

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**Μετάγγιση Φρέσκου Κατεψυγμένου Πλάσματος:
Ο ρόλος των κυτταρικών μικροκυστιδίων**

**Χαράλαμπος Σαραντίδης Α.Μ. 08034
Νικόλαος Μπουτουρίδης Α.Μ. 08055**

**Δρ. Κριεμπάρδης Αναστάσιος
Καθηγητής Εφαρμογών Αιματολογίας – Αιμοδοσίας**

ΑΘΗΝΑ, Μαΐος 2013

TECHNOLOGICAL EDUCATIONAL INSTITUTE OF ATHENS

**FACULTY OF HEALTH AND CARING PROFESSIONS
DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORIES**

Fresh Frozen Plasma Transfusion: The role cellular of microparticles

**Haralampos Sarantidis (R. N. 08034)
Nikolaos Boutouridis (R. N. 08055)**

**Dr. Kriebardis Anastasios
Lecturer of Haematology and Transfusion Medicine**

ATHENS, May 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ιστορική αναδρομή

- 1.1 Ιστορική αναδρομή στη μετάγγιση του αίματος
- 1.2 Η αιμοδοσία μέχρι σήμερα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Παράγωγα του αίματος και παράγοντες πήξης

- 2.1 Παράγωγα του αίματος
 - 2.1.1 Επισκόπηση παραγώγων αίματος
 - 2.1.2 Συμπυκνωμένα Ερυθρά
 - 2.1.3 Συμπυκνωμένα Αιμοπετάλια
 - 2.1.4 Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα
 - 2.1.5 Ασταθή παράγωγα αίματος
 - 2.1.6 Σταθερά παράγωγα αίματος
- 2.2 Παράγοντες πήξης
- 2.3 Παράγοντες εξαρτώμενοι από την Βιταμίνη Κ
- 2.4 Παράγοντες επαφής
- 2.5 Παράγοντες ευαίσθητοι στην θρομβίνη
- 2.6 Φωσfolιπίδια και ιόντα ασβεστίου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

- 3.1 Φρέσκο Κατεψυγμένο Πλάσμα
 - 3.1.1 Πλάσμα πλούσιο σε Αιμοπετάλια
 - 3.1.2 Πλάσμα πλούσιο σε Αιμοπετάλια
 - 3.1.3 Πλάσμα φτωχό σε Αιμοπετάλια

- 3.2 Μετάγγιση του Φρέσκου Κατεψυγμένου Πλάσματος.
- 3.3 Αρχές φυγοκέντρησης
- 3.4 Αρχές διαχωρισμού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Μικροκυστίδια

- 4.1 Είδη και χαρακτηριστικά των κυριότερων πληθυσμών κυστιδίων
- 4.2 Γιατί τα κύτταρα δημιουργούν κυστίδια
- 4.3 Μικροκυστίδια
- 4.4 Βιοχημική βάση της σύνθεσης των μικροκυστιδίων
- 4.5 Μηχανισμός απελευθέρωσης μικροκυστιδίων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Παραγωγή μικροκυστιδίων από τα κύτταρα

- 5.1 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων
 - 5.1.1 Διαδικασία κυστιδιοποίησης των ερυθροκυττάρων
 - 5.1.2 Κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων in vivo
 - 5.1.3 Κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων in vitro
 - 5.1.4 Παραγωγή μικροκυστιδίων από κύτταρα
- 5.2 Η Κυστιδιοποίηση των αιμοπεταλίων
 - 5.2.1 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων
 - 5.2.2 Διαδικασία αιμοπεταλιοφέρνησης και δειγματοληψία αίματος(πειραματικό)
 - 5.2.3 Απομόνωση αιμοπεταλίων (πειραματικό)
- 5.3 Κυστιδιοποίηση λευκών αιμοσφαιρίων
- 5.4 Μηχανισμοί σχηματισμού ενδοθηλιακών μικροκυστιδίων
- 5.5 Σχηματισμός κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, σχηματισμός μικρομορίων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Μέθοδοι ανάλυσης και μέτρησης των μικροκυστιδίων

- 6.1 Μέτρηση των επιπέδων των MPs χρησιμοποιώντας Λειτουργικές Δοκιμασίες
- 6.2 Μέθοδοι για την ανάλυση MPs
 - 6.2.1 FCM ανάλυση
 - 6.2.2 Τεχνική ELISA για τη δραστικότητα των MPs
 - 6.2.3 MP ανίχνευση με την προπηκτική PL-εξαρτώμενη δοκιμασία πήξεως του χρόνου
 - 6.2.4 Στατιστική ανάλυση
 - 6.2.5 Αποτελέσματα Αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων(PMPs) και δραστηριότητα τους σε προϊόντα της APC (ερευνητικό)
 - 6.2.6 Σύγκριση των τριών διαφορετικών μεθόδων για την ανίχνευση MPs

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

- 7.1 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην αιμοσταση και τη θρόμβωση (προθρομβωτικές - προπηκτικές Ιδιότητες των MPs)
- 7.2 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στη εξέλιξη και τη διάγνωση του καρκίνου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Ο ρόλος των μικροκυστιδίων σε ασθένειες

- 8.1 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στις καρδιαγγειακές νόσους
- 8.2 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην αθηρογένεση
- 8.3 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στις φλεγμονές

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

- 9.1 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματεύεται την μετάγγιση του φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος και κυρίως τον ρόλο των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση, την μετάγγιση του αίματος και στην συνέχεια πιο εξειδικευμένα στην μετάγγιση του φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος, καθώς και στα παράγωγα του αίματος τα οποία διακρίνονται σε σταθερά και ασταθή.

Επίσης γίνεται μια εκτενής ανάλυση του μηχανισμού πήξης του αίματος καθώς και στους παράγοντες πήξης οι οποίοι αναλύονται ο καθένας ξεχωριστά. Όλα τα προηγούμενα αφορούν το γενικό-εισαγωγικό κομμάτι της εργασίας. Το πιο εξειδικευμένο αφορά αποκλειστικά το φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα και κυρίως τα μικροκυστίδια και τον πολλαπλό τους ρόλο στον οργανισμό μας. Πιο συγκεκριμένα, δίνεται ο ορισμός του φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος, οι υποκατηγορίες του και γίνεται παρουσίαση των μεθόδων φυγοκέντρησης και διαχωρισμού για την παραλαβή αυτών των παραγώγων.

Αναλύονται τα διαφορετικά είδη κυστιδίων που παράγονται από τα κύτταρα του οργανισμού καθώς και ο λόγος που γίνεται η παραγωγή τους αυτή. Όμως από όλες τις κατηγορίες των κυστιδίων η σπουδαιότερη είναι τα μικροκυστίδια. Αναλύονται τα γενικά-μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, η βιοχημική τους σύσταση καθώς και ο τρόπος παραγωγής τους από τις διάφορες κατηγορίες κυττάρων (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, ενδοθηλιακά κύτταρα). Όμως ο αριθμός των μικροκυστιδίων στο φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα είναι σημαντικός. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται τρεις λειτουργικές μέθοδοι, η κυτταρομετρία ροής, η τεχνική Elisa και η ανίχνευση των μικροκυστιδίων με την προπηκτική PL-εξαρτώμενη δοκιμασία. Στο τέλος μάλιστα του συγκεκριμένου κεφαλαίου γίνεται στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τους και μία σύγκριση τους.

Τα μικροκυστίδια έχουν έναν πολλαπλό και όπως αποδεικνύεται βάσει μελετών σημαντικότερο ρόλο στον οργανισμό μας, τόσο όταν εκείνος βρίσκεται σε μία υγιή και σωστή λειτουργία, όσο και όταν υπάρχει κάποια ασθένεια. Πιο αναλυτικά τα μικροκυστίδια είναι εξαιρετικά σημαντικά στην διακυτταρική επικοινωνία, συμβάλλουν στην πήξη του αίματος και μεταφέρουν διάφορες ουσίες και φάρμακα σε κύτταρα στόχους. Η παρουσία και ο ρόλος όμως των μικροκυστιδίων είναι εξαιρετικά σημαντικός και στην εξέλιξη καθώς και στην διάγνωση μιας πληθώρας ασθενειών. Η πιο καλά μελετημένη ασθένεια σε αυτά τα ζητήματα μέχρι σήμερα είναι ο καρκίνος. Στην εργασία όμως γίνεται και μια αναφορά στην αθηρογένεση, την φλεγμονή και τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Μέσα από την εργασία αυτή συμπεραίνουμε πως μέσα από την μελέτη των μικροκυστιδίων του πλάσματος, προκύπτουν σημαντικότερες μελλοντικές προοπτικές για την καλύτερη διάγνωση και θεραπεία πολλών ασθενειών και γίνεται κατανοητό πως ο ανθρώπινος οργανισμός μας επιφυλάσσει πολλές ακόμα εκπλήξεις που πρέπει να ανακαλύψουμε.

ABSTRACT

This thesis paper discusses the transfusion of fresh frozen plasma and the role it plays in this the presence and the role of microvesicles. Initially in a flashback reported in transfusion of blood and then more specialized in transfusion of fresh frozen plasma and in blood derivatives which are divided into stable and unstable. Also includes an extensive analysis of coagulation and clotting factors which are analyzed each individually.

The most specialized exclusively fresh frozen plasma and mainly microvesicles and their multiple roles in the body. More specifically, we propose the definition of fresh frozen plasma, subcategories and we present methods of centrifugation and separation for the receipt. of these derivatives

Different types of vesicles produced by cells of the body is analysed and the reason is their production. But by all classes of vesicles the most important are the microvesicles. Analyzed general-morphological features, biochemical composition and the method of production of the various types of cells (red cells, white cells, endothelial cells). However the number of microvesicles in fresh frozen plasma is important. For this reason are used three functional methods, flow cytometry, the Elisa technique and detection of microvesicles with procoagulant PL-dependent assay. In the end of this chapter is shown a statistical analysis of the results of these methods and a comparison of them.

Microvesicles, have a multiple and as evidenced by studies major role in our body, so when it is in a healthy and proper function, and when there is an illness. In detail the microvesicles are extremely important in intracellular communication, contributing to blood clotting and carry various substances and drugs to target cells. The presence and role of microvesicles is however extremely important in development and in the diagnosis of a plurality of diseases. The best studied disease in these issues until today is cancer. At work there is a reference in atherogenesis, inflammation and cardiovascular disease.

Through this work we conclude that through the study of microvesicles plasma generated very significant future prospects for better diagnosis and treatment of many diseases and it is understood that the human body holds many more surprises to discover.

