

PLATELET- NEUTROPHIL COMPLEXES – DEFINITION, MECHANISMS AND IMPLICATIONS (REVIEW)

Sheniz Yuzeir

Clinic of Hematology, Medical University in Varna, Bulgaria, shenizyuzeir@abv.bg

Abstract: Neutrophils are innate immune cells that protect the host from infection by eliminating the invading pathogens. In recent years, neutrophils and platelets have been shown to be active not only in inflammatory processes but also in some pathological conditions, including the development of neoplastic diseases and thrombosis. The interaction between circulating platelets and neutrophils is characterised by the intensive exchange of intracellular signals. Overexpression of some of these molecules has been reported, with increased leukocyte and platelet activation as well as increased adhesion of blood cells to the vascular endothelium. Platelet-neutrophil interactions are increased in thrombo-inflammatory diseases and are sensitive biomarkers for platelet activation and targets for the development of new therapies. The crosstalk between platelets and innate immune cells promotes thrombosis, inflammation, and tissue damage.

A key step in the formation of platelet-neutrophil complexes (PNCs) is the process of interaction between the adhesion molecule P-selectin (CD62P) on the platelet membrane and the PSGL-1 ligand on neutrophils. The formation of PNCs modulates a wide range of pathological conditions, including both innate and acquired immune systems. PNCs are involved in the pathogenesis of inflammatory diseases, malignancies and thrombotic processes. The formation of PNCs is associated with the initiation of a number of processes at the cellular and molecular levels. Malignant diseases are risk factors for the occurrence of arterial, venous and microthrombosis, which are most often associated with hypercoagulable processes that form platelet aggregates. By modulating the immune system through direct and indirect interactions with leukocytes, platelets regulate several aspects of tumor-related pathology. This review aims at summarizing the role of platelet-neutrophil interactions in the development and progression of cancer and puts its focus on cancer-related alterations of platelet and leukocyte functions and their impact on cancer pathology.

The analysis and evaluation of the levels of the circulating platelet- neutrophil complexes in blood in neoplastic diseases can be used as potential predictors of tumor progression, metastasis and the occurrence of thrombosis.

Keywords: Neutrophils, platelets, platelet-neutrophil complexes (PNC)

НЕУТРОФИЛНО-ТРОМБОЦИТНИ КОМПЛЕКСИ- ДЕФИНИЦИЯ, МЕХАНИЗМИ НА ОБРАЗУВАНЕ И ПОСЛЕДИЦИ (ОБЗОР)

Шениз Юзеир

Клиника по Хематология, УМБАЛ“Света Марина“, Медицински университет, Варна, България, shenizyuzeir@abv.bg

Резюме: Неутрофилните гранулоцити като компоненти на вродената имунна система използват различни механизми за защита на организма от инфекциозни процеси. През последните години се доказва, че неутрофилите и тромбоцитите са активни участници не само във възпалителните процеси, но и в редица патологични състояния, включително в развитието на неопластични заболявания и тромбоза. Взаимодействието между циркулиращите тромбоцити и неутрофили е процес, характеризиращ се с интензивен обмен на вътреклетъчни сигнали. Докладвана е свръхекспресия на някои от тези молекули, водещи до засилено активиране на левкоцитите и тромбоцитите, както и повишена адхезивност на кръвните клетки към съдовия ендотел. Връзката между тромбоцитите и вродените имунни клетки насърчават развитието на тромбоза, възпалителни процеси и увреждане на тъканите, което подчертава тяхната неизменна роля като потенциални предиктивни биомаркери.

