w ich fizycznym kontakcie z leukocytami poprzez wiązanie z ligandem PSGL-1. Interakcja CD62P/PSGL-1 odgrywa kluczową rolę w procesie tzw. rolowania leukocytów, polegającym na ich przemieszczaniu i przyleganiu do komórek śródbłónka za pośrednictwem płytek krwi, co stanowi główny etap rekrutacji leukocytów, a następnie diapedezy i wynaczynienia w rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Obecność PSGL-1 potwierdzono na powierzchni monocytów, neutrofilów, eozynofili i hematopoetycznych komórek progenitorowych [145]. CD62P jest głównym mediatorem tworzenia PLCs, w powstawanie których zaangażowane są szczególnie monocyty. PLCs stanowią pośredni etap w rozwoju stanu zapalnego w obrębie śródbłónka. Adhezja PLCs do komórek śródbłónka przyczynia się do rozwoju reakcji zapalnej zwiększając produkcję mediatorów zapalnych [146]. W warunkach fizjologicznych we krwi obwodowej występuje nieznaczna ilość PLCs, zaś ich liczba znacząco wzrasta w stanach patologicznych, takich jak zaburzenia sercowo-naczyniowe, uogólnione stany zapalne, nowotwory, czy choroby o podłożu autoimmunologicznym [147, 148]. Heterogenne kompleksy komórkowe z udziałem płytek krwi są uważane za jeden z typowych markerów aktywacji tych komórek. Ocena odsetka trwale utworzonych PLCs może nawet stanowić czulszy wskaźnik aktywacji płytek, niż powierzchniowa ekspresja cząsteczki CD62P, ze względu na jej czasową ekspozycję i gwałtowną utratę poprzez okresowe wyrzuty do osocza [149].

P-selektyna wiąże się także z ligandami na powierzchni płytek krwi, które są przez nią rozpoznawane dzięki procesowi siarkowania reszty tyrozynowej znajdującej się na N-końcu. Sulfatydy pełnią rolę liganda P-selektyny bezpośrednio zaangażowanego w procesy agregacji i adhezji płytek krwi. P-selektyna oddziałując z sulfatydami płytkowymi stabilizuje utworzone AGs formowane poprzez połączenia GPIIb/IIIa z fibrynogenem, a zahamowanie tej interakcji prowadzi do inhibicji płytkowej agregacji. Poziom wytworzonych homo-agregatów płytkowych jest miarą stopnia aktywacji tych komórek i wskazuje na ich aktywność pro-zakrzepową [150].

W spoczynkowych płytkach krwi receptor GPIIb/IIIa przyjmuje konformację nieaktywną. Transdukcja zewnątrzkomórkowych sygnałów za pośrednictwem metabotropowych receptorów GPCRs, dzięki stymulacji z udziałem agonistów, takich jak: ADP, TXA<sub>2</sub>, epinefryna, trombina, prowadzi do przejścia GPIIb/IIIa ze stanu niskiego do wysokiego powinowactwa względem cząsteczki fibrynogeny i innych ligandów. W wyniku aktywacji płytek rośnie także liczba kopii tego receptora glikoproteinowego na powierzchni płytki. Wiązanie ligandu powoduje grupowanie integryny i promuje sygnalizację, która inicjuje



i wzmacnia szereg zdarzeń komórkowych w celu sterowania podstawowymi funkcjami płytek, takimi jak zmiana kształtu, degranulacja, agregacja czy retrakcja skrzepu [151]. Sygnały powstające wewnątrz komórki powodują przejście integryny w stan zdolny do wiązania ligandu na skutek zmian konformacyjnych wewnątrz jej cząsteczki. Regulacja dwukierunkowej sygnalizacji za pośrednictwem GPIIb/IIIa wymaga zaangażowania białek oddziałujących z cytoplazmatyczną domeną tego receptora, takich jak konserwatywne ewolucyjnie kindliny i talina [152]. Aktywny receptor GPIIb/IIIa odgrywa krytyczną rolę w tworzeniu AGs, a poziom powierzchniowej ekspresji aktywnej formy tego receptora stanowi wiarygodny marker aktywacji płytek krwi [153, 154].

Oprócz P-selektyny, drugą glikoproteiną transbłonową odgrywającą istotną rolę w interakcjach komórkowych, jest cytokina CD154 (CD40L), ligand odpowiedzialny za aktywację receptora CD40, obecnego głównie na limfocytach T. Po aktywacji płytek krwi cząsteczka CD40L ulega translokacji z płytkowych  $\alpha$ -ziarnistości na błonę plazmatyczną i jest ekspozycja na powierzchni komórki, a częściowo wydzielana w postaci rozpuszczalnej (ang. *Soluble CD40L*, sCD40L) poprzez rozszczepienie proteolityczne. Pobudzone płytki krwi są głównym źródłem sCD40L. Szacuje się, że ponad 95% krążącego CD40L (powierzchniowego) i sCD40L jest pochodzenia płytkowego, co czyni te cząsteczki dobrymi markerami płytkowej aktywacji [155, 156]. Badania wskazują na wysoką ekspresję cząsteczek CD40L w stanach zapalnych, a ich poziom jest skorelowany z tworzeniem koniugatów płytkowo-limfocytarnych. Szlak CD40/CD40L odgrywa kluczową rolę w rozwoju miażdżycy, której patogenezą jest związana z przewlekłym stanem zapalnym w obrębie śródbłona naczyń [157]. Kompleks CD40/CD40L jest łącznikiem między humoralną i komórkową odpowiedzią immunologiczną. Bezpośrednia interakcja pomiędzy komórkami dendrytycznymi, aktywowanymi za pośrednictwem limfocytarnej cząsteczki CD40, a komórkami B prowadzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Zatem płytkowy CD40L jest czynnikiem kostymulatorowym, dzięki któremu limfocyty T wspierają odpowiedź komórek B, promując przełączanie izotypów Ig i generując pamięć komórek B [158]. Szlak sygnałowy CD40/CD40L jest krytycznym czynnikiem w chorobach autoimmunologicznych i jest uznawany za marker wczesnej fazy autoimmunologicznych reakcji zapalnych [159].

Mikrocząstki pochodzenia płytkowego (ang. *Platelet-derived Microparticles*, PMPs) są to małe, pęcherzykowate struktury, stanowiące fragmenty błony plazmatycznej komórek, które uległy aktywacji. Mikrocząstki uwalniane do osocza pochodzą z błon komórkowych wszystkich elementów morfotycznych krwi oraz z komórek śródbłona naczyń, przy czym

płytki krwi oraz megakariocyty są głównym źródłem mikrocząstek obecnych w krążeniu [160]. Uwalnianie mikrocząstek z komórek eukariotycznych jest procesem fizjologicznym, który zachodzi podczas dojrzewania i starzenia się komórek, ale wzmożone uwalnianie jest następstwem aktywacji komórek i prowadzi do większej liczby mikrocząstek wykrywanych w osoczu w przebiegu wielu chorób, głównie o charakterze pro-zakrzepowym i zapalnym [161]. Udział mikrocząsteczek, w tym głównie PMPs, w patogenezie niektórych chorób, czyni je ważnym parametrem diagnostycznym [162]. PMPs charakteryzują się szczególnie małym rozmiarem w zakresie 100-1000 nm i posiadają na swojej powierzchni typowe antygeny płytkowe, co pozwala odróżnić je od mikrocząstek innego pochodzenia [163]. PMPs odgrywają znaczącą rolę w hemostazie, angiogenezie oraz w komunikacji międzykomórkowej prowadzącej głównie do rozwoju reakcji zapalnej, ale także do wspierania procesu metastazy [164]. PMPs zawierają komponenty cytoplazmatyczne, takie jak białka, lipidy i RNA pochodzące z ich komórek prekursorowych [165] oraz są bogate w ujemnie naładowane fosfolipidy błonowe, dostarczając tzw. powierzchni pro-koagulacyjnej w postaci miejsc wiążących dla osoczowych czynników krzepnięcia (IXa, VIII, Va i IIa). Ponadto, PMPs są nośnikami czynnika tkankowego (ang. *Tissue Factor*, TF) oraz posiadają liczne receptory powierzchniowe, w tym P-selektynę oraz GPIIb/IIIa odpowiedzialne za homo- i hetero-agregację komórek [166]. Oddziaływanie PMPs z komórkami odpornościowymi oraz ze śródbłonkiem nasila rozwój stanu zapalnego [167, 168]. Zwiększony poziom krążących PMPs zaobserwowano w miażdżycy, ale także u chorych z nadciśnieniem czy po udarze mózgu. Ponadto, wykazano wartość predykcyjną PMPs w chorobach zakrzepowych [169-173]. Istnieje też wiele innych stanów patologicznych, w których monitorowanie ilości PMPs może stanowić ważny element diagnostyczny, jak chociażby skazy krwotoczne (w tym wymagające transfuzji koncentratów płytkowych), co można przełożyć na strategię terapeutyczne [174].

## **5. METODA CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ W ANALIZIE PŁYTEK KRWI**

---

Cytometria przepływowa to technika badawcza i diagnostyczna, która umożliwia szybką i stosunkowo łatwą analizę jakościową i ilościową pojedynczych komórek lub cząstek w płynnej zawieszynie, przemieszczających się w świetle lasera. Każda komórka analizowana jest pod kątem rozproszenia światła widzialnego i fluorescencji. Rozproszenie światła widzialnego jest mierzone w dwóch kierunkach: na wprost (ang. *Forward Scatter*, FSC), co wskazuje względną wielkość komórki, która jest proporcjonalna do rozproszenia padającego światła lasera oraz bocznie, pod kątem 90° (ang. *Side Scatter*, SSC), gdzie rozproszenie światła wskazuje na wewnętrzną złożoność lub ziarnistość komórki [175]. Rozproszenie światła nie

jest zależne od fluorescencji. Fluorescencja mierzona jest w uprzednio przygotowanej próbce za pomocą barwników fluorescencyjnych, np. jodku propidyny lub poprzez skoniugowanie barwnika fluorescencyjnego z odpowiednimi przeciwciałami skierowanymi na antygeny powierzchniowe. Cytometria przepływowa to użyteczne narzędzie, które znajduje zastosowanie w wielu dyscyplinach, takich jak immunologia, biologia molekularna czy wirusologia. Pozwala na jednoczesną charakterystykę mieszanych populacji komórek, które następnie można rozdzielić na określone subpopulacje [176]. Oprócz analizy komórek, głównym zastosowaniem techniki cytometrii przepływowej jest sortowanie komórek [177].

Tradycyjne cytometry przepływowe składają się z trzech układów: układu hydraulicznego, układu optycznego oraz układu elektronicznego. Układ hydrauliczny zawiera płyn osłonowy utworzony zwykle na bazie buforowanego roztworu soli fizjologicznej, który dozowany jest pod ciśnieniem w celu dostarczenia i skupienia próbki w punkcie przechwyty (sorter) lub w miejscu padania wiązki lasera (analiza). Obecność płynu osłaniającego zapewnia laminarny przepływ komórek, stanowiący kluczowy element tej metody, umożliwiający osobną analizę każdej z przepływających komórek [178]. Układ optyczny składa się ze źródła światła laserowego oraz systemów optycznych zbierających sygnały świetlne (fotopowielacze, diody). Dzięki zastosowaniu filtrów znajdujących się przed elementami zbierającymi sygnał świetlny możliwe jest wykrycie określonego zakresu długości fali świetlnej charakterystycznej dla specyficznych fluorochromów [179]. Najpopularniejsze lasery stosowane w cytometrach to 355 nm (ultrafiolet), 405 nm (fioletowy), 488 nm (niebieski), 532 nm oraz 552 nm (zielony), 561 nm (zielono-żółty) i 640 nm (czerwony) [180].

Jak wspomniano powyżej, technika cytometrii przepływowej wykorzystuje unikalną zdolność do jednoczesnej analizy mieszanych populacji komórek pod kątem wielu parametrów (tzw. *Multipleksing*). W najprostszej postaci eksperymentu immunofenotypowania, komórki są znakowane fluorochromem skoniugowanym z przeciwciałem, które jest skierowane przeciwko antygenowi różnicującemu obecnemu na powierzchni badanej komórki [181]. Do najczęściej używanych fluorochromów zalicza się izotiocyjanian fluoresceiny (ang. *Fluorescein Isothiocyanate*, FITC), fikoerytrynę (ang. *Phycoerythrin*, PE), kompleks białek perydyna-chlorofil (ang. *Peridinin-Chlorophyll-Protein*, PerCP), allofikocyjaninę (ang. *Allophycocyanin*, APC) [182]. Większość wybieranych do znakowania antygenów stanowi indywidualny klaster różnicowania (ang. *Cluster of Differentiation*, CD). Znaczna ilość komórek odpornościowych ma specyficzne markery CD, które definiują je jako określoną populację/subpopulację komórek

[183]. Oprócz markerów charakteryzujących linię komórkową, wyróżnia się dużą grupę markerów aktywacyjnych dla różnego rodzaju komórek [184].

Płytki krwi wykazują istotną rolę w utrzymaniu integralności naczynia krwionośnego, dzięki natychmiastowej aktywacji oraz adhezji do uszkodzonej ściany naczynia. Tworzenie homo- i hetero-agregatów przez płytki krwi wpływa na uszczelnienie uszkodzenia poprzez wytworzenie czopu komórkowego, jednakże wzmożona aktywacja płytek krwi prowadzi do efektów niepożądanych [185], dlatego analiza poziomu ich aktywacji *in vivo* ma kluczowe znaczenie w wykrywaniu i monitorowaniu zaburzeń pro-zakrzepowych i zapalnych [186]. Zmiany w ekspresji i/lub konformacji receptorów płytkowych stanowią najczęstszy parametr oceniany techniką cytometrii przepływowej [187]. Niedobór lub całkowity brak funkcjonalnych receptorów płytkowych powoduje dysfunkcję płytek, w tym zaburzenia agregacji prowadzące do krwotoków (np. zaburzona synteza receptora GPIIb/IIIa w trombastenii Glanzmanna) [188].

W przypadku receptora GPIIb/IIIa jego nieaktywna postać obecna jest na powierzchni płytek spoczynkowych, natomiast w wyniku pobudzenia komórek następują zmiany konformacyjne, dzięki którym możliwe jest przejście receptora w formę aktywną. Zastosowanie mysiego przeciwciała monoklonalnego PAC-1 skoniugowanego z barwnikiem fluorescencyjnym umożliwia identyfikację aktywnej formy kompleksu GPIIb/IIIa na powierzchni płytek krwi, a amplituda sygnału fluorescencji jest miarą stopnia pobudzenia tych komórek. Natomiast analiza powierzchniowej ekspresji CD62P metodą cytometrii przepływowej została uznana w ostatnich trzech dekadach za „złoty standard” do oceny aktywacji płytek krwi w warunkach *ex vivo* [189]. Podwyższony poziom CD62P wykazano w licznych badaniach klinicznych w ostrym zespole niedokrwiennym, nadciśnieniu, otyłości, cukrzycy, niewydolności nerek, ostrym udarze niedokrwiennym [190], małopłytkowości [191], jak również w innych stanach klinicznych, w których nadaktywność płytek krwi jest jednym z patomechanizmów choroby. Ekspresja CD62P jest też miarą reaktywności płytek, czyli specyficznej odpowiedzi funkcjonalnej na czynnik aktywujący, którą ocenia się stosując submaksymalne stężenia klasycznych agonistów, takich jak np.: ADP (0,5-5  $\mu$ M), TRAP (1-8  $\mu$ M) oraz kolagen (1-2  $\mu$ g/ml) [192-195].

Zastosowanie metody cytometrii przepływowej umożliwia także ocenę interakcji płytkowych, w tym tworzenie homoagregatów oraz kompleksów płytkowo-leukocytarnych, z jednoczesną możliwością antygenowego różnicowania subpopulacji komórek zapalnych zaangażowanych w tworzenie PLCs. Natomiast, dzięki zachowaniu macierzystych antygenów powierzchniowych, możliwe jest również określenie odsetka powstających PMPs. Ponadto,

metoda cytometrii pozwala na analizę ziarnistości wewnątrzpłytkowych [196]. Określenie podłoża oraz wczesne wykrycie anomalii płytkowych bywa trudne, jednakże użycie metody cytometrii przepływowej umożliwia wnikliwą analizę stanu funkcjonalnego płytek krwi w warunkach *ex vivo*, w próbkach krwi bezpośrednio pobranych od pacjenta [197].

Jedną z najważniejszych zalet stosowania cytometrii przepływowej jest właśnie fakt, iż płytki krwi analizowane są w stanie fizjologicznym, ze względu na niewielką ingerencję w badaną próbkę, co zapobiega aktywacji płytek i tworzeniu artefaktów pomiarowych zaburzających faktyczny obraz stanu czynnościowego tych komórek. Co więcej, technika cytometrii umożliwia analizę kilku różnych parametrów jednocześnie, przy użyciu bardzo małej ilości wyjściowego materiału biologicznego. Dzięki temu, że przeprowadzane oznaczenia są praktycznie niezależne od liczby płytek, metoda cytometrii przepływowej umożliwia badania diagnostyczne zarówno u pacjentów z trombocytopenią, jak i z trombcytozą [198].

Procedura przygotowująca próbkę do cytometrycznej analizy płytek krwi jest stosunkowo prosta i nie zawiera zbyt wielu punktów krytycznych mogących wpłynąć na wiarygodność wykonanego testu. Ważne jest zastosowanie odpowiedniego antykoagulantu, przy czym preferowany jest cytrynian sodu, gdyż użycie kwasu etylenodiaminotetraoctowego (ang. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) bądź heparyny wpływa na zmianę struktury GP powierzchniowych, co może być przyczyną powstania artefaktów płytkowych [199]. W celu określenia stopnia aktywacji płytek krwi krążących w łożysku naczyniowym stosuje się tzw. utrwalenie komórek, mające na celu uchwycenie stanu płytek odzwierciedlającego ich funkcjonalność *in vivo*. Najczęściej płytki krwi utrwalają się 0,5–1,0% formaldehydem lub paraformaldehydem. Utrwalenie można także zastosować do płytek krwi już uprzednio wyznakowanych odpowiednimi przeciwciałami, przy czym kluczowe znaczenie ma tu konsekwentne stosowanie stałego protokołu utrwalania i znakowania komórek. Kolejnym, istotnym aspektem jest prawidłowe dobranie przeciwciał i sprzężonych z nimi fluorochromów oraz stosowanie właściwych kontroli izotypowych umożliwiających ocenę niespecyficznego wiązania przeciwciał [200]. Cytometria przepływowa jest to prosta, niezawodna i ekonomiczna technika, która ma szerokie zastosowanie w diagnozowaniu wrodzonych i nabytych zaburzeń płytek krwi [198]. Może służyć jako przydatne narzędzie stosowane w celu wdrożenia właściwej profilaktyki [201], lub narzędzie prognostyczne, w tym do monitorowania postępu terapii przeciwpłytkowych oraz ustalenia zależności dawka-efekt testowanych leków [202].

Metoda cytometrii przepływowej w analizie płytek krwi stosowana jest najczęściej w celu:

- oceny stanu czynnościowego płytek poprzez pomiar ekspresji typowych receptorów płytkowych, odsetka powstałych AGs, PMPs oraz PLCs, w całkowitej populacji badanych komórek w próbce biologicznej [168, 203-206],
- monitorowania terapii przeciwplatekowej przy stosowaniu blokerów receptorów dla ADP, antagonistów GPIIb/IIIa oraz inhibitorów cyklooksigenazy, skuteczności innych leków przeciwplatekowych oraz monitorowania funkcji płytek krwi przed i podczas angioplastyki wieńcowej [207-209],
- kontroli jakości koncentratów płytek krwi, w tym identyfikacji zanieczyszczeń leukocytarnych [210, 211].

## **6. PŁYTKI KRWI W CHOROBAH NEURODEGENERACYJNYCH**

---

### **6.1. Pro-zakrzepowa aktywność płytek krwi w stwardnieniu rozsianym**

Stwardnienie rozsiane (ang. *Multiple Sclerosis*, MS) jest przewlekłą chorobą zapalną ośrodkowego układu nerwowego (OUN), charakteryzującą się demielinizacją włókien istoty białej, spowodowaną rozpadem otoczki mielinowej w wyniku uszkodzenia rozpuszczalnego, zasadowego białka mieliny (ang. *Myelin Basic Protein*, MBP) [212]. MS jest chorobą heterogenną o bardzo zmiennym przebiegu klinicznym oraz zróżnicowanym obrazie patofizjologicznym, będącą składową wielu toczących się procesów, w tym stanu zapalnego, demielinizacji, niszczenia aksonów i neuronów, jak również naprawczych mechanizmów remielinizacyjnych [213]. Według najnowszej klasyfikacji z 2014 roku wyróżnia się dwie główne postaci choroby: rzutowo-remisyjną postać MS (ang. *Relapsing-Relmitting Multiple Sclerosis*, RRMS) oraz postępującą postać MS (ang. *Progressive Multiple Sclerosis*, PMS), w tym przypadku z uwzględnieniem pacjentów będących w fazie pierwotnie postępującej MS (ang. *Primary-Progressive Multiple Sclerosis*, PPMS) i wtórnie postępującej MS (ang. *Secondary-Progressive Multiple Sclerosis*, SPMS) [214].

MS wciąż pozostaje chorobą o niejednoznacznie określonej etiologii, ale za kluczowy patomechanizm rozwoju tego schorzenia uznaje się zaburzenia funkcji układu odpornościowego połączone ze wzrostem przepuszczalności bariery krew-mózg (ang. *Brain-Blood Barrier*, BBB) [215]. Główną przyczyną dysfunkcji układu immunologicznego jest nieprawidłowa czynność komórek dendrytycznych, należących do komórek prezentujących antygen (ang. *Antigen Presenting Cells*, APCs), które swobodnie przechodzą przez BBB i inicjują różnicowanie komórek T pamięci w pro-zapalne limfocyty pomocnicze T (ang. *T-helper*, Th), głównie o profilu Th1 i Th17 [216]. Autoreaktywne komórki

T dostają się do OUN, gdzie uwalniają cytokiny pro-zapalne inicjując kaskadę aktywacji kolejnych komórek, w tym makrofagów i komórek mikrogleju. Mechanizmy pro-zapalne leżące u podstaw procesów toczących się w obrębie mikrogleju sprzyjają postępowi choroby [217].

Jednakże, pomimo faktu, że MS ma podłoże typowo neurozapalne, to uznaje się, że jest także ściśle związane z uszkodzeniem naczyń krwionośnych, głównie na skutek zwiększenia przepuszczalności BBB [218]. Zaburzona integralność mikronaczyniowa w mózgu może odgrywać istotną rolę w występowaniu zdarzeń neurodegeneracyjnych [189]. Ponadto, badania epidemiologiczne wskazują na zwiększone ryzyko występowania incydentów naczyniowo-zakrzepowych w MS [200]. Liczne doniesienia potwierdzają wzmożoną aktywność pro-zakrzepową płytek krwi w przebiegu wielu chorób neurodegeneracyjnych, w tym również w MS [168, 203, 219-221].

Już w drugiej połowie XX w. Nathanson i Savitsky zaobserwowali zwiększoną adhezję płytek u pacjentów z MS, która dodatnio korelowała z aktywnością choroby [222]. Dalsze badania, prowadzone przez Sheremata i wsp. na pacjentach z MS, wykazały zwiększony poziom markerów czynnościowych płytek krwi *in vivo*, w tym PMPs, AGs oraz wzrost ekspresji CD62P. Ponadto, wzrost płytkowych IgM świadczył o toczącym się w organizmie aktywnym procesie zapalnym [223]. Powyższe obserwacje dostarczyły wstępnych dowodów, że płytki krwi obecne w krążeniu pacjentów z aktywną postacią MS (RRMS) wykazują stan nadmiernej aktywacji. W połączeniu z doniesieniami z pierwszej połowy XX wieku, które wykazały obecność elementów układu krzepnięcia, takich jak fibryna czy TF w zmianach demielinizacyjnych, pozwoliło to wnioskować o silnym potencjale pro-koagulacyjnym obserwowanym u pacjentów w przebiegu MS [224]. Zidentyfikowanie płytkowego receptora GPIIb/IIIa oraz czynników pro-koagulacyjnych w aktywnych zapalnie zmianach demielinizacyjnych potwierdziło znaczącą rolę płytek krwi oraz innych elementów układu hemostazy w przebiegu MS [225]. W kolejnych latach Langer i wsp. wykazali, że płytki krwi są „uwięzione” w ogniskach demielinizacyjnych, co tylko potwierdza ich udział w rozwoju stanu zapalnego i demielinizacji w przebiegu MS [226]. Zaobserwowano również, że zablokowanie kluczowego receptora płytkowego jakim jest GPIIb/IIIa powoduje złagodzenie objawów w modelu zwierzęcym autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (ang. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, EAE) [227]. Podobnie, zmniejszenie liczby płytek krwi w EAE prowadziło do znacznego złagodzenia objawów i hamowało proces zapalny [226].

Patologiczna aktywacja płytek krwi odgrywa kluczową rolę w zakrzepicy naczyń tętniczych, powodując zmniejszenie lub całkowite zamknięcie przepływu głównie w tętnicach wieńcowych [228-230]. Najnowsze doniesienia potwierdzają zwiększone ryzyko pojawienia się incydentów niedokrwiennych, zwłaszcza niedokrwiennego udaru mózgu i zawału mięśnia sercowego (ang. *Myocardial Infarction*, MI), jak również zakrzepicy żyłnej u pacjentów z MS, co jest skorelowane ze stopniem rozwoju tej choroby [231, 232]. Analiza trendów przeżyciowych i przyczyny zgonów u pacjentów z MS wykonana przez Brønnum-Hansen i wsp. wykazała, że ryzyko śmierci z powodu udaru niedokrwiennego lub MI było o ponad 30% większe w przypadku MS, w porównaniu do grupy kontrolnej [233].

Przyczyny nadmiernej aktywacji płytek krwi w MS nie są wyjaśnione. Mogą one wynikać z predyspozycji genetycznych lub powstawać na skutek wtórnego procesu chorobowego związanego z zapalnym uszkodzeniem warstwy śródbłonka naczyniowego, gdzie dochodzi do wzajemnej aktywacji płytek krwi, komórek odpornościowych oraz komórek śródbłonka. Badania potwierdzają podwyższony poziom mikrocząstek śródbłonka (ang. *Endothelial Microparticles*, EMPs) w osoczu pacjentów z MS, co świadczy o uszkodzeniu tych komórek. Istotną rolę w uszkodzeniu śródbłonka mogą odgrywać krążące PMPs [160], a także oddziaływanie P-selektyny z PSGL-1 obecnym na limfocytach, co zwiększa śródbłonkową ekspresję integryny  $\alpha 4\beta 1$ , ułatwiającą wiązanie komórek zapalnych do warstwy śródbłonka [234].

## **6.2. Dysfunkcja mitochondriów w płytkach krwi**

Stres oksydacyjny odgrywa ważną rolę w regulacji plastyczności mózgu, a intensywne produkcje reaktywnych form tlenu (RFT) oraz reaktywnych form azotu (RFA) istotnie wpływa na zaburzenia transmisji neuronalnej, stanowiące przyczynę niepełnosprawności psycho-fizycznej. Struktury mózgu są szczególnie podatne na działanie RFT/RFA ze względu na ich intensywny metabolizm tlenowy. Pomimo istnienia naturalnych mechanizmów przeciwutleniających, komórki OUN, zwłaszcza neurony, są niewystarczająco chronione przed nadmierną produkcją i szkodliwym działaniem RFT/RFA [235]. Ze względu na szczególnie dużą liczbę mitochondriów obecnych w pojedynczej komórce, metabolizm tlenowy płytek krwi jest często porównywany do metabolizmu neuronów. Co więcej, w wielu zaburzeniach neurologicznych, w tym chorobach neurodegeneracyjnych, potwierdzono dysfunkcję mitochondriów płytkowych. Zaburzenia mitochondrialne mogą przyczyniać się do nadmiernej aktywności płytek krwi obserwowanej u pacjentów z MS [220, 236] i do zmiany ich właściwości hemostatycznych [237]. Płytki krwi spoczynkowe są metabolicznie bardzo aktywne i wykazują wysoki wskaźniki obrotu energii, w celu zaspokojenia znacznego



zapotrzebowania energetycznego [238]. Zdrowe płytki krwi zawierają w swojej cytoplazmie od 5 do 8 mitochondriów [239] i uważa się, że stanowią główny rezerwuar tych organelli w układzie krążenia [240]. Płytki krwi są zdolne do uwalniania własnych mitochondriów do środowiska zewnątrzkomórkowego, zarówno w postaci wolnych organelli, jak i zamkniętych wewnątrz mikrocząstek płytkowych. W układzie krążenia płytki krwi stanowią główne źródło krążących mitochondriów, które są odpowiedzialne za generowanie silnych sygnałów pro-zapalnych [241]. Do RFT wytwarzanych przez płytki krwi zalicza się przede wszystkim: anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^{\bullet}$ ), rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2^{\bullet}$ ) oraz reaktywne formy o charakterze nie rodnikowym, głównie nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) [242]. Wytwarzane w płytkach RFT odgrywają istotną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , które stanowią wtórny przekaźniki regulujący szeroki zakres podstawowych procesów komórkowych, przyczyniając się do aktywacji i agregacji płytek krwi [243, 244]. Dysfunkcje mitochondriów wiążą się z zaburzeniem funkcjonowania łańcucha oddechowego na skutek wzrostu przepuszczalności błony mitochondrialnej wywołanego głównie przez nadprodukcję RFT, bądź przeciążenie tych organelli jonami  $Ca^{2+}$  w wyniku ich wzmożonego wychwytu z cytoplazmy. Procesy te są bezpośrednio związane z powstaniem w błonie mitochondrialnej tzw. megakanałów o wysokiej przepuszczalności, które pozwalają jonom i małym molekułom na swobodne przemieszczanie się zgodnie z ich gradientami stężeń, powodując ostatecznie rozproszenie potencjału błony mitochondrialnej (ang. *Mitochondrial Membrane Potential*, MMP) i przerwanie ciągłości mitochondrialnej błony zewnętrznej [245]. Spadek MMP może stanowić pierwszy sygnał świadczący o utracie żywotności [246]. Co ciekawe, utrzymujące się przez długi czas niskie wartości MMP mogą doprowadzić do stanu alternatywnego dla stresu oksydacyjnego czyli tzw. stresu redukcyjnego, który może być równie szkodliwy dla komórek, co wspomniany stres oksydacyjny [247].

Nieprawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego ma zwykle odzwierciedlenie w występowaniu mutacji mitochondrialnego DNA (ang. *Mitochondrial DNA*, mtDNA) [248]. W związku z tym, że liczba enzymów naprawczych mtDNA jest mocno ograniczona jest on bardziej podatny na stres oksydacyjny niż jądrowy DNA. Nagromadzenie mutacji w mtDNA może wpłynąć na zmniejszenie syntezy ATP oraz zwiększyć generowanie RFT, co z kolei może skutkować akumulacją nowych mutacji mtDNA, ustanawiając w ten sposób pętlę sprzężenia zwrotnego, która determinuje nieprawidłowe funkcjonowanie komórki i jest dość często spotykanym zjawiskiem w chorobach neurodegeneracyjnych [249]. Zmiany mitochondrialne

w płytkach krwi wykazano w wielu jednostkach chorobowych, dlatego zaproponowano, aby służyły jako potencjalny marker ogólnoustrojowej dysfunkcji mitochondriów [250].

### 6.3. Płytkowe miRNA

MikroRNA (ang. *microRNA*, miRNA) to małe, endogenne, niekodujące cząsteczki RNA zawierające od 21 do 24 nukleotydów, które odgrywają kluczową rolę w negatywnej regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Geny miRNA są przepisywane z kodujących sekwencji w genomie najczęściej przez polimerazę RNA II, a powstałe transkrypty pri-miRNA podlegają modyfikacjom końca 5' (czapeczka) i 3' (ogon poliadenylowy) [251]. Następnie, ulegają obróbce przez białka Drosha, polegającej na wycięciu rejonu o strukturze tzw. „spinki do włosów”, dzięki czemu powstają cząsteczki pre-miRNA o długości około 70 par zasad. Pre-miRNA są następnie eksportowane z jądra za pośrednictwem eksportyny 5, białka będącego transporterem jądrowym. W kolejnym etapie, pre-miRNA ulega w cytoplazmie cięciu przez enzym Dicer do dwuniciowych cząsteczek o długości około 22 pz [252]. Termodynamicznie mniej stabilna z nici ulega inkorporacji do kompleksu wyciszającego translację RISC (ang. *RNA-Induced Silencing Complex*). Kompleks ten dzięki komplementarności cząsteczki miRNA ma zdolność przyłączania się do regionów 3'UTR (ang. *Untranslated Regions*) mRNA genu docelowego, co prowadzi do degradacji transkryptu [253]. Szacuje się, że ponad 60% genów kodujących ludzkie białka regulowanych jest przez miRNA [254]. Według danych literaturowych, pojedyncza cząsteczka miRNA może być odpowiedzialna za regulację aż 200 różnych genów [255].

Płytki krwi charakteryzują się dużą liczbą cząsteczek miRNA. Badania wskazują, że płytkowe miRNA łączy się do mRNA dla wielu istotnych białek, które biorą udział w regulowaniu aktywności płytek krwi [256]. Narastająca ilość dowodów, które pojawiły się w przeciągu ostatnich kilku lat wskazuje, że płytkowe miRNA są biologicznie i klinicznie istotne jako: (1) potencjalne regulatory translacji i ekspresji białek płytkowych, (2) markery poziomu miRNA w dojrzałych megakariocytach, (3) biomarkery chorób hematologicznych i zaburzeń związanych z reaktywnością płytek krwi oraz (4) narzędzie do zrozumienia podstawowych mechanizmów ekspresji genów [257]. Uważa się, że krążące miRNA mogą odzwierciedlać poziom aktywacji płytek krwi, a zatem mogą służyć jako marker skuteczności terapii przeciwplatek [258].

W płytkach krwi zachodzi funkcjonalna cytoplazmatyczna obróbka miRNA, jednakże obfitość dojrzałych miRNA w porównaniu z liczbą pre-miRNA sugeruje, że płytki krwi dziedziczą większość swoich dojrzałych miRNA bezpośrednio z megakariocytów [259].

Co więcej, wykazano, że wiele płytkowych miRNA, w tym miR-10a, miR-27, miR-130a, miR-146a, miR-150, miR-221, miR-222 oraz miR-223, zaangażowanych jest w regulację procesu megakariopoezy [260]. Częsteczki miRNA regulują ważne funkcje fizjologiczne płytek krwi, takie jak zmianę kształtu, wydzielanie ziarnistości i agregację płytek [261]. Ple i wsp. zidentyfikowali ok 500 dojrzałych cząsteczek miRNA znajdujących się w płytkach krwi [259]. Natomiast Nagalla i wsp. [262] odkryli 284 transkryptów miRNA, z których 74 wykazywały odmienną ekspresję w zależności od stopnia reaktywności płytek. Z czego ekspresja siedmiu cząsteczek miRNA (miR-19b, miR-34b, miR-190, miR-320b, miR-320c, miR-320d) wykazała bardzo silną korelację ze stopniem odpowiedzi płytek na adrenalinę. Podczas gdy, Gatsiou i wsp. wskazali, iż cząsteczki miR-96, miR-200b, miR-495, miR-107 i miR-223 są zaangażowane w reaktywność płytek krwi, ich agregację, funkcje wydzielnicze oraz właściwości adhezyjne [263].

Rosnąca liczba publikacji dowodzi, że cząsteczki miRNA mogą odgrywać kluczową rolę w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej, w tym wpływać na rozwój reakcji autoimmunologicznych [264], jak również istotnie oddziaływać na proces demielinizacji w OUN [265]. W świetle powyższych doniesień potwierdzony został znaczący udział cząsteczek miRNA w rozwoju MS, jednakże brak jest jakichkolwiek danych dotyczących potencjalnej roli miRNA pochodzenia płytkowego.

# **CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA**

## **1. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU**

---

Stwardnienie rozsiane jest chorobą charakteryzującą się zmiennym przebiegiem klinicznym oraz zróżnicowanym obrazem patofizjologicznym, obejmującym m.in. zaburzenia naczyniowe związane z utratą integralności BBB.

Badania epidemiologiczne potwierdzają zaburzenia hemostazy naczyniowej wskazując na zwiększone ryzyko występowania incydentów niedokrwienych związanych z patologiczną aktywnością pro-zakrzepową płytek krwi u pacjentów z MS, szczególnie w fazie progresywnej PMS. Udział płytek w patogenezie MS obejmuje ich interakcje z leukocytami oraz komórkami śródbłonna, prowadzące do naruszenia BBB i infiltracji limfocytów do miejsc tworzenia się ognisk demielinizacji w OUN.

Istnieje stosunkowo niewiele badań dotyczących czynności płytek krwi w MS. Jednakże dostępne dane literaturowe potwierdzają nadmierną aktywację wewnątrznaczyniową płytek krwi oraz ich nadreaktywność w odpowiedzi na działanie agonistów. Poza wzmożoną funkcją hemostatyczną w MS, udowodniony został także udział płytek krwi w promowaniu procesów neurozapalnych. Przewlekły stan zapalny i wysoka aktywność procesów pro-oksydacyjnych to główne czynniki wskazywane dotychczas jako potencjalna przyczyna nadmiernej aktywności płytek w MS.

Badania zaplanowane w niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy nadają nowy kierunek poszukiwań genezy nadaktywności płytek krwi w MS, koncentrując się na określeniu podłoża genetycznego, zarówno na poziomie płytek krwi jak i ich komórek macierzystych – megakariocytów. Poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania płytek krwi w MS może przyczynić się do zdefiniowania nowych celów terapii skierowanej na te komórki stanowiące istotny element patogenezy MS.

## **2. CEL PRACY**

---

### **2.1. Cel nadrzędny**

Nadrzędnym celem pracy jest poznanie molekularnego podłoża podwyższonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi występującej u pacjentów z PMS.

### **2.2. Cele szczegółowe**

#### **2.2.1. Ocena stanu czynnościowego płytek krwi poprzez:**

- określenie stopnia aktywacji płytek krwi w krwi pełnej metodą cytometrii przepływownej,
- pomiar stężenia receptorów P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA,
- pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR,
- cytometryczne oznaczenie stopnia reaktywności płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub>, poprzez pomiar fosforylacji białek VASP,
- pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących biomarkery miażdżycy w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR,
- określenie korelacji ekspresji (na poziomie mRNA oraz białka) płytkowego receptora PAR-1 z poziomem biomarkerów miażdżycy (ekspresja mRNA dla genów kodujących ApoA1 (*APOA1*) oraz  $\alpha$ 2M (*A2M*)).

#### **2.2.2. Analiza zmian molekularnych fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach poprzez:**

- pomiar stężenia fibrynogenu w płytkach krwi, megakariocytach oraz w osoczu metodą ELISA,
- oznaczenie poziomu mRNA dla genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach,
- identyfikację potencjalnych PTMs łańcuchów ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS (chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas),
- analizę zmian sekwencji genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogenu.

### **2.2.3. Ocena molekularnych zmian $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny, jako kluczowych białek cytoszkieletu płytek krwi i megakariocytów poprzez:**

- pomiar stężenia  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA,
- pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących  $\beta$ -tubulinę oraz  $\beta$ -aktynę w płytkach krwi i megakariocytach metodą qPCR,
- identyfikację potencjalnych PTMs  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS,
- analizę zmian sekwencji genu kodującego  $\beta$ -tubulinę.

### **2.2.4. Ocena profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach poprzez:**

- ilościową analizę metodą mikromacierzy,
- ilościową walidację wyników metodą qPCR.

### **2.2.5. Ocena funkcjonalności mitochondriów w płytkach krwi poprzez:**

- ocenę potencjału błony mitochondrialnej płytek krwi z zastosowaniem sondy JC-1,
- pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu tlenowego w płytkach krwi metodą qPCR,
- oznaczenie poziomu RFT w płytkach krwi z zastosowaniem sondy H<sub>2</sub>DCF-DA.

### 3. MATERIAŁY I METODY

---

#### 3.1. Materiały

##### **Materiał badawczy:**

Materiał badawczy stanowiła świeża krew pełna pochodząca od pacjentów ze stwierdzoną postępującą postacią stwardnienia rozсіяnego (PMS) pobierana do probówko-strzykawk S-Monovette® (Sarstedt, Nümbrecht, Niemcy) z antykoagulantem CPDA-1 (ang. *Citrate Phosphate Dextrose Adenine*) (o składzie: cytrynian trójsodowy, kwas cytrynowy, glukoza, dwuwodorofosforan sodowy, adenina) oraz od zdrowych dawców pobierana do probówek BD Vacutainer® (Becton Dickinson, New Jersey, Stany Zjednoczone) z antykoagulantem ACD-A (ang. *Acid Citrate Dextrose – Solution A*) (o składzie: cytrynian trójsodowy, kwas cytrynowy oraz glukoza). Z krwi pełnej otrzymane zostało również osocze bogatopłytkowe (ang. *Platelet-Rich Plasma*, PRP), osocze ubogopłytkowe (ang. *Platelet-Poor Plasma*, PPP), płytki krwi oraz megakariocyty.

##### **Grupa badana:**

Do badań włączono 50 pacjentów z PMS w wieku ( $52,3 \pm 10,4$ ), którzy byli rehabilitowani na Oddziale Rehabilitacji Neurologicznej Miejskiego Centrum Medycznego im. Karola Jonschera, znajdującego się przy ul. Milionowej 14 w Łodzi. Wszyscy pacjenci poddani zostali diagnostyce neuroobrazowej – badaniu rezonansem magnetycznym (ang. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI), w celu zobrazowania obecnych zmian demielinizacyjnych, ich charakteru i lokalizacji w różnych obszarach mózgu i rdzenia kręgowego. U każdego pacjenta oceniono stopień niepełnosprawności na podstawie rozszerzonej skali niewydolności ruchowej Kurtzkego (ang. *Expanded Disability Status Scale*, EDSS) oraz przeprowadzono wywiad, na podstawie którego oszacowano poziom depresji według skali depresji Becka (ang. *Beck Depression Inventory*, BDI). W trakcie pobytu w szpitalu pacjentom nie podawano terapii immunomodulacyjnej, hormonów, suplementów wykazujących właściwości przeciwzakrzepowe oraz antyoksydacyjne.

##### **Grupa kontrolna:**

Grupę kontrolną stanowiło 50 ochotników bez przewlekłych i/lub ostrych stanów zapalnych, u których nie stwierdzono żadnych zaburzeń ze strony OUN oraz układu sercowo-naczyniowego. Zdrowi dawcy stanowili grupę homogeną względem płci (60% kobiet) oraz wieku ( $49 \pm 11,2$  lat) z grupą badaną. Krew pełna pobierana była w Centrum Diagnostyki Laboratoryjnej (CDL) znajdującym się przy ul. Jaracza 85 w Łodzi. W celu doboru prawidłowej grupy kontrolnej, w krwi oznaczono parametry morfologii i biochemii, włączając do badań osoby, u których wartości mierzonych parametrów mieściły się w zakresach referencyjnych. Ponadto zostały wykonane badania



w kierunku wykluczenia stanu zapalnego: odczyn Biernackiego (OB), białko C-reaktywne (ang. *C-Reactive Protein, CRP*), zaburzeń układu krzepnięcia: czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (ang. *Activated Partial Thromboplastin Time, APTT*), fibrynogen, czas trombinowy (ang. *Thrombotic Time, TT*), czas protrombinowy (ang. *Prothrombotic Time, PT*).

Charakterystyka kliniczna obu grup zawarta jest w **Tab. 2**.

**Tabela 2.** Charakterystyka kliniczna ochotników oraz pacjentów z PMS. Parametry wraz z zakresami referencyjnymi wyrażono jako wartość średnią  $\pm$  SD

Mierzone parametry wraz z zakresami referencyjnymi	Grupa kontrolna (n = 50)	PMS (n = 50)
<b>Wiek</b> (lata $\pm$ SD)	49 $\pm$ 11,2	48,6 $\pm$ 12,5
<b>Płeć</b> (K – Kobiety; M – Mężczyźni)	30 (K); 20 (M)	29 (K); 21 (M)
Punkty w skali <b>EDSS</b> (0-10 pkt) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1–4,5 – od lekkiej do średniej niepełnosprawności</li> <li>• 5–9,5 – od umiarkowanej do ciężkiej niepełnosprawności</li> <li>• 10 – śmierć spowodowana chorobą</li> </ul>	ND.	5,5 $\pm$ 1,9
Punkty w skali <b>BDI</b> (1-40 pkt) <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1–9 – brak depresji</li> <li>• 10–15 – pierwsze objawy depresji</li> <li>• 16–31 – łagodna depresja</li> <li>• 32–47 – umiarkowana depresja</li> <li>• Ponad 47 – ciężka depresja</li> </ul>	ND.	9,6 $\pm$ 4,6
Średni czas trwania choroby [lata $\pm$ SD]	ND.	14,5 $\pm$ 8,1
<b>BMI</b> (ang. <i>Body Mass Index</i> ) [kg/m <sup>2</sup> $\pm$ SD] <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;18,5 – niedowaga</li> <li>• 18,5–24,9 – waga prawidłowa</li> <li>• 25–29,9 – nadwaga</li> <li>• 30 i więcej – otyłość</li> </ul>	22,3 $\pm$ 5,1	21,5 $\pm$ 9,5
<b>Liczba płytek krwi</b> (130–400 $\times$ 10 <sup>3</sup> / $\mu$ l)	259 $\pm$ 68	321,9 $\pm$ 43

ND. – nie dotyczy

Wszystkie badania wykonane zostały zgodnie z Deklaracją Helsińską i zostały zatwierdzone przez Etyczny Komitet Uniwersytetu Medycznego w Łodzi RNN/260/08/KB. Na badania uzyskano również zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Łódzkiego Nr 5/KBBN-UŁ/II/2013 oraz Nr 15/KBBN-UŁ/II/2016.

## STOSOWANE ODCZYNNIKI I ZESTAWY KOMERCYJNE:

Odczynnik chemiczny/Zestaw komercyjny	Firma	Miasto, Kraj
Chrono-Par® ADP Reagent, Chrono-Par® Collagen	Chrono-Log Corporation	Havertown, Stany Zjednoczone
<b>Cytometria przepływowa:</b> BD FACSTM Lysing Solution, BD CellFIX™, mysie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu antygenowi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• CD61/FITC</li> <li>• CD45/PE</li> <li>• CD62P/PE</li> </ul>	BD Biosciences	San Jose, Kalifornia, Stany Zjednoczone
<b>Izolacja płytek krwi i megakariocytów:</b> Kuleczki magnetyczne MicroBeads opłaszczane przeciwciałami monoklonalnymi: <ul style="list-style-type: none"> <li>• anty-CD45</li> <li>• anty-CD61</li> <li>• anty-CD235a</li> </ul>	MACS Miltenyi Biotec,	Bergisch Gladbach, Niemcy
<b>Synteza cDNA:</b> Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR  <b>Ekspresja mRNA:</b> TaqMan™ Universal Master Mix II No UNG, Sondy TaqMan™: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>18SrRNA</i> (Hs99999901_s1)</li> <li>• <i>FGA</i> (Hs00241027_m1)</li> <li>• <i>FGB</i> (Hs00170586_m1)</li> <li>• <i>FGG</i> (Hs00241037_m1)</li> <li>• <i>P2RY12</i> (Hs01881698_s1)</li> <li>• <i>ITGA2B</i> (Hs00166246_m1)</li> <li>• <i>ITGB3</i> (Hs01001469_m1)</li> <li>• <i>F2R</i> (Hs05045041_s1)</li> <li>• <i>MTCO-1</i> (Hs02596864_g1)</li> <li>• <i>GAPDH</i> (Hs02786624_g1)</li> <li>• <i>TUBB1</i> (Hs00917771_g1)</li> <li>• <i>ACTB</i> (Hs010606658_s1)</li> </ul> <b>Synteza mikro cDNA:</b> TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit  <b>Ekspresja miRNA:</b> TaqMan™ Fast Advance Master Mix, Sondy TaqMan™ : <ul style="list-style-type: none"> <li>• miR-15b-5p (478313_mir)</li> <li>• miR-126-3p (477887_mir)</li> <li>• miR-26a-5p (477995_mir)</li> <li>• miR-199a-3p (477961_mir)</li> <li>• miR-191-5p (477952_mir) (endogenna control)</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone
<b>Sondy fluorescencyjne:</b> JC-1 (jodek tetraetylobenzimidazolilokarbocyaniny), H <sub>2</sub> DCF-DA (dioctan 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceiny)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> x 10H <sub>2</sub> O, NaCl, NaOH, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O, CH <sub>3</sub> COOH, CH <sub>3</sub> COONa, MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	POCH S.A.	Gliwice, Polska
RNAlater	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornia, Stany Zjednoczone

Sepharose-2B, glicyna, BSA, TRAP, bromocyjanek, HEPES, glukoza, chlorek potasu, mocznik, tiomocznik, CHAPS, Tris, glicerol, $\beta$ -ME, proteinaza K, chlorowodorek guanidyny, DTT, jodoacetamid, acetonitryl, kwas mrówkowy, woda z 0,1% (v:v) TFA	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, Stany Zjednoczone
Molecular Grade Water	Corning	New York, Stany Zjednoczone
<b>Pomiar stężenia białek oraz oczyszczanie białek:</b> Affi-Gel Blue Gel, RCDC Protein Assay Kit, 2-D Cleanup Kit	Bio-Rad Laboratories	Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone
<b>Mikromacierz miRNA:</b> microRNA Spike-In Kit (Labelling Spike-In, Hyb Spike-In, Dilution Buffer), miRNA Complete Labelling and Hyb Kit, Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornia, Stany Zjednoczone
PLTVASP/P2Y12	BioCytex	Marsylia, Francja
<b>Izolacja całkowitego RNA:</b> Isolate II RNA Mini Kit	Bioline	Londyn, Wielka Brytania
<b>Izolacja DNA:</b> QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden, Niemcy
<b>Pomiar immunoenzymatyczny:</b> Human Fibrinogen SimpleStep ELISA® Kit, Human Fibrinogen ELISA® Kit	Abcam	Cambridge, Wielka Brytania
Human P2Y12 (P2Y purinoceptor 12) ELISA Kit, Human GPIIb/IIIa (Platelet Membrane Glycoprotein IIb/IIIa complex) ELISA Kit, Human F2R (Proteinase-activated receptor 1) ELISA Kit	Fine Test	Wuhan, Chiny
Human ACTB (Actin beta chain) ELISA Kit Human TUBB (Tubulin beta chain) ELISA Kit	Elabscience	Houston, Teksas, Stany Zjednoczone
<b>Sekwencjonowanie DNA:</b> MiSeq® Reagent Kit v3 (Incorporation Buffer I PE, MiSeq® Flow Cell), AmpliSeq™ Library PLUS for Illumina®, bufor Low TE, AmpliSeq™ CD Indexes, Set A for Illumina®	Illumina	San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone
<b>Pomiar fluorescencyjny stężenia:</b> Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, Qubit™ RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone
QuantiFluor® dsDNA System	Promega	Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone
<b>LC-MS/MS:</b> Prekolumna RP-18 (nanoACQUITY Symmetry® C18 – Waters 186003514), kolumna nano-HPLC RP-18 (nanoACQUITY BEH C18 – Waters 186003545),	Waters	Milford, Massachusetts, Stany Zjednoczone
Modyfikowana trypsyna	Promega	Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Metody preparatywne

#### 3.2.1.1. Izolowanie płytek krwi metodą filtracji żelowej na złożu Sepharose 2B-BSA

##### Zasada metody:

Płytki krwi jako najmniejsze elementy krwi obwodowej są bardzo wrażliwe na zmiany warunków środowiska, w którym się znajdują. Odpowiedzią na te zmiany jest ich nagła i masowa aktywacja. Z tego względu właściwa izolacja płytek krwi jest pierwszym i kluczowym warunkiem umożliwiającym prawidłowe przeprowadzenie metod analitycznych. Za jedną z najmniej inwazyjnych metod izolowania płytek krwi uważa się filtrację żelową na kolumnie wypełnionej złożem Sepharose-2B, które jest równomiernie i gęsto usieciowane albuminą wołową (ang. *Bovine Serum Albumin*, BSA), co uniemożliwia kontakt płytek krwi z powierzchnią żelu, która doprowadziłaby do ich aktywacji.

Przygotowanie żelu Sepharose 2B-BSA wymaga aktywacji Sepharose 2B za pośrednictwem bromocyjanianu, a następnie związania ligandu białkowego. W trakcie aktywacji złoża Sepharose 2B w wyniku reakcji bromocyjanianu z grupami hydroksylowymi cząsteczek żelu powstają estry cyjaninowe, które są silnie reaktywne wobec grup aminowych, dzięki czemu możliwe jest przyłączenie się BSA do złoża. Podczas przepływu PRP przez żel Sepharose 2B-BSA dochodzi do rozdziału składników PRP zgodnie z ich wielkością. Ze względu na rozmiar płytki krwi nie mogą wnikać w niewielkie porowatości ziaren złoża i przepływają przez kolumnę jako pierwsze. Natomiast białka osoczowe penetrują porowatości żelu i ich przepływ przez kolumnę jest spowolniony.

##### Material badawczy:

Świeża krew pełna pobrana na CPDA-1 oraz ACD-A od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

##### Odczynniki:

- Złoże Sepharose 2B-BSA
- Zmodyfikowany bufor Tyroda (pH 7,4) (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 5 mM glukoza, woda dejonizowana)

##### Sprzęt laboratoryjny:

Spektrofotometr Helios α (Uniq)

### **Składniki do przygotowania złoża Sepharose 2B-BSA:**

- Sepharose 2B
- 0,1 M bufor octanowy w 1 M NaCl (pH 4,0)
- 0,5 M bufor fosforanowy (pH 11,5)
- 0,1 M bufor boranowy (pH 8,3)
- BSA (20 mg/ml) w 0,1 M buforze boranowym (inaktywacja przez 12 godz. w temp. 56°C)
- Wodny roztwór bromocyjanianu (100 mg/ml)
- 0,2 M roztwór glicyny w 0,1 M buforze boranowym
- 20% roztwór etanolu

### **Przygotowanie buforów:**

#### 0,1 M bufor octanowy w 1 M NaCl (pH 4,0):

- 5,8 ml  $\text{CH}_2\text{COOH}$  (odczynnik A) uzupełniono wodą dejonizowaną do 500 ml,
- 8,2 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (odczynnik B) rozpuszczono w 500 ml wody dejonizowanej.

Zmieszano 205 ml odczynnika A z 45 ml odczynnika B, a następnie dodano 29 g NaCl i uzupełniono wodą dejonizowaną do 500 ml.

#### 0,5 M bufor fosforanowy (pH 11,5):

Odważono 89,535 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i rozpuszczono w 300 ml wody dejonizowanej, a następnie za pomocą 0,5 M NaOH doprowadzono do pH 11,5 i uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 500 ml.

#### 0,1 M bufor boranowy (pH 8,3):

- 37,2 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 8,7 g NaCl rozpuszczono w 3000 ml wody dejonizowanej (odczynnik A),
- 38,2 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$  rozpuszczono w 2000 ml wody dejonizowanej (odczynnik B).

Zmieszano 3000 ml odczynnika A z 2000 ml odczynnika B.

### **Wykonanie:**

1. Złoże Sepharose 2B-BSA 2-krotnie odpłukano z konserwantu wodą dejonizowaną. Po każdym odpłukaniu złoże wirowano (500 obr./3 min./25°C) oraz odstawiono do opadnięcia osadu.
2. Złoże (4,5 ml) nawarstwiono porcjami, upakowano na kolumnie. Następnie upakowane w kolumnie złoże przemyto 3-krotnie ogrzanym do 37°C buforem Tyroda.
3. Na złoże Sepharose 2B-BSA porcjami naniesiono 2,5 ml PRP, a następnie dodano bufor Tyroda.
4. Gdy krople eluatu zmieniły wygląd z przezroczystych na opalizujące rozpoczęto zbieranie eluatu (płytki krwi) i kontynuowano do momentu zażółcenia spływających kropli.
5. Każdorazowo, w zebranych eluacie oznaczano liczbę płytek krwi metodą spektrofotometryczną w czytniku Helios  $\alpha$  UNIQA przy  $\lambda = 800$  nm, po czym otrzymaną zawiesinę doprowadzano ogrzanym do temp. 37°C zmodyfikowanym buforem Tyroda do miana  $4 \times 10^8$  płytek/ml.

### **3.2.1.2. Izolowanie płytek krwi metodą wirowania różnicowego**

#### **Zasada metody:**

Wirowanie frakcjonujące w oparciu o szybkość sedymentacji (wirowanie różnicowe) to metoda polegająca na rozdzielaniu mieszaniny na frakcje przez wprowadzenie mieszaniny w ruch obrotowy przy zastosowaniu wirówki. Podczas rozdzielania elementów morfotycznych metodą wirowania różnicowego krwi, komórki cięższe są odrzucane z większą siłą ku obwodowi, a następnie przechodzą do osadu, a komórki lżejsze układają się w warstwie bliższej osi obrotu, co pozwala im utrzymać się w mieszaninie. Każdorazowo, uzyskany supernatant ponownie odwirowuje się przy zwiększonej sile odśrodkowej i/lub czasie wirowania. W celu wyizolowania płytek krwi warunki wirowania zostały dopasowane w taki sposób, aby w trakcie wirowania erytrocyty i leukocyty osadziły się na dnie probówek-strzykawkki, zaś płytki krwi pozostały we frakcji PRP.

Uzyskane osocze zostało następnie oczyszczone z pozostałości erytrocytarno-leukocytarnych z zastosowaniem kuleczek magnetycznych na kolumnie separacyjnej. Wnętrze kolumnienki pokryte jest powłoką złożoną z kulek ferromagnetycznych, dzięki której możliwa jest precyzyjna oraz szybka separacja komórek CD45- oraz CD235a- pozytywnych na kolumnie. Antygen CD235a ulega ekspresji na dojrzałych erytrocytach i komórkach prekursorowych erytrocytów, zaś antygen CD45 obecny jest na leukocytach.

#### **Material badawczy:**

Świeża krew pełna pobrana na CPDA-1 oraz ACD-A od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### **Zastosowane odczynniki:**

- Zmodyfikowany bufor Tyroda (pH 7,4) (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 5 mM glukoza, woda)
- Kuleczki magnetyczne MicroBeads: anty-CD45 oraz anty-CD235A
- Bufor lizujący (7 M mocznik, 2 M tiomocznik, 4% CHAPS, 30 mM Tris)
- RNAlater

#### **Sprzęt laboratoryjny:**

- Kolumnienki (rozmiar S) z powłoką ferromagnetyczną
- Metalowy statyw (MACS MultiStand)
- Magnesy (Mini MACS Separator)

### **Wykonanie:**

1. Świeżą krew pełną wirowano (1200 obr./12 min./25°C) w celu uzyskania PRP.
2. Po odwirowaniu zebrano PRP do sterylnej probówki, a pozostałą krew odwirowano na PPP (4500 obr./12 min./25°C) i zamrożono w celu dalszych analiz proteomicznych.
3. Uzyskane osocze PRP inkubowano przez 5 min. w temp. 37°C wraz z kuleczkami MicroBeads sprzężonymi ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi: anty-CD45 (15 µl) skierowanymi na antygen leukocytarny oraz anty-CD235A (20 µl) skierowanymi na glikoforynę A obecną na błonie erytrocytów, a następnie tak wyznakowane osocze nakładano porcjami na kolumienkę.
4. Oczyszczone na kolumienke PRP zostało rozdzielone na dwie równe porcje. Obie porcje osocza odwirowano (2200 obr./12 min./25°C), supernatant usunięto, a następnie osady płytkowe przemyto 3-krotnie ogrzanym do temp. 37°C zmodyfikowanym buforem Tyroda. Jedną pulę osadu płytkowego zawieszono w 1000 µl RNAlater, zaś drugą w 250 µl buforu lizującego. Obie zawiesiny płytek krwi zamrożono w temp. -32°C w celu dalszych analiz, odpowiednio transkryptomocnych oraz proteomicznych.

#### **3.2.1.3. Izolowanie megakariocytów metodą separacji magnetycznej**

##### **Zasada metody:**

Technologia MACS® MicroBead firmy Miltenyi Biotec jest wiodącą metodą izolacji, umożliwiającą magnetyczną separację wybranych populacji komórek w oparciu o antygeny powierzchniowe znakowane specyficznymi przeciwciałami sprzężonymi z kulkami superparamagnetycznymi (MicroBeads). Izolację megakariocytów z krwi pełnej przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie za pomocą metody wirowania frakcjonującego w gradencie stężeń uzyskano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs). W drugim etapie, spośród wyizolowanych PBMCs za pomocą wysokoczułej metody separacji magnetycznej została wyselekcjonowana populacja megakariocytów (komórek CD61-pozytywnych) wyznakowanych magnetycznie mikrokulkami anty-CD61. Następnie, zawiesinę komórek naniesiono na kolumnę MACS®, która umieszczona jest w polu magnetycznym separatora MACS. Wygenerowane pole magnetyczne skutecznie zatrzymuje komórki oznaczone małymi nanowymiarowymi kulkami, zaś niewyznakowane komórki (CD61-negatywne) przepływają swobodnie przez kolumnę. Po usunięciu kolumny z pola magnetycznego, pozytywnie wyselekcjonowana frakcja komórek może być w łatwy sposób eluowana wraz z nałożonym buforem reakcyjnym poprzez wygenerowanie silnego podciśnienia za pomocą tłoczka

kolumnienki. Ilość komórek CD61-pozytywnych każdorazowo oznaczano cytometrycznie poprzez wyznakowanie zawiesiny komórek odpowiednio przeciwciałami anti-CD61-FITC (anti-CD61 sprzężone z FITC) oraz anti-CD42/PE (anti-CD42 sprzężone z PE).