DNA: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ

TF: παράγοντας θρομβίνης (thrombin factor)

MPs: μικροκυστίδια

MVs: μικροκυστίδια

TEM: ηλεκτρονική μικροσκόπηση μεταφοράς

RBCs: ερυθρά αιμοσφαίρια

PLTs: αιμοπετάλια

FFP: φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

EMPs: ενδοθηλιακά μικροκυστίδια

ρMVs: αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια

Hb: αιμοσφαιρίνη

ATP: ενεργειακό νόμισμα κυττάρου

ΣΕ: συμπυκνωμένα ερυθρά

SPU: απλή μονάδα πλάσματος

DPU: διπλή μονάδα πλάσματος

WBCs: λευκά αιμοσφαίρια

FCM: κυτταρομετρία ροής

FSC: πρόσθια σκέδαση

FITC: Fleet Intelligence Training Center

ITP: ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα

DVT: εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση

WB: ολικό αίμα (whole blood)

PT: χρόνος προθρομβίνης

INR: ινοδογόνο

PRP: πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

ΤΤΡ: θρομβοτική θρομβοπενική πορφύρα

ΡΡΡ: πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

Ευχαριστούμε θερμά τον εισηγητή μας
κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την πολύτιμη βοήθεια του και
τις οικογένειές μας για την υποστήριξή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Ιστορική αναδρομή στη μετάγγιση του Αίματος

Από τα αρχαία χρόνια το αίμα ήταν τυλιγμένο με ένα μυστηριώδες πέπλο και προκαλούσε δέος στους αρχαίους λαούς. Το χρησιμοποιούσαν σε ειδικές θεραπείες και ιερές τελετουργίες. Επίσης είχαν αναπτυχθεί πολλές θεωρίες γύρω από τις μαγικές ιδιότητες του αίματος. Από πολύ νωρίς είχε αναγνωριστεί πως η απώλεια αίματος οδηγούσε συχνά σε αδυναμία ή και θάνατο. Απόδειξη αυτής της ιδιότητας αποτελούσαν οι αρχαίοι Ρωμαίοι και Έλληνες, που έδιναν τέλος στη ζωή τους, κόβοντας τις φλέβες των καρπών τους. Η προσπάθεια για μετάγγιση αίματος χάνεται στα βάθη της ιστορίας. Με την πάροδο του χρόνου έγιναν πολλές προσπάθειες μεταγγίσεων, άλλοτε επιτυχημένες και άλλοτε αποτυχημένες με τις τελευταίες να υπερτερούν[1,2,6]. Αρχικές προσπάθειες αντιμετώπισης της αιμορραγίας περιλάμβαναν πόση αίματος. Το αίμα όμως φαίνεται να χρησιμοποιούταν για πολλούς «ιατρικούς» σκοπούς. Αιγύπτιοι φαραώ και ευγενείς έκαναν μπάνιο με αίμα, για να αντιμετωπίσουν διάφορες ασθένειες (π.χ. την ελεφαντίαση) ή να αναζωογονηθούν. Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι επίσης λούζονταν με αίμα ή και το έπιναν. Την εποχή των μονομάχων οι θεατές έπιναν το αίμα των ετοιμοθάνατων μαχητών προκειμένου να αποκτήσουν κι εκείνοι το θάρρος και τη δύναμή τους, όπως περιγράφει ο Gaius Plinius Secundus, ο οποίος επίσης αναφέρει πως η επάλειψη με αίμα ανακούφιζε από τον πόνο και η πόση του θεράπευε την επιληψία, ενώ την ίδια εποχή ο Γαληνός ισχυρίζεται πως η πόση αίματος σκύλου ή νυφίτσας θεράπευε τη λύσσα. Παρομοίως, οι αρχαίοι Νορβηγοί έπιναν αίμα φάλαινας και φώκιας για να θεραπεύσουν την επιληψία. Μια μορφή «μετάγγισης» εμφανίζεται στην αρχαία ελληνική μυθολογία, όταν η Μήδεια για να αναζωογονήσει τον γέρο πατέρα του Ιάσονα, αφαιρεί όλο το «γερασμένο» αίμα και ξαναγεμίζει τα στεγνά πλέον αγγεία με ένα «φίλτρο», όπως περιγράφει ο Publius Ovidius Naso στο βιβλίο του «Μεταμορφώσεις». Μια άλλη «μετάγγιση»

αίματος πραγματοποιήθηκε (ως θεραπεία), σύμφωνα με ένα αρχαίο εβραϊκό κείμενο, στον μολυσμένο με λεπρά βασιλιά της Συρίας, από τον οποίο αφαιρέθηκε το αίμα από τις φλέβες του για να αντικατασταθεί με αίμα άλλου ατόμου.

Η πρώτη «μετάγγιση» περιγράφεται από τον Ιταλό ιστορικό και πολιτικό Pasquale Villari (1827-1917). Πραγματοποιήθηκε στον Πάπα Innocent VIII το 1492, ο οποίος, με τις σημερινές γνώσεις, εικάζεται ότι έπασχε από χρόνια νεφρική νόσο. Μετά από άκαρπες προσπάθειες αναζωογόνησής του, ένας αμφιβόλου φήμης ιατρός, ονομαζόμενος Abraham Menre, προχώρησε σε μετάγγιση αίματος στον Πάπα. Ως «δότες» επιλέχθηκαν τρία δεκάχρονα αγόρια (στα όποια είχαν υποσχεθεί αμοιβή ενός δουκάτου). Τα τρία παιδιά πέθαναν λίγο μετά τη «μετάγγιση», ενώ και ο Πάπας πέθανε αργότερα, πιθανώς από την ασθένειά του. Η περιγραφή της «μετάγγισης» αυτής όμως, θεωρείται πως πρόκειται για λανθασμένη μετάφραση των αρχικών κείμενων και πως στην πραγματικότητα ο Πάπας συμβουλευτήκε να πει το αίμα, όπως υποστηρίζει και ο χρονικογράφος του 15ου αιώνα Stefano Infessura [5, 6].

Στα χρόνια που ακολούθησαν μετά τις δημοσιεύσεις του Harvey, πολλοί ισχυρίστηκαν πως ήταν οι πρώτοι που πραγματοποίησαν μετάγγιση αίματος. Το 1615, ο Andreas Libavius (1555-1616), διακεκριμένος χημικός της περιόδου, καθώς και το 1628, ο Giovanni Francisco Colle da Belluno (1558-1631), καθηγητής στο πανεπιστήμιο της Padua, υποστήριξαν τη χρήση της μετάγγισης ως μέσο βελτίωσης της υγείας και επιμήκυνσης της ζωής και περιέγραψαν τέτοιου τύπου διαδικασίες, χωρίς όμως να προβούν σε περαιτέρω πειράματα ή έρευνες [1, 2, 6]. Ο Francesco Follì (1624-1685) περιγράφει το 1654, με ιδιαίτερη παραστατικότητα, τη συσκευή, τη μέθοδο και τη διαδικασία της μετάγγισης που ποτέ όμως δεν πραγματοποίησε (όπως και ένας Γάλλος μοναχός ονομαζόμενος Robert des Gabets (1610-1678)). Ο μόνος που φέρεται να έκανε απόπειρα πρακτικής εφαρμογής της μετάγγισης αίματος είναι ο Francis Potter (1594-1678) το 1639, ο οποίος ισχυρίστηκε πως επιχείρησε μετάγγιση αίματος από ένα κοτόπουλο σε ένα άλλο, εγχείρημα που μάλλον κατέληξε σε αποτυχία [2].

Ο επιστήμονας που θεωρείται ότι πρώτος πρότεινε και παρουσίασε την ενδοφλέβια χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών (σε φλέβες σκύλων και άλλων ζώων) είναι ο γνωστός αρχιτέκτονας, αστρονόμος και ιατρός Sir Christopher Wren (1632-1723). Τα πειράματα που πραγματοποίησε με τη συμμετοχή του βοηθού του Timothy Clerk, είχαν τόσο θετικά, όσο και αρνητικά αποτελέσματα [1, 2, 5, 6]. Τα πειράματά του περιγράφηκαν αναλυτικά από τον γνωστό χημικό και ιατρό Robert Boyle (1627-1691), σε βιβλίο που εκδόθηκε το 1663. Ο ίδιος ο Boyle συνέχισε τα πειράματα του Wren με εγχύσεις «υγρών», όπως μύρας, κρασιού και οπίου, στις φλέβες ζώων, ακόμα και «εθελοντών» κρατουμένων φυλακών. Τη συνέχεια στα πειράματα αυτά έδωσε ο ιατρός Richard Lower (1631-1691), σκεπτόμενος, πως εφόσον είναι εφικτή η έγχυση κρασιού και μύρας στις φλέβες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και αίμα. Το Φεβρουάριο του 1665 πραγματοποίησε την πρώτη επιτυχημένη μετάγγιση αίματος σε σκύλο, που αφού τον αφαίμαξε σχεδόν σε σημείο θανάτου, του μετάγγισε το αίμα άλλου, μεγαλύτερου σκύλου, συνδέοντας την αρτηρία του με τη φλέβα του πρώτου (αν και στην αρχή επιχειρήθηκε άμεση μετάγγιση από φλέβα σε φλέβα, που απέτυχε, καθώς το αίμα έπηξε μέσα στην ασημένια σωλήνωση που χρησιμοποιήθηκε). Αργότερα, το Νοέμβριο του 1667, ο Lower με τη βοήθεια του Edmund King, προσπάθησε να πραγματοποιήσει την πρώτη μετάγγιση σε άνθρωπο, τον Arthur Coga. Στον «ασθενή», ο οποίος παρουσίαζε ψυχολογικές διαταραχές και η μετάγγιση θεωρήθηκε πιθανή θεραπεία, μεταγγίστηκε αίμα πρόβατου [2, 6].

Δεν ήταν όμως αυτή η πρώτη φορά που έγινε απόπειρα μετάγγισης σε άνθρωπο, καθώς λίγους μήνες πριν το πείραμα των Lower και King, ένας αξιοσημείωτος Γάλλος επιστήμονας και ιατρός στην αυλή του βασιλιά Λουδοβίκου XIV, ο Jean Baptiste Denis (1640-1704), φέρεται να μετάγγισε αίμα σε άνθρωπο. Έχοντας διαβάσει τη δουλειά του Lower, προχώρησε σε πολλές δοκιμές μετάγγισης αίματος σε σκύλους. Τον Ιούνιο του 1667, ζητήθηκε από τον Denis να θεραπεύσει ένα 15χρονο αγόρι, που είχε υψηλό πυρετό για μήνες. Στο παιδί μεταγγίστηκε αίμα από την καρωτίδα προβάτου. Τα αρχικά αποτελέσματα χαρακτηρίστηκαν εντυπωσιακά, καθώς φάνηκε βελτίωση στην κατάσταση του παιδιού, αν και

καταγράφηκε «έντονο αίσθημα θερμότητας στο χέρι κατά τη μετάγγιση», που σήμερα γνωρίζουμε πως είναι ένδειξη της ασύμβατης μετάγγισης. Ακολούθησαν κι άλλες φαινομενικά επιτυχημένες μεταγγίσεις από τον Denis, μέχρι που το 1668, ένας ασθενής με ψυχολογικές διαταραχές ονομαζόμενος Antoine Mauroy πέθανε, αφού είχε μεταγγιστεί με αίμα προβάτου (για τρίτη φορά σε διάστημα λίγων μηνών). Ο Denis και ο συνεργάτης του Paul Emmeretz κατηγορηθήκαν για φόνο (αν και τελικά αθωώθηκαν, καθώς αποδείχτηκε πως η σύζυγος του Mauroy τον δηλητηρίασε με αρσενικό!). Η περίπτωση αυτή λειτούργησε ως αφορμή για την απαγόρευση των μεταγγίσεων, αρχικά στη Γαλλία και στη συνέχεια σε Αγγλία και Ευρώπη (μάλιστα ο ίδιος ο Πάπας υποστήριξε την απαγόρευσή τους) [1, 2, 5, 6].

Μετά από μια μακρά περίοδο, κατά την οποία λίγοι τόλμησαν έστω και να αναφερθούν στη μετάγγιση αίματος, εμφανίζεται στο Λονδίνο ο αξιόλογος ιατρός, φυσιολόγος και μαιευτήρας James Blundell (1790-1877), ο οποίος συνειδητοποίησε την ασυμβατότητα της μετάγγισης αίματος ζώων σε ανθρώπους και εκτέλεσε πρώτος μετάγγιση από άνθρωπο σε άνθρωπο το 1818. Στη συνειδητοποίηση αυτή συνέβαλε η επιρροή του έργου του αμερικανού φυσιολόγου John Henry Leacock (1729-1802), που τοποθετήθηκε εναντίον της «ανάμειξης» αίματος διαφορετικών ειδών κατά τη μετάγγιση. Οι περισσότερες μεταγγίσεις που πραγματοποίησε ο Blundell ήταν για την αντιμετώπιση της αιμορραγίας μετά τον τοκετό. Κατασκεύασε επίσης διάφορες συσκευές που εμπόδιζαν την πήξη του αίματος. Σήμερα ο Blundell θεωρείται από πολλούς ο «πατέρας της σύγχρονης μετάγγισης αίματος» [1, 2, 5, 6].

Τα κυρία προβλήματα με τα οποία ήταν αντιμέτωποι οι επιστήμονες που επιχειρούσαν μεταγγίσεις, ήταν η συμβατότητα του αίματος του δότη με αυτό του δέκτη, η θρόμβωση του αίματος, αλλά και σε ποιες περιπτώσεις μια μετάγγιση αποτελούσε τη σωστή επιλογή για θεραπεία.

