

## Rola PF4 (chemokiny CXCL4) w powstawaniu skrzepu

The role of PF4 (CXCL4) in the process of clot formation

Bożena Sokołowska<sup>1</sup>, Anna Dmoszyńska<sup>1</sup>, Anna M. Kowalska<sup>2,3</sup>

Acta  
Haematologica  
Polonica;  
43 (2a): 150–154

### STRESZCZENIE

Czynnik płytkowy 4 (PF4) uwalniany jest z ziarnistości  $\alpha$  krwinek płytkowych podczas ich aktywacji. Uczestniczy w powstawaniu skrzepu. Prawidłowe stężenie PF4 warunkuje nie tylko efektywność procesów krzepnięcia krwi, ale również skuteczność terapeutycznych dawek heparyny. Praca niniejsza opiera się w dużej mierze na pracach doświadczalnych jednej z współautorek.

Słowa kluczowe: PF4, chemokiny, model biologiczny wywoływania zakrzepicy

### SUMMARY

Platelet factor 4 (PF4) is released from platelet  $\alpha$  granules during activation process. It takes part in clot formation. Physiological concentration of PF4 is essential not only for thrombus formation but also for the anticoagulant potency of heparin. This review is based on experiments performed by one of coauthors.

Keywords: PF4, chemokines, carotid artery thrombosis model

© by Polskie Towarzystwo Hematologów  
i Transfuzjologów  
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 5.04.2012  
Zaakceptowano: 14.04.2012

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji  
Szpitala Uniwersyteckiego w Lublinie  
Kierownik: Prof. zw. dr hab. Anna Dmoszyńska

<sup>2</sup> The Children's Hospital of Philadelphia,  
Philadelphia PA, USA

<sup>3</sup> Instytut Biologii Medycznej, Polska Akademia Nauk, Łódź  
Dyrektor Instytutu:  
Prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Adres do korespondencji:  
Dr Bożena Sokołowska  
Klinika Hematoonkologii i Transplantacji UM w Lublinie  
ul. Staszica 11, 20-080 Lublin  
tel. 81 5435496  
e-mail: besokolowska@gmail.com

## Wstęp

Czynnik płytkowy 4 (*Platelet Factor 4-PF4*; chemokina CXCL4) uwalniany jest z ziarnistości alfa płytek krwi podczas ich aktywacji [1, 2]. Biosynteza PF4 zachodzi głównie w megakariocytach, ale niewielkie jego ilości znajdują się także w monocytach i tam również mogą odgrywać ważną rolę biologiczną [3]. Ludzki gen *PF4* (*Cxc4*, ok. 1 kb) zawiera trzy eksony i znajduje się na chromosomie 4q12-21. Gen też oddzielony jest o ok. 4 kB od genu chemokiny zwanego kwaśnym białkiem płytkowym (*platelet basic protein*; PBP; chemokina CXCL7). Kwaśne białko płytkowe również uwalniane jest z płytek krwi [4]. Mysi *PF4* (*cxc4*) leży na chromosomie 5, na którym, podobnie jak u ludzi, znajdują się geny innych chemokin, zarówno biosyntygowanych w megakariocytach, jak i w innych komórkach. Ludzki i myszy *PF4* mają około 40% homologii.

## Podrodzina chemokin CXC

PF4 należy do rodziny chemokin, białek o małej masie cząsteczkowej (8–12 kDa), odgrywających główną rolę w procesach zapalnych przede wszystkim poprzez aktywację i nasilenie chemotaksji leukocytów. Chemokiny uczestniczą również w procesach hemostazy, modyfikując funkcję płytek. Białka te charakteryzuje występowanie w określonym miejscu czterech cystein (C). 48 z dotychczas poznanych chemokin (i 19 receptorów, z którymi chemokiny się wiążą) zostało podzielonych na cztery podrodziny (CC, CXC, CX3C i XC)