#### **Material badawczy:**

Świeża krew pełna pobrana na CPDA-1 oraz ACD-A od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### **Odczynniki:**

- Zmodyfikowany bufor Tyroda (pH 7,4) (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 5 mM glukoza, woda dejonizowana)
- Gradisol G
- Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) (pH 7,4)
- Bufor reakcyjny (pH 7,4) (2 mM EDTA, 0,5% BSA, PBS o pH 7,4)
- Kuleczki magnetyczne sprzężone z przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD61 (MicroBeads)
- Bufor lizujący (7 M mocznik, 2 M tiomocznik, 4% CHAPS, 30 mM Tris)
- RNAlater

#### **Sprzęt laboratoryjny:**

- Kolumnienki (rozmiar L) z powłoką ferromagnetyczną
- Metalowy statyw (MACS MultiStand)
- Magnes (Mini MACS Separator)

#### **Wykonanie:**

1. Świeżą krew pełną nawarstwiono porcjami (w stosunku 1:1) na preparat Gradisol G, a następnie wirowano (2000 obr./30 min./25°C). Po odwirowaniu, górną warstwę osocza zlano, kożuszek leukocytarny wraz z frakcją PBMCs zebrano za pomocą pipety i przeniesiono do nowych probówek.
2. Zebraną zawiesinę PBMCs uzupełniono równą objętością sterylnego PBS (pH 7,4) i odwirowano (1600 obr./12 min./25°C). Supernatant odrzucono. Powtórzono pkt. 2.
3. Osad PBMCs zawieszono w 100 µl buforu reakcyjnego oraz inkubowano przez 15 min. w temp. 4°C z kuleczkami magnetycznymi MicroBeads opłaszczonymi przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD61 (20 µl).
4. Po upływie czasu inkubacji dodano 2 ml buforu reakcyjnego i próbkę wirowano (1400 obr./10 min./25°C). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 500 µl buforu reakcyjnego.
5. Zawiesinę komórek CD61-pozytywnych naniesiono w objętości 500 µl na kolumnienkę i przeprowadzono separację magnetyczną przy użyciu statywu oraz separatora magnetycznego.



6. Kolumnkę usunięto z pola magnetycznego w celu uwolnienia nanokuleczek przyciąganych przez magnes, naniesiono 500  $\mu$ l buforu reakcyjnego i za pomocą tłoczka kolumnki wymyto megakariocyty razem z buforem reakcyjnym do czystej probówki typu Eppendorf.
7. Otrzymaną zawiesinę megakariocytów w buforze reakcyjnym rozdzielono na dwie równe części. Obie porcje zawiesiny odwirowano (5000 obr./3 min./25°C), supernatant usunięto, a następnie osady megakariocytów przemyto 3-krotnie sterylnym PBS. Do jednej z nich dodano 500  $\mu$ l RNAlater, zaś do drugiej 250  $\mu$ l buforu lizującego i zamrożono w temp. -32°C w celu dalszych analiz, odpowiednio transkryptomicznych oraz proteomicznych.

#### **3.2.1.4. Izolacja całkowitego RNA z płytek krwi i z megakariocytów**

##### **Zasada metody:**

Izolację całkowitego RNA z płytek krwi oraz megakariocytów (w tym mRNA i miRNA) przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu Isolate II RNA Mini Kit. Zestaw ten zawiera komplet odczynników umożliwiających procesy inaktywacji RNaz oraz stabilizację cząsteczek RNA, przy jednoczesnym oddzieleniu białek i DNA. W pierwszym etapie komórki poddawane są lizie z zastosowaniem buforu lizującego (bufor RLY) z dodatkiem  $\beta$ -merkaptoetanolu (ang.  *$\beta$ -Mercaptoethanol*,  $\beta$ -ME). W celu homogenizacji próbki, do lizatu dodaje się 70% etanolu. Uzyskany homogenat przenoszony jest na mikrokolumnkę, która następnie zostaje odwirowana. Po tym etapie na membranę mikrokolumnki dodaje się bufor odsalający (bufor MEM), a mikrokolumnka ponownie jest odwirowana. Następnie, na membranę mikrokolumnki dodaje się mieszaninę DNazy z buforem reakcyjnym (bufor RDN). Kończącym etapem jest oczyszczanie całkowitego RNA z soli, składników komórkowych i metabolitów poprzez dwuetapowe przemywanie membrany mikrokolumnki za pomocą buforów RW1 oraz RW2. Oczyszczony całkowity RNA następnie jest wymywany z mikrokolumnki za pomocą wody wolnej od RNaz.

Wyizolowany RNA wykorzystywano do syntezy cDNA (na matrycy mRNA lub miRNA) w procesie odwrotnej transkrypcji, po wcześniejszej analizie ilościowej i jakościowej wyizolowanego materiału. Stężenie oraz czystość pojedynczych próbek RNA oznaczano na spektrofotometrze Synergy HIT (Biotek) na płytkach Take3<sup>TM</sup> Micro – Volume Plate, mierząc absorbancję przy długości fali 260 nm (maksimum absorpcji dla DNA i RNA) i 280 nm (maksimum absorpcji dla białka). Następnie obliczano wartość współczynnika A260/A280.

Wolny od zanieczyszczeń RNA charakteryzuje się wartością współczynnika A260/A280 wynoszącą około 2. Wartość absorbancji próbki czystego RNA (mierzonej przy długości fali 260 nm w kuwecie o długości 1 cm) wynosząca 1 odpowiada stężeniu RNA ( $C_{RNA}$ ) równemu 40  $\mu\text{g/ml}$ .

### **Material badawczy:**

Zawieszone w RNAlater mrożone płytki krwi oraz megakariocyty od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

### **Odczynniki:**

Zawartość zestawu Isolate II RNA Mini Kit (Bioline):

- Bufor RLY – bufor do lizy komórek
- Etanol 70%
- Bufor MEM – bufor odsalający membranę
- Bufor RDN – bufor reakcyjny
- DNaza – enzym trawiący DNA
- Bufory przemywające RW1 i RW2
- Woda wolna od RNaz
- $\beta$ -ME

### **Sprzęt laboratoryjny:**

Spektrofotometr Synergy HIT (Biotek)

### **Wykonanie:**

1. Do osadu komórek dodano mieszaninę buforu RLY z  $\beta$ -ME (350  $\mu\text{l}$  buforu RLY i 3,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -ME), następnie próbki zworteksowano. Uzyskane lizaty naniesiono na mikrokolumnkę (ISOLATE II Filter) umieszczoną w probówce zbiorczej i wirowano (11000 obr./1 min./25°C).
2. Do przesączu w probówce zbiorczej dodano 350  $\mu\text{l}$  etanolu (70%) w celu homogenizacji lizatu. Próbkę wymieszano poprzez intensywne pipetowanie.
3. Zhomogenizowany przesącz naniesiono na nową mikrokolumnkę umieszczoną w probówce zbiorczej i wirowano (11000 obr./1 min./25°C).
4. Na mikrokolumnkę naniesiono 350  $\mu\text{l}$  buforu MEM, następnie wirowano (11000 obr./1 min./25°C). Przesącz odrzucono.
5. Bezpośrednio na środek membrany krzemionkowej znajdującej się w mikrokolumnce naniesiono 95  $\mu\text{l}$  mieszaniny DNazy z buforem RDN (stock roboczy mieszaniny składał się z 10  $\mu\text{l}$  DNazy i 90  $\mu\text{l}$  RDN) i inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej.
6. I przemywanie: na mikrokolumnkę naniesiono 200  $\mu\text{l}$  buforu przemywającego RW1, następnie wirowano (11000 obr./1 min./25°C). Przesącz odrzucono.

7. II przemywanie: na mikrokolumnienkę naniesiono 600 µl buforu RW2, następnie wirowano (11000 obr./1 min./25°C). Przesącz odrzucono.
8. III przemywanie: na mikrokolumnienkę naniesiono po raz drugi 250 µl buforu RW2, następnie wirowano (11000 obr./1 min./25°C). Przesącz odrzucono. Mikrokolumnienkę umieszczono w nowej probówce zbiorczej (probówka typu Eppendorf o obj. 1,5 ml).
9. Przeprowadzono elucję całkowitego RNA poprzez naniesienie 60 µl wody wolnej od RNaz prosto na membranę, a następnie wirowano (11000 obr./1 min./25°C).
10. Całkowite RNA zawieszono w wodzie wolnej od RNaz zostało wymyte z mikrokolumnienki i zamrożone w temp. -32°C w celu przechowania materiału do dalszej analizy transkrypcyjnej.

### **3.2.1.5. Synteza cDNA na matrycy mRNA**

#### **Zasada metody:**

Proces odwrotnej transkrypcji (ang. *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) umożliwia uzyskanie komplementarnej nici DNA (ang. *Complementary DNA*, cDNA) na matrycy RNA, dzięki aktywności enzymu odwrotnej transkryptazy. Reakcję RT-PCR przeprowadzono przy zastosowaniu zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR zgodnie z protokołem producenta. Zestaw wykorzystuje enzym Maxima Reverse Transcriptase, który charakteryzuje się wysoką termostabilnością (optimum aktywności w temp. 50°C) i zwiększoną szybkością syntezy cDNA. Zestaw ten umożliwia w bardzo krótkim czasie (15-30 min.) w podwyższonych temp. i przy bardzo małej ilości RNA (1 pg to 5 µg) uzyskanie zbioru cDNA komplementarnego do mRNA całego transkryptomu czyli tzw. bibliotekę cDNA.

#### **Materiał badawczy:**

Całkowite RNA (1 ng/ml) wyizolowane z płytek krwi i megakariocytów od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### **Odczynniki:**

Zestaw Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific):

- mieszanina enzymatyczna Maxima (odwrotna transkryptaza oraz inhibitor RNaz RiboLock),
- mieszanina reakcyjna (bufor reakcyjny, trifosforany deoksynukleozydowe (ang. *Deoxyribonucleotide Triphosphate*, dNTPs), oligo(dT)<sub>18</sub>, primery heksamerowe),
- woda wolna od RNaz.

### Sprzęt laboratoryjny:

Termocykler C1000™ (Bio-Rad)

### Wykonanie:

1. Do sterylnych, wolnych od RNaz probówek typu Eppendorf dodano w następującej kolejności poniżej wymienione składniki: mieszaninę reakcyjną, mieszaninę enzymatyczną, całkowite RNA oraz wodę wolną od RNaz (**Tab. 3**). Zawartość probówek dokładnie wymieszano poprzez pipetowanie.
2. Inicjacja reakcji następuje w temp. pokojowej przez 10 min., a następnie przez 15 min. w temp. 50°C dochodzi do wydłużania transkryptów. Terminacja reakcji (inaktywacja enzymu) zachodzi w temp. 85°C przez 5 min. (**Tab. 4**).
3. Biblioteki cDNA magazynowano w temp. -80°C.

**Tabela 3.** Składniki zestawu użytego do reakcji RT-PCR

Składniki zestawu:	Objętości [μl]
Mieszanina reakcyjna	4
Mieszanina enzymatyczna Maxima	2
Matrycowy RNA [1 ng/ml]	10
Woda wolna od RNaz	4
<b>Całkowita objętość</b>	<b>20</b>

**Tabela 4.** Warunki reakcji RT-PCR

Etap	Czas inkubacji	Temp.
Inicjacja	10 min.	25°C
Wydłużanie	15 min.	50°C
Inaktywacja enzymu	5 min.	85°C

### 3.2.1.6. Synteza mikro cDNA na matrycy miRNA

#### Zasada metody:

TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit zawiera gotowy zestaw odczynników przeznaczonych do syntezy mikro cDNA na matrycy miRNA przy użyciu standardowego termocyklera. W pierwszym etapie dojrzałe miRNA zawarte w puli wyizolowanego całkowitego RNA są modyfikowane przez wydłużenie końca 3' transkryptu poprzez dodanie ogonka poli(A), a następnie wydłużenie końca 5' przez ligację adapterów. W ten sposób zmodyfikowane cząsteczki miRNA podlegają następnie odwrotnej transkrypcji, po której następuje amplifikacja w celu namnożenia produktu, w postaci mikro cDNA dla wszystkich miRNA (reakcja miR-Amp).

**Material:**

Całkowite RNA (1 ng/ml) wyizolowane z płytek krwi i megakariocytów od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

**Odczynniki:**

Składniki zestawu TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (A28007):

- 10X Bufor Poli(A)
- 10 mM ATP
- 5 U/μl Enzym Poli(A)
- 5X Bufor dla ligazy DNA
- 10 U/μl Ligaza RNA
- 50% PEG 8000
- 25X Adaptor ligacji
- 5X Bufor RT
- 20X Uniwersalny Primer RT
- 100 mM dNTP Mix
- 10X RT enzyme mix
- 20X miR-Amp Primer Mix
- 2X miR-Amp Master Mix

**Sprzęt laboratoryjny:**

Termocykler C1000™ (Bio-Rad)

**Wykonanie:****1. Przyłączenie ogonka poli(A) – poliadenylacja końca 3' miRNA**

Próbki z całkowitym RNA i odczynniki do syntezy mikro cDNA (oprócz 50% PEG 8000) rozmrożono na lodzie. Po rozmrożeniu próbki zworteksowano na niskich obrotach i odwirowano. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji poliadenylacji zawarty jest w **Tab. 5**.

**Tabela 5.** Skład mieszaniny reakcyjnej do poliadenylacji

Składniki mieszaniny reakcyjnej do poliadenylacji	Objętość [μl] na jedną reakcję
10X bufor poli(A)	0,5
ATP	0,5
Enzym poli(A)	0,3
Woda wolna od RNaz	1,7
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>3,0 μl</b>

Do 2  $\mu\text{l}$  próbki całkowitego RNA dodano 3  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej do poliadenylacji. Następnie próbki poddano poliadenylacji w termocyklerze w warunkach reakcji przedstawionych w **Tab. 6**.

**Tabela 6.** Warunki reakcji poliadenylacji

Etapy	Temp.	Czas
Poliadenylacja	37°C	45 min.
Zakończenie reakcji	65°C	10 min.
Hold	4°C	-

## 2. Ligacja adaptera do końca 5' miRNA

Przygotowano mieszaninę reakcyjną do ligacji adaptera (**Tab. 7**).

**Tabela 7.** Skład mieszaniny reakcyjnej do ligacji adaptera

Składniki mieszaniny reakcyjnej do ligacji adaptera	Objętość [ $\mu\text{l}$ ] na jedną reakcję
5X bufor dla ligazy DNA	3
50% PEG 8000	4,5
25X Adaptor ligacji	0,6
Ligaza RNA	1,5
Woda wolna od RNaz	0,4
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

Do 5  $\mu\text{l}$  próbki dodano 10  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej do ligacji adaptera. Następnie ligację przeprowadzono w termocyklerze w warunkach reakcji przedstawionych w **Tab. 8**.

**Tabela 8.** Warunki reakcji ligacji adaptera

Etapy	Temp.	Czas
Ligacja	16°C	60 min.
Hold	4°C	-

## 3. RT-PCR

Przygotowano mieszaninę reakcyjną do reakcji odwrotnej transkrypcji (**Tab. 9**).

**Tabela 9.** Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji RT-PCR

Składniki mieszaniny reakcyjnej do RT-PCR	Objętość [ $\mu\text{l}$ ] na jedną reakcję
5X RT bufor	6
dNTP Mix	1,2
20X Uniwersalny RT Primer	1,5
10X RT enzyme mix	3
Woda wolna od RNaz	3,3
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>15 <math>\mu\text{l}</math></b>

Do 15 µl próbki dodano 15 µl mieszaniny reakcyjnej do RT-PCR. Następnie próbkę poddano reakcji w termocyklerze w warunkach przedstawionych w **Tab. 10**.

**Tabela 10.** Warunki reakcji RT-PCR

Etapy	Temp.	Czas
Odwrotna transkrypcja	42°C	15 min.
Zakończenie reakcji	85°C	5 min.
Hold	4°C	-

#### 4. Amplifikacja – reakcja miR-Amp

Przygotowano mieszaninę reakcyjną do amplifikacji (**Tab. 11**).

**Tabela 11.** Skład mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji

Składniki mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji	Objętość [µl] na jedną reakcję
2X miR-Amp Master Mix	25
20X miR-Amp Primer Mix	2,5
Woda wolna od RNaz	17,5
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>45 µl</b>

Do 5 µl próbki dodano 45 µl mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji. Następnie próbkę poddano amplifikacji w termocyklerze w warunkach przedstawionych w **Tab. 12**. Produkty amplifikacji zostały zamrożone w temp. -80°C i przechowywane do dalszej analizy qPCR.

**Tabela 12.** Warunki reakcji amplifikacji

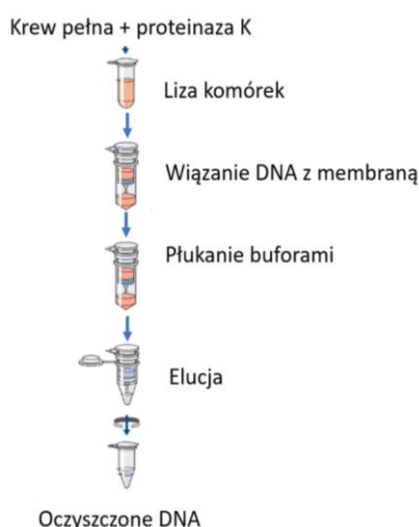
Etapy	Temp.	Czas	Cykle
Aktywacja enzymu	95°C	5 min.	1
Denaturacja	95°C	3 sek.	14
Wydłużanie	60°C	30 sek.	
Zakończenie reakcji	99°C	10 min.	1
Hold	4°C	-	1

#### 3.2.1.7. Izolacja DNA z krwi pełnej

##### Zasada metody:

Izolację DNA przeprowadzono z użyciem komercyjnego zestawu QIAamp DNA Mini Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Zestaw ten wykorzystuje technologię membrany krzemionkowej (technologia QIAamp) do izolacji i oczyszczania całkowitego (komórkowego i wolnokrążącego) DNA z krwi pełnej. Procedura QIAamp DNA Mini obejmuje 4 etapy: lizę komórek, adsorpcja DNA do membrany na mikrokolumie QIAamp Mini, kilkukrotne płukanie (oczyszczanie) i elucję DNA z kolumienki za pomocą rozgrzanego buforu.

Wolnokrążące kwasy nukleinowe obecne w płynach ustrojowych są zwykle związane z białkami lub zamknięte w pęcherzykach, co stwarza konieczność wykonania wydajnego etapu lizy w celu uwolnienia kwasów nukleinowych, które będą mogły swoiście związać się z mikrokolumnką QIAamp Spin Column. Z tego względu próbki są poddawane lizie w warunkach wysoce denaturujących w podwyższonych temp. w obecności proteiny K i buforu lizującego, co zapewnia inaktywację DNaz oraz uwolnienie kwasów nukleinowych od związanych z nimi białek, lipidów i struktur pęcherzykowych. Schemat przedstawiający etapy izolacji DNA z krwi pełnej prezentuje **Ryc. 2**.



**Rycina 2.** Etapy izolacji DNA z krwi pełnej

Stężenie wyizolowanego DNA zmierzono fluorymetrycznie za pomocą zestawu Qubit™ dsDNA HS Assay Kit na fluorymetrze Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Stężenie oraz czystość pojedynczych próbek DNA oznaczono na spektrofotometrze Synergy HIT na płytkach Take3™ Micro – Volume Plate, mierząc absorbancję przy długości fali 260 nm (maksimum absorpcji dla DNA i RNA) i 280 nm (maksimum absorpcji dla białka). Wolny od zanieczyszczeń DNA ma wartość współczynnika A260/A280 około 1,8-2,0.

#### **Material badawczy:**

Mrożona krew pełna od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### **Odczynniki:**

Odczynniki i elementy zawarte w zestawie do izolacji DNA QIAamp DNA Mini Kit:

- Proteinaza K
- Bufor lizujący (bufor AL)
- Bufor płuczący AW1
- Etanol 96-100%



- Bufor płuczący AW2
- Woda wolna od DNaz
- Mikrokolumnienki (QIAamp Mini Spin Column)

#### **Sprzęt laboratoryjny:**

- Fluorymetr Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher Scientific)
- Spektrofotometr Synergy HIT (Biotek)

#### **Wykonanie:**

1. Do 200 µl mrożonej krwi pełnej dodano 20 µl proteiny K, próbki zworteksowano i przeniesiono do sterylnej probówki typu Eppendorf (1,5 ml).
2. Do probówki z krwią mrożoną dodano 200 µl buforu lizującego (Bufor AL) i zworteksowano przez 15 sek.
3. Próbkę inkubowano w bloku grzejmym przez 10 min. w temp. 56°C. Po inkubacji próbki zworteksowano i odwirowano.
4. Do próbek dodano 200 µl etanolu 96-100%. Następnie próbki zworteksowano przez 15 sek. i odwirowano.
5. Próbkę naniesiono na mikrokolumnienkę (QIAamp Mini Spin Column) z probówką zbiorczą i wirowano 8000 obr. przez 1 min. Po odwirowaniu, mikrokolumnienkę przeniesiono do nowej, czystej probówki zbiorczej, a probówkę zawierającą przesącz odrzucono.
6. Na mikrokolumnienkę dodano 500 µl buforu AW1 i wirowano (8000 obr./1 min./20-25°C). Po odwirowaniu, mikrokolumnienkę przeniesiono do nowej, czystej probówki zbiorczej, a probówkę zawierającą przesącz odrzucono.
7. Na mikrokolumnienkę dodano 500 µl buforu AW2 i wirowano (14000 obr./3 min./20-25°C). Po odwirowaniu, mikrokolumnienkę przeniesiono do nowej, czystej probówki zbiorczej, a probówkę zawierającą przesącz odrzucono.
8. Mikrokolumnienkę przeniesiono do nowej, czystej probówki zbiorczej i odwirowano ponownie na maksymalnych obrotach przez 1 min. Przesącz odrzucono.
9. Mikrokolumnienkę przeniesiono do nowej probówki typu Eppendorf (1,5 ml) i dodano 200 µl wody wolnej od DNaz.
10. Próbkę inkubowano przez 1 min. w temp. pokojowej i wirowano (8000 obr./5 min./20-25°C).
11. Całkowite DNA zawieszony w wodzie wolnej od DNaz zostało wymyte z mikrokolumnienki i zamrożone w temp. -80°C w celu przechowania materiału do dalszej analizy.

## 3.2.2. Metody analityczne

### 3.2.2.1. Analiza czynnościowa płytek krwi metodą cytometrii przepływowej

#### Zasada metody:

Cytometria przepływowa jest metodą umożliwiającą wykrywanie i identyfikację komórkowych antygenów powierzchniowych za pomocą skierowanych do nich specyficznych przeciwciał wyznakowanych fluorescencyjnie. Komórki wyznakowane odpowiednimi przeciwciałami wraz z przyłączonymi fluorochromami zostają uszeregowane w cienki strumień, dzięki czemu możliwy jest ich laminarny przepływ w komorze pomiarowej. W trakcie przepływu pojedynczych komórek, fluorochromy ulegają wzbudzeniu, a intensywność fluorescencji odpowiada ekspresji danego antygeny. W cytometrze przepływowym na wyznakowane komórki pada wiązka światła laserowego, która umożliwia zróżnicowanie poszczególnych frakcji za pomocą trzech parametrów tj. wielkości komórek (parametr FSC), ziarnistości (parameter SSC) oraz poziomu fluorescencji (ang. *Fluorescence*, FL).

W celu identyfikacji płytek krwi zastosowano specyficzne mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu antygenowi CD61 (GPIIIa, integryna  $\beta 3$ ) sprzężone z FITC. Do identyfikacji P-selektyny, jako markera aktywacji płytek krwi, użyto mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu antygenowi CD62P, sprzężone z PE. Natomiast w celu wyodrębnienia populacji leukocytów użyto mysie przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiemu antygenowi CD45, sprzężone z PE. Każdorazowo wczytywano 15000 obiektów CD61-pozytywnych (płytki krwi) w celu określenia w tej puli komórek odsetka obiektów CD62P-pozytywnych, AGs, PMPs oraz PLCs.

Nakładanie się widm barwników fluorescencyjnych może prowadzić do uzyskania wyników zarówno fałszywie pozytywnych, jak i fałszywie negatywnych. W celu wyeliminowania sygnału pochodzącego od nakładania się widm emisji fluorescencji zastosowanych fluorochromów wykonano kompensację, która polega na przeprowadzeniu wstępnych pomiarów z wykorzystaniem użytych barwników (FITC i PE). Dodatkowo, wykonanie kontroli izotypowych pozwoliło wykluczyć niespecyficzne wiązanie się użytych przeciwciał. Próbkki kontrolne były wyznakowane mysimi IgG tej samej klasy, co przeciwciała diagnostyczne, sprzężonymi z odpowiednimi fluorochromami.

#### Material badawczy:

Świeża krew pełna pobrana na CPDA-1 oraz ACD-A od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

**Odczynniki:**

- ADP o stężeniu 20  $\mu\text{M}$  (2,5 mg liofilizowanego preparatu ADP rozpuszczono w 5 ml 0,9% NaCl w celu uzyskania stężenia wyjściowego 1 mM)
- TRAP o stężeniu 500  $\mu\text{M}$  (do 250  $\mu\text{g}$  liofilizatu TRAP dodano 280  $\mu\text{l}$  0,9% NaCl)
- BD FACS™ Lysing Solution (10X stęż. roztwór rozcieńczono 10-krotnie wodą destylowaną)
- BD CellFix™ (10X stężony roztwór rozcieńczono 10-krotnie wodą destylowaną)
- Przeciwciała monoklonalne: anti-CD61/FITC, anti-CD45/PE oraz anti-CD62P/PE
- Sterylny NaCl 0,9%

**Sprzęt laboratoryjny:**

Cytometr przepływowy – CyFlow® Cube 6 (Sysmex)

**Wykonanie:**

1. Do próbek (oznaczonych 1-11) typu Eppendorf (1,5 ml) wprowadzono po 100  $\mu\text{l}$  świeżej krwi pełnej, następnie do próbek nr 8, 9, 11 dodano wybranego agonisty, odpowiednio: 5  $\mu\text{l}$  ADP (20  $\mu\text{M}$ ) oraz po 10  $\mu\text{l}$  TRAP (500  $\mu\text{M}$ ). Próbkę z dodanym agonistą delikatnie zworteksowano.
2. Wszystkie próbki inkubowano przez 10 min. w temp. 37°C w cieplarni.
3. Po upływie czasu inkubacji do każdej próbki dodano po 900  $\mu\text{l}$  1% BD FACS™ Lysing Solution, w celu lizy błon erytrocytarnych, a następnie próbki zworteksowano i inkubowano przez 1 godzinę w temp. 37°C w cieplarni.
4. Do nowo przygotowanych próbek (oznaczonych 1-11) dodano po 6  $\mu\text{l}$  odpowiednich przeciwciał według formuły znakowania, która zawarta jest w **Tab. 13**. Następnie do nowych próbek z przeciwciałami dodano analogicznie po 75  $\mu\text{l}$  lizatów krwi pełnej (uzyskanych w pkt. 3), zworteksowano i inkubowano przez 30 min. w temp. pokojowej w ciemności.
5. W celu utrwalenia do każdej próbki dodano po 500  $\mu\text{l}$  1% BD CellFix™, zworteksowano, a następnie wirowano (62000 obr./12 min./25°C). Supernatant odrzucono, zaś osad zawieszono w 900  $\mu\text{l}$  sterylnego NaCl 0,9%.
6. Przygotowane próbki przechowywano w temp. 2-8°C, aż do momentu wykonania pomiaru w cytometrze przepływowym CyFlow® Cube 6. Wszystkie wyniki opracowano w programie CyView™: Initiative Software for CyFlow® Cube 6.

**Tabela 13.** Formuła znakowania próbek do analizy cytometrycznej

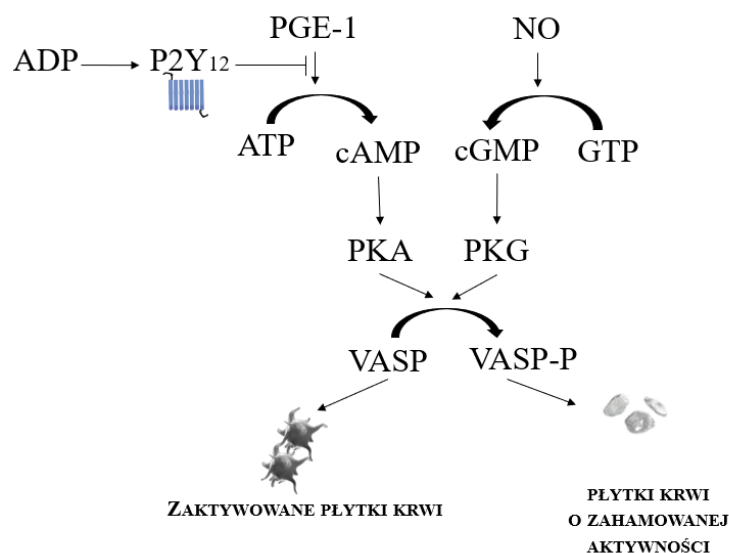
L.p.	Rodzaj zastosowanego przeciwciała monoklonalnego	Rodzaj układu	Rodzaj zastosowanego agonisty
1.	Brak	Kontrola negatywna	Brak
2.	Mysie IgG <sub>1</sub> /FITC	Kontrola izotypowa	Brak
3.	Mysie IgG <sub>1</sub> /PE	Kontrola izotypowa	Brak
4.	Anty-CD61/FITC	Kompensacja	Brak
5.	Anty-CD62P/PE	Kompensacja	Brak
6.	Anty-CD45/PE	Kompensacja	Brak
7.	anty-CD61/FITC + anty-CD62P/PE	AGs, PMPs, P-selektyna	Brak
8.	anty-CD61/FITC + anty-CD62P/PE	AGs, PMPs, P-selektyna	ADP
9.	anty-CD61/FITC + anty-CD62P/PE	AGs, PMPs, P-selektyna	TRAP
10.	anty-CD61/FITC + anty-CD45/PE	PLCs	Brak
11.	anty-CD61/FITC + anty-CD45/PE	PLCs	TRAP

### **3.2.2.2. Cytofluorymetryczna ocena stopnia reaktywności płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub> poprzez pomiar fosforylacji białek VASP**

#### **Zasada metody:**

Białka VASP należą do rodziny białek regulatorowych, które biorą udział w procesach opartych na reorganizacji cytoszkieletu, takich jak tworzenie się pseudopodiów i adhezja płytek krwi. Białka VASP stanowią główny substrat dla dwóch kinaz białkowych PKA i PKG, które fosforylują go w trzech obszarach: Ser<sup>157</sup>, Ser<sup>239</sup> oraz Thr<sup>278</sup>. Fosforylacja VASP w miejscu Ser<sup>157</sup> w odpowiedzi na czynniki rozkurczające zmniejsza zdolność tego białka do interakcji z aktywną oraz koreluje ze spadkiem aktywacji płytkowego receptora GPIIb/IIIa i z zahamowaniem agregacji płytek. Fosforylacja białek VASP regulowana jest przez szlak cAMP oraz cGMP, które są aktywowane przez czynniki wazodylatacyjne, odpowiednio: prostaglandynę E1 (ang. *Prostaglandin E1*, PGE1) oraz NO.

Aktywacja receptora P2Y<sub>12</sub> za pośrednictwem ADP hamuje wytwarzanie cAMP, co wpływa na zahamowanie fosforylacji białek VASP (**Ryc. 3**). Do oceny stopnia aktywności receptora P2Y<sub>12</sub> zastosowano wskaźnik reaktywności płytek (ang. *Platelet Reactivity Index*, PRI) obliczony na podstawie poziomu fosforylacji VASP.



**Rycina 3.** Szlak fosforylacji białek VASP

**Material badawczy:**

Świeża krew pełna pobrana na CPDA-1 oraz ACD-A od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

**Odczynniki:**

Zawartość zestawu PLTVASP/P2Y<sub>12</sub>:

- Reagent 1: Rozpuszczalnik
- Reagent 2a: PGE1 (rozpuszczono liofilizat w 400 µl wody destylowanej)
- Reagent 2b: PGE1 + ADP (rozpuszczono liofilizat w 400 µl wody destylowanej)
- Reagent 3: Utrwalacz
- Reagent 4a: Monoklonalne mysie przeciwciała anti-VASP-P
- Reagent 4b: Negatywna kontrola izotypowa (monoklonalne mysie przeciwciała) oraz odczynnik do permeabilizacji błony komórkowej
- Reagent 5: Zestaw do znakowania: poliklonalne mysie przeciwciała IgG-FITC oraz anti-CD61-PE oraz odczynnik do permeabilizacji błony komórkowej

**Sprzęt laboratoryjny:**

Cytometr przepływowy – CyFlow® Cube 6 (Sysmex)

**Wykonanie:**

1. Przygotowano zestaw 3 probówek cytometrycznych (T1, T2 oraz T3). Do probówki T1 dodano 10 µl odczynnika 2a, do probówek T2 i T3 dodano po 10 µl odczynnika 2b.
2. Do wszystkich probówek (T1, T2 oraz T3) dodano po 10 µl świeżej krwi pełnej. Probówki wortexowano (na wolnych obrotach) przez 1-2 sek., a następnie inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej. Po inkubacji do wszystkich probówek (T1, T2 oraz T3) dodano po 10 µl

odczynnika 3. Następnie próbki worteksowano (na wolnych obrotach) przez 1-2 sek., a następnie inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej.

3. Do probówki T1 oraz T2 dodano po 10 µl odczynnika 4a, natomiast do probówki T3 dodano 10 µl odczynnika 4b. Probówki worteksowano (na wolnych obrotach) przez 1-2 sek. i inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej.
4. Do wszystkich probówek dodano po 10 µl odczynnika 5, a następnie próbki worteksowano (na wolnych obrotach) przez 1-2 sek. i inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej.
5. Do wszystkich probówek dodano po 2 ml odczynnika 1, a następnie próbki worteksowano (na szybkich obrotach) przez 1-2 sek. i przechowywano do 2 godz. w temp. 2-8°C, aż do momentu wykonania pomiaru na cytometrze przepływowym.
6. Po pomiarze cytometrycznym na podstawie uzyskanych wyników obliczono PRI przy użyciu wartości średniej intensywności fluorescencji (ang. *Mean Fluorescence Intensity*, MFI) w obecności samego PGE1 lub PGE1 z ADP, zgodnie z protokołem producenta.

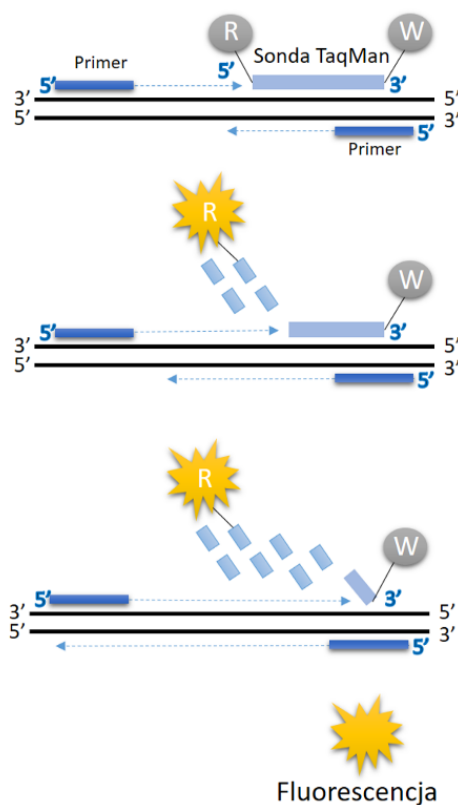
### **3.2.2.3. Pomiar ekspresji wybranych genów płytkowych na poziomie mRNA za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)**

#### **Zasada metody:**

Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Quantitative PCR*, qPCR) stanowi czułą metodę analityczną stosowaną w biologii molekularnej, która wykorzystuje technikę fluorescencji umożliwiającą monitorowanie ilości produktu reakcji w czasie rzeczywistym, odróżniając ją tym samym od klasycznej reakcji PCR. Monitorowanie ilości powstałych amplikonów możliwe jest dzięki znakowaniu produktów amplifikacji odpowiednimi fluorochromami, które następnie w trakcie kolejnych, zapętlających się etapów reakcji, wzbudzone są światłem o określonej długości fali, a emisja energii wydzielonej przez nie zostaje wykryta i zmierzona. W celu określenia ekspresji genów stosuje się porównanie ilości powstałych amplikonów badanych genów względem amplikonów określonych genów referencyjnych (ang. *Housekeeping Genes*), charakteryzujących się niezmiennym poziomem ekspresji w określonej tkance, niezależnie od stanu zdrowia organizmu. Do najczęściej stosowanych genów referencyjnych zalicza się geny metabolizmu podstawowego.

W celu zwiększenia specyficzności i czułości metody qPCR zamiast standardowych barwników fluorescencyjnych, które interkalują do dwuniciowego DNA stosuje się sondy typu TaqMan™. Są to krótkie sekwencje nukleotydowe (20-40 nt) posiadające na końcu 5' znacznik fluorescencyjny tj. amidynę fluoresceiny (ang. *Fluorescein Amidite*, FAM), a na końcu 3' wygaszacz fluorescencji (np. pochodną rodminy). Długość sondy umożliwia interakcję wygaszacza

z fluorochromem i w konsekwencji hamowanie emisji fluorescencji. Sonda TaqMan™ po związaniu się z komplementarną sekwencją obecną na cDNA degradowana jest przez polimerazę Taq, która posiada aktywność 5'-egzonukleazową i powoduje odseparowanie się fluorochromu od wygaszacza, dzięki czemu możliwa jest emisja światła fluorescencyjnego (**Ryc. 4**).



**Rycina 4.** Schemat działania sondy TaqMan™. Sondy TaqMan™ składają się z fluorochrom (R) kowalencyjnie przyłączonego do końca 5' sondy oligonukleotydowej oraz z wygaszacza na końcu 3' (W). Cząsteczka wygaszacza gasi fluorescencję emitowaną przez fluorochrom, gdy jest wzbudzana przez źródło światła termocyklera. Dopóki fluorochrom i wygaszacz są w pobliżu, wygaszanie hamuje wszelkie sygnały fluorescencji. Podczas etapu elongacji następuje degradacja sondy przez polimerazę Taq. W konsekwencji dochodzi do przestrzennego rozdzielania fluorochromu i wygaszacza, co pozwala na rejestrację światła emitowanego przez fluorochrom.

Każdy z powtarzających się cykli składa się z trzech faz: denaturacji, przyłączania primerów i sond oraz wydłużania (elongacji). W pierwszej fazie zachodzącej w temp. 95°C dochodzi do rozdziału podwójnej nici DNA (denaturacja) na skutek rozerwania wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi nici DNA. W drugiej fazie do matrycowego DNA przyłączone zostają primery oraz sonda TaqMan™. Ostatnim etapem jest budowa nici DNA na nici matrycowej za pomocą polimerazy DNA (polimeraza *Taq*) i końcowa elongacja. Każdy kolejny cykl rozpoczyna się od denaturacji nowych dwuniciowych fragmentów DNA. Do przeprowadzenia reakcji qPCR użyto TaqMan™ Universal Master Mix II, No UNG (Applied Biosystem) oraz odpowiednich sond typu

TaqMan™ dla badanych amplikonów. Charakterystyka sond TaqMan™ użytych w badaniu zawarta jest w **Tab. 14**. Jako gen referencyjny stosowano *18S rRNA*. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji qPCR przedstawiają **Tab. 15 i 16**. Do obliczeń względnego poziomu ekspresji wykorzystano metodę porównań wartości cykli progowych (ang. *Cycle Threshold*, Ct) stosując formułę pojedynczej delty  $2^{-\Delta Ct}$  gdzie  $\Delta Ct = Ct$  (badany gen) – Ct (referencyjny gen). Wartości Ct określono używając oprogramowania Bio-Rad CFX Manager 3.1. Dla każdego z analizowanych amplikonów określono różnicę statystyczną pomiędzy średnią wartością  $2^{-\Delta Ct}$  obliczoną dla grupy badanej i grupy kontrolnej.

**Tabela 14.** Charakterystyka sond TaqMan™ zastosowanych w reakcji qPCR

Gen	Kodowane białko	Numer identyfikacyjny sondy	Lokalizacja na chromosomie	Długość amplikonu [nt]
<i>18S rRNA</i>	podjednostka rybosomalna 18S rRNA	Hs99999901_s1	-	187
<i>FGA</i>	łańcuch $\alpha$ fibrynogenu	Hs00241027_m1	4	73
<i>FGB</i>	łańcuch $\beta$ fibrynogenu	Hs00170586_m1	44	64
<i>FGG</i>	łańcuch $\gamma$ fibrynogenu	Hs00241037_m1	4	99
<i>TUBB1</i>	$\beta$ 1-tubulina	Hs00917771_g1	20	66
<i>ACTB</i>	$\beta$ -aktyna	Hs01060665_g1	7	63
<i>P2RY12</i>	receptor P2Y <sub>12</sub>	Hs01881698_s1	3	136
<i>F2R</i>	receptor dla trombiny	Hs05045041_s1	5	101
<i>ITGA2B</i>	podjednostka $\alpha$ 2b integryny	Hs00166246_m1	17	133
<i>ITGB3</i>	podjednostka $\beta$ 3 integryny	Hs01001469_m1	17	59
<i>A2M</i>	$\alpha$ 2-makroglobulina (ang. <i><math>\alpha</math>2-macroglobulin</i> , $\alpha$ 2M)	Hs00929995_m1	12	84
<i>APOA1</i>	apolipoproteina A1 (ang. <i>Apolipoprotein A1</i> , ApoA1)	Hs00163641_m1	11	56
<i>GAPDH</i>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> , GAPDH)	Hs02786624_g1	12	157
<i>MTCO-1</i>	oksydaza cytochromu c (kompleks IV) (gen mitochondrialny)	Hs02596864_g1	-	94

#### Material:

cDNA z płytek krwi i megakariocytów od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### Odczynniki:

- TaqMan™ Universal Master Mix II, No UNG
- Sondy TaqMan™
- Woda wolna od RNaz

#### Sprzęt laboratoryjny:

Termocykler CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad)



## Wykonanie:

1. Próbkę cDNA zostały rozmrożone na lodzie, zworteksowane i odwirowane.
2. Przygotowano mieszaninę reakcyjną do qPCR. Do 1 µl cDNA nałożonego na dołek płytki dodano 9 µl mieszaniny reakcyjnej do qPCR.
3. Płytkę 96-dołkową zabezpieczono folią uszczelniającą i odwirowano.
4. Pomiaru ekspresji dokonano posługując się termocyklerem CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad).

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej qPCR

Składniki mieszaniny reakcyjnej do qPCR	Objętość [µl] na jedną reakcję
TaqMan™ Universal Master Mix II, No UNG	5
Woda wolna od RNaz	3,75
Sonda TaqMan™	0,25
<b>Calkowita objętość próbki:</b>	<b>9</b>

Tabela 16. Warunki reakcji qPCR

Etapy	Temp.	Czas	Cykle
Aktywacja polimerazy	95°C	10 min.	1
Denaturacja	95°C	30 sek.	40
Wydłużanie	60°C	1 min.	
Hold	4°C	-	1

### 3.2.2.4. Określenie profilu ekspresji miRNA płytek krwi i megakariocytów techniką mikromacierzy

#### Zasada metody:

Podstawową techniką stosowaną do określenia profilu ekspresji cząsteczek miRNA w różnym materiale biologicznym jest analiza mikromacierzy. Jest to nowoczesna technika, która znajduje obecnie największe zastosowanie w analizach profili genowych, ze względu na możliwość jednoczesnego badania ekspresji dużej liczby genów, z wykorzystaniem stosunkowo niewielkiej ilości materiału wyjściowego. Zastosowanie analizy mikromacierzy umożliwia równoczesną analizę ilościową i jakościową poziomu ekspresji tysięcy miRNA w pojedynczej próbce badanej. Podstawą metody mikromacierzy miRNA jest hybrydyzacja oparta na rozpoznawaniu komplementarnych sekwencji, co odbywa się na szklanej płytce zawierającej związane do podłoża oligonukleotydy zoptymalizowane do efektywnej i specyficznej hybrydyzacji z badanymi miRNA. Każda mikromacierz posiada scharakteryzowane lokalizacje hybrydyzacji poszczególnych transkryptów, dzięki czemu detekcja miejsca skąd generowany jest sygnał fluorescencji pozwala na określenie rodzaju miRNA, natomiast intensywność sygnału odpowiada stężeniu miRNA. Względny poziom

ekspresji dla danego genu jest wprost proporcjonalny do intensywności sygnału pochodzącego ze skanu obrazu cyfrowego szkiełka mikromacierzy.

W celu uzyskania sygnału fluorescencyjnego cząsteczki miRNA znakowane są fluorescencyjnie na końcu 3' za pomocą znacznika cyjaniny 3-pCp. Następnie wyznakowane próbki ulegają hybrydyzacji na mikromacierzy SurePrint G3 Human miRNA w temp. 55°C przez 21 godz. w piecu hybrydyzacyjnym z wbudowanym rotorem. Kolejnym etapem jest wymycie niezwiązanego materiału z płytki szklanej za pomocą dwóch buforów płuczących. Skan szkiełek mikromacierzy wykonywany jest w skanerze SureScan firmy Agilent. Na podstawie uzyskanych wyników następnie przeprowadza się analizę ekspresji dla grupy badanej i kontrolnej w programie komputerowym GeneSpring (Agilent). Uzyskane surowe dane z mikromacierzy dotyczą intensywności fluorescencji, które następnie w programie Gene Spring (Agilent) podlegają korekcji (korekta Benjamini-Hochberg), normalizacji oraz logarytmizacji intensywności poziomów fluorescencji.

#### **Material badawczy:**

Całkowite RNA wyizolowane z płytek krwi oraz megakariocytów. Próbki całkowitego RNA następnie zagęszczono w koncentratorze próżniowym SpeedVac (Thermo Fischer Scientific) w celu uzyskania optymalnego stężenia całkowitego RNA. Czas zagęszczania: około 3 godz.; temp. 20-25°C.

#### **Sprzęt laboratoryjny:**

- Koncentrator próżniowy SpeedVac (Thermo Fischer Scientific)
- Szkiełka mikromacierzy G3 Human miRNA Microarray Kit (8×60K) (Agilent)
- Piec hybrydyzacyjny z rotatorem
- Hybrydyzacyjne szkiełka uszczelniające (Agilent)
- Mieszadła magnetyczne
- Łaźnia wodna
- Blok grzejny (Biosan)
- Nakładka z barierą przeciw-ozonową
- Nakładka uszczelniająca
- Skaner mikromacierzy SureScan (Agilent)

#### **Odczynniki:**

Zestawy komercyjne do mikromacierzy firmy Agilent Technologies:

MicroRNA Spike-In Kit:

- Dilution Buffer
- Labeling Spike-In
- Hyb Spike-In

miRNA Complete Labeling and Hyb Kit:

- 10X Gene Expression Blocking Agent
- 2X Hi-RPM Hybridization Buffer
- T4 RNA Ligase
- 10X T4 RNA Ligase Buffer
- Calf Intestinal Phosphatase
- 10X Cal Intestinal Phosphate Buffer
- DMSO
- Woda wolna od RNaz
- Cyjanina 3-pCp

Gene Expression Wash Buffer Kit:

- Gene Expression Wash Buffer 1 and Gene Expression Wash Buffer 2
- Triton X-102 (10%)

### Oprogramowanie:

Odczyt wyników: Feature Extraction Software. Analiza statystyczna: GeneSpring

### Wykonanie:

#### 1. Przygotowanie roztworów Spike-in

Przygotowano rozcieńczenia roztworów Labeling Spike-In (do procesu znakowania) oraz Hyb Spike-In (do hybrydyzacji) (**Tab. 17**).

**Tabela 17.** Rozcieńczenia roztworów Labeling Spike-In oraz Hyb Spike-In

<b>Pierwsze rozcieńczenie Labeling Spike-In</b>	<b>Pierwsze rozcieńczenie Hyb Spike-In</b>
198 µl diluentu	198 µl diluentu
2 µl roztworu Labeling Spike-In	2 µl roztworu Hyb Spike-In
<b>Drugie rozcieńczenie Labeling Spike-In</b>	<b>Drugie rozcieńczenie Hyb Spike-In</b>
198 µl diluentu	198 µl diluentu
2 µl roztworu z I rozc. Labeling Spike-In	2 µl roztworu z I rozc. Hyb Spike-In
<b>Trzecie rozcieńczenie Labeling Spike-In</b>	<b>Trzecie rozcieńczenie Hyb Spike-In</b>
198 µl diluentu	198 µl diluentu
2 µl roztworu z II rozc. Labeling Spike-In	2 µl roztworu z II rozc. Hyb Spike-In

#### 2. Defosforylacja próbki

Próbki całkowitego RNA doprowadzono do wymaganego stężenia (50 ng/µl) przy użyciu wody wolnej od DNaz/RNaz. Pobrano 2 µl całkowitego RNA do sterylnej probówki typu Eppendorf (1,5 ml) (procedurę przeprowadzono na lodzie). Następnie, przygotowano roztwór CIP Master Mix (**Tab. 18**).

**Tabela 18.** Skład CIP Master Mix

<b>Składniki CIP Master Mix</b>	<b>Objętość [µl] na jedną reakcję</b>
10X Bufor dla alkalicznej fosfatazy	0,4
Trzecie rozcieńczenie Labeling Spike-In	1,1
Alkaliczna fosfataza	0,5
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>2,0</b>

Do próbek dodano po 2 µl CIP Master Mix, delikatnie wymieszano poprzez pipetowanie. Próbkę inkubowano w temp. 37°C przez 30 min. w bloku grzejnym.

### 3. Denaturacja próbki

Do próbek dodano 2,8 µl DMSO i inkubowano w temp. 100°C przez 5 min. w bloku grzejnym. Po inkubacji próbki natychmiast przeniesiono do kąpielii wodnej z topniejącym lodem.

### 4. Ligacja

Podgrzano 10XT4 RNA Ligase Buffer do temp. 37°C, a następnie schłodzono do temp. pokojowej. Następnie, przygotowano Ligation Master Mix (**Tab. 19**).

**Tabela 19.** Skład Ligation Master Mix

Składniki Ligation Master Mix	Objętość [µl] na jedną reakcję
10X T4 RNA Ligase Buffer	1,0
Cyjanina 3-pCp	3,0
Ligaza T4 RNA	0,5
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>4,5</b>

Do próbek dodano po 4,5 µl Ligation Master Mix, delikatnie wymieszano poprzez pipetowanie. Próbkę inkubowano w temp. 16°C w bloku grzejnym przez 2 godz.

### 5. Osuszanie próbki

Próbki całkowicie osuszano przy użyciu wirówki próżniowej w temp. 55°C przez ok. 3 godz.

### 6. Hybrydyzacja

Przygotowano odczynnik 10X Gene Expression Blocking Agent (do liofilizatu 10X Gene Expression Blocking Agent dodano 125 µl wody wolnej od nukleaz, delikatnie wymieszano przez pipetowanie). Do próbek dodano mieszaninę hybrydyzacyjną (Hybridization mix) (**Tab.20**).

**Tabela 20.** Skład Hybridization Master Mix

Składniki Hybridization Master Mix	Objętość [µl] na jedną reakcję
Próbka wyznakowanego miRNA	17
10X Gene Expression Blocking Agent	4,5
Trzecie rozcieńczenie Hyb Spike-In	1
2X Hi-RPM Hybridization Buffer	22,5
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>45</b>

Próbki inkubowano w temp. 100°C przez 5 min. w bloku grzejnym. Następnie, po inkubacji, próbki natychmiast przeniesiono na lód.

### 7. Przygotowanie mikromacierzy do hybrydyzacji

Slajd umieszczono w komorze Agilent SureHyb. Na szkielek naniesiono po 40 µl próbki badanych. Mikromacierz umieszczono na uszczelce, tak aby strona aktywna macierzy została

skierowana do dołu, zaś kod numeryczny do góry. Pokrywę komory szczelnie zamknięto. Komorę umieszczono w piecu do hybrydyzacji. Proces hybrydyzacji (10 obr./min.) przeprowadzano w temp. 55°C przez 20 godz.

## 8. Przygotowanie buforów oraz naczyń do płukania

Do buforów Gene Expression Wash Buffer 1 i 2 dodano 2 ml 10% Tritonu X-102. Następnie, 500 ml bufor Gene Expression Wash Buffer 2 inkubowano w temp. 37°C przez noc (aż do zakończenia procesu hybrydyzacji). Pierwsze naczynie wypełniono buforem płuczącym Gene Expression Wash Buffer 1 o temp. 20-25°C. Drugie naczynie postawiono na mieszadle magnetycznym, dodano dipol oraz statyw dla mikromacierzy i wypełniono buforem płuczającym Gene Expression Wash Buffer 2 o temp. 20-25°C. Trzecie naczynie postawiono na mieszadle magnetycznym, dodano dipol oraz statyw dla mikromacierzy i zalano podgrzany do temp. 37°C Gene Expression Wash Buffer 2.

## 9. Procedura płukania mikromacierzy

Komorę ze slajdem wyjęto z pieca hybrydyzacyjnego. W pierwszym naczyniu z buforem Gene Expression Wash Buffer 1 (20-25°C) zdemonowano slajd z mikromacierzą. Slajd z mikromacierzą przeniesiono na statyw do drugiego naczynia z Gene Expression Wash Buffer 2 (20-25°C) i inkubowano przez 5 min. Następnie, slajd przeniesiono na statyw do naczynia trzeciego z podgrzany do temp. 37°C buforem Gene Expression Wash Buffer 2 i inkubowano przez 5 min. (**Tab. 21**).

**Tabela 21.** Warunki płukania slajdu z mikromacierzą

	Nr naczynia	Użyty Bufor myjący	Temp.	Czas
Demontaż	1	Gene Expression Wash Buffer 1	20-25°C	-
Pierwsze płukanie	2	Gene Expression Wash Buffer 2	20-25°C	5 min.
Drugie płukanie	3	Gene Expression Wash Buffer 2	37°C	5 min.

## 10. Skan mikromacierzy i analiza profilu ekspresji miRNA

Skan szkiełek mikromacierzy odbywa się w urządzeniu SureScan firmy Agilent. W wyniku skanowania macierzy uzyskuje się obrazy, które poddawane są obróbce i wstępnej analizie w programie Agilent Feature Extraction Software (v10.7). Wyniki analizowane są przy pomocy programu statystycznego GenSpring (Agilent).

### 3.2.2.5. Walidacja poziomu ekspresji wybranych miRNA z użyciem qPCR

#### Zasada metody:

Dla wyselekcjonowanych miRNA wykazujących istotną różnicę między grupą badaną a kontrolną, w poziomie ekspresji mierzoną techniką mikromacierzy, została przeprowadzona walidacja wyników przy użyciu metody qPCR. W reakcji RT wykonanej przy użyciu zestawu TaqMan™

Advance miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystem) wykorzystano próbki całkowitego RNA wyizolowanego z płytek krwi i megakariocytów. Do przeprowadzenia reakcji qPCR użyto mikro cDNA, TaqMan™ Fast Advance Master Mix (Applied Biosystem) oraz odpowiednich sond typu TaqMan™ dla badanych miRNA. Charakterystyka sond TaqMan™ użytych w badaniu zawarta jest w **Tab. 22**. Jako kontrolę endogenną do normalizacji danych zastosowano cząsteczkę **miR-191-5p**. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji qPCR przedstawione są w **Tab. 23 i 24**.

Średnie wartości Ct wyznaczono, używając oprogramowania Bio-Rad CFX Manager 3.1. Względne poziomy ekspresji cząsteczek miRNA obliczono za pomocą formuły  $2^{-\Delta Ct}$  gdzie  $\Delta Ct = Ct(\text{badany miRNA}) - Ct(\text{kontrola endogenna})$ . Następnie, dla każdego z analizowanych miRNA określono różnicę statystyczną pomiędzy średnią wartością  $2^{-\Delta Ct}$  obliczoną dla grupy badanej i grupy kontrolnej.

**Tabela 22.** Charakterystyka zastosowanych sond TaqMan™ dla wybranych miRNA

miRNA	Nazwa sondy	Numer identyfikacyjny sondy	Sekwencja dojrzałego miRNA	Lokalizacja na chromosomie
<b>miR-15b-5p</b>	Hsa-miR-15b-5p	478313_mir	UAGCAGCACAUCAUGGUUACA	Chr. 3
<b>miR-24-3p</b>	Has-miR-24-3p	477992_mir	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	Chr. 9
<b>miR-126-5p</b>	Hsa-miR-126-3p	477888_mir	CAUUUUUUUUUGGUACGCG	Chr. 9
<b>miR-199a-3p</b>	Has-miR-199a-3p	477961_mir	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	Chr. 19
<b>miR-191-5p</b>	Hsa-miR-191-5p	477952_mir	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	Chr. 3

#### Material:

Micro cDNA z płytek krwi i megakariocytów od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### Odczynniki:

- TaqMan™ Fast Advance Master Mix
- Sondy TaqMan™
- Woda wolna od RNaz

#### Sprzęt laboratoryjny:

Termocykler CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad)

#### Wykonanie:

1. Próbkę mikro cDNA zostały rozmrożone na lodzie, zworteksowane i odwirowane.
2. mikro cDNA rozcieńczono w stosunku 1:10 za pomocą wody wolnej od RNaz.
3. Przygotowano mieszaninę reakcyjną do qPCR. Do 1,5 µl rozcieńzonego mikro cDNA nałożonego na dołek płytki 96-dołkowej dodano 8,5 µl mieszaniny reakcyjnej do qPCR.
4. Płytkę 96-dołkową zabezpieczono folią uszczelniającą i odwirowano.
5. Pomiaru ekspresji dokonano posługując się termocyklerem CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad).

**Tabela 23.** Skład mieszaniny reakcyjnej do qPCR

Składniki mieszaniny reakcyjnej do qPCR	Objętość [ $\mu$ l] na jedną reakcję
TaqMan™ Fast Advance Master Mix	5
Woda wolna od RNaz	3
Sonda TaqMan™	0,5
<b>Całkowita objętość próbki:</b>	<b>8,5</b>

**Tabela 24.** Warunki reakcji qPCR

Etapy	Temp.	Czas	Cykle
Aktywacja polimerazy	95°C	20 sek.	1
Denaturacja	95°C	3 sek.	40
Wydłużanie	60°C	30 sek.	
Hold	4°C	-	1

### **3.2.2.6. Pomiar stężenia receptorów płytkowych, białek cytoszkieletu oraz fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA**

#### **Zasada metody:**

Test ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) jest metodą immunoenzymatyczną, która pozwala na ilościowe oznaczenie białka w badanym materiale, za pomocą tworzenia się swoistych kompleksów antygen-przeciwciała, dzięki sprzężonej reakcji enzymatycznej. Istnieje kilka wariantów metody. W zastosowanym wariantcie, płytkę opłaszczoną przeciwciałami specyficznymi dla badanego białka, poddaje się inkubacji z antygenem. Do powstałego kompleksu antygen-przeciwciała dodaje się przeciwciała oraz kompleks streptawidyna-peroksydaza chrzanowa (ang. *Horseradish Peroxidase*, HRP). Po dodaniu substratu chromogennego (ang. *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*, TMB) powstaje barwny produkt, którego intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia białka w próbce.

Metoda ELISA została wykorzystana w celu określenia stężenia receptorów płytkowych (P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 i GPIIb/IIIa), kluczowych białek cytoszkieletu ( $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny) oraz fibrynogenu w lizatach komórkowych (płytek krwi i megakariocytów) pochodzących od pacjentów z PMS oraz od zdrowych ochotników. Badania przeprowadzono przy użyciu komercyjnych zestawów. Każdorazowo, pomiar absorbancji wykonano na czytniku mikropłytek SPECTROStar Nano, przy długości fali  $\lambda = 450$  nm. Stężenia badanych białek odczytano z odpowiednich krzywych wzorcowych wyrażonych w ng/ml.

### **Material badawczy:**

Lizaty płytek krwi oraz megakariocytów pochodzących od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

### **Odczynniki:**

- Płytki 96-dołkowa opłaszczona przeciwciałami skierowanymi przeciwko odpowiedniemu białku, w zależności od stosowanego zestawu
- Liofilizat standardu białkowego: P2Y<sub>12</sub> (20 ng/ml), PAR-1 (20 ng/ml), GPIIb/IIIa (20 ng/ml),  $\beta$ -aktyna (20 ng/ml),  $\beta$ -tubulina (20 ng/ml), fibrynogen (200 ng/ml)
- Bufor do rozcieńczania próbek i standardów
- Kompleks streptawidyna-HRP
- Roztwór przeciwciał biotynylowanych lub zestaw przeciwciał wychwytyjących i wykrywających
- Koncentrat buforu płuczącego
- TMB
- Stop solution
- Bufor do przygotowania mieszaniny przeciwciał (Antibody diluent)

### **Zestawy komercyjne do pomiaru stężenia:**

- **receptorów płytkowych – P2Y<sub>12</sub>, GPIIb/IIIa i PAR-1**
  - Human P2Y<sub>12</sub> (P2Y purinoceptor 12) ELISA Kit (Fine Test)
  - Human F2R (Proteinase-activated receptor 1) ELISA Kit (Fine Test)
  - Human GPIIb/IIIa (Platelet Membrane Glycoprotein IIb/IIIa complex) ELISA Kit (Fine Test)
- **białek cytoszkieletu –  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny**
  - Human TUBB (Tubulin beta chain) ELISA Kit (Elabscienc)
  - Human ACTB (Actin beta) ELISA Kit (Elabscienc)
- **fibrynogen**
  - Human Fibrinogen SimpleStep ELISA® Kit (Abcam)

### **Sprzęt laboratoryjny:**

Spektrofotometr SPECTROStar Nano (BMG Labtech)

#### **Przygotowanie standardów białkowych do wykonania krzywych wzorcowych dla:**

- **receptorów płytkowych i białek cytoszkieletu:** do liofilizatu standardu białkowego (P2Y<sub>12</sub>, PAR-1, GPIIb/IIIa,  $\beta$ -tubulina oraz  $\beta$ -aktyna) dodano 1000  $\mu$ l buforu do rozcieńczania i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej w celu uzyskania roztworu wzorcowego o stężeniu 20 ng/ml. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń roztworu wzorcowego o następujących stężeniach: 10; 5; 2,5; 0,625; 0,312 oraz 0,156 ng/ml.
- **fibrynogenu:** do liofilizatu standardu białkowego ludzkiego fibrynogenu dodano 250  $\mu$ l buforu do rozcieńczania oraz inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej w celu uzyskania roztworu wzorcowego o stężeniu 200 ng/ml. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń roztworu wzorcowego o następujących stężeniach: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 oraz 1,56 ng/ml.