Ключов етап в образуването на PNC е процес на взаимодействие между разположената върху тромбоцитната мембрана адхезионна молекула P-selektin (CD62 P) и лиганда PSGL-1, намиращ се върху неутрофилите. Образуването на комплекси, наречени PNC (platelet-neutrophil complexes) има ключова роля в модулирането на широк спектър патологични състояния, както на вродената, така и на придобитата имунна система. Неутрофилно-тромбоцитни комплекси участват в патогенезата на възпалителни заболявания, злокачествени заболявания и тромботични процеси. Образуването на тези комплекси са свързани с иницирането на редица процеси на клетъчно и молекулярно ниво. Малигнените заболявания са рискови

фактори за възникването на венозни, артериални и микротромбози, което най-често се свързва с процесите на хиперкоагулация, както и със засилената способност на активираните неутрофили да образуват агрегати с активираните тромбоцити. PNC чрез директни и индиректни взаимодействия модулират имунната система и тумор-асоциираната патология. Този преглед обобщава текущите познания за ролята и механизмите на образуване на неутрофилно-тромбоцитни комплекси, както и тяхното въздействие върху туморната прогресия.

Анализът и оценката на нивата на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси в кръвта при неопластични заболявания може да се използва като потенциален предиктор за туморната прогресия, метастазирание и за появата на тромбоза.

Ключови думи: неутрофили, тромбоцити, неутрофилно-тромбоцитни комплекси

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Вроденият имунитет се поддържа чрез взаимодействие и комбинирано функциониране на множество клетъчни типове, включително дендритни клетки, моноцити, мастоцити, NK-клетки и гранулоцити (Brandau et al, 2013; Granger et al, 2017). През последните няколко години вниманието на изследователските групи се фокусира върху новоткритите функции на неутрофилите и тромбоцитите, потвърждаващи тяхната значима роля не само като участници във възпалителни процеси, но и при редица патологични състояния, включително малигнени заболявания и тромботични процеси. Днес е известно, че образуването на комплекси между тромбоцити и неутрофили се наблюдава при широк спектър от заболявания, но точният механизъм на тяхното формиране все още е обект на дискусии. През 1975 г. за първи път подобни взаимодействия между неутрофили и тромбоцити са наблюдавани при пациенти с рак на простатна жлеза (Bauer et al, 1975). При редица проучвания е доказано, че при инфекциозни процеси, хронични възпалителни и малигнени заболявания, както и при тромбоза броят на циркулиращите неутрофили и тромбоцити се увеличават многократно. Ключов момент инициращ образуването на комплекси между тромбоцити и инфламаторни клетки е активирането на тромбоцитите.

2. АКТИВИРАНЕ НА ТРОМБОЦИТИТЕ

Активацията на тромбоцитите протича в резултат на задвижването на два пускови механизма. От една страна от неутрофилните гранулоцити се освобождават различни проангиогенни фактори, серни протеази, азотен оксид, които модулират функциите на тромбоцитите и по този начин ги активират (Piccardoni et al, 2001). От друга страна тромбоцитите чрез адхезивни рецептори и множество секретирани разтворими медиатори предават биохимични сигнали на неутрофилните гранулоцити, моноцити и лимфоцити. Освен това активираните тромбоцити чрез различни пътища взаимодействат със съдовия ендотел и индуцират експресия на адхезивни молекули и хемокини, които от своя страна допринасят за хемотаксиса на левкоцити (da Costa Martins et al, 2006; Eichelberge et al, 2020).

Според литературни данни активирането на тромбоцитите може да се иницира и от протромботичен сигнал, който се получава от т.нар G-протеин (тирозин-свързан рецептор), водещо до активиране на бета 2-интегрин. Тези взаимодействия между рецептори и лигандни молекули медиат процесите на тромбоцитна адхезия към ендотелните клетки и иницират каскада от вътреклетъчни сигнали, довеждащи до тромбоцитна активация, освобождаване на тромбоцитни агонисти и образуване на тромбоцитни агрегати (Coughlin et al, 2005).