w zależności od tego, ile aminokwasów występuje pomiędzy cząsteczkami cystein. PF4 (CXCL4) oraz PBP (CXCL7) należą do podrodziny chemokin CXC, w których cysteiny oddziela tylko jeden aminokwas. Chemokiny należą do rodziny cytokin i charakteryzują się właściwościami chemotaktycznymi. Jednak PF4 zaliczany do tej rodziny ze względu na swoją budowę nie wykazuje bezpośrednich właściwości chemotaktycznych. Natomiast wspomniane powyżej białko PBP poprzez proteolizę degradowane jest do kilku białek, między innymi do peptydu NAP-2 (*Neutrophil activating peptide-2*), który ma silne właściwości chemotaktyczne. NAP-2 zawiera sekwencję ELR, dzięki której współdziała z receptorem CXCR2 wiążącym białka G transportujące sygnały wewnątrzkomórkowe. PF4 nie ma ściśle określonego receptora poza występującym tylko w niektórych komórkach śródbłonna receptorem CXCR3B. W przeważającej mierze aktywność PF4 związana jest z oddziaływaniem z glikozaminami występującymi na powierzchni komórek. Krwinki płytkowe, oprócz czynnika PF4 i PBP, wydzielają wiele chemokin zestawionych w poniższej tabeli.

Płytki posiadają na swojej powierzchni receptory specyficzne dla chemokin, takie jak CXCR4 i CCR4. Chemokiny SDF-1, MDC i TARC są słabymi aktywatorami płytek. SDF-1 aktywuje cyklazę adenylową, a MDC i TARC powodują mobilizację jonów wapnia, w ten sposób uczestnicząc w procesach agregacji płytek i uwalniania zawartości ziarnistości wewnątrzpłytkowych.

**Tabela I.** Chemokiny wydzielane przez płytki, cel ich działania i funkcja

Table I. Chemokines secreted by platelets and their function

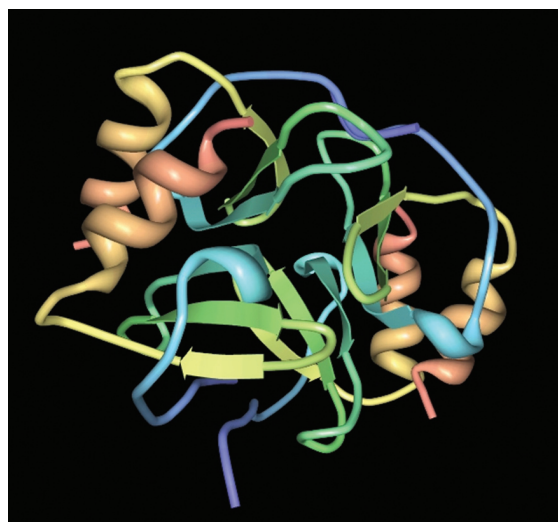
| Nazwa        | Cel działania                     | Funkcja  |
|--------------|-----------------------------------|--|
| CXCL4/PF4    | płytki, komórki śródbłonna naczyń | udział w krzepnięciu krwi, aktywacja białka C                          |
| CCL2/MCP-1   | monocyty, limfocyty T             | mobilizacja leukocytów   |
| CCL5/RANTES  | limfocyty T, komórki NK           | mobilizacja monocytów  |
| CCL7/MCP-3   | monocyty, SMC                     | aktywacja komórek mięśni gładkich – SMC ( <i>smooth muscle cells</i> ) |
| CCL17/TARC   | limfocyty T, płytki               | aktywacja płytek   |
| CCL22/MDC    | limfocyty T, płytki, monocyty     | aktywacja płytek   |
| CXCL1/Gro-a  | neutrofile, monocyty              | unieruchamianie monocytów  |
| CXCL5/ENA78  | monocyty                          | unieruchamianie monocytów  |
| CXCL7/NAP-2  | neutrofile                        | mobilizacja neutrofili   |
| CXCL8/IL-8   | makrofagi                         | mobilizacja makrofagów   |
| CXCL12/SDF-1 | płytki, megakariocyty, limfocyty  | aktywacja płytek   |

## Budowa i funkcja PF4

PF4 został opisany po raz pierwszy w roku 1970. Jest białkiem o masie cząsteczkowej 7,8 kD i składa się z 70 aminokwasów. Cząsteczka PF4 zawiera 4 reszty cysteinowe odpowiedzialne za tworzenie mostków dwusiarczkowych. W sekwencji aminokwasów wykazuje dużego stopnia homologię z cząsteczką  $\beta$ -tromboglobuliny [5].