### **Procedura oznaczania stężenia receptorów płytkowych i białek cytoszkieletu:**

1. Na płytkę opłaszczoną przeciwciałami specyficznymi dla badanego białka naniesiono próby badane, kontrolne oraz próbki ze standardami białkowymi do krzywej wzorcowej, w objętości 100  $\mu\text{l}$ /dołek.
2. Płytkę odpowiednio zabezpieczono folią i inkubowano przez 90 min. w temp. 37°C.
3. Po inkubacji płytkę przepłukano 3-krotnie buforem płuczącym (350  $\mu\text{l}$ /dołek), a następnie osuszono do całkowitego pozbycia się buforu ze studzienek.
4. Do wszystkich studzienek dodano po 100  $\mu\text{l}$  roztworu biotynylowanych przeciwciał, płytkę przykryto i inkubowano przez 60 min. w temp. 37°C.
5. Po inkubacji płytkę przepłukano 3-krotnie buforem płuczającym (350  $\mu\text{l}$ /dołek),
6. a następnie osuszono do całkowitego pozbycia się buforu ze studzienek.
7. Do wszystkich studzienek dodano po 100  $\mu\text{l}$  roztworu kompleksu streptawidyna-HRP, płytkę przykryto i inkubowano przez 30 min. w temp. 37°C.
8. Po inkubacji płytkę przepłukano 5-krotnie buforem płuczającym (350  $\mu\text{l}$ /dołek), a następnie osuszono do całkowitego pozbycia się buforu ze studzienek.
9. Do wszystkich studzienek dodano po 90  $\mu\text{l}$  roztworu TMB, płytkę przykryto i inkubowano przez 15 min. w temp. 37°C.
10. Następnie dodano po 50  $\mu\text{l}$  roztworu zatrzymującego reakcję.
11. Pomiar absorbancji wykonano na czytniku mikropłytek SPECTROStar Nano przy długości fali  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Stężenie badanych białek odczytano z krzywej wzorcowej wyrażonej w ng/ml.

### **Procedura oznaczania stężenia fibrynogenu:**

1. Na płytkę opłaszczoną przeciwciałami specyficznymi dla fibrynogenu naniesiono próby badane, kontrolne oraz próbki ze standardami białkowymi do wykonania krzywej wzorcowej, w objętości 100  $\mu\text{l}$ /dołek.
2. Po naniesieniu standardów i prób badanych do każdego dołka dodano po 50  $\mu\text{l}$  przygotowanej wcześniej mieszaniny przeciwciał wychwytyjących oraz wykrywających i inkubowano przez 60 min. na kołyszce laboratoryjnej (400 obr./min) w temp. pokojowej.
3. Po upływie inkubacji delikatnie zlano zawartość dołków i 3-krotnie przepłukano płytkę przygotowanym buforem płuczającym (350  $\mu\text{l}$ /dołek), a następnie osuszono do całkowitego pozbycia się buforu ze studzienek.
4. Do każdego dołka dodano po 100  $\mu\text{l}$  TMB.

5. Płytkę zabezpieczono folią i inkubowano przez 10 min. na kołysce laboratoryjnej (400 obr./min) w temp. pokojowej (15-25°C) w ciemności.
6. Po zakończonej inkubacji do każdego dołka dodano po 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję, płytkę przykryto i umieszczono na 1 min. na kołysce laboratoryjnej (400 obr./min).
7. Po upływie czasu wykonano pomiar na spektrofotometrze SPECTROStar Nano przy długości fali  $\lambda = 450$  nm. Stężenie fibrynogenu odczytano z krzywej wzorcowej wyrażonej w ng/ml.

### **3.2.2.7. Pomiar stężenia fibrynogenu w osoczu metodą ELISA**

#### **Zasada metody:**

Test kompetycyjnym ELISA jest odmianą testu immunoenzymatycznego, którego charakter działania polega na współzawodnictwie pomiędzy antygenami standaryzowanymi, a antygenami zawartymi w badanym materiale o miejsca wiążące przeciwciała. W przypadku zastosowanego testu komercyjnego badanym antygenem był fibrynogen osoczowy pochodzący z krwi pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej, zaś antygenem standaryzowanym był biotynylowany ludzki fibrynogen. W trakcie przebiegu reakcji do antygeny przyłącza się kompleks streptawidyna-HRP, a do kompleksu enzymatycznego przyłącza się substrat TMB dając reakcję barwną. Im więcej antygenów standaryzowanych tworzy kompleks z opłaszczonymi na płytce przeciwciałami, tym mniej wolnych miejsc pozostaje dla przyłączenia się antygenów obecnych w badanym materiale i w konsekwencji uzyskuje się wyższy poziom absorbancji mierzonej w teście kompetycyjnym. Podsumowując, uzyskana wartość absorbancji jest odwrotnie proporcjonalna do otrzymanego stężenia antygeny w badanym materiale.

#### **Material:**

Osocze ubogopłytkowe (PPP) od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

#### **Odczynniki:**

Zawartość zestawu Human Fibrinogen ELISA® Kit (Abcam):

- Płytki 96 – dołkowa opłaszczona specyficznymi przeciwciałami anty-fibrynogen
- Liofilizat fibrynogenu (40 µg/ml)
- Bufor do rozcieńczania próbek i standardów (Sample Diluent)
- Liofilizat biotynylowanego ludzkiego fibrynogenu (antygen standaryzowany)
- Kompleks Streptawidyna-HRP
- TMB
- Stop solution
- Bufor płuczący

**Przygotowanie standardów fibrynogenu do wykonania krzywej wzorcowej:** do roztworu wzorcowego ludzkiego fibrynogenu dodano 2500  $\mu\text{l}$  buforu do rozcieńczania i inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej w celu uzyskania roztworu wzorcowego o stężeniu 40  $\mu\text{g/ml}$ . Następnie wykonano szereg rozcieńczeń roztworu wzorcowego o następujących stężeniach: 40; 13,33; 4,44; 0,49 oraz 0,17  $\text{ng/ml}$ .

#### **Wykonanie:**

1. Osocze PPP wirowano (2000 obr./10 min./20-25°C). Następnie odwirowane osocze rozcieńczono 100-krotnie w buforze do rozcieńczania. Na opłaszczoną przeciwciałami płytkę naniesiono standardy fibrynogenu do wykonania krzywej wzorcowej oraz próbki badane i kontrolne (25  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ).
2. Natychmiast po nałożeniu próbek i standardów, dodano roztwór biotynylowanego ludzkiego fibrynogenu (25  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ). Płytkę odpowiednio zabezpieczono plastikową folią ochronną i przeprowadzono 2-godz. inkubację w temp. pokojowej. Po upływie czasu inkubacji płytkę przepłukano 5-krotnie buforem płuczącym (200  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ), a następnie osuszono do całkowitego pozbycia się buforu ze studzienek.
3. Do przepłukanych studzienek dodano kompleksu straptawidyna-HRP (50  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ) i inkubowano przez 30 min. w temp. pokojowej. Po upływie czasu inkubacji płytkę ponownie przepłukano 5-krotnie buforem płuczącym (200  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ), a następnie osuszono do całkowitego pozbycia się buforu ze studzienek.
4. W celu wywołania reakcji barwnej do studzienek dodano TMB (50  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ) i inkubowano przez 25 min. w temp. pokojowej. Po zakończonej inkubacji dodano roztworu zatrzymującego reakcję (50  $\mu\text{l}/\text{dołek}$ ).
5. Pomiar absorbancji wykonano na czytniku mikropłytek SPECTROStar Nano przy długości fali  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Stężenie fibrynogenu w osoczu odczytano z krzywej wzorcowej wyrażonej w  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **3.2.2.8. Identyfikacja potencjalnych PTMs fibrynogenu, $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS-MS/MS)**

##### **Zasada metody:**

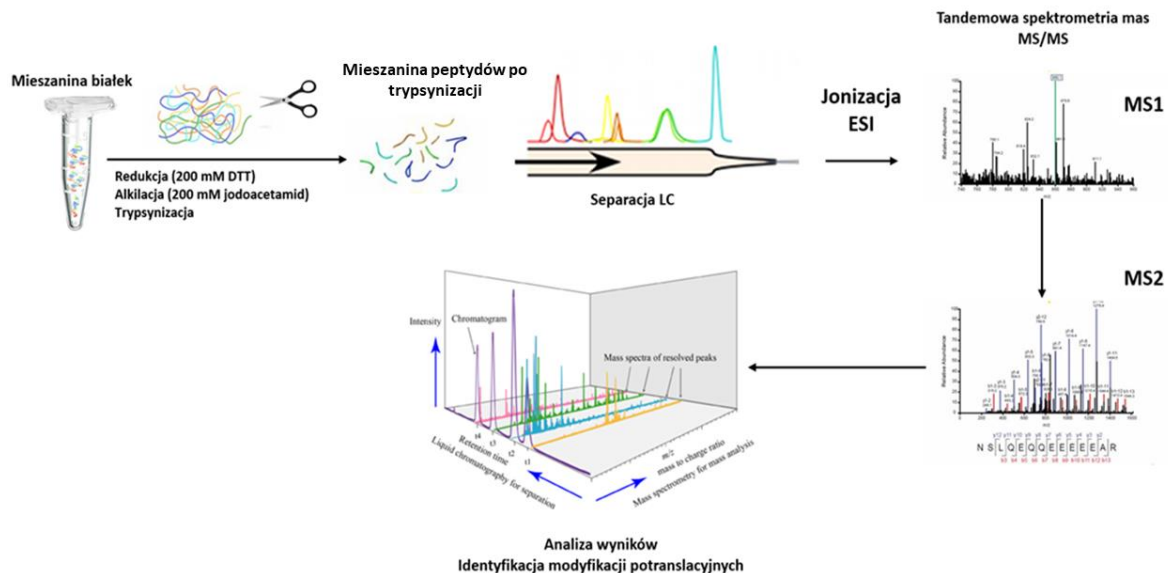
Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry*, LC-MS-MS/MS) jest dynamicznie rozwijającą się techniką łączoną, która znajduje szerokie zastosowanie w analizie jakościowej i ilościowej złożonych próbek białkowych. W pierwszej kolejności analiza LC pozwala na rozdział peptydów na podstawie różnic w ich czasach retencji (ang. *Retention Time*, RT), następnie przy użyciu spektrometrii mas możliwy jest rozdział związków o zbliżonych RT, ale różnych stosunkach wartości masy do ładunku

( $m/z$ ). Do analizy LC wykorzystano metodę wysokosprawnej chromatografii ciekowej (ang. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) z odwróconym układem faz, gdzie fazą stacjonarną są długołańcuchowe węglowodory kowalencyjnie przyłączone do powierzchni krzemionki, a fazą ruchomą jest 0.1% kwas mrówkowy z rozpuszczalnikiem organicznym (acetonitryl). Spektrometria mas jest to technika analityczna umożliwiająca rozdzielanie zjonizowanych związków na podstawie stosunku ich ładunku do masy ( $m/z$ ). Analiza spektrometrii mas składa się z kilku etapów: (1) jonizacja próbki (analitu), (2) rozdzielanie wytworzonych jonów pod względem ich stosunku  $m/z$ , (3) wykrywanie jonów oraz (4) interpretacja uzyskanych widm masowych. Jedną z najczęściej stosowanych technik jonizacji związków wysokocząsteczkowych tj. peptydy oraz białka w układzie LC-MS-MS/MS jest elektrorozpylanie (ang. *Electro Spray Ionization*, ESI). Metoda ESI polega na rozpylaniu pod wysokim ciśnieniem atmosferycznym eluatu, do którego przyłożone jest wysokie napięcie, a następnie podgrzewaniu oraz osuszaniu gazem powodując odparowanie rozpuszczalnika. W rezultacie dochodzi do tzw. „wybuchu kolumbowskiego” i desorpcja jonów z kropli oraz następnie przekierowanie do analizatora mas, który rozdziela jony pod względem ich stosunku  $m/z$ . Połączone układy analizatorów, w których wybrany w analizatorze mas jon (MS1) ulega powtórnej analizie mas (MS2) to tandemowa spektrometria mas (MS1/MS2). Analizy MS1/MS2 mogą być prowadzone jedynie przy wykorzystaniu spektrometrów o układzie analizatora lub analizatorów zdolnych do fragmentacji jonów w komorze zawierającą gaz kolizyjny (jest to jeden z gazów szlachetnych, zazwyczaj azot lub hel), w której dochodzi do fragmentacji jonów metodą dysocjacji indukowanej kolizyjnie. Powstające w źródle jony pierwotne są rozdzielane w pierwszym spektrometrze (MS1). Następnie jony o wybranym stosunku  $m/z$  trafiają do komory kolizyjnej, gdzie w zależności od warunków ulegają dysocjacji. W wyniku fragmentacji jonów pierwotnych powstają tzw. jony potomne, które w (MS2) są ponownie rozdzielane ze względu na stosunek  $m/z$ . Parametry energii kolizyjnej są tak dobrane, aby jony peptydowe ulegały dysocjacji w obrębie wiązania peptydowego. Jest to krytyczne, podczas ustalania sekwencji aminokwasowej peptydu. Schemat obróbki próbki białkowej w trakcie analizy LC-MS-MS/MS (**Ryc. 5**).

Widmo fragmentacyjne (ilość i wartości  $m/z$  obserwowanych sygnałów) jest zależna od sekwencji aminokwasowej peptydu. Ponieważ PTMs zazwyczaj przyłączają się kowalencyjnie do łańcuchów bocznych aminokwasów – widmo fragmentacyjne peptydu modyfikowanego w porównaniu do jego niemodyfikowanego odpowiednika będzie się różnić, co umożliwia nie tylko identyfikacje, ale i lokalizacje modyfikacji. Współczesne spektrometry mas generują dziesiątki tysięcy widm fragmentacyjnych, co wykracza poza możliwość manualnej analizy, dlatego analiza danych prowadzona jest przy pomocy programów komputerowych, które porównują empiryczne

widma fragmentacyjne z widmami teoretycznymi i na tej podstawie możliwe jest ustalenie składu peptydowego mieszaniny, a tym samym białkowego analizowanej próbki.

W celu identyfikacji PTMs białek fibrynogeny,  $\beta$ -aktyny oraz  $\beta$ -tubuliny wykonano analizę LC-MS-MS przy użyciu systemu nano-HPLC NanoACQUITY sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas LTQ-Orbitrap™ Velos.



**Rycina 5.** Strategia postępowania z próbką białkową w trakcie analizy LC-MS-MS/MS

### Material badawczy:

Lizaty płytek krwi i megakariocytów oraz PPP od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej

### Odczynniki i zestawy komercyjne:

- RCDC Protein Assay Kit (Bio-Rad) – zestaw do pomiaru stężenia białek w warunkach silnie denaturujących
- ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) – zestaw do oczyszczania białek
  - Precipitation agent 1 – odczynnik do precypitacji 1
  - Precipitation agent 2 – odczynnik do precypitacji 2
  - Wash reagent 1 – odczynnik do przemywania 1
  - Wash reagent 2 – odczynnik do przemywania 2
- Afi-Gel Blue Gel (Bio-Rad) – usieciowana agarozą z kowalencyjnie przyłączonym barwnikiem Cibacron Blue F3GA do oczyszczania osocza z albumin
- Bufor do zawieszenia białek (100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 0,9% NaCl, 0,5 M mocznik)
- Trypsyna (Promega)
- Kwas mrówkowy
- Jodoacetamid
- Ditiotretiol (ang. *Dithiothreitol*, DTT)
- Woda z kwasem trifluoroctowym (ang. *Trifluoroacetic Acid*, TFA)

## **Sprzęt laboratoryjny:**

Wysokosprawny chromatograf cieczowy Acquity nano-HPLC (Waters) sprzężony z tandemowym spektrometrem mas LQT-Orbitrap™ Velos (Thermo Scientific)

## **Wykonanie:**

### **1. Oczyszczanie osocza metodą filtracji żelowej**

Fracje białkowe o największych stężeniach (albumina i immunoglobuliny) usunięto z osocza za pomocą filtracji żelowej z wykorzystaniem Affi-Gel Blue Gel (Bio-Rad) w celu poprawienia rozdzielczości białek występujących w mniejszym stężeniu.

### **2. Oczyszczenie i zagęszczenie próbek białkowych z lizatów komórkowych (płytki krwi i megakariocyty)**

Za pomocą zestawu ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) próbki białkowe zostały oczyszczone z zanieczyszczeń jonowych, takich jak detergenty, lipidy, sole i związki fenolowe, a następnie zagęszczone. Zestaw ten wykorzystuje zmodyfikowaną metodę wytrącania białka z użyciem kwasu TCA.

### **3. Pomiar stężenia mieszaniny białek**

Pomiar stężenia białka wykonano za pomocą zestawu do testu kolorymetrycznego, kompatybilnego ze środkiem redukującym i detergentami – RCDC Protein Assay Kit (Bio-Rad).

### **4. Zawieszenie białek w buforze do analizy LC-MS-MS/MS i sonifikacja**

Oczyszczone białka zostały zawieszone w buforze o niskiej sile jonowej o składzie: 100 mM Tris/HCl, 0,9% NaCl, 0,5 M mocznik (pH 8,5). Następnie, próbki poddano sonifikacji.

### **5. Analiza LC-MS-MS/MS**

Roztwór peptydów analizowano metodą LC-MS-MS/MS (separacja na złożu RP-18 w układzie faz acetonitryl/woda sprzężona z tandemową spektrometrią mas) przy użyciu systemu nano-HPLC NanoACQUITY (Waters) i spektrometru mas LTQ-Orbitrap™ Velos. Przed analizą białka poddano standardowej procedurze trawienia w roztworze – strategia „*bottom-up*”, podczas której białka redukowano 200 mM DTT (przez 60 min. w temp. 60°C), alkilowano 200 mM jodoacetamidem (45 min. w temp. pokojowej w ciemności) i trawiono przez noc trypsyną. Mieszaninę peptydów nałożono na prekolumnę RP-18 nanoACQUITY Symmetry® C18 (Waters) używając wody zawierającej 0,1% TFA jako fazę ruchomą, a następnie przeniesiono na kolumnę nano-HPLC RP-18 (Waters) przy użyciu gradientu acetonitrylu (5-35% przez 70 min.) w obecności 0,05% kwasu mrówkowego przy przepływie 250 nl/min. Peptydy wymyte z kolumny C18 przepompowano przez końcówkę kapilarną i analizowano za pomocą instrumentów LTQ-Orbitrap™

Velos. Wylot kolumny był bezpośrednio połączony ze źródłem jonów ESI spektrometru masowego LTQ-Orbitrap™ Velos. Do najważniejszych parametrów analizatora mas zalicza się rozdzielczość (im większa rozdzielczość tym mniejszy błąd pomiaru masy) oraz zakres pomiaru masy (im szerszy zakres tym bardziej precyzyjna informacja o rzeczywistej masie związku).

#### **Parametry analizy MS1/MS2:**

- zakres  $m/z$ : 300-2000,
- rozdzielczość MS1: 35000,
- rozdzielczość MS2: 15000.6

Otrzymane surowe dane poddano wstępnemu przetwarzaniu w programie MASCOT Distiller (wersja 2.4.2.0, Matrix Science). Następnie, w celu identyfikacji peptydów otrzymane masy i widma fragmentacyjne były analizowane względem referencyjnych sekwencji ludzkich białek z baz danych SwissProt przy użyciu programu MASCOT MS/MS Ion Search (wersja 2.4.1, Matrix Science). Stopień podobieństwa ocenia się za pomocą parametru *score*. Peptydy, dla których wynik MASCOT przekraczał wartość progową odpowiadającą < 5% wartości oczekiwanej, obliczonej za pomocą procedury MASCOT uznano za zidentyfikowane pozytywnie.

#### **3.2.2.9. Sekwencjonowanie DNA techniką Illumina**

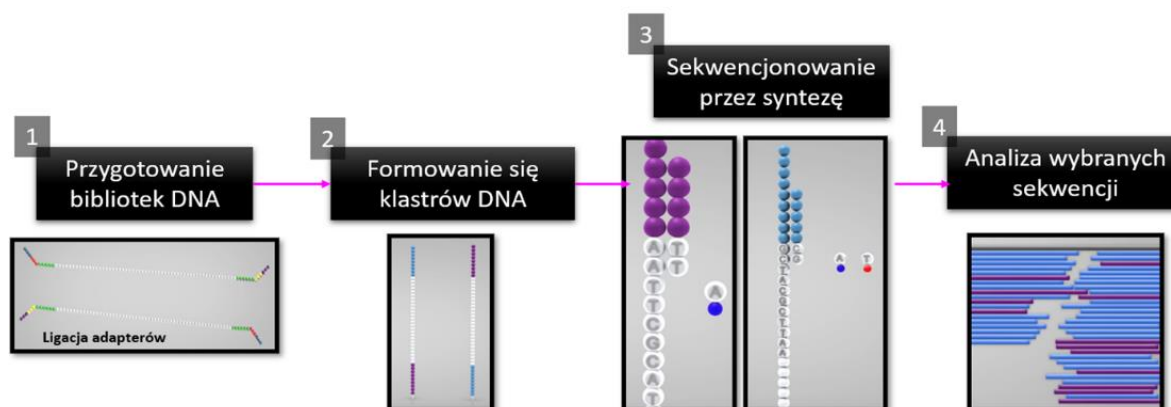
##### **Zasada metody:**

Sekwencjonowanie DNA z amplifikacją mostkową przez syntezę z odwracalną terminacją (Illumina) jest obecnie najczęściej stosowaną i najbardziej wydajną technologią sekwencjonowania nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS). Technologia Illuminy składa się z trzech głównych etapów: przygotowanie biblioteki DNA, amplifikacja matrycy oraz masowe sekwencjonowanie przez syntezę. Analiza porównawcza pełnych sekwencji kodujących geny dla łańcuchów fibrynogenu (*FGA*, *FGB*, *FGG*) oraz  $\beta$ 1-tubuliny (*TUBB1*) między pacjentami z PMS a grupą kontrolną umożliwiła identyfikację różnic w sekwencjach kodujących badanych genów, jednocześnie generując listę potencjalnych mutacji między sekwencjami badanymi a sekwencjami referencyjnymi.

Materiałem wyjściowym dla tego procesu jest wysokiej jakości DNA. W pierwszym etapie cząsteczka DNA ulega rozbiciu (fragmentacji) na łatwiejsze do analizy fragmenty o długości od 200 do 600 par zasad. Do fragmentów DNA przyłączane zostają krótkie, komplementarne sekwencje zwane adaptorami, które działają jako punkty odniesienia podczas kolejnych procesów sekwencjonowania. Zmodyfikowany DNA wprowadzany jest do tzw. komórki przepływowej (ang. *Flow Cell*), która zawiera specyficzne oligonukleotydy służące jako punkt zakotwiczenia dla przyłączonych adapterów. Po przyłączeniu się fragmentów DNA rozpoczyna się faza generowania

jednociowych klastrów DNA, podczas której dochodzi do wytworzenia około tysiąca kopii każdego fragmentu DNA o jednakowej sekwencji, na których wykonywana jest amplifikacja mostkowa metodą qPCR. Tworzą się tzw. mostki dwuniciowego DNA między starterami na powierzchni komórki przepływowej. W kolejnym etapie dwuniciowy DNA jest rozkładany na jednociowy, pozostawiając kilka milionów gęstych skupisk identycznych sekwencji DNA. Następnie do komórki przepływowej dodawane są startery i terminatory (znakowane fluorescencyjnie zasady nukleotydowe). Po każdym cyklu syntezy kamera wykonuje zdjęcie komórki przepływowej, a komputer określa jaka baza została dodana na podstawie długości fali znacznika fluorescencyjnego i rejestruje ją dla każdego miejsca na chipie. Po każdym cyklu nieprzyłączone cząsteczki są wymywane. Następnie dochodzi do chemicznego odblokowania w celu usunięcia grup blokujących końcówkę fluorescencyjną 3'.

Sekwencjonowanie odbywa się na raz dla milionów klastrów, a każdy klaster ma około 1000 identycznych kopii DNA. Dane sekwencje są analizowane poprzez znajdowanie fragmentów z nakładającymi się obszarami, tzw. kontigami i ustawianie ich w jednej linii. Jeśli znana jest sekwencja odniesienia, kontigi są następnie porównywane z nią w celu identyfikacji wariantów. Etapy sekwencjonowania DNA technologią Illumina przedstawia **Ryc. 6**.



**Rycina 6.** Główne etapy sekwencjonowania DNA przez syntezę z wykorzystaniem technologii Illumina

#### **Materiał badawczy:**

DNA wyizolowane z krwi pełnej od pacjentów z PMS oraz od grupy kontrolnej

#### **Odczynniki:**

- MiSeq® Reagent Kit v3 (Incorporation Buffer I PE, MiSeq® Flow Cell)
- AmpliSeq™ Library PLUS for Illumina® (5X AmpliSeq™ HiFi Mix, AmpliSeq™ DNA Panel Pool 1, AmpliSeq™ DNA Panel Pool 2, odczynnik FuPa, 5X Switch Solution, ligaza DNA, 1X Lib Amp Mix, 10X Library Amp Primers)
- Bufor Low TE (Tris-EDTA)
- AmpliSeq™ CD Indexes, Set A for Illumina® – adaptory index (i7) oraz index 2 (i5)
- AMPPure XP beads – kuleczki do oczyszczania bibliotek DNA
- High Sensitivity D1000 – zestaw odczynników do elektroforezy DNA



## Sprzęt laboratoryjny:

- Sekwencjator MiSeq System (Illumina)
- TapeStation (Agilent) – sprzęt do automatycznej elektroforezy
- Fluorymetr Quantus™ (Promega)

## Wykonanie:

### 1. Amplifikacja DNA

Próbki DNA procesowano w celu otrzymania bibliotek NGS wg protokołu „AmpliSeq for Illumina On-Demand, Custom and Community Panels” (Document # 1000000036408 v09). Dla każdej analizowanej próbki kontrolnej i badanej przygotowano w probówkach typu Eppendorf (1,5 ml) mieszaninę do amplifikacji (**Tab. 25**).

**Tabela 25.** Mieszanina reakcyjna do amplifikacji DNA

Zastosowane odczynniki:	Objętość [μl]
5X AmpliSeq™ HiFi Mix	5
DNA (2-200 ng)	<7,5
Woda wolna od DNaz	do osiągnięcia docelowej objętości
<b>Całkowita objętość</b>	<b>12,5</b>

Do nowej płytki 96-dołkowej do qPCR nałożono w dwóch powtórzeniach po 5 μl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej do amplifikacji dla każdej z próbek. Następnie, dodano 5,5 μl 2X AmpliSeq™ DNA Panel Pool 1 do jednego dołka, a do drugiego dodano 5 μl 2X AmpliSeq™ DNA Panel Pool 2. Łączna objętość mieszaniny wynosiła 10,5 μl dla jednego dołka oraz 10 μl dla drugiego dołka. Płytkę przykryto folią uszczelniającą oraz odwirowano. W następnym kroku płytkę wstawiono do termocyklera i nastawiono odpowiedni program do amplifikacji. Program AMP\_DNA: 105°C przez 5 min., 99°C przez 2 min., a następnie 19 cykli: 99°C przez 15 sek. oraz 60°C przez 4 min. (hold w 10°C do 24 godz.).

### 2. Trawienie primerów oraz częściowe trawienie amplikonów

Zmieszano ze sobą oba dołki zawierające produkty amplifikacji qPCR (łączna objętość 20,5 μl). Do każdego dołka dodano po 2 μl odczynnika FuPa. Łączna objętość mieszaniny wynosiła 22,5 μl. Płytkę przykryto folią uszczelniającą oraz odwirowano. Następnie, płytkę wstawiono do termocyklera i nastawiono odpowiedni program do trawienia amplikonów. Program FUPA: 50°C przez 10 min., 55°C przez 10 min., 62°C przez 20 min. (hold w 10°C do 24 godz.).

### 3. Ligacja adapterów

Do częściowo przetrawionych amplikonów przyłączono adaptory tzw. index (i7) oraz index 2 (i5). Dla każdej analizowanej próbki kontrolnej i badanej dodano mieszaninę do ligacji (**Tab. 26**). Płytkę przykryto folią uszczelniającą oraz odwirowano. Następnie, płytkę wstawiono do

termocyklera i nastawiono odpowiedni program do ligacji adapterów. Program LIGATE: 105°C przez 5 min., 22°C przez 30 min., 68°C przez 5 min., 72°C przez 5 min. (hold w 10°C do 24 godz.).

**Tabela 26.** Mieszanina reakcyjna do ligacji adapterów

Zastosowane odczynniki:	Objętość [μl]
5X Switch Solution	4
AmpliSeq™ CD Indexes	2
Ligaza DNA	2
<b>Całkowita objętość</b>	<b>8</b>

#### 4. Pierwsze oczyszczanie bibliotek DNA

Do dołków na płytce dodano 30 μl AMPPure XP beads i inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej. Następnie, płytkę umieszczono na magnetycznej płytce przez 2 min. i odrzucono supernatant (przyłączone kuleczki do bibliotek DNA pozostały na dnie dołków). Dołki przemyto 2-krotnie 70% etanolem w obj. 150 μl. Inkubowano w temp. pokojowej przez 30 sek. W kolejnym etapie odrzucono supernatant i pozostawiono na płytce magnetycznej przez 10 min. do całkowitego odparowania etanolu.

#### 5. Amplifikacja bibliotek DNA

Dla każdej analizowanej próbki kontrolnej i badanej dodano mieszaninę do amplifikacji bibliotek DNA (**Tab. 27**).

**Tabela 27.** Mieszanina reakcyjna do amplifikacji bibliotek DNA

Zastosowane odczynniki:	Objętość [μl]
1X Lib Amp Mix	45
10X Library Amp Primers	5
<b>Całkowita objętość</b>	<b>50</b>

Płytkę przykryto folią uszczelniającą oraz odwirowano. W kolejnym kroku płytkę wstawiono do termocyklera i nastawiono odpowiedni program do amplifikacji bibliotek DNA. Program AMP\_7: 105°C przez 5 min., 98°C przez 2 min., następnie 7 cykli: 98°C przez 15 sek. oraz 64°C przez 1 min. (hold w 10°C do 24 godz.).

#### 6. Drugie oczyszczenie i pomiar stężenia bibliotek DNA

Drugie oczyszczanie złożone jest z dwóch etapów. W pierwszym etapie DNA o dużej masie cząsteczkowej jest wychwytywane przez kulki i odrzucane. Biblioteka DNA i startery pozostałe w supernatancie przenoszone są na świeżą płytkę. W drugim etapie biblioteki DNA w pozostawionym supernatancie zostają wychwycone przez kulki, podczas gdy startery pozostają w supernatancie. Następnie, biblioteki są eluowane z kulek. Stężenie otrzymanych bibliotek DNA zmierzono metodą fluorymetryczną przy użyciu Quantus™ (Promega). Zakres stężeń DNA wynosił 0,55–13 ng/μl. W celu weryfikacji jakości bibliotek DNA próbki poddano elektroforezie na sprzęcie

TapeStation z użyciem odczynników High Sensitivity D1000. 11 próbek odrzucono ze względu na niskie stężenia i nieprawidłowy obraz w elektroforezie. Biblioteki rozcieńczono i zdenaturowano wg protokołu „MiSeq System. Denature and Dilute Libraries Guide (Document # 15039740 v10) Protocol C: AmpliSeq for Illumina Panels Normalization Method”. Następnie, każdą próbkę doprowadzono do określonego stężenia końcowego 8 pM przy użyciu buforu TE.

## 7. Sekwencjonowanie DNA i obróbka informatyczna

Do sekwencjonowania następnej generacji przekazano 40 bibliotek (19 z grupy badanej oraz 21 z grupy kontrolnej). Biblioteki NGS następnie zostały rozdzielone i poddane dwóm oddzielnym sekwencjonowaniom w sekwenatorze genomowym MiSeq przy użyciu technologii Illumina.

### 3.2.2.10. Analiza zmian transbłonowego potencjału mitochondrialnego płytek krwi z zastosowaniem sondy JC-1

#### **Zasada metody:**

W komórkach prawidłowych, odpowiedni MMP oraz sprawność mitochondriów zapewniają efektywne funkcjonowanie energetycznych szlaków metabolicznych, dostarczających energii w postaci ATP. Komórki w warunkach fizjologicznych, posiadają wysoki MMP (od  $-120$  do  $-180$  mV), który uwarunkowany jest odpowiednią dystrybucją jonów wodorowych  $[H^+]$ . Obserwowana w stanach patologicznych depolaryzacja błony mitochondrialnej wpływa na osłabienie ich zdolność do generowania ATP oraz powoduje uwalnianie czynników proapoptotycznych. Użycie sondy fluorescencyjnej JC-1 (jodek tetraetylobenzimidazolilokarbocyaniny) umożliwia spektrofotometryczną analizę zaburzeń MMP. JC-1 gromadzi się w dużych ilościach w hiperspolaryzowanej błonie mitochondrialnej ( $-140$  mV), tworząc agregaty emitujące pomarańczową fluorescencję ( $\lambda_{ex} = 530$  nm,  $\lambda_{em} = 590$  nm). W trakcie depolaryzacji ( $-100$  mV) dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej i następuje spadek stężenia JC-1 oraz rozpad agregatów do monomerów, przy jednoczesnej emisji zielonej fluorescencji ( $\lambda_{ex} = 485$  nm,  $\lambda_{em} = 538$  nm). Przemiana JC-1 z postaci zagregowanej do monomerycznej wiąże się z przesunięciami w jego widmie fluorescencyjnym oraz ze zmianą fluorescencji pomarańczowej na zieloną (**Tab. 28**). Stosunek emisji fluorescencji agregatów ( $\lambda_{em} = 590$  nm) i monomerów ( $\lambda_{em} = 538$  nm) –  $590\text{ nm}/538\text{ nm}$  wyraża poziom uszkodzenia błony mitochondriów badanych komórek.

**Tabela 28.** Charakterystyka postaci sondy JC-1 w zależności od zmiany potencjału błony mitochondrialnej

Postać JC-1	Rodzaj emitowanej fluorescencji	Potencjał błony mitochondrialnej
Agregat	Pomarańczowa ( $\lambda_{ex} = 530 \text{ nm}$ , $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ )	Wysoki (-140 mV; hiperpolaryzacja)
Monomer	Zielona ( $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ , $\lambda_{em} = 538 \text{ nm}$ )	Niski (-100 mV; depolaryzacja)

### Material badawczy:

Płytki krwi wyizolowane na kolumnie na złożu Sepharose 2B-BSA, zawieszono w buforze Tyroda (miano płytek doprowadzono każdorazowo do wartości  $2 \times 10^8/\text{ml}$ ).

### Odczynniki:

- Sonda JC-1 (Thermo Fisher Scientific)
- Zmodyfikowany bufor Tyroda (pH 7,4) (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 5 mM glukoza, woda)

### Wykonanie:

1. Na mikropłytkę 96-dołkową przeznaczoną do pomiaru fluorescencji naniesiono po 100  $\mu\text{l}$  zawiesiny płytek w 4 powtórzeniach. Do 2 dołków z zawiesiną płytek krwi dodano znacznika JC-1 (końcowe stężenie 5  $\mu\text{M}$ ).
2. Płytkę z próbkami inkubowano przez 30 min. w cieplarni w temp. 37°C.
3. Pomiaru fluorescencji dokonano przy 2 parametrach wzbudzenie/odczyt: 530 nm/590 nm (agregaty); 485 nm/538 nm (monomery). Na podstawie uzyskanych danych wyliczono stosunek emisji fluorescencji agregatów i monomerów (590 nm/538 nm), będący parametrem określającym poziom uszkodzenia błony mitochondriów.

### 3.2.2.11. Określenie poziomu RFT w płytkach krwi z zastosowaniem sondy H<sub>2</sub>DCF-DA

#### Zasada metody:

W celu określenia poziomu wolnych rodników tlenowych wewnątrz płytek krwi zastosowano metodę opartą na utlenianiu sondy fluorescencyjnej diocetanu dihydrodichlorofluoresceiny (ang. *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*, H<sub>2</sub>DCF-DA) przez obecne w komórce RFT. H<sub>2</sub>DCF-DA stanowi zredukowaną chemicznie postać fluoresceiny. Znacznik fluorescencyjny swobodnie przenika przez błonę komórkową do wnętrza komórki, gdzie w wyniku działania esteraż ulega deacetylacji do niefluoryzującej formy H<sub>2</sub>DCF. Kolejnym etapem przekształceń chemicznych sondy jest jej utlenienie przez wewnątrzkomórkowe RFT, co skutkuje wytworzeniem końcowego produktu reakcji 2',7'-dichlorofluoresceina (ang. *2',7'-dichlorofluorescein*, DCF), charakteryzującego się intensywną fluorescencją. Cząsteczki DCF utrzymują się w cytozolu, wykazując maksimum wzbudzenia i emisji

przy długościach fal odpowiednio  $\lambda_{ex} = 480$  nm i  $\lambda_{ex} = 510$  nm. Intensywność fluorescencji sondy jest wprost proporcjonalna do ilości reagujących z nią RFT obecnych w komórce.

#### **Material:**

Płytki krwi wyizolowane na kolumnie na złożu Sepharose 2B-BSA, zawieszono w buforze Tyroda (miano płytek każdorazowo doprowadzono do wartości  $2 \times 10^8$ /ml).

#### **Odczynniki:**

- Sonda H<sub>2</sub>DCF-DA (Thermo Fisher Scientific)
- Zmodyfikowany bufor Tyroda (pH 7,4) (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 0,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, 5 mM glukoza, woda)

#### **Wykonanie:**

1. Na mikropłytkę 96-dołkową przeznaczoną do pomiaru fluorescencji naniesiono po 100  $\mu$ l zawiesiny płytek w 4 powtórzeniach. Do 2 dołków z zawiesiną płytek krwi dodano znacznika H<sub>2</sub>DCF-DA (końcowe stężenie 5  $\mu$ M).
2. Płytkę z próbkami inkubowano przez 30 min. w cieplarni w temp. 37°C.
3. Pomiaru fluorescencji dokonano przy parametrach wzbudzenie/odczyt: 480 nm/510 nm.

#### **3.2.2.12. Analiza statystyczna**

Analizy statystyczne wszystkich prezentowanych wyników wykonano przy użyciu programów Statistica 12 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., SanJose, CA, USA) i GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Dla wszystkich otrzymanych wyników sprawdzono normalność rozkładu testem Shapiro-Wilka. Jeżeli rozkład danych miał cechy rozkładu normalnego stosowano test t-Studenta. Kiedy rozkład danych odbiegał od rozkładu normalnego wówczas stosowano test U-Manna Whitneya. Procedura testowań wielokrotnych została wykonana za pomocą korekt: Benjamini-Hochberga, Holm-Sidaka i Bonferroniego-Sidaka. Za pomocą testu  $\chi^2$  dokonano oceny istotności różnic między częstościami występowania genotypów. Do obliczenia związku między wariantami eksperymentalnymi a wykrytą mutacją zastosowano bezwarunkowy model wielokrotnej regresji logistycznej. Analiza statystyczna obejmowała także określenie ryzyka wystąpienia zdarzenia tzw. iloraz szans (ang. *Odds Ratio*, OR) z 95% przedziałem ufności (ang. *Confidence Interval*, CI). Dla wszystkich przeprowadzonych analiz poziom  $p < 0,05$  przyjęto jako istotny statystycznie.

## 4. WYNIKI

---

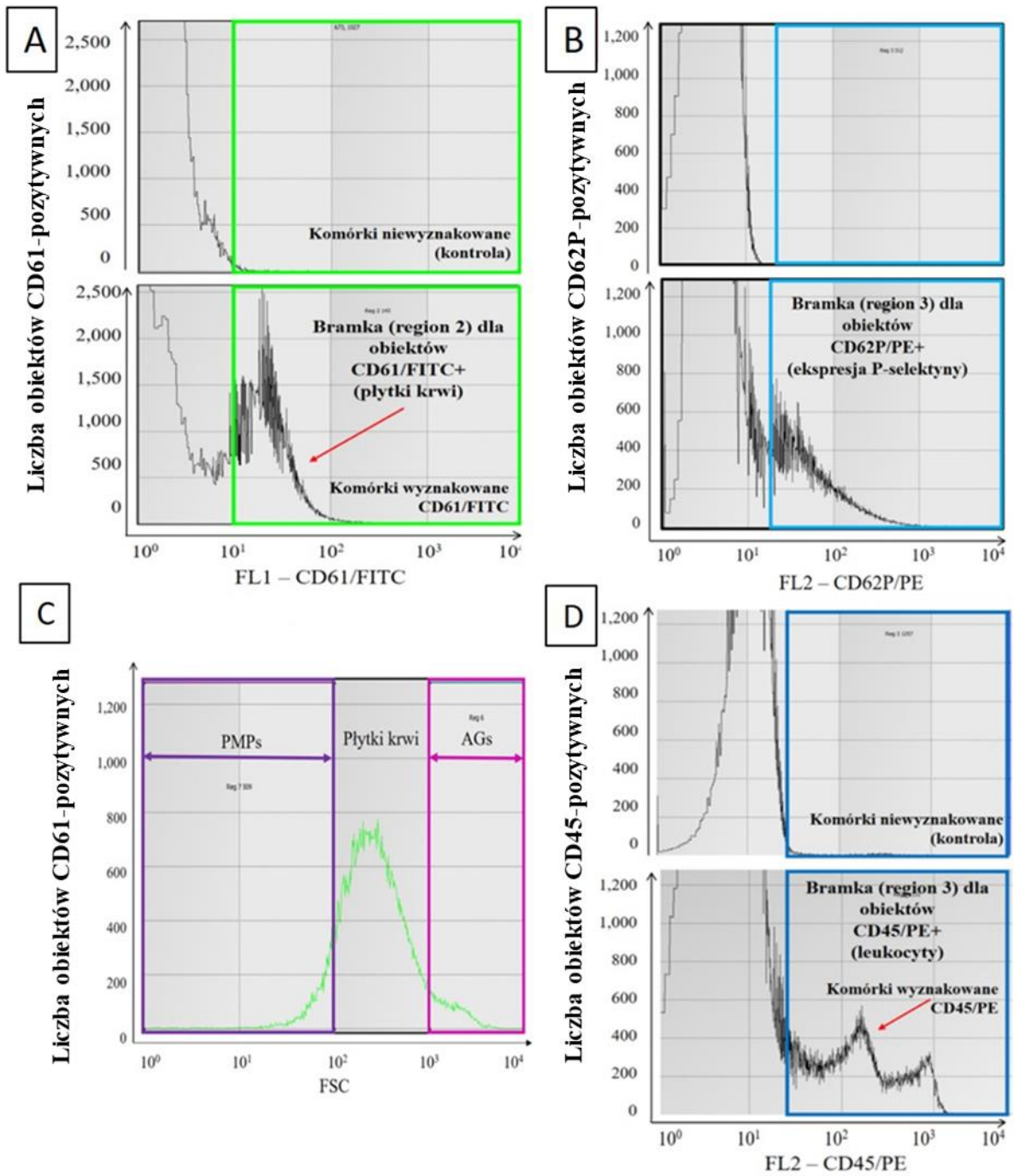
### 4.1. Ocena stanu czynnościowego płytek krwi

#### 4.1.1. Określenie stopnia aktywacji płytek krwi w krwi pełnej metodą cytometrii przepływowej

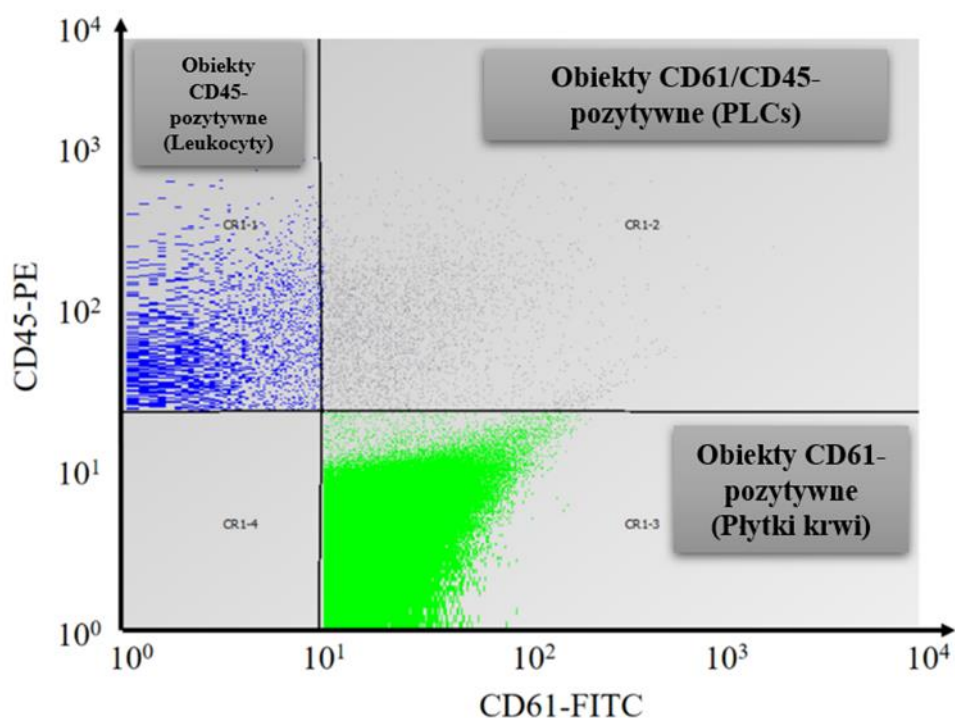
W celu dokonania analizy porównawczej stopnia spontanicznej aktywacji oraz reaktywności płytek krwi pacjentów z PMS względem prawidłowych płytek krwi (pochodzących od zdrowych dawców), zastosowano metodę cytometrii przepływowej. Badania przeprowadzono na płytkach krwi spoczynkowych oraz pobudzonych agonistami dla najważniejszych receptorów aktywujących wewnątrzpłytkowe szlaki przekazywania sygnału (ADP, TRAP).

Płytki krwi zostały wyznakowane przy użyciu przeciwciał specyficznych dla swoistego antygeny powierzchniowego CD61 (przeciwciała anti-CD61 sprzężone ze znacznikiem FITC). W celu unifikacji wyników pomiarów dokonywano każdorazowo na 15000 obiektach CD61-pozytywnych. W oparciu o parametr rozproszenia czołowego – FSC w populacji komórek CD61-pozytywnych zostały wyselekcjonowane frakcje AGs i PMPs. Obiekty CD61-pozytywne, dla których parametr FSC wynosił powyżej  $10^3$  były uznawane za AGs, a poniżej  $10^2$  traktowane jako PMPs. Do oceny powierzchniowej ekspresji P-selektyny będącej markerem aktywacji płytek krwi zastosowano przeciwciało anti-CD62P sprzężone ze znacznikiem PE. Obiekty CD61-pozytywne wykazujące poziom fluorescencji PE powyżej  $10^{1,5}$  w skali logarymicznej uznane były za płytki krwi z wyeksponowaną powierzchniowo P-selektyną. Odsetek obiektów CD62P-pozytywnych liczono każdorazowo w stosunku do całkowitej puli zliczonych płytek krwi (15000 obiektów CD61-pozytywnych) (**Ryc. 7A-C**).

W celu określenia ilości powstających PLCs zastosowano dwubarwnikowe znakowanie markerów powierzchniowych specyficznych dla płytek krwi oraz leukocytów (odpowiednio przeciwciała anti-CD61/FITC oraz anti-CD45/PE). Pomiarów fluorescencji dokonywano zliczając każdorazowo 15000 obiektów CD45-pozytywnych (**Ryc. 7D**). Po wprowadzeniu odpowiednich parametrów bramkowania za PLCs uznano obiekty o odpowiedniej jednoczesnej fluorescencji znacznika FITC i PE. Wyodrębnione subpopulacje: CR1-1 (obiekty CD45-pozytywne), CR1-2 (obiekty CD45/CD61-pozytywne), CR1-3 (obiekty CD61-pozytywne) oraz CR1-4 (obiekty CD45/CD61-negatywne) zostały przedstawione na wykresie punktowym (ang. *Dot-Plot*) (**Ryc. 8**).



**Rycina 7.** Przykładowe histogramy obrazujące strategię bramkowania obiektów: CD61-pozytywnych (A), CD62P-pozytywnych (B), AGs i PMPs (C) oraz obiektów CD45-pozytywnych (D).



**Rycina 8.** Przykładowy wykres Dot-Plot reprezentujący strategię bramkowania PLCs w układzie komórek podwójnie znakowanych. Obiekty wykazujące intensywność fluorescencji FITC na kanale FL1 w skali logarymicznej powyżej  $10^1$  uznane są za płytki krwi i obecne są w regionie CR1-3. Region CR1-1 stanowią obiekty CD45-pozytywne wykazujące fluorescencję PE w kanale FL2 w skali logarymicznej powyżej  $10^{1,5}$ . PLCs obecne są w regionie CR1-2 i wykazują świecenie obu znaczników.

### Stopień spontanicznej aktywacji płytek w krążeniu

W nietraktowanej krwi pełnej, na podstawie różnicowania komórek w dwuwymiarowym układzie FSC vs SSC, wykazano około 2,5-krotnie podwyższony odsetek PMPs ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 9**) oraz ponad 2-krotny wzrost odsetka AGs ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 10**) w odniesieniu do całkowitej puli analizowanych płytek krwi w PMS, w porównaniu do kontroli. Wskazuje to na zwiększoną aktywność płytek krwi w warunkach *in vivo* i może świadczyć o chronicznej aktywacji płytek w krążeniu pacjentów z PMS.

Na podstawie analizy intensywności świecenia barwnika PE sprzężonego z przeciwciałami skierowanymi przeciwko P-selektynie (CD62P/PE) stwierdzono, że poziom powierzchniowej ekspresji tego markera aktywacji płytek jest wyższy 9-krotnie u pacjentów z PMS ( $p < 0,001$ ) w stosunku do płytek kontrolnych (**Ryc. 11**). Wykazano również zwiększoną zdolność spoczynkowych płytek krwi do tworzenia PLCs, o czym świadczył około 2-krotny wzrost liczby powstałych PLCs u pacjentów z PMS ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 12**) w porównaniu do grupy kontrolnej.



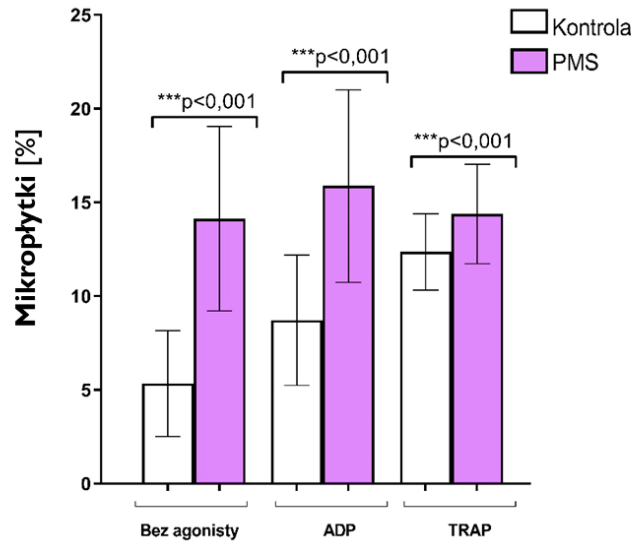
### **Aktywność płytek krwi w odpowiedzi na czynniki aktywujące (ADP, TRAP)**

W przeprowadzonych badaniach ocenie poddano również reaktywność płytek krwi rozumianą jako zdolność do reagowania w odpowiedzi na działanie czynników aktywujących. Do badań użyto ADP (20  $\mu$ M) oraz TRAP (500  $\mu$ M), porównując czynność płytek w próbkach krwi pochodzącej od pacjentów z PMS i kontrolnych. W wyniku stymulacji płytek krwi z użyciem ADP, w krwi PMS zaobserwowano około 2-krotny wzrost frakcji PMPs ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 9**) i ponad 2-krotny wzrost puli AGs ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 10**) oraz prawie 3-krotnie wyższą ekspresję CD62P ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 11**), w stosunku do kontroli.

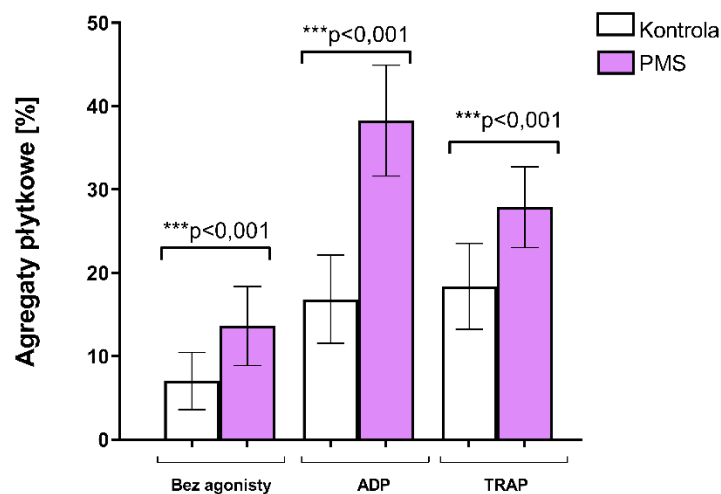
Aktywacja płytek krwi z użyciem TRAP powodowała około 15% wzrost frakcji PMPs ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 9**), 1,5-krotny wzrost frakcji AGs ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 10**) oraz ponad 6-krotnie zwiększoną ekspresję CD62P ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 11**) w PMS, w stosunku do kontroli.

Przy czym, należy zaznaczyć, że w przypadku krwi pochodzącej od pacjentów z PMS, wzrost odsetka PMPs obserwowany po działaniu agonistów, był nieistotny statystycznie w stosunku do frakcji PMPs jaką oznaczono bezpośrednio po pobraniu, w krwi nietraktowanej agonistami (**Ryc. 9**). Wskazuje to na wzmożoną aktywację płytek w krwi obwodowej chorych, gdyż nadmierne generowanie PMPs jest markerem tzw. zużycia płytek, do którego dochodzi w wyniku często powtarzających się epizodów ich aktywacji.

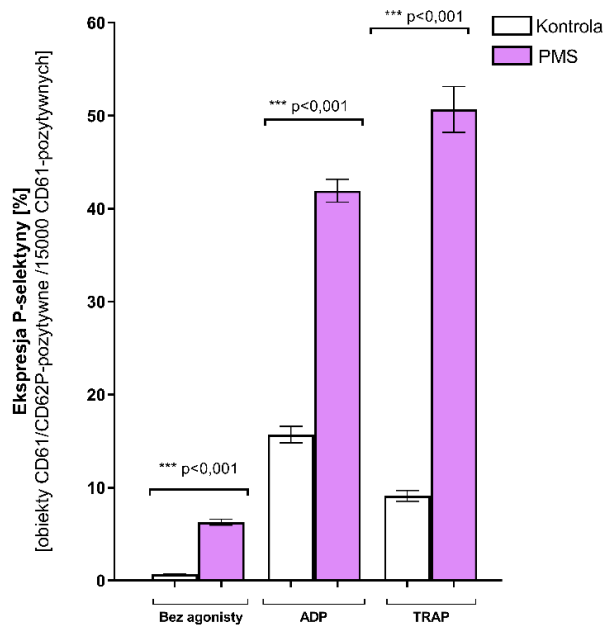
W związku z tym, że stymulacja płytek krwi za pośrednictwem TRAP powodowała znaczący wzrost powierzchniowej ekspresji P-selektyny, odpowiedzialnej za tworzenie PLCs, dodatkowo oznaczono odsetek PLCs w krwi pełnej aktywowanej TRAP i wykazano ponad 2-krotny wzrost frakcji PLCs u chorych z PMPs w porównaniu do kontroli ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 12**).



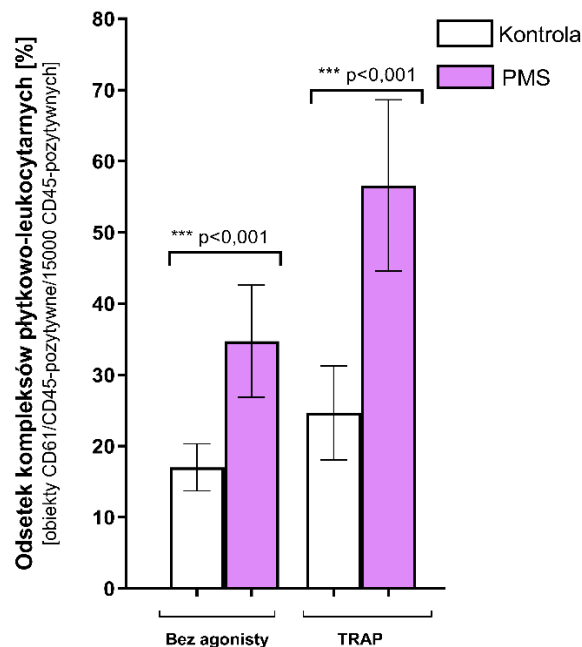
**Rycina 9.** Odsetek PMPs w analizowanej puli 15000 obiektów CD61-pozytywnych, spoczynkowych i aktywowanych (20  $\mu$ M ADP, 500  $\mu$ M TRAP), mierzony metodą cytometrii przepływowej w krwi pełnej, w grupie pacjentów z PMS (n = 50) oraz w grupie kontrolnej (n = 50). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako wartość średnią odsetka PMPs  $\pm$  SD (PMS vs kontrola \*\*\*p < 0,001).



**Rycina 10.** Odsetek AGs w analizowanej puli 15000 obiektów CD61-pozytywnych spoczynkowych i aktywowanych (20  $\mu$ M ADP, 500  $\mu$ M TRAP), mierzony metodą cytometrii przepływowej w krwi pełnej, w grupie pacjentów z PMS (n = 50) oraz w grupie kontrolnej (n = 50). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako wartość średnią odsetka AGs  $\pm$  SD, (PMS vs kontrola \*\*\*p < 0,001).



**Rycina 11.** Poziom ekspresji P-selektyny wyrażony jako odsetek obiektów CD61/CD62P-pozytywnych w analizowanej puli 15000 obiektów CD61-pozytywnych spoczynkowych i aktywowanych (20  $\mu$ M ADP, 500  $\mu$ M TRAP), mierzony metodą cytometrii przepływowej w krwi pełnej, w grupie pacjentów z PMS (n = 50) oraz w grupie kontrolnej (n = 50). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako wartość średnią odsetka eksponowanej P-selektyny  $\pm$  SD, (PMS vs kontrola \*\*\*p < 0,001).



**Rycina 12.** Odsetek PLCs w analizowanej puli 15000 obiektów CD45-pozytywnych, mierzony metodą cytometrii przepływowej w pełnej krwi bez agonisty i aktywowanej (500  $\mu$ M TRAP), w grupie pacjentów z PMS (n = 50) oraz w grupie kontrolnej (n = 50). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako wartość średnią odsetka PLCs  $\pm$  SD, (PMS vs kontrola \*\*\*p < 0,001).

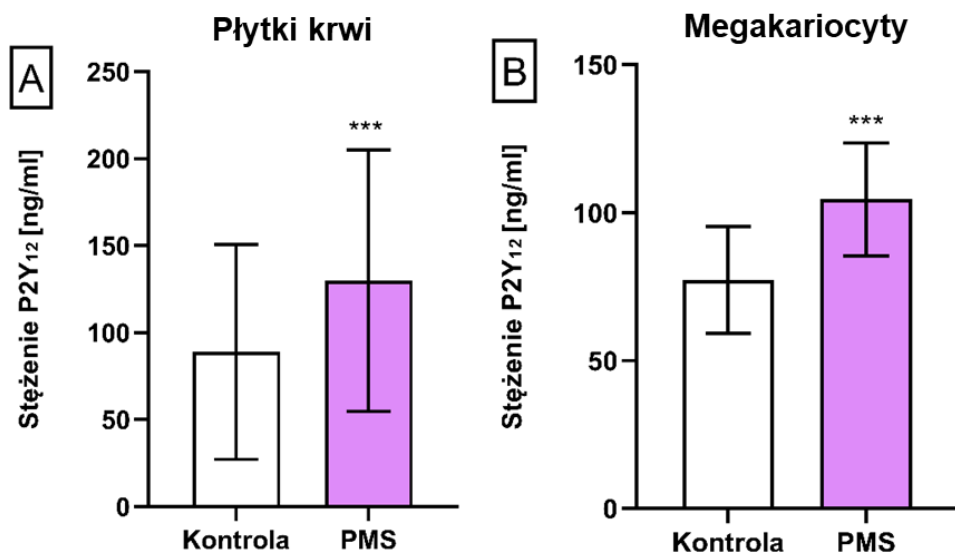
#### **4.1.2. Pomiar stężenia receptorów P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA**

Pomiar stężenia cząsteczek białkowych wybranych receptorów powierzchniowych, kluczowych dla biologicznej aktywności płytek krwi, został wykonany w lizatach płytek krwi oraz megakariocytów (uzyskanych z próbek doprowadzonych uprzednio do tego samego miana komórek), przy użyciu komercyjnych zestawów Human ELISA (Fine Test) zgodnie z protokołem producenta. Stężenie badanych receptorów określono korzystając z odpowiednich krzywych wzorcowych wyrażonych w ng/ml.

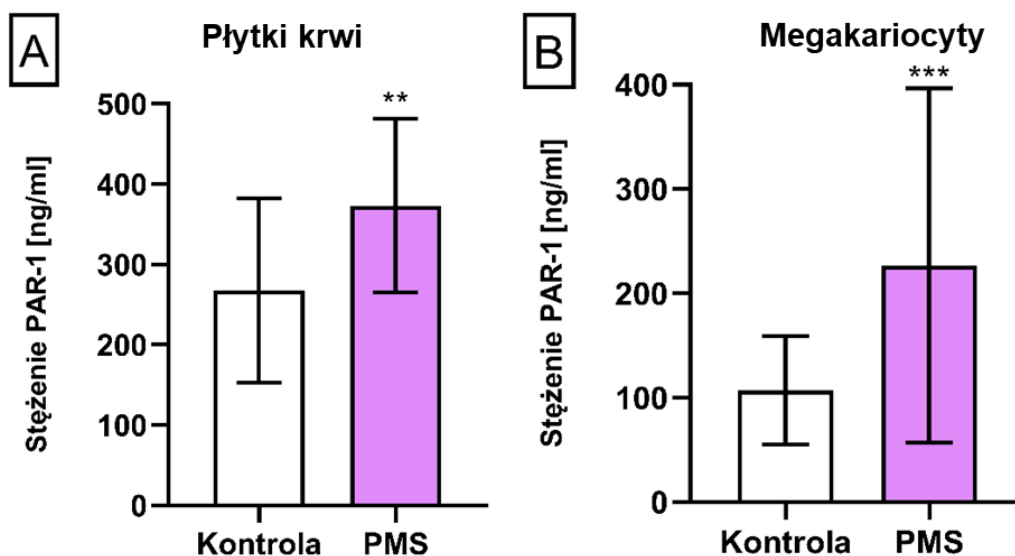
Na podstawie wyników uzyskanych metodą ELISA stwierdzono, że średnie stężenie cząsteczek receptora P2Y<sub>12</sub> w płytkach krwi pochodzących od pacjentów z PMS wynosiło  $129,98 \pm 75,24$  ng/ml i było o 46% wyższe od stężenia w płytkach prawidłowych wynoszącego średnio  $88,9 \pm 61,73$  ng/ml ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 13A**). Analogiczne wyniki uzyskano dla megakariocytów, gdzie wzrost średniego stężenia w PMS wynosił 35% (PMS vs kontrola:  $104,52 \pm 19,03$  ng/ml vs  $77,28 \pm 18,15$  ng/ml) ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 13B**).