Друг описан алтернативен вариант за активиране на тромбоцитите е свързването на експресирани от туморни клетки имуноглобулинови молекули IgG с тромбоцитните рецептори Fc-RIIa (Mitrugno et al, 2014; Miao et al, 2019). Човешките тромбоцити притежават Fcγ рецептор IIa (Fc-RIIa), който е способен да свързва и интернализира IgG комплекси (Worth et al, 2006;). Предварителната стимулация с IgG комплекси води до повишено активиране, причиняващи състояние на „свръхчувствителност на тромбоцитите“ (Berlacher et al, 2013).

Колективно, всички описани механизми предизвикват допълнителна агрегация на тромбоцитите и благоприятстват образуването на неутрофилно-тромбоцитни комплекси (PNC). В крайна сметка, чрез своята абнормна цитокинова продукция, туморните клетки могат да стимулират активирането на тромбоцитите и да потенцират протуморен отговор (Kauffenstein et al, 2001).

3. МЕХАНИЗМИ НА ОБРАЗУВАНЕ НА НЕУТРОФИЛНО-ТРОМБОЦИТНИ КОМПЛЕКСИ (PNC)

Ключова роля при образуването на комплекси между неутрофили и тромбоцити играе адхезионната молекула P-селектин, която се експресира върху повърхността на активирани ендотелни клетки. В неактивирани ендотелни клетки той се съхранява в гранули, наречени телца на Weibel-Palade, докато в

неактивирани тромбоцити Р-селектинът се съхранява в α -гранулите. Тази молекула има съществена роля при първоначалната адхезия на левкоцитите към ендотелните клетки, в резултат на възпалителни стимули или тъканно увреждане. Когато ендотелните клетки се активират от тромбоцитните агонисти ADP, тромбин по време на възпаление, Р-селектинът се премества от интрацелуларното пространство към повърхността на ендотелните клетки (Bambace et al, 2011). Експозицията на Р-селектин върху повърхността на тромбоцитите изисква тяхното активиране, което е задължително условие за инициране на взаимодействията между циркулиращите неутрофили и тромбоцити. Неутрофилно-тромбоцитните комплекси са използвани като маркери за *in vivo* активиране на тромбоцитите (Michelson et al, 2001). След активиране на тромбоцитите ключов етап в образуването на PNC е процесът на взаимодействие между разположената върху тромбоцитната мембрана адхезионна молекула Р-selectin (CD62 P) и лиганда PSGL-1, намиращ се върху неутрофилите (Moore et al, 1995).

При активирането си тромбоцитите освобождават редица фактори, възпалителни хемокини (PAF, RANTES, CCL3, CXCL1, CXCL4 и CXCL7), които стимулират процесите на тромбоцитната адхезия, агрегация, клетъчна сигнализация, имунен отговор и по този начин модулират туморната микросреда (von Hundelshausen et al, 2005).

От друга страна, неутрофилните гранулоцити освобождават редица ензими и медиатори, като катепсин G и еластаза, чрез които стимулират активацията на тромбоцитите (Sambrano et al, 2000). Описаните сложни взаимодействия стимулират междуклетъчната сигнализация и водят до генериране на бърз и бавен тип клетъчни отговори. Бързият клетъчен отговор се получава благодарение на сигналите, предадени първоначално от адхезивните рецептори Р-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), а впоследствие от интегрини и хемокини, получени от тромбоцитни рецептори. Тези сигнали предизвикват незабавни реакции в неутрофилните гранулоцити, като активират $\beta 2$ -интегрин, трансмиграцията, хемотаксиса, клетъчната адхезия и производство на ROS (Pervushina et al, 2004). Бавният клетъчен отговор се регулира от сигнали, предавани от тромбоцитни рецептори, като хемокини и цитокини или се освобождават като разтворими молекули от активирани тромбоцити. Тези сигнали предизвикват транслокация на Nuclear factor- κ B (NF- κ B) фактор, който медира експресията на възпалителен фенотип. Това се дължи на факта, че много тумори експресират тъканен фактор (TF), което води до образуване на тромбин, активиране на коагулацията и на тромбоцитите (Orellana et al, 2015). Повишеното активиране на тромбоцитите при пациенти с малигнени заболявания не само допринася за развитието на тромбоза, но и за стимулиране на процесите на туморна ангиогенеза и метастазиране (Cedervall et al, 2012).