Ο Karl Landsteiner (1868-1943/ βραβείο Νόμπελ 1930) το 1900 έδωσε απάντηση στο πρόβλημα της συμβατότητας του αίματος δότη-δέκτη, διαχωρίζοντας το αίμα των ανθρώπων σε τρεις ομάδες (ομάδα Α, ομάδα Β, ομάδα Ο) και υποστηρίζοντας την επιλογή των δοτών με βάση την ομάδα στην οποία

ανήκουν. Η τετάρτη ομάδα (ομάδα AB) ανακαλύφθηκε το 1902 από δύο μαθητές του Landsteiner, τους De Castello και Sturli. Παρόλα αυτά, η ιδέα του έλεγχου ABO συμβατότητας δότη-δέκτη πριν τη μετάγγιση δεν εφαρμόστηκε, παρά μόνο το 1907, μετά από πρόταση δύο αμερικανών χειρουργών, των Reuben Totenberg και Schultz. Το 1927, ο Landsteiner και ο Levin ανακάλυψαν τα Pp αντιγόνα⁷ του συστήματος ομάδας αίματος P, ενώ την ίδια χρονιά πρότειναν ένα νέο σύστημα ομάδας αίματος, μετά την αναγνώριση δυο νέων γονιδίων, των M και N. Το σύστημα αυτό επεκτάθηκε το 1947 από τους Sanger και Race, που αναγνώρισαν τα σχετιζόμενα γονίδια S και s. Η ομάδα Rhesus (Rh) περιγράφηκε από τους Landsteiner και Alexander Wiener το 1940 [1, 2, 5, 6].

1.2 Η αιμοδοσία μέχρι σήμερα

Από τη δεκαετία του 1940 και μετά οι εξελίξεις στο χώρο της αιμοδοσίας ήταν συνεχείς. Έγιναν διαδοχικές βελτιώσεις στα υλικά και τα μέσα που χρησιμοποιούνταν καθ' όλη τη διαδικασία, από τις βελόνες και τους ασκούς, μέχρι τα αντιπηκτικά και τα ψυγεία αποθήκευσης. Άρχισε να δίνεται πλέον ιδιαίτερη βαρύτητα στην ασφάλεια και την ποιότητα των παραγώγων του αίματος. Καθορίστηκε ο ποιοτικός έλεγχος του αίματος και ο έλεγχος για μια σειρά νοσημάτων. Η αποθήκευση επαρκών ποσοτήτων ελεγμένου και απολύτως ασφαλούς αίματος εξελίχθηκε σε ζήτημα εθνικής σημασίας της κάθε χώρας [7]. Η προσέλκυση αιμοδοτών αποτέλεσε ένα καινούριο στοίχημα, καθώς η αιμοδοσία ήταν μια νέα ιδέα για το ευρύ κοινό και η ασφάλειά της απασχολούσε τους εθελοντές. Χρειάστηκαν πολλά χρόνια για να καθιερωθεί στη συνείδηση των ανθρώπων η χρησιμότητα των μεταγγίσεων. Ακόμα και μετά από τους δύο παγκόσμιους πολέμους, καθώς και τον ισπανικό εμφύλιο, όπου πολλές ζωές σώθηκαν χάρη στην έγκαιρη μετάγγιση αίματος, μεγάλο μέρος του κόσμου κρατούσε επιφυλακτική στάση, γεγονός που απαίτησε πολύ χρόνο, πολλή προσπάθεια, ή και κάποιες συγκυρίες, για να αλλάξει [7,8]. Για παράδειγμα, μεγάλη, θετική αλλαγή στην αντιμετώπιση της αιμοδοσίας από τον ιαπωνικό λαό

παρατηρήθηκε το 1930, όταν η ζωή του πρωθυπουργού της Ιαπωνίας, Osachi Hamaguchi, σώθηκε χάρη σε μία μετάγγιση αίματος [7]. Ακόμα και σήμερα, αν και πλέον δεν μπορεί να αμφισβητηθεί η χρησιμότητα και η ασφάλεια των μεταγγίσεων, το ποσοστό των εθελοντών-αιμοδοτών είναι μικρό [9].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Παράγωγα του αίματος

Παράγωγο αίματος είναι ένα οποιοδήποτε συστατικό του αίματος που συλλέγεται από ένα δότη και προορίζεται για θεραπευτική χρήση. Τα παράγωγα του αίματος χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα ασταθή και σταθερά παράγωγα. Τα ασταθή (labile) είναι το ολικό αίμα, τα συμπυκνωμένα ερυθρά και αιμοπετάλια, το πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα, το νωπό πλάσμα και τα προγονικά κύτταρα. Τα σταθερά παράγωγα είναι η λευκωματίνη, οι συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξης, οι αντιπρωτεάσες, οι ανοσοσφαιρίνες ενδομυϊκές και ενδοφλέβιες, το προθρομβωτικό σύμπλεγμα, το συμπύκνωμα αντιθρομβίνης III, οι αναστολείς πήξεως και το συμπύκνωμα ινωδογόνου[4].

2.1.1 Επισκόπηση παραγώγων αίματος

Τρεις κύριοι τύποι παραγώγων αίματος μεταγγίζονται: συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα (EC), συμπυκνωμένα αιμοπετάλια (PC) και φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP). Το κάθε παράγωγο συντηρείται σύμφωνα με τα ιδιαίτερα (επιμέρους) συστατικά του. Ωστόσο, κατά την συντήρησή τους, μπορεί να συμβεί τροποποίηση ή διάσπαση των προϊόντων (συστατικών) τους, κι είναι γνωστές ως «βλάβες συντήρησης»[13]. Οι τροποποιήσεις πολλών βιοχημικών παραμέτρων έχουν εξακριβωθεί με την πάροδο των ετών, κυρίως όσον αφορά στα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα. Οι τροποποιήσεις στην πρωτεϊνική δομή των υπερκείμενων ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους έχουν παρατηρηθεί με τη χρήση της πρωτεομικής ανάλυσης[13].

2.1.2 Συμπυκνωμένα Ερυθρά (Erythrocyte Concentrates)

Ο κύριος σκοπός της μετάγγισης των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι να διατηρηθεί η ικανότητα της μεταφοράς και της διανομής του O₂ στους ιστούς. Τα συμπυκνωμένα ερυθρά απομονώνονται από το ολικό αίμα που λαμβάνεται από τον αιμοδότη. Μετά την φυγοκέντρηση, την απομάκρυνση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και την προσθήκη «συντηρητικού διαλύματος», τα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν είτε να συντηρηθούν, είτε να μεταγγιστούν σε ασθενείς. Τα συντηρώμενα κύτταρα επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως τον τύπο των αντιπηκτικών, τον αιματοκρίτη, το pH ή τη θερμοκρασία κ.α. Καθένας από τους παραπάνω παράγοντες είναι σημαντικός και πρέπει να ελέγχεται αυστηρά, γιατί μπορεί να επηρεάσει τη συντήρηση των κυττάρων του αίματος, αλλά και την βιωσιμότητά τους[15-16]. Σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές οδηγίες μετάγγισης, τουλάχιστον το 75% των ερυθροκυττάρων πρέπει να επιβιώνει in vivo εντός 24ωρών μετά την μετάγγιση[14]. Υπάρχουν κι άλλοι περιορισμοί που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, όπως η ελάχιστη ποσότητα της αιμοσφαιρίνης ανά μονάδα αίματος ή ο μέγιστος ρυθμός αιμόλυσης. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά την συντήρηση[17]. Παρά τις γνώσεις για τον μεταβολισμό των ερυθροκυττάρων, πρέπει να μελετηθούν όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητές τους. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με κύριες μελέτες, ο χρόνος συντήρησης των EC πιθανόν να αυξάνει τον κίνδυνο επιπλοκών από την μετάγγιση[15-16].

Table 1 : Main biochemical characteristic of erythrocyte concentrate during storage

Parameters	Days of storage									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	
pH	6,92	6,79	6,65	6,55	6,47	6,40	6,35	6,29	6,24	
Na ⁺ (mmol/l)	102	88	83	79	74	71	69	69	65	
K ⁺ (mmol/l)	1,6	18,6	27,3	34,4	40,3	46,0	50,5	53,6	57,3	
Hb libre (%)	0,08	0,14	0,17	0,23	0,31	0,28	0,3	0,5	0,52	
Lactate (mmol/l)	1,79	10,26	16,13	21,55	27,66	28,96	32,77	24,53	29,59	
Glucose (mmol/l)	26,8	22,3	18,8	15,7	13,1	10,9	9,0	7,2	5,9	
2-3 DPG (% of the initial level)	100	40-60	10	< 10	0	0	0	0	0	

Πίνακας 1: Τα κύρια βιοχημικά χαρακτηριστικά των Συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης (με την πάροδο των ημερών)[15-16].

2.1.3 Συμπυκνωμένα Αιμοπετάλια (Plateled Concentrates)

Τα αιμοπετάλια παίζουν βασικό ρόλο στην αιμόσταση, αυτά σχηματίζουν τον θρόμβο σε περίπτωση αγγειακής βλάβης μετά από αλληλεπίδραση με την υπο-ενδοθηλιακή ουσία (προσκόλληση) και με άλλα αιμοπετάλια (συσσώρευση). PC μεταγγίζονται σε άτομα με θρομβοπενία, όπως και σε άτομα των οποίων τα αιμοπετάλια εμφανίζουν μειωμένη λειτουργικότητα. Η πιο συνηθισμένη διαδικασία συλλογής αιμοπεταλίων είναι η αφαίρεση. Οι συνθήκες συντήρησης, όπως και για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, είναι πολύ σημαντικές. PC έχουν μικρή διάρκεια ζωής (5 ημέρες), κι είναι πολύ ευαίσθητα στις συνθήκες του περιβάλλοντος[13].

Μετά από 5 ημέρες, αυτά υφίστανται μη αναστρέψιμη ενεργοποίηση και βλάβη. Αυτά συντηρούνται σε θερμοκρασία 20° C - 24° C με συνεχή ανακίνηση. Η θερμοκρασία συντήρησης είναι κρίσιμη και σχετίζεται με ενδεχόμενο κίνδυνο ανάπτυξης βακτηρίων, πράγμα το οποίο πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη. Δυστυχώς, ακόμα είναι αδύνατον να γίνει συντήρηση των PC στους 4° C, γιατί σε αυτήν την θερμοκρασία, ο υποδοχέας της αιμοπεταλιακής μεμβράνης τροποποιείται μη αναστρέψιμα, οδηγώντας το αιμοπετάλιο σε άμεση φαγοκυττάρωση από τα ηπατικά μακροφάγα[13].

2.1.4 Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (Fresh Frozen Plasma ή FFP)

Ο στόχος της μετάγγισης FFP είναι να διατηρήσει τις παραμέτρους του πήκτικου μηχανισμού σε αιμορραγούντες ασθενείς. Ωστόσο, ο ρόλος και η χορήγηση FFP ακόμα αποτελεί θέμα συζήτησης στην ιατρική των μεταγγίσεων. Το FFP λαμβάνεται με δυο μεθόδους, την φυγοκέντρηση του ολικού αίματος και την πλασμαφαίρεση. Η αποθήκευση του πλάσματος είναι ευκολότερη διότι δεν περιέχει κύτταρα. Αντιθέτως, είναι δυνατή η συντήρηση για μεγάλο χρονικό διάστημα[13].

2.1.5 Ασταθή παράγωγα

Νωπό πλάσμα, Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

2.1.6 Σταθερά παράγωγα

Βιομηχανοποιημένα προϊόντα/παράγωγα αίματος. Λευκωματίνη, Συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξεως και αντιπρωτεάσες, Ανοσοσφαιρίνες ενδομυϊκές και ενδοφλέβιες, προθρομβινικό σύμπλεγμα, Συμπύκνωμα αντιθρομβίνης III, Αντιαναστολείς πήξεως, Συμπύκνωμα Ινοδογόνου.