PF4 jest syntetyzowany wyłącznie w megakariocytach i magazynowany w ziarnistościach  $\alpha$  płytek. Stanowi 2–3% całkowitego białka znajdującego się w krążących płytkach. Po aktywacji płytek pod wpływem ADP, trombiny, adrenaliny PF4 jest uwalniany z ich wnętrza tak intensywnie, że jego stężenie w pobliżu miejsca uszkodzenia naczynia przekracza 2  $\mu$ M (~12  $\mu$ g/ml surowicy) [6], podczas gdy tylko niewielkie ilości (około 1000 razy mniej) wykrywalne są w osoczu. Stężenie PF4 w płytkach wynosi ok. 100  $\mu$ M natomiast w bezpośrednim otoczeniu skrzepu po aktywacji płytek może osiągać 280  $\mu$ M, czyli ok. 100 razy więcej niż w surowicy [7]. Na rycinie 1 przedstawiono strukturę czynnika płytkowego 4.

Ze względu na fakt, że PF4 występuje w płytkach w bardzo dużym stężeniu, jego cząsteczka została jako pierwsza spośród chemokin rozpoznana i poddana sekwencjonowaniu DNA [8], a w 10 lat później został sklonowany gen ludzkiego PF4 [9]. Natywny płytkowy czynnik 4 jest sferycznym tetramerem składającym się z identycznych podjednostek, z których każda ma ciężar cząsteczkowy równy 7,8 kDa. Jed-



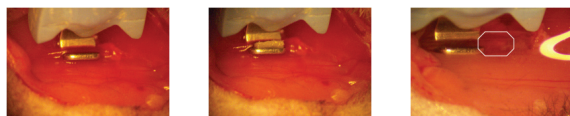
**Ryc. 1.** Struktura czynnika płytkowego 4 (ze strony internetowej banku danych o białkach <http://www.rcsb.org/pdb>)  
Fig. 1. The structure of PF4 molecule (from internet: RCBS Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb>)

nostki te połączone są asymetrycznie [10] i ustabilizowane dzięki oddziaływaniu sił elektrostatycznych. Dzięki technikom krystalograficznym oraz badaniom z wykorzystaniem Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (NMR) opracowano model strukturalny PF4, w którym cząsteczki heparyny owinięte są wokół tetrameru i przylączają się do jednakowych, dodatnio naładowanych pierścieni usytuowanych prostopadle do spirali  $\alpha$ , zawierającej cząsteczkę lizyny [11, 12].

Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* wskazywały na to, że PF4 uczestniczy w wielu procesach biologicznych obejmujących: megakariopoezę [13], angiogenezę [14], powstawanie przerzutów nowotworowych [15], odpowiedź immunologiczną [16] oraz tworzenie skrzepu [17, 18]. Co prawda, udział PF4 w wymienionych powyżej procesach obserwowano jedynie wówczas, gdy stężenie PF4 było bardzo duże i wynosiło 5–25  $\mu$ g/ml lub 0,2–08  $\mu$ M, a więc nie można być pewnym, że te obserwacje poczynione *in vitro* świadczą o rzeczywistym znaczeniu biologicznym PF4. Z drugiej strony wiadomo, że takie stężenie PF4 może osiągnąć w przypadku bardzo intensywnej aktywacji płytek.