Również średnie stężenie PAR-1 w płytkach krwi pochodzących od pacjentów z PMS było wyższe w stosunku do kontroli o około 40% ( $373,3 \pm 108,25$  ng/ml vs  $267,73 \pm 114,97$  ng/ml) ( $p < 0,01$ ) (**Ryc. 14A**), a w przypadku megakariocytów średnie stężenie PAR-1 było ponad 2-krotnie wyższe w PMS w porównaniu do grupy kontrolnej (PMS vs kontrola:  $226,73 \pm 169,89$  ng/ml vs  $107,26 \pm 51,99$  ng/ml) ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 14B**).

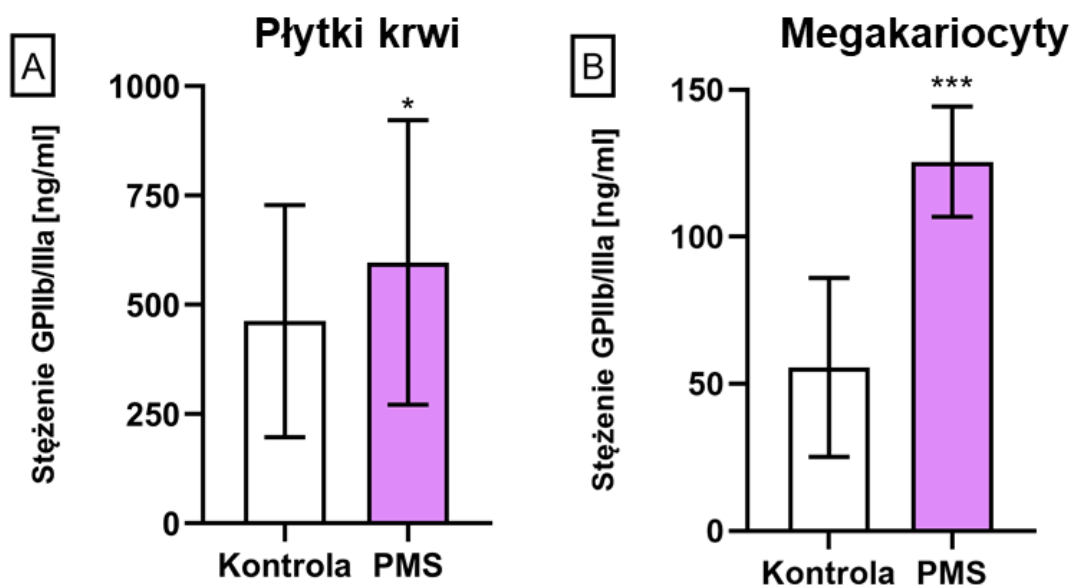
Wykazano także wyższą o około 30% ( $p < 0,05$ ) ekspresję GPIIb/IIIa w płytkach pacjentów z PMS, w porównaniu z ilością tego białka w płytkach kontrolnych. Średnia wartość stężenia GPIIb/IIIa w płytkach krwi pochodzących od pacjentów z PMS wynosiła  $596,56 \pm 325,70$  ng/ml, natomiast w grupie kontrolnej  $462,72 \pm 265,24$  ng/ml (**Ryc. 15A**). W przypadku megakariocytów stwierdzono 2-krotny wzrost ( $p < 0,001$ ) średniego stężenia GPIIb/IIIa w PMS ( $125,53 \pm 50,69$  ng/ml) w porównaniu ze średnią wartością kontroli wynoszącą  $55,62 \pm 30,42$  ng/ml (**Ryc. 15B**). Wartości stężeń analizowanych receptorów zostały przedstawione w **Tab. 29**.



**Rycina 13.** Średnie stężenie P2Y<sub>12</sub> [ng/ml] ± SD w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\*\*p < 0,001.



**Rycina 14.** Średnie stężenie PAR-1 [ng/ml] ± SD w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.



**Rycina 15.** Średnie stężenie GPIIb/IIIa [ng/ml]  $\pm$  SD w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001.

**Tabela 29.** Stężenie receptorów kluczowych dla hemostatycznej funkcji płytek krwi [ng/ml]  $\pm$  SD

Receptor	Średnia wartość stężenia [ng/ml] $\pm$ SD		Istotność statystyczna (p)
	w płytkach krwi		
	Kontrola	PMS	
P2Y <sub>12</sub>	88,90 $\pm$ 61,73	129,98 $\pm$ 75,24	p < 0,001
PAR-1	267,73 $\pm$ 114,97	373,30 $\pm$ 108,25	p < 0,01
GPIIb/IIIa	462,72 $\pm$ 265,24	596,56 $\pm$ 325,70	p < 0,05
Receptor	Średnia wartość stężenia $\pm$ SD		Istotność statystyczna (p)
	w megakariocytach		
	Kontrola	PMS	
P2Y <sub>12</sub>	77,28 $\pm$ 18,15	104,52 $\pm$ 19,03	p < 0,001
PAR-1	107,26 $\pm$ 51,99	226,73 $\pm$ 169,89	p < 0,001
GPIIb/IIIa	55,62 $\pm$ 30,42	125,53 $\pm$ 50,69	p < 0,001

#### **4.1.3. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących P2Y<sub>12</sub>, PAR-1 oraz GPIIb/IIIa w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR**

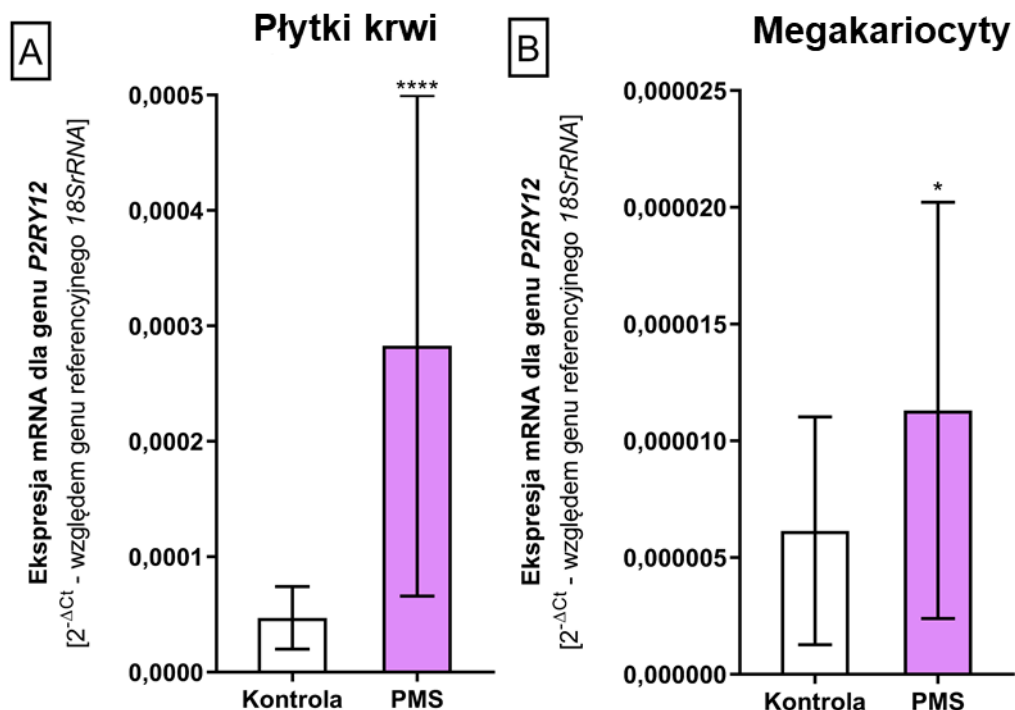
Ze względu na rozwinięty system receptorów błonowych płytki krwi charakteryzują się wysoką reaktywnością w odpowiedzi na działanie bodźców środowiskowych, co determinuje ich rolę w układzie hemostazy. W celu określenia potencjalnych zdolności reakcyjnych płytek krwi u chorych z PMS w stosunku do płytek kontrolnych, wykonano pomiar ekspresji wybranych transkryptów mRNA zarówno w płytkach krwi jak i w megakariocytach, dla genów kodujących kluczowe receptory powierzchniowe. Względny poziom ekspresji (w odniesieniu do genu referencyjnego *18S rRNA*) oznaczono dla receptora dla ADP – P2Y<sub>12</sub>, trombiny – PAR-1 oraz fibrynogenu – GPIIb/IIIa.

Do obliczeń wykorzystano metodę porównań cykli progowych (Ct) stosując formułę pojedynczej delty ( $2^{-\Delta Ct}$ ). Pomiary wartości Ct wykonano w dwóch powtórzeniach dla każdej badanej próbki i wyliczono wartość średnią, a następnie obliczono ( $\Delta Ct$ ) tj. różnicę ze średnich Ct otrzymanych dla badanego genu i genu referencyjnego. Następnie, dla każdego transkryptu określono różnicę pomiędzy średnią wartością  $\Delta Ct$  obliczoną dla grupy PMS i grupy kontrolnej.

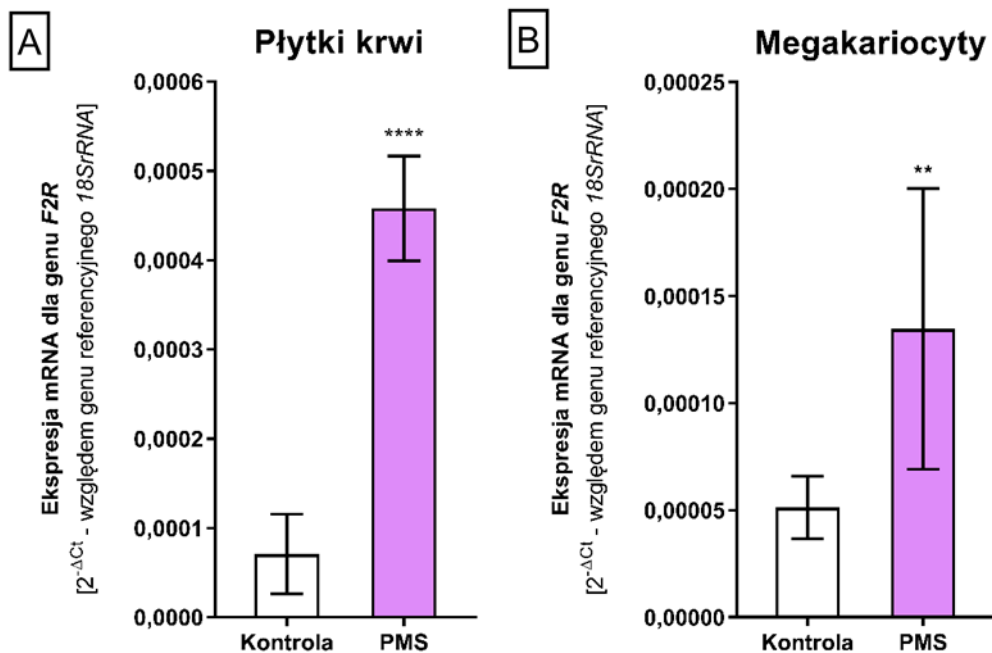
Uzyskane wyniki wskazują na istotny statystycznie ( $p < 0,0001$ ) około 6-krotny wzrost ekspresji mRNA w płytkach krwi dla genu *P2RY12* (**Ryc. 16A**) oraz genu *F2R* kodującego receptor dla trombiny (**Ryc. 17A**) u pacjentów z PMS wobec grupy kontrolnej. Ponadto, około 3-krotny wzrost ekspresji cząsteczek mRNA dla genów kodujących obie podjednostki integrynowe receptora GPIIb/IIIa, tj. zarówno dla genu *ITGA2B*, jak i *ITGB3* w płytkach krwi pacjentów z PMS w porównaniu do grupy kontrolnej (**Ryc. 18A1** oraz **18B1**).

Analiza względnej ekspresji tych samych transkryptów w megakariocytach wykazała około 2-krotny wzrost poziomu mRNA dla genu *P2RY12* ( $p < 0,05$ ) (**Ryc. 16B**), około 2,5-krotny dla genu *F2R* ( $p < 0,01$ ) (**Ryc. 17B**) oraz 1,5-krotny dla genu *ITGA2B* ( $p < 0,05$ ) (**Ryc. 18A2**) i ponad 2-krotny dla *ITGB3* ( $p < 0,01$ ) (**Ryc. 18B2**) w grupie pacjentów z PMS wobec wyników uzyskanych w grupie kontrolnej.

Wartości względnej ekspresji badanych genów na poziomie mRNA (wyrażone jako  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$ ) umieszczone zostały w **Tab. 30**.

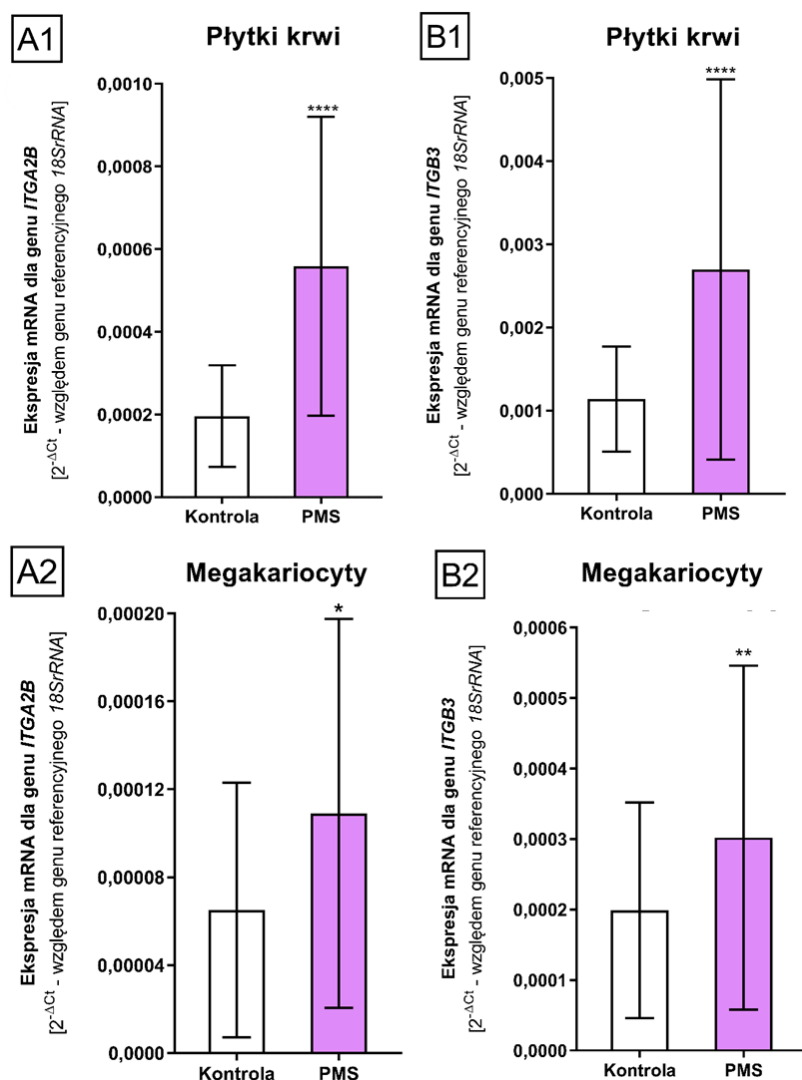


**Rycina 16.** Ekspresja genu *P2RY12* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*), \*p < 0,05; \*\*\*\*p < 0,0001.



**Rycina 17.** Ekspresja genu *F2R* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*), \*\* p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001.





**Rycina 18.** Ekspresja genów *ITGA2B* (A) oraz *ITGB3* (B) (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A1, B1) i megakariocytach (A2, B2) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18S rRNA*), \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001.

**Tabela 30.** Wartość względnej ekspresji mRNA dla genów kodujących kluczowe receptory powierzchniowe płytek krwi

Badany gen	Średnia wartość $2^{-\Delta Ct} \pm SD$ w płytkach krwi		Istotność statystyczna (p)
	Kontrola	PMS	
<i>P2Y12</i>	0,000047 ± 0,000027	0,000283 ± 0,000198	<b>p &lt; 0,0001</b>
<i>F2R</i>	0,000071 ± 0,000045	0,000458 ± 0,000194	<b>p &lt; 0,0001</b>
<i>ITGA2B</i>	0,000170 ± 0,000090	0,000487 ± 0,000289	<b>p &lt; 0,0001</b>
<i>ITGB3</i>	0,001141 ± 0,000633	0,002698 ± 0,002286	<b>p &lt; 0,0001</b>
Badany gen	Średnia wartość $2^{-\Delta Ct} \pm SD$ w megakariocytach		Istotność statystyczna (p)
	Kontrola	PMS	
<i>P2Y12</i>	0,000006 ± 0,000005	0,000011 ± 0,000009	<b>p &lt; 0,05</b>
<i>F2R</i>	0,000051 ± 0,000098	0,000135 ± 0,000040	<b>p &lt; 0,01</b>
<i>ITGA2B</i>	0,000065 ± 0,000058	0,000109 ± 0,000089	<b>p &lt; 0,05</b>
<i>ITGB3</i>	0,000199 ± 0,000153	0,000312 ± 0,000275	<b>p &lt; 0,01</b>

#### 4.1.4. Cytometryczne oznaczenie stopnia reaktywności płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub> poprzez pomiar fosforylacji białek VASP

W celu określenia stopnia aktywacji płytkowego receptora P2Y<sub>12</sub> w odpowiedzi na działanie ADP, wykonano pomiar poziomu fosforylacji białek VASP. Zastosowanie PGE1 zwiększa poziom fosforylacji VASP poprzez stymulację cykazy adenylanowej. Pobudzenie receptora P2Y<sub>12</sub> przez ADP hamuje wytwarzanie cAMP, co zmniejsza fosforylację białek VASP indukowaną przez PGE1. Oznaczenie poziomu fosforylacji białek VASP (VASP-P) pozwala na ocenę aktywności receptora P2Y<sub>12</sub>. Analizę wykonano metodą cytometrii przepływowej we krwi pełnej z zastosowaniem standardowego testu PLT VASP/P2Y<sub>12</sub> (Biocytex).

Wyniki zostały przedstawione jako wartość wskaźnika reaktywności płytek PRI określonego na podstawie stopnia ufosforylowania białek VASP, które jest silnie skorelowane z hamowaniem zależnej od ADP agregacji płytek krwi.

PRI wyznaczono na podstawie pomiaru MFI białek VASP-P po stymulacji PGE1 a także w obecności PGE1 i ADP; a następnie z zastosowaniem wyliczeń według poniższego wzoru:

$$\text{PRI} [\%] = \frac{\text{MFIC}_{\text{PGE1}} - \text{MFIC}_{\text{PGE1+ADP}}}{\text{MFIC}_{\text{PGE1}}} \times 100$$

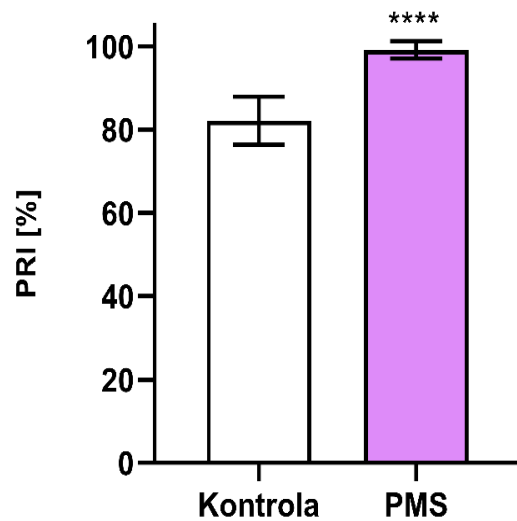
$$\text{MFIC}_{\text{PGE1}} = \text{MFI}_{\text{PGE1}} - \text{MFI}_{\text{kontrola izotypowa}}$$

$$\text{MFIC}_{\text{PGE1+ADP}} = \text{MFI}_{\text{PGE1+ADP}} - \text{MFI}_{\text{kontrola izotypowa}}$$

Gdzie:

- **MFIC** (ang. *corrected MFI*) – skorygowana wartość MFI o wartość fluorescencji uzyskanej dla kontroli izotypowej ( $\text{MFI}_{\text{kontrola izotypowa}}$ ),
- **MFIC<sub>PGE1</sub>** – MFIC w obecności PGE1,
- **MFIC<sub>PGE1+ADP</sub>** – MFIC w obecności PGE1 i ADP.

Płytki krwi pochodzące od pacjentów z PMS osiągnęły niemal w każdej próbie badanej maksymalny poziom reaktywności w odpowiedzi na działanie ADP ( $\text{PRI} = 99,8 \pm 2\%$ ), podczas gdy średnia reaktywność płytek kontrolnych była o około 20% niższa ( $\text{PRI} = 82,1 \pm 5,8\%$ ) ( $p < 0,0001$ ) (**Ryc. 19**).



**Rycina 19.** Poziom fosforylacji białek VASP w analizowanej puli 15000 obiektów CD61-pozytywnych, mierzony metodą cytometrii przepływowej w krwi pełnej, w grupie pacjentów z PMS (n = 30) oraz w grupie kontrolnej (n = 30). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako średnią wartość wskaźnika reaktywności płytek PRI [%] ± SD, \*\*\*\*p < 0,0001.

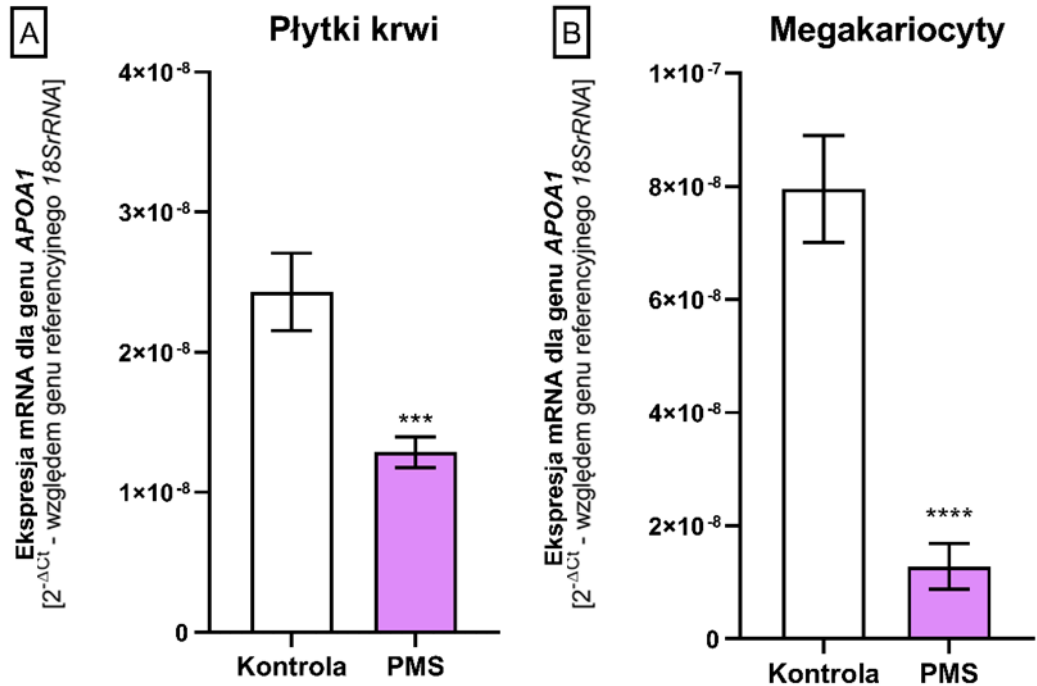
#### 4.1.5. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących biomarkery miażdżycy w płytkach krwi i megakariocytach techniką qPCR

Dane literaturowe wskazują, że istnieje dobrze udokumentowany związek między występowaniem miażdżycy tętnic a pogorszeniem niepełnosprawności ruchowej i osłabieniem funkcji poznawczych u pacjentów z MS. Do uznanych markerów miażdżycy tętnic zalicza się apolipoproteinę A1 (ang. *Apolipoprotein A1*, ApoA1) oraz  $\alpha$ 2-makroglobulinę (ang.  *$\alpha$ 2-macroglobulin*,  $\alpha$ 2M). Funkcja ApoA1 związana jest z kontrolą układu krzepnięcia krwi oraz aktywacją endogennych szlaków fibrynolitycznych. Badania epidemiologiczne potwierdziły, że obniżony poziom ApoA1 ma działanie pro-miażdżycowe. Podczas gdy wzrost ekspresji  $\alpha$ 2M promuje procesy pro-zakrzepowe i nasila stan zapalny, przez co wzmacnia tworzenie zmian miażdżycowych.

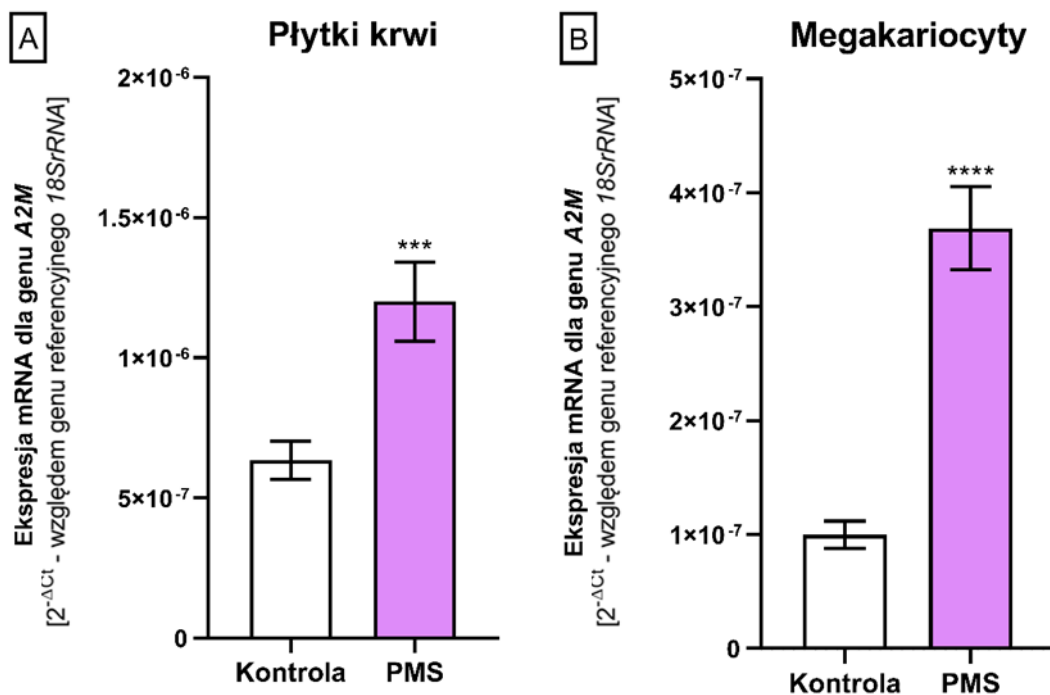
W celu identyfikacji poziomu biomarkerów miażdżycowych w płytkach krwi i megakariocytach pochodzących od pacjentów z PMS oraz w grupie kontrolnej wykonano pomiar względnej ekspresji mRNA (względem genu referencyjnego – *18S rRNA*) dla genów kodujących ApoA1 (*APOA1*) oraz  $\alpha$ 2M (*A2M*). Uzyskane wyniki wykazały znacząco niższą ekspresję transkryptów *APOA1* zarówno w płytkach krwi (**Ryc. 20A**), jak i w megakariocytach (**Ryc. 20B**) pochodzących od pacjentów z PMS w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio  $p < 0,001$  oraz  $p < 0,0001$ ). Natomiast ekspresja mRNA dla genu *A2M* była ponad 2-krotnie wyższa ( $p < 0,001$ ) w płytkach krwi (**Ryc. 21A**) i około 4-krotnie ( $p < 0,0001$ ) w megakariocytach (**Ryc. 21B**) pochodzących od osób z PMS w porównaniu z grupą kontrolną.

Wykonana została analiza korelacji pomiędzy poziomem względnej ekspresji transkryptów dla genów kodujących białka ApoA1 oraz  $\alpha$ 2M (uznanych za biomarkery miażdżycy), a poziomem markerów stanu czynnościowego płytek krwi w warunkach spontanicznej aktywacji i aktywacji indukowanej TRAP (AGs, PMPs, P-selektyna i PLCs) i ekspresji receptora dla TRAP na poziomie białka (PAR-1) i genu *F2R*.

Wyniki wieloparametrycznej analizy zostały zestawione w **Tab. 31** i wskazują na wysoką korelację ujemną dla ekspresji genu *APOA1* oraz dodatnią dla ekspresji genu *A2M* względem wszystkich parametrów określających stan czynnościowy płytek krwi, zarówno w PMS, jak i w kontroli.



**Rycina 20.** Ekspresja genu *APOA1* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.



**Rycina 21.** Ekspresja genu *A2M* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

**Tabela 31.** Parametry korelacji dla ekspresji oraz *APOA1* oraz *A2M* względem parametrów określających stan czynnościowy płytek krwi. Korelację analizowano metodą rang Spearmana, a następnie wartość p skorygowano przy użyciu testów Benjamini-Hochberga, Holm-Sidak i Bonferroni-Sidak (wartości istotne statystycznie wyróżniono)

Parametry	Rho	p	Typ korekty		
			Benjamin-Hochberg	Holm-Sidak	Bonferroni-Sidak
<b>Ekspresja mRNA dla genu <i>APOA1</i> w kontrolnych płytkach krwi vs</b>			<b>p</b>		
Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	-0,5779	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PAR-1 [ng/ml]	-0,4964	<b>0,0276</b>	<b>0,0276</b>	<b>0,0276</b>	0,2441
AGs [%] (bez agonisty)	-0,7107	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	-0,7035	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
P-selektyna [%] (bez agonisty)	-0,4675	<b>0,0098</b>	<b>0,0109</b>	<b>0,0253</b>	0,0938
PLCs [%] (bez agonisty)	-0,6024	<b>0,0011</b>	<b>0,0024</b>	<b>0,0077</b>	<b>0,0109</b>
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,4835	<b>0,0085</b>	<b>0,0106</b>	<b>0,0253</b>	0,0818
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5713	<b>0,0012</b>	<b>0,0024</b>	<b>0,0077</b>	<b>0,0119</b>
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5112	<b>0,0051</b>	<b>0,0073</b>	<b>0,0202</b>	<b>0,0498</b>
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5412	<b>0,0023</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,0114</b>	<b>0,0228</b>
<b>Ekspresja mRNA dla genu <i>APOA1</i> w płytkach krwi od pacjentów z PMS vs</b>					
Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	-0,4046	<b>0,0062</b>	<b>0,0089</b>	<b>0,0246</b>	0,0603
PAR-1 [ng/ml]	-0,7693	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AGs [%] (bez agonisty)	-0,6823	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	-0,6809	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
P-selektyna [%] (bez agonisty)	-0,3627	<b>0,0495</b>	<b>0,0495</b>	<b>0,0495</b>	0,3981
PLCs [%] (bez agonisty)	-0,6714	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,4691	<b>0,0096</b>	<b>0,012</b>	<b>0,0285</b>	<b>0,092</b>
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5538	<b>0,0018</b>	<b>0,0036</b>	<b>0,0108</b>	<b>0,0179</b>
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	-0,4546	<b>0,0123</b>	<b>0,0137</b>	<b>0,0285</b>	0,1164
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5292	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>	<b>0,0149</b>	<b>0,0296</b>
<b>Ekspresja mRNA dla genu <i>APOA1</i> w kontrolnych megakariocytach vs</b>					
Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	-0,4631	<b>0,0106</b>	<b>0,0151</b>	<b>0,0417</b>	0,1011
PAR-1 [ng/ml]	-0,7127	<b>0,0006</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,006</b>	<b>0,006</b>
AGs [%] (bez agonisty)	-0,5555	<b>0,0017</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0119</b>	<b>0,0169</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	-0,5604	<b>0,0015</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0119</b>	<b>0,0149</b>
P-selektyna [%] (bez agonisty)	-0,4843	<b>0,013</b>	<b>0,0163</b>	<b>0,0417</b>	0,1227
PLCs [%] (bez agonisty)	-0,5156	<b>0,004</b>	<b>0,008</b>	<b>0,0238</b>	<b>0,0393</b>
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,4129	<b>0,0241</b>	<b>0,0241</b>	<b>0,0417</b>	0,2165
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5700	<b>0,0012</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0107</b>	<b>0,0119</b>
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	-0,4942	<b>0,006</b>	<b>0,01</b>	<b>0,0296</b>	0,0584
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,4320	<b>0,0179</b>	<b>0,0199</b>	<b>0,0417</b>	0,1652
<b>Ekspresja mRNA dla genu <i>APOA1</i> w megakariocytach od pacjentów z PMS vs</b>					
Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	-0,5478	<b>0,0024</b>	<b>0,008</b>	<b>0,0205</b>	<b>0,0237</b>
PAR-1 [ng/ml]	-0,5737	<b>0,0092</b>	<b>0,0153</b>	<b>0,0452</b>	0,0883
AGs [%] (bez agonisty)	-0,4983	<b>0,0065</b>	<b>0,013</b>	<b>0,0392</b>	0,0631
PMPs [%] (bez agonisty)	-0,3698	<b>0,049</b>	<b>0,049</b>	<b>0,0885</b>	0,3949
P-selektyna [%] (bez agonisty)	-0,5896	<b>0,0023</b>	<b>0,008</b>	<b>0,0205</b>	<b>0,0228</b>
PLCs [%] (bez agonisty)	-0,5887	<b>0,0057</b>	<b>0,013</b>	<b>0,0392</b>	0,0556
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,436	<b>0,0304</b>	<b>0,038</b>	<b>0,0885</b>	0,2656
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,3928	<b>0,0395</b>	<b>0,0439</b>	<b>0,0885</b>	0,3317
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	-0,6045	<b>0,0017</b>	<b>0,008</b>	<b>0,0169</b>	<b>0,0169</b>
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	-0,5342	<b>0,0114</b>	<b>0,0163</b>	<b>0,0452</b>	0,1083

**Ekspresja mRNA dla genu *A2M* w kontrolnych płytkach krwi vs**

Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	0,5986	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PAR-1 [ng/ml]	0,6525	<b>0,0023</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,0114</b>	<b>0,0228</b>
AGs [%] (bez agonisty)	0,6028	<b>0,0005</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	<b>0,005</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	0,5251	<b>0,0032</b>	<b>0,0046</b>	<b>0,0127</b>	<b>0,0315</b>
P-selektyna [%] (bez agonisty)	0,3925	<b>0,0327</b>	<b>0,0327</b>	<b>0,0492</b>	0,2828
PLCs [%] (bez agonisty)	0,6741	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	0,4104	<b>0,0249</b>	<b>0,0277</b>	<b>0,0492</b>	<b>0,2229</b>
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	0,7294	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	0,4430	<b>0,015</b>	<b>0,0188</b>	<b>0,0443</b>	0,1403
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6154	<b>0,0004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,004</b>

**Ekspresja mRNA dla genu *A2M* w płytkach krwi od pacjentów z PMS vs**

Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	0,8454	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PAR-1 [ng/ml]	0,5994	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AGs [%] (bez agonisty)	0,6628	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	0,4314	<b>0,018</b>	<b>0,02</b>	<b>0,0357</b>	0,1661
P-selektyna [%] (bez agonisty)	0,4003	<b>0,0291</b>	<b>0,0291</b>	<b>0,0357</b>	0,2557
PLCs [%] (bez agonisty)	0,4870	<b>0,0069</b>	<b>0,0099</b>	<b>0,0273</b>	0,0669
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6082	<b>0,0005</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,005</b>
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	0,4724	<b>0,009</b>	<b>0,0113</b>	<b>0,0273</b>	0,0864
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	0,6367	<b>0,0002</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,002</b>
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6935	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

**Ekspresja mRNA dla genu *A2M* w kontrolnych megakariocytach vs**

Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	0,4322	<b>0,0033</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,0099</b>	<b>0,0325</b>
PAR-1 [ng/ml]	0,6897	<b>0,002</b>	<b>0,0029</b>	<b>0,008</b>	<b>0,0198</b>
AGs [%] (bez agonisty)	0,6175	<b>0,0005</b>	<b>0,0013</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,005</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	0,4474	<b>0,0138</b>	<b>0,0138</b>	<b>0,0138</b>	0,1297
P-selektyna [%] (bez agonisty)	0,5658	<b>0,0013</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0129</b>
PLCs [%] (bez agonisty)	0,6806	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	0,5220	<b>0,0035</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,0099</b>	<b>0,0345</b>
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6259	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,003</b>
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	0,5639	<b>0,0014</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0139</b>
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6325	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,003</b>

**Ekspresja mRNA dla genu *A2M* w megakariocytach od pacjentów z PMS vs**

Ekspresja mRNA dla genu <i>F2R</i>	0,7112	<b>0,0006</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>
PAR-1 [ng/ml]	0,7112	<b>0,0006</b>	<b>0,0009</b>	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>
AGs [%] (bez agonisty)	0,6533	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PMPs [%] (bez agonisty)	0,5111	<b>0,0043</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0074</b>	<b>0,0422</b>
P-selektyna [%] (bez agonisty)	0,7447	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
PLCs [%] (bez agonisty)	0,6565	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
AGs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6110	<b>0,0004</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,004</b>
PMPs [%] (po aktywacji TRAP)	0,6157	<b>0,0004</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,004</b>
P-selektyna [%] (po aktywacji TRAP)	0,5728	<b>0,0011</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0033</b>	<b>0,0109</b>
PLCs [%] (po aktywacji TRAP)	0,5193	<b>0,0037</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,0074</b>	<b>0,0364</b>

## 4.2. Analiza zmian molekularnych fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach

### 4.2.1. Pomiar stężenia fibrynogenu w płytkach krwi, megakariocytach oraz w osoczu metodą ELISA

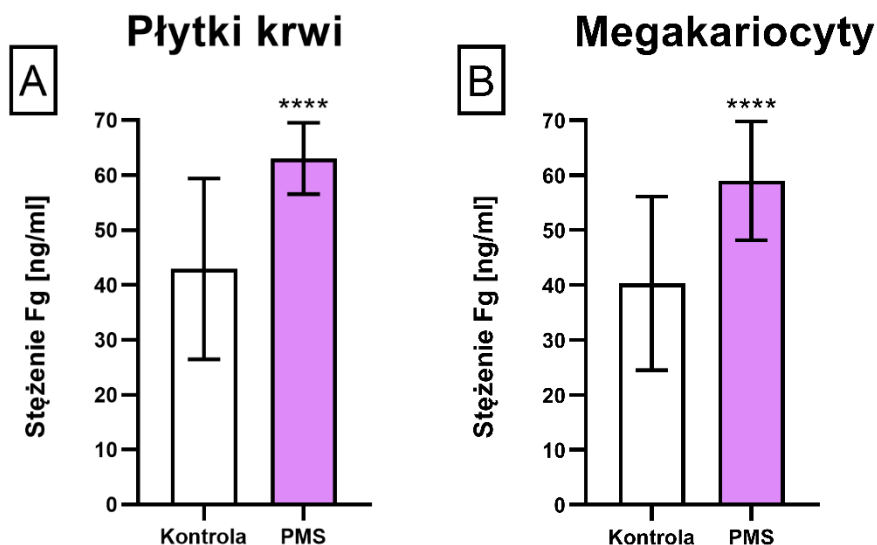
Fibrynogen jest głównym białkiem osoczowej kaskady krzepnięcia, a także jest kluczowy dla agregacji płytek krwi. Syntetyzowany jest głównie przez hepatocyty, a następnie wydzielany do osocza. Jednak niewielka pula fibrynogenu znajduje się w ziarnistościach płytek krwi, a wzrost stężenia fibrynogenu płytkowego może być czynnikiem predysponującym te komórki w kierunku potencjału pro-zakrzepowego. W celu wykrycia potencjalnych różnic w wewnątrzkomórkowym stężeniu fibrynogenu w płytkach i w megakariocytach wykonano oznaczenia z użyciem zestawu Human Fibrinogen SimpleStep ELISA® Kit firmy Abcam. Stężenie fibrynogenu wyznaczono z krzywej kalibracyjnej wyrażonej w ng/ml.

Dane literaturowe wskazują, że nadaktywne płytki krwi o nasilonych właściwościach pro-zakrzepowych cechuje zdolność do absorbowania białek z osocza, w tym również fibrynogenu, co jednak nie zostało dotychczas potwierdzone w MS. Wzmoczona ekspresja płytkowej GPIIb/IIIa w PMS, będącej głównym receptorem dla fibrynogenu, może sprzyjać wychwytowi fibrynogenu z krążącej puli osoczowej. Z tego względu wykonano dodatkowo analizę porównawczą w celu określenia stężenia fibrynogenu w osoczu pacjentów z PMS oraz w grupie kontrolnej. Wyższe stężenie fibrynogenu osoczowego mogłoby być czynnikiem sprzyjającym takiemu wychwytowi. W badaniu wykorzystano komercyjny zestaw Human Fibrinogen ELISA® Kit firmy Abcam. Stężenie fibrynogenu wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej dla białka wzorcowego, wyrażonej w µg/ml.

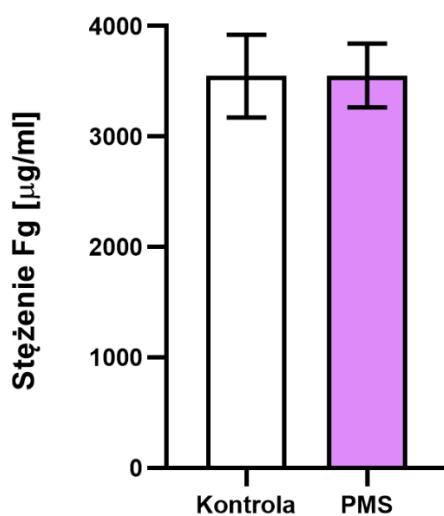
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że średnie stężenie fibrynogenu w płytkach krwi pochodzących od pacjentów z PMS ( $63,07 \pm 6,5$  ng/ml) jest około 1,5-krotnie wyższe ( $p < 0,0001$ ) w porównaniu do płytek prawidłowych ( $42,94 \pm 16,5$  ng/ml) (**Ryc. 22A**). Analogicznie, 1,5-krotny wzrost wykazano w przypadku megakariocytów (PMS vs kontrola:  $58,98 \pm 10,84$  ng/ml vs  $40,29 \pm 15,8$  ng/ml) ( $p < 0,0001$ ) (**Ryc. 22B**).

Średnie stężenie fibrynogenu w osoczu pacjentów z PMS wyniosło  $3553,05 \pm 289,2$  µg/ml i było porównywalne ze średnim stężeniem fibrynogenu w osoczu osób zdrowych, wynoszącym  $3546,79 \pm 376,04$  µg/ml ( $p > 0,05$ ) (**Ryc. 23**). Średnie wartości stężenia fibrynogenu w osoczu, zarówno w grupie kontrolnej, jak i pacjentów z PMS mieszczą się w granicach wartości referencyjnej wynoszącej ok. 3g/L (3000 µg/ml).





**Rycina 22.** Średnie stężenie fibrynogenu [ng/ml]  $\pm$  SD w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\*\*\* p < 0,0001.

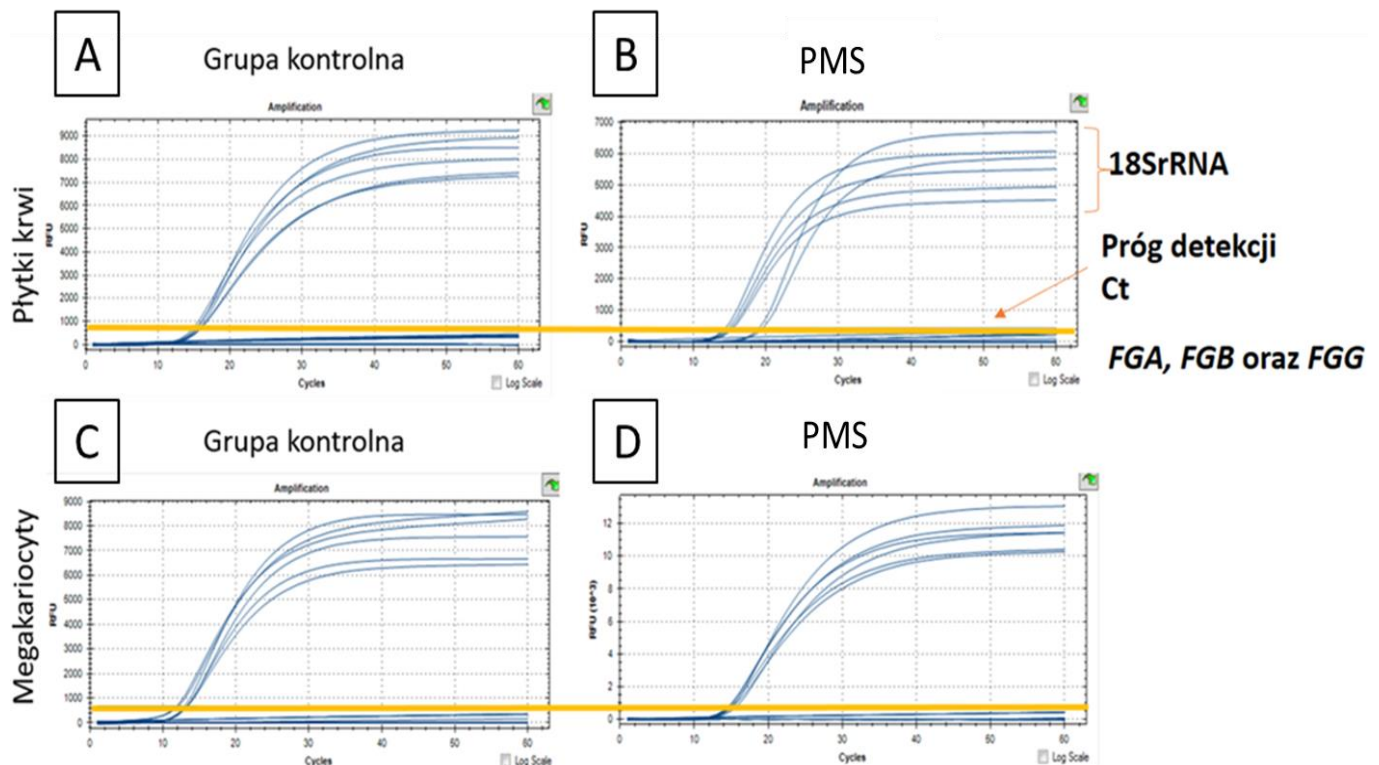


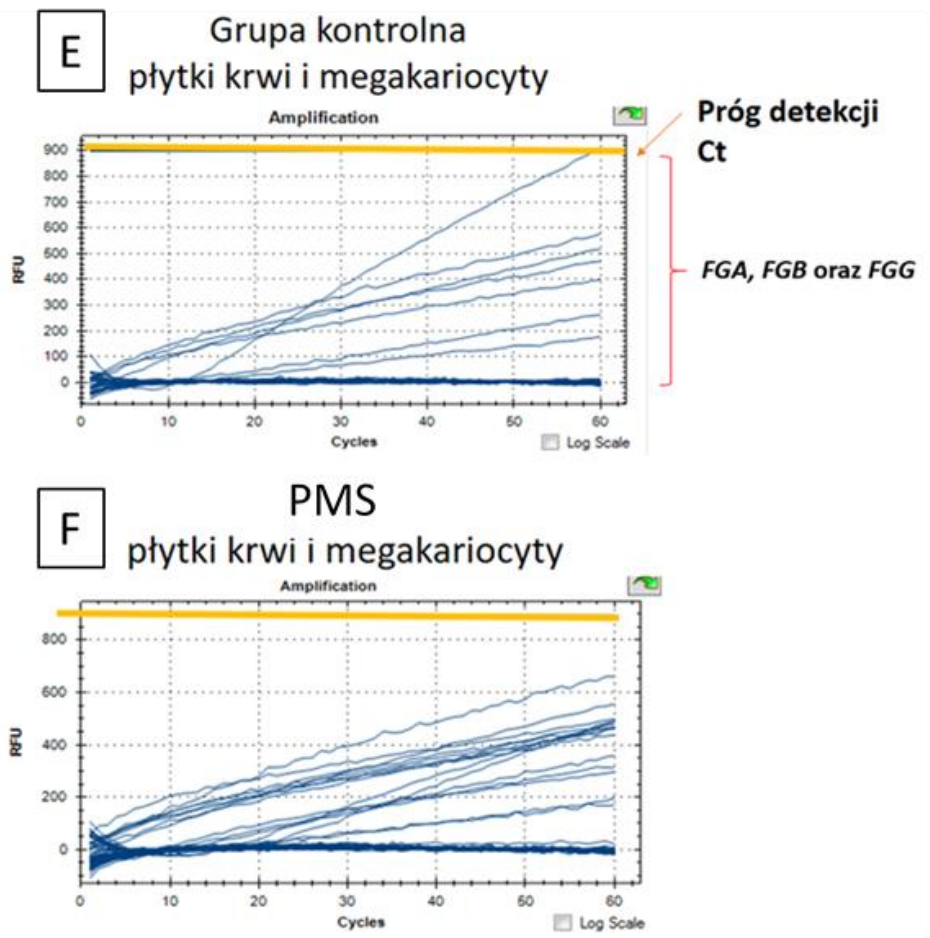
**Rycina 23.** Średnie stężenie fibrynogenu [µg/ml]  $\pm$  SD w osoczu, w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, p > 0,05.

#### 4.2.2. Oznaczenie poziomu mRNA dla genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -, $\beta$ - oraz $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach

Obecny w płytkach fibrynogen może być pochodzenia osoczowego lub może być syntetyzowany w megakariocytach, czy w płytkach krwi na bazie cząsteczek mRNA pochodzących z megakariocytów. Aby określić zdolność płytek krwi i megakariocytów do syntezy fibrynogenu wykonano analizę ilościową transkryptów dla genów *FGA*, *FGB*, *FGG* kodujących odpowiednio łańcuchy  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu w grupie pacjentów z PMS oraz kontrolnej, metodą qPCR przy zastosowaniu sond typu TaqMan. Jako gen referencyjny zastosowano *18SrRNA*.

Uzyskane wyniki przedstawione na **Ryc. 24** obrazują brak istotnej ekspresji cząsteczek mRNA dla genów *FGA*, *FGB* i *FGG* zarówno w płytkach krwi (**Ryc. 24A,B**), jak i w megakariocytach (**Ryc. 24C,D**) w obu porównywanych grupach. Niewielki wzrost powielanych transkryptów genów dla łańcuchów fibrynogenu pozostaje poniżej progu detekcji (**Ryc. 24E,F**).





**Rycina 24.** Wykres średniej intensywności fluorescencji dla ekspresji mRNA genów *FGA*, *FGB* i *FGG* oraz *18SrRNA* w płytkach krwi (A,B) i megakariocytach (C,D) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Poziom fluorescencji poniżej progu detekcji, zarejestrowany dla transkryptów w grupie kontrolnej (E) i w grupie badanej (F).

#### **4.2.3. Identyfikacja potencjalnych PTMs łańcuchów ( $\alpha$ -, $\beta$ - oraz $\gamma$ -) fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS**

Stosując metodę LC-MS-MS/MS przeprowadzono analizę porównawczą PTMs łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach pochodzących od pacjentów z PMS oraz kontroli. Fibrynogen stanowi kluczowy element osoczowej kaskady krzepnięcia, a ponadto jest białkiem odpowiedzialnym za formowanie AGs, przez co modyfikacje jego cząsteczek mogą mieć istotny wpływ na pro-zakrzepowy charakter płytek krwi oraz pro-koagulacyjny potencjał krwi. W analizie porównano także wzór PTMs łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu: płytkowy vs osoczowy oraz płytkowy vs megakariocytarny w obrębie danej grupy (dla PMS i dla kontroli).

Ze względu na złożony charakter analiz przeprowadzonych w celu identyfikacji PTMs, część opisu metodologicznego, odnoszącego się bezpośrednio do tych analizy, umieszczona została poniżej, poprzedzając prezentowane wyniki. Uzyskane widma zostały przeprocesowane przy pomocy pakietu bioinformatycznego Mascot (Matrix Science), którego zasada działania opiera się na porównaniu widm empirycznych z widmami teoretycznymi, wygenerowanymi na podstawie sekwencji aminokwasowych zdeponowanych w bazie danych, przykładając miarę statystyczną do określenia jakości tego porównania. W trakcie analizy skorzystano z opcji tzw. przeszukania '*Error Tolerant*', która ukierunkowana jest na poszukiwanie niespodziewanych PTMs. Standardowo, ze względu na specyfikę programów do analizy danych, jak również naturę danych proteomicznych, podczas analizy istotne jest sprecyzowanie parametrów analizy bioinformatycznej, w celu zminimalizowania tzw. identyfikacji fałszywie pozytywnych. Przeszukanie *Error Tolerant* polega na podwójnym przeszukaniu danych – pierwsze przeszukanie jest restrykcyjne i ma na celu zidentyfikowanie białek, następnie dla tych białek wykonuje się drugie przeszukanie, w którym parametry przeszukania są mniej restrykcyjne w celu wykrycia niespodziewanych PTMs. Skutkuje to wygenerowaniem list modyfikowanych peptydów, jednak uwzględniając charakterystykę pracy programu, część modyfikacji jest fałszywie pozytywna i konieczna jest manualna weryfikacja wyników.

Zaletą spektrometrii mas jest możliwość analizy danych w ujęciu względnie ilościowym, która dostarcza informacji o ile zmienił się poziom ekspresji badanego białka (białek) pomiędzy grupą eksperymentalną, a kontrolną, bez podawania wartości mianowanych, ale poprzez podanie stosunku poziomu ekspresji. Analiza ilościowa wymaga osobnej ścieżki procesowania danych. Spektrometr mas zbiera dwie serie danych tzw. MS1, w której uzyskuje się informacje na temat wartości m/z (stosunek m/z, umożliwiając obliczenie masy cząsteczkowej peptydu),

czasu potrzebnego do przejścia substancji rozpuszczonej przez kolumnę chromatograficzną tzw. czasu retencji (RT) oraz intensywności sygnału (ang. *Signal Intensity*, INT). W pomiarze MS2, dla najbardziej intensywnych jonów spektrometr 'zbiera' wartość m/z, RT oraz tzw. widma fragmentacyjne. Dystrybucja sygnałów (tzw. pików) w widmie fragmentacyjnym jest specyficzna dla sekwencji aminokwasowej peptydu i umożliwia 'odszyfrowanie' sekwencji aminokwasowej peptydu podczas analizy. Właśnie ta właściwość jest wykorzystywana przez program Mascot. Podstawowym ograniczeniem spektrometrii mas jest przypadkowość analizy MS2, tzn. wybieranie jonów peptydowych do fragmentacji jest obarczone dużym elementem losowości (powtórzenia pomiarów tej samej próbki skutkują uzyskaniem części widm fragmentacyjnych będących unikalnymi dla pomiaru). W przeciwieństwie do analizy MS2, analiza MS1 ma bardzo wysoki współczynnik powtarzalności (bliski 100%), dlatego do analizy ilościowej wykorzystywane są dane z serii MS1.

Zestaw danych MS1 i MS2 początkowo są procesowane niezależnie podczas względnej analizy ilościowej, dopiero w późniejszym etapie następuje integracja z tych serii danych. W uproszczeniu, seria MS2 analizowana jest przy pomocy programu Mascot, generując listy peptydów zidentyfikowanych w poszczególnych próbkach. Program MScan importuje wyniki z programu Mascot oraz łączy je, tworząc wspólną listę peptydów dla wszystkich pomiarów. Jest to zabieg minimalizujący powyżej opisaną losowość zbierania widm fragmentacyjnych. W kolejnym etapie analizy, program MSparky integruje dane z pomiaru MS1 (m/z, RT, INT) z MS2 (m/z, RT, sekwencja aminokwasów) tworząc dla każdej próbki listę zidentyfikowanych peptydów wraz z ich wartościami m/z, RT i INT. Ostatnim etapem analizy danych jest analiza statystyczna wyników, podczas której program Diffprot porównuje powyższe listy peptydów oraz ich względnej ilości dla poszczególnych próbek, segreguje je zgodnie z projektem eksperymentu w grupę kontrolną i badaną, a następnie przeprowadza analizę statystyczną, w wyniku której uzyskuje się informację czy dane białko w sposób istotny statystycznie różnicuje badane grupy (analiza ilościowa peptydów ma bezpośrednie przełożenie na ilość białka).

Podczas analizy wyników zastosowano następujące kryteria odfiltrowania modyfikowanych peptydów:

1. Odfiltrowanie peptydów, które nie spełniają kryterium wartości Mascot *Score* lub FDR (ang. *False Discovery Rate*)  $\leq 1\%$ .
2. Poszukiwanie modyfikowanych peptydów, które różnicują grupy, tzn. takich, które są unikalne dla danej grupy eksperymentalnej lub zmiana poziomu ekspresji modyfikowanego

peptydu jest większa niż 50%, w porównaniu do kontroli, ponieważ mieści się to w „standardowej” zmienności technicznej pomiarów lub też zmienności biologicznej, nie wpływającej na fenotyp.

3. Odrzucenie zmodyfikowanych peptydów, których widma fragmentacyjne były słabej jakości lub nie było możliwe wskazanie modyfikowanego aminokwasu, jak również modyfikacje, które wynikają z preparatyki lub pomiaru.

Modyfikacje nieuwzględniane w analizie: oksydacje, sieciowanie (ang. *Crosslinking*), karbamyłacje, dehydratacje, jak również inne modyfikacje wynikające z przygotowania i pomiaru próbek do analizy spektrometrii mas.

Uzyskane wartości z przeprowadzonej analizy biostatystycznej nakierowanej na identyfikację i lokalizację PTMs w sekwencji aminokwasowej przedstawiają odpowiednio:

1. wartość prawdopodobieństwa p-value z korektą FDR (q-value), która określa przypadkowość danego zjawiska (im większa wartość q-value tym mniejsze prawdopodobieństwo, że dane białko różnicuje badane grupy),
2. względną ilość peptydu, gdzie za 100% uznaje się peptyd generujący najwyższy sygnał w widmie, między analizowanymi wariantami eksperymentalnymi, który odpowiada stosunkowi względnej obfitości peptydów/białek (ang. *Ratio*, R) i wyznacza kierunek zmiany ( $R < 1$  obniżona względna ilość peptydu;  $R > 1$  zwiększona względna ilość peptydu),
3. wartość krotności zmiany (ang. *Fold Change*, FC) (dla  $R > 1$   $FC = R$ ; dla  $R < 1$   $FC = 1/R$ ; przyjmuje się, że stosunek poniżej 1,5 oznacza, że białko nie jest regulowane, przy czym jako białka różnicujące uznaje się takie, których parametr FC wynosi powyżej 2),
4. ilość peptydów wziętych do analizy (ang. *Analysed Peptides*, APs) (im więcej peptydów poddano analizie, tym większe prawdopodobieństwo, że uzyskane wyniki są wiarygodne i powtarzalne).

Formuła znakowania próbek oraz układy analizowanych wariantów eksperymentalnych przedstawione zostały w **Tab. 32**. Szczegółowa charakterystyka analizowanych peptydów łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrinogenu znajduje się w **Tab. 33**.

**Tabela 32.** Formuła znakowania próbek oraz układy badawcze w analizie LC-MS-MS/MS

Formuła znakowania próbek:	Układy porównawcze:
PLT_K – płytki krwi kontrolne	PLT_K vs PLT_PMS
PLT_PMS – płytki krwi od pacjentów z PMS	MK_K vs MK_PMS
MK_K – megakariocyty kontrolne	PLT_K vs MK_K
MK_PMS – megakariocyty od pacjentów z PMS	PLT_PMS vs MK_PMS
O_K – osocze kontrolne	PLT_K vs O_K
O_MS – osocze od pacjentów z PMS	PLT_MS vs O_MS

**Tabela 33.** Charakterystyka peptydów łańcuchów ( $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -) fibrynogeny na podstawie analizy LC-MS-MS/MS

Białko/ układ badawczy	Masa białka odczytana z baz danych (kDa)	Masa cząst. (kDa)	pI	Liczba aminokwasów	Mascot Score	Pokrycie sekwencji (%)
<b>łańcuch <math>\alpha</math>-fibrynogeny (P02671)</b>						
PLT_K	94,97	95,51	5,70	866	5647	66
PLT_PMS					10196	74
MK_K					6914	60
MK_PMS					10144	73
O_K					1261	38
O_PMS					1102	45
<b>łańcuch <math>\beta</math>-fibrynogeny (P02675)</b>						
PLT_K	55,93	56,44	8,54	491	4920	82
PLT_PMS					5996	63
MK_K					1555	67
MK_PMS					2150	71
O_K					18081	86
O_PMS					15407	87
<b>łańcuch <math>\gamma</math>-fibrynogeny (P02679)</b>						
PLT_K	51,51	51,98	5,37	453	2702	69
PLT_PMS					3287	73
MK_K					1455	56
MK_PMS					1674	65
O_K					5195	80
O_PMS					6401	91

Za pomocą różnych kolorów wskazano konkretne pozycje aminokwasowe, na których zidentyfikowano daną modyfikację (deamidacja, glikozylacja, glikacja, fosforylacja, metylacja, nitrozylacja, acetylacja). Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogeny pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi przedstawione zostały w **Tab. 34, 37** oraz **40**. Sekwencje aminokwasowe dla łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogeny wraz z zaznaczonymi miejscami modyfikacji zostały przedstawione w **Tab. 35, 38** oraz **41**. Ponadto, w **Tab. 36, 39** oraz **42** przedstawione zostały wybrane sekwencje peptydowe dla łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogeny, które spełniły kryteria wartości Mascot Score i FDR i różnicują badane warianty eksperymentalne.