2.2 Η πήξη του αίματος

Με τον όρο πήξη του αίματος εννοούμε το σύνολο της διαδοχικής ενεργοποίησης των παραγόντων της πήξης του πλάσματος, οι οποίοι με τον σχηματισμό ενζυμικών ενεργοποιημένων συμπλεγμάτων καταλήγουν στην παραγωγή θρομβίνης και στον σχηματισμό του ινώδους (θρόμβου) ο οποίος μετατρέπει τον εύθρυπτο αιμοπεταλιακό θρόμβο σε σταθερό και την επίσχεση της αιμορραγίας από παροδική σε μόνιμη[4]. Η πήξη του αίματος είναι μια αμυντική λειτουργία του οργανισμού, η οποία εξασφαλίζει την επίσχεση της αιμορραγίας μετά τον τραυματισμό ενός αγγείου. Αποτελεί πολύπλοκο ενζυμικό, αυτοελεγχόμενο φαινόμενο, καθώς ουσίες που ονομάζονται ανασταλτές, αλλά και

η θρομβίνη με τον αυτοκαταλυτικό ρόλο της (περιορίζει την υπέρμετρη παραγωγή της), εμποδίζουν τη γενίκευση της ενεργοποίησης του μηχανισμού πήξης. Η πήξη συνίσταται στην παραγωγή μιας ισχυρής πρωτεΐνης του αίματος, της θρομβίνης, που διασπά το ευδιάλυτο ινωδογόνο του πλάσματος. Αποσκοπεί στην παραγωγή ινώδους και στο σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου ως τελικό αποτέλεσμα σειράς διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες επιτελούνται κατά κλιμακωτά στάδια με τη συμμετοχή των παραγόντων πήξης του πλάσματος και την δράση επιταχυντικών και ανασταλτικών παραγόντων που εξασφαλίζουν την αιμοστατική ισορροπία[4]. Στο μηχανισμό της πήξης συμμετέχουν πρωτίστως οι 12 πλασματικοί παράγοντες (ένζυμα) αλλά και πολλές άλλες βασικές ουσίες που έχουν βρεθεί στο αίμα και στους ιστούς (ιστικός παράγοντας) και ρυθμίζουν το όλο σύστημα της πήξης, όπως είναι οι φυσιολογικοί ανασταλτές της πήξης, το μεγάλο μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK), το σύστημα της καλλικρεΐνης κ.α. Από αυτές, άλλες προάγουν την πήξη και λέγονται επιταχυντικοί παράγοντες πήξης ή επιταχυντές και άλλες την αναστέλλουν και είναι γνωστές ως ανασταλτικοί παράγοντες ή ανασταλτές ή αντιπηκτικοί παράγοντες. Επίσης, στο μηχανισμό της πήξης του αίματος διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο διάφοροι συμπαράγοντες όπως τα φωσφολιπίδια (από μεμβράνες και ιστούς) και τα αιμοπετάλια[4]. Οι πλασματικοί παράγοντες της πήξης (plasma coagulation factors) (με εξαίρεση τον FIV, που είναι ιόντα ασβεστίου) είναι πρωτεΐνες του πλάσματος που ονομάζονται παράγοντες της πήξης. Κυκλοφορούν όλοι στο πλάσμα, εκτός από τον ιστικό παράγοντα, ο οποίος ελευθερώνεται στην κυκλοφορία σε περίπτωση ιστικής βλάβης. Βρίσκονται στο πλάσμα σε ανενεργό μορφή ως βιολογικά αδρανείς πρωτεΐνες (προένζυμα) σε μικρές ποσότητες, με εξαίρεση το ινωδογόνο, με τιμές αναφοράς στο πλάσμα 200-400 mg/dL[4]. Έχει μελετηθεί και είναι γνωστή η δομή τους (αλληλουχία αμινοξέων), το μοριακό βάρος τους και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν την κυκλοφορούσα πρωτεΐνη μέσω συμπληρωματικού DNA. Η φυσιολογική τους συγκέντρωση στο πλάσμα, ο χρόνος ημιζωής, το χρωμόσωμα στο οποίο εντοπίζονται τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεσή τους, η ποσότητα που είναι αναγκαία για τη λειτουργική τους

έκφραση, η λειτουργία, οι ιδιότητές τους και ο ακριβής τους ρόλος στη διεργασία της πήξης είναι γνώσεις απαραίτητες για την κατανόηση των διαταραχών που προέρχονται από την κληρονομική ή επίκτητη ανεπάρκειά τους. Σήμερα οι παράγοντες πήξης χαρακτηρίζονται με λατινικούς αριθμούς από το I μέχρι το XIII που αντικατέστησαν το 1962 την πολλαπλή ονοματολογία[3].

Επικράτησε ο χαρακτηρισμός τους με λατινικούς αριθμούς που δόθηκαν ανάλογα με την χρονολογική σειρά ανακάλυψής τους από τη Διεθνή Επιτροπή Ονοματολογίας Παραγόντων Πήξης. Ο παράγοντας αναγράφεται ως F (FACTOR) , ενώ ο ενεργοποιημένος παράγοντας συμβολίζεται με ένα a (activated) δίπλα στο λατινικό αριθμό. Ενεργοποιημένος παράγοντας σημαίνει τη μετατροπή από αδρανή πρωτεΐνη (προένζυμο, υπόστρωμα) σε ενεργό πρωτεΐνη (ένζυμο) με τη δράση ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, η οποία επιταχύνεται από την παρουσία φωσφολιπιδικής επιφάνειας και ειδικής πρωτεΐνης, που δρα ως συμπαράγοντας (co-factor). Συμπαράγοντας ή συνένζυμο ονομάζεται ο παράγοντας που απαιτείται για την επιτάχυνση της δράσης ενός ενζύμου, όπως είναι ο FV, ο FVIII, η TM (Thrombomoduline), η Pr-C (Protein-C), η Pr-S (Protein-S), ο Hco FII (Hepatin co-factor II) κ.λπ. Τέλος, ζυμογόνο είναι το πρόδρομο μη ενεργό ένζυμο, το οποίο μετατρέπεται σε ενεργό ένζυμο με βιολογική δραστηριότητα με τη δράση άλλου ενζύμου. Εδώ ανήκουν η προκαλλικρεΐνη και οι παράγοντες II, VII, IX, XII και XIII. Οι παράγοντες της πήξης που παίρνουν μέρος στην διαδικασία του φαινομένου της πήξης έχουν καταλυτική δράση, εκτός του παράγοντα I (ινωδογόνο), που δρα ως υπόστρωμα στα συστήματα πήξης και ινωδόλυσης, και των παραγόντων V και VIII, που δρουν ως συμπαράγοντες. Οι πλάσματικοί παράγοντες της πήξης παράγονται στο ήπαρ. Ο τόπος σύνθεσής τους είναι το ηπατικό κύτταρο, εκτός από τον παράγοντα FVIII, τον FV και από τους XI και XII, που πιστεύεται ότι συντίθεται στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και τον III ή TF που παράγεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα[4].

2.3 Παράγοντες Πήξης

Αξίζει να σημειωθεί πως οι παράγοντες πήξης χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες, τους εξαρτώμενους από την βιταμίνη K παράγοντες, τους παράγοντες επαφής, τους παράγοντες που είναι ευαίσθητοι στην θρομβίνη και στα φωσφολιπίδια και ιόντα ασβεστίου[3].

2.3 Παράγοντες εξαρτώμενοι από την Βιταμίνη K

Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι παράγοντες II, VII, IX και X, γνωστοί ως προθρομβινικοί παράγοντες (prothrombin factors), που παράγονται αποκλειστικά στο ήπαρ παρουσία απαραίτητης της βιταμίνης K, η οποία είναι αναγκαία για τη βιολογική δραστηριότητά τους. Παρουσία της βιταμίνης K μετατρέπονται στη μορφή που απαιτείται προκειμένου να συμμετέχουν στη διαδικασία της πήξης [4].

Παράγοντας II ή Προθρομβίνη

Είναι θερμοευαίσθητη γλυκοπρωτεΐνη (α₂-σφαιρίνη), με μοριακό βάρος 72.000 Daltons και δομή πλήρως γνωστή. Είναι ευδιάλυτη στο νερό και καταστρέφεται σε θερμοκρασία 60°C. Παράγεται στο ήπαρ, παρουσία απαραίτητης της βιταμίνης K. Δρά ως ζυμογόνο στην πήξη και αποτελεί την ανενεργό μορφή του ενζύμου θρομβίνη, στην οποία μετατρέπεται με την επίδραση του ενεργοποιητικού παράγοντα προθρομβίνης ή προθρομβινάσης. Η συγκέντρωση του παράγοντα II στο πλάσμα είναι 10-14 mg/dl και ο χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα ανέρχεται στις 65 ώρες[3].

Παράγοντας VII

Ο παράγοντας VII ή προκομβερτίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 48.000 Daltons, η οποία παράγεται αποκλειστικά στο ήπαρ παρουσία απαραίτητης της βιταμίνης K, γι' αυτό σε ηπατική ανεπάρκεια εμφανίζεται μείωσή του. Ο χρόνος

ημίσειας ζωής του στο πλάσμα ανέρχεται σε 5 ώρες και η συγκέντρωσή της στο πλάσμα είναι <1 µg/ml[3].

Παράγοντας ΙΧ

Ο παράγοντας ΙΧ ή παράγοντας Christmas είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 57.000 Daltons και αποτελείται από μια μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα 415 αμινοξέων. Παράγεται στο ήπαρ παρουσία απαραίτητως της βιταμίνης Κ. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του στο πλάσμα είναι 25 ώρες και η συγκέντρωσή του στο πλάσμα είναι 5 µg/dl[3].

Παράγοντας Χ

Ο παράγοντας Χ ή παράγοντας Stuart είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 55.000 Daltons που συντίθεται αποκλειστικά στο ήπαρ παρουσία απαραίτητως της βιταμίνης Κ. Απαντά τόσο στο πλάσμα όσο και στον ορό, γιατί δεν καταναλίσκεται πλήρως κατά την πήξη του αίματος. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής 32-48 ώρες και η συγκέντρωσή του στο πλάσμα είναι 12 µg/ml[3].

2.4 Παράγοντες επαφής

Στους παράγοντες επαφής (contact factors) συγκαταλέγονται οι παράγοντες XI και XII, η προκαλλικρεΐνη και το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο. Η ονομασία των παραγόντων επαφής οφείλεται στην ιδιότητά τους να ενεργοποιούνται και να προσκολλώνται μόλις έρθουν σε επαφή με υδρόφιλες αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες ή ουσίες, όπως είναι in vivo η μη φυσιολογική επιφάνεια (τραυματισμένο αγγείο) και in vitro η ξένη επιφάνεια, όπως το γυαλί, η καολίνη, το βαμβάκι κλπ[3].

Παράγοντας XI

Ο παράγοντας XI ή παράγοντας Rosenthal είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 160.000 Daltons, που συντίθεται μάλλον στο ΔΕΣ. Απαντά τόσο στο πλάσμα

όσο και στον ορό, επειδή διότι δεν καταναλίσκεται εντελώς κατά την πήξη του αίματος. Είναι σταθερός παράγοντας και δεν καταστρέφεται κατά την διατήρηση του αίματος. Δρα ανασταλτικά στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου. Έχει χρόνο ζωής στο πλάσμα 40-48 ώρες και η συγκέντρωση του στο πλάσμα είναι 5μg/ml. Η ανεπάρκεια του παράγοντα XI προκαλεί την αιμορροφιλία C, η οποία παρατηρείται και στα δύο φύλα[3].

Παράγοντας XII

Παράγοντας XII ή παράγοντας Hageman είναι γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 85.000 Daltons, που συντίθεται μάλλον στο ΔΕΣ. Ονομάστηκε έτσι από το όνομα του πρώτου ασθενούς στον οποίο μελετήθηκε. Δεν καταναλώνεται πλήρως κατά την πήξη του αίματος, γι' αυτό και βρίσκεται τόσο στο πλάσμα όσο και στον ορό του αίματος. Από τον παράγοντα XII ξεκινάει η διαδοχική ενεργοποίηση των υπόλοιπων παραγόντων στο ενδογενές σύστημα του μηχανισμού της πήξης για τον σχηματισμό της θρομβοπλαστίνης. Επίσης, μπορεί να ενεργοποιεί τον παράγοντα VII στο εξωγενές σύστημα. Τέλος, συμμετέχει έμμεσα στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Ο παράγοντας XII έχει χρόνο ημίσειας ζωής 48-52 ώρες και η συγκέντρωσή του στο πλάσμα ανέρχεται σε 40 μg/ml. Η ανεπάρκειά του δεν συνοδεύεται από αιμορραγικές εκδηλώσεις αλλά συχνά από θρομβοφιλική διάθεση, λόγω ελαττωμένης ινωδολυτικής δραστηριότητας [3].