## Wpływ PF4 na megakariopoezę

W pracy Eslina z roku 2004 podjęto próbę zdefiniowania roli PF4 w tworzeniu skrzepu w warunkach *in vivo*, wykorzystując myszy *knock-out*, pozbawione PF4 (mPF4<sup>-/-</sup>) [19] oraz myszy transgeniczne wykazujące nadekspresję ludzkiego PF4 w płytkach (hPF4<sup>+</sup>) [20]. Oba rodzaje myszy rozwijały się prawidłowo, nie obserwowano u nich jawnych objawów skazy krwotocznej. Rutynowe badania układu krzepnięcia mięsicy się w granicach normy. Oceniając morfologię krwi, wy-



**Ryc. 2.** Etapy wywołania zakrzepicy w tętnicy szyjnej myszy; a) wyeksponowanie prawej tętnicy szyjnej; b) umieszczenie fragmentu papierowego filtra nasączonego 10% FeCl<sub>3</sub> na ścianie tętnicy na okres 2 minut; c) rejestrowanie przepływu krwi przez okres 30 minut i obserwacja powstawania skrzepu w świetle naczynia

**Fig. 2.** Thrombosis induced in mouse carotid artery; a) carotid artery exposed; b) filter paper patch 1x2mm soaked in 10% FeCl<sub>3</sub> applied to artery for 2 min; c) blood flow monitored for 30 minutes, white clot can be observed



**Ryc. 3.** Wykresy obrazujące rodzaje skrzepów i odpowiadające im współczynniki; a) skrzep stabilny; b) skrzep niestabilny; c) brak skrzepu

**Fig. 3.** Graphs showing different types of clots; a) stable occlusion; b) unstable occlusion; c) no occlusion

kazano, że różnice dotyczyły m. in. liczby płytek krwi. Nadmierna i obniżona ekspresja PF4 powoduje bowiem odpowiednio obniżenie i zwiększenie liczby płytek. Liczba płytek zwiększa się o około 15–30% u myszy pozbawionych PF4 (mPF4<sup>-/-</sup>) i obniża się o tyle samo u myszy z nadmierną ekspresją ludzkiego PF4 w płytkach (hPF4<sup>+</sup>), w porównaniu z myszami o prawidłowej ekspresji PF4 czyli tzw. dzikich (WT; *wild type*). Wydaje się to potwierdzać informację, znaną z badań *in vitro*, o hamującym wpływie PF4 na megakariopozę [13]. Dalsze prace *ex vivo* z wykorzystaniem megakariocytów pochodzących od myszy mPF4<sup>-/-</sup> i hPF4<sup>+</sup> oraz badania *in vivo* tych samych myszy poddanych chemioterapii wykazały, że PF4 ma istotny wpływ na wzrost kolonii megakariocytarnych oraz na odnowę płytek po chemioterapii i radioterapii [21, 22].

### Wpływ PF4 na aktywację białka C

Przeciwwzakrzepowe działanie PF4 wynika również z jego wpływu na trombomodulinę, która bierze udział w procesie aktywacji białka C. Zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* zauważono, że PF4, wiążąc się z siarczanem chondroityny, podwyższa stężenie aktywnego białka C w obecności komórek śródbłonna i w osoczu małych [23–25]. Badania z użyciem myszy wykazały również, że stopień podwyższenia stężenia aktywnego białka C zależy od stężenia PF4 [26], jednak w przypadku dużego stężenia białka C wpływ PF4 na aktywację tego białka zostaje zahamowany [27]. Efekt wywierany przez PF4 wynika z oddziaływania jego dodatnio naładowanej cząsteczki z ujemnie naładowaną cząsteczką siarczanu chondroityny zlokalizowanego w bocznym łańcuchu trombomodu-

liny. Działanie podobne do tego, jakie wywiera PF4 na białko C, zauważono również w przypadku innych dodatnio naładowanych polipeptydów. Heparyna, której cząsteczka ma ładunek ujemny, moduluje siłę oddziaływania PF4 z trombomoduliną [27].

### Model wywołania zakrzepicy w tętnicy szyjnej myszy

Nie do końca wyjaśniona została rola PF4 w patogenezie zakrzepicy, opisywano bowiem zarówno pro-, jak i przeciwwzakrzepowe jego działanie. W celu zaprezentowania różnic w powstawaniu skrzepu wynikających z zawartości PF4 w płytkach, posłużono się własnym opisanym wcześniej [28] modelem wywołania zakrzepicy w tętnicy szyjnej myszy za pomocą bibuly nasączonej chlorkiem żelaza FeCl<sub>3</sub>.