## Łańcuch $\alpha$ -fibrynogenu:

**Tabela 34.** Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla łańcucha  $\alpha$ -fibrynogenu pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi

vs	PLT_K	PLT_PMS	MK_K	MK_PMS	O_K	O_MS
PLT_K		q-value: 0,0005 Ratio:0,78 FC: 1,27 AP: 272	q-value: 0,81 Ratio:1,55 FC: 1,55 AP: 211	X	q-value: 0,64 Ratio: 0,88 FC: 1,14 AP: 306	X
PLT_PMS	q-value: 0,0005 Ratio:0,78 FC: 1,27 AP: 272		X	q-value: 0,69 Ratio: 2,06 FC: 2,06 AP:237	X	q-value: 0,08 Ratio: 1,30 FC: 1,30 AP:274
MK_K	q-value: 0,81 Ratio:1,55 FC: 1,55 AP: 211	X		q-value: 0,94 Ratio: 1,13 FC: 1,13 AP:65	X	X
MK_PMS	X	q-value: 0,69 Ratio: 2,06 FC: 2,06 AP:237	q-value: 0,94 Ratio: 1,13 FC: 1,13 AP:65		X	X
O_K	q-value: 0,64 Ratio: 0,88 FC: 1,14 AP: 306	X	X	X		X
O_MS	X	q-value: 0,08 Ratio: 1,30 FC: 1,30 AP:274	X	X	X	

X-warianty, które nie były poddane analizie

**Tabela 35.** Sekwencja aminokwasowa  $\alpha$ -fibrynogenu (M. cz. 94,97 kDa, 866 aa) i miejsca zidentyfikowanych PTMs

N-koniec 10 MFSMRIVCLV	20 LSVVGTAWTA	30 DSGEGDFLAE	40 GGGVRGPRVV	50 ERHQACKDS
		↑miejsce cięcia przez trombinę		
60 DWPFCSDDEDW	70 NYKCPSGCRM	80 KGLIDEVNDQ	90 FTNRINKLKN	100 SLFEYQKNNK
110 DSHSLTTNIM	120 EILRGDFSSA	130 NNRDNTYNRV	140 SEDLRSRIEV	150 LKRKVIEKVQ
160 HIQLLQKNVR	170 AQLVDMKRFLE	180 VDIDIKIRSC	190 RGSCSRALAR	200 EVDLKDIEDQ
210 QKQLEQVIK	220 DLLPSRDRQH	230 LPLIKMKPVP	240 DLVPGNFKSQ	250 LQKVPPEWKA
260 LTDMPQMRME	270 LERPGGNEIT	280 RGGSTSYGTG	290 SETESPRNPS	300 SAGSWNSGSS
310 GPGSTGNRNP	320 GSSGTGGTAT	330 WKPGSSGPGS	340 TGSWNSGSSG	350 TGSTGNQNGP
360 SPRPGSTGW	370 NPGSSERGSA	380 GHWTSESSVS	390 GSTGQWHSSES	400 GSFRPDSPGS
410 GNARPNNDPW	420 GTFEVSGNV	430 SPGTRREYHT	440 EKLVTSKGDK	450 ELRTGKEKVT
460 SGSTTTTTRS	470 CSKTVTKTVI	480 GPDGHKEVTK	490 EVRTSEDGSD	500 CPEAMDLGTL
510 SGIGTLDGFR	520 HRHPDEAAFF	530 DTASTGKTFP	540 GFFSPMLGEF	550 VSETESRGSE
560 SGIFTNTKES	570 SSHHPGIAEF	580 PSRGKSSSYS	590 KQFTSSTSYN	600 RGDSTFESKS
610 YKMADEAGSE	620 ADHEGTHSTK	630 RGHAKSRPVR	640 DCDDVLQTHP	650 SGTQSGIFNI
660 KLPGSSKIFS	670 VYCDQETSLG	680 GWLLIQQRMD	690 GSLNFNRTWQ	700 DYKRGFGLSN
710 DEGEGEFWLG	720 NDYLHLLTQR	730 GSVLRVELED	740 WAGNEAYAAY	750 HFRVGEAEG
760 YALQVSSYEG	770 TAGDALIEGS	780 VEEGAETSH	790 NNMQFSTFDR	800 DADQWEENCA
810 EYVGGGWYWN	820 NCQAANLNGI	830 YYPGGSYDPR	840 NNSPYEIEG	850 VVVWSFRGAD
860 YSLRAVRMKI	866 C-koniec RPLVTQ			



**Tabela 36.** Sekwencje peptydowe łańcucha  $\alpha$ -fibrynogenu wraz z rodzajem i miejscem PTMs spełniające kryteria wartości Mascot Score i FDR

Względna ilość peptydów		R	FC	Sekwencja + PTM (modyfikowane aminokwasy)	Pozycja aminokwasowa
<b>PLT_K</b>	<b>O_K</b>				
brak	7,88	-	-	GSESGIFTNTK+Deamidated (N)	Asn <sup>556</sup>
brak	7,43	-	-	NPSSAGSWNSGSSGPGSTGNR+Deamidated (N)	Asn <sup>288</sup> , Asn <sup>296</sup> , Asn <sup>307</sup>
brak	7,46	-	-	HPDEAAFFDTASTGK+Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1) (ST)	Thr <sup>522</sup> , Ser <sup>524</sup> , Thr <sup>525</sup>
brak	7,29	-	-	MELERPGGNEITR+Deamidated (N)	Asn <sup>277</sup>
brak	7,37	-	-	GLIDEVNDQFTNR+Deamidated (NQ)	Asn <sup>78</sup> , Gln <sup>79</sup> , Asn <sup>83</sup>
brak	7,9	-	-	QLEQVIAK+Deamidated (Q)	Gln <sup>203</sup> , Gln <sup>206</sup>
7,25	brak	-	-	QFTSSTSYNRGDSTFESK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>582</sup> , Asn <sup>590</sup>
7,44	brak	-	-	MKGLIDEVNDQFTNR+Hex (KR)	Lys <sup>71</sup> , Arg <sup>84</sup>
7,27	brak	-	-	ADSGEGDFLAEGGGVRGPR+Phospho (S)	Ser <sup>22</sup>
6,64	7,45	0,15	6,67	TVTKTVIGPDGHK+Phospho (T)	Thr <sup>464</sup> , Thr <sup>466</sup> , Thr <sup>468</sup>
6,6	7,1	0,32	3,3	MADEAGSEADHEGTHSTK+Phospho (ST)	Ser <sup>609</sup> , Thr <sup>616</sup> , Ser <sup>618</sup> , Thr <sup>619</sup>
7,48	7,91	0,37	2,7	MKPVPDLVPGNFK+Deamidated (N)	Asn <sup>236</sup>
7,28	7,7	0,38	2,63	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
7,74	7,98	0,58	1,72	PGSTGTWNPSSER+Phospho (ST)	Ser <sup>356</sup> , Thr <sup>357</sup> , Thr <sup>359</sup> , Ser <sup>364</sup> , Ser <sup>365</sup>
7,72	7,93	0,62	1,63	NSLFHEYQK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>90</sup> , Gln <sup>96</sup>
7,16	7,27	0,77	1,29	NNKDSHSLTTNIMEILR+Deamidated (N)	Asn <sup>98</sup> , Asn <sup>99</sup> , Asn <sup>108</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>O_PMS</b>				
8,6	brak	-	-	TVTKTVIGPDGHK+Phospho (T)	Thr <sup>464</sup> , Thr <sup>466</sup> , Thr <sup>468</sup>
7,38	brak	-	-	MKGLIDEVNDQFTNR+Hex (KR)	Lys <sup>71</sup> , Arg <sup>84</sup>
7,13	brak	-	-	HRHPDEAAFFDTASTGK+Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1) (ST)	Thr <sup>522</sup> , Ser <sup>524</sup> , Thr <sup>525</sup>
brak	7,68	-	-	QLEQVIAK+Deamidated (Q)	Gln <sup>203</sup> , Gln <sup>206</sup>
brak	6,85	-	-	NNKDSHSLTTNIMEILR+Deamidated (N)	Asn <sup>98</sup> , Asn <sup>99</sup> , Asn <sup>108</sup>
brak	6,84	-	-	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
7,31	7,63	0,48	2,08	GSESGIFTNTK+Deamidated (N)	Asn <sup>556</sup>
7,57	7,7	0,75	1,33	MKPVPDLVPGNFK+Deamidated (N)	Asn <sup>236</sup>
7,82	7,87	0,88	1,14	NSLFHEYQK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>90</sup> , Gln <sup>96</sup>
7,22	7,24	0,94	1,06	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
8,23	7,81	2,63	2,63	PGSTGTWNPSSER+Phospho (ST)	Ser <sup>356</sup> , Thr <sup>357</sup> , Thr <sup>359</sup> , Ser <sup>364</sup> , Ser <sup>365</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>PLT_PMS</b>				
brak	7,29	-	-	GSESGIFTNTK+Deamidated (N)	Asn <sup>556</sup>
brak	7,81	-	-	MELERPGGNEITR+Deamidated (N)	Asn <sup>277</sup>
7,58	brak	-	-	EVVTSEDSGDCEAMDGLTSLGIGTLDGFR+Nitrosyl (C)	Cys <sup>491</sup>
brak	7,02	-	-	HRHPDEAAFFDTASTGK+Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1) (ST)	Thr <sup>522</sup> , Ser <sup>524</sup> , Thr <sup>525</sup>
6,93	brak	-	-	NNKDSHSLTTNIMEILR+Deamidated (N)	Asn <sup>98</sup> , Asn <sup>99</sup> , Asn <sup>108</sup>
brak	7,12	-	-	NPSSAGSWNSGSSGPGSTGNR+Deamidated (N)	Asn <sup>288</sup> , Asn <sup>296</sup> , Asn <sup>307</sup>
6,12	brak	-	-	MADEAGSEADHEGTHSTK+Phospho (ST)	Ser <sup>609</sup> , Thr <sup>616</sup> , Ser <sup>618</sup> , Thr <sup>619</sup>

7,95	8,36	0,39	2,56	PGSTGTWNPSSER+Phospho (ST)	Ser <sup>356</sup> , Thr <sup>357</sup> , Thr <sup>359</sup> , Ser <sup>364</sup> , Ser <sup>365</sup>
7,1	7,38	0,53	1,89	ADSGEGDFLAEGGGVRGPR+Phospho (S)	Ser <sup>22</sup>
8,26	8,48	0,6	1,67	MELERPGGNEITR+Deamidated (N)	Asn <sup>277</sup>
7,59	7,76	0,68	1,47	MKPVPDLVPGNFK+Deamidated (N)	Asn <sup>236</sup>
7,4	7,46	0,87	1,15	MKGLIDEVNQDFTNR+Hex (KR)	Lys <sup>71</sup> , Arg <sup>84</sup>
7,92	7,94	0,95	1,05	NSLFEYQK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>90</sup> , Gln <sup>96</sup>
7,12	7,14	0,97	1,03	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
7,57	7,25	2,07	2,07	QFTSSTSYNRGDSTFESK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>582</sup> , Asn <sup>590</sup>
<b>MK_K</b>	<b>MK_PMS</b>				
brak	6,12	-	-	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
brak	7,31	-	-	MELERPGGNEITR+Deamidated (N)	Asn <sup>277</sup>
brak	8,53	-	-	QFTSSTSYNRGDSTFESK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>582</sup> , Asn <sup>590</sup>
5,86	5,96	0,79	1,27	TVTKTVIGPDGHK+Phospho (T)	Thr <sup>464</sup> , Thr <sup>466</sup> , Thr <sup>468</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>MK_K</b>				
7,58	brak	-	-	MKGLIDEVNQDFTNR+Hex (KR)	Lys <sup>71</sup> , Arg <sup>84</sup>
7,38	brak	-	-	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
8,46	brak	-	-	ADSGEGDFLAEGGGVRGPR+Phospho (S)	Ser <sup>22</sup>
7,24	brak	-	-	NNKDSHSLTTNIMEILR+Deamidated (N)	Asn <sup>98</sup> , Asn <sup>99</sup> , Asn <sup>108</sup>
7,91	brak	-	-	PGSTGTWNPSSER+Phospho (ST)	Ser <sup>356</sup> , Thr <sup>357</sup> , Thr <sup>359</sup> , Ser <sup>364</sup> , Ser <sup>365</sup>
7,89	brak	-	-	NSLFEYQK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>90</sup> , Gln <sup>96</sup>
7,74	brak	-	-	MKPVPDLVPGNFK+Deamidated (N)	Asn <sup>236</sup>
6,64	brak	-	-	MADEAGSEADHEGTHSTK+Phospho (ST)	Ser <sup>609</sup> , Thr <sup>616</sup> , Ser <sup>618</sup> , Thr <sup>619</sup>
8,11	brak	-	-	MELERPGGNEITR+Deamidated (N)	Asn <sup>277</sup>
7,73	brak	-	-	QFTSSTSYNRGDSTFESK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>582</sup> , Asn <sup>590</sup>
6,67	6,96	0,51	1,96	TVTKTVIGPDGHK+Phospho (T)	Thr <sup>464</sup> , Thr <sup>466</sup> , Thr <sup>468</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>MK_PMS</b>				
brak	6,73	-	-	TVTKTVIGPDGHK+Phospho (T)	Thr <sup>464</sup> , Thr <sup>466</sup> , Thr <sup>468</sup>
7,38	brak	-	-	GSESGIFTNTK+Deamidated (N)	Asn <sup>556</sup>
7,52	brak	-	-	MKGLIDEVNQDFTNR+Hex (KR)	Lys <sup>71</sup> , Arg <sup>84</sup>
7,12	brak	-	-	HRHPDEAAFFDTASTGK+Hex(1)HexNAc(1)NeuAc(1) (ST)	Thr <sup>522</sup> , Ser <sup>524</sup> , Thr <sup>525</sup>
8,57	brak	-	-	ADSGEGDFLAEGGGVRGPR+Phospho (S)	Ser <sup>22</sup>
8,18	brak	-	-	PGSTGTWNPSSER+Phospho (ST)	Ser <sup>356</sup> , Thr <sup>357</sup> , Thr <sup>359</sup> , Ser <sup>364</sup> , Ser <sup>365</sup>
7,23	brak	-	-	NPSSAGSWNSGSSGPGSTGNR+Deamidated (N)	Asn <sup>288</sup> , Asn <sup>296</sup> , Asn <sup>307</sup>
7,77	brak	-	-	MKPVPDLVPGNFK+Deamidated (N)	Asn <sup>236</sup>
7,24	brak	-	-	QFTSSTSYNRGDSTFESK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>582</sup> , Asn <sup>590</sup>
7,25	6,9	2,24	2,24	GDFSSANNR+Deamidated (N)	Asn <sup>121</sup> , Asn <sup>122</sup>
8,31	7,81	3,13	3,13	MELERPGGNEITR+Deamidated (N)	Asn <sup>277</sup>

## Łańcuch $\beta$ -fibrynogenu:

**Tabela 37.** Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla łańcucha  $\beta$ -fibrynogenu pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi

vs	PLT_K	PLT_PMS	MK_K	MK_PMS	O_K	O_MS
PLT_K		q-value: 0,95 Ratio:0,93 FC: 1,08 AP: 195	q-value: 0,56 Ratio: 2,17 FC: 2,17 AP: 164	X	q-value: 0,82 Ratio: 0,92 FC: 1,08 AP: 236	X
PLT_PMS	q-value: 0,95 Ratio:0,93 FC: 1,08 AP: 195		X	q-value: 0,95 Ratio: 1,17 FC: 1,17 AP: 174	X	q-value: 0,81 Ratio: 1,13 FC: 1,13 AP:210
MK_K	q-value: 0,56 Ratio: 2,17 FC: 2,17 AP: 164	X		q-value: 0,98 Ratio: 0,92 FC: 1,09 AP:60	X	X
MK_PMS	X	q-value: 0,95 Ratio: 1,17 FC: 1,17 AP: 174	q-value: 0,98 Ratio: 0,92 FC: 1,09 AP:60		X	X
O_K	q-value: 0,82 Ratio: 0,92 FC: 1,08 AP: 236	X	X	X		X
O_MS	X	q-value: 0,81 Ratio: 1,13 FC: 1,13 AP:210	X	X	X	

X-warianty, które nie były poddane analizie

**Tabela 38.** Sekwencja aminokwasowa łańcucha  $\beta$ -fibrynogenu (M. cz. 56,44 kDa, 491 aa) i miejsca zidentyfikowanych PTMs

N-koniec 10 MKRMVSWSFH	20 KLKTMKHL	30 LLLCVFLVKS	40 QGVNDNEEGF	50 FSARGHRPLD
			$\uparrow$ miejsce cięcia przez trombinę	
60 KKREEAPSLR	70 PAPPISGGG	80 YRARPAKAAA	90 TQKKVERKAP	100 DAGGCLHADP
110 DLGVLCPGTC	120 QLQEALLQQE	130 RPIRNSVDEL	140 NNNVEAVSQT	150 SSSSFQYMYL
160 LKDLWQKRQK	170 QVKDENVVN	180 EYSSELEKHQ	190 LYIDETVNSN	200 IPTNLRVLRS
210 ILENLRSKIQ	220 KLESDVSAQM	230 EYCRTPCTVS	240 CNIPVVSQKE	250 CEEIIRKGGE
260 TSEMYLIQPD	270 SSVKPYRVYC	280 DMNTENGGWT	290 VIQNRQDGSV	300 DFGRKWDPYK
310 QGFQNVATNT	320 DGKNYCGLPG	330 EYWLGNDKIS	340 QLTRMGPTL	350 LIEMEDWKGD
360 KVKAHYGGFT	370 VQNEANKYQI	380 SVNKYRGTAG	390 NALMDGASQL	400 MGENTMTIH
410 NGMFFSTYDR	420 DNDGWLTSDP	430 RKQCSKEDGG	440 GWWYNRCHAA	450 NPNGRYYWGG
460 QYTWDMAKHG	470 TDDGVVWMNW	480 KGSWYSMRKM	490 SMKIRPFPQ	491 C-koniec Q

**Tabela 39.** Sekwencje peptydowe łańcucha  $\beta$ -fibrynogenu wraz z rodzajem i miejscem PTMs spełniające kryteria wartości Mascot Score i FDR

Względna ilość peptydów		R	FC	Sekwencja + PTM (modyfikowane aminokwasy)	Pozycja aminokwasowa
<b>PLT_K</b>	<b>O_K</b>				
brak	7,5	-	-	DNENVVNEYSSSELEK+Deamidated (N)	Asn <sup>165</sup> , Asn <sup>167</sup> , Asn <sup>170</sup>
brak	7,5	-	-	NSVDELNNNVEAVSQTSSSSFQYMYLLK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>131</sup> , Asn <sup>132</sup> , Asn <sup>133</sup> , Gln <sup>139</sup> , Gln <sup>146</sup>
brak	7,67	-	-	NYCGLPGEYWLGNNDK+Deamidated (N)	Asn <sup>314</sup> , Asn <sup>326</sup>
brak	7,3	-	-	AHYGGFTVQNEANK+Deamidated (NQ)(+2)	Gln <sup>362</sup> , Asn <sup>363</sup> , Asn <sup>366</sup>
8,05	brak	-	-	TMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTSDPR+Deamidated (N)	Asn <sup>401</sup> , Asn <sup>412</sup>
7,49	brak	-	-	KQCSKEDGGGWYNR+Acetyl (C)	Cys <sup>424</sup>
7,11	7,55	0,37	2,70	VYCDMNTENGGWTVIQNR+Deamidated (NQ)	Asn <sup>273</sup> , Asn <sup>276</sup> , Gln <sup>283</sup> , Asn <sup>284</sup>
7,76	7,11	4,45	4,45	CHAA NPNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>441</sup> , Asn <sup>443</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>O_PMS</b>				
7,19	brak	-	-	DNENVVNEYSSSELEK+Deamidated (N)	Asn <sup>165</sup> , Asn <sup>167</sup> , Asn <sup>170</sup>
brak	7,18	-	-	KGGETSEMYLIQPDSSVKPYR+Methyl (Q)	Gln <sup>258</sup>
7,33	brak	-	-	NYCGLPGEYWLGNNDK+Deamidated (N)	Asn <sup>314</sup> , Asn <sup>326</sup>
7,55	7,68	0,74	1,35	VYCDMNTENGGWTVIQNR+Deamidated (NQ)	Asn <sup>273</sup> , Asn <sup>276</sup> , Gln <sup>283</sup> , Asn <sup>284</sup>
7,43	7,4	1,08	1,08	KQCSKEDGGGWYNR+Acetyl (C)	Cys <sup>424</sup>
8,26	7,93	2,12	2,12	TMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTSDPR+Deamidated (N)	Asn <sup>401</sup> , Asn <sup>412</sup>
7,69	6,8	7,73	7,73	CHAA NPNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>441</sup> , Asn <sup>443</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>PLT_PMS</b>				
brak	7,09	-	-	DNENVVNEYSSSELEK+Deamidated (N)	Asn <sup>165</sup> , Asn <sup>167</sup> , Asn <sup>170</sup>
brak	7,33	-	-	NYCGLPGEYWLGNNDK+Deamidated (N)	Asn <sup>314</sup> , Asn <sup>326</sup>
7,5	8,39	0,13	7,69	TMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTSDPR+Deamidated (N)	Asn <sup>401</sup> , Asn <sup>412</sup>
6,83	7,67	0,15	6,67	VYCDMNTENGGWTVIQNR+Deamidated (NQ)	Asn <sup>273</sup> , Asn <sup>276</sup> , Gln <sup>283</sup> , Asn <sup>284</sup>
7,51	7,54	0,94	1,06	KQCSKEDGGGWYNR+Acetyl (C)	Cys <sup>424</sup>
7,99	7,8	1,54	1,54	CHAA NPNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>441</sup> , Asn <sup>443</sup>
<b>MK_K</b>	<b>MK_PMS</b>				
7,03	brak	-	-	QDGSVDFGR+Deamidated (Q)	Gln <sup>286</sup>
brak	5,87	-	-	HQLYIDETVNSNIPNLNLR+HexNAc(2)NeuGc(1) (ST)	Thr <sup>186</sup> , Ser <sup>189</sup> , Thr <sup>193</sup>
brak	7,45	-	-	DNENVVNEYSSSELEK+Deamidated (N)	Asn <sup>165</sup> , Asn <sup>167</sup> , Asn <sup>170</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>MK_K</b>				
7,67	brak	-	-	TMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTSDPR+Deamidated (N)	Asn <sup>401</sup> , Asn <sup>412</sup>
7,94	brak	-	-	VYCDMNTENGGWTVIQNR+Deamidated (NQ)	Asn <sup>273</sup> , Asn <sup>276</sup> , Gln <sup>283</sup> , Asn <sup>284</sup>
7,68	brak	-	-	KQCSKEDGGGWYNR+Acetyl (C)	Cys <sup>424</sup>
brak	7,62	-	-	QDGSVDFGR+Deamidated (Q)	Gln <sup>286</sup>
7,92	brak	-	-	CHAA NPNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>441</sup> , Asn <sup>443</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>MK_PMS</b>				
8,21	brak	-	-	TMTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTSDPR+Deamidated (N)	Asn <sup>401</sup> , Asn <sup>412</sup>
7,99	brak	-	-	VYCDMNTENGGWTVIQNR+Deamidated (NQ)	Asn <sup>273</sup> , Asn <sup>276</sup> , Gln <sup>283</sup> , Asn <sup>284</sup>
7,19	brak	-	-	DNENVVNEYSSSELEK+Deamidated (N)	Asn <sup>165</sup> , Asn <sup>167</sup> , Asn <sup>170</sup>
7,6	brak	-	-	KQCSKEDGGGWYNR+Acetyl (C)	Cys <sup>424</sup>
brak	6,61	-	-	HQLYIDETVNSNIPNLNLR+HexNAc(2)NeuGc(1) (ST)	Thr <sup>186</sup> , Ser <sup>189</sup> , Thr <sup>193</sup>
7,41	brak	-	-	NYCGLPGEYWLGNNDK+Deamidated (N)	Asn <sup>314</sup> , Asn <sup>326</sup>

## Łańcuch $\gamma$ -fibrynogenu:

**Tabela 40.** Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla łańcucha  $\gamma$ -fibrynogenu pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi

vs	PLT_K	PLT_PMS	MK_K	MK_PMS	O_K	O_MS
PLT_K		q-value: 0,95 Ratio:0,92 FC: 1,08 AP:163	q-value: 0,91 Ratio: 1,40 FC: 1,40 AP: 134	X	q-value: 0,91 Ratio: 1,02 FC: 1,02 AP: 184	X
PLT_PMS	q-value: 0,95 Ratio:0,92 FC: 1,08 AP:163		X	q-value: 0,96 Ratio: 1,17 FC: 1,17 AP:144	X	q-value: 0,81 Ratio: 1,13 FC: 1,13 AP:175
MK_K	q-value: 0,91 Ratio: 1,40 FC: 1,40 AP: 134	X		q-value: 0,99 Ratio: 0,94 FC: 1,07 AP:57	X	X
MK_PMS	X	q-value: 0,96 Ratio: 1,17 FC: 1,17 AP:144	q-value: 0,99 Ratio: 0,94 FC: 1,07 AP:57		X	X
O_K	q-value: 0,91 Ratio: 1,02 FC: 1,02 AP: 184	X	X	X		X
O_MS	X	q-value: 0,81 Ratio: 1,13 FC: 1,13 AP:175	X	X	X	

X-warianty, które nie były poddane analizie

**Tabela 41.** Sekwencja aminokwasowa łańcucha  $\gamma$ -fibrynogenu (M. cz. 51,98 kDa, 453 aa) i miejsca zidentyfikowanych PTMs

N-koniec 10	20	30	40	50
MSWSLHPRNL	ILYFYALLFL	SSTCVAYVAT	RDNCCILDER	FGSYCPTTCG
60	70	80	90	100
IADFLSTYQT	KVDKDLQSLE	DILHQVENKT	SEVKQLIKAI	QLTYNPDESS
110	120	130	140	150
KPNMIDAATL	KSRKMLEEIM	KYEASILTHD	SSIRYLQEIY	NSNNQKIVNL
160	170	180	190	200
KEKVAQLEAQ	CQEPCKDTVQ	IHDITGKDCQ	DIANKGAKQS	GLYFIKPLKA
210	220	230	240	250
NQQLVYCEI	DGSGNGWTVF	QKRLDGSVDF	KKNWIQYKEG	FGHLSPTGTT
260	270	280	290	300
EFWLGNEKIH	LISTQSAIPY	ALRVELEDWN	GRTSTADYAM	FKVGPEADKY
310	320	330	340	350
RLTYAYFAGG	DAGDAFDGFD	FGDDPSDKFF	TSHNGMQFST	WDNDNDKFEG
360	370	380	390	400
NCAEQDGSW	WMNKCHAGHL	NGVYYQGGTY	SKASTPNGYD	NGIHWATWKT
410	420	430	440	450
RWYSMKKTTM	KIIPFNRLTI	GEGQQHLLGG	AKQVRPEHPA	ETEYDSLYPE
451 C-koniec DDL				

**Tabela 42.** Sekwencje peptydowe łańcucha  $\gamma$ -fibrynogenu wraz z rodzajem i miejscem PTMs spełniające kryteria wartości Mascot Score i FDR

Względna ilość peptydów		R	FC	Sekwencja + PTM (modyfikowane aminokwasy)	Pozycja aminokwasowa
<b>PLT_K</b>	<b>O_K</b>				
brak	7,98	-	-	CHAGHLNGVYYQGGTYSK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>371</sup> , Gln <sup>376</sup>
brak	7,62	-	-	AIQLTYNPDESSKPNMIDAATLK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>91</sup> , Asn <sup>95</sup>
7,73	7,93	0,64	1,56	VELEDWNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>280</sup>
7,35	7,54	0,64	1,56	NWIQYK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>233</sup> , Gln <sup>236</sup>
7,89	8,01	0,75	1,33	ASTPNGYDNGIHWATWK+Deamidated (N)	Asn <sup>387</sup> , Asn <sup>391</sup>
7,61	7,31	2,02	2,02	YLQEIYNSNNQK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>137</sup> , Asn <sup>141</sup> , Asn <sup>143</sup> , Asn <sup>144</sup> , Gln <sup>145</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>O_PMS</b>				
brak	7,61	-	-	DNCCILDER+Deamidated (N)	Asn <sup>33</sup>
7,3	brak	-	-	IHLISTQSAIPYALR+Deamidated (Q)	Gln <sup>265</sup>
brak	7,49	-	-	CHAGHLNGVYYQGGTYSK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>371</sup> , Gln <sup>376</sup>
8	brak	-	-	ASTPNGYDNGIHWATWK+Deamidated (N)	Asn <sup>387</sup> , Asn <sup>391</sup>
7,78	8	0,6	1,67	VELEDWNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>280</sup>
7,35	7,38	0,92	1,09	NWIQYK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>233</sup> , Gln <sup>236</sup>
7,88	7,72	1,43	1,43	YLQEIYNSNNQK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>137</sup> , Asn <sup>141</sup> , Asn <sup>143</sup> , Asn <sup>144</sup> , Gln <sup>145</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>PLT_PMS</b>				
brak	7,26	-	-	IHLISTQSAIPYALR+Deamidated (Q)	Gln <sup>265</sup>
7,7	7,99	0,5	2,00	YLQEIYNSNNQK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>137</sup> , Asn <sup>141</sup> , Asn <sup>143</sup> , Asn <sup>144</sup> , Gln <sup>145</sup>
7,25	7,36	0,76	1,32	NWIQYK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>233</sup> , Gln <sup>236</sup>
7,93	7,9	1,07	1,07	VELEDWNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>280</sup>
8,19	8,12	1,18	1,18	ASTPNGYDNGIHWATWK+Deamidated (N)	Asn <sup>387</sup> , Asn <sup>391</sup>
<b>MK_K</b>	<b>MK_PMS</b>				
brak	7,21	-	-	VELEDWNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>280</sup>
7,38	7,51	0,74	1,35	CHAGHLNGVYYQGGTYSK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>371</sup> , Gln <sup>376</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>MK_K</b>				
7,89	brak	-	-	VELEDWNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>280</sup>
brak	7,94	-	-	CHAGHLNGVYYQGGTYSK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>371</sup> , Gln <sup>376</sup>
7,47	brak	-	-	NWIQYK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>233</sup> , Gln <sup>236</sup>
8,07	brak	-	-	ASTPNGYDNGIHWATWK+Deamidated (N)	Asn <sup>387</sup> , Asn <sup>391</sup>
7,79	brak	-	-	YLQEIYNSNNQK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>137</sup> , Asn <sup>141</sup> , Asn <sup>143</sup> , Asn <sup>144</sup> , Gln <sup>145</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>MK_PMS</b>				
7,36	brak	-	-	IHLISTQSAIPYALR+Deamidated (Q)	Gln <sup>265</sup>
brak	8,05	-	-	CHAGHLNGVYYQGGTYSK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>371</sup> , Gln <sup>376</sup>
7,44	brak	-	-	NWIQYK+Deamidated (NQ)	Asn <sup>233</sup> , Gln <sup>236</sup>
8	brak	-	-	ASTPNGYDNGIHWATWK+Deamidated (N)	Asn <sup>387</sup> , Asn <sup>391</sup>
7,88	brak	-	-	YLQEIYNSNNQK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>137</sup> , Asn <sup>141</sup> , Asn <sup>143</sup> , Asn <sup>144</sup> , Gln <sup>145</sup>
7,81	7,75	1,17	1,17	VELEDWNGR+Deamidated (N)	Asn <sup>280</sup>

Analiza proteomiczna łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu wykazała istotne statystycznie zmiany w poziomie ekspresji poszczególnego peptydu, jedynie w przypadku łańcucha  $\alpha$ -fibrynogenu, zgodnie z **Tab. 34**. Jednakże, analizując różnice w obrębie konkretnych sekwencji aminokwasowych dostrzega się istotne zmiany w profilu PTMs we wszystkich analizowanych łańcuchach fibrynogenu, które różnicują analizowane grupy badawcze (PMS vs kontrola) jedynie na poziomie modyfikacji (**Tab. 36, 38 oraz 42**).

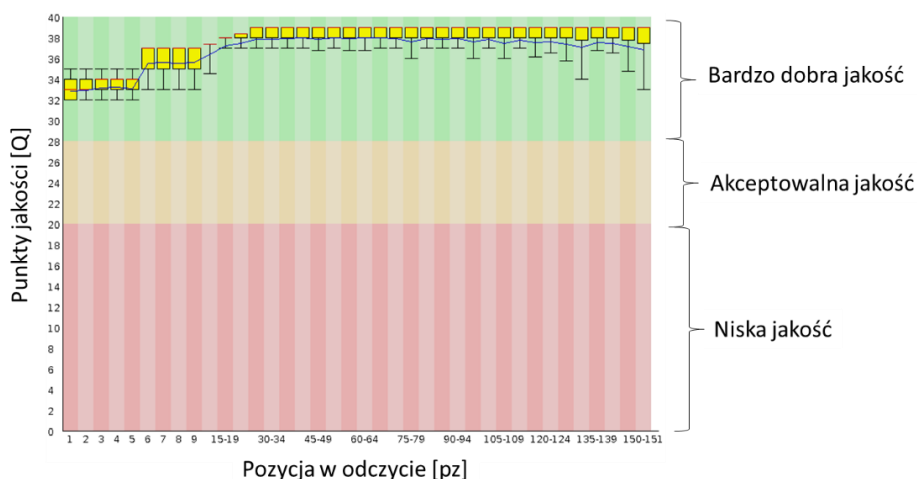
Analiza statystyczna pomiędzy grupą kontrolną a PMS dla łańcucha  $\alpha$ -fibrynogenu płytkowego wykazała wartość  $q$ -value = 0,0005, co wskazuje, że łańcuch  $\alpha$ -fibrynogenu jest polipeptydem silnie różnicującym płytki krwi w PMS od płytek prawidłowych. Jak stwierdzono, łańcuch  $\alpha$ -fibrynogenu znajdujący się w płytkach PMS wykazuje ponad 2-krotny wzrost poziomu fosforylacji na resztach Ser<sup>22</sup> (sekwencja: ADSGEGDFLAEGGGVVRGPR) oraz 2,5-krotny wzrost na resztach Ser<sup>356</sup>, Ser<sup>364</sup>, Ser<sup>365</sup>, Thr<sup>357</sup> oraz Thr<sup>359</sup> (sekwencja: PGSTGTWNPSSER), w porównaniu do kontroli. Ponadto, w grupie PMS łańcuch płytkowego  $\alpha$ -fibrynogenu charakteryzuje się zwiększonym o 15% poziomem glikacji na resztach Lys<sup>71</sup> i Arg<sup>84</sup>, jak również posiada dodatkowe miejsce O-glikozylacji na resztach Ser<sup>524</sup>, Thr<sup>522</sup>, Thr<sup>525</sup>, których nie wykryto w płytkach kontrolnych (**Tab. 36**).

W przypadku łańcuchów  $\beta$ - i  $\gamma$ -fibrynogenu analiza statystyczna danych dotyczących różnic pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną nie wykazała istotnych zmian w poziomie ekspresji peptydów (**Tab. 37 i Tab. 40**) oraz różnic w profilu PTMs pomiędzy badanymi wariantami eksperymentalnymi (**Tab. 39 i Tab. 42**).

#### 4.2.4. Analiza zmian sekwencji genów kodujących łańcuchy ( $\alpha$ -, $\beta$ - oraz $\gamma$ -) fibrynogenu

W celu analizy skringowej różnic w sekwencji genów kodujących łańcuchy  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu pomiędzy grupą pacjentów z PMS a grupą kontrolną zastosowano metodę wysokoprzepustowego sekwencjonowania (NGS). Analiza została wykonana na sekwenatorze MiSeq przy użyciu zestawu AmpliSeq firmy Illumina w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

W pierwszej kolejności, nieprzetworzone dane sekwencjonowania wygenerowane w pliku tekstowym w formacie FastQ poddano analizie kontroli jakości za pomocą narzędzia bioinformatycznego FastQC. Każdemu rozpoznanemu nukleotydowi przypisywany jest jakościowy wynik odczytu tzw. *Q-score* (ang. *Quality score*) obliczony na podstawie algorytmu *Phred*. Wartość wyniku jakościowego określa prawdopodobieństwo rozpoznania błędnego nukleotydu (im wyższa wartość *Q-score*, tym wyższa jakość i większa dokładność rozpoznania nukleotydu). Analiza rozkładu wyników jakościowych *Q-score* względem poszczególnych pozycji w odczytach NGS wykazała, że badane preparaty mają bardzo wysoki poziom jakości umożliwiający w sposób satysfakcjonujący wykonanie dalszej analizy. Uzyskana średnia wartość *Q-score* powyżej 32 pkt odpowiada za mniej niż 0,1% szans błędnie rozpoznanego nukleotydu. Ponadto, program FastQC za pomocą tabel i wykresów umożliwia w sposób graficzny przedstawienie jakości uzyskanych odczytów. Przykładowy wykres analizy jakości próbki kontrolnej (nr 17K) metodą FastQC przedstawia **Ryc. 25**.



**Rycina 25.** Przykładowy rozkład wyników jakościowych *Q-score* rozpoznania nukleotydów dla poszczególnych pozycji w odczytach w próbce 17K. Wyniki przedstawione są w postaci wykresów pudełkowych, gdzie kwartył dolny i górny oznaczają odpowiednio wartości 10 i 90 centyla. Niebieska linia wyznacza średnią wartość wyniku jakościowego. Kolorem tła wykresów podzielono wyniki na bardzo dobrej jakości (kolor zielony), relatywnie dobrej jakości (kolor żółty) oraz niskiej jakości (kolor różowy).



W kolejnym etapie, za pomocą narzędzia *Bowtie2*, powszechnie stosowanego programu do dopasowania sekwencji, zmapowano odczyty sekwencji uzyskanych metodą NGS i porównano je z sekwencją referencyjną według najnowszej bazy danych ludzkiego genomu HG38 (ang. *Human Genome build 38*). Uzyskane wyniki wskazują, iż średnio 95% odczytów zostało zmapowanych do sekwencji referencyjnej. Następnie, przy użyciu narzędzia bioinformatycznego Bftools wykryto mutacje punktowe w genach *FGA*, *FGB* i *FGG*. Na koniec, przeprowadzono kompleksową analizę anotacji zidentyfikowanych mutacji za pośrednictwem programu SnpEff. Do najważniejszych elementów anotacji zalicza się: rodzaj mutacji, częstość wariantu, obecność mutacji w bazach danych oraz określenie zmian na poziomie struktury aminokwasowej białka (wg bazy UniProt). Dodatkowo, przy wykorzystaniu ręcznej analizy danych wykonano przegląd istotnych prac naukowych oraz informacji na temat powiązanych badań klinicznych dotyczących spodziewanych efektów mutacji w badanych genach.

Analiza skringowa metodą NGS wykazała obecność 10 mutacji o charakterze substytucji w sekwencji genomowego DNA dla genów *FGA*, *FGB* oraz *FGG* kodujących odpowiednio łańcuchy  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibryny, pomiędzy PMS a grupą kontrolną. W analizowanych sekwencjach genów wykryto 9 nowych, nieopisanych wcześniej mutacji, a także jeden znany wariant polimorficzny genu *FGA* (rs6050) wg bazy danych (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). W **Tab. 43** zestawiono wszystkie zidentyfikowane w pracy mutacje w genach *FGA*, *FGB* i *FGG*.

**Tabela 43.** Charakterystyka wykrytych mutacji w genach *FGA*, *FGB* i *FGG*

Gen (identyfikator z bazy Ensemble)/ liczba pz / pozycja w chromosomie	Mutacja	Lokalizacja w genie
<i>FGA</i> (ENST00000651975.1) 3655 pz 4q31.3	c.1040A>G	Egzon 5
	c.991A>G (rs6050)	Egzon 5
	c.2175G>C	Egzon 6
	c.*394A>G	3'UTR
	c.365-80C>T	Intron 3
	c.365-414A>T	Intron 3
	c.*468A>T	3'UTR
<i>FGB</i> (ENST00000302068.9) 3641 pz 4q31.3	c.832+57T>A	Intron 5
<i>FGG</i> (ENST00000336098.8) 2072 pz 4q32.1	c.*546G>A	3'UTR
	c.-213A>T	5'UTR

**Legenda:** (c.) – mutacja obecna w sekwencji kodującej; (>) – substytucja (podstawienie nukleotydu); (\*) – położenie mutacji za kodonem STOP; (-) – położenie mutacji przed kodonem START. Zapis mutacji w intronie uzależniony jest od jego pozycji w sekwencji niekodującej. Gdy mutacja obecna jest na początku intronu: numer ostatniego nt w egzonie, znak „+” i pozycja w intronie (np. c.832+57), natomiast gdy mutacja obecna jest na końcu sekwencji intronu: numer pierwszego nt kolejnego egzonu, znak „-” i pozycja w intronie (np. c.365-414) [266].

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono częstość występowania genotypów oraz alleli dla grupy kontrolnej i badanej. W celu sprawdzenia czy otrzymane różnice w częstościach występowania genotypów i alleli mają istotny statystycznie związek z ryzykiem wystąpienia MS, obliczono wartość ilorazu szans (OR) i 95% przedział ufności (95% CI). Wartość OR pozwala oszacować z jaką częstością dany allel lub genotyp danego wariantu jest związany z daną grupą. W związku z tym, gdy wartości OR oraz 95% IC:

- są mniejsze od 1, to wskazuje, że dany allel lub genotyp może mieć potencjalny charakter ochronny przed wystąpieniem fenotypu choroby,
- wykazują zróżnicowaną wartość (OR~), to świadczy o braku związku między rozpatrywanym allelem lub genotypem a ryzykiem choroby,
- są większe od 1, to wskazuje, że nosiciele danego allelu bądź genotypu są w grupie ryzyka zachorowania.

W przypadku genu *FGA* wykryto 7 mutacji punktowych, w tym 3 mutacje typu zmiany sensu (ang. *Missense*) obecnych w sekwencjach kodujących oraz 4 mutacje w regionach niekodujących (2 w intronach i 2 w sekwencjach regulatorowych).

Mutacja c.1040A>G w genie *FGA* znajduje się w kodonie 10140. Jest to wariant polegający na substytucji adeniny (A) guaniną (G) (A>G), który powoduje zmianę typu sensownego w kodonie 1040. Na poziomie białka prowadzi do zamiany glutaminy (Gln – CAA) na argininę (Arg – CGA) w pozycji 347 sekwencji aminokwasowej. Na podstawie pozyskanych wyników porównania pacjentów z PMS z grupą kontrolną stwierdza się, że nosiciele heterozygoty A/G charakteryzują się 4-krotnie większym ryzykiem wystąpienia MS (OR = 4,024; 95% CI [1,059 – 15,278]; p = 0,041), natomiast homozygota A/A obniża ryzyko pojawienia się fenotypu choroby (OR = 0,249; 95% CI [0,066 – 0,944]; p = 0,041). W żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu G w układzie homozygotycznym (GG) (**Tab. 44**).

Polimorfizm c.991A>G (rs6050) genu *FGA* polega na substytucji adeniny guaniną (A>G), która powoduje zmianę typu sensownego w kodonie 991. Na poziomie białka prowadzi do zamiany treoniny (Thr – ACU) na alaninę (Ala – GCU) w pozycji 331 sekwencji aminokwasowej. Na podstawie pozyskanych wyników porównania pacjentów z PMS z grupą kontrolną stwierdza się, że nosiciele heterozygoty A/G charakteryzują się również 4-krotnie większym ryzykiem wystąpienia MS (OR = 4,200; 95% CI [1,081 – 16,325]; p = 0,038), natomiast homozygota A/A obniża ryzyko pojawienia się fenotypu choroby (OR = 0,238; 95% CI [0,061 – 0,925]; p = 0,038). W żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu G w układzie homozygotycznym (GG) (**Tab. 44**).

Ponadto, wykryto 5 mutacji punktowych polegających na substytucji nukleotydów, które występują tylko w grupie pacjentów z PMS. Należą do nich mutacje o charakterze zmiany sensu c.2175G>C (zamiana argininy (Arg – AGG) w pozycji 725 seryną (Ser – AGC)) oraz mutacje w regionie intronów c.365-80C>T, c.365-414A>T oraz w regionie 3'UTR c.\*394A>G oraz c.\*468A>T. W przypadku tych mutacji, na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania alleli i genotypów w porównywanych wariantach eksperymentalnych (**Tab. 44**).

W genie *FGB* w obu grupach wykryto jedną mutację punktową w rejonie intronu 5 w odległości 57 par zasad od kodonu 832 (c.832+57T>A). Mutacja c.832+57T>A w genie *FGB* polega na substytucji tyminy (T) adeniną (A) (T>A). Dokonując analizy tego wariantu stwierdzono istotną statystycznie różnicę w częstości występowania alleli i genotypów w PMS w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich rozpatrywanych wariantach porównawczych. Wykazano, że heterozygota T/A zwiększa ponad 8-krotnie prawdopodobieństwo wystąpienia MS (OR = 8,75; 95% CI [2,032 – 37,672]; p = 0,004), jak również allel T podnosi to ryzyko około 4-krotnie (OR = 3,7; 95% CI [1,249 – 10,933]; p = 0,018). W żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu A w układzie homozygotycznym (AA) (**Tab. 45**).

W przypadku genu *FGG* zlokalizowano dwa warianty mutacji w regionach regulatorowych: c.\*546G>A w rejonie 3'UTR oraz c.-213A>T w rejonie 5'UTR. Mutacja c.\*546G>A w genie *FGG* występująca w obu grupach badanych związana jest z podstawieniem guaniny (G) adeniną (G>A) w kodonie 546 od końca miejsca translacji. Porównując częstości genotypów i alleli w obu grupach nie wykryto istotnych statystycznie różnic między analizowanymi grupami, jednakże zaobserwowano kierunek zmiany w przypadku allelu G w układzie homozygotycznym (G/G) wskazując na jego potencjalny charakter ochronny w stosunku do występowania fenotypu choroby (OR = 0,114; 95% CI [0,012 – 1,060]; p = 0,056). Podobne predyspozycje w kierunku protekcyjnym wykazuje allel G (OR = 0,137; 95% CI [0,016 – 1,195]; p = 0,072). W żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu A w układzie homozygotycznym (A/A) (**Tab. 46**). Natomiast, mutacja c.-213A>T w regionie 5'UTR genu w odległości 213 par zasad od miejsca translacji dotyczy substytucji adeniny (A) na tyminę (T) (A>T) i wykryta została jedynie u pacjentów z PMS. W żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu T w układzie homozygotycznym (T/T) (**Tab. 46**).

Częstości genotypów i alleli odpowiednio dla zidentyfikowanych wariantów genu *FGA*, *FGB* oraz *FGG* zostały przedstawione w **Tab. 44-46**.

**Tabela 44.** Częstość występowania genotypów i alleli zidentyfikowanych mutacji w genie *FGA* w grupie pacjentów z PMS oraz kontrolnej, na **czerwono** zaznaczono wartości istotne statystycznie

Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.1040A&gt;G (Gln347Arg) – FGA</b>	$\chi^2 = 4,356; p = 0,037$					
A/A	13	0,650	6	0,316	0,249 (0,066 – 0,944)	<b>0,041</b>
A/G	7	0,350	13	0,684	4,024 (1,059 – 15,278)	<b>0,041</b>
A	33	0,825	25	0,658	0,408 (0,142 – 1,172)	0,096
G	7	0,175	13	0,342	2,451 (0,853 – 7,045)	0,096
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.991A&gt;G (Thr331Ala) – FGA</b>	$\chi^2 = 4,496; p = 0,034$					
A/A	12	0,600	5	0,263	0,238 (0,061 – 0,925)	<b>0,038</b>
A/G	8	0,400	14	0,737	4,200 (1,081 – 16,325)	<b>0,038</b>
A	32	0,800	24	0,632	0,429 (0,155 – 1,185)	0,103
G	8	0,200	14	0,368	2,333 (0,844 – 6,453)	0,103
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.2175G&gt;C (Arg725Ser) – FGA</b>	$\chi^2 = 3,421; p = 0,064$					
G/G	20	1,000	16	0,842	0,115 (0,006 – 2,388)	0,162
G/C	-	-	3	0,157	8,697 (0,419 – 180,602)	0,162
G	40	1	35	0,921	0,125 (0,006 – 2,508)	0,174
C	-	-	3	0,079	7,985 (0,399 – 159,971)	0,174
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.*394A&gt;G – FGA</b>	$\chi^2 = 3,421; p = 0,064$					
A/A	20	1,000	16	0,842	0,115 (0,006 – 2,388)	0,162
A/G	-	-	3	0,158	8,697 (0,419 – 180,602)	0,162
A	40	1,000	35	0,921	0,125 (0,006 – 2,508)	0,174
G	-	-	-	0,079	7,985 (0,399 – 159,971)	0,174
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.365-80C&gt;T – FGA</b>	$\chi^2 = 6,037; p = 0,014$					
C/C	20	1,000	14	0,734	0,064 (0,003 – 1,256)	0,070
C/T	-	-	5	0,266	15,552 (0,796 – 303,802)	0,070
C	40	1,000	33	0,868	0,075 (0,004 – 1,409)	0,084
T	-	-	5	0,132	13,299 (0,709 – 249,317)	0,084
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.365-414A&gt;T – FGA</b>	$\chi^2 = 3,421; p = 0,064$					
A/A	20	1,000	16	0,842	0,115 (0,006 – 2,388)	0,162
A/T	-	-	3	0,158	1,25 (0,222 – 7,052)	0,162
A	40	1,000	35	0,921	0,125 (0,006 – 2,508)	0,174
T	-	-	3	0,079	7,986 (0,399 – 159,971)	0,174
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.*468A&gt;T – FGA</b>	$\chi^2 = 3,421; p = 0,064$					
A/A	20	1,000	16	0,842	0,115 (0,006 – 2,388)	0,162
A/T	-	-	3	0,158	1,25 (0,222 – 7,052)	0,162
A	40	1,000	35	0,921	0,125 (0,006 – 2,508)	0,174
T	-	-	3	0,079	7,986 (0,399 – 159,971)	0,174

**Tabela 45.** Częstość występowania genotypów i alleli zidentyfikowanych mutacji w genie *FGB* w grupie pacjentów z PMS oraz kontrolnej, na **czerwono** zaznaczono wartości istotne statystycznie

Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.832+57T&gt;A – FGB</b>	$\chi^2 = 9,393$ ; <b>p = 0,002</b>					
A/A	14	0,7	4	0,211	0,144 (0,027 – 0,492)	<b>0,004</b>
T/A	6	0,3	15	0,789	8,75 (2,032 – 37,672)	<b>0,004</b>
A	34	0,85	23	0,605	0,271 (0,092 – 0,801)	<b>0,018</b>
T	6	0,15	15	0,395	3,696 (1,249 – 10,933)	<b>0,018</b>

**Tabela 46.** Częstość występowania genotypów i alleli zidentyfikowanych mutacji w genie *FGG* w grupie pacjentów z PMS oraz kontrolnej

Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.*546G&gt;A – FGG</b>	$\chi^2 = 4,674$ ; p = 0,031					
G/G	19	0,95	13	0,684	0,114 (0,012 – 1,060)	0,056
G/A	1	0,05	6	0,316	8,77 (0,942 – 81,675)	0,056
G	39	0,975	32	0,842	0,137 (0,016 – 1,195)	0,072
A	1	0,025	6	0,158	7,316 (0,837 – 63,919)	0,072
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.-213A&gt;T – FGG</b>	$\chi^2 = 4,691$ ; p = 0,030					
A/A	20	1,000	15	0,789	0,084 (0,004 – 1,679)	0,105
A/T	-	-	4	0,211	11,900 (0,595 – 237,974)	0,105
A	40	1,000	34	0,895	0,095 (0,005 – 1,821)	0,118
T	-	-	4	0,105	10,565 (0,549 – 203,251)	0,118

### 4.3. Ocena molekularnych zmian $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny, jako kluczowych białek cytoszkieletu płytek krwi i megakariocytów

#### 4.3.1. Pomiar stężenia $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach metodą ELISA

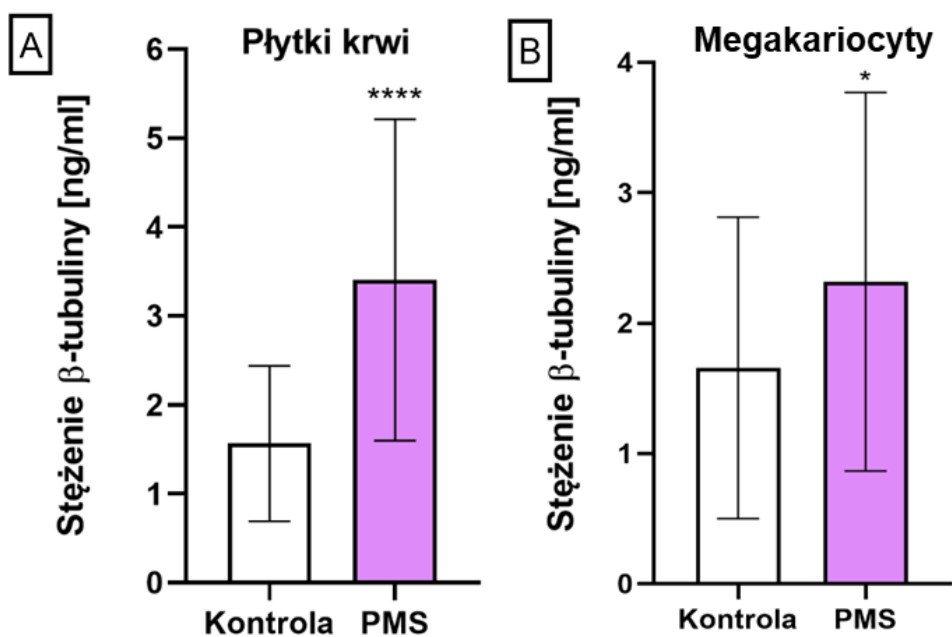
Adhezja płytek krwi jest pierwszym etapem ich aktywacji prowadzącej m.in. do fosforylacji białek cytoszkieletu. Reorganizacja architektury cytoszkieletu umożliwia zmianę kształtu płytek krwi i degranulację ziarnistości zawierających szereg związków czynnych biologicznie, co ostatecznie przyczynia się do tworzenia stabilnych homo- i hetero-agregatów komórkowych. Różnice ilościowe i/lub strukturalne w cząsteczkach białek cytoszkieletu płytkowego determinują zmiany w hemostatycznej odpowiedzi płytek krwi wpływając na proces tworzenia się czopu płytkowego. Zwiększona ilość głównych białek motorycznych cytoszkieletu tj.  $\beta$ -tubuliny oraz  $\beta$ -aktyny może sprzyjać zdarzeniom pro-zakrzepowym.

W celu zweryfikowania potencjalnych zmian ilościowych w białkach cytoszkieletu płytek krwi, jako prawdopodobnych czynników ich wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej obserwowanej w PMS, wykonano pomiar stężenia  $\beta$ -tubuliny oraz  $\beta$ -aktyny w lizatach tych komórek, wykorzystując komercyjnie dostępne testy ELISA, odpowiednio: Human TUBB (Tubulin  $\beta$  chain) ELISA Kit oraz Human ACTB (Actin beta) ELISA Kit. Stężenia badanych białek cytoszkieletu wyznaczono stosując odpowiednie krzywe wzorcowe wyrażone w ng/ml.

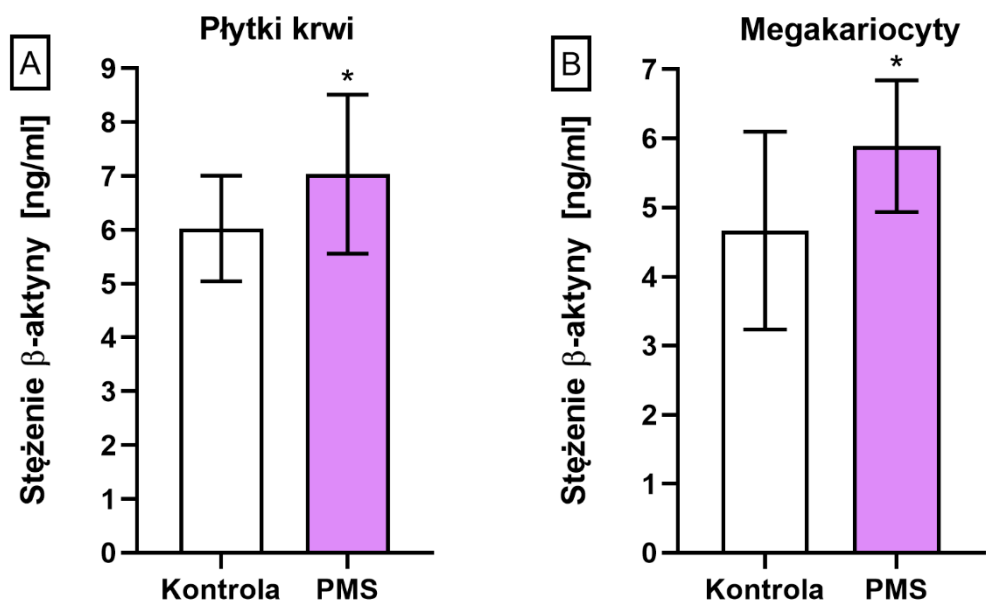
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że średnie stężenie  $\beta$ -tubuliny w płytkach krwi pacjentów z PMS (wynoszące  $3,4 \pm 1,8$  ng/ml) jest ponad 2-krotnie wyższe ( $p < 0,0001$ ) od stężenia w płytkach prawidłowych ( $1,56 \pm 0,87$  ng/ml) (**Ryc. 26A**). W przypadku wyników uzyskanych dla megakariocytów wykazano około 40% wzrost ( $p < 0,05$ ) średniego stężenia  $\beta$ -tubuliny, które w PMS wynosiło  $2,31 \pm 1,45$  ng/ml, a w kontroli  $1,65 \pm 1,15$  ng/ml (**Ryc. 26B**).

W wynikach uzyskanych dla  $\beta$ -aktyny również zaobserwowano wzrost ekspresji tego białka u pacjentów z PMS, ale wykazane różnice były mniejsze, niż w przypadku  $\beta$ -tubuliny.

Średnie stężenie  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi w PMS ( $7,04 \pm 1,48$  ng/ml) było wyższe w stosunku do kontroli ( $6,93 \pm 0,98$  ng/ml) o około 15% ( $p < 0,05$ ) (**Ryc. 27A**). Średnie stężenie  $\beta$ -aktyny w mitochondriach wynosiło w PMS  $5,89 \pm 0,95$  ng/ml i było wyższe o około 25% ( $p < 0,05$ ) w porównaniu ze średnią wartością wynoszącą dla kontroli  $4,67 \pm 1,43$  ng/ml (**Ryc. 27B**).



**Rycina 26.** Średnie stężenie  $\beta$ -tubuliny [ng/ml]  $\pm$  SD w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*p < 0,05, \*\*\*\*p < 0,0001.



**Rycina 27.** Średnie stężenie  $\beta$ -aktyny [ng/ml]  $\pm$  SD w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*p < 0,05.

#### **4.3.2. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących $\beta$ -tubuline oraz $\beta$ -aktyne w płytkach krwi i megakariocytach metodą qPCR**

Dynamiczna reorganizacja cytoszkieletu płytkowego uruchamia kaskadę sygnalizacyjną, która odgrywa istotną rolę we wszystkich procesach, w których uczestniczą płytki krwi. W celu weryfikacji, czy zwiększone stężenie dwóch kluczowych białek cytoszkieletu, tj.  $\beta$ -tubuliny oraz  $\beta$ -aktyny w PMS ma odzwierciedlenie w poziomie ekspresji mRNA genów *TUBB1* i *ACTB*, wykonano analizę porównawczą poziomu ekspresji transkryptów dla tych genów w płytkach krwi i megakariocytach pochodzących od pacjentów z PMS oraz kontrolnych.

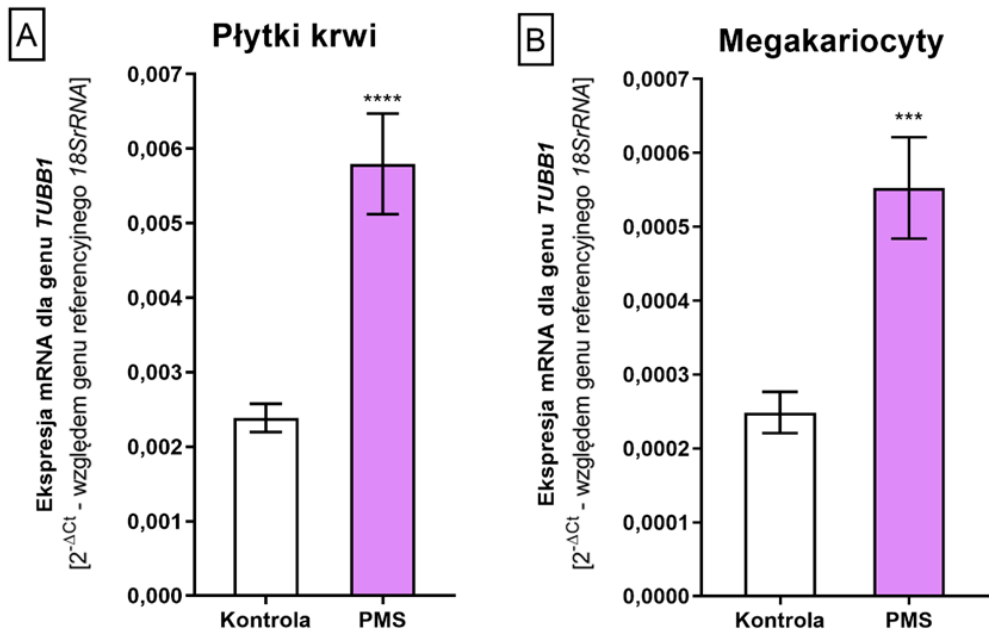
Analizie ekspresji na poziomie mRNA poddano gen kodujący  $\beta$ -tubulinę *TUBB1* oraz  $\beta$ -aktynę *ACTB*, stosując jako gen referencyjny *18SrRNA*. Do obliczeń wartości względnej ekspresji wykorzystano metodę porównań cykli progowych (Ct) stosując formułę pojedynczej delty  $2^{-\Delta Ct}$ .