2.5 Παράγοντες ευαίσθητοι στην θρομβίνη

Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται οι παράγοντες I, V, VIII και XIII, γνωστοί και ως παράγοντες χρησιμοποίησης (consumable factors), που αποτελούν υπόστρωμα για την δράση της θρομβίνης. Κυκλοφορούν στο πλάσμα, αλλά όχι στον ορό του αίματος. Η βιολογική δράση τους συνεχίζεται με την παρουσία της θρομβίνης και καταναλώνονται κατά την διάρκεια του φαινομένου της πήξης[4].

Παράγοντας Ι ή Ινωδογόνο

Είναι θερμοευαίσθητη μεγαλομοριακή σφαιρίνη του πλάσματος μοριακού βάρους 340.000 Daltons, που παράγεται στο ήπαρ και υπάρχει στο πλάσμα και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση στο πλάσμα απ' όλους τους παράγοντες (200-400 mg/dl). Ο χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα είναι 90 ώρες. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα αυξάνει φυσιολογικά στην εγκυμοσύνη, σε φλεγμονή, τραυματισμό και χειρουργική επέμβαση. Η ελάττωση της συγκέντρωσής του στο αίμα ονομάζεται ινωδοπενία και διακρίνεται σε πλήρη έλλειψη και σε μερική. Η έλλειψη του ινωδογόνου εργαστηριακά παρατηρείται με τις εξής δοκιμασίες[4].

- Χρόνος πήξης
- Χρόνος προθρομβίνης
- Χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
- Χρόνος θρομβίνης

Παράγοντας V

Ο παράγοντας V ή προαξελερίνη είναι μεγαλομοριακή γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 330.000 Daltons. Είναι θερμοευαίσθητη σφαιρίνη, που καταστρέφεται εύκολα σε θερμοκρασία 56°C και κατά τη διατήρηση του πλάσματος, γι' αυτό και ονομάζεται ασταθής παράγοντας. Συντίθεται στο ήπαρ χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία της βιταμίνης K. Υπάρχει στο πλάσμα και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, απ' όπου εκλύεται στη διάρκεια της ενεργοποίησής τους[4].

Λειτουργικά ο παράγοντας V επιτελεί τις ακόλουθες δράσεις

- Επιταχύνει τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη παρουσία φωσφολιπιδίων και ιόντων ασβεστίου (επιταχυντικός παράγοντας).

- Δρα ως συμπαράγοντας του ενεργοποιημένου FX, επιταχύνει δηλαδή την καταλυτική δράση του FXa στη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη.
- Διευκολύνει τη συσσώρευση του FX στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής του στο πλάσμα είναι 15-24 ώρες και η συγκέντρωση του 10μg/ml. Η ένδεια του παράγοντα V μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη, με την δεύτερη να παρατηρείται σε παθήσεις του ήπατος και σε λοιμώξεις[4].

Παράγοντας VIII

Είναι θερμοευαίσθητη μεγαλομοριακή σφαιρίνη (η οποία αποτελείται από μια βαριά πρωτεϊνική αλυσίδα και από μια διπλή ελαφριά αλυσίδα) με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 1.000.000 Daltons, που καταστρέφεται στη θερμοκρασία των 50°C εντός 30 min. Απαντά στο πλάσμα και όχι στον ορό του αίματος, διότι καταναλίσκεται τελείως κατά την πήξη του αίματος, όπου μετατρέπεται σε θρομβοπλαστίνη πλάσματος, όταν επιδράσει επ' αυτής ο αιμοπεταλιακός παράγοντας. Συντίθεται στο ήπαρ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά υπάρχει και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, στα μεγακαρυοκύτταρα, στο σπλήνα και ενδεχομένως και αλλού. Τέλος έχει χρόνο ημίσειας ζωής 5-12 ώρες.[4]

Παράγοντας XIII

Ο παράγοντας XIII ή παράγοντας σταθεροποίησης του ινώδους είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 320.000 Daltons. Το μόριό του αποτελείται από δύο ζεύγη πολυπεπτιδικών αλυσίδων, που δεν είναι πανομοιότυπες, της α και β. Συντίθεται στο ήπαρ, αλλά υπάρχει και στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων με δομή που διαφέρει από εκείνη του πλάσματος. Καταναλίσκεται κατά την πήξη του αίματος, γι' αυτό και η περιεκτικότητα του ορού σε παράγοντα XIII είναι πολύ μικρή. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα 5-12 ημέρες και η συγκέντρωσή του είναι 4-8 mg/dl. Αξίζει να σημειωθεί πως βρίσκεται σε ικανές ποσότητες και στα αιμοπετάλια. Όσον αφορά τις λειτουργίες του είναι οι εξής:

- Προωθεί το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των μονομερών του ινώδους μετά την υδρόλυση από την θρομβίνη, μετατρέποντάς τα σε πολυμερή[4].
- Συμμετέχει στη σύνδεση του μορίου της φιβρονεκτίνης με το ινώδες, το κολλαγόνο και μεταξύ τους[4].

2.5 Φωσφολιπίδια και ιόντα ασβεστίου

Τα φωσφολιπίδια είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, παρέχονται από τους ιστούς και τα αιμοπετάλια και δημιουργούν στο σημείο της βλάβης του αγγείου μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια. Αποτελούν, όπως είναι γνωστό, τον τόπο ενζυμικής ενεργοποίησης των παραγόντων πήξης του αίματος, οι οποίοι προσκολλώνται στην επιφάνεια των φωσφολιπιδίων και με τον τρόπο αυτό αρχίζει η ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης[4].

Παράγοντας IV

Τα ιόντα ασβεστίου ή παράγοντας IV διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πήξη του αίματος με την ιδιότητα που έχουν να προάγουν όλες τις αντιδράσεις του μηχανισμού της πήξης, εκτός από τα δύο πρώτα στάδια της ενδογενούς οδού. Η συγκέντρωση του ασβεστίου στο αίμα φυσιολογικά ανέρχεται σε 9-11 mg/dl. Τέλος το ασβέστιο δεν καταναλώνεται κατά την πήξη του αίματος[4].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Φρέσκο Κατεψυγμένο Πλάσμα (fresh frozen plasma)

Το πλάσμα που καταψύχεται σε θερμοκρασία -18°C ή μικρότερη μέσα σε οχτώ ώρες από την αιμοληψία καλείται Φρέσκο Κατεψυγμένο Πλάσμα ή FFP και έχει χρόνο ζωής ένα έτος [4]. Το πλάσμα προς μετάγγιση παρασκευάζεται με φυγοκέντρηση ολικού αίματος από μονό δότη και στη συνέχεια αποθηκεύεται σε $<-30^{\circ}\text{C}$. Πιο συγκεκριμένα οι αιμοληψίες που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή πλάσματος πρέπει να έχουν γίνει σε τουλάχιστον διπλό ασκό, να μπου αμέσως στο ψυγείο (4°C) και να φυγοκεντρηθούν μέσα σε έξι ώρες το αργότερο. Η φυγοκέντρηση λαμβάνει χώρα σε ψυκτική φυγόκεντρο $+4^{\circ}\text{C}$, σε στροφές και χρόνο ανάλογα με την εκάστοτε φυγόκεντρο. Μετά την φυγοκέντρηση το πλάσμα μεταφέρεται στο συνοδό ασκό του κλειστού συστήματος και καταψύχεται αμέσως. Μεγαλύτεροι όγκοι πλάσματος είναι δυνατόν να συλλέγονται με χρήση αυτοματοποιημένης αφαίρεσης [20]. Μία πρότυπη μονάδα πλάσματος έχει όγκο 200 – 250 ml όταν συλλέγεται από ολικό αίμα ή 400 – 600 ml όταν λαμβάνεται από αφαίρεση (FFPA). Το Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP) περιέχει παράγοντες πήξης σε φυσιολογική ποσότητα και είναι ελεύθερο ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων καθώς και αιμοπεταλίων. Προσοχή δέν είναι ένα συμπύκνωμα παραγόντων πήξεως. Μία μονάδα FFP είναι περίπου 225 ml και πρέπει να είναι συμβατή με τα ερυθρά αιμοσφαίρια του λήπτη σύμφωνα με το σύστημα ABO. Ο λόγος που η συντήρηση του γίνεται σε τόσο χαμηλή θερμοκρασία για την διαφύλαξη όλων των αιμοστατικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων των ασταθών παραγόντων V και VIII [21,22]. Το FFP αποψύχεται στους 37°C σε υδατόλουτρο και μπορεί να συντηρηθεί μετά την απόψυξη μέχρι 24 ώρες σε $1 - 6^{\circ}\text{C}$ [23,24]. Το FFP αυξάνει την δραστικότητα του παράγοντα πήξης κατά 20% και

για αυτό το λόγο χορηγείται σε ασθενείς με έλλειψη πολλαπλών παραγόντων πήξης καθώς και σε σπάνιες μεμονωμένες ελλείψεις παραγόντων. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως εάν το FFP δεν χρησιμοποιηθεί εντός ενός έτους μπορεί να χορηγηθεί σαν κοινό πλάσμα μέχρι 5 χρόνια. Το κοινό πλάσμα δεν διαθέτει παράγοντες πήξης [25].

3.1.2 Πλάσμα πλούσιο σε Αιμοπετάλια.

Το Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια αποτελεί μια αυτόλογη ουσία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαφόρων ειδών επεμβάσεις από διάφορες ειδικότητες κυρίως για την επιτάχυνση της επούλωσης μαλακών πληγών και περιλαμβάνει σε υψηλή συγκέντρωση διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (IGF), αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), κ.α. Αποτελείται από αιμοπετάλια σε υψηλή συγκέντρωση και μικρή ποσότητα πλάσματος. Ο φυσιολογικός αριθμός αιμοπεταλίων κυμαίνεται από 150.000 / μl έως 300.000 / μl, με μέσω όρο τα 200.000 / μl ενώ το PRP περιλαμβάνει συγκεντρώσεις αιμοπεταλίων 5 φορές υψηλότερες, περίπου 1.000.000 / μl [25,26].

3.1.3 Πλάσμα φτωχό σε Αιμοπετάλια.

Προετοιμασία του πλάσματος φτωχού σε αιμοπετάλια (Platelet Poor Plasma) και συνθήκες αποθήκευσης:

Έως 1 ώρα μετά τη λήψη των κλασμάτων από κάθε δότη αίματος και τα αιμοπεταλιακά προϊόντα, λαμβάνεται πλάσμα με την χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών σταδίων φυγοκέντρησης. Το πρώτο στάδιο φυγοκέντρησης διεξήχθη με μία φυγόκεντρο (48 S, Rotina, Hettich, Γερμανία) χρησιμοποιώντας χαμηλών στροφών φυγοκέντρηση στις 1500 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου [27].

3.2 Μετάγγιση του Φρέσκου Κατεψυγμένου Πλάσματος

Οι ενδείξεις είναι πολύ περιορισμένες και χορήγηση του μπορεί να έχει απρόβλεπτες ανεπιθύμητες αντιδράσεις (αλλεργικές αντιδράσεις, αναφυλαξία, οξεία πνευμονική βλάβη από μετάγγιση, αιμόλυση). Οι κίνδυνοι μετάδοσης λοιμώξεων, είναι παρόμοιοι με αυτούς των υπολοίπων παραγόντων αίματος. Δεν πρέπει να χορηγείται σε αιμορραγούντα ασθενή, χωρίς προηγούμενο έλεγχο πήκτικότητας (PT, INR, aPTT). Μετάγγιση FFP δεν ενδείκνυται, αν οι τιμές PT, INR και aPTT είναι φυσιολογικές[26].

