

*Joanna Saluk-Juszczak, Paweł Nowak, Jacek Golański,
Barbara Wachowicz, Wiesław Kaca*

**EKSPRESJA P-SELEKTYNY NA POWIERZCHNI PŁYTEK KRWI
INDUKOWANA ENDOTOKSYNĄ BAKTERYJNĄ *PROTEUS MIRABILIS***

Selektyna P jest białkiem zmagazynowanym w α ziarnistościach płytek krwi. Po aktywacji płytek wywołanej różnymi agonistami dochodzi do wyeksponowania selektyny P na powierzchni tych komórek i inicjowania adhezji do leukocytów. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu endotoksyny bakteryjnej z *Proteus mirabilis* (LPS S1959) za pomocą metody cytometrii przepływowej na stopień aktywacji płytek krwi. Metoda cytometrii przepływowej przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD62 pozwoliła wykazać, że endotoksyna bakterii Gram-ujemnych powoduje aktywację płytek krwi i ekspresję P-selektyny (CD62) na powierzchni płytek krwi.

WSTĘP

Endotoksyna bakteryjna (lipopolisacharyd, LPS) jest integralną częścią ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Poprzez swój hydrofobowy składnik (lipid A) LPS wbudowany jest do zewnętrznej warstwy ściany komórkowej tych bakterii. Lipopolisacharydy występują we wszystkich bakteriach Gram-ujemnych i tylko w nich. Tworzą one sztywną osłonkę na powierzchni komórek wytwarzających je bakterii, co utrudnia zwalczanie tych drobnoustrojów [1, 2].

Najistotniejsza z negatywnych cech endotoksyn jest ich zdolność do indukowania szoku septycznego związanego z zaburzeniami krążenia i układu hemostazy prowadzącymi do powstania rozsianego krzepnięcia wewnątrz-naczyniowego (DIC), co prowadzi do nieprawidłowego funkcjonowania narządów całego ciała i w konsekwencji do śmierci. Ostatnio zwraca się uwagę na rolę płytek krwi w tym procesie, a przede wszystkim na ich aktywację prowadzącą do adhezji, agregacji i sekrecji [3, 4]. Działanie

endotoksyny wiąże się z aktywacją komórek zapalnych gospodarza i z pobudzeniem ich do wydzielania mediatorów zapalnych [2–5]. Kojarzone do niedawna wyłącznie z procesami hemostazy, płytki krwi posiadają właściwości klasycznych komórek zapalnych i stanowią ważny czynnik zapalenia chroniący organizm przed zakażeniem drobnoustrojami [6]. W układach *in vivo* lipopolisacharyd powoduje gromadzenie się płytek krwi oraz ich aktywację wyrażoną agregacją i sekrecją związków zmagazynowanych w płytkowych ziarnistościach. Wśród wielu uwalnianych substancji wyróżnić można płytkowe cytokiny zapalne, takie jak: płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostowy β (TGF β), płytkowy czynnik 4 (PF4), β -tromboglobulina (β TG) oraz interleukiny IL-1 i RANTES [3–5, 7]. Nie wiadomo jednak, czy odpowiedź płytek na zakażenie bakteryjne zachodzi w wyniku bezpośredniego oddziaływania endotoksyny z powierzchnią płytki, czy też jest skutkiem złożonych interakcji międzykomórkowych zachodzących w warunkach *in vivo*.

Celem prowadzonych badań była próba odpowiedzi na pytanie, czy lipopolisacharyd ma bezpośredni wpływ na płytki krwi w układzie *in vitro*. Stopień aktywacji płytek krwi wywołanej działaniem endotoksyny bakteryjnej określano stosując metodę cytometrii przepływowej. Markerem aktywacji płytek krwi była ekspresja antygenu CD62 (selektyna P, PADGEM, GMP140) na powierzchni badanych komórek. Zastosowanie metody cytometrii przepływowej umożliwiło ocenę ilości płytek wykazujących ekspresję antygenu CD62. Wartość ekspresji P-selektyny wyrażona została jako frakcja komórek rejestrowanych przez cytometr przepływowy jako obiekty antygenopoztywne, tj. takie, które prezentują na swojej powierzchni przynajmniej 800–1000 kopii antygenu rozpoznawanego przez znakowane fluorescencyjnie przeciwciała monoklonalne.

MATERIAŁY I METODY

Material

Do badań stosowano lipopolisacharyd *Proteus mirabilis* (LPS S1959) otrzymany z Instytutu Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego. Materiał badawczy stanowiły płytki krwi wyizolowane z krwi ludzkiej pochodzącej od zdrowych dawców, którzy przez okres 10 dni przed oddaniem krwi nie stosowali aspiryny, ani innego leku wpływającego na funkcję płytek.