Analiza względnej ekspresji cząsteczek mRNA dla genów *TUBB1* i *ACTB* w płytkach krwi wykazała ponad 2,5-krotny wzrost ( $p < 0,0001$ ) poziomu transkryptów *TUBB1* (**Ryc. 28A**) i prawie 2-krotny *ACTB* ( $p < 0,0001$ ) w PMS, w porównaniu do grupy kontrolnej (**Ryc. 29A**).

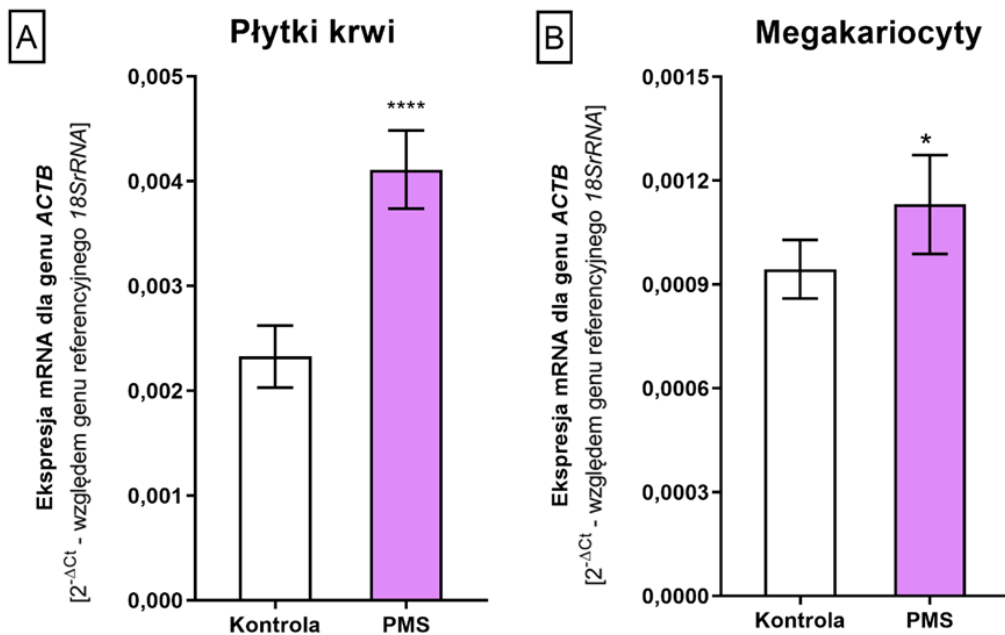
Pomiar ekspresji tych samych transkryptów w megakariocytach również wykazał istotne statystycznie różnice pomiędzy porównywanymi grupami. Ekspresja mRNA dla genu *TUBB1* była o ponad 55% wyższa ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 28B**), a genu *ACTB* o około 15% ( $p < 0,05$ ) (**Ryc. 29B**) u pacjentów z PMS w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tym samym uzyskane wyniki wykazały, analogicznie jak miało to miejsce dla ekspresji na poziomie białka, wyższą ekspresję kluczowych elementów cytoszkieletu w PMS, szczególnie w przypadku  $\beta$ -tubuliny.





**Rycina 28.** Ekspresja genu *TUBB1* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.



**Rycina 29.** Ekspresja genu *ACTB* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*p < 0,05; \*\*\*\*p < 0,0001.

#### 4.3.3. Identyfikacja potencjalnych PTMs $\beta$ -tubuliny i $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach przy zastosowaniu techniki LC-MS-MS/MS

W celu analizy porównawczej występowania potencjalnych PTMs w cząsteczkach  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi i megakariocytach pochodzących od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej zastosowano technikę LC-MS-MS/MS.

Formuła znakowania próbek oraz układy analizowanych wariantów eksperymentalnych przedstawione zostały w **Tab. 47**.

**Tabela 47.** Formuła znakowania próbek oraz układy badawcze w analizie LC-MS-MS/MS

Formuła znakowania próbek:	Układy porównawcze:
PLT_K – płytki krwi kontrolne	PLT_K vs PLT_PMS
PLT_PMS – płytki krwi od pacjentów z PMS	MK_K vs MK_PMS
MK_K – megakariocyty kontrolne	PLT_K vs MK_K
MK_PMS – megakariocyty od pacjentów z PMS	PLT_PMS vs MK_PMS

Szczegółowa charakterystyka analizowanych peptydów  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny znajduje się w **Tab. 48**. Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi przedstawione zostały odpowiednio w **Tab. 49** i **52**. Sekwencje aminokwasowe dla  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny wraz z zaznaczonymi miejscami modyfikacji zostały umieszczone w **Tab. 50** i **53**. Za pomocą różnych kolorów wskazano konkretne pozycje aminokwasowe, na których zidentyfikowano daną modyfikację (glikacja, metylacja, acetylacja, deamidacja). W **Tab. 51** i **54** przedstawione zostały wybrane sekwencje peptydowe dla  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny, które spełniły kryteria wartości Mascot Score i FDR i różnicują badane warianty eksperymentalne.

**Tabela 48.** Charakterystyka peptydów  $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny na podstawie analizy LC-MS-MS/MS

Układ badawczy	Masa cząst. odczytana z baz danych (kDa)	Masa cząst. (kDa)	pI	Liczba aminokwasów	Mascot Score	Pokrycie sekwencji
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>						
PLT_K	49,67	50,75	5,05	451	4954	85%
PLT_PMS					4007	78%
MK_K					1367	87%
MK_PMS					1494	81%
<b><math>\beta</math>-aktyna</b>						
PLT_K	41,74	41,98	5,29	375	32199	90%
PLT_PMS					25610	75%
MK_K					6793	94%
MK_PMS					8579	96%

**Tabela 49.** Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla  $\beta$ -tubuliny pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi

vs	PLT_K	PLT_PMS	MK_K	MK_PMS
PLT_K		q-value: 0,94 Ratio: 1,14 FC: 1,14 AP: 74	q-value: 0,93 Ratio: 0,36 FC: 2,78 AP: 51	X
PLT_PMS	q-value: 0,94 Ratio: 1,14 FC: 1,14 AP: 74		X	q-value: 0,92 Ratio: 0,65 FC: 1,55 AP: 70
MK_K	q-value: 0,93 Ratio: 0,36 FC: 2,78 AP: 51	X		q-value: 0,74 Ratio: 3,65 FC: 3,65 AP: 23
MK_PMS	X	q-value: 0,92 Ratio: 0,65 FC: 1,55 AP: 70	q-value: 0,74 Ratio: 3,65 FC: 3,65 AP: 23	

X-warianty, które nie były poddane analizie

**Tabela 50.** Sekwencja aminokwasowa  $\beta$ -tubuliny (M. cz. 50,75 kDa, 451 aa) i miejsca zidentyfikowanych PTMs

10	20	30	40	50
MREIVHIQIG	QCGNQIGAKF	WEMIGEEHGI	DLAGSDRGAS	ALQLERISVY
60	70	80	90	100
YNEAYGRKYV	PRAVLVDLEP	GTMDSIRSSK	LGALFQPDFS	VHGNSGAGNN
110	120	130	140	150
WAKGHYTEGA	ELIENVLEVV	RHESECDCL	QGFQIVHSLG	GGTGSGMGTL
160	170	180	190	200
LMNKIREEYP	DRIMNSFSVM	PSPKVSDTVV	EPYNAVLSIH	QLIENADACF
210	220	230	240	250
CIDNEALYDI	CFRTLKLTTP	TYGDLNHLVS	LTMSGITSL	RFPGQLNADL
260	270	280	290	300
RKLAVNMVFP	PRLHFFMPGF	APLTAQGSQQ	YRALSVAELT	QQMFDARNTM
310	320	330	340	350
AACDLRRGRY	LTVACIFRGK	MSTKEVDQQL	LSVQTRNSSC	FVEWIPNNVK
360	370	380	390	400
VAVCDIPPRG	LSMAATFIGN	NTAIQEIFNR	VSEHFSAMFK	RKAFVHWYTS
410	420	430	440	451
EGMDINEFGE	AENNIHDLVS	EYQQFQDAKA	VLEEDDEVTE	EAEMEPEDKGH

Wykaz zidentyfikowanych peptydów  $\beta$ -tubuliny, które spełniły kryteria wartości Mascot *Score* i FDR przedstawiony został w **Tab. 51**.

**Tabela 51.** Sekwencje peptydowe  $\beta$ -tubuliny wraz z rodzajem i miejscem PTMs spełniające kryteria wartości Mascot *Score* i FDR

Względna ilość peptydów		R	FC	Sekwencja + PTM (modyfikowane aminokwasy)	Pozycja aminokwasowa
<b>PLT_K</b>	<b>PLT_PMS</b>				
7,99	7,22	5,93	5,93	LAVNMVPFPR+Deamidated (N)	Asn <sup>256</sup>
brak	6,85	-	-	IMNSFSVMPSPK+Deamidated (N)	Asn <sup>165</sup>
7,35	7,42	0,85	1,18	LGALFQPDSFVHGN SGAGNNWAK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>86</sup> , Asn <sup>99</sup> , Asn <sup>100</sup>
<b>MK_K</b>	<b>MK_PMS</b>				
brak	7,33	-	-	LHFFMPGFAPLTAQGSQQYR+Deamidated (Q)	Gln <sup>276</sup> , Gln <sup>279</sup> , Gln <sup>280</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>MK_K</b>				
7,55	brak	-	-	LGALFQPDSFVHGN SGAGNNWAK+Deamidated (NQ)	Gln <sup>86</sup> , Asn <sup>99</sup> , Asn <sup>100</sup>
7,92	brak	-	-	LAVNMVPFPR+Deamidated (N)	Asn <sup>256</sup>
<b>PLT_PMS</b>	<b>MK_PMS</b>				
brak	7,19	-	-	LHFFMPGFAPLTAQGSQQYR+Deamidated (Q)	Gln <sup>276</sup> , Gln <sup>279</sup> , Gln <sup>280</sup>
7,32	brak	-	-	LAVNMVPFPR+Deamidated (N)	Asn <sup>256</sup>

Spośród wszystkich wygenerowanych przez program Mascot sekwencji peptydowych  $\beta$ -tubuliny wyodrębniono 3 z nich, które zarówno spełniają kryterium wartości *Score* lub FDR, jak i różnicują badane warianty eksperymentalne ze względu na obecność potencjalnych miejsc ich modyfikacji. Analiza wartości *q* dla  $\beta$ -tubuliny wykazała, że nie jest to białko, które w sposób istotny statystycznie różnicuje badane grupy. Wyjątek stanowi układ porównujący ze sobą sekwencje peptydów  $\beta$ -tubuliny między megakariocytami z grupy PMS i kontrolnej oraz między płytkami i megakariocytami kontrolnymi, w którym pomimo tego, że średnie *q*-value dla białka osiąga wartość powyżej 0,05 to parametr FC dla względnej ilości określonych peptydów wynosi odpowiednio 3,65 i 2,78, i wskazuje, że deamidacja jest modyfikacją różnicującą analizowane układy badawcze (**Tab. 51**).

**Tabela 52.** Parametry analizy biostatystycznej wyników uzyskanych metodą LC-MS-MS/MS dla  $\beta$ -aktyny pomiędzy analizowanymi wariantami eksperymentalnymi

vs	PLT_K	PLT_PMS	MK_K	MK_PMS
PLT_K		q-value: 0,92 Ratio: 1,05 FC: 1,05 AP: 278	q-value: 0,96 Ratio: 1,15 FC: 1,15 AP: 231	X
PLT_PMS	q-value: 0,92 Ratio: 1,05 FC: 1,05 AP: 278		X	q-value: 0,98 Ratio: 1,16 FC: 1,16 AP: 251
MK_K	q-value: 0,96 Ratio: 1,15 FC: 1,15 AP: 231	X		q-value: 0,0013 Ratio: 0,61 FC: 1,63 AP: 108
MK_PMS	X	q-value: 0,98 Ratio: 1,16 FC: 1,16 AP: 251	q-value: 0,0013 Ratio: 0,61 FC: 1,63 AP: 108	

X-warianty, które nie były poddane analizie

**Tabela 53.** Sekwencja aminokwasowa  $\beta$ -aktyny (M. cz. 41,98 kDa, 375 aa) i miejsca zidentyfikowanych PTMs

N-koniec 10	20	30	40	50
MDDDIAALVV	DNGSGMCKAG	FAGDDAPRAV	FPSIVGRPRH	QGVMVGMGQK
60	70	80	90	100
DSYVGDEAQS	KRGILTLKYP	IEHGIVTNWD	DMEKIWHHTF	YNELRVAPEE
110	120	130	140	150
HPVLLTEAPL	NPKANREKMT	QIMFETFNTF	AMYVAIQAVL	SLYASGRRTG
160	170	180	190	200
IVMDSGDGVT	HTVPIYEGYA	LPHAILRLDL	AGRDLTDYLM	KILTERGYSF
210	220	230	240	250
TTTAEREIVR	DIKEKLCYVA	LDPEQEMATA	ASSSSLEKSY	ELPDGQVITI
260	270	280	290	300
GNERFRCPEA	LFQPSFLGME	SCGIHETTFN	SIMKCDVDIR	KDLYANTVLS
310	320	330	340	350
GGTMYPGIA	DRMQKEITAL	APSTMKIKII	APPERKYSVW	IGGSILASLS
360	370	375 C-koniec		
TFQQMWSKQ	EYDESGPSIV	HRKCF		

Wykaz zidentyfikowanych peptydów  $\beta$ -aktyny, które spełniły kryteria wartości Mascot *Score* i FDR przedstawiony został w **Tab. 54**.

**Tabela 54.** Sekwencje peptydowe  $\beta$ -aktyny wraz z rodzajem i miejscem PTMs spełniające kryteria wartości Mascot *Score* i FDR

Względna ilość peptydów		R	FC	Sekwencja + PTM(modyfikowane aminokwasy)	Pozycja aminokwasowa
<b>PLT_K</b>	<b>PLT_PMS</b>				
brak	8,16	-	-	YPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELR+Methyl (H)	His <sup>73</sup> , His <sup>87</sup> , His <sup>88</sup>
6,62	brak	-	-	HQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQS <sup>K</sup> +Hex (K)	Lys <sup>50</sup> , Lys <sup>61</sup>
7,43	7,34	1,22	1,22	CDVDIR+Acetyl (C)	Cys <sup>285</sup>
<b>MK_K</b>	<b>MK_PMS</b>				
9,13	brak	-	-	IWHHTFYNELR+Deamidated (N)	Asn <sup>92</sup>
7,85	brak	-	-	YPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELR+Methyl (H)	His <sup>73</sup> , His <sup>87</sup> , His <sup>88</sup>
<b>PLT_K</b>	<b>MK_K</b>				
brak	brak	-	-	-	-
<b>PLT_PMS</b>	<b>MK_PMS</b>				
8,12	brak	-	-	YPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELR+Methyl (H)	His <sup>73</sup> , His <sup>87</sup> , His <sup>88</sup>

Analiza wartości *q* i FC dla  $\beta$ -aktyny pokazuje, że nie jest to białko, które w sposób istotny statystycznie różnicuje próbki, a zatem z pewnym uproszczeniem można przyjąć, że poziom  $\beta$ -aktyny zasadniczo nie wykazuje różnic pomiędzy badanymi grupami. Wyjątek stanowi układ porównujący sekwencję peptydu  $\beta$ -aktyny w megakariocytach z grupy PMS i kontrolnej (*q*-value = 0,0013) (**Tab. 52**). Ponadto, analiza sekwencji  $\beta$ -aktyny pochodzącej z megakariocytów wykazała, że w grupie kontrolnej obecne są miejsca metylacji na resztach His<sup>73</sup>, His<sup>87</sup> i His<sup>88</sup> oraz deamidacji na reszcie Asn<sup>92</sup>, których nie zidentyfikowano w megakariocytach z PMS (**Tab. 54**).

Należy również zwrócić uwagę na istnienie zmiennego profilu modyfikacji  $\beta$ -aktyny w pozostałych porównywanych wariantach eksperymentalnych. Spośród wszystkich wygenerowanych przez program Mascot sekwencji peptydowych  $\beta$ -aktyny wyodrębniono 5, które zarówno spełniają kryterium wartości Mascot *Score* lub FDR, jak i różnicują badane warianty eksperymentalne ze względu na obecność potencjalnych miejsc ich modyfikacji. Na podstawie różnic we względnej ilości wyodrębnionych peptydów  $\beta$ -aktyny pomiędzy analizowanymi układami badawczymi wykryto cztery typy PTMs, które potencjalnie różnicują badane grupy, są to: metylacja, acetylacja, glikacja oraz deamidacja (**Tab. 54**).

#### 4.3.4. Analiza zmian sekwencji genu kodującego $\beta$ -tubulinę

W celu analizy przesiewowej zmian w sekwencji genu *TUBB1* kodującego  $\beta$ -tubulinę pomiędzy grupą pacjentów z PMS a grupą kontrolną zastosowano metodę NGS. Analiza skринingowa sekwencji DNA dla *TUBB1* pozwoliła na identyfikację dwóch nowych mutacji, które nigdy wcześniej nie zostały wykryte i opisane w żadnej bazie danych zawierających wykaz polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP).

W genie *TUBB1* wykazano obecność jednej mutacji c.1336C>A typu missense, która występuje tylko w grupie pacjentów z PMS oraz wariant c.-484C>G występujący w obu grupach, który uzyskał wartość na granicy istotności statystycznej ( $p < 0,088$ ). Charakterystyka wykazanych zmian w sekwencji genu *TUBB1* została przedstawiona w **Tab. 55**.

Mutacja c.1336C>A w genie *TUBB1* znajdująca się w egzonie 4 w kodonie 1336 polega na substytucji cytozyny (C) na adeninę (A) (C>A) i wywołuje zamianę proliny (Pro – CCA) w pozycji 1336 na treoninę (Thr – ACA) w sekwencji aminokwasowej białka. W przypadku tej mutacji nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli pomiędzy grupą PMS a grupą kontrolną. W żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu A w układzie homozygotycznym (A/A) (**Tab. 56**).

Natomiast mutacja c.-484C>G w genie *TUBB1* związana jest z podstawieniem cytozyny (C) guaniną (G) w regionie 5'UTR w pozycji -484. Porównując częstości genotypów i alleli pacjentów z PMS z grupą kontrolną, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ). Ponadto, w żadnej z rozpatrywanych grup nie zaobserwowano występowania allelu G w układzie homozygotycznym (G/G) (**Tab. 56**).

Rozmieszczenie genotypów i alleli badanych mutacji w genie *TUBB1* kodującym  $\beta$ -tubulinę u pacjentów z PMS i ochotników przedstawione zostało w **Tab. 56**.

**Tabela 55.** Charakterystyka badanych mutacji w genie *TUBB1*

Gen (identyfikator z bazy Ensemble)/ liczba pz / pozycja w chromosomie	Mutacja	Zmiana w sekwencji aminokwasowej	Lokalizacja w genie
<i>TUBB1</i> (ENSG00000101162) 3321 pz 20q13.32	c.-484C>G	-	5'UTR
	c.1336C>A	Pro446Thr	Egzon 4

**Tabela 56.** Częstość występowania genotypów i alleli zidentyfikowanych mutacji w genie *TUBB1* w grupie pacjentów z PMS oraz kontrolnej

Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.-484C&gt;G – <i>TUBB1</i> <math>\chi^2 = 2,915</math>; p = 0,088</b>						
C/C	15	0,75	18	0,947	0,167 (0,018 – 1,587)	0,119
C/G	5	0,25	1	0,053	6,000 (0,630 – 57,139)	0,119
C	35	0,875	37	0,974	5,285 (0,588 – 47,525)	0,137
G	5	0,125	1	0,026	0,189 (0,021 – 1,701)	0,137
Genotyp/Allel	Kontrola (n = 20)		PMS (n = 19)		OR (95% CI)	p
	n	Częstość	n	Częstość		
<b>c.1336C&gt;A (Pro446Thr) – <i>TUBB1</i> <math>\chi^2 = 4,692</math>; p = 0,030</b>						
C/C	20	1,000	15	0,789	0,084 (0,004 – 1,679)	0,105
C/A	-	-	4	0,211	11,903 (0,595 – 237,974)	0,105
C	40	1,000	34	0,895	0,095 (0,005 – 1,821)	0,118
A	-	-	4	0,105	10,565 (0,549 – 203,251)	0,118

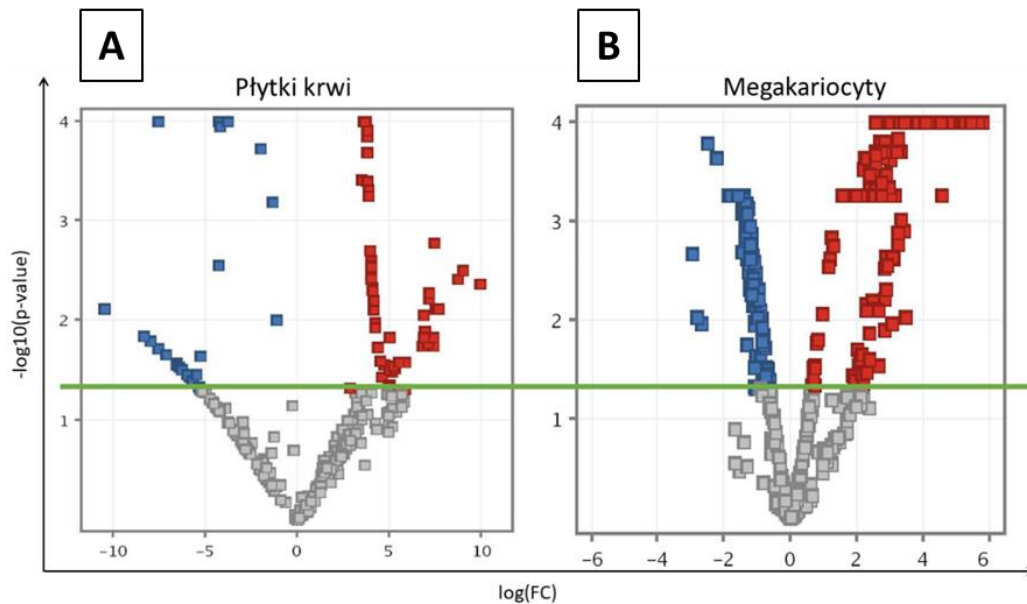


## 4.4. Ocena profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach

### 4.4.1. Metoda mikromacierzy miRNA

Cząsteczki miRNA pełnią funkcję ujemnych regulatorów ekspresji docelowego mRNA na poziomie potranskrypcyjnym. Poziom ekspresji płytkowych cząsteczek miRNA może mieć wpływ na syntezę białek, które zaangażowane są w szlaki aktywacji płytek krwi oraz regulują ich właściwości hemostatyczne. Z tego względu skringowa analiza porównawcza profilu ekspresji płytkowych miRNA wykonana metodą mikromacierzy może pozwolić na wykrycie molekularnego podłoża zmian specyficznych dla zwiększonego ryzyka incydentów niedokrwiennych, które obserwuje się u pacjentów z PMS.

Zmienność ekspresji między grupą badaną a kontrolną w zbiorze wszystkich zidentyfikowanych cząsteczek miRNA ocenia się na podstawie tzw. wykresu wulkanicznego (ang. *Volcano Plot*). Wykres stanowi zlogarytmowaną wartość ujemną istotności zmienności ekspresji dla każdego genu ( $p$ -value) w funkcji logarytmicznej krotności zmian poziomu ekspresji tzw.  $\log(FC)$ . Wykresy wulkaniczne uzyskane dla analizy mikromacierzy miRNA w płytkach krwi i megakariocytach przedstawiono na **Ryc. 30**.



**Rycina 30.** Wykresy typu *Volcano Plot* przedstawiające zależność między ujemnym logarytmem istotności statystycznej a logarytmem krotności zmian ( $\log(FC)$ ) wyników ekspresji cząsteczek miRNA uzyskanych techniką mikromacierzy w płytkach krwi (A) i megakariocytach (B) pomiędzy grupą PMS ( $n = 45$ ) a kontrolą ( $n = 45$ ). Wszystkie punkty powyżej zielonej linii poziomej posiadają wartości istotności ( $p < 0,05$ ), punkty niebieskie i czerwone charakteryzuje większa niż dwukrotna zmiana poziomu ekspresji ( $FC > 2$ ). Punkty niebieskie to miRNA wykazujące spadek ekspresji, a punkty czerwone to miRNA wykazujące wzrost ekspresji w grupie PMS wobec grupy kontrolnej.

Analiza mikromacierzy wykazała istotnie zmieniony profil ekspresji miRNA płytek krwi i megakariocytów u pacjentów z PMS w porównaniu do zdrowych ochotników. Na podstawie analizy bioinformatycznej uzyskanych wyników zidentyfikowano 93 miRNA wykazujące wzrost ekspresji oraz 42 miRNA, których ekspresja jest statystycznie niższa w płytkach krwi w PMS w odniesieniu do grupy kontrolnej. W przypadku megakariocytów pochodzących od pacjentów z PMS zidentyfikowano wzrost ekspresji 130 miRNA oraz spadek ekspresji w przypadku 93 miRNA, wobec grupy kontrolnej.

Wyniki skringowej analizy mikromacierzy profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach, obrazujące wszystkie zidentyfikowane miRNA wykazujące istotnie zmienioną ekspresję w grupie pacjentów z PMS względem grupy kontrolnej, wraz z krotnością ekspresji log(FC) przedstawiono w **Tab. 57 i 58**.

**Tabela 57.** Wyniki skringowej analizy mikromacierzy miRNA w płytkach krwi obrazujące wszystkie zidentyfikowane miRNA wykazujące istotnie zmienioną ekspresję w grupie pacjentów z PMS względem grupy kontrolnej

Płytki krwi							
93 cząsteczki miRNA wykazujące <b>zwiększoną</b> ekspresję w PMS względem kontroli				42 cząsteczki miRNA wykazujące <b>obniżoną</b> ekspresję w PMS względem kontroli			
miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]	miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]	miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]	miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]
miR-4481	2,93	miR-188-5p	4,34	miR-4646-3p	-0,21	miR-4730	-5,47
miR-642a-3p	2,78	miR-7108-5p	4,37	miR-638	-0,87	miR-107	-5,49
miR-483-5p	2,83	miR-6769b-5p	4,37	miR-6759-3p	-1,02	miR-6716-3p	-5,55
miR-7107-5p	2,89	miR-4485-3p	4,38	miR-324-3p	-1,60	miR-331-3p	-5,59
miR-6089	2,93	miR-4327	4,40	miR-6073	-3,49	miR-24-3p	-5,91
miR-6891-5p	2,93	miR-4647	4,47	miR-4455	-3,63	miR-20a-5p	-6,02
miR-4271	2,96	miR-4484	4,57	miR-4299	-3,73	miR-126-3p	-6,05
miR-7847-3p	2,98	miR-602	4,58	miR-320a	-3,75	miR-15b-5p	-6,15
miR-4728-3p	3,00	miR-1275	4,62	miR-27b-3p	-3,77	miR-199a-3p	-6,17
miR-4505	3,00	miR-4312	4,62	miR-15a-5p	-3,81	miR-103a-3p	-6,17
miR-1908-3p	3,13	miR-5739	4,64	miR-744-5p	-3,91	miR-16-5p	-6,79
miR-6885-3p	3,13	miR-4476	4,64	miR-26a-5p	-3,93	let-7d-5p	-7,12
miR-4687-3p	3,16	miR-642b-3p	4,64	miR-25-3p	-3,97	let-7f-5p	-7,24
miR-6812-5p	3,17	miR-5571-5p	4,65	miR-423-5p	-4,13	let-7g-5p	-7,64
miR-6889-3p	3,17	miR-4436b-3p	4,65	miR-221-3p	-4,30		
miR-1587	3,26	miR-5787	4,73	miR-26b-5p	-4,46		
miR-197-5p	3,39	miR-92b-3p	4,75	miR-451b	-4,50		
miR-4666b	3,44	hsa-miR-519d-3p	4,77	miR-151a-5p	-4,55		
miR-4515	3,45	miR-3135b	4,80	miR-27a-3p	-4,71		
miR-4530	3,46	miR-6088	4,86	miR-23a-3p	-4,75		
miR-7150	3,46	miR-4459	5,01	miR-17-5p	-4,78		
miR-3180-5p	3,48	miR-6893-5p	5,04	miR-130a-3p	-4,79		
miR-33b-3p	3,48	miR-6884-3p	5,11	miR-8485	-4,83		
miR-7974	3,51	miR-5699-5p	5,14	miR-93-5p	-4,84		
miR-3656	3,54	miR-3614-5p	5,42	let-7a-5p	-4,90		
miR-4700-3p	3,58	miR-6858-5p	5,54	miR-574-3p	-5,03		
miR-3960	3,63	miR-625-3p	5,62	miR-432-5p	-5,21		
miR-6752-3p	3,63	miR-6785-5p	5,66	let-7e-5p	-5,30		
miR-513b-5p	3,66	miR-4741	5,79				
miR-30d-5p	3,69	miR-3184-3p	5,79				
miR-6757-3p	3,70	miR-7641	5,93				
miR-6800-5p	3,77	miR-6877-3p	6,18				
miR-22-3p	3,77	miR-767-3p	6,27				

miR-365a-3p	3,88	miR-1470	6,29
miR-563	3,88	miR-3150b-5p	6,31
miR-1227-3p	4,05	miR-1267	6,33
miR-18b-3p	4,11	miR-4698	6,36
miR-150-3p	4,14	miR-3190-5p	6,37
miR-6730-3p	4,17	miR-4478	6,48
miR-6869-5p	4,18	miR-124-3p	7,50
miR-6790-3p	4,22	miR-664b-5p	7,79
miR-6792-3p	4,22	miR-4636	7,81
miR-4714-5p	4,23	miR-4697-5p	8,11
miR-939-3p	4,28	miR-8089	8,26
miR-6892-3p	4,28	miR-874-3p	8,30
miR-5681b	4,29	miR-1914-3p	10,57
miR-6728-3p	4,30		

**Tabela 58.** Wyniki skringowej analizy mikromacierzy miRNA w megakariocytach obrazujące wszystkie zidentyfikowane miRNA wykazujące istotnie zmienioną ekspresję w grupie pacjentów z PMS względem grupy kontrolnej

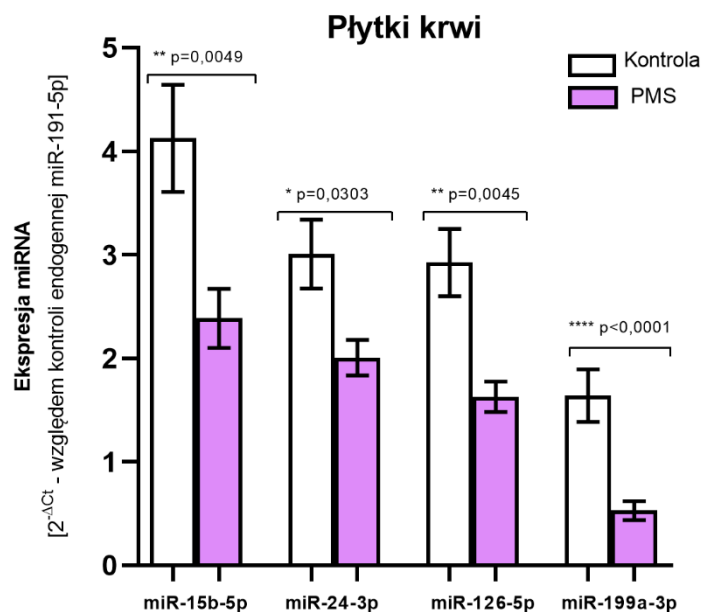
Megakariocyty							
130 cząsteczek miRNA wykazujących <b>zwiększoną</b> ekspresję w PMS względem kontroli				93 cząsteczki miRNA wykazujące <b>obniżoną</b> ekspresję w PMS względem kontroli			
miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]	miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]	miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]	miRNA	log(FC) [PMS vs kontrola]
miR-664b-5p	0,702	miR-5010-3p	2,963	miR-6165	-0,70	miR-4738-3p	-1,29
miR-6891-5p	0,725	miR-4274	2,981	miR-6127	-0,72	miR-6763-3p	-1,30
miR-92a-3p	0,746	miR-4730	2,998	miR-6731-3p	-0,79	miR-3151-3p	-1,30
miR-7641	0,796	miR-652-5p	3,005	miR-5585-3p	-0,80	miR-3162-3p	-1,30
miR-937-5p	0,804	miR-1224-5p	3,016	miR-6749-5p	-0,80	miR-8485	-1,31
miR-4634	0,976	miR-151a-5p	3,036	let-7i-5p	-0,82	miR-4485-5p	-1,33
miR-1587	1,145	miR-6728-5p	3,042	miR-940	-0,86	miR-6851-3p	-1,33
miR-1275	1,167	miR-6086	3,058	miR-7107-5p	-0,86	miR-4433a-5p	-1,33
miR-1273g-3p	1,221	miR-6786-5p	3,075	miR-197-5p	-0,87	miR-483-3p	-1,34
miR-575	1,573	miR-1260b	3,086	miR-4284	-0,90	miR-4649-3p	-1,35
miR-142-3p	1,720	miR-5703	3,108	miR-4652-3p	-0,90	miR-6858-3p	-1,36
miR-7975	1,968	miR-4665-5p	3,134	miR-1973	-0,91	miR-6824-3p	-1,36
miR-423-5p	1,987	miR-146b-5p	3,174	miR-4436b-5p	-0,92	miR-6800-3p	-1,36
miR-1260a	2,033	miR-8071	3,184	miR-642a-3p	-0,98	miR-6870-3p	-1,36
miR-4701-3p	2,094	miR-4436b-3p	3,237	miR-6085	-0,98	miR-149-5p	-1,38
miR-6793-5p	2,117	miR-7114-5p	3,246	miR-197-3p	-0,99	miR-6797-3p	-1,38
miR-15b-5p	2,123	miR-3652	3,257	miR-4787-3p	-1,01	miR-6880-3p	-1,38
miR-4767	2,162	miR-146a-5p	3,258	miR-6752-3p	-1,02	miR-6798-3p	-1,39
miR-16-5p	2,207	miR-6768-5p	3,291	miR-4665-3p	-1,03	miR-6737-3p	-1,39
miR-223-3p	2,230	miR-4646-5p	3,246	miR-4697-5p	-1,03	miR-4769-3p	-1,39
miR-6809-5p	2,271	miR-486-5p	3,306	miR-3613-3p	-1,07	miR-6785-3p	-1,40
miR-135a-3p	2,298	miR-6743-3p	3,315	let-7f-5p	-1,07	miR-4313	-1,40
miR-4443	2,300	miR-6850-5p	3,341	miR-4323	-1,07	miR-4750-3p	-1,42
miR-7111-3p	2,358	miR-320a	3,342	miR-98-3p	-1,08	miR-574-3p	-1,42
let-7e-5p	2,362	miR-4306	3,347	miR-619-5p	-1,08	miR-1234-3p	-1,43
miR-874-3p	2,375	miR-4532	3,408	let-7f-1-3p	-1,08	miR-4731-3p	-1,44
miR-328-5p	2,384	miR-6829-5p	3,420	miR-634	-1,10	miR-6739-5p	-1,45
miR-4327	2,394	miR-3648	3,444	miR-6507-3p	-1,11	let-7b-3p	-1,45
miR-664b-3p	2,447	miR-630	3,482	miR-1249-3p	-1,12	miR-1972	-1,47
miR-3138	2,458	miR-5195-3p	3,537	miR-6819-3p	-1,14	miR-4701-5p	-1,48
miR-6884-3p	2,490	miR-106b-5p	3,588	miR-1304-3p	-1,14	miR-6759-3p	-1,52
miR-4651	2,533	miR-4698	3,639	miR-6069	-1,14	miR-4465	-1,53
miR-3911	2,542	miR-4710	3,706	miR-6777-3p	-1,14	miR-4486	-1,70
miR-484	2,547	miR-25-3p	3,832	miR-1281	-1,15	miR-3653-3p	-1,72
miR-21-5p	2,551	miR-6753-5p	3,845	let-7a-5p	-1,17	miR-6126	-1,75
miR-6820-5p	2,552	miR-30d-5p	3,990	miR-1202	-1,19	miR-6774-5p	-1,84
miR-6772-5p	2,570	miR-6734-5p	4,005	miR-1228-3p	-1,19	miR-4497	-1,86
miR-6808-5p	2,577	miR-30b-5p	4,051	miR-6766-3p	-1,20	miR-623	-2,24
miR-23b-3p	2,577	miR-6849-5p	4,061	miR-6879-5p	-1,20	miR-550a-3-5p	-2,51
miR-20b-5p	2,588	miR-17-5p	4,081	miR-6813-3p	-1,21	miR-3679-3p	-2,69

miR-181a-5p	2,592	miR-211-3p	4,126	miR-191-3p	-1,21
miR-424-5p	2,605	miR-4463	4,178	miR-766-3p	-1,21
miR-4667-5p	2,639	miR-107	4,249	miR-4725-5p	-1,23
miR-188-5p	2,654	miR-29b-3p	4,286	miR-6889-3p	-1,24
miR-6075	2,675	miR-19a-3p	4,305	miR-4749-3p	-1,25
miR-30c-5p	2,685	miR-142-5p	4,337	miR-6865-3p	-1,25
miR-3940-5p	2,694	miR-4433a-3p	4,378	miR-933	-1,25
miR-4689	2,712	miR-3195	4,485	miR-6508-5p	-1,25
miR-8060	2,730	miR-22-3p	4,487	miR-425-3p	-1,26
miR-548q	2,746	miR-451a	4,539	miR-6515-3p	-1,27
miR-6824-5p	2,746	miR-29c-3p	4,544	miR-1238-3p	-1,27
miR-1183	2,751	miR-23a-3p	4,564	miR-129-2-3p	-1,28
miR-6788-5p	2,756	miR-134-5p	4,613	miR-1825	-1,28
miR-4716-3p	2,798	miR-199a-3p	4,736		
miR-345-3p	2,803	miR-130a-3p	4,782		
miR-6756-3p	2,806	miR-15a-5p	5,175		
miR-4534	2,807	miR-26b-5p	5,243		
miR-6833-5p	2,807	miR-20a-5p	5,286		
miR-342-3p	2,809	miR-103a-3p	5,380		
miR-199a-5p	2,852	miR-29a-3p	5,422		
miR-6779-5p	2,861	miR-27a-3p	5,449		
miR-1236-5p	2,880	miR-24-3p	5,501		
miR-4743-5p	2,887	miR-126-3p	5,609		
miR-8089	2,913	miR-26a-5p	5,638		
miR-425-5p	2,929	miR-19b-3p	5,805		

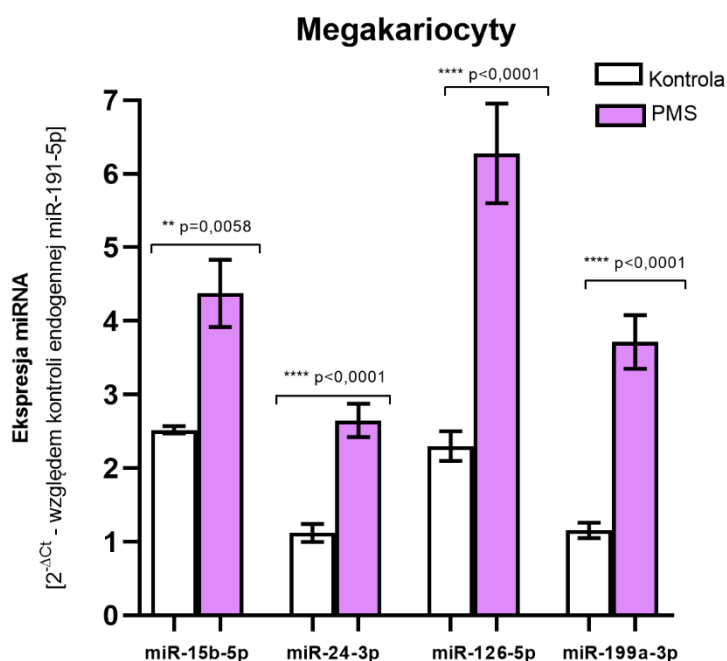
#### **4.4.2. Walidacja wyników mikromacierzy metodą qPCR**

Spośród miRNA wykazujących w metodzie mikromacierzy istotnie zmienioną ekspresję w grupie pacjentów z PMS względem grupy kontrolnej, wyselekcjonowano te cząsteczki, które zgodnie z danymi literaturowymi, są zaangażowane w regulację genów odpowiedzialnych za główne szlaki aktywacji i istotne funkcje hemostatyczne płytek krwi. Dla wytypowanych cząsteczek miRNA została przeprowadzona walidacja wyników przy użyciu metody qPCR. Względny poziom ekspresji (w odniesieniu do kontroli endogennej – miR-191-5p) oznaczono dla: miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p oraz miR-199a-3p. Do obliczeń wartości względnej ekspresji miRNA wykorzystano metodę porównań cykli progowych (Ct) stosując formułę pojedynczej delty  $2^{-\Delta Ct}$ . Określono różnicę pomiędzy średnią wartością  $2^{-\Delta Ct}$  obliczoną dla grupy badanej i grupy kontrolnej i na tej podstawie wyliczono parametr krotności zmian.

Pomiar metodą qPCR wykazał istotny statystycznie spadek ekspresji wytypowanych miRNA w płytkach krwi w PMS w odniesieniu do kontroli, tj.: około 1,5-krotny dla 24-3p ( $p < 0,05$ ), 2-krotny dla miR-15b-5p ( $p < 0,01$ ) i miR-126-5p ( $p < 0,01$ ) oraz 3-krotny dla miR-199a-3p ( $p < 0,0001$ ) (**Ryc. 31 oraz Tab. 57**). Wyniki dla ekspresji tych samych miRNA w megakariocytach również wykazały istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami, przy czym odnotowano wzrost ekspresji tych miRNA w PMS względem kontroli: około 2-krotny dla miR-15b-5p ( $p < 0,01$ ), 2,5-krotny dla miR-24-3p ( $p < 0,0001$ ) oraz 3-krotny dla miR-126-5p ( $p < 0,0001$ ) i miR-199a-3p ( $p < 0,0001$ ) (**Ryc. 32 oraz Tab. 58**).



**Rycina 31.** Ekspresja miRNA (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p, miR-199a-3p) mierzona metodą qPCR w płytkach krwi w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według endogennej kontroli – miR-191-5p). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001.



**Rycina 32.** Ekspresja miRNA (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p, miR-199a-3p) mierzona metodą qPCR w megakariocytach w grupie pacjentów z PMS (n = 45) oraz w grupie kontrolnej (n = 45). Wyniki wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według endogennej kontroli – miR-191-5p). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya, \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001.

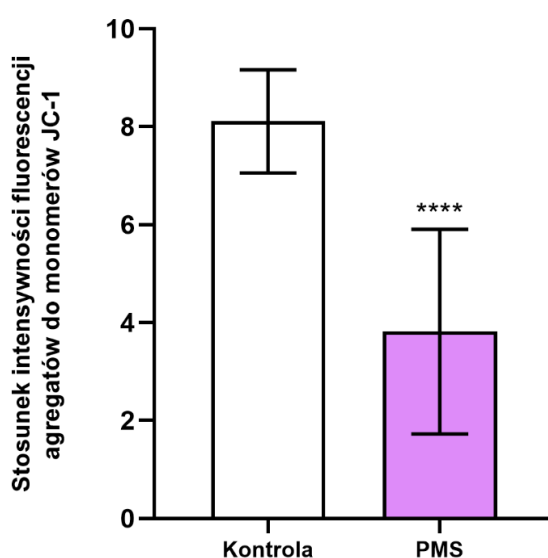
## 4.5. Ocena funkcjonalności mitochondriów w płytkach krwi

### 4.5.1. Ocena potencjału błony mitochondrialnej płytek krwi z zastosowaniem sondy JC-1

MMP generowany przez pompy protonowe (kompleksy I, III i IV) jest podstawowym elementem procesu magazynowania energii podczas fosforylacji oksydacyjnej. Dysfunkcja mitochondriów jest jednym z najczęściej pojawiających się procesów patologicznych w etiologii zaburzeń neurologicznych.

W celu identyfikacji potencjalnych zmian MMP w mitochondriach płytek krwi pochodzących od pacjentów z PMS oraz grupy kontrolnej wykorzystano fluorescencyjne znakowanie komórek sondą JC1. Cząsteczki tego barwnika tworzą agregaty w komórkach posiadających nieuszkodzone mitochondria o wysokim potencjale elektrycznym błony. W przypadku depolaryzacji mitochondriów JC-1 pozostaje w formie monomerów. Spadek zagregowanej postaci barwnika JC-1 wskazuje na depolaryzację oraz na wzrost przepuszczalność błony mitochondrialnej, który wywołany jest głównie nadprodukcją RFT, powodując ostatecznie rozproszenie potencjału mitochondrialnego i przerwanie ciągłości mitochondrialnej błony zewnętrznej. Stosunek emisji fluorescencji agregatów ( $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ ) i monomerów ( $\lambda_{em} = 538 \text{ nm}$ ) wyrażony jako  $590 \text{ nm}/538 \text{ nm}$  określa poziom uszkodzenia błony mitochondriów badanych komórek.

Uzyskane wyniki wskazują na ponad 1,5-krotnie niższy ( $p < 0,0001$ ) stosunek ilości agregatów do monomerów barwnika JC-1 w płytkach krwi pacjentów z PMS w porównaniu z grupą kontrolną (**Ryc. 33**).



**Rycina 33.** Poziom uszkodzenia błony mitochondriów w płytkach krwi w grupie pacjentów z PMS ( $n = 30$ ) oraz w grupie kontrolnej ( $n = 30$ ). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wynik wyrażono jako średnią wartość stosunku emisji fluorescencji agregatów do monomerów ( $590 \text{ nm}/538 \text{ nm}$ ) JC-1  $\pm$  SD, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

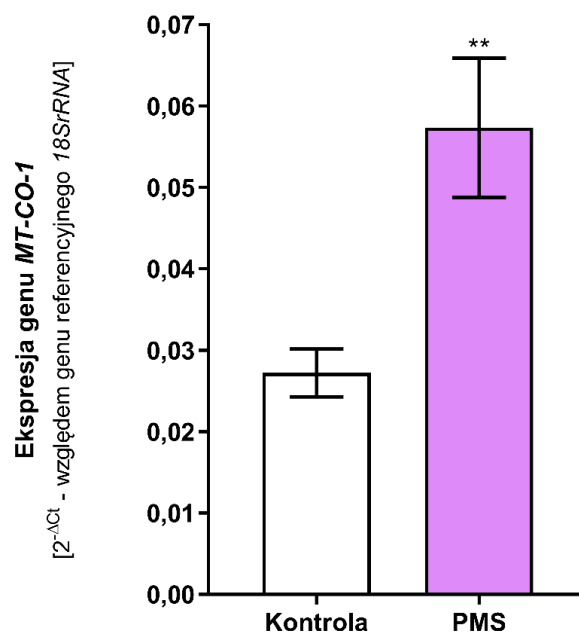
#### 4.5.2. Pomiar ekspresji mRNA dla genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu tlenowego w płytkach krwi metodą qPCR

Mitochondria odgrywają kluczową rolę w metabolizmie pozbawionych jądra płytek krwi, dlatego ich dysfunkcja przyczynia się do zaburzonej aktywności płytek oraz do apoptozy. W trakcie aktywacji płytek krwi metabolizm tlenowy w komórce przyspiesza w celu wytworzenia dodatkowej puli metabolicznego ATP koniecznego dla utrzymania zmiany kształtu, przebiegu agregacji i procesu degranulacji. To przyrostowe zużycie energii jest jednym z głównych wyznaczników funkcjonowania płytek krwi. Nadmierna aktywacja płytek krwi idzie w parze ze wzmożonym zapotrzebowaniem energetycznym.

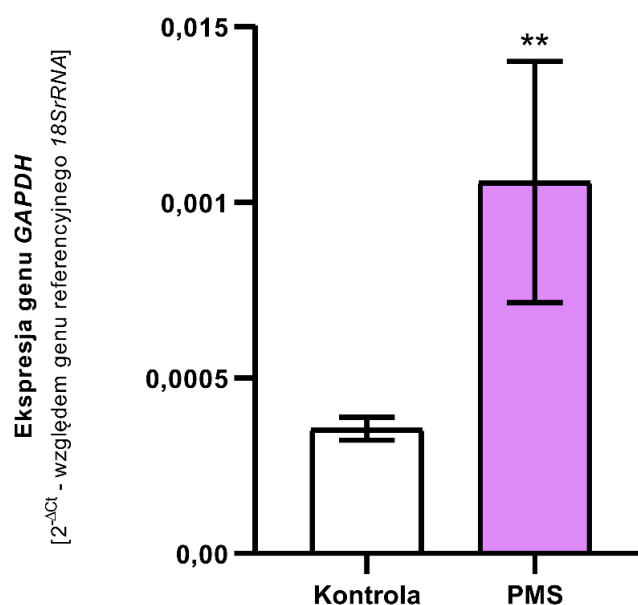
Do kluczowych enzymów komórkowych zaangażowanych w metabolizm tlenowy zalicza się m.in. oksydazę cytochromu c (kompleks IV) oraz dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*, GAPDH), które uznane są za wewnątrzkomórkowe czujnik stresu oksydacyjnego. Oksydaza cytochromu c jest ostatnim enzymem łańcucha transportu elektronów w procesie fosforylacji oksydacyjnej, kodowanym przez mitochondrialny gen *MTCO-1*, zaś GAPDH to wielofunkcyjne białko, kodowane przez gen *GAPDH*, które oprócz podstawowej funkcji enzymatycznej w procesie glikolizy, odpowiedzialne jest m.in. za transkrypcyjną oraz potranskrypcyjną regulację genów. Intensywny wzrost stężenia rodników tlenowych powstałych przez wadliwe funkcjonowanie kompleksów łańcucha oddechowego, jak również patologiczne nagromadzenie agregatów GAPDH skutkuje nieodwracalnym uszkodzeniem mitochondriów oraz wpływa na uwolnienie mediatorów apoptotycznych.

W celu weryfikacji potencjalnych zaburzeń w ekspresji genów *MTCO-1* i *GAPDH* wykonano pomiar ich względnej ekspresji metodą qPCR, stosując jako gen referencyjny *18S rRNA*. Do obliczeń wartości względnej ekspresji wykorzystano metodę porównań cykli progowych (Ct) stosując formułę pojedynczej delty  $2^{-\Delta Ct}$ .

Pomiar względnej ekspresji mRNA dla genu *MTCO1* w płytkach krwi wykazał ponad 2-krotny ( $p < 0,01$ ) wzrost poziomu analizowanych transkryptów w PMS w porównaniu do grupy kontrolnej (**Ryc. 34**). Analiza względnej ekspresji mRNA dla genu *GAPDH* wykazała około 3-krotny ( $p < 0,01$ ) wzrost poziomu badanych transkryptów w PMS w stosunku do grupy kontrolnej (**Ryc. 35**).



**Rycina 34.** Ekspresja genu *MTCO-1* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi w grupie pacjentów z PMS (n = 55) oraz w grupie kontrolnej (n = 55). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wynik wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*), \*\*p < 0,01.



**Rycina 35.** Ekspresja genu *GAPDH* (mierzona na poziomie mRNA) w płytkach krwi w grupie pacjentów z PMS (n = 55) oraz w grupie kontrolnej (n = 55). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wynik wyrażono jako średnią wartość  $2^{-\Delta Ct} \pm SD$  (według genu referencyjnego – *18SrRNA*), \*\*p < 0,01.

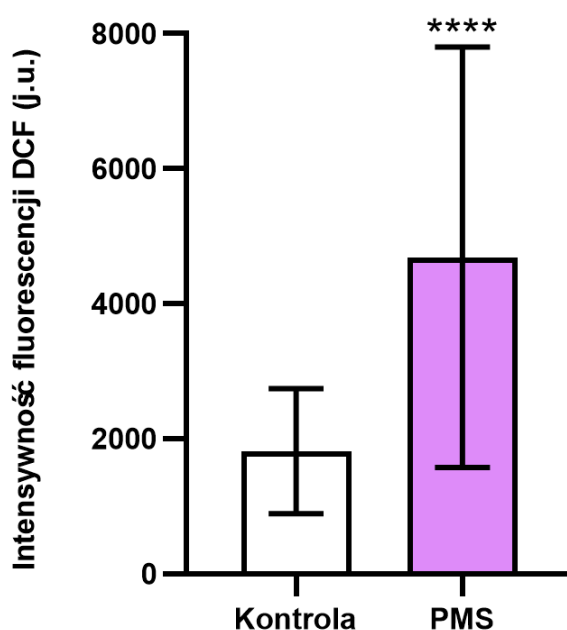


#### 4.5.3. Oznaczenie poziomu RFT w płytkach krwi z zastosowaniem sondy H<sub>2</sub>DCF-DA

Płytki krwi, podobnie jak inne komórki, w wyniku ich fizjologicznego metabolizmu mogą wytwarzać RFT, które następnie uczestniczą w mechanizmach aktywacji tych komórek. Udział płytek krwi w procesach demielinizacyjnych prowadzących do neurodegeneracji w OUN może obejmować promowanie procesów patologicznych takich jak stan zapalny i generowanie RFT.

W celu oznaczenia poziomu RFT powstających w płytkach krwi przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem wskaźnika fluorescencyjnego DCF. Poziom emisji fluorescencji DCF jest wprost proporcjonalny do poziomu wewnątrzkomórkowego stężenia RFT, takich jak nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) czy rodnik hydroksylowy (OH<sup>•</sup>), które utleniają sondę H<sub>2</sub>DCF-DA do jej wysoce fluorescencyjnej formy DCF. Intensywność fluorescencji powstającej DCF jest miarą poziomu wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego.

W przypadku użycia sondy H<sub>2</sub>DCF-DA w płytkach krwi, zaobserwowano ponad 2,5-krotnie wyższą średnią wartość wewnątrzkomórkowego poziomu RFT w grupie badanej, w odniesieniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ) (**Ryc. 36**), co świadczy o wzmożonej produkcji RFT w płytkach krwi pacjentów z PMS.



**Rycina 36.** Poziom RFT w płytkach krwi w grupie pacjentów z PMS ( $n = 30$ ) oraz w grupie kontrolnej ( $n = 30$ ). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu testu U-Manna Whitneya. Wyniki wyrażono jako średnią intensywność fluorescencji sondy DCF  $\pm$  SD (j.u. – jednostka umowna), \*\*\*\* $p < 0,001$ .

## 5. DYSKUSJA

---

MS jest chorobą zapalną OUN, która charakteryzuje się zróżnicowanym przebiegiem klinicznym, zależnym od natężenia rzutów choroby, czasu progresji oraz stopnia niepełnosprawności [267]. Badania nad etiologią MS prowadzone są od wielu lat, natomiast z uwagi na różnorodny przebieg schorzenia, w tym trudny do zdiagnozowania początek choroby, nadal nie są jednoznacznie określone czynniki jej patogenezy. Niemniej jednak uważa się, że kluczowym etapem stanowiącym mechanizm spustowy dla rozwoju MS jest przerwanie ciągłości BBB związane z masywną migracją leukocytów z krążenia obwodowego, co w konsekwencji powoduje miejscowe nagromadzenie mediatorów pro-zapalnych i nasila proces demielinizacji w OUN [268]. Rekrutacja leukocytów wspierana jest przez aktywne płytki krwi, które dzięki obecności licznych receptorów powierzchniowych są zdolne do oddziaływania z komórkami układu immunologicznego oraz indukowania zapalnego fenotypu w komórkach śródbłonna. Zaburzenia hemostazy naczyniowej stanowią jeden z kluczowych elementów patogenezy MS, a bezpośredni udział płytek krwi w promowaniu reakcji zapalnych i procesach neurodegeneracyjnych został już dawno zauważony [269]. Wykazano, że aktywne płytki krwi, licznie występujące w zmianach demielinizacyjnych, są nie tylko zaangażowane w procesy zapalne w mysim modelu EAE [270], ale również promują rozwój uszkodzenia istoty szarej w rdzeniu kręgowym u człowieka [271]. Ponadto, badania epidemiologiczne dowodzą, że incydenty niedokrwienne związane z nadaktywacją płytek krwi, takie jak udar niedokrwienny mózgu czy zawał mięśnia sercowego, są skorelowane ze zwiększoną śmiertelnością wśród pacjentów z MS, zwłaszcza u osób w przewlekłej fazie choroby (PMS) [231, 272, 273]. Stwierdzono, że choroby sercowo-naczyniowe stanowią główną przyczynę przedwczesnych zgonów pacjentów z MS, a ryzyko śmierci z powodu incydentów niedokrwiennych jest o 30% większe, w porównaniu do populacji generalnej. Przyczyniać się do tego może zmiana stylu życia związana z pogłębiającą się niepełnosprawnością wymuszającą ograniczenia ruchowe, a także długotrwałe stosowanie terapii farmakologicznej modyfikującej przebieg MS [229].

Płytki krwi stanowią podstawowy element układu hemostatycznego, jednakże w ostatnim czasie zwrócono szczególną uwagę na ich istotną aktywność pro-zapalną poprzez oddziaływanie z elementami układu odpornościowego oraz na ich udział w chorobach autoimmunologicznych [274]. Udowodniona została wzmożona aktywność płytek krwi w MS, głównie w badaniach dotyczących ostrej fazy choroby (RRMS) [223, 275]. Niemniej jednak nadal brak jest danych odnoszących się do przyczyny obserwowanej nadaktywacji

płytek krwi w MS. Poznanie podłoża zmian czynnościowych płytek krwi w MS może mieć bardzo istotne znaczenie nie tylko dla prewencji incydentów niedokrwienych, ale może znacząco przyczynić się do poznania czynników patogenezy MS, gdyż udział płytek krwi w permeabilizacji BBB jest ściśle zależny od ich wzmożonej aktywności.

Celem prezentowanej pracy było poznanie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw wzmożonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi występującej u pacjentów z PMS, u których odnotowuje się wysokie ryzyko chorób sercowo-naczyniowych, w tym incydentów niedokrwienych bezpośrednio związanych z nadmiernym pobudzeniem płytek krwi.

Pierwszym etapem badań była porównawcza analiza cytometryczna oceniająca stan czynnościowy płytek krwi w PMS w odniesieniu do płytek prawidłowych, poprzez określenie stopnia aktywności płytek w krążeniu, na podstawie analizy *ex vivo* parametrów ich aktywacji. Poziom typowych markerów aktywacji płytek oceniano w krwi pełnej bezpośrednio po pobraniu, starając się odzwierciedlić faktyczny stan aktywacji krążących płytek krwi. Uzyskane wyniki przemawiają za istotnie wyższym potencjałem pro-zakrzepowym płytek krwi w PMS, który w porównaniu do kontroli, manifestuje się wzmożoną produkcją PMPs stanowiących marker aktywacji, jak i rozpadu płytek na skutek ich tzw. zużycia w krążeniu (Ryc. 9), jak również zwiększonym poziomem spontanicznej agregacji tych komórek (Ryc. 10). Co więcej, wytwarzane PMPs stanowią bogaty rezerwuar aktywnych biologicznie związków o potencjale pro-zakrzepowym i pro-zapalnym [170, 276]. PMPs wykazują szerokie spektrum nie tylko substancji bioaktywnych, ale także czynnych receptorów pochodzących z płytek krwi [277]. Ponadto, powierzchnia PMPs stanowi miejsce odkładania się kompleksów dopełniacza, które mogą przyciągać i aktywować leukocyty poprzez interakcję z ich receptorami [278]. Wśród białek płytkowych zawartych w PMPs znajdują się metaloproteinazy macierzy (ang. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs), które należą do głównych czynników uszkodzających BBB (zwłaszcza MMP-2 i MMP-9), umożliwiając migrację białych krwinek do OUN, co może mieć poważne konsekwencje dla dalszego rozwoju miejscowej odpowiedzi neurozapalnej i demielinizacji w MS [279], jak również dla uszkodzenia naczyń krwionośnych prowadzącego do rozwoju incydentów niedokrwienych [280, 281]. Uzyskane wyniki wskazują zatem na pro-zakrzepowy fenotyp płytek krwi w PMS, ponadto mogą świadczyć o ich chronicznej aktywacji w krążeniu, co z kolei może promować występowanie incydentów niedokrwienych *in vivo* [282-284]. Poziom spontanicznej aktywacji płytek krwi oznaczono także poprzez pomiar powierzchniowej ekspresji P-selektyny (CD62P) stanowiącej uznany marker monitorowania stanu czynnościowego płytek krwi *in vivo* [285]. CD62P jest wewnątrzkomórkowym białkiem

obecnym w błonie  $\alpha$ -ziarnistości spoczynkowych płytek krwi, które w wyniku aktywacji tych komórek ulega translokacji do błony powierzchniowej, jednocześnie umożliwiając interakcję pobudzonych płytek krwi z leukocytami, przy udziale liganda PSGL-1 znajdującego się głównie na powierzchni neutrofilii i monocytów [286]. Na podstawie analizy przeprowadzonej w krwi pełnej metodą cytometrii przepływową wykazano, że poziom powierzchniowej ekspresji CD62P na płytkach krwi pacjentów z PMS jest wyższy w stosunku do płytek kontrolnych (Ryc. 11) i co za tym idzie, odsetek powstających PLCs jest około 2-krotnie wyższy u pacjentów z PMS (Ryc. 12). Uzyskane wyniki są ważne z punktu widzenia płytkowo-leukocytarnego „cross talk” prowadzącego do wzajemnego aktywowania wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Płytki krwi są kluczowym elementem komórkowym pośredniczącym w adhezji krążących limfocytów do śródbłonka, co zapewnia ich rekrutację, inicjuje diapedezę i infiltrację limfocytów T-reaktywnych w głąb ściany uszkodzonego naczynia, co ma poważne konsekwencje dla przerwania ciągłości BBB i dalszego rozwoju miejscowej odpowiedzi neurozapalnej i tworzenia plak demielinizacyjnych [287]. Dostępne dotychczas dane literaturowe, które wskazują na zwiększone właściwości homo- i heteroagregacyjne płytek krwi, wzmożoną ekspresję P-selektyny oraz istotny wzrost PMPs odnoszą się wyłącznie do wczesnej fazy RRMS [223]. Podobne doniesienia dotyczą choroby Alzheimera [288], a także chorób autoimmunologicznych, w tym reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) oraz toczenia rumieniowatego układowego (ang. *Systemic Lupus Erythematosus*, SLE), w których zwiększony poziom markerów aktywacji płytek krwi był skorelowany z aktywnością choroby [289-291].