3.2.1 Ενδείξεις χορήγησης Φρέσκου Κατεψυγμένου Πλάσματος:

- Διόρθωση εκσεσημασμένης μικροαγγειακής αιμορραγίας αν PT >1,5 φορά των φυσιολογικών τιμών ή το INR ή το aPTT > 2 φορές των Φ.Τ
- Διόρθωση εκσεσημασμένης αιμορραγίας δευτεροπαθούς αιτιολογίας, από ανεπάρκεια πολλαπλών παραγόντων πήξης, σε ασθενείς που μεταγγίσθηκαν με μεγαλύτερο από ένα όγκο αίματος (περίπου 70ml/kg Β.Σ.) και όταν οι: PT ή INR και aPTT, δεν μπορούν να μετρηθούν έγκαιρα.
- Διόρθωση γνωστής ανεπάρκειας μεμονωμένου παράγοντα πήξης, για την οποία δεν διατίθεται ειδικό παράγωγο για χρήση.
- Στην επείγουσα αναστροφή της θεραπείας με βαρφαρίνη, το FFP έχει μόνο μερική δράση και πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε σοβαρή αιμορραγία επί απουσίας των άλλων μεθόδων αντιμετώπισης. Για ταχεία διόρθωση, ενδείκνυται η βιταμίνη Κ. Κ, ενώ για επείγουσα αντιμετώπιση σοβαρής αιμορραγίας, προτιμάται η χορήγηση ενός συμπλέγματος προθρομβίνης, που περιέχει τους παράγοντες: II, VII ,IX και X, σε δόση 50μον./ kg Β.Σ.
- Στην αντοχή στην ηπαρίνη (ανεπάρκεια αντιθρομβίνης III), σε ασθενή που απαιτεί χορήγηση ηπαρίνης.
- Στην αντιμετώπιση της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (TTP). Με την εμφάνισή της, πρέπει να ξεκινάει η καθημερινή αντικατάσταση πλάσματος, ιδανικά στις πρώτες 24 ώρες. Αυτό θα πρέπει να συνεχιστεί τουλάχιστον για 2ημέρες μετά την ύφεση των συμπτωμάτων.

- Η χορήγηση FFP έχει προταθεί, για την πρόληψη αιμορραγίας σε ασθενείς με ηπατική νόσο και παρατεταμένο χρόνο προθρομβίνης αν και η ανταπόκριση μπορεί να είναι απρόβλεπτη και δεν επιτυγχάνεται πάντα η αποκατάσταση της αιμοστατικής διαταραχής. Αν δοθεί FFP πρέπει να επαναληφθεί ο αιμορραγικός έλεγχος, για να καθοριστεί η περαιτέρω αντιμετώπιση. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να τεκμηριώνουν την πρακτική που εφαρμόζεται σε πολλά κέντρα ήπατος, να λαμβάνονται βιοψίες μόνο αν ο PT διαφέρει κατά 4sec εκείνου του μάρτυρα[27].

3.2.2 Τρόπος χορήγησης Φρέσκου Κατεψυγμένου Πλάσματος:

Το FFP χορηγείται σε δόσεις υπολογισμένες ώστε να επιτευχθεί το ελάχιστο 20-30% της συγκέντρωσης των παραγόντων πήξης του πλάσματος (10-15ml/kg FFP), εκτός από την επείγουσα αναστροφή της διαταραχής πήκτικότητας από βαρφαρίνη, για την οποία 5-8 ml/kg συνήθως είναι αρκετό. Αξίζει να σημειωθεί πως τέσσερα με πέντε συμπληρώματα αιμοπεταλίων, μία μονάδα από μονο-δότη αφαιρεμένα αιμοπετάλια ή μια μονάδα ολικό αίμα, έχει περιεκτικότητα σε παράγοντες πήξης ανάλογη με αυτήν μίας μονάδας FFP.[28]

Σε περίπτωση εμφάνισης αιμορραγικής διάθεσης, καλό είναι πριν από τη χορήγηση πλάσματος, να προηγείται μια μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων. Δεν υπάρχει ένδειξη χορήγησης FFP για διόρθωση του INR, επί απουσίας αιμορραγίας. Το FFP δεν ενδείκνυται θεραπευτικά στη διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (D.I.C.) χωρίς σημεία αιμορραγίας, ούτε έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα της προληπτικής /προφυλακτικής του χορήγησης[29].

Χορήγηση FFP για την αντιμετώπιση ασθενούς με μαζική απώλεια αίματος, θα πρέπει να γίνεται μόνο μετά από διενέργεια εργαστηριακού ελέγχου.

3.2.3 Μαζική Μετάγγιση:

Σύμφωνα με παλαιότερες οδηγίες, η έγκαιρη και επαρκής αντιμετώπιση της καταπληξίας είχε πρωταρχική σημασία στην πρόληψη των διαταραχών της πήκτικότητας, αν και οι προφυλακτικές θεραπείες υποκατάστασης, ούτε προλαμβάνουν τη διαδικασία, ούτε μειώνουν τις ανάγκες σε μετάγγιση. Σύμφωνα με τα νεώτερα δεδομένα, η έλλειψη των παραγόντων πήξης δεν είναι συνήθης στη μαζική αιμορραγία, αν δεν συνυπάρχει διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη και είναι μάλλον απότοκος της καθυστερημένης αναζωογόνησης. Υπάρχει μια επιφύλαξη για την αποτελεσματικότητα της χορήγησης FFP σε ανάλογες περιπτώσεις, ακόμα και αν συνυπάρχουν παθολογικοί χρόνοι πήξης, οι οποίοι θεωρητικά θα συνιστούσαν τη χρήση του. Κάποιοι συγγραφείς προτείνουν τη χρήση FFP αν η αιμορραγία συνεχίζεται παρά τη χορήγηση ικανών ποσοτήτων κρυσταλλοειδών διαλυμάτων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων και πάντα με το σύγχρονο εργαστηριακό έλεγχο πήκτικότητας [30].

3.2.4 Φάρμακα για αντιμετώπιση εκσεσημασμένης αιμορραγίας:

Δεσμοπρεσσίνη ή τοπικά αιμοστατικά όπως κόλλα ινικής ή γέλη θρομβίνης, πρέπει να εξεταστούν όταν προκύπτει μεγάλη αιμορραγία. Όταν οι καθιερωμένες καλά τεκμηριωμένες επιλογές για αντιμετώπιση μμεγάλης μικροαγγειακής αιμορραγίας έχουν εξαντληθεί, τίθεται ένδειξη για χρήση του ανασυντεθειμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VII[30].

3.3 Αρχές φυγοκέντρησης

Η σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος καθορίζεται από τέσσερις παραμέτρους, την δύναμη G, την επιτάχυνση, τον χρόνο και την επιβράδυνση. Η συμπεριφορά καθίζησης των κυττάρων του αίματος καθορίζεται από το μέγεθος τους, από τη διαφορά ανάμεσα στην πυκνότητά τους και στην πυκνότητά τους και στην πυκνότητα του περιβάλλοντος υγρού, από το ιξώδες του μέσου και από την πλαστικότητα του σχήματος των κυττάρων σε συνάρτηση με την θερμοκρασία

($\geq 20^\circ$). Η φυγοκέντρωση διακρίνεται σε τρεις φάσεις, την πρώτη όπου παράγεται το περιβάλλον υγρό το οποίο είναι ένα μείγμα από πλάσμα και αντιπηκτικό καθώς τα λευκά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια λόγω μεγαλύτερου όγκου καθιζάνουν ταχύτερα από τα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια έχουμε την μετέπειτα φάση κατά την οποία τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια καθιζάνουν στο κατώτερο τμήμα του ασκού ενώ το ανώτερο τμήμα περιέχει πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Τέλος έχουμε την παράταση φάσης φυγοκέντρωσης κατά την οποία έχουμε την καθίζηση των αιμοπεταλίων στην επιφάνεια της στιβάδας των ερυθρών, η πλειονότητα των λευκών κάτω από τα αιμοπετάλια και στον πυθμένα τα ερυθρά. Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχει και η ταχεία φυγοκέντρωση κατά την οποία έχουμε παραγωγή πλάσματος χωρίς κύτταρα (PPP) [30].

3.4 Αρχές διαχωρισμού

Υπάρχουν δύο είδη διαχωρισμού, ο διαχωρισμός μετά την αρχική φυγοκέντρωση και ο διαχωρισμός μετά από αρχική διήθηση με φίλτρο. Κατά τον διαχωρισμό το σύστημα ασκού απομακρύνεται από την φυγόκεντρο, τοποθετείται σε σύστημα αφαίρεσης και τα προϊόντα μεταφέρονται σε δορυφόρους ασκούς. Η τεχνική παρασκευής προϊόντων διαθέτει τέσσερις επιλογές μετά την αρχική φυγοκέντρωση και μία επιλογή μετά την αρχική διήθηση με φίλτρο.

Επίσης υπάρχουν και κάποιες άλλες δευτερεύουσες αρχές διαχωρισμού οι οποίες είναι οι εξής:

- φυγοκέντρωση ζώνης
- Φυγοκέντρωση αντίθετου ρεύματος ή έκλυση
- Διήθηση διασταυρούμενης ροής
- Διήθηση βάθους και επιφάνειας, με τέσσερις μηχανισμούς παγίδευσης σε φίλτρο (λευκαφαίρεση)
- Πλύση κυτταρικών στοιχείων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Είδη και χαρακτηριστικά των κυριότερων πληθυσμών κυστιδίων

4.1.1 Εξωσώματα

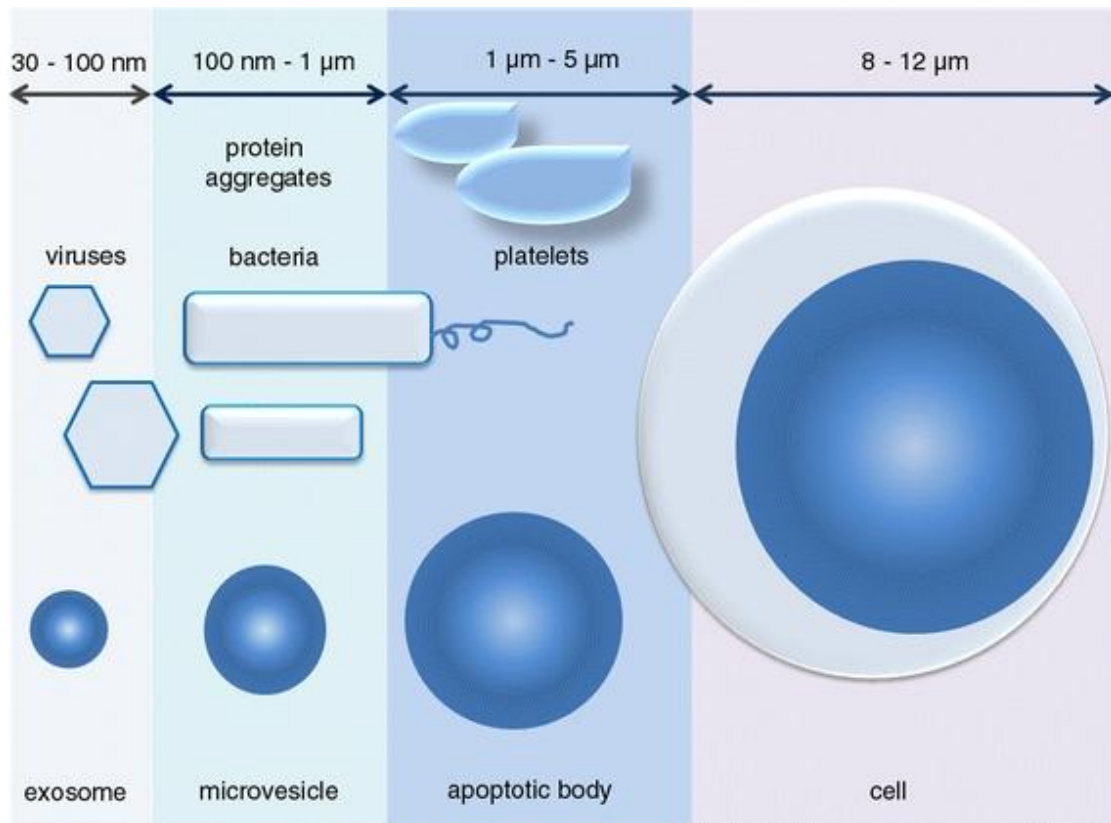
- Τα εξωσώματα περιγράφηκαν πρώτα από τον Trams και συνεργάτες[31] ως κυστίδια με αποπτωτική δραστηριότητα. Αυτή η εργασία ακολουθήθηκε από τα αποτελέσματα των Harding και Stahl[32] περιγράφοντας την απελευθέρωση μικρών κυστιδίων και κοκκίων από κύτταρα ποντικών και με μία μικροσκόπηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο περιέγραψε την εξωκύττωση από σωματίδια περίπου 50 nm [33].
- Είναι κυστίδια περιβαλλόμενα από μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα (με διάμετρο περίπου 50-100 nm), το εύρος του μεγέθους τους ξεπερνά για λίγο εκείνο των ιών [34].
- Τα εξωσώματα έχουν χαρακτηριστεί στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και των όγκων.