Opis procedury: Do badania używano 6–10-tygodniowych zwierząt o wadze 18–25 g. Po anestezji dootrzewnowej za pomocą pentobarbitalu w dawce 80 mg/kg wypreparowywano prawą tętnicę szyjną. Wypreparowaną tętnicę umieszczano na końcówce aparatu mierzącego przepływ krwi u małych zwierząt: model T 106; Transonic Systems, Ithaca, NY. Na zewnętrznej ścianie tętnicy umieszczano fragment papierowego filtra Whatmana o wymiarach 1x2 mm, nasączonego 10% roztworem chlorku żelaza (FeCl<sub>3</sub>). Filtr pozostawiano na ścianie tętnicy przez okres 2 minut. Po jego usunięciu tętnicę przemywano roztworem PBS i rejestrowano przepływ krwi za pomocą wymienionego powyżej aparatu przez okres 30 minut. Mierzono czas, po którym obserwowano powstanie skrzepu zamykającego światło naczynia i zatrzymującego przepływ krwi oraz sprawdzano stabilność skrzepu. Na rycinie 2 zaprezentowano poszczególne etapy tej procedury.

Na rycinie 3 przedstawiono sposób powstawania skrzepu stabilnego bądź niestabilnego. W celu ułatwienia oceny statystycznej, poszczególnym rodzajom skrzepu przypisano odpowiedni współczynnik – 2 punkty dla skrzepu wywołującego zamknięcie światła naczynia trwające dłużej niż 10 min określonego jako stabilny, 1 punkt dla skrzepu niestabilnego, tzn. takiego, który wywołał zamknięcie światła naczynia trwające krócej niż 10 min, i 0 punktów, gdy nie uzyskano zamknięcia światła naczynia [28].

### Stabilność skrzepu a stężenie PF4

Skrzepy stabilne powstawały przy fizjologicznym stężeniu PF4. Natomiast gdy stężenie PF4 było o 50% mniejsze lub gdy przekraczało poziom fizjologiczny co najmniej 4 krotnie, obserwowano powstawanie skrzepów niestabilnych. Tak więc zarówno nadmiar, jak i niedobór PF4 powoduje upośledzenie powstawania skrzepu [19].

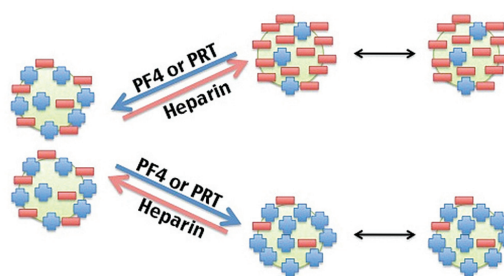
W celu potwierdzenia obserwacji wskazującej na to, że niestabilność skrzepu wynika ze zmiany stężenia PF4 Eslin i wsp. przeprowadzili następujące doświadczenie. Mysiom dzikim WT i mysiom pozbawionym PF4 mPF4<sup>-/-</sup> tuż przed wywoływaniem zakrzepicy za pomocą FeCl<sub>3</sub> podano w infuzji ludzki PF4 (hPF4). Podanie hPF4 mysiom pozbawionym tego czynnika korygowało powstanie skrzepu. Natomiast u myszy z prawidłową zawartością PF4 podanie dodatkowo PF4 upośledzało tworzenie skrzepu [19].

Próba wyjaśnienia tego spostrzeżenia związana jest z faktem, że PF4 charakteryzuje się dużym powinowactwem do ujemnie naładowanych powierzchni.

Uwolnienie PF4 w objętości fizjologicznej częściowo neutralizuje ujemnie naładowane powierzchnie płytek krwi i komórek śródbłonna, umożliwiając tym samym przyleganie płytek do siebie i do komórek śródbłonna naczyń, a tym samym promuje powstawanie skrzepu. W przypadku uwolnienia niedostatecznej ilości PF4 powierzchnie komórek zachowują swój ujemny ładunek wystarczający do zahamowania powstawania skrzepu. W sytuacji gdy objętość PF4 zdecydowanie przekracza poziom fizjologiczny, ładunek powierzchni płytek staje się dodatni, a jednakowo naładowane komórki odpychają się, tak więc ponownie tworzenie skrzepu jest zahamowane. Wynika stąd, że PF4 modyfikuje ładunek powierzchni płytek i komórek śródbłonna, a konkretnie niedobór PF4 powoduje, że powierzchnia pozostaje ujemna – tworzenie skrzepu jest zahamowane, natomiast przy jego nadmiarze powierzchnie stają się dodatnie – tworzenie skrzepu również jest zahamowane. Tylko prawidłowa zawartość PF4 powoduje, że tworzenie skrzepu jest prawidłowe – powierzchnia płytek i komórek śródbłonna ma wówczas ładunek +/-.