Poza oceną aktywacji spontanicznej, drugim parametrem określającym kondycję płytek *in vivo* jest tzw. reaktywność, czyli zdolność płytek do reagowania na działanie bodźca zewnętrznego. Płytki krwi posiadają na swojej powierzchni liczne receptory, dzięki którym są wrażliwe na wiele substancji znajdujących się w krążeniu, które powodują ich aktywację. Dla powstrzymania incydentów niedokrwienych zależnych od płytek krwi podstawowym celem farmakoterapii są receptory płytkowe uczestniczące w ich aktywacji: głównie P2Y<sub>12</sub> i GPIIb/IIIa oraz PAR-1. P2Y<sub>12</sub> jest kluczowym receptorem dla ADP, który wzmacnia odpowiedź płytek krwi indukowaną przez innych agonistów [292, 293]. ADP-zależna aktywacja receptora P2Y<sub>12</sub>, odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji receptora GPIIb/IIIa bezpośrednio uczestniczącego w formowaniu pierwotnego czopu płytkowego. Udowodniono, że myszy pozbawione P2Y<sub>12</sub> wykazują zmniejszoną aktywację GPIIb/IIIa prowadzącą do ograniczenia agregacji i adhezji płytek [42]. Ponadto, nieodwracalna agregacja płytek krwi za pośrednictwem receptorów dla trombiny PAR-1 oraz PAR-4 jest w dużej mierze zależna od

stymulacji szlaku P2Y<sub>12</sub>/ADP [294, 295]. W niniejszej pracy przeprowadzona została analiza porównawcza odpowiedzi płytek krwi na działanie ADP (20 μM), która wykazała zwiększoną reaktywność płytek u pacjentów z PMS w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 9-11). Uzyskane wyniki zostały potwierdzone cytometrycznym testem diagnostycznym, który oparty jest na ocenie poziomu fosforylacji białek VASP. Fosforylacja VASP ujemnie koreluje ze stopniem aktywacji płytek krwi w szlaku, w którym pośredniczy receptor P2Y<sub>12</sub>. VASP bierze udział w reorganizacji cytoszkieletu, adhezji i agregacji płytek krwi. Fosforylacja białek VASP przez PKA i PKG w pozycji Ser<sup>157</sup> koreluje z obniżoną aktywnością receptora GPIIb/IIIa i zwiększonym stopniem hamowania agregacji płytek [296]. Ponadto, fosforylacja VASP w pozycjach Ser<sup>153</sup> i Ser<sup>235</sup> hamuje proces polimeryzacji włókien aktyny przez blokowanie prawidłowego formowania się filamentów aktynowych [297]. Aktywacja P2Y<sub>12</sub> przez ADP wpływa na zahamowanie wytwarzania cAMP, co powoduje zmniejszenie poziomu fosforylacji białek VASP. Można zatem uznać, że stan fosforylacji VASP jest specyficznym wewnątrzkomórkowym markerem reaktywności receptora P2Y<sub>12</sub>, ponieważ niski poziom ufosforylowanej formy VASP jest skorelowany ze zwiększoną aktywnością receptora P2Y<sub>12</sub> [298]. Analiza cytometryczna wykazała, że wskaźnik reaktywności płytek (PRI) osiągnął prawie maksymalny poziom (99,1 ± 2%) we wszystkich próbkach od pacjentów z PMS, podczas gdy średnia reaktywność płytek kontrolnych była o około 20% niższa (Ryc. 19). W celu analizy molekularnego podłoża wzmożonej reaktywności płytek względem ADP na drodze zależnej od P2Y<sub>12</sub>, przeprowadzono badania poziomu ekspresji mRNA dla P2Y<sub>12</sub> oraz stężenia białka tego receptora. Uzyskane wyniki wykazały znacznie wyższą ekspresję mRNA dla genu *P2RY12* zarówno w płytkach krwi, jak i megakariocytach pacjentów z PMS (Ryc. 16), co znalazło również odzwierciedlenie w zwiększonej liczbie kopii tego receptora (Ryc. 13). ADP uznany jest za agonistę płytek krwi, który odgrywa większą rolę w ich wtórnej aktywacji indukowanej pierwotnie przez innych agonistów, ponieważ sam indukuje jedynie zmianę kształtu towarzyszącą adhezji oraz odwracalną agregację, nie jest natomiast w stanie wywołać pełnej degranulacji oraz stabilnej agregacji [299]. Nie zmienia to faktu, że ADP jest jednym z głównych agonistów płytek krwi. Działając synergistycznie z trombiną, ADP jest podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za tworzenie czopu płytkowego, który prowadzi do okluzji naczynia krwionośnego [300]. Szlak sygnałowy poprzez trombinowy receptor PAR-1 jest w dużej mierze zależny od szlaku P2Y<sub>12</sub>/Gi indukowanego przez ADP. Co więcej, aktywacja receptora PAR-1 jest odpowiedzialna za zwiększoną ekspresję mRNA dla P2Y<sub>12</sub>, jak również wzrost całkowitego stężenia białka komórkowego receptora P2Y<sub>12</sub> oraz jego

powierzchniową ekspresję w wyniku ekspozycji komórki na trombinę [301]. Koncentrując się na molekularnych aspektach zwiększonej aktywacji płytek zależnej od szlaku ADP/P2Y<sub>12</sub> w prowadzonych badaniach wzięto także pod uwagę zależność między ekspresją mRNA dla P2RY<sub>12</sub> a poziomem aktywacji płytek krwi na szlaku zależnym od PAR-1.

PAR-1 jest bardzo czułym receptorem, niezbędnym do szybkiej i silnej odpowiedzi płytek krwi, ponieważ PAR-1 jest doskonałym substratem dla trombiny, którego sekwencja jest podobna do hirudyny, dzięki czemu ściśle wiąże się z miejscem zewnętrznym w cząsteczce tej proteazy [302]. Trombina jest najsilniejszym fizjologicznym agonistą płytek krwi, który wpływa na różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. U człowieka działa na płytki krwi za pośrednictwem receptorów PAR-1 oraz PAR-4. PAR-4 tworzy dimery z receptorem P2Y<sub>12</sub> poprzez aktywację szlaku P2Y<sub>12</sub>/PI3K, powodując wzrost stabilizacji powstałego skrzepu płytkowego [303, 304]. Przy czym fizjologiczne znaczenie PAR-4 jest istotne głównie wtedy gdy funkcja PAR-1 jest zaburzona. Bowiem, w przeciwieństwie do PAR-1, PAR-4 pośredniczy w aktywacji płytek krwi tylko przy wysokich stężeniach trombiny, i w tych warunkach sygnalizacja PAR-4 wydaje się być niepotrzebna do aktywacji płytek krwi, jeśli funkcja PAR-1 jest prawidłowa [305]. Biorąc pod uwagę kluczową rolę, jaką trombina odgrywa w rozwoju zakrzepicy zarówno żyłnej jak i tętniczej, w przedstawionej pracy podjęto badania w celu określenia potencjalnych zmian czynnościowych oraz molekularnych w szlaku trombina/PAR-1, jako przyczyny zwiększonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi w PMS. Jako agonistę receptora PAR-1 zastosowano TRAP tj. syntetyczny peptyd aktywujący receptor dla trombiny, o sekwencji aminokwasowej: SFLLRNSFLLRNPNDKYEPF, który selektywnie oddziałuje z PAR-1 [46]. TRAP umożliwia aktywację PAR-1 niezależnie od trombiny i jest uważany za pełnego agonistę tego receptora. Zastosowanie TRAP pozwoliło na ocenę poziomu reaktywności płytek w krwi pełnej bez konieczności ich izolowania, gdyż wyeliminowało wykrzepianie fibryny, do którego dochodzi w wyniku działania trombiny w osoczu [306]. Zastosowanie TRAP jako zewnętrznego agonisty miało na celu zweryfikowanie funkcjonalności szlaku sygnałowego zależnego od PAR-1 poprzez określenie reaktywności płytek krwi *ex vivo* w ich środowisku fizjologicznym. Indukcja PAR-1 uruchamia wewnątrzpłytkowy szlak aktywacji, który powoduje intensywną translokację i ekspozycję powierzchniową P-selektyny, co stanowi główny element pośredniczący w tworzeniu PLCs [307]. Na podstawie pomiaru metodą cytometrii przepływowej wykazano, że po stymulacji z użyciem TRAP poziom powierzchniowej P-selektyny w płytkach od pacjentów z PMS wzrasta 6-krotnie w porównaniu do kontroli (Ryc. 11), a odsetek PLCs zarejestrowanych w krwi pacjentów z PMS jest 2-krotnie wyższy

niż w kontroli (Ryc. 12). Przyrost poziomu markerów aktywacji płytek mierzonych metodą cytometrii przepływową, takich jak wielkość subpopulacji PMPs oraz odsetek AGs, odnotowany w wyniku działania TRAP był również większy w przypadku pacjentów z PMS w stosunku do kontroli (Ryc. 9 i Ryc. 10). Jest to szczególnie godne uwagi, że pomimo podwyższonego wyjściowego poziomu markerów aktywacji płytek w PMS komórki te nadal zachowują znaczącą reaktywność, co świadczy o ich silnym potencjale pro-zakrzepowym. Tworzenie homo- i hetero-agregatów oraz generowanie znacznych ilości PMPs ma istotne znaczenie we wzmacnianiu kaskady krzepnięcia. Jednak duże ilości PMPs wytwarzanych w stanach zapalnych mogą także wpływać na odpowiedź immunologiczną [308]. PMPs są generowane w odpowiedzi na działanie kilku silnych agonistów płytek krwi, w tym trombiny [309], ale indywidualna zdolność PAR-1 i PAR-4 do indukowania tworzenia PMPs nie została dotychczas zbadana. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy wskazują na zwiększoną reaktywność płytek krwi pacjentów z PMS zależną od aktywacji receptora PAR-1. W celu określenia molekularnego podłoża ujawnionych zmian fenotypowych przeprowadzono analizę porównawczą poziomu ekspresji PAR-1, która obejmowała ocenę zmian na poziomie zarówno produktu białkowego, jak i mRNA w płytkach krwi oraz w megakariocytach. W badaniach tych po raz pierwszy wykazano, że płytkowa ekspresja PAR-1 (cząsteczek białka oraz transkryptów dla genu *F2R*) jest zwiększona u pacjentów z PMS (Ryc. 14 i Ryc. 17), co może tłumaczyć wzmożoną aktywność szlaku sygnałowego trombina/PAR-1, prowadzącą w konsekwencji do pro-zakrzepowego potencjału płytek krwi w PMS.

Chroniczny stan zapalny w obrębie warstwy śródbłonna sprzyja rozwojowi miażdżycy. W ostatnich latach zwrócono uwagę na stężenie biomarkerów miażdżycy, jako parametru analizowanego u pacjentów z PMS pod kątem ryzyka wystąpienia incydentów niedokrwienych, a także, co ciekawe, rozwoju zmian neurodegeneracyjnych. Z tego względu w prezentowanej pracy wykonano pomiar ekspresji biomarkerów miażdżycy – ApoA1 oraz  $\alpha$ 2M w płytkach krwi i megakariocytach w PMS i w grupie kontrolnej. Wyniki wykazały obniżenie względnej ekspresji transkryptów mRNA dla genu *APOA1* zarówno w płytkach krwi, jak i w megakariocytach w PMS w porównaniu z kontrolą (Ryc. 20). Badania epidemiologiczne wskazują, że obniżony poziom ApoA1 ma konsekwencje pro-miażdżycowe [310-312]. Niska ekspresja ApoA1 stanowi marker ryzyka chorób układu krążenia, zwłaszcza jeśli towarzyszy jej pro-zakrzepowy fenotyp płytek krwi. W przeprowadzonych badaniach wykazano ujemną korelację między względną ekspresją genu *APOA1* a parametrami określającymi stan czynnościowy płytek krwi spoczynkowych oraz ich reaktywność indukowaną przez TRAP,

a także pomiędzy ekspresją PAR-1 na poziomie mRNA i białka (Tab. 31). Uzyskane wyniki uzupełniają nagromadzone dotychczas dowody na to, że zmiany w biomarkerach szlaku cholesterolu są związane z progresją późnej fazy przebiegu PMS. Murali i wsp. wykazali względny spadek poziomu ApoA1 u pacjentów przechodzących w fazę PMS, w stosunku do poziomu podstawowego ApoA1, jaki odnotowano u pacjentów w fazie RRMS, co było istotnie związane z większą liczbą nowych zmian demielinizacyjnych i utratą istoty szarej w PMS [313]. Neuroprotektoryjne właściwości ApoA1 zostały potwierdzone w kilku innych niedawnych badaniach, które dostarczyły nowych dowodów na to, że wyższy poziom ApoA1 jest istotnie skorelowany z lepszą perfuzją mózgową u pacjentów z MS oraz mniejszym zanikiem kory mózgowej, po uwzględnieniu poziomu neurofilamentów w surowicy jako markera neurodegeneracji [314-316]. Drugim ważnym biomarkerem miażdżycy analizowanym w tej pracy była  $\alpha 2M$ , która wytwarzana jest głównie przez komórki wątroby, ale jest także syntetyzowana lokalnie przez komórki krwi, w tym również przez płytki krwi. Funkcja  $\alpha 2M$  we krwi związana jest z regulacją układu immunologicznego, kontrolą układu krzepnięcia oraz hamowaniem fibrylizacji [317].  $\alpha 2M$  jest bardzo obficie występującym białkiem surowicy biorącym udział w rozwoju miażdżycy [318]. Ekspresja genu *A2M* istotnie warunkuje stopień ciężkości i rozległość zmian miażdżycowych [319] i w związku z tym uważa się, że  $\alpha 2M$  może być potencjalnym markerem prognozowania i diagnostyki incydentów niedokrwiennych [320]. Przeprowadzona w pracy analiza metodą qPCR wykazała znacząco zwiększoną względną ekspresję transkryptów mRNA dla genu *A2M* zarówno w płytkach krwi, jak i megakariocytach od pacjentów z PMS w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 21). Odkrycie to wydaje się szczególnie ważne ze względu na dodatnie korelacje ekspresji *A2M* z parametrami aktywacji płytek krwi spoczynkowych oraz stymulowanych na drodze receptora PAR-1 uczestniczącego w trombinowej aktywacji płytek krwi, jak również z samą ekspresją PAR-1 na poziomie mRNA i białka (Tab. 31).

Aktywacji płytek krwi towarzyszy ekspozycja dużej liczby receptorów powierzchniowych, w tym głównego receptora integrynowego GPIIb/IIIa dla fibrynogenu, często wykorzystywanego jako marker aktywacji płytek. Spośród wielu receptorów płytek krwi to kompleks GPIIb/IIIa jest podstawowym mediatorem homo-agregacji płytek zachodzącej przy udziale dimerycznych cząsteczek fibrynogenu, a poprzez połączenie z leukocytarnym kompleksem integrynowym CD11b/CD18 (MAC-1) pełni rolę stabilizującą podczas formowania się PLCs [321]. Podjednostki GPIIb/IIIa stanowią antygeny różnicujące, charakterystyczne dla płytek krwi oraz megakariocytów. Badanie obrazowania mózgu wraz ze



znakowaniem z użyciem przeciwciał specyficznych dla aktywnej formy receptora GPIIb/IIIa wykazało obecność pobudzonych płytek krwi w mózgu ze stanem zapalnym w modelu zwierzęcym. Sugeruje to możliwość zastosowania cząsteczek receptora GPIIb/IIIa związanych z płytkami krwi do celów diagnostycznych w stanach zapalnych układu nerwowego [322]. Natomiast Lock i wsp. na podstawie wyników analizy mikromacierzy ludzkich aktywnych plak demielinizacyjnych w MS, wykazali podwyższony poziom mRNA dla genu *ITGA2B* kodującego podjednostkę integrynową GPIIb, co potwierdza udział płytek krwi w patogenezie neurozapalenia [225]. Również Döring i wsp. poprzez identyfikację cząsteczek P-selektyny oraz GPIIb wykazali obecność aktywnych płytek krwi w zmianach zapalnych w OUN w zwierzęcym modelu EAE [323]. Co więcej, Langer i wsp. zaobserwowali, że zablokowanie receptora GPIIb/IIIa powodowało złagodzenie objawów w przebiegu mysiego modelu EAE. Podobne efekty hamowania procesu zapalnego dawało też obniżenie liczby płytek krwi. Zaobserwowano zahamowanie postępu choroby, w tym obniżenie demielinizacji i uszkodzenia aksonów. Natomiast nie odnotowano wpływu na proces immunizacji w EAE, co świadczy o udziale płytek krwi w procesach neurozapalnych, gdzie promowanie reakcji zapalnej jest zależne od cross-talk płytka-leukocyt oraz adhezji i agregacji płytek w obrębie ściany naczynia krwionośnego [226, 227]. Oznacza to, że płytki krwi istotnie przyczyniają się do postępu EAE, a tym samym potencjalnie do progresji ludzkiego MS, a aktywność receptora GPIIb/IIIa stanowi nie tylko istotny czynnik determinujący właściwości trombogene płytek krwi, ale także ich uczestnictwo w stanach neurozapalnych i demielinizacji. W związku z potencjalnym znaczeniem GPIIb/IIIa w progresji MS, w pracy oznaczono poziom ekspresji tego receptora w płytkach krwi oraz w megakariocytach. Wykazano wzrost stężenia cząsteczek białkowych receptora GPIIb/IIIa zarówno w płytkach krwi jak i w megakariocytach pacjentów z PMS w porównaniu do kontroli (Ryc. 15), jak również wyższą ekspresję mRNA dla genów *ITGA2B* i *ITGB3* kodujących odpowiednio podjednostki integrynowe GPIIb i GPIIIa (Ryc. 18).

Zwiększona liczba kopii receptora GPIIb/IIIa może być kluczowym czynnikiem pro-agregacyjnych właściwości płytek krwi w PMS. Tym bardziej, iż najnowsze doniesienia literaturowe wskazują, że płytki krwi w PMS charakteryzują się podwyższonym wewnątrzkomórkowym stężeniem fibrynogenu [219]. Synteza fibrynogenu zachodzi głównie w komórkach wątroby, ale pewna pula tego białka jest syntetyzowana przez megakariocyty szpiku kostnego, które są komórkami prekursorowymi płytek krwi [324, 325]. Płytki krwi powstają w procesie różnicowania megakariocytów, podczas którego zostają wyposażone w liczne mitochondria, rybosomy (potrzebne do syntezy białek płytkowych) oraz cząsteczki

mRNA i miRNA. Dzięki temu, pomimo braku jądra komórkowego, płytki krwi zachowują aktywny metabolizm [326]. W bezjądrzastych płytkach krwi ssaków potwierdzona została synteza białek zachodząca w oparciu o mRNA pochodzące z megakariocytów. Dotychczas opisanych jest około 5000 transkryptów, które zostają przekazane z megakariocytów w czasie tworzenia płytek krwi, co stanowi ponad połowę puli transkryptów obecnych w megakariocytach [7, 327]. Porównanie płytkowego transkryptomu i proteomu wykazało, że około 70% białek płytkowych jest najprawdopodobniej syntetyzowane na bazie płytkowego mRNA. Przy czym poziom syntezy białka w płytkach może być częściowo zależny od stopnia ich aktywacji [7]. W kolejnym etapie badań podjęto się weryfikacji postawionej hipotezy, że w płytkach krwi pacjentów z PMS zachodzi wzmożona synteza fibrynogenu. Ponadto, wykonana została analiza potencjalnych zmian molekularnych fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach w PMS. W pierwszej kolejności, metodą ELISA oznaczono stężenie fibrynogenu w płytkach krwi, megakariocytach oraz osoczu w próbkach pochodzących od pacjentów z PMS oraz próbkach kontrolnych. Wyniki jakie uzyskano wskazują na około 1,5-krotnie wyższe stężenie fibrynogenu zarówno w płytkach krwi, jak i w megakariocytach pacjentów z PMS, w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 22). Natomiast w przypadku stężenia fibrynogenu w osoczu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy PMS i grupą kontrolną (Ryc. 23). Średnia wartość stężenia fibrynogenu w osoczu w obu grupach oscylowała w granicach wartości referencyjnej ok. 3 g/L [328]. W oparciu o uzyskane wyniki, w kolejnym etapie przeprowadzono porównawczą analizę ilościową ekspresji mRNA dla genów *FGA*, *FGB* i *FGG* kodujących odpowiednio łańcuchy  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -fibrynogenu w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej. Niestety, ekspresja badanych transkryptów zarówno w płytkach krwi, jak i w megakariocytach była na poziomie poniżej progu detekcji w obu porównywanych grupach (Ryc. 24). Ze względu na pionierski charakter badań nie ma możliwości porównania uzyskanych wyników z danymi literaturowymi, jednak otrzymane wyniki sugerują, że fibrynogen obecny w płytkach krwi nie jest syntetyzowany ani w tych komórkach, ani w megakariocytach. Natomiast, z danych literaturowych wynika, że część białek płytkowych jest absorbowana z osocza [329]. Istnieje zatem możliwość, że zwiększone stężenie fibrynogenu w płytkach krwi w PMS może wynikać z ich zwiększonych zdolności do pochłaniania białek z osocza, w tym fibrynogenu, co może być zasocjowane ze zwiększoną liczbą receptorów dla fibrynogenu (GPIIb/IIIa) obecnych na powierzchni płytek krwi.

Heterogenność fibrynogenu jest wynikiem działania kilku rodzajów zmienności: polimorfizmów genetycznych, alternatywnego przetwarzania mRNA, rozszczepienia

proteolitycznego, czynników środowiskowych i modyfikacji aminokwasowych, które wpływają na tworzenie się skrzepu, jego strukturę i podatność na lizę. Skutki tego mają konsekwencje dla występowania i ciężkości przebiegu chorób zakrzepowo-zatorowych [330, 331]. Według danych literaturowych, obecnie zidentyfikowano kilkanaście polimorfizmów fibrynogenu, z czego do najbardziej przebadanych SNP zalicza się mutacje zmiany sensu: -455G>A (rs1800790) oraz -148C>T (rs1800787). Badania kliniczne wykazały, że polimorfizmy rs1800790 i rs1800787 genu *FGB* są ściśle związane ze zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwiennego i choroby niedokrwiennej serca [332-334]. Zmienność genetyczna w obrębie genów kodujących łańcuchy fibrynogenu może istotnie przyczyniać się do zmiany częstości występowania i/lub przebiegu procesów pro-zakrzepowych. Z tego względu następnym etapem podjętych badań było określenie, przy użyciu techniki NGS, potencjalnych różnic w sekwencji genów *FGA*, *FGB*, *FGG* kodujących poszczególne łańcuchy fibrynogenu u pacjentów z PMS w odniesieniu do grupy kontrolnej. Analiza przesiewowa zmian w sekwencji badanych genów pomiędzy PMS a grupą kontrolną pozwoliła zidentyfikować 10 zmian typu SNP (głównie w genie *FGA* kodującym łańcuch  $\alpha$ -fibrynogenu), z czego 9 z nich było nowo wykrytymi mutacjami, które nigdy wcześniej nie zostały opisane w bazie danych SNP. Wykonany skrining wykazał obecność 7 mutacji w genie *FGA*, jednej mutacji w genie *FGB* oraz dwóch mutacji w genie *FGG*. Ponadto, w przypadku wariantów c.1040A>G, c.991A>G genu *FGA* i c.832+57T>A w genie *FGG* wykazano zależności między występowaniem mutacji punktowych a ryzykiem wystąpienia PMS (Tab. 44 i 45). Spośród wszystkich zidentyfikowanych w pracy SNP, mutacja zmiany sensu c.991A>G (rs6050) wydaje się być najbardziej istotna ze względu na jej dobrze udokumentowany udział w chorobach naczyniowych. Zgodnie z danymi literaturowymi polimorfizm c.991A>G został powiązany ze zwiększonym ryzykiem udaru niedokrwiennego [335] i występowaniem silnego stanu zapalnego [336]. Ponadto, Zeng et al. wykazali, że polimorfizm c.991A>G może znacząco przyczyniać się do etiologii sporadycznego krwotoku mózgowego [337]. W prezentowanej pracy po raz pierwszy wykazano, że polimorfizmu c.991A>G powoduje 4-krotny wzrost ryzyka rozwoju PMS w porównaniu do grupy kontrolnej (OR = 4,2; p = 0,038) (Tab. 44). Zgodnie z dostępną literaturą, dotychczas nie badano wpływu wykrytych mutacji na ryzyko występowania MS, jednakże uzyskane w pracy wyniki wskazują możliwy udział polimorfizmu c.991A>G w etiologii MS. Z funkcjonalnego punktu widzenia, zmiany w odcinku kodującym mają większe znaczenie, bowiem mogą tłumaczyć, jak zmiana nukleotydu w sekwencji DNA może wpłynąć na kodowany przez dany kodon aminokwas i tym

samym prowadzić do zmiany polarności białka, jak również wpłynąć na jego funkcję i strukturę. Co ważniejsze, mutacje w sekwencjach kodujących mogą powodować ujawnienie się fenotypu choroby m.in. poprzez zmiany w strukturze cząteczki mRNA, jak również inaktywację genów oraz inicjację aparatu splicingowego. Jednakże, to głównie mutacje w intronach są odpowiedzialne za zaburzenia procesu składania mRNA, co w konsekwencji może powodować powstawanie nieprawidłowych transkryptów. Ponadto, mutacjom intronowym przypisuje się często znaczenie prognostyczne [338]. Dokonując analizy mutacji c.832+57T>A w intronie genu *FGB* stwierdzono istotną statystycznie różnicę w częstości występowania alleli i genotypów homo- i heterozygotycznych w PMS w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wykazano, że heterozygota T/A zwiększa ponad 8-krotnie prawdopodobieństwo rozwoju PMS (OR = 8,75) (Tab. 45). Natomiast w genie *FGG* zidentyfikowano w regionie 5'UTR mutację c.-213A>T, która nie została nigdy wcześniej scharakteryzowana w żadnej bazie danych SNP. Pomimo tego, że nie wykazano jej wpływu na występowanie MS (Tab. 46) to właśnie mutacje w regionach regulatorowych, w których dochodzi do przyłączenia się czynników transkrypcyjnych, powodują zmiany w ekspresji genów i w konsekwencji wpływają na liczbę transkryptów w komórce [339, 340]. Zgodnie z posiadanym stanem wiedzy, analiza sekwencji genów *FGA*, *FGB* oraz *FGG* nie została dotychczas przeprowadzona na populacji pacjentów z MS, jak również istotny jest fakt, że wykazane w pracy zmiany w genach są to głównie nowo odkryte mutacje, w związku z czym nie ma możliwości skonfrontowania uzyskanych wyników z dostępną literaturą. Ponadto, należy podkreślić fakt, że przeprowadzone badania miały charakter skriningowy, a ich celem było przede wszystkim wyznaczenie dalszego kierunku analiz, dzięki którym możliwe będzie sprecyzowanie charakteru zmian genetycznych oraz określenie zmian fenotypowych.

W celu identyfikacji zmian we wzorze PTMs w obrębie cząteczek fibrynogenu wyizolowanego z płytek krwi, megakariocytów oraz osocza wykonano przesiewową analizę map białkowych dla poszczególnych łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu w PMS i w grupie kontrolnej. Analiza statystyczna wykazała istotne zmiany w poziomie ekspresji łańcucha  $\alpha$ -fibrynogenu, wskazując, że jest to polipeptyd różnicujący płytki krwi pomiędzy PMS i kontrolną (q-value = 0,0005) (Tab. 34). Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na istnienie zmiennego profilu modyfikacji  $\alpha$ -fibrynogenu pomiędzy badanymi wariantami eksperymentalnymi (Tab. 36). Szczególnie istotne wydają się różnice we wzorach glikacji, O-glikozylacji oraz fosforylacji. Patologiczne PTMs, jak chociażby modyfikacje oksydacyjne, obserwuje się w różnych stanach chorobowych, w tym chorobach sercowo-naczyniowych

i chorobach neurodegeneracyjnych [341]. W ciągu ostatnich kilku lat przybywa badań, w tym z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas, w celu określenia pozycji i charakteru PTMs obecnych w łańcuchach  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -fibrynogenu [342, 343]. Uważa się, że występowanie PTMs może mieć istotny wpływ na kluczowe funkcje fibrynogenu, takie jak polimeryzacja fibryny i interakcja z płytkami krwi [344]. Struktura fibrynogenu jest najczęściej modyfikowana poprzez glikację oraz homocysteinylację, które przyczyniają się do tworzenia trombogennej struktury fibryny [345]. Brak jest jednak danych, dotyczących występowania wzoru PTMs łańcuchów fibrynogenu w poszczególnych jednostkach chorobowych, w tym w schorzeniach charakteryzujących się zwiększonym potencjałem pro-zakrzepowym krwi. W pracy wykazano miejsca glikacji na resztach Lys<sup>71</sup> i Arg<sup>84</sup> w  $\alpha$ -fibrynogenu płytek krwi od pacjentów z PMS, których nie zidentyfikowano w płytkach kontrolnych (Tab. 36). Stopień glikacji fibrynogenu odpowiada za strukturę włókien i upakowanie fibryny, co determinuje podatność skrzepu na fibrylizację i może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka wystąpienia zakrzepicy żyłnej [346]. W pracy wykazano ponadto dodatkowe miejsca fosforylacji cząsteczki  $\alpha$ -fibrynogenu na resztach Ser<sup>356</sup> i Ser<sup>365</sup> w płytkach krwi w PMS, których nie zidentyfikowano na płytkach kontrolnych (Tab. 36). Z danych literaturowych wynika, że fosforylacja fibrynogenu wpływa na stan czynnościowy tego białka sprzyjając właściwościom pro-zakrzepowym, w tym skracając parametry czasu krzepnięcia [347]. Co ciekawe, wyższy poziom fosforylacji fibrynogenu zaobserwowano m.in. po zabiegach operacyjnych, co potencjalnie może stanowić mechanizm zapobiegania krwawieniom okołozabiegowym [348]. Badania przeprowadzone w ramach realizowanej pracy doktorskiej stanowią jedynie analizę skriningową, której celem była identyfikacja potencjalnych różnic we wzorze PTMs dla cząsteczek łańcuchów fibrynogenu w PMS i w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych szczegółowych badań, których przedmiotem będzie wnikliwa analiza zmian zidentyfikowanych we wzorach PTMs. Ze względu na globalny, a zarazem pionierski charakter prowadzonych badań, na chwilę obecną możliwe jest jedynie wskazanie charakteru zachodzących zmian w kierunku pro-zakrzepowym. Jednakże, konieczne jest dalsze prowadzenie badań nakierowanych na weryfikację i ocenę funkcjonalnych konsekwencji wykazanych zmian proteomicznych.

Zwiększona aktywność płytek krwi może być potencjalnie uwarunkowana wieloma czynnikami oddziałującymi na różnych poziomach struktury i funkcji tych komórek. Jednak biologiczną odpowiedź płytek wiąże się zawsze ze zmianą ich kształtu, dlatego modyfikacje białek cytoszkieletu stanowią ważny aspekt zaburzonej fizjologii płytek. Ilościowe i/lub

strukturalne zmiany białek cytoszkieletu mogą bezpośrednio pociągać za sobą zmiany czynnościowe hemostatycznej funkcji płytek, a w konsekwencji prowadzić do pojawienia się incydentów sercowo-naczyniowych. W związku z tym, w kolejnym etapie badań wykonana została analiza zmian ilościowych i jakościowych kluczowych białek cytoszkieletu w płytkach krwi, a także w megakariocytach. W pierwszej kolejności, metodą immunoenzymatyczną oznaczono stężenie  $\beta$ -tubuliny oraz  $\beta$ -aktyny w płytkach krwi oraz megakariocytach pochodzących od pacjentów z PMS oraz w próbkach kontrolnych. Wykazano, że średnie stężenie obu białek cytoszkieletu w płytkach krwi oraz w megakariocytach pacjentów z PMS jest wyższe od stężenia w kontroli (Ryc. 26 i Ryc. 27). Przy czym szczególnie wzrost zaobserwowano w przypadku  $\beta$ -tubuliny. Aby określić, czy zmiany ilościowe  $\beta$ -tubuliny oraz  $\beta$ -aktyny są wynikiem zwiększonej syntezy tych białek w badanych komórkach, w kolejnym etapie badań wykonano analizę ilościową ekspresji genów *TUBB1* oraz *ACTB*, kodujących odpowiednio  $\beta$ 1-tubulinę oraz  $\beta$ -aktynę, w PMS oraz w grupie kontrolnej. Zaobserwowano zależność analogiczną, jak w przypadku pomiaru stężenia białka. Zarówno w płytkach krwi, jak i w megakariocytach wykazano wzrost ilości transkryptów dla genów *TUBB1* (Ryc. 28) oraz *ACTB* (Ryc. 29) w PMS, przy czym szczególnie dużą różnicę względem kontroli odnotowano w przypadku mRNA dla genu kodującego  $\beta$ 1-tubulinę. Prawidłowa ekspresja białek cytoszkieletu płytek krwi ma istotne znaczenie dla ich roli w mechanizmach hemostazy. Badania Schwer i wsp. wskazują, że ilość  $\beta$ 1-tubuliny przekazywanej płytkom podczas ich powstawania *de novo* w procesie różnicowania megakariocytów determinuje powstawanie, strukturę i funkcję płytek krwi. Badania genetyczne przeprowadzone na modelu mysim wykazały, że indukowany defekt genu dla  $\beta$ 1-tubuliny skutkuje trombocytopenią wynikającą z zaburzonego wytwarzania proplateletów, będących bezpośrednimi prekursorami płytek krwi. Co więcej, powstające płytki krwi są niezdolne do zmiany kształtu z dyskoidalnego na kolczasty sferocyt oraz wykazują osłabioną odpowiedź na trombinę. Powstające zaburzenia skutkują wydłużonym czasem krwawienia [75]. Poprzez analogię do tych badań, można wnioskować, że wzmożona ekspresja  $\beta$ 1-tubuliny może mieć konsekwencje pro-zakrzepowe, jednakże w literaturze brakuje badań prowadzonych w tym kierunku.

Mutacje w genach oraz PTMs wpływają na funkcjonalną heterogeniczność bardzo konserwatywnych dimerów tubuliny i stanowią główny regulator ich działania [116]. Analiza wzoru PTMs przeprowadzona w prezentowanej pracy wykazała, że  $\beta$ 1-tubulina nie jest białkiem, które w istotny sposób różnicuje badane grupy (PMS vs kontrola) (Tab. 49), niemniej

jednak posiada zróżnicowany profil modyfikacji białka w porównywanych grupach (Tab. 51). Wykazano, że  $\beta$ 1-tubulina z płytek krwi w PMS charakteryzuje się znacznie większym poziomem deamidacji reszt Asn i Gln w porównaniu do  $\beta$ 1-tubuliny pochodzącej z płytek kontrolnych (Tab. 51). Deamidacja wciąż należy do słabo poznanych PTMs, jednak istnieją doniesienia, które wskazują, że deamidacja może wpływać na stabilność strukturalną białka zakłócając jego pierwotną funkcję biologiczną [349, 350]. Natomiast, jak wykazano w pracy,  $\beta$ -aktyna tylko w przypadku megakariocytów (PMS vs kontrola) różnicuje badane warianty eksperymentalne (q-value = 0,0013) (Tab. 52), ponadto posiada odmienny profil PTMs w porównywanych grupach (Tab. 54). Analiza sekwencji  $\beta$ -aktyny wykazała cztery różne PTMs w obrębie płytek krwi, są to: metylacja, acetylacja, glikacja oraz deamidacja (Tab. 54). Wykryto, że w grupie PMS obecne są dodatkowe miejsca metylacji na resztach His<sup>73</sup>, His<sup>87</sup> i His<sup>88</sup>, których nie zidentyfikowano w płytkach krwi kontrolnych (Tab. 54). Z danych literaturowych wynika, że metylacja w pozycji His<sup>73</sup> stanowi stosunkowo rzadki typ modyfikacji, ale istotnie wpływa na obniżenie elastyczności i stabilności filamentów aktynowych poprzez regulację włókien naprężeniowych odpowiedzialnych za zmianę kształtu komórki [351]. W przypadku płytek krwi z PMS wykazano także niższy poziom acetylacji na resztach Cys<sup>285</sup>  $\beta$ -aktyny. Drazik i wsp. wykazali, że komórki pozbawione N-acetylotransferazy są hipermobilne i charakteryzują się znacznym wzrostem liczby filopodiów i całkowitej zawartości F-aktyny, podczas gdy testy *in vitro* pokazują, że acetylowana  $\beta$ -aktyna wykazuje wolniejsze wydłużanie włókien niż jej forma nieacetylowana [352]. A zatem spadek acetylacji w płytkach PMS może predysponować do zwiększonej elastyczności cytoszkieletu i bardziej dynamicznej zmiany kształtu.

$\beta$ 1-tubulina kodowana przez gen *TUBB1* jest główną izoformą  $\beta$ -tubuliny obecną w płytkach krwi i megakariocytach [109]. Istnieje wiele badań genetycznych, które wskazują na to, że mutacje w obrębie genu *TUBB1* stanowią istotny czynnik zakłócający formowanie mikrotubuli, co wpływa na upośledzone tworzenie się proplitek. Badania Kunishima i wsp. wykazały, że mutacja c.779T>C (Phe260Ser) w genie *TUBB1* powoduje powstawanie niefunkcyjnych mikrotubuli oraz formowanie się płytek o nieregularnym kształcie [353]. Badania prowadzone przez Fiore i wsp. dowiodły natomiast, że mutacja c.1267C>T w genie *TUBB1* odgrywa rolę w tworzeniu się zwojów mikrotubuli w płytkach [354]. Badania przeprowadzone na chińskiej populacji dzieci z wrodzoną niedoczynnością tarczycy, wykazały obecność mutacji c.952C>T w genie *TUBB1* prowadzącej do zmiany sekwencji aminokwasowej w C-końcowym regionie białka tubuliny- $\beta$ 1, która została oceniona na

podstawie kryteriów klasyfikacji i wytycznych dotyczących zmienności genetycznej jako czynnik potencjalnie patogenny, przyczyniający się do rozwoju chorób autoimmunologicznych [355]. Ponadto, istnieją badania, które stwierdzają zależność pomiędzy występowaniem mutacji c.130-131 AG>CC w genie *TUBB1* (Gln43Pro) a zwiększonym ryzykiem udaru krwotocznego u mężczyzn [356]. Mutacja typu missense g.10094G>A (Arg307His) w obrębie genu *TUBB1* u pacjentów z małopłytkowością idiopatyczną była natomiast związana z cięższym przebiegiem choroby, zwiększonym niepowodzeniem terapii immunomodulujących i wzmożoną aktywnością płytek krwi [357]. Co ciekawe, badania genetyczne Stoupa i wsp. wykazały istnienie niespotykanej zależności między obecnością mutacji w genie *TUBB1* a chorobami tarczycy i fizjologią płytek krwi. Badacze zidentyfikowali 3 nowe mutacje w genie *TUBB1* u osób z dysgenezą tarczycy, które prowadzą do powstawania niefunkcyjnych dimerów  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny, które nie mogą tworzyć prawidłowych zwojów mikrotubuli. Ponadto, mutacje *TUBB1* powodowały tworzenie się makropłytek i prowadziły do ich hiperagregacji po stymulacji niskimi dawkami agonistów [358]. Zmiany w obrębie sekwencji genu *TUBB1* wydają się zatem być czynnikiem dla rozwoju wielu chorób, w tym również o podłożu autoimmunologicznym, do których zaliczane jest MS. Z tego względu, kolejnym etapem podjętych badań było określenie, przy użyciu techniki NGS, potencjalnych różnic w sekwencji genu *TUBB1* u pacjentów z PMS w odniesieniu do grupy kontrolnej. W pracy wykryto dwie nowe mutacje, to jest c.1336C>A w regionie egzonu 4, występującą jedynie u pacjentów z PMS oraz c.-484C>G w regionie 5'UTR, obecną w obu grupach, która uzyskała wartość na granicy istotności statystycznej ( $p < 0,088$ ) (Tab. 56). W obu przypadkach nie wykazano zależności między występowaniem zidentyfikowanych wariantów a ryzykiem rozwoju PMS (Tab. 57). Niemniej jednak, zarówno mutacje w regionie 5'UTR, jak również modyfikacje C-końcowe w sekwencji na poziomie białka, mogą potencjalnie wpływać na ekspresję białka, polimeryzację mikrotubuli oraz na interakcje z białkami MAP w komórce [359]. Ponadto, uważa się, że zmiany profilu aminokwasowego na C-końcu mogą prowadzić do zmian w obfitości białek, poprzez modulację szybkości translacji, a także powodować formowanie się niestabilnych struktur białkowych [360]. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących zmian sekwencji genu *TUBB1* w populacji pacjentów z MS, a wykryte przez nas mutacje mogą zapoczątkować dalsze badania, szczególnie pod kątem zaburzonej czynności hemostatycznej płytek krwi w PMS.

Kolejnym etapem badań była analiza profilu ekspresji cząsteczek płytkowego miRNA, które odpowiedzialne są za regulowanie procesu translacji, co ma szczególne znaczenie dla



molekularnego podłoża zmian w hemostatycznej funkcji płytek krwi w stanach patologicznych [361]. W tym celu wykonano globalną analizę porównawczą profilu miRNA w PMS względem kontroli z wykorzystaniem metody mikromacierzy w płytkach krwi i megakariocytach. Na podstawie analizy bioinformatycznej uzyskanych wyników zidentyfikowano 93 miRNA wykazujące wzrost ekspresji oraz 42 miRNA, których ekspresja była statystycznie niższa w płytkach krwi w PMS w odniesieniu do kontroli (Tab. 57). W przypadku megakariocytów w PMS zidentyfikowano wzrost ekspresji 130 miRNA oraz spadek ekspresji 93 miRNA, wobec grupy kontrolnej (Tab. 58). Spośród cząsteczek miRNA wykazujących wysoki poziom krotności zmian ekspresji w PMS, wyselekcjonowano cząsteczki, biorąc pod uwagę te, które zgodnie z danymi literaturowymi, są specyficzne dla płytek krwi, najobficiej w nich występują oraz są zaangażowane w regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za główne szlaki aktywacji i istotne funkcje hemostatyczne płytek krwi [263, 361, 362]. Na tej podstawie wytypowano 4 cząsteczki miRNA: miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p oraz miR-199a-3p, dla których przeprowadzono walidację wyników uzyskanych w metodzie mikromacierzy, poprzez pomiar względnego poziomu ekspresji (w odniesieniu do kontroli endogennej – miR-191-5p) stosując metodę Real-Time PCR. Pomiar metodą qPCR wykazał istotny statystycznie spadek ekspresji wytypowanych miRNA w płytkach krwi w PMS w odniesieniu do kontroli (Ryc. 31). Natomiast, wyniki ekspresji tych samych wyselekcjonowanych miRNA w megakariocytach również wykazały istotne różnice pomiędzy porównywanymi grupami, przy czym odnotowano wzrost ekspresji tych miRNA w PMS względem kontroli (Ryc. 32). Jak sugerują doniesienia literaturowe, pomimo tego, że znaczna część miRNA zawartych w płytkach krwi pochodzi z puli przekazanej przez megakariocyty na drodze trombopoezy, to jednak profil ekspresji tych cząsteczek w płytkach zależy również od zdolności płytek do pobierania miRNA ze środowiska, jak również wydzielania ich do osocza w mikropęcherzykach płytkowych: PMPs oraz egzosomach. Warto zauważyć, że zdecydowana większość miRNA obecna w osoczu jest pochodzenia płytkowego [39]. Wykazano, że ilość miRNA w płytkach krwi istotnie zmniejsza się w ciągu ich życia i zależy od poziomu aktywności, a sama zmienność miRNA, a nawet także mRNA, wynika przede wszystkim z poziomego transferu komórkowego między płytkami krwi a innymi komórkami naczyniowymi poprzez tzw. proces internalizacji [363]. Można przypuszczać, że pierwotnie w megakariocytach ekspresja badanych miRNA jest wyższa u pacjentów z PMS, a nowopowstające płytki otrzymują od nich odpowiednio dużą pulę tych cząsteczek, ale ze względu na fakt, iż płytki krwi w PMS zyskują status hiperreaktywnych to intensywnie

i masowo uwalniają je do osocza w PMPs lub egzosomach lub/i przekazują innym komórkom naczyniowym, stąd obniżona ekspresja tych miRNA w samych płytkach. Aby móc ostatecznie przyjąć tę hipotezę za prawdziwą, należy wykonać dodatkowe badania polegające na analizie osoczowych miRNA w celu porównania ich z pulą miRNA płytkowych i megakariocytarnych. Badania te będą kontynuowane w oparciu o wyniki własne oraz dane literaturowe. Analogicznie do spostrzeżeń z wyników uzyskanych w niniejszej pracy, Wang i wsp. wykazali, że pacjenci z wysokim poziomem reaktywności płytek (ang. *High Platelet Reactivity*, HPR) mają niższą zawartość miR-15b w płytkach, w porównaniu do pacjentów z niskim poziomem reaktywności płytek (ang. *Low Platelet Reactivity*, LPR) [71]. Co więcej, nadekspresja miR-15b u pacjentów z LPR negatywnie reguluje aktywność agregacyjną płytek w wyniku promowania ich apoptozy. Natomiast, niska ekspresja miR-15b u pacjentów z HPR prowadzi do podwyższonego poziomu białka Bcl-2, przez co hamuje apoptozę oraz wzmacnia proces agregacji płytek krwi w porównaniu do pacjentów z LPR [364]. Liu i wsp. dowiedli natomiast, że nadekspresja miR-15b w limfocytach T CD4<sup>+</sup> hamuje patogenne różnicowanie się komórek Th17 i łagodzi przebieg EAE [365]. Przy czym, Chen i wsp. wykazali znacznie obniżoną ekspresję miR-15b w limfocytach T CD4<sup>+</sup> pochodzących od pacjentów z MS w porównaniu do kontroli [366]. Podobnie, Manna i wsp. analizując surowicę pacjentów z RRMS także udokumentowali spadek ekspresji miR-15b w stosunku do grupy kontrolnej [367]. Również miR-126 koreluje ze stanem aktywacji płytek krwi, a także stanowi marker prognostyczny dla zdarzeń sercowo-naczyniowych [368]. Cerutti i wsp. dowiedli, że spadek ekspresji miR-126 zwiększa powierzchniową ekspresję E-selektyny oraz białka adhezyjnego komórek naczyniowych (ang. *Vascular Cell Adhesion Protein*, VCAM), co wpływa na wzrost adhezji leukocytów do śródbłonna BBB [369]. MiR-126 jest silnie wyrażany w płytkach krwi i uważa się, że jest znacząco zaangażowany w ich reaktywność, agregację, degranulację oraz adhezję. Jansen i wsp. wykazali, że u pacjentów z chorobą wieńcową niski poziom ekspresji miR-126 i miR-199a zawartych w PMPs koreluje z obniżoną predyspozycją do występowania ostrych zdarzeń niedokrwienych [370]. Natomiast w przypadku miR-24, Fayyad-Kazan i wsp. ustalili, że jego obniżona ekspresja odpowiedzialna jest za wzmożone wydzielania IFN- $\gamma$  przez limfocyty T CD4<sup>+</sup> [371]. Może mieć to znaczenie z punktu widzenia patogenezy MS, gdyż IFN- $\gamma$  jest jedną z głównych cytokin pro-zapalnych obecnych w zmianach demielinizacyjnych MS, a jej poziom znacznie się zwiększa podczas ostrej fazy choroby [372]. Co więcej, istnieją doniesienia, że obniżona ekspresja miR-24 odgrywa rolę w promowaniu nawrotów u pacjentów z MS [373]. Liczne doniesienia literaturowe dowodzą, że miRNA mogą wpływać na rozwój

procesów neurodegeneracyjnych i kontrolować odpowiedź immunologiczną ze znaczącym wpływem na ekspansję reakcji autoimmunologicznych [374-376]. Zatem istotne wydaje się określenie profilu ekspresji miRNA u pacjentów z MS, co może znaleźć praktyczne zastosowanie zarówno w diagnostyce klinicznej, jak i terapii tego schorzenia. W większości dotychczas opublikowanych badań analizujących ekspresję miRNA w MS wykorzystano PBMCs, krew pełną, osocze, czy płyn mózgowo-rdzeniowy [377, 378]. Obecnie nie ma badań, które koncentrowałyby się na ocenie zmienności w profilu płytkowego miRNA u pacjentów z MS.

Uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne powstające na skutek stresu oksydacyjnego stanowią ważne podłoże dla rozwoju wielu chorób. Z jednej strony, stres oksydacyjny wpływa bezpośrednio na przemiany epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i modyfikacje histonów, które regulują transkrypcję miRNA [379, 380], z drugiej natomiast, deregulacja fizjologicznych poziomów miRNA może prowadzić do uszkodzenia oksydacyjnego i rozwoju choroby [381]. W przewlekłych chorobach zapalnych, takich jak MS, ochrona antyoksydacyjna jest zwykle znacznie osłabiona, co prowadzi do wysokiego poziomu stresu oksydacyjnego [382]. Stres oksydacyjny w MS uczestniczy w uszkodzeniu mieliny i degradacji aksonów, co przyczynia się do manifestowania objawów klinicznych choroby [383]. Ponadto, udokumentowano, że nadmierne generowanie RFT/RFA w przebiegu MS wpływa na tzw. plastyczność mózgu i prowadzi do zaburzeń w procesach neurotransmisji [384]. Utrzymujący się wysoki poziom stresu oksydacyjnego jest też dobrze udokumentowanym czynnikiem zaburzenia procesów hemostazy [385, 386], co może mieć istotne znaczenie dla patogenezy MS. W prezentowanej pracy podjęto badania mające na celu ocenę poziomu stresu oksydacyjnego w płytkach krwi. Analiza porównawcza wewnątrzpłytkowego poziomu RFT wykonana z zastosowaniem sondy DCFH wykazała znaczący wzrost stężenia RFT w PMS w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 36). Jednym z hipotetycznych mechanizmów mogących odpowiadać za rozproszoną neurodegenerację występującą u pacjentów z MS jest dysfunkcja mitochondriów. Zaburzenia mitochondrialne najprawdopodobniej spowodowane są patologicznym otwarciem kanałów przejściowych znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, które po otwarciu pozwalają na wniknięcie substancji rozpuszczonych do macierzy mitochondrialnej, powodując spadek MMP i uwolnienie białek apoptotycznych, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki [387]. Tempo obrotu ATP w płytkach krwi jest bardzo duże, co sugeruje istotną rolę mitochondriów w funkcjonowaniu płytek. Zaskakująco duża jest także zawartość tych organelli, w liczbie około 8-9 sztuk przypadających na pojedynczą komórkę. Ponadto, zapotrzebowanie na energię nasila się podczas aktywacji płytek

krwi i złożonej kaskady sygnalizacyjnej, która reguluje procesy adhezji, agregacji i degranulacji płytek [388, 389]. To przyrostowe zużycie energii jest jednym z głównych wyznaczników czynności płytek krwi. MtDNA koduje funkcjonalnie ważne podjednostki mitochondrialnego łańcucha oddechowego, złożonego z czterech kompleksów, zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (kompleksy I-IV) oraz syntazę ATP (określaną czasami jako kompleks V) [390]. Oksydaza cytochromu c (kompleks IV) jest ostatnim enzymem mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów w procesie fosforylacji oksydacyjnej, kodowanym przez mitochondrialny gen *MTCO-1*. W tym końcowym kompleksie zużywane jest ponad 90% tlenu obecnego w komórce. Kompleks IV katalizuje redukcję  $O_2$  do  $H_2O$ , dzięki czemu stanowi istotną strukturę zapobiegającą tworzeniu się produktów pośrednich w postaci RFT [391]. Z czego wynika, że zmniejszona ekspresja oksydazy cytochromu c zwiększa mitochondrialny poziom RFT. Natomiast, wzrost RFT powstałych przez wadliwe funkcjonowanie kompleksów łańcucha oddechowego skutkuje nieodwracalnym uszkodzeniem mitochondriów, co w rezultacie może doprowadzić do spadku MMP [392], który stanowi wczesny sygnał utraty żywotności komórek [393]. Nasze wyniki sugerują występowanie uszkodzeń mitochondriów w PMS, co potwierdza spadek ekspresji transkryptów genu *MTCO-1* (Ryc. 34) i znacząca depolaryzacja błony mitochondrialnej płytek krwi (Ryc. 33) u pacjentów z PMS w porównaniu z grupą kontrolną.

Uważa się, że GAPDH, będący enzymem metabolizmu tlenowego, służy jako wewnątrzkomórkowy czujnik stresu oksydacyjnego na poziomie mitochondrialnym i może przyczyniać się do inicjacji fazy apoptozy [394]. GAPDH stanowi wielofunkcyjne białko, które oprócz podstawowej funkcji enzymatycznej w procesie glikolizy [395], odpowiedzialne jest m.in. za transkrypcyjną [396] oraz potranskrypcyjną regulację genów [397], jak również wewnątrzkomórkowy ruch błonowy [398]. GAPDH jest jednym z białek komórkowych wzbogaconych o reaktywne grupy sulhydrylowe, co wyjaśnia jego szczególną zdolność do agregacji [399]. Oddziaływanie RFT na cząsteczkę GAPDH hamuje jego aktywność enzymatyczną, powodując zahamowanie procesu glikolizy oraz promuje utworzenie mniej stabilnej formy białka podatnej na denaturację i późniejszą agregację. Liczne badania wskazują, że zagregowana postać GAPDH wywołana stresem oksydacyjnym, po którym następuje produkcja włókienek amyloidopodobnych, ostatecznie prowadzi do apoptozy komórek nerwowych zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [394, 400, 401]. Jednakże, szczegółowe mechanizmy śmierci komórek nerwowych indukowanej nagromadzeniem cząsteczek GAPDH w przypadku MS nie są potwierdzone. Przypuszcza się, że patologiczne odkładanie się GAPDH prowadzi do

dysfunkcji mitochondriów oraz hamuje prawidłowe funkcjonowanie retikulum endoplazmatycznego, co ostatecznie skutkuje śmiercią komórki [402, 403]. Ponadto, nagromadzenie GAPDH powoduje obrzęk macierzy mitochondrialnej, nadmierną aktywację zależnych od napięcia kanałów jonowych, których otwarcie prowadzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej i uwolnienia mediatorów apoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej, takich jak cytochrom c, kaspaza-3, kaspaza-9 i czynnik indukujący apoptozę [404, 405]. Badania Ito et al. wykazały, że w warunkach silnego stresu oksydacyjnego spowodowanego zahamowaniem endogennej aktywności enzymów antyoksydacyjnych dochodzi do zwiększenia ekspresji mRNA genu *GAPDH* w komórkach śródbłonna aorty piersiowej [406]. W niniejszej pracy wykazano wzrost ilości transkryptów mRNA w płytkach krwi dla genu *GAPDH* u pacjentów z PMS w porównaniu z kontrolą (Ryc. 35). Jednakże, aby móc w pełni potwierdzić, że w PMS dochodzi do patologicznego nagromadzenia GAPDH należałoby przeprowadzić dodatkowe badania polegające na pomiarze stężenia białka monomerycznego, jak również zagregowanego u pacjentów z PMS, tak jak to zostało wykonane w przypadku innych chorób neurodegeneracyjnych [407, 408]. Uzyskane wyniki pozwalają jednak przypuszczać, że płytki krwi pacjentów z PMS charakteryzujące się wysokim poziomem RFT, wykazują zaburzone funkcjonowaniem mitochondriów. Przewlekłe bodźce neurozapalne w przebiegu MS zakłócają homeostazę neuroaksonalną, prowadząc do jednoczesnego wzrostu stresu oksydacyjnego, charakteryzującego się wtórnym uszkodzeniem mitochondriów, co finalnie prowadzi do osiągnięcia krytycznego poziomu produkcji ATP i aktywacji mechanizmów pro-apoptotycznych [409-412].

## 6. WNIOSKI

---

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Płytki krwi oraz megakariocyty pochodzące z krążenia pacjentów z PMS charakteryzują się wzmożoną ekspresją i reaktywnością wybranych receptorów powierzchniowych dla kluczowych fizjologicznych agonistów płytkowych, co może stanowić przyczynę pro-zakrzepowego potencjału tych komórek, obserwowanego w PMS.
2. Zwiększone wewnątrzkomórkowe stężenie fibrynogenu w płytkach krwi i megakariocytach w PMS, zmiany w profilu PTMs, które istotnie różnicują łańcuchy fibrynogenu pomiędzy grupą kontrolną i PMS oraz wykryte zmiany sekwencji DNA: w genie *FGA* mutacja c.1040A>G i polimorfizm c.991A>G (rs6050), a w genie *FGB* mutacja c.832+57T>A mogą przyczyniać się do pro-zakrzepowego charakteru zmian całkowitego potencjału hemostatycznego w PMS, mającego konsekwencje w postaci wysokiego ryzyka występowania zakrzepicy żyłnej i tętniczej.
3. Zmiany molekularne  $\beta$ -tubuliny na poziomie białka, mRNA oraz sekwencji DNA mogą stanowić bezpośrednią przyczynę zmienionej odpowiedzi hemostatycznej płytek krwi w PMS.
4. Analiza profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach wykazuje w PMS zmiany w poziomie ekspresji cząsteczek: miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p, miR-199a-3p zaangażowanych w regulację procesów aktywacji płytek (w tym w agregację, degranulację, adhezję), a także w proces apoptozy tych komórek.
5. Wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe RFT, nadmierna depolaryzacja błony mitochondrialnej oraz nadekspresja mRNA dla genów kodujących enzymy metabolizmu tlenowego, które wykazano w płytkach krwi pochodzących od pacjentów z PMS, wskazują na często występującą w chorobach neurodegeneracyjnych dysfunkcję miochondriów, i co z tym idzie, udział stresu oksydacyjnego w promowaniu pro-zakrzepowej odpowiedzi płytek krwi.

## 7. STRESZCZENIE

---

Stwardnienie rozsiane (MS) jest przewlekłą chorobą zapalną OUN, charakteryzującą się demielinizacją włókien istoty białej, spowodowaną rozpadem otoczki mielinowej. Uważa się, że rozwój procesów autoimmunologicznych, chroniczny stan zapalny i długotrwały wpływ stresu oksydacyjnego stanowią główne przyczyny demielinizacji, która w konsekwencji prowadzi do śmierci neuronów. Badania epidemiologiczne potwierdzają zwiększone ryzyko występowania incydentów niedokrwiennych związanych z patologiczną aktywnością pro-zakrzepową płytek krwi u pacjentów z MS, szczególnie w fazie progresywnej (PMS). Wskazuje to na zaburzenia hemostatycznej czynności płytek krwi w MS. Udział płytek w patogenezie MS obejmuje również ich interakcje z leukocytami oraz komórkami śródbłonna, prowadzące do naruszenia BBB i infiltracji limfocytów do miejsc tworzenia się ognisk demielinizacji w OUN. Ponadto, uczestnictwo płytek krwi w procesie neurodegeneracji obejmuje inicjowanie i rozwój procesów zapalnych oraz generowanie RFT.

Celem pracy było poznanie molekularnego podłoża podwyższonej aktywności pro-zakrzepowej płytek krwi występującej u pacjentów z PMS. W pierwszej kolejności ocenie poddano stan czynnościowy płytek krwi poprzez określenie ekspresji i stopnia reaktywności głównych receptorów powierzchniowych dla fizjologicznych agonistów płytkowych. Następnie podjęto próbę określenia zmian molekularnych fibrynogenu (jako białka kluczowego dla potencjału pro-zakrzepowego krwi) oraz głównych białek cytoszkieletu ( $\beta$ -tubuliny i  $\beta$ -aktyny), które mogą stanowić podłoże zmienionej funkcji hemostatycznej płytek krwi. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie skринingowej analizy porównawczej (PMS vs kontrola) profilu ekspresji cząsteczek miRNA w płytkach krwi i megakariocytach. W ostatnim etapie badań ocenie poddano wybrane parametry funkcjonowania mitochondriów płytkowych.

Analizując wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że płytki krwi od pacjentów z PMS wykazują zwiększoną aktywność, jak również wzmożoną ekspresję kluczowych receptorów powierzchniowych i nasiloną odpowiedź na działanie fizjologicznych agonistów płytkowych. Wykazano, że płytki krwi oraz megakariocyty pochodzące od pacjentów z PMS posiadają zwiększone stężenie fibrynogenu, jak również charakteryzują się odmiennym profilem PTMs łańcuchów  $\alpha$ -,  $\beta$ - oraz  $\gamma$ -fibrynogenu oraz zmianami w sekwencjach genów *FGA*, *FGB* i *FGG*, które w sposób istotny różnicują badane grupy. W pracy wykazano także istotne zmiany dotyczące białek cytoszkieletu, odnoszące się przede wszystkim do  $\beta$ -tubuliny, które manifestują się zwiększonym stężeniem wewnątrzkomórkowym tego białka oraz wzrostem liczby transkryptów mRNA zarówno

w płytkach krwi, jak i w megakariocytach w PMS. Wykryto również zmiany w sekwencji genu *TUBB1* kodującego  $\beta$ -tubulinę. Skriningowa analiza profilu ekspresji miRNA w płytkach krwi i megakariocytach od pacjentów z PMS wykazała istotne zmiany w ilości cząsteczek miRNA (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p oraz miR-199a-3p) będących potranskrypcyjnymi regulatorami ekspresji genów, które zaangażowane są w kluczowe szlaki aktywacji płytek krwi, jak również uczestniczą w różnicowaniu oraz programowanej śmierci komórek. Ponadto, stwierdzono, że w płytkach krwi pacjentów z PMS dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych rodników tlenowych, obserwuje się spadek MMP oraz zwiększoną liczbę transkryptów mRNA dla genów kodujących enzymy zaangażowane w komórkowy metabolizm tlenowy (oksydaza cytochromu c oraz GAPDH).

Uzyskane wyniki mogą stanowić częściowe wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zwiększony potencjał pro-zakrzepowy płytek krwi, przyczyniający się do obserwowanego w PMS wzrostu ryzyka występowania incydentów sercowo-naczyniowych.



## 8. SUMMARY

---

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination of white matter fibers caused by the breakdown of the myelin sheath. It is believed that the development of autoimmune processes, chronic inflammation and the long-term impact of oxidative stress are the main causes of demyelination, which in consequence lead to neuronal death. Epidemiological studies confirm an increased risk of ischemic events associated with pathological blood platelet pro-thrombotic activity in patients with MS, especially in the progressive phase (PMS), which indicate the disturbance in the hemostatic role of platelets in MS course. The involvement of blood platelets in the pathogenesis of MS also includes their interactions with leukocytes and endothelial cells, leading to a violation of the BBB and infiltration of lymphocytes to the sites of demyelination foci in the CNS. Moreover, the blood platelet participation in the process of neurodegeneration involves the initiation and development of inflammatory processes and generation of reactive oxygen species (ROS).