Μηχανισμοί «κλειδιά» μέσω των οποίων τα εξωσώματα μπορεί να ασκούν τις βιολογικές τους λειτουργίες στα κύτταρα περιλαμβάνουν:

Άμεση επαφή ανάμεσα στα μόρια της επιφάνειας των κυστιδίων και των κυττάρων, ενδοκύττωση των κυστιδίων και ένωση της κυστιδικής και κυτταρικής μεμβράνης.

Τα εξωσώματα μπορεί να μεταφέρουν mRNA και miRNA. Η οριζόντια μεταφορά ογκογενετικού υποδοχέα [35] και η μεταφορά κυστιδίων του HIV [36] έχουν ήδη διαπιστωθεί στην περίπτωση των εξωσωμάτων.

- Παραδείγματα για τις κύριες λειτουργίες των εξωσωμάτων περιλαμβάνουν την αντιγονοπαρουσίαση και τις ανοσοδιεγερτικές και ανοσοκατασταλτικές δραστηριότητες [34-37].
- Διαθέτουν φωσφατιδυλισερίνη στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης και μάρτυρες συμπεριλαμβανομένων των CD63, CD81, CD9, LAMP1 και TSG101 [38].
- Η απομόνωση και οι αναλυτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν φυγοκέντρηση και υπερφυγοκέντρηση με διαφορετικά επίπεδα σουκρόζης, ηλεκτρονική μικροσκόπηση μεταφοράς (TEM) και φασματοσκοπία μάζας.



Εικόνα 1: Απεικόνιση μεγέθους των διαφόρων τύπων των κυστιδίων.

[György B, Szabó TG et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life* (2011) Aug 68:2667-88.]

4.1.2 Μικροκυστίδια (MVs)

- Τα μικροκυστίδια περιγράφηκαν πρώτα από τους Chargaff και West το 1946 [36] ως ιζηματικός παράγοντας του πλάσματος ελεύθερου από αιμοπετάλια με την ικανότητα να δημιουργεί θρομβίνη. Το 1967, ο Peter Wolf τα περιέγραψε ως «σκόνη αιμοπεταλίων», ένα κλάσμα που περιέχει κυρίως κυστίδια πλούσια σε λιπίδια, παραγόμενα από υπερφυγοκέντρηση φρέσκου πλάσματος [39].
- Τα μικροκυστίδια είναι δομές περιβαλλόμενες από μια φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Έχουν διάμετρο περίπου 100-1000 nm [2] ή 100-400 nm στο πλάσμα του αίματος[41]. Αξίζει να σημειωθεί πως η χαμηλότερη τιμή μένει ακόμα να καθοριστεί[42]. Το εύρος του μεγέθους τους ξεπερνά αυτό των βακτηρίων και των αδιάλυτων ανοσολογικών συμπλεγμάτων.
- Σχηματίζονται με ρυθμιζόμενη απελευθέρωση κοκκίων από την πλασματική μεμβράνη.
- Ο ρυθμός της σταθερής αυτής απελευθέρωσης των κυστιδίων[43] είναι γενικά χαμηλός (με εξαίρεση τους όγκους)[44].
- Ρυθμιζόμενη απελευθέρωση των κυστιδίων επάγεται αποτελεσματικά κατά την ενεργοποίηση των υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας ή απόπτωση και την επακόλουθη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου [45,46]
- Έχουν χαρακτηριστεί ως προϊόντα αιμοπεταλίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Παραδείγματα των κυριότερων λειτουργιών των μικροκυστιδίων είναι η προπηκτική ικανότητα, η συνεισφορά στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και στην διακυτταρική επικοινωνία.
- Διαθέτουν φωσφατιδυλισερίνη, ωστόσο κάποιες έρευνες προτείνουν επίσης την ύπαρξη μικροκυστιδίων χωρίς εξωτερικοποίηση της φωσφατιδυλισερίνης.

- Η απομόνωση ρουτίνας και οι αναλυτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την κυτταρομετρία ροής, φυγοκέντρηση και διαδικασίες βασιζόμενες στην δέσμευση ουσιών [93].

4.1.3 Αποπτωτικά σωματίδια

- Ο όρος αποπτωτικό σωματίδιο αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Kerr το 1972,[44] το νέο ορόσημο στην έρευνα που αφορά την απόπτωση πραγματοποιήθηκε από τον Robert Horvitz και άλλους ανιχνεύοντας τη δημιουργία κυτταρικής γραμμής στην νηματώδη *Caenorhabditis elegans*[45-46].
- Τα αποπτωτικά σωματίδια έχουν διάμετρο περίπου 1-5 μm (περίπου το εύρος μεγέθους των αιμοπεταλίων)[47].
- Χαρακτηρίζονται από την εξωτερικοποίηση φωσφατιδυλισερίνης και μπορεί να περιέχουν διασπασμένο DNA[48].
- Παραδείγματα των λειτουργιών των αποπτωτικών σωματιδίων είναι η οριζόντια μεταφορά των ογκογονιδίων[49], η οριζόντια μεταφορά του DNA, η παρουσίαση των επιτόπων των T κυττάρων με μίμηση από τα φαγοκύτταρα και η επαναπαρουσίαση των αυτοαντιγόνων από τα B κύτταρα [50]. Η μίμηση από τα αποπτωτικά σωματίδια έχει βρεθεί ότι οδηγεί στην ανοσοκαταστολή.

4.2 Γιατί τα κύτταρα δημιουργούν κυστίδια

Προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια στο περιβάλλον τους. Τα βακτήρια ελευθερώνουν κυστίδια από την εξωτερική τους μεμβράνη, που μοιάζουν με μικροκυστίδια, τα οποία δρουν ως μεταφορείς διαφόρων σκοπών. Περιέχουν μόρια σηματοδότησης για άλλα βακτήρια και διανέμουν τοξίνες σε κύτταρα υποδοχείς και ανταλλάσσουν DNA με γονίδια που κωδικοποιούν παθογένειες μεταξύ βακτηρίων. Ομοίως τα μικροκυστίδια που προέρχονται από ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μεταφορείς διαφόρων σκοπών συμπεριλαμβάνοντας: μόρια σηματοδότησης, κυτταρικά απόβλητα και λειτουργική γενετική πληροφορία. Για να απεικονίσουμε την ραγδαίως αυξανόμενη γνώση μας στους πολύπλοκους ρόλους που διαδραματίζουν τα μικροκυστίδια και τα εξωσώματα στην εξέλιξη μιας ασθένειας, εστιάζουμε στον καρκίνο, που αποτελεί την πιο πολύ μελετημένη ασθένεια σε αυτό τον τομέα. Οι κλινικές εφαρμογές των μικροκυστιδίων και των εξωσωμάτων, συμπεριλαμβανόμενης της διάγνωσης, της πρόληψης και της θεραπείας στον καρκίνο έχουν προσδιοριστεί. Πιο αναλυτικά λοιπόν, τα ευκαρυωτικά κύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια στο περιβάλλον τους. Τα πιο καλά και ευρέως μελετημένα κυστίδια είναι τα εξωσώματα και τα μικροκυστίδια. Τα μικροκυστίδια βλασταίνουν από την κυτταρική μεμβράνη και είναι σχετικά μεγάλα με διάμετρο 100nm με 1μm. Το ίδιο συμβαίνει και με τα εξωσώματα τα οποία έχουν διάμετρο 30-100 nm. Οροί και ρυθμισμένα μέσα από *in vitro* καλλιεργημένα κύτταρα, καθώς και τα υγρά του σώματος όπως αίμα ή ούρα περιέχουν όλα σημαντικό αριθμό κυστιδίων προερχόμενα από κύτταρα. Σε σωματικά υγρά μικροσωματίδια και εξωσωμάτια από διάφορα κύτταρα συνυπάρχουν κάτω από φυσιολογικές ή και παθολογικές καταστάσεις. Ο αριθμός αυτών των κυστιδίων, η κυτταρική τους προέλευση, η σύνθεση και λειτουργία τους όμως μπορούν να καθορίσουν την κατάσταση μιας ασθένειας. Ο εντοπισμός και ο χαρακτηρισμός των κυστιδίων παραμένει πολύ δύσκολος λόγω του μικρού τους μεγέθους και της ετερογένειάς τους, που μάλιστα έχουν οδηγήσει σε πολύπλοκα και αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ ερευνητικών εργαστηρίων. Αυτή τη περίοδο, πραγματοποιούνται πολλές προσπάθειες με ειδική κυτταρομετρία ροής,

με μικροσκόπηση ατομικής δύναμης, δυναμική σκέδαση φωτός σε συνδυασμό με φθορισμό, για να αποκτήσουν μια πιο λεπτομερή εικόνα των πραγματικών συγκεντρώσεων, της κατανομής μεγέθους, κυτταρικής προέλευσης και την σύνθεση των μικροκυστιδίων και των εξωσωμάτων. Για πολύ καιρό, οι λειτουργίες των μικροκυστιδίων μελετούνταν κυρίως χρησιμοποιώντας καθορισμένα παρασκευάσματα, τα οποία εξετάζονταν και ακόμα εξετάζονται για την ικανότητά τους να ενεργοποιήσουν την πήξη, την αγγειογένεση. Από την μία πλευρά αυτές οι μελέτες έχουν αποδώσει μία εκτενή εικόνα σχετικά με την ενδεχόμενη βιολογική σημασία των κυτταρικής προέλευσης κυστιδίων, αλλά από την άλλη δεν έχουν δώσει απαντήσεις στην ερώτηση «ποιός είναι ο πραγματικός ρόλος των «κυστιδίων». Με άλλα λόγια γιατί τα κύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια στο περιβάλλον τους;

Για να απαντήσουμε την ερώτηση γιατί τα ευκαρυωτικά κύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια, πρέπει να μάθουμε από τα προκαρυωτικά, τα οποία απελευθερώνουν από την εξωτερική τους μεμβράνη κυστίδια, τα οποία μοιάζουν με μικροκυστίδια, στο περιβάλλον τους.

4.3 Μικροκυστίδια

Ο πρώτος που ασχολήθηκε με τα μικροκυστίδια τα οποία χαρακτήρισε και ως σκόνη αιμοπεταλίων ήταν ο Peter Wolf το 1967. Μάλιστα ανέφερε πως είναι ένα κλάσμα του αίματος πλούσιο σε λιπίδια το οποίο απομονώνεται με υπερφυγοκέντρηση φρέσκου πλάσματος[51].