Izolowanie płytek krwi i ich inkubacja z LPS

Do otrzymania płytek krwi zastosowano metodę wirowania różnicowego świeżej krwi pobranej na cytrynian sodu 0,11 mol/l używając wyłącznie sprzętu plastikowego [8, 9]. Zarówno preparatykę, jak i znakowanie płytek krwi przeciwciałami prowadzono zgodnie z procedurą Becton-Dickinson dla cytofluorymetrycznej analizy płytek.

Otrzymane płytki krwi zawieszano w zmodyfikowanym buforze Tyroda o pH 7,4 (bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+}) i zawiesinę płytek krwi ($3 \times 10^8/\text{ml}$) inkubowano z LPS S1959 *Proteus mirabilis* o końcowym stężeniu 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ w ciągu 5, 10 i 30 minut w temperaturze pokojowej.

Metoda cytofluorymetrii przepływowej

Bezpośrednio po dodaniu LPS oraz po kolejnych czasach inkubacji pobierano po 20 μl mieszaniny inkubacyjnej dodając do 200 μl 1% roztworu formaldehydu (CellFix). Po wymieszaniu próbki pozostawiano na 24 h w temperaturze 4°C 5 μl rozcieńczonych 2-krotnie buforem fosforanowym (PBS) przeciwciał firmy Becton-Dickinson nanoszono do probówek Falcon przed dodaniem zawiesiny płytek. Do wprowadzonych przeciwciał dodawano następnie po 7,5 μl zawiesiny utrwalonych płytek. Płytki znakowano przez okres 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po okresie znakowania reakcję hamowano przez rozcieńczenie dodając 500 μl PBS.

Oznaczenia cytofluorymetryczne wykonywano w dniu znakowania płytek krwi stosując aparat FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Płytki krwi znakowano monoklonalnymi przeciwciałami anti-CD61 sprzężonymi z izotiocyjanianem fluoresceiny (anti-CD61-FITC) i anti-CD62 sprzężonymi z fikoerytryną (anti-CD62-PE) lub IgG1-PE, które stanowiły kontrolę negatywną. Przeciwciała anti-CD61-FITC stosowano w celu wyróżnienia populacji płytek od innych komórek. Natomiast stosowanie monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko selektynie P (anti-CD62) pozwoliło ocenić stopień aktywacji płytek krwi wywołanej LPS i wyrażonej poprzez ekspresję antygenu CD62 [10].

WYNIKI I DYSKUSJA

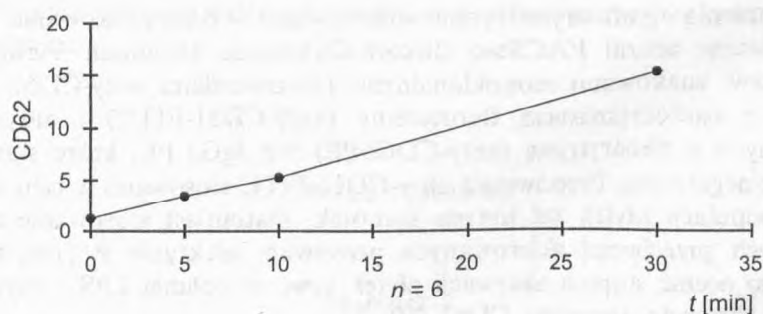
Celem prowadzonych badań było określenie metodą cytometrii przepływowej wpływu lipopolisacharydu *Proteus mirabilis* LPS S1959 na stopień aktywacji płytek krwi w układzie *in vitro* mierzony ekspresją antygenu CD62 na powierzchni komórek.

Aktywacja płytek krwi jest procesem złożonym i wysoce skomplikowanym. Wiąże się ona ze zmianą kształtu komórek, adhezją, agregacją i sekrecją związków zmagazynowanych w płytkowych ziarnistościach. Uwalniane są wówczas liczne związki, wśród których znajduje się płytkowa selektyna P (GMP140, CD62, PADGEM) ekspozycja po uwolnieniu na powierzchni zaktywowanych komórek [7, 11]. Ilość antygenu CD62 na powierzchni płytek krwi, zależna od stopnia aktywacji tych komórek, może stanowić marker płytkowej aktywacji [12–14].