4. КЛИНИЧНИ ЕФЕКТИ И ПРОЯВИ НА НЕУТРОФИЛНО-ТРОМБОЦИТНИ КОМПЛЕКСИ (PNC)

Формирането на неутрофилно-тромбоцитните комплекси е свързано с инициране на редица процеси на клетъчно и молекулярно ниво. PNC водят до повишена фагоцитна активност на неутрофилите, засилена трансмиграция на левкоцитите и екстравазация към възпалителните огнища (Assinger et al, 2011; Badrnya et al, 2014; Diacovo et al, 1996). Също така, стимулират експресията на тъканния фактор (TF), активират коагулацията и потенцират образуването на неутрофилни екстрацелуларни мрежи (NETs) (Gros et al, 2015; Lisman et al, 2018; Clark et al, 2007).

Друг характерен процес, въвлечен в неутрофилно-тромбоцитните взаимодействия е трансклетъчният метаболизъм на арахидоновата киселина. От една страна неутрофилно-тромбоцитните комплекси усилват синтеза на антиинфламаторни и вазоконстриктивни субстанции, като левкотриени и тромбоксан A₂. От друга страна тези комплекси водят до генериране на липоксини, които медира процесите на възпаление. Като цяло, левкотриените LTC₄, LTD₄, LTE₄, LTB₄ и 12- и 20-diHETE имат широк спектър от функции, най-вече подобряване на пермеабилитета на съдовата стена, модулиране на контрактилната способност на гладките мускулни клетки и хемотаксис (Peters-Golden et al, 2007).

В редица проучвания е доказано, че взаимодействието между тромбоцити и неутрофили води до образуване на ранна метастатична ниша. Labelle и сътрудници описват, че хемотаксиса на гранулоцитите към метастатичното място се медира от сигнали, получен от CXCL5 рецептора на тромбоцитите и CXCR2 рецептора от гранулоцитите след пряк контакт с туморните клетки. Неутрофилите и тромбоцитите, като „критични играчи“ имат изключително важна роля в туморогенезата. Доказано е тяхното въздействие върху туморната биология, туморната прогресия, неоангиогенезата и процесите на метастазиране (Labelle et al, 2014; Zhou et al, 2019).

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От събраните литературни данни става ясно, че образуваните комплекси между неутрофили и тромбоцити имат съществена роля в модулирането на различни взаимоотношения процеси, необходими за регулирането