### Skuteczność leczenia heparyną a stężenie PF4

Skuteczność leczniczych dawek heparyny również zależy do stężenia PF4, który ma zdolność neutralizowania heparyny. Tuż przed wywoływaniem zakrzepicy za pomocą FeCl<sub>3</sub> Dehmer i wsp. [29] podawali różne dawki heparyny mysiom w celu osiągnięcia zarówno poziomu terapeutycznego, jak i wyższego i niższego. U myszy dzikich dawki terapeutyczne heparyny standardowej wynoszące 50–75 U/kg były wystarczające do zahamowania powstawania skrzepu. Myszy z obniżoną zawartością PF4 wymagały mniejszych dawek do uzyskania tego samego efektu. Natomiast u myszy z nadmierną ekspresją ludzkiego PF4 (hPF4<sup>+</sup>) heparyna podawana w dawkach stopniowo zwiększanych od 50–75 U/kg do 150 U/kg nie wywoływała zahamowania skrzepu, gdyż nadmiar PF4 neutralizował jej



**Ryc. 4. Rodzaje ładunku powierzchni płytek w zależności od zawartości PF4, siarczanu protaminy i heparyny**  
Fig. 4. Changes of platelet surface charge depending on the levels of PF4, protamine sulfate and heparin

działanie. Dopiero bardzo duża dawka leku powyżej 150 kg wywoływała efekt antykoagulacyjny, powodując zahamowanie tworzenia skrzepu.

### Podsumowanie

PF4 uczestniczy w powstawaniu skrzepu. Jego prawidłowe stężenie jest konieczne, aby proces krzepnięcia był efektywny. Zarówno niedobór, jak i nadmiar tego białka prowadzi do upośledzenia procesu krzepnięcia. W przypadku chorób, takich jak nadpłytkowość samoistna, gdzie liczba płytek jest bardzo duża, obserwujemy zarówno powikłania zakrzepowe jak i krwotoczne. Być może jednym z powodów tak skrajnej różnicy w typie obserwowanych zaburzeń hemostazy jest nieprawidłowa zawartość i uwalnianie PF4 z ziarnistości wewnątrzpłytkowych. Odbiegające od normy stężenie PF4 skutkuje bowiem nieprawidłowościami w powstawaniu skrzepu. Drugim bardzo ważnym aspektem praktycznym wynikającym z oceny zawartości PF4 jest przewidywanie skuteczności leczenia heparyną standardową. Wykazano doświadczalnie, że tylko prawidłowa zawartość PF4 w płytkach warunkuje skuteczne działanie terapeutycznych dawek heparyny.

### Piśmiennictwo

1. Rucinski B, Niewiarowski S, James P, et al. Antiheparin proteins secreted by human platelets. purification, characterization, and radioimmunoassay. *Blood*, 1979; 53(1): 47–62.
2. Holt JC, Niewiarowski S. Biochemistry of alpha granule proteins. *Semin Hematol*, 1985; 22(2): 151–63.
3. Schaffner A, Rhyn P, Schoedon G, et al. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes – role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J Leukoc Biol*, 2005; 78(1): 202–9.
4. Holt JC, Yan ZQ, Lu WQ, et al. Isolation, characterization, and immunological detection of neutrophil-activating peptide 2: a proteolytic degradation product of platelet basic protein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992; 199(2): 171–7.