Tabela 1

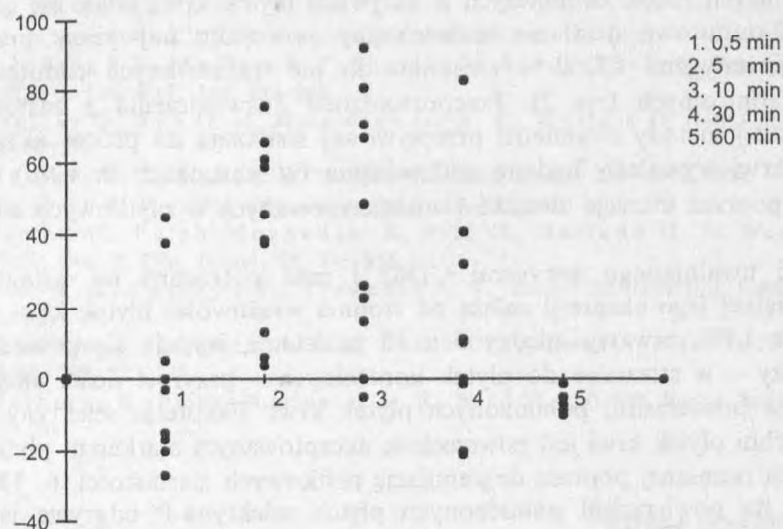
Autoaktywacja płytek krwi mierzona ekspresją selektyny P (w minutach)

Lp.	0,5	5	10	30
1	2,10	5,00	7,05	20,00
2	1,15	3,43	5,38	9,00
3	1,50	2,70	4,05	15,60
4	1,05	2,35	4,10	21,85
5	0,55	2,40	4,70	14,55
6	1,50	5,15	6,50	11,10
$\bar{X}_x$	1,31	3,51	5,30	15,35
$\pm SD$	$\pm 0,48$	$\pm 1,17$	$\pm 1,15$	$\pm 4,53$



Rys. 1. Autoaktywacja płytek krwi mierzona ekspresją selektyny P

Prezentowane wyniki pokazują wyraźny wzrost ekspresji antygenu CD62 na powierzchni płytek, wprost proporcjonalny do czasu inkubacji zawiesiny płytek z endotoksyną (tab. 1, rys. 1). Wzrost ten wskazuje na aktywację badanych komórek wywołaną lipopolisacharydem. Porównano ilość antygenu



Rys. 2. Wpływ LPS na ekspresję selektyny P na płytkach krwi

Tabela 2

Wpływ LPS na ekspresję selektyny P na płytkach krwi

Próba	CD62	CD62	CD62	CD62	CD62	CD62	CD62	CD62	CD62	CD62
Płytki 0,5	1,45	5,00	1,15	1,05	0,65	0,75	1,55	3,50	1,05	1,80
LPS 0,5	2,10	6,90	1,15	1,05	0,55	0,55	1,50	2,80	1,10	1,50
Przyrost	45%	38%	0%	0%	-15%	-27%	-3%	-20%	5%	-17%
Płytki 5	3,10	11,40	2,35	1,70	1,15	1,45	2,55	7,65	0,85	5,15
LPS 5	5,00	18,15	3,43	2,35	1,20	2,40	2,70	10,60	1,50	5,75
Przyrost	61%	59%	46%	38%	4%	66%	6%	39%	76%	13%
Płytki 10	5,60	15,80	2,80	2,45	1,55	2,60	3,50	14,70	1,95	6,50
LPS 10	7,05	23,60	5,38	4,10	2,65	4,70	4,05	18,15	1,85	6,50
Przyrost	26%	49%	92%	67%	71%	81%	16%	23%	-5%	0%
Płytki 30	26,25	34,40	6,40	27,35	12,35	18,45	11,85	21,65	5,35	10,00
LPS 30	20,00	34,45	9,00	21,85	12,25	14,55	15,60	39,65	5,90	11,10
Przyrost	-20%	0%	41%	-20%	-1%	-21%	32%	83%	10%	11%

CD62 eksponowaną na powierzchni płytek krwi traktowanych lipopolisacharydem z ilością tego antygenu na płytkach kontrolnych (w których może dochodzić do autoaktywacji). Maksimum ekspresji monitorowanego antygenu przypadło na okres 10 minut działania endotoksyny. Wykazano, że dłuższe (1 h) działanie LPS nie wywoływało dalszej odpowiedzi płytek krwi, a ilość wyeksponowanego antygenu CD62 była zbliżona do wartości kontroli.

Mimo dużych różnic osobniczych w aktywacji płytek krwi, udało się ustalić, że 5–10-minutowe działanie endotoksyny powoduje najwyższy przyrost ekspresji antygeny CD62 w stosunku do nie traktowanych endotoksyną płytek kontrolnych (rys. 2). Przeprowadzone doświadczenia z zastosowaniem czulej metody cytometrii przepływowej wskazują na proces aktywacji płytek krwi wywołany badaną endotoksyną (w warunkach *in vitro*) i wyrażony poprzez sekrecję związków zmagazynowanych w płytkowych ziarnistościach.