The aim of the study was to investigate the molecular basis of increased platelet pro-thrombotic activity in PMS patients. Firstly, the functional status of platelets was assessed by determining the expression and degree of reactivity of major surface receptors for physiological platelet agonists. Then an attempt was made to determine the molecular changes of fibrinogen (as a central protein for the blood pro-thrombotic potential), and the main proteins of the cytoskeleton ( $\beta$ -tubulin and  $\beta$ -actin), which may underlie an altered hemostatic function of platelets. The next step was to perform a comparative screening analysis (PMS vs control) of the miRNA expression profile in platelets and megakaryocytes. In the last stage of the research, selected parameters of the platelet mitochondria functioning were assessed.

Analyzing the results obtained from the conducted experiments, it was found that blood platelets from PMS patients demonstrate an increased activity, as well as elevated expression levels of crucial surface receptors and an enhanced response to the action of physiological platelet agonists. It has been shown that platelets and megakaryocytes from PMS patients have an augmented concentration of fibrinogen, as well as are characterized by a different PTMs profile of the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -fibrinogen chains and exhibit changes in the sequences of the *FGA*, *FGB* and *FGG* genes that significantly differentiate the studied groups. In this work, it is also demonstrated significant changes in cytoskeleton proteins, mainly related to  $\beta$ -tubulin, which are manifested by an increased intracellular concentration of this protein and an increment in

the number of mRNA transcripts in both platelets and megakaryocytes in PMS. Changes in the sequence of the *TUBB1* gene encoding  $\beta$ -tubulin were also detected. Screening analysis of the miRNA expression profile in platelets and megakaryocytes from PMS patients showed significant changes in the amount of miRNA molecules (miR-15b-5p, miR-24-3p, miR-126-5p and miR-199a-3p) being a post-transcriptional gene expression regulators, which are involved in the essential blood platelet activation pathways, as well as differentiation and programmed cell death. In addition, it was found that in the blood platelets of PMS patients there is a growth in the intracellular level of ROS, a decrease in MMP and an increased number of mRNA transcripts for genes encoding enzymes involved in cellular oxygen metabolism (cytochrome c oxidase and GAPDH).

The obtained results may be a partial explanation of the potential molecular mechanisms responsible for the enhanced pro-thrombotic potential of platelets, contributing to the increase in the risk of cardiovascular events observed in PMS patients.

## 9. PIŚMIENICTWO

---

1. Xu, X.R., et al., *Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2016. **53**(6): p. 409-30.
2. van der Bom, J.G., et al., *Platelet count and the risk for thrombosis and death in the elderly*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2009. **7**(3): p. 399-405.
3. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, *Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis*. TheScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 781857-781857.
4. Pluthero, F.G. and W.H.A. Kahr, *The Birth and Death of Platelets in Health and Disease*. Physiology (Bethesda), 2018. **33**(3): p. 225-234.
5. Saeed, S., et al., *From Evolution of Platelets to Their Role in Heart Attacks*. Journal of Medical Sciences, 2004.
6. Saluk, J., et al., *The formation, metabolism and the evolution of blood platelets*. Postępy higieny i medycyny doświadczalnej, 2014. **68**: p. 384-92.
7. Schubert, P. and D.V. Devine, *De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine*. Vox Sang, 2010. **99**(2): p. 112-22.
8. Bijak, M., et al., *[The synthesis of proteins in unnuclated blood platelets]*. Postępy Hig Med Dosw (Online), 2013. **67**: p. 672-9.
9. Weyrich, A.S., et al., *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2009. **7**(2): p. 241-246.
10. Angenieux, C., et al., *Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0148064.
11. Kim, H.L., *Comparison of oligonucleotide-microarray and serial analysis of gene expression (SAGE) in transcript profiling analysis of megakaryocytes derived from CD34+ cells*. Exp Mol Med, 2003. **35**(5): p. 460-6.
12. Gnatenko, D., et al., *Transcript Profiling of Human Platelets Using Microarray and Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2009. **496**: p. 245-72.
13. Hou, Y., et al., *Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis*. Journal of biomedical research, 2015. **29**(6): p. 437-444.
14. Fitch-Tewfik, J.L. and R. Flaumenhaft, *Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells*. Frontiers in endocrinology, 2013. **4**: p. 77-77.
15. White, J.G., *Use of the electron microscope for diagnosis of platelet disorders*. Semin Thromb Hemost, 1998. **24**(2): p. 163-8.
16. Maynard, D.M., et al., *The alpha-granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(8): p. 1786-96.
17. Sharda, A. and R. Flaumenhaft, *The life cycle of platelet granules*. F1000Research, 2018. **7**: p. 236-236.
18. Heijnen, H. and P. van der Sluijs, *Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2015. **13**(12): p. 2141-2151.
19. Duerschmied, D., C. Bode, and I. Ahrens, *Immune functions of platelets*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 678-91.
20. O'Donnell, V.B., R.C. Murphy, and S.P. Watson, *Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets*. Circulation research, 2014. **114**(7): p. 1185-1203.
21. Saboor, M., et al., *Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology*. Pakistan journal of medical sciences, 2013. **29**(3): p. 891-896.
22. Rivera, J., et al., *Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation*. Haematologica, 2009. **94**(5): p. 700-711.

23. Bennett, J.S., B.W. Berger, and P.C. Billings, *The structure and function of platelet integrins*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 200-5.
24. Madamanchi, A., S.A. Santoro, and M.M. Zutter, *alpha2beta1 Integrin*. Adv Exp Med Biol, 2014. **819**: p. 41-60.
25. Clemetson, K.J. and J.M. Clemetson, *Platelet GPIb complex as a target for anti-thrombotic drug development*. Thromb Haemost, 2008. **99**(3): p. 473-9.
26. Eble, J.A., et al., *Dramatic and concerted conformational changes enable rhodocetin to block  $\alpha 2\beta 1$  integrin selectively*. PLOS Biology, 2017. **15**(7): p. e2001492.
27. Wagner, C.L., et al., *Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets*. Blood, 1996. **88**(3): p. 907-14.
28. Springer, T.A., J. Zhu, and T. Xiao, *Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin  $\alpha IIb\beta 3$* . The Journal of cell biology, 2008. **182**(4): p. 791-800.
29. Yakushkin, V.V., et al., *Glycoprotein IIB-IIIa content and platelet aggregation in healthy volunteers and patients with acute coronary syndrome*. Platelets, 2011. **22**(4): p. 243-51.
30. Machado-Pineda, Y., et al., *CD9 Controls Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Mediated Cell Adhesion by Modulating Its Association With the Metalloproteinase ADAM17*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**: p. 2474.
31. Schaff, M., et al., *Integrin  $\alpha 6\beta 1$  is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis*. Circulation, 2013. **128**(5): p. 541-52.
32. Diacovo, T.G., et al., *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1243-51.
33. Lonsdorf, A.S., et al., *Engagement of  $\alpha IIb\beta 3$  (GPIIb/IIIa) with  $\alpha v\beta 3$  integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(3): p. 2168-2178.
34. Li, R. and J. Emsley, *The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2013. **11**(4): p. 605-614.
35. Vanhoorelbeke, K., et al., *Inhibition of platelet glycoprotein Ib and its antithrombotic potential*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(26): p. 2684-97.
36. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 403-12.
37. Klintman, D., X. Li, and H. Thorlacius, *Important Role of P-Selectin for Leukocyte Recruitment, Hepatocellular Injury, and Apoptosis in Endotoxemic Mice*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2004. **11**(1): p. 56.
38. Graff, J., et al., *Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): p. 952-7.
39. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo*. The Journal of experimental medicine, 2000. **191**(8): p. 1413-1422.
40. Dangelmaier, C., et al., *Potentiation of thromboxane A2-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway*. Thromb Haemost, 2001. **85**(2): p. 341-8.
41. Nieswandt, B., et al., *Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin  $\alpha IIb\beta 3$  activation in platelets*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39493-8.
42. Andre, P., et al., *P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 398-406.
43. Kunapuli, S.P., et al., *Platelet purinergic receptors*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(2): p. 175-80.
44. Storey, R.F., et al., *Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y12 receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin*. Thromb Haemost, 2002. **88**(3): p. 488-94.

45. Mansour, A., et al., *P2Y<sub>12</sub> Inhibition beyond Thrombosis: Effects on Inflammation*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(4): p. 1391.
46. Reiter, R., et al., *Regulation of protease-activated receptor 1 (PAR1) on platelets and responsiveness to thrombin receptor activating peptide (TRAP) during systemic inflammation in humans*. Thromb Haemost, 2003. **90**(11): p. 898-903.
47. Kahn, M.L., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 879-87.
48. Heuberger, D.M. and R.A. Schuepbach, *Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases*. Thrombosis Journal, 2019. **17**(1): p. 4.
49. Henriksen, R.A. and V.K. Hanks, *PAR-4 agonist AYPGKF stimulates thromboxane production by human platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(5): p. 861-6.
50. Jiang, L., et al., *A critical role of thrombin/PAR-1 in ADP-induced platelet secretion and the second wave of aggregation*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(5): p. 930-40.
51. Lova, P., et al., *Contribution of protease-activated receptors 1 and 4 and glycoprotein Ib-IX-V in the G(i)-independent activation of platelet Rap1B by thrombin*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25299-306.
52. Chung, A.W.Y., et al., *Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets*. British journal of pharmacology, 2002. **135**(5): p. 1123-1132.
53. Inwald David, P., et al., *CD40 Is Constitutively Expressed on Platelets and Provides a Novel Mechanism for Platelet Activation*. Circulation Research, 2003. **92**(9): p. 1041-1048.
54. French, S.L. and J.R. Hamilton, *Protease-activated receptor 4: from structure to function and back again*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(20): p. 2952-65.
55. Ceruso, M.A., et al., *Thrombin receptor-activating peptides (TRAPs): investigation of bioactive conformations via structure-activity, spectroscopic, and computational studies*. Bioorg Med Chem, 1999. **7**(11): p. 2353-71.
56. Shiraki, R., et al., *Expression of Toll-like receptors on human platelets*. Thromb Res, 2004. **113**(6): p. 379-85.
57. Friedman, E.A., et al., *Understanding the role of prostaglandin E2 in regulating human platelet activity in health and disease*. Thrombosis research, 2015. **136**(3): p. 493-503.
58. Stitham, J., et al., *Prostacyclin: An Inflammatory Paradox*. Frontiers in Pharmacology, 2011. **2**: p. 24.
59. Noetzli, L.J., S.L. French, and K.R. Machlus, *New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(7): p. 1288-1300.
60. Hartwig, J. and J. Italiano, Jr., *The birth of the platelet*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1580-6.
61. Kaushansky, K., *Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis*. Blood, 2008. **111**(3): p. 981-6.
62. Woolthuis, C.M. and C.Y. Park, *Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage*. Blood, 2016. **127**(10): p. 1242-1248.
63. Kondo, M., *Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors*. Immunological reviews, 2010. **238**(1): p. 37-46.
64. Xavier-Ferruccio, J. and D.S. Krause, *Concise Review: Bipotent Megakaryocytic-Erythroid Progenitors: Concepts and Controversies*. Stem cells (Dayton, Ohio), 2018. **36**(8): p. 1138-1145.
65. Bluteau, D., et al., *Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 227-34.
66. Tanum, G., *The megakaryocyte DNA content and platelet formation after the sublethal whole body irradiation of rats*. Blood, 1984. **63**(4): p. 917-20.
67. Odell, T.T., Jr., C.W. Jackson, and D.G. Gosslee, *Maturation of rat megakaryocytes studied by microspectrophotometric measurement of DNA*. Proc Soc Exp Biol Med, 1965. **119**(4): p. 1194-9.

68. Raslova, H., et al., *Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification*. Blood, 2003. **101**(2): p. 541-4.
69. Long, M.W., *Cyclins and cell division kinases in megakaryocytic endomitosis*. C R Acad Sci III, 1995. **318**(6): p. 649-54.
70. Eliades, A., N. Papadantonakis, and K. Ravid, *New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18909-17.
71. Wolgemuth, D.J., M. Manterola, and A. Vasileva, *Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis*. The International journal of developmental biology, 2013. **57**(2-4): p. 159-168.
72. Muntean, A.G., et al., *Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5199-5207.
73. Tijssen, M.R. and C. Ghevaert, *Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 2013. **11**(4): p. 593-604.
74. Mills, E.W., R. Green, and N.T. Ingolia, *Slowed decay of mRNAs enhances platelet specific translation*. Blood, 2017. **129**(17): p. e38-e48.
75. Eckly, A., et al., *Biogenesis of the demarcation membrane system (DMS) in megakaryocytes*. Blood, 2014. **123**(6): p. 921-930.
76. Selvadurai, M.V. and J.R. Hamilton, *Structure and function of the open canalicular system – the platelet's specialized internal membrane network*. Platelets, 2018. **29**(4): p. 319-325.
77. Klement, G.L., et al., *Platelets actively sequester angiogenesis regulators*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2835-42.
78. McArthur, K., S. Chappaz, and B.T. Kile, *Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage*. Blood, 2018. **131**(6): p. 605-610.
79. Kuter, D.J. and T.B. Gernsheimer, *Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia*. Hematology/oncology clinics of North America, 2009. **23**(6): p. 1193-1211.
80. Sattler, M., et al., *The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases*. Exp Hematol, 1995. **23**(9): p. 1040-8.
81. Rouyez, M.C., et al., *Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 4991-5000.
82. Nakao, T., et al., *PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27(Kip1)*. Cell Cycle, 2008. **7**(2): p. 257-66.
83. LaLuppa, J.A., E.T. Papoutsakis, and W.M. Miller, *Evaluation of cytokines for expansion of the megakaryocyte and granulocyte lineages*. Stem Cells, 1997. **15**(3): p. 198-206.
84. Weisdorf, D.J., et al., *Thrombopoietic cytokines in relation to platelet recovery after bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplantation, 2000. **25**(7): p. 711-715.
85. Bhattacharya, P., et al., *GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity*. Cytokine, 2015. **75**(2): p. 261-271.
86. Lefrancais, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. Nature, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
87. Grozovsky, R., K.M. Hoffmeister, and H. Falet, *Novel clearance mechanisms of platelets*. Current opinion in hematology, 2010. **17**(6): p. 585-589.
88. Harker, L.A. and C.A. Finch, *Thrombokinetis in man*. J Clin Invest, 1969. **48**(6): p. 963-74.
89. Carroll, R.C. and J.M. Gerrard, *Phosphorylation of platelet actin-binding protein during platelet activation*. Blood, 1982. **59**(3): p. 466-71.
90. Shin, E.-K., et al., *Platelet Shape Changes and Cytoskeleton Dynamics as Novel Therapeutic Targets for Anti-Thrombotic Drugs*. Biomolecules & therapeutics, 2017. **25**(3): p. 223-230.
91. Pollard, T.D., *Genomics, the cytoskeleton and motility*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 842-3.
92. Khaitlina, S.Y., *Functional specificity of actin isoforms*. Int Rev Cytol, 2001. **202**: p. 35-98.
93. Rowley, J.W., et al., *Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes*. Blood, 2011. **118**(14): p. e101-11.
94. Fox, J.E., et al., *Actin filament content and organization in unstimulated platelets*. J Cell Biol, 1984. **98**(6): p. 1985-91.

95. Tseng, Y., et al., *How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **334**(1): p. 183-92.
96. Schäfer, C., et al., *The filopodium: a stable structure with highly regulated repetitive cycles of elongation and persistence depending on the actin cross-linker fascin*. *Cell adhesion & migration*, 2011. **5**(5): p. 431-438.
97. Sedzro, D., et al., *Structure and Functions: ERM Protein Family*. 2018.
98. Bearer, E.L., J.M. Prakash, and Z. Li, *Actin dynamics in platelets*. *International review of cytology*, 2002. **217**: p. 137-182.
99. Fox, J.E., *Cytoskeletal proteins and platelet signaling*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(1): p. 198-213.
100. Ahern-Djamali, S.M., et al., *Mutations in Drosophila enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains*. *Mol Biol Cell*, 1998. **9**(8): p. 2157-71.
101. Massberg, S., et al., *Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice*. *Blood*, 2004. **103**(1): p. 136-42.
102. Eigenthaler, M., et al., *Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells*. *Eur J Biochem*, 1992. **205**(2): p. 471-81.
103. Blume, C., et al., *AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(7): p. 4601-12.
104. Butt, E., et al., *cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(20): p. 14509-17.
105. Horstrup, K., et al., *Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition*. *Eur J Biochem*, 1994. **225**(1): p. 21-7.
106. Aleil, B., et al., *Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(1): p. 85-92.
107. Zeiler, M., M. Moser, and M. Mann, *Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range*. *Mol Cell Proteomics*, 2014. **13**(12): p. 3435-45.
108. Schwer, H.D., et al., *A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets*. *Curr Biol*, 2001. **11**(8): p. 579-86.
109. Cerecedo, D., *Platelet cytoskeleton and its hemostatic role*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2013. **24**(8): p. 798-808.
110. Stoupa, A., et al., *TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology*. *EMBO Mol Med*, 2018. **10**(12).
111. Strassel, C., et al., *An essential role for alpha4A-tubulin in platelet biogenesis*. *Life Sci Alliance*, 2019. **2**(1).
112. Patel, S.R., et al., *Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes*. *Blood*, 2005. **106**(13): p. 4076-85.
113. Abraham, Z., et al., *Kinesin and Dynein Mechanics: Measurement Methods and Research Applications*. *Journal of biomechanical engineering*, 2018. **140**(2): p. 0208051-02080511.
114. Cuenca-Zamora, E.J., et al., *Tubulin in Platelets: When the Shape Matters*. *International journal of molecular sciences*, 2019. **20**(14): p. 3484.
115. Patel-Hett, S., et al., *Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules*. *Blood*, 2008. **111**(9): p. 4605-16.
116. Chakraborti, S., et al., *The emerging role of the tubulin code: From the tubulin molecule to neuronal function and disease*. *Cytoskeleton*, 2016. **73**(10): p. 521-550.
117. Patel-Hett, S., et al., *Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules*. *Blood*, 2008. **111**(9): p. 4605-4616.

118. Gundersen, G.G., M.H. Kalnoski, and J.C. Bulinski, *Distinct populations of microtubules: Tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo*. *Cell*, 1984. **38**(3): p. 779-789.
119. Li, L. and X.-J. Yang, *Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015. **72**(22): p. 4237-4255.
120. Janke, C. and G. Montagnac, *Causes and Consequences of Microtubule Acetylation*. *Current Biology*, 2017. **27**(23): p. R1287-R1292.
121. Sadoul, K., et al., *HDAC6 controls the kinetics of platelet activation*. *Blood*, 2012. **120**(20): p. 4215-4218.
122. Thomas, S.G., 3 - *The Structure of Resting and Activated Platelets*, in *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 47-77.
123. Khan, A.O., et al., *Post-translational polymodification of the C-terminal tail of *TUBB1* regulates motor protein processivity in platelet production and function*. *bioRxiv*, 2019: p. 595868.
124. van Dijk, J., et al., *Microtubule polyglutamylation and acetylation drive microtubule dynamics critical for platelet formation*. *BMC Biology*, 2018. **16**(1): p. 116.
125. Goodman, S.L., et al., *Platelet shape change and cytoskeletal reorganization on polyurethaneureas*. *J Biomed Mater Res*, 1989. **23**(1): p. 105-23.
126. Canobbio, I., et al., *Altered cytoskeleton organization in platelets from patients with MYH9-related disease*. *J Thromb Haemost*, 2005. **3**(5): p. 1026-35.
127. Berrou, E., et al., *Heterogeneity of platelet functional alterations in patients with filamin A mutations*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(1): p. e11-8.
128. Bury, L., et al., *Cytoskeletal perturbation leads to platelet dysfunction and thrombocytopenia in variant forms of Glanzmann thrombasthenia*. *Haematologica*, 2016. **101**(1): p. 46-56.
129. Mountford, J.K., et al., *The class II PI 3-kinase, PI3KC2a, links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function*. *Nature Communications*, 2015. **6**(1): p. 6535.
130. Escolar, G., E. Leistikow, and J.G. White, *The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets*. *Blood*, 1989. **74**(6): p. 1983-8.
131. Kannan, M., F. Ahmad, and R. Saxena, *Platelet activation markers in evaluation of thrombotic risk factors in various clinical settings*. *Blood Rev*, 2019. **37**: p. 100583.
132. Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. *Frontiers in immunology*, 2015. **6**: p. 98-98.
133. von Hundelshausen, P. and M.M.N. Schmitt, *Platelets and their chemokines in atherosclerosis-clinical applications*. *Frontiers in physiology*, 2014. **5**: p. 294-294.
134. Csongradi, E., et al., *Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients*. *Thromb Haemost*, 2011. **106**(4): p. 683-92.
135. Rectenwald, J.E., et al., *D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(6): p. 1312-7.
136. Mussbacher, M., et al., *Optimized plasma preparation is essential to monitor platelet-stored molecules in humans*. *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0188921.
137. Chen, Z., et al., *Activation and shedding of platelet glycoprotein IIb/IIIa under non-physiological shear stress*. *Molecular and cellular biochemistry*, 2015. **409**(1-2): p. 93-101.
138. Boilard, E., A.C. Duchez, and A. Brisson, *The diversity of platelet microparticles*. *Curr Opin Hematol*, 2015. **22**(5): p. 437-44.
139. Ma, R., et al., *Phosphatidylserine-mediated platelet clearance by endothelium decreases platelet aggregates and procoagulant activity in sepsis*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 4978-4978.
140. Lam, F.W., K.V. Vijayan, and R.E. Rumbaut, *Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells*. *Comprehensive Physiology*, 2015. **5**(3): p. 1265-1280.
141. Kawabata, K., et al., *Soluble P-selectin is released from activated platelets in vivo during hemodialysis*. *Nephron*, 1998. **78**(2): p. 148-55.
142. Carter, A.M., et al., *Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease*. *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(8): p. 1718-23.



143. Alehagen, U. and T. Lindahl, *sP-selectin is a useful biomarker for cardiovascular risk*. Cardiovascular Endocrinology, 2015. **4**: p. 22-27.
144. Ferroni, P., et al., *Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation*. Clin Chim Acta, 2009. **399**(1-2): p. 88-91.
145. Kappelmayer, J. and B. Nagy, Jr., *The Interaction of Selectins and PSGL-1 as a Key Component in Thrombus Formation and Cancer Progression*. BioMed research international, 2017. **2017**: p. 6138145-6138145.
146. McGregor, L., J. Martin, and J.L. McGregor, *Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 830-7.
147. Irving, P.M., et al., *Formation of platelet-leukocyte aggregates in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(4): p. 361-72.
148. Dziedzic, A. and M. Bijak, *Interactions between platelets and leukocytes in pathogenesis of multiple sclerosis*. Adv Clin Exp Med, 2019. **28**(2): p. 277-285.
149. Finsterbusch, M., et al., *Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates*. Platelets, 2018. **29**(7): p. 677-685.
150. Merten, M. and P. Thiagarajan, *Role for sulfatides in platelet aggregation*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2955-60.
151. Huang, J., et al., *Platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting*. Journal of Hematology & Oncology, 2019. **12**(1): p. 26.
152. Nieswandt, B., D. Varga-Szabo, and M. Elvers, *Integrins in platelet activation*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 206-9.
153. Nagy, B., Jr., I.B. Debreceni, and J. Kappelmayer, *Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers*. Ejiifcc, 2013. **23**(4): p. 124-34.
154. Tomczyńska, M., et al., *The potential contribution and role of a blood platelets in autoimmune thyroid diseases*. Journal of cellular and molecular medicine, 2018. **22**(12): p. 6386-6390.
155. Lievens, D., et al., *Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4317-27.
156. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
157. Garlich, C.D., et al., *Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia*. Stroke, 2003. **34**(6): p. 1412-8.
158. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.
159. Karnell, J.L., et al., *Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. **141**: p. 92-103.
160. Siljander, P.R., *Platelet-derived microparticles - an updated perspective*. Thromb Res, 2011. **127 Suppl 2**: p. S30-3.
161. Voukalis, C., E. Shantsila, and G.Y.H. Lip, *Microparticles and cardiovascular diseases*. Annals of Medicine, 2019. **51**(3-4): p. 193-223.
162. Hayasaka, K., et al., *[Advancement of platelet activation measurement: focusing on platelet-derived microparticle measurement]*. Rinsho Byori, 2006. **54**(3): p. 250-5.
163. Aatonen, M.T., et al., *Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
164. Kailashiya, J., *Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations*. Anal Biochem, 2018. **546**: p. 78-85.
165. Tao, S.-C., S.-C. Guo, and C.-Q. Zhang, *Platelet-derived Extracellular Vesicles: An Emerging Therapeutic Approach*. International journal of biological sciences, 2017. **13**(7): p. 828-834.
166. Li, X. and H. Cong, *Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome*. Tex Heart Inst J, 2009. **36**(2): p. 134-9.
167. Vajen, T., S.F. Mause, and R.R. Koenen, *Microparticles from platelets: novel drivers of vascular inflammation*. Thromb Haemost, 2015. **114**(2): p. 228-36.
168. Morel, O., et al., *Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses*. Platelets, 2008. **19**(1): p. 9-23.

169. Badimon, L., et al., *Role of Platelet-Derived Microvesicles As Crosstalk Mediators in Atherothrombosis and Future Pharmacology Targets: A Link between Inflammation, Atherosclerosis, and Thrombosis*. *Frontiers in pharmacology*, 2016. **7**: p. 293-293.
170. Italiano, J.E., Jr., A.T. Mairuhu, and R. Flaumenhaft, *Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes*. *Curr Opin Hematol*, 2010. **17**(6): p. 578-84.
171. Campello, E., et al., *Modulating thrombotic diathesis in hereditary thrombophilia and antiphospholipid antibody syndrome: a role for circulating microparticles?* *Clin Chem Lab Med*, 2017. **55**(7): p. 934-943.
172. Bucciarelli, P., et al., *Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism*. *Thromb Res*, 2012. **129**(5): p. 591-7.
173. Papadavid, E., et al., *Increased levels of circulating platelet-derived microparticles in psoriasis: Possible implications for the associated cardiovascular risk*. *World J Cardiol*, 2016. **8**(11): p. 667-675.
174. George, J.N., E.B. Pickett, and R. Heinz, *Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate*. *Blood*, 1986. **68**(1): p. 307-9.
175. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. *Crit Rev Biotechnol*, 2017. **37**(2): p. 163-176.
176. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. *Current protocols in immunology*, 2018. **120**: p. 5.1.1-5.1.11.
177. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007. **106**: p. 19-39.
178. Han, Y., et al., *Review: imaging technologies for flow cytometry*. *Lab on a chip*, 2016. **16**(24): p. 4639-4647.
179. Givan, A.L., *Flow cytometry: an introduction*. *Methods Mol Biol*, 2011. **699**: p. 1-29.
180. Telford, W.G., *Overview of Lasers for Flow Cytometry*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1678**: p. 447-479.
181. Bleesing, J.J. and T.A. Fleisher, *Immunophenotyping*. *Semin Hematol*, 2001. **38**(2): p. 100-10.
182. Flores-Montero, J., et al., *Fluorochrome choices for multi-color flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 2019. **475**: p. 112618.
183. Im, M., et al., *Comparative quantitative analysis of cluster of differentiation 45 antigen expression on lymphocyte subsets*. *Korean J Lab Med*, 2011. **31**(3): p. 148-53.
184. Caruso, A., et al., *Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation*. *Cytometry*, 1997. **27**(1): p. 71-6.
185. Gros, A., V. Ollivier, and B. Ho-Tin-Noé, *Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair*. *Frontiers in immunology*, 2015. **5**: p. 678-678.
186. Puurunen, M.K., et al., *Platelet function as a risk factor for venous thromboembolism in the Framingham Heart Study*. *Thrombosis research*, 2017. **151**: p. 57-62.
187. Nagy, B., Jr., I.B. Debreceni, and J. Kappelmayer, *Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers*. *EJIFCC*, 2013. **23**(4): p. 124-134.
188. Ueno, M., et al., *Role of platelets and antiplatelet therapy in cardiovascular disease*. *J Atheroscler Thromb*, 2011. **18**(6): p. 431-42.
189. Kappelmayer, J., et al., *The emerging value of P-selectin as a disease marker*. *Clin Chem Lab Med*, 2004. **42**(5): p. 475-86.
190. Zeller, J.A., D. Tschoepe, and C. Kessler, *Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia*. *Thromb Haemost*, 1999. **81**(3): p. 373-7.
191. Remenyi, G., et al., *Comparison of coated-platelet levels in patients with essential thrombocythemia with and without hydroxyurea treatment*. *Platelets*, 2013. **24**(6): p. 486-92.
192. Tarnow, I., et al., *Nephropathy in type 1 diabetes is associated with increased circulating activated platelets and platelet hyperreactivity*. *Platelets*, 2009. **20**(7): p. 513-9.
193. Schneider, D.J., et al., *Association between increased platelet P-selectin expression and obesity in patients with type 2 diabetes: a BARI 2D (Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes) substudy*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(5): p. 944-9.
194. Lukasik, M., et al., *Chronic hyper-reactivity of platelets resulting in enhanced monocyte recruitment in patients after ischaemic stroke*. *Platelets*, 2012. **23**(2): p. 132-42.

195. Alberti, S., et al., *Platelet-leukocyte mixed conjugates in patients with atrial fibrillation*. Platelets, 2009. **20**(4): p. 235-41.
196. Michelson, A.D., et al., *Evaluation of Platelet Function by Flow Cytometry*. Methods, 2000. **21**(3): p. 259-270.
197. Tomer, A., *Platelet activation as a marker for in vivo prothrombotic activity: detection by flow cytometry*. J Biol Regul Homeost Agents, 2004. **18**(2): p. 172-7.
198. Blair, T.A., A.L. Frelinger, and A.D. Michelson, *35 - Flow Cytometry*, in *Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 627-651.
199. Ritchie, J.L., H.D. Alexander, and I.M. Rea, *Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood--methodological considerations*. Clin Lab Haematol, 2000. **22**(6): p. 359-63.
200. Hu, H., M. Daleskog, and N. Li, *Influences of fixatives on flow cytometric measurements of platelet P-selectin expression and fibrinogen binding*. Thromb Res, 2000. **100**(3): p. 161-6.
201. Brown, M. and C. Wittwer, *Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology*. Clinical Chemistry, 2000. **46**(8): p. 1221-1229.
202. Matzdorff, A., *Platelet function tests and flow cytometry to monitor antiplatelet therapy*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(4): p. 393-9.
203. Morel, A., et al., *Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2017. **430**(1): p. 69-80.
204. Nielsen, M.H., et al., *A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma*. Journal of extracellular vesicles, 2014. **3**: p. 10.3402/jev.v3.20795.
205. Mobarrez, F., et al., *A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles*. Thrombosis Research, 2010. **125**(3): p. e110-e116.
206. Yamazaki, M., S. Uchiyama, and M. Iwata, *Measurement of Platelet Fibrinogen Binding and P-Selectin Expression by Flow Cytometry in Patients with Cerebral Infarction*. Thrombosis Research, 2001. **104**(3): p. 197-205.
207. Gremmel, T., R. Koppensteiner, and S. Panzer, *Comparison of Aggregometry with Flow Cytometry for the Assessment of Agonists'-Induced Platelet Reactivity in Patients on Dual Antiplatelet Therapy*. PloS one, 2015. **10**(6): p. e0129666-e0129666.
208. Godino, C., et al., *Comparison of VerifyNow-P2Y12 test and Flow Cytometry for monitoring individual platelet response to clopidogrel. What is the cut-off value for identifying patients who are low responders to clopidogrel therapy?* Thrombosis Journal, 2009. **7**(1): p. 4.
209. Gachet, C. and B. Aleil, *Testing antiplatelet therapy*. European Heart Journal Supplements, 2008. **10**(suppl\_A): p. A28-A34.
210. van der Meer, P.F., et al., *A flow cytometric method for platelet counting in platelet concentrates*. Transfusion, 2012. **52**(1): p. 173-80.
211. Finak, G., et al., *Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 20686-20686.
212. Ghasemi, N., S. Razavi, and E. Nikzad, *Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy*. Cell journal, 2017. **19**(1): p. 1-10.
213. Goldenberg, M.M., *Multiple sclerosis review*. P & T : a peer-reviewed journal for formulary management, 2012. **37**(3): p. 175-184.
214. Katz Sand, I., *Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis*. Curr Opin Neurol, 2015. **28**(3): p. 193-205.
215. Loma, I. and R. Heyman, *Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment*. Current neuropharmacology, 2011. **9**(3): p. 409-416.
216. Galea, I., et al., *An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(9): p. 2023-2030.
217. Olsson, T., et al., *Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma*. J Clin Invest, 1990. **86**(3): p. 981-5.
218. Spencer, J.I., J.S. Bell, and G.C. DeLuca, *Vascular pathology in multiple sclerosis: reframing pathogenesis around the blood-brain barrier*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2018. **89**(1): p. 42-52.

219. Bijak, M., et al., *Increased level of fibrinogen chains in the proteome of blood platelets in secondary progressive multiple sclerosis patients*. J Cell Mol Med, 2019. **23**(5): p. 3476-3482.
220. Morel, A., et al., *The increased level of COX-dependent arachidonic acid metabolism in blood platelets from secondary progressive multiple sclerosis patients*. Molecular and cellular biochemistry, 2016. **420**(1-2): p. 85-94.
221. Morel, A., et al., *Markers of oxidative/nitrative damage of plasma proteins correlated with EDSS and BDI scores in patients with secondary progressive multiple sclerosis*. Redox Rep, 2017. **22**(6): p. 547-555.
222. Nathanson, M. and J.P. Savitsky, *Platelet adhesive index studies in multiple sclerosis and other neurologic disorders*. J Nerv Ment Dis, 1952. **116**(4): p. 357-8.
223. Sheremata, W.A., et al., *Evidence of platelet activation in multiple sclerosis*. Journal of neuroinflammation, 2008. **5**: p. 27-27.
224. Putnam, T.J., *LESIONS OF "ENCEPHALOMYELITIS" AND MULTIPLE SCLEROSIS: VENOUS THROMBOSIS AS THE PRIMARY ALTERATION*. Journal of the American Medical Association, 1937. **108**(18): p. 1477-1480.
225. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.
226. Langer, H.F. and T. Chavakis, *Platelets and neurovascular inflammation*. Thromb Haemost, 2013. **110**(5): p. 888-93.
227. Langer, H.F., et al., *Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Circ Res, 2012. **110**(9): p. 1202-10.
228. Christiansen, C.F., et al., *Risk of arterial cardiovascular diseases in patients with multiple sclerosis: a population-based cohort study*. Neuroepidemiology, 2010. **35**(4): p. 267-74.
229. Peeters, P.J., et al., *The risk of venous thromboembolism in patients with multiple sclerosis: the Clinical Practice Research Datalink*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(4): p. 444-51.
230. Zoller, B., et al., *Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden*. Lancet, 2012. **379**(9812): p. 244-9.
231. Mincu, R.I., et al., *Cardiovascular Dysfunction in Multiple Sclerosis*. Maedica, 2015. **10**(4): p. 364-370.
232. Persson, R., et al., *Incident cardiovascular disease in patients diagnosed with multiple sclerosis: A multi-database study*. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 2020. **37**.
233. Brønnum-Hansen, H., N. Koch-Henriksen, and E. Stenager, *The Danish Multiple Sclerosis Registry*. Scandinavian Journal of Public Health, 2011. **39**(7\_suppl): p. 62-64.
234. Ivanov, I.I., et al., *Platelet P-selectin triggers rapid surface exposure of tissue factor in monocytes*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 13397.
235. Beckhauser, T.F., J. Francis-Oliveira, and R. De Pasquale, *Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity*. Journal of experimental neuroscience, 2016. **10**(Suppl 1): p. 23-48.
236. Dziedzic, A., et al., *Oxidative Damage of Blood Platelets Correlates with the Degree of Psychophysical Disability in Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020. **2020**: p. 1-12.
237. Qiao, J., et al., *Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species*. Redox biology, 2018. **14**: p. 126-130.
238. Garcia-Souza, L.F. and M.F. Oliveira, *Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology*. Int J Biochem Cell Biol, 2014. **50**: p. 156-60.
239. Melchinger, H., et al., *Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone*. Frontiers in cardiovascular medicine, 2019. **6**: p. 153-153.
240. Grimaldi, M.C., et al., *PLATELET MITOCHONDRIA ENHANCE INFLAMMATORY SETTING AND APOPTOSIS IN DIABETIC PATIENTS WITH NSTEMI ACUTE CORONARY SYNDROME*. Journal of the American College of Cardiology, 2019. **73**(9 Supplement 1): p. 56.
241. Boudreau, L.H., et al., *Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation*. Blood, 2014. **124**(14): p. 2173-2183.

242. Masselli, E., et al., *ROS in Platelet Biology: Functional Aspects and Methodological Insights*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(14): p. 4866.
243. Giorgi, C., et al., *Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 77-85.
244. Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt, *Calcium signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(7): p. 1057-66.
245. Suski, J.M., et al., *Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation*. Methods Mol Biol, 2012. **810**: p. 183-205.
246. Hwang, A.B., D.-E. Jeong, and S.-J. Lee, *Mitochondria and organismal longevity*. Current genomics, 2012. **13**(7): p. 519-532.
247. Rajasekaran, N.S., et al., *Human alpha B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice*. Cell, 2007. **130**(3): p. 427-39.
248. Howell, N., et al., *mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders*. Trends Genet, 2005. **21**(11): p. 583-6.
249. Cha, M.-Y., D.K. Kim, and I. Mook-Jung, *The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases*. Experimental & molecular medicine, 2015. **47**(3): p. e150-e150.
250. Xu, J., et al., *Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(2): p. 195-202.
251. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. Frontiers in Endocrinology, 2018. **9**: p. 402.
252. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(8): p. 509-524.
253. Dahiya, N., et al., *Platelet MicroRNAs: An Overview*. Transfus Med Rev, 2015. **29**(4): p. 215-9.
254. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome research, 2009. **19**(1): p. 92-105.
255. Shivdasani, R.A., *MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3646-53.
256. Stakos, D.A., et al., *Platelet microRNAs: From platelet biology to possible disease biomarkers and therapeutic targets*. Platelets, 2013. **24**(8): p. 579-89.
257. Edelstein, L.C. and P.F. Bray, *MicroRNAs in platelet production and activation*. Blood, 2011. **117**(20): p. 5289-5296.
258. Pordzik, J., et al., *The Potential Role of Platelet-Related microRNAs in the Development of Cardiovascular Events in High-Risk Populations, Including Diabetic Patients: A Review*. Frontiers in endocrinology, 2018. **9**: p. 74-74.
259. Plé, H., et al., *The repertoire and features of human platelet microRNAs*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50746.
260. Undi, R., R. Kandi, and R. Gutti, *MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators*. Advances in Hematology, 2013. **2013**: p. 695754.
261. Landry, P., et al., *Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 961-6.
262. Nagalla, S., et al., *Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5189-97.
263. Gatsiou, A., et al., *MicroRNAs in platelet biogenesis and function: implications in vascular homeostasis and inflammation*. Curr Vasc Pharmacol, 2012. **10**(5): p. 524-31.
264. Qu, Z., W. Li, and B. Fu, *MicroRNAs in Autoimmune Diseases*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 527895.
265. Teuber-Hanselmann, S., E. Meinl, and A. Junker, *MicroRNAs in gray and white matter multiple sclerosis lesions: impact on pathophysiology*. The Journal of Pathology, 2020. **250**(5): p. 496-509.
266. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis, *Nomenclature for the description of human sequence variations*. Hum Genet, 2001. **109**(1): p. 121-4.
267. Thompson, A.J., et al., *Multiple sclerosis*. Lancet, 2018. **391**(10130): p. 1622-1636.

268. Olsson, T., L.F. Barcellos, and L. Alfredsson, *Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol, 2017. **13**(1): p. 25-36.
269. Plantone, D., et al., *A Perspective of Coagulation Dysfunction in Multiple Sclerosis and in Experimental Allergic Encephalomyelitis*. Frontiers in Neurology, 2019. **9**: p. 1175.
270. Langer, H.F., et al., *Platelets contribute to the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Circ Res, 2012. **110**(9): p. 1202-10.
271. Sonia D'Souza, C., et al., *Platelets Drive Inflammation and Target Gray Matter and the Retina in Autoimmune-Mediated Encephalomyelitis*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2018. **77**(7): p. 567-576.
272. Jadidi, E., M. Mohammadi, and T. Moradi, *High risk of cardiovascular diseases after diagnosis of multiple sclerosis*. Mult Scler, 2013. **19**(10): p. 1336-40.
273. Roshanisefat, H., et al., *Multiple sclerosis clinical course and cardiovascular disease risk – Swedish cohort study*. European Journal of Neurology, 2014. **21**(11): p. 1353-e88.
274. Rawish, E., et al., *Platelets as Mediators of Neuroinflammation and Thrombosis*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**: p. 2560.
275. Gross, H.J. and C. Watson, *Characteristics, burden of illness, and physical functioning of patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis: a cross-sectional US survey*. Neuropsychiatric disease and treatment, 2017. **13**: p. 1349-1357.
276. Ueba, T., et al., *Plasma level of platelet-derived microparticles is associated with coronary heart disease risk score in healthy men*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 342-9.
277. Gowert, N.S., et al., *Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease*. PloS one, 2014. **9**(2): p. e90523-e90523.
278. Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet, *Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis*. Molecular immunology, 2010. **47**(13): p. 2170-2175.
279. Waubant, E., *Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis*. Dis Markers, 2006. **22**(4): p. 235-44.
280. Danese, S., et al., *Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2011-5.
281. Ziliotto, N., et al., *Coagulation Pathways in Neurological Diseases: Multiple Sclerosis*. Frontiers in Neurology, 2019. **10**: p. 409.
282. Simak, J., et al., *Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1296-302.
283. Wang, J.-M., et al., *Increased circulating CD31+/CD42- microparticles are associated with impaired systemic artery elasticity in healthy subjects*. American journal of hypertension, 2007. **20**(9): p. 957-964.
284. Lacroix, R., et al., *Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013. **11**(s1): p. 24-35.
285. Curvers, J., et al., *Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort*. Transfusion, 2008. **48**(7): p. 1439-46.
286. Furie, B. and B.C. Furie, *Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation*. Trends Mol Med, 2004. **10**(4): p. 171-8.
287. Hoyer, F.F., G. Nickenig, and N. Werner, *Microparticles--messengers of biological information*. Journal of cellular and molecular medicine, 2010. **14**(9): p. 2250-2256.
288. Hosseinzadeh, S., et al., *Plasma microparticles in Alzheimer's disease: The role of vascular dysfunction*. Metab Brain Dis, 2018. **33**(1): p. 293-299.
289. Dye, J.R., A.J. Ullal, and D.S. Pisetsky, *The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol, 2013. **78**(2): p. 140-8.
290. Sellam, J., et al., *Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R156.

291. Habets, K.L., et al., *Anti-citrullinated protein antibodies contribute to platelet activation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2015. **17**(1): p. 209.
292. Dorsam, R.T. and S.P. Kunapuli, *Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation*. *The Journal of clinical investigation*, 2004. **113**(3): p. 340-345.
293. Wallentin, L., *P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(16): p. 1964-77.
294. Wu, C.-C., et al., *The roles and mechanisms of PAR4 and P2Y12/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in maintaining thrombin-induced platelet aggregation*. *British journal of pharmacology*, 2010. **161**(3): p. 643-658.
295. Kim, S., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate Gi signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G<sub>s</sub> signaling*. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3629-3636.
296. Waldmann, R., M. Nieberding, and U. Walter, *Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases*. *Eur J Biochem*, 1987. **167**(3): p. 441-8.
297. Wentworth, J.K., G. Pula, and A.W. Poole, *Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets*. *Biochem J*, 2006. **393**(Pt 2): p. 555-64.
298. Shin, J.-H., et al., *Vasodilator-stimulated phosphoprotein-phosphorylation by ginsenoside Ro inhibits fibrinogen binding to  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 in thrombin-induced human platelets*. *Journal of ginseng research*, 2016. **40**(4): p. 359-365.
299. Mustard, J.F., et al., *Factors responsible for ADP-induced release reaction of human platelets*. *Am J Physiol*, 1975. **228**(6): p. 1757-65.
300. Woulfe, D., J. Yang, and L. Brass, *ADP and platelets: the end of the beginning*. *The Journal of clinical investigation*, 2001. **107**(12): p. 1503-1505.
301. Rauch Bernhard, H., et al., *Regulation of Functionally Active P2Y12 ADP Receptors by Thrombin in Human Smooth Muscle Cells and the Presence of P2Y12 in Carotid Artery Lesions\**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010. **30**(12): p. 2434-2442.
302. Andersen, H., et al., *Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. **96**(20): p. 11189-11193.
303. Smith, T.H., et al., *Protease-activated receptor-4 and purinergic receptor P2Y12 dimerize, co-internalize, and activate Akt signaling via endosomal recruitment of  $\beta$ -arrestin*. *The Journal of biological chemistry*, 2017. **292**(33): p. 13867-13878.
304. Khan, A., et al., *The physical association of the P2Y12 receptor with PAR4 regulates arrestin-mediated Akt activation*. *Molecular pharmacology*, 2014. **86**(1): p. 1-11.
305. Rand, M.L. and S.J. Israels, *Chapter 125 - Molecular Basis of Platelet Function*, in *Hematology (Seventh Edition)*, R. Hoffman, et al., Editors. 2018, Elsevier. p. 1870-1884.e2.
306. Ali, R.A., L.M. Wuescher, and R.G. Worth, *Platelets: essential components of the immune system*. *Current trends in immunology*, 2015. **16**: p. 65-78.
307. Liu, C., et al., *Platelet-leukocyte aggregate is associated with adverse events after surgical intervention for rheumatic heart disease*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 13069.
308. Hargett, L.A. and N.N. Bauer, *On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication*. *Pulmonary circulation*, 2013. **3**(2): p. 329-340.
309. Flaumenhaft, R., A.T. Mairuhu, and J.E. Italiano, *Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles*. *Semin Thromb Hemost*, 2010. **36**(8): p. 881-7.
310. Manfroi, W., et al., *Are apolipoproteins A and B better than lipoproteins for assessing risk of obstructive coronary heart disease?* *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 1999. **72**: p. 657-68.
311. O'Brien, T., et al., *The Role of Lipoprotein A-I and Lipoprotein A-I/A-II in Predicting Coronary Artery Disease*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995. **15**(2): p. 228-231.
312. Mucchiano, G.I., et al., *Apolipoprotein A-I-derived amyloid in atherosclerosis. Its association with plasma levels of apolipoprotein A-I and cholesterol*. *Am J Clin Pathol*, 2001. **115**(2): p. 298-303.

313. Murali, N., et al., *Cholesterol and neurodegeneration: longitudinal changes in serum cholesterol biomarkers are associated with new lesions and gray matter atrophy in multiple sclerosis over 5 years of follow-up*. European Journal of Neurology, 2020. **27**(1): p. 188-e4.
314. Jakimovski, D., et al., *Hypertension and heart disease are associated with development of brain atrophy in multiple sclerosis: a 5-year longitudinal study*. European Journal of Neurology, 2019. **26**(1): p. 87-e8.
315. McComb, M., et al., *Neuroprotective associations of apolipoproteins A-I and A-II with neurofilament levels in early multiple sclerosis*. J Clin Lipidol, 2020.
316. McComb, M., et al., *Apolipoproteins AI and E are associated with neuroaxonal injury to gray matter in multiple sclerosis*. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 2020. **45**: p. 102389.
317. Armstrong, P.B. and J.P. Quigley, *Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system*. Dev Comp Immunol, 1999. **23**(4-5): p. 375-90.
318. Yoshino, S., et al., *Molecular form and concentration of serum  $\alpha$ (2)-macroglobulin in diabetes*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 12927-12927.
319. Larionov, S., et al., *Expression of alpha2-macroglobulin, neutrophil elastase, and interleukin-1alpha differs in early-stage and late-stage atherosclerotic lesions in the arteries of the circle of Willis*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(1): p. 33-43.
320. Mori, T., et al., *Serum glycoproteins and severity of coronary atherosclerosis*. Am Heart J, 1995. **129**(2): p. 234-8.
321. Patko, Z., et al., *Roles of Mac-1 and glycoprotein IIb/IIIa integrins in leukocyte-platelet aggregate formation: stabilization by Mac-1 and inhibition by GpIIb/IIIa blockers*. Platelets, 2012. **23**(5): p. 368-75.
322. von Zur Muhlen, C., et al., *A contrast agent recognizing activated platelets reveals murine cerebral malaria pathology undetectable by conventional MRI*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1198-207.
323. Döring, A., et al., *E- and P-Selectin Are Not Required for the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL Mice*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(12): p. 8470.
324. Belloc, F., et al., *Fibrinogen synthesis by megakaryocyte rich human marrow cell concentrates*. Thromb Res, 1985. **38**(4): p. 341-51.
325. Tennent, G.A., et al., *Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver*. Blood, 2007. **109**(5): p. 1971-4.
326. Geddis, A.E., *Megakaryopoiesis*. Semin Hematol, 2010. **47**(3): p. 212-9.
327. Davizon-Castillo, P., W. Rowley Jesse, and T. Rondina Matthew, *Megakaryocyte and Platelet Transcriptomics for Discoveries in Human Health and Disease*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2020. **40**(6): p. 1432-1440.
328. Oswald, M.W., H.H. Hunt, and J. Lazarchick, *Normal range of plasma fibrinogen*. Am J Med Technol, 1983. **49**(1): p. 57-9.
329. Senzel, L., D.V. Gnatenko, and W.F. Bahou, *The platelet proteome*. Current opinion in hematology, 2009. **16**(5): p. 329-333.
330. de Vries, P.S., et al., *A meta-analysis of 120 246 individuals identifies 18 new loci for fibrinogen concentration*. Human molecular genetics, 2016. **25**(2): p. 358-370.
331. de Maat, M.P. and M. Verschuur, *Fibrinogen heterogeneity: inherited and noninherited*. Curr Opin Hematol, 2005. **12**(5): p. 377-83.
332. Tousoulis, D., et al., *Fibrinogen and cardiovascular disease: genetics and biomarkers*. Blood Rev, 2011. **25**(6): p. 239-45.
333. Green, F.R., *Fibrinogen polymorphisms and atherothrombotic disease*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 549-59.
334. Siegerink, B., F.R. Rosendaal, and A. Algra, *Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(3): p. 385-90.
335. Zhang, J., et al., *Association between two functional fibrinogen-related polymorphisms and ischemic stroke: a case-control study*. Genet Test Mol Biomarkers, 2013. **17**(11): p. 789-93.



336. Hoppe, B., et al., *Fibrinogen and factor XIII A-subunit genotypes interactively influence C-reactive protein levels during inflammation*. *Ann Rheum Dis*, 2012. **71**(7): p. 1163-9.
337. Zeng, Y., et al., *Fibrinogen polymorphisms associated with sporadic cerebral hemorrhage in a Chinese population*. *J Clin Neurosci*, 2012. **19**(5): p. 753-6.
338. Cooper, D.N., *Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes*. *Human genomics*, 2010. **4**(5): p. 284-288.
339. Fareed, M. and M. Afzal, *Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service*. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2013. **14**(2): p. 123-134.
340. Hoogendoorn, B., et al., *Functional analysis of human promoter polymorphisms*. *Human Molecular Genetics*, 2003. **12**(18): p. 2249-2254.
341. Sies, H., C. Berndt, and D.P. Jones, *Oxidative Stress*. *Annu Rev Biochem*, 2017. **86**: p. 715-748.
342. Bychkova, A.V., et al., *Oxidation-induced modification of the fibrinogen polypeptide chains*. *Dokl Biochem Biophys*, 2017. **474**(1): p. 173-177.
343. Weigandt, K.M., et al., *Fibrin clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen*. *Biophysical journal*, 2012. **103**(11): p. 2399-2407.
344. Headlam, H.A. and M.J. Davies, *Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(9): p. 1175-84.
345. Negre-Salvayre, A., et al., *Hyperglycemia and glycation in diabetic complications*. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(12): p. 3071-109.
346. Yamagishi, S., et al., *Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells*. *Diabetologia*, 1998. **41**(12): p. 1435-41.
347. Hanna, L.S., et al., *Comparison of structures of various human fibrinogens and a derivative thereof by a study of the kinetics of release of fibrinopeptides*. *Biochemistry*, 1984. **23**(20): p. 4681-7.
348. Martin, S.C., et al., *Increased phosphate content of fibrinogen in vivo correlates with alteration in fibrinogen behaviour*. *Thromb Res*, 1992. **68**(6): p. 467-73.
349. Soulbey, A.J., et al., *Does deamidation cause protein unfolding? A top-down tandem mass spectrometry study*. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2015. **24**(5): p. 850-860.
350. Takata, T., et al., *Deamidation alters the structure and decreases the stability of human lens betaA3-crystallin*. *Biochemistry*, 2007. **46**(30): p. 8861-8871.
351. Nyman, T., et al., *The role of MeH73 in actin polymerization and ATP hydrolysis*. *J Mol Biol*, 2002. **317**(4): p. 577-89.
352. Drazic, A., et al., *NAA80 is actin's N-terminal acetyltransferase and regulates cytoskeleton assembly and cell motility*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(17): p. 4399-4404.
353. Kunishima, S., et al., *TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia*. *Eur J Haematol*, 2014. **92**(4): p. 276-82.
354. Fiore, M., C. Goulas, and X. Pillois, *A new mutation in TUBB1 associated with thrombocytopenia confirms that C-terminal part of  $\beta$ 1-tubulin plays a role in microtubule assembly*. *Clin Genet*, 2017. **91**(6): p. 924-926.
355. Sun, C.-H., et al., *TUBB1 mutation in children with congenital hypothyroidism and thyroid dysgenesis in Shandong, China*. *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics*, 2019. **21**(10): p. 972-976.
356. Navarro-Núñez, L., et al., *The association of the beta1-tubulin Q43P polymorphism with intracerebral hemorrhage in men*. *Haematologica*, 2007. **92**(4): p. 513-8.
357. Basciano, P.A., et al., *The beta 1 tubulin R307H single nucleotide polymorphism is associated with treatment failures in immune thrombocytopenia (ITP)*. *British journal of haematology*, 2013. **160**(2): p. 237-243.

358. Stoupa, A., et al., *TUBB1 mutations cause thyroid dysgenesis associated with abnormal platelet physiology*. EMBO Mol Med, 2018. **10**(12).
359. Al-Bassam, J., et al., *MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1187-96.
360. Weber, M., et al., *Impact of C-terminal amino acid composition on protein expression in bacteria*. Molecular systems biology, 2020. **16**(5): p. e9208-e9208.
361. Nagalla, S., et al., *Platelet microRNA-mRNA coexpression profiles correlate with platelet reactivity*. Blood, 2011. **117**(19): p. 5189-5197.
362. Simon, L.M., et al., *Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics*. Blood, 2014. **123**(16): p. e37-e45.
363. Clancy, L., et al., *The role of RNA uptake in platelet heterogeneity*. Thromb Haemost, 2017. **117**(5): p. 948-961.
364. Wang, J., et al., *Platelet microRNA-15b protects against high platelet reactivity in patients undergoing percutaneous coronary intervention through Bcl-2-mediated platelet apoptosis*. Annals of translational medicine, 2020. **8**(6): p. 364-364.
365. Liu, R., et al., *MicroRNA-15b Suppresses Th17 Differentiation and Is Associated with Pathogenesis of Multiple Sclerosis by Targeting O-GlcNAc Transferase*. J Immunol, 2017. **198**(7): p. 2626-2639.
366. Chen, C., et al., *Dysregulated MicroRNA Involvement in Multiple Sclerosis by Induction of T Helper 17 Cell Differentiation*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 1256-1256.
367. Manna, I., et al., *Exosome-associated miRNA profile as a prognostic tool for therapy response monitoring in multiple sclerosis patients*. Faseb j, 2018. **32**(8): p. 4241-4246.
368. Cavarretta, E., G.A. Chiariello, and G. Condorelli, *Platelets, endothelium, and circulating microRNA-126 as a prognostic biomarker in cardiovascular diseases: per aspirin ad astra*, in *Eur Heart J*. 2013: England. p. 3400-2.
369. Cerutti, C., et al., *MiR-126 and miR-126\* regulate shear-resistant firm leukocyte adhesion to human brain endothelium*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 45284.
370. Jansen, F., et al., *MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. Journal of the American Heart Association, 2014. **3**(6): p. e001249-e001249.
371. Furlan, R., et al., *Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4*. J Neuroimmunol, 2000. **111**(1-2): p. 86-92.
372. Lees, J.R. and A.H. Cross, *A little stress is good: IFN-gamma, demyelination, and multiple sclerosis*. The Journal of clinical investigation, 2007. **117**(2): p. 297-299.
373. Fayyad-Kazan, H., et al., *Downregulation of microRNA-24 and -181 parallels the upregulation of IFN- $\gamma$  secreted by activated human CD4 lymphocytes*. Hum Immunol, 2014. **75**(7): p. 677-85.
374. Eacker, S.M., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Understanding microRNAs in neurodegeneration*. Nature reviews. Neuroscience, 2009. **10**(12): p. 837-841.
375. Bushati, N. and S.M. Cohen, *MicroRNAs in neurodegeneration*. Curr Opin Neurobiol, 2008. **18**(3): p. 292-6.
376. Yelamanchili, S.V. and H.S. Fox, *Defining larger roles for "tiny" RNA molecules: role of miRNAs in neurodegeneration research*. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2010. **5**(1): p. 63-69.
377. Muñoz-San Martín, M., et al., *Analysis of miRNA signatures in CSF identifies upregulation of miR-21 and miR-146a/b in patients with multiple sclerosis and active lesions*. Journal of Neuroinflammation, 2019. **16**(1): p. 220.
378. Amoruso, A., et al., *Immune and central nervous system-related miRNAs expression profiling in monocytes of multiple sclerosis patients*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 6125.
379. Lu, C., et al., *Crosstalk of MicroRNAs and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Cancer*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020. **2020**: p. 2415324.
380. He, J. and B.-H. Jiang, *Interplay Between Reactive Oxygen Species and MicroRNAs in Cancer*. Current Pharmacology Reports, 2016. **2**(2): p. 82-90.

381. Banerjee, J., S. Khanna, and A. Bhattacharya, *MicroRNA Regulation of Oxidative Stress*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017. **2017**: p. 2872156.
382. Uttara, B., et al., *Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options*. Curr Neuropharmacol, 2009. **7**(1): p. 65-74.
383. van Horssen, J., et al., *Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(12): p. 1729-37.
384. Adamczyk, B. and M. Adamczyk-Sowa, *New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1973834.
385. Nowak, P., B. Olas, and B. Wachowicz, [*Oxidative stress in haemostasis*]. Postepy Biochem, 2010. **56**(3): p. 239-47.
386. Tymk, K., *Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis*. Microcirculation, 2011. **18**(2): p. 152-62.
387. Bernardi, P., et al., *The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target*. Febs j, 2006. **273**(10): p. 2077-99.
388. Zharikov, S. and S. Shiva, *Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(1): p. 118-23.
389. Akkerman, J.W. and H. Holmsen, *Interrelationships among platelet responses: studies on the burst in proton liberation, lactate production, and oxygen uptake during platelet aggregation and Ca<sup>2+</sup> secretion*. Blood, 1981. **57**(5): p. 956-66.
390. Sharma, R., et al., *Clinical Characteristics and Differential Clinical Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics, 2020: p. 55-70.
391. Mahad, D., H. Lassmann, and D. Turnbull, *Review: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. **34**(6): p. 577-89.
392. Sun, Q., et al., *Defect of mitochondrial respiratory chain is a mechanism of ROS overproduction in a rat model of alcoholic liver disease: Role of zinc deficiency*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, 2015. **310**: p. ajpgi.00270.2015.
393. Zorova, L.D., et al., *Mitochondrial membrane potential*. Anal Biochem, 2018. **552**: p. 50-59.
394. Tarze, A., et al., *GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization*. Oncogene, 2007. **26**(18): p. 2606-2620.
395. Nicholls, C., H. Li, and J.P. Liu, *GAPDH: a common enzyme with uncommon functions*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012. **39**(8): p. 674-9.
396. Zheng, L., R.G. Roeder, and Y. Luo, *S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component*. Cell, 2003. **114**(2): p. 255-66.
397. Rodríguez-Pascual, F., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(23): p. 7139-55.
398. Tisdale, E.J., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2480-6.
399. Hara, M.R., et al., *S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(7): p. 665-74.
400. Nakajima, H., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death*. The Journal of biological chemistry, 2017. **292**(11): p. 4727-4742.
401. Kubo, T., et al., *Active site cysteine-null glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) rescues nitric oxide-induced cell death*. Nitric Oxide, 2016. **53**: p. 13-21.
402. Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito, *Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation*. Science, 2001. **292**(5521): p. 1552-5.
403. Oladzad Abbasabadi, A., et al., *Disruption of mitochondrial membrane integrity induced by amyloid aggregates arising from variants of SOD1*. Int J Biol Macromol, 2013. **61**: p. 212-7.
404. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science, 2004. **305**(5684): p. 626-9.

405. Shoshan-Barmatz, V., et al., *VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death*. Mol Aspects Med, 2010. **31**(3): p. 227-85.
406. Ito, Y., et al., *Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta*. Am J Physiol, 1996. **270**(1 Pt 2): p. H81-7.
407. Itakura, M., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Aggregates Accelerate Amyloid- $\beta$  Amyloidogenesis in Alzheimer Disease*. The Journal of biological chemistry, 2015. **290**(43): p. 26072-26087.
408. Mikhaylova, E.R., et al., *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase augments the intercellular transmission and toxicity of polyglutamine aggregates in a cell model of Huntington disease*. J Neurochem, 2016. **136**(5): p. 1052-63.
409. Dutta, R., et al., *Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients*. Ann Neurol, 2006. **59**(3): p. 478-89.
410. Trapp, B.D. and P.K. Stys, *Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2009. **8**(3): p. 280-91.
411. Mao, P. and P.H. Reddy, *Is multiple sclerosis a mitochondrial disease?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2010. **1802**(1): p. 66-79.
412. Sadeghian, M., et al., *Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 33249.