на вътреклетъчния баланс. Анализът и оценката на нивата на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси в кръвта при неопластични заболявания може да се използва като потенциален предиктор за туморната прогресия, метастазиране и за появата на тромбоза.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Assinger, A., Laky, M., Schabbauer, G., Hirschl, A.M., Buchberger, E., Binder, B.R., & Volf, I. (2011). Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. *J Thromb Haemost.*9:799–809.
- Bambace, N.M., & Holmes, C. E (2011). The platelet contribution to cancer progression. *JThromb Haemost.* 9: p. 237-249
- Badrnya, S., et al. (2014). Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(3):571–580
- Bauer, H.M. (1975). In-vitro platelet-neutrophil adherence. *Am J Clin Pathol.* 63:824–7.
- Berlacher, M.D., Vieth, J. A., Heflin, B. C., Gay, S. R., Antczak, A. J., Tasma, B. E et al.(2013). FcγRIIa Ligation Induces Platelet Hypersensitivity to Thrombotic Stimuli. *Am J Path.* 082: p. 244-254.
- Brandau, S., Dumitru, C.A., & Lang, S. (2013). Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin Immunopathol.* 35:163–176.
- Cedervall, J., & Olsson, A.K. (2012). Platelet Regulation of Angiogenesis, Tumor Growth and Metastasis. *Tumour Angiogenesis.* Rijeka: InTech .p. 116-134.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., et al. (2007). Platelet TLR4 Activates Neutrophil Extracellular Traps to Ensnare Bacteria in Septic Blood. *Nat Med.* 13(4):463-9.
- Coughlin, S.R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* (3): 1800-1814.
- da Costa Martins, P.A., van Gils, J.M., Mol, A., Hordijk, P.L., & Zwaginga, J.J. (2006). Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J Leukoc Biol.*79:499 –507.
- Diacovo, T.G. et al.(1996). Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood.*88(1):146–157.
- Eichelberge, K. R., & Goldman, W. E.(2020). Manipulating Neutrophil Degranulation as a Bacterial Virulence Strategy. *Plos Pathog.*16(12):e1009054. doi: 10.1371/journal.ppat.1009054.
- Granger, V., Faille, D., Marani, V., Noël, B., Gallais, Y., et al.(2017). Human blood monocytes are able to form extracellular traps, *J. Leukoc. Biol.* 102: 775-781.
- Gros, A., Ollivier, V., & Ho-Tin-Noe, B. (2015). Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front Immunol.* 5:678.
- Kauffenstein, G., Bergmeier, W., Eckly, A., Ohlmann, P., Léon, C., Cazanave, J. P., et al.(2001).The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett.* 505(2): p. 281-290.
- Labelle, M., Begum, S., & Hynes, R.O. (2014). Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:E3053–61.
- Lisman, T. (2018). Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell and Tissue Research.* volume 371, p.567–576.
- Miao, S., Shu, D., Zhu, Y., Lu, M., Zhang, Q., Pei, Y., et al. (2019). Cancer cell-derived immunoglobulin G activates platelets by binding to platelet FcγRIIa,. *Cell Death Dis.* 10: p. 87.
- Michelson, A.D., Barnard, M.R., Krueger, L.A., Valeri, C.R., & Furman, M.I. (2001). Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.*104:1533–153
- Mitrugno, A., Williams, D., Kerrigan, S. W., & Moran, N. (2014). A novel and essential role for FcγRIIa in cancer cell-induced platelet activation. *Blood.* 123(2): p. 249-260.
- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Li, F., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S, et al. (1995). P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 128:661–71.
- Orellana, R., Kato, S., Erices, R., Bravo, M. L., Gonzalez, P., Oliva, B., et al. (2015). Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 15: 290.
- Pervushina, O., Scheuerer, B., Reiling, N., Behnke, L., Schroder, J.M., Kasper, B. et al. (2004).Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear

- phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J Immunol* 1. 73:2060–2067.
- Peters-Golden, M., & Henderson, W.R. Jr. (2007). Leukotrienes. *N Engl J Med*. 357:1841–1854.
- Piccardoni, P., Sideri, R., Manarini, S., Piccoli, A., Martelli, N., de Gaetano, G., et al. (2001). Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood*. 98:108–116.
- Sambrano, G.R., Huang, W., Faruqi, T., Mahrus, S., Craik, C., & Coughlin, S.R. (2000). Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem*. 275:6819–6823.
- von Hundelshausen, P., Koenen, R. R., Sack, M., Mause, S. F., Adriaens, W., Proudfoot, A. E. I., et al. (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 105 (3): 924–930. doi:10.1182/blood-2004-06-2475.
- Worth, R.G., Chien, C. D., Chien, P., Reilly, M. P., McKenzie, S. E., & Schreiber, A. D. (2006). Platelet FcγRIIA binds and internalizes IgG-containing complexes. *Experimental Hematology*. 34: p. 1490–1495
- Zhou, J., Xu, E., Shao, K., Shen, W., Gu, Y., Li, M., & Shen, W. (2019). Circulating platelet-neutrophil aggregates as risk factor for deep venous thrombosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) Clin Chem Lab Med*. 57(5):707–715. doi: 10.1515/cclm-2018-0909.