Ilość uwalnianego antygeny CD62 i czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnej jego ekspresji zależą od stopnia wrażliwości płytek krwi. Czas działania LPS, zawarty między 5 a 10 minutami, wydaje się powodować najwyższy – w stosunku do płytek kontrolnych – przyrost ilości antygeny CD62 na powierzchni pobudzonych płytek krwi. Ekspresja selektyny-P na powierzchni płytek krwi jest powszechnie akceptowanym markerem płytkowej aktywacji ocenianej poprzez degranulację płytkowych ziarnistości [6, 13, 14]. Obecna na powierzchni pobudzonych płytek selektyna-P odgrywa istotną rolę w interakcji tych komórek z komórkami zapalnymi głównie z neutrofilami [15–18]. Istnieje również sugestia, iż uczestniczy ona w oddziaływaniu płytek krwi z LPS, jest miejscem wiązania LPS do płytek i może pełnić rolę receptora komórkowego dla LPS [19].

LITERATURA

- [1] Glauser M. P. (1996), *Drugs*, 52, suppl. 2: 7–27.
- [2] Rietschel E. T., Brade H., Holst O., Brade L., Muller-Loennies S., Mamat U., Zahring U., Beckmann F., Seydel U., Brandenburg K., Ulmer A. J., Mattern T., Heine H., Schletter J., Loppnow H., Schonbock U., Flad H. D., Hauschildt S., Schade U. F., Di Padova F., Kusumoto S., Schumann R. R. (1996), *Current Topics in Microbiology and Immunology, Pathology of septic shock*, ed. E. T. Rietschel, H. Wagner, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 39–81.
- [3] Freudenberg M. A., Galanos C. (1990), *Inter Rev. Immunol.*, 6, 207–221.
- [4] McCuskey R. S., Urbaschek R., Urbaschek B. (1996), *Cardiovascular Res.*, 32, 753–763.
- [5] Cicala C., Santacrose C., Itoh H., Douglas G. J., Page C. P. (1997), *Pharmacol Lett.*, 2, 31–38.
- [6] Larsson A., Lundahl T., Eriksson M., Lundkvist K. (1996), *Platelets*, 7, 153–158.
- [7] Levi M., ten Cate H., van der Polt T., van Deventer S. J. H. (1993), *J. Am. Med. Assoc.*, 271, 427–428.
- [8] Wachowicz B., Saluk J., Kaca W. (1998), *Microbiol Immunol.*, 42, 47–49.
- [9] Mustard J. F., Kinlough-Rathbone R. L., Packham M. A. (1989), *Meth. Enzymol.*, 169, 3–10.

- [10] Golański J., Pietrucha T., Baj Z., Greger J., Watała C. (1996), *Thrombos. Res.*, **83**, 199–216.
- [11] Clemetson K. J. (1995), *Thromb. Haemost.*, **74**, 111–116 (A).
- [12] Stenberg P. E., Mc Ever R. P., Shuman M. A., Jacques Y. V., Bainton D. F. (1985), *J. Cell Biol.*, **101**, 880–886.
- [13] Escolar G., Rao G. H., Nieuwenhuis H. K., White J. G. (1996), *Platelets*, **7**, 297–301.
- [14] Mc Ever R. P., Martin M. N. (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 9799–9804.
- [15] Mc Ever R. P. (1997), *Glycoconjugate J.*, **15**, 585–591.
- [16] Gawaz M., Fateh-Moghadam S., Pilz G., Gurland H. J., Werdan K. (1995), *Eur. J. Clin. Invest.*, **25**, 843–851.
- [17] Aziz K. A., Cawley J. C., Treweeke A. T., Zuzel M. (1997), *J. Leukoc. Biol.*, **61**, 322–328.
- [18] Peters M. J., Heyderman R. S., Hatch D. J., Klein N. J. (1997), *J. Immunol. Meth.*, **209**, 125–135.
- [19] Malhotra R., Priest R., Foster M. R., Bird M. I. (1998), *Eur. J. Immunol.*, **28**, 983–988.

Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Instytut Kardiologii Akademii Medycznej
w Łodzi

Joanna Saluk-Juszczak, Paweł Nowak, Jacek Golański, Barbara Wachowicz, Wiesław Kaca

P-SELECTIN EXPRESSION ON BLOOD PLATELETS INDUCED BY ENDOTOXIN *PROTEUS MIRABILIS*

P-selectin is stored in the α granules of blood platelets. Following platelet activation by different agonists, P-selectin is expressed on the cell surface where it mediates adhesion primarily to leucocytes. The aim of the study was to evaluate the direct effect of *Proteus mirabilis* lipopolysaccharides on the P-selectin expression on the platelet surface measured by cytometric method. The obtained results showed that LPS *in vitro* induced the expression of P-selectin (CD62) on platelets. It indicates that endotoxin from Gram-negative bacteria can activate blood platelets.