5. Zucker MB, Katz IR. Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1991; 198(2): 693–702.
6. Fukami MH, Holmsen H, Kowalska MA, et al. Platelet Secretion. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, et al. ed. *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practice*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2001; 561–73.
7. Brandt E, Ludwig A, Petersen F, et al. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol Rev*, 2000; 177: 204–16.
8. Deuel TF, Keim PS, Farmer M, et al. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74(6): 2256–8.
9. Poncz M, Surrey S, LaRocco P, et al. Cloning and characterization of platelet factor 4 cDNA derived from a human erythroleukemic cell line. *Blood*, 1987; 69(1): 219–23.
10. Mayo KH, Chen MJ. Human platelet factor 4 monomer-dimer-tetramer equilibria investigated by 1H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 1989; 28(24): 9469–78.
11. Zhang X, Chen L, Bancroft DP, et al. Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry*, 1994; 33(27): 8361–6.
12. Stuckey JA, St Charles R, Edwards BF. A model of the platelet factor 4 complex with heparin. *Proteins*, 1992; 14(2): 277–87.
13. Gewirtz AM, Zhang J, Ratajczak J, et al. Chemokine regulation of human megakaryocytopoiesis. *Blood*, 1995; 86(7): 2559–67.
14. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, et al. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem*, 1995; 270(25): 15059–65.
15. Yoshimitsu K, Wright KC, Wallace S, et al. Hepatic arterial infusion of recombinant platelet factor-4 suppresses metastases to the lungs from tumors implanted into the livers of rabbits. *Cancer*, 1995; 75(10): 2435–41.
16. Brandt E, Petersen F, Ludwig A, et al. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol*, 2000; 67(4): 471–8.
17. Harker LA, Hanson SR. Platelet factors predisposing to arterial thrombosis. *Baillieres Clin Haematol*, 1994; 7(3): 499–522.
18. Okuno T, Crockatt D. Platelet factor 4 activity and thromboembolic episodes. *Am J Clin Pathol* 1977; 67(4): 351–5.
19. Eslin DE, Zhang C, Samuels KJ, et al. Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood*, 2004; 104(10): 3173–80.
20. Zhang C, Thornton MA, Kowalska MA, et al. Localization of distal regulatory domains in the megakaryocyte-specific platelet basic protein/platelet factor 4 gene locus. *Blood*, 2001; 98(3): 610–7.
21. Lambert MP, Wang Y, Bdeir KH, et al. Platelet factor 4 regulates megakaryopoiesis through low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on megakaryocytes. *Blood*, 2009; 114(11): 2290–8.
22. Lambert MP, Xiao L, Nguyen Y, et al. The role of platelet factor 4 in radiation-induced thrombocytopenia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011; 80(5): 1533–40.
23. Slungaard A, Fernandez JA, Griffin JH, et al. Platelet factor 4 enhances generation of activated protein C in vitro and in vivo. *Blood*, 2003; 102(1): 146–51.
24. Slungaard A. Platelet factor 4 modulation of the thrombomodulin-protein C system. *Crit Care Med*, 2004; 32(5 Suppl): 331–5.
25. Dudek AZ, Pennell CA, Decker TD, et al. Platelet factor 4 binds to glycanated forms of thrombomodulin and to protein C. A potential mechanism for enhancing generation of activated protein C. *J Biol Chem*, 1997; 272(50): 31785–92.
26. Kowalska MA, Mahmud SA, Lambert MP, et al. Endogenous platelet factor 4 stimulates activated protein C generation in vivo and improves survival after thrombin or lipopolysaccharide challenge. *Blood*, 2007; 110(6): 1903–5.
27. Kowalska MA, Krishnaswamy S, Rauova L, et al. Antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) inhibit activated protein C generation: new insights into the prothrombotic nature of HIT. *Blood*, 2011; 118(10): 2882–8.
28. Kufirin D, Eslin DE, Bdeir K, et al. Antithrombotic thrombocytes: ectopic expression of urokinase-type plasminogen activator in platelets. *Blood*, 2003; 102(3): 926–33.
29. Dehmer GJ, Fisher M, Tate DA, et al. Reversal of heparin anticoagulation by recombinant platelet factor 4 in humans. *Circulation*, 1995; 91(8): 2188–94.