Τα μικροκυστίδια αντιπροσωπεύουν έναν ετερογενή πληθυσμό κυστιδίων με διάμετρο 100 έως 1000 nm που απελευθερώνονται από την πλασματική μεμβράνη και διαθέτουν αντιγόνα ειδικά των γονικών κυττάρων. Η απελευθέρωση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων όπως το στρες ή κάποια ασθένεια. Μολονότι ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων αποτελεί ένα φυσιολογικό φαινόμενο, μια πληθώρα παθήσεων συνδέονται με μια σημαντική αύξηση των

κυκλοφορούντων microparticles, συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσων νοσημάτων, αρτηριοσκλήρωση και είναι ενδεικτικά κακοηθειών. Τα μικροκυστίδια εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιοενεργών ουσιών και δεκτών στην επιφάνεια τους όπως κυτταροκίνες, πρωτεΐνες σηματοδοσίας, mRNA και microRNA[e18,e19]. Πρόσφατες μελέτες έδωσαν αποδεικτικά στοιχεία για την έννοια των μικροκυστιδίων ως αληθινούς φορείς για τα διακυτταρικά φαινόμενα, ανταλλαγές βιολογικών σημάτων και πληροφοριών. Πράγματι, τα μικροκυστίδια μπορούν να μεταφέρουν μέρος των συστατικών τους και το περιεχόμενο του επιλεγμένου κυττάρου στόχου, έτσι μεσολαβούν στην ενεργοποίηση κυττάρων, την φαινοτυπική τροποποίηση, και τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων. Επειδή τα μικροκυστίδια εύκολα κυκλοφορούν στα αγγεία, μπορούν να χρησιμεύσουν ως μονάδες εναλλαγής σηματοδοσίας και μεταφορείς όχι μόνο στο στενά τοπικό τους περιβάλλον, αλλά και σε αξιοσημείωτη απόσταση από τον τόπο προέλευσής τους[e18,e19]. Συνολικά, αυτή η παράδοση με το διακυτταρικό σύστημα μπορεί να επεκτείνει τα όρια της περιορισμένης διακίνησης ουσιών και ιδρύει ένα δίκτυο επικοινωνίας, οι ειδικές ιδιότητες του οποίου μπορεί να είναι αποτελεσματικές για την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Γίνεται εύκολα αντιληπτό λοιπόν πως τα μικροκυστίδια αποτελούν έναν νέο και αποτελεσματικό μηχανισμό διακυτταρικής επικοινωνίας και σηματοδότησης. Τα μικροκυστίδια μπορεί να προέρχονται από διάφορες «πηγές». Από τα αιμοπετάλια (P-μικροκυστίδια), λευκοκύτταρα(L-μικροκυστίδια), ερυθρά αιμοσφαίρια (R-μικροκυστίδια), ενδοθηλιακά κύτταρα και άλλα κύτταρα ιστών. Ωστόσο δεν είναι αντίγραφα των μητρικών κυττάρων και της πλασματικής μεμβράνης από την οποία προέρχονται[52-53].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μικροκυστίδια μπορούν να σχηματιστούν με διάφορους τρόπους οι οποίοι καθορίζουν το διαφορετικό μοριακό τους προφίλ και τη βιολογική τους δράση. Μια σημαντική πτυχή στην κυτταρική βιολογία είναι η επικοινωνία, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω άμεσης επαφής μεταξύ των κυττάρων ή με τη βοήθεια των διαλυτών ουσιών, οι οποίες αντιδρούν με τα κύτταρα. Το γεγονός ότι τα MP's απελευθερώνονται από τα κύτταρα ότι επηρεάζει άλλα κύτταρα είναι μια σχετικά νέα έννοια, αλλά είναι ένας βασικός μηχανισμός για την

παράδοση ενός μηνύματος με έναν εξαιρετικά ελεγχόμενο τρόπο. Τα μικροκυτίδια ασκούν τη δράση τους, είτε μέσω της διέγερσης του κυττάρου στόχου από την αλληλεπίδραση του υποδοχέα ή με άμεση μεταφορά του περιεχομένου τους το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει πρωτεΐνες της μεμβράνης, λιπίδια και κυτταροπλασματικά συστατικά των μητρικών κυττάρων ή RNA. Όχι DNA. Με αυτό τον τρόπο, τα μικροκυτίδια μπορούν να διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο και τη μεταφορά των σημάτων μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων, επάγοντας έτσι τη σηματοδότηση και την απόκριση σε απομακρυσμένα κύτταρα.

Αν και δεν χαρακτηρίζεται με λεπτομέρεια, μπορεί να υποθεθεί ότι η πρόσληψη και η αφαίρεση από τα κύτταρα συμβαίνει με παρόμοιους ή ταυτόσημους μοριακούς μηχανισμούς. Η σημασία της κυτταρικής επικοινωνίας μέσω των μικροκυστιδίων είναι ότι επιτυγχάνεται μεταφορά στοιχείων σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αντίθεση με την αντίδραση των κυττάρων με διάφορα διαλύματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μικροκυτίδια να αντιπροσωπεύουν σήμερα ένα νέο μηχανισμό ενδοκυτταρικής επικοινωνίας μεσολαβώντας στις φλεγμονές, στην πήξη και άνοσες αποκρίσεις. Τα μικροκυτίδια είναι αναπόσπαστο μέρος όλων των ασταθών προϊόντων αίματος και χορηγούνται σε μεταγγιζόμενους ασθενείς. Βρίσκονται συσσωρευμένα σε κυτταρικά (ερυθρά αιμοσφαίρια RBCs, αιμοπετάλια PLTs) συσσωματώματα καθώς και στο φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP) κατά την διάρκεια αποθήκευσης. Ένα κλινικά σημαντικό ζήτημα είναι ότι τα μικροκυτίδια μπορούν να έχουν προπηκτικές δραστηριότητες. Έχει καταδειχθεί ότι τα P-Μικροκυτίδια (PMPs) έχουν από 50 έως 100 φορές υψηλότερη προπηκτική δράση από τα αιμοπετάλια (PLTs). Τα μικροκυτίδια εκθέτουν την δραστικότητα του ιστικού παράγοντα, έτσι ώστε να μπορεί να έχει ένα ρόλο στην έναρξη της πήξεως του αίματος. Κατά τη διάρκεια της απελευθέρωσης των μικροκυστιδίων, η φυσιολογική ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων μεταξύ των δύο μεμβρανών της πλασματικής μεμβράνης χάνεται, με αποτέλεσμα την έκθεση του ανιονικού φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη (PS). Στη συνέχεια συμβάλλει στην προπηκτική ιδιότητα των μικροκυστιδίων, δεδομένου ότι

εξυπηρετεί στη συναρμολόγηση των παραγόντων πήξεως σε ενεργά σύμπλοκα για την παραγωγή θρομβίνης. Ωστόσο παρατηρήσεις δείχνουν επίσης την ύπαρξη μικροκυστιδίων χωρίς PS, όπως στην περίπτωση του P-MP's που προέρχονται από πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια υποδηλώνοντας ότι κατέχουν και άλλες δραστηριότητες εκτός από την προ-πηκτική φωσφολιπιδίου. Τα τελευταία χρόνια, ένα αυξανόμενο σώμα της βιβλιογραφίας έχει καταδείξει μια αυξημένη συχνότητα εμφάνισης από ανεπιθύμητα κλινικά αποτελέσματα που σχετίζονται με τη μετάγγιση ενός μεγάλου αριθμού μονάδων με αυξημένο χρόνο αποθήκευσης. Αυτά τα γεγονότα περιλαμβάνουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης, νεφρικής ανεπάρκειας, αναπνευστικής ανεπάρκειας, ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων και θάνατο[53].

4.4 Βιοχημική βάση της σύνθεσης των μικροκυστιδίων

Τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης είναι πολύ ειδικά από την άποψη της σύνθεσής τους και της κατανομής τους σε ποικίλα ευκαρυωτικά κύτταρα, υπό φυσιολογικές συνθήκες τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα έχουν μία ασύμμετρη κατανομή από μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Τα χολικά φωσφολιπίδια, και είναι κυρίως τοποθετημένα στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ τα αμυνοφωσφολιπίδια και PS είναι τοποθετημένα στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η διατήρηση αυτής της μεμβρανικής ασυμμετρίας είναι πολύ σημαντική και ρυθμίζεται μέσω μιας πολύπλοκης ισορροπίας από διαμεμβρανικά ένζυμα. Η κλασσική θεωρία της διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης και η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων βασίζεται στην απώλεια της μεμβρανικής ασυμμετρίας μέσω μιας εγκάρσιας μετανάστευσης ανιονικών φωσφολιπιδίων όπως το PS από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης προς την εξωτερική. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διεγερθεί από διάφορα κυτταρικά γεγονότα όπως η απόπτωση, η νέκρωση και η κυτταρική ενεργοποίηση. Στα αιμοπετάλια, η έκθεση του PS προάγει επίσης την εκάθαρση από αποπτωτικά κύτταρα και κυτταρικά θραύσματα από τα μακροφάγα. Μια

εισροή ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) από εξωκυτταρικές πηγές και ιόντων ασβεστίου που απελευθερώνονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) προκαλεί την ενεργοποίηση της καλπαΐνης, μιας κυστεϊνικής πρωτεΐνάσης. Η καλπαΐνη έχει πολλές λειτουργίες κατά τη διάρκεια της παραγωγής των μικροκυστιδίων συμπεριλαμβανομένης της διάσπασης των κυτταροσκελετικών νηματίων ακτίνης, κάτι που οδηγεί στην ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την ρήξη των μικροκυστιδίων. Άλλες λειτουργίες-δράσεις περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω της (προκασπάσης 3) και του BclxL. Για να επιβεβαιώσουμε τη συμμετοχή της καλπαΐνης (calpain) στην απελευθέρωση μικροκυστιδίων, η καλεπτίνη (caloptin), ένας γνωστός αναστολέας της καλπαΐνης, αποδείχθηκε ότι μπορεί να αναστείλει την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από αιμοπετάλια. Στη θρομβωτική-θρομβοκυτταροπενική αναιμία, η παρουσία της ενεργής καλπαΐνης στο πλάσμα σχετίζεται άμεσα με την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα αιμοπετάλια.

Εκτός από τον ιό της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV) με μεταβίβαση ειδικών υποδοχέων (co-receptors), ένας άλλος μηχανισμός προτάθηκε, ο οποίος σχετίζεται με τα μικροκυστίδια και ονομάστηκε μηχανισμός του «Δούρειου Ίππου» (Trojan Horse Mechanism). Ο οποίος αντικαθιστά την απευθείας μετάδοση του ιού στο εσωτερικό των κυττάρων. Έχει υποτεθεί ότι ένας παρόμοιος μηχανισμός ισχύει και για την μόλυνση των κυττάρων από σωματίδια prions καθώς αυτά τα μολυσματικά σωματίδια έχουν εντοπιστεί σε μικροκυστίδια προερχόμενα από αιμοπετάλια. Παρ' όλα αυτά, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να κατανοήσουμε πλήρως σε πόσο σημαντικό βαθμό συμμετέχουν τα μικροκυστίδια καθώς και τα εξωσώματα στην διαδικασία της μόλυνσης[54]. Μια συγκαλλιέργεια από ινοβλάστες του ανθρώπινου δέρματος με A549 p0 κύτταρα, μια κυτταρική γραμμή με μεταλλαγμένο και εξασθενημένο μιτοχονδριακό DNA έτσι ώστε τα κύτταρα να είναι ανίκανα ανάπτυξης και αερόβιας κυτταρικής αναπνοής, έδειξε ότι τα A549 p0 κύτταρα απέκτησαν μιτοχονδριακές λειτουργίες από τους ινοβλάστες. Αυτά τα κύτταρα ήταν ικανά να διαδίδονται ραγδαίως με έναν τρόπο που μοιάζει με τη γονική κυτταρική γραμμή με λειτουργικά

μιτοχόνδρια. Είναι πιθανόν ότι αυτή η μεταφορά των λειτουργικών μιτοχονδρίων ανάμεσα σε κύτταρα, συμπεριλαμβάνει τη συμμετοχή μικροκυστιδίων ή/και των εξωσωμάτων [54].

4.5 Μηχανισμός απελευθέρωσης μικροκυστιδίων

Ο ακριβής μηχανισμός ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την μεμβρανική κυστιδιοποίηση δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ακόμα. Παρ' όλα αυτά, πολλές αναφορές έχουν αποδώσει αυτό το γεγονός σε πολύπλοκους μηχανισμούς οι οποίοι συμπεριλαμβάνουν τόσο φυσιολογικούς όσο και εξωγενείς παράγοντες. Τα μικροκυτίδια δεν είναι ούτε αντικείμενα, ούτε το αποτέλεσμα μιας τυχαίας διαδικασίας όπως πιστευόταν, όπως η αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης νεκρωτικών κυττάρων κατά την διάρκεια του θανάτου τους. Αντί για αυτό, η κυστιδιοποίηση είναι μια εξαιρετικά καλά ρυθμισμένη διαδικασία που σχετίζεται με διαφορετικά κύτταρα κατά την διέγερσή τους [54]. Εξωγενή ερεθίσματα όπως η επινεφρίνη, το κολλαγόνο και το ιονοφόρο ασβέστιο έχουν όλα αναφερθεί ότι διεγείρουν την απελευθέρωση μικροκυστιδίων. Επιπροσθέτως σε αυτά, συγκεντρώσεις από το σύμπλεγμα του συμπληρώματος C5b-9 και μηχανικοί παράγοντες όπως το στρές(stress) είναι καθοριστικοί και οδηγούν στην απελευθέρωση μικροκυστιδίων από διάφορα κύτταρα. Το 2002 είχε αναφερθεί ότι η διέγερση ενδοθηλιακών κυττάρων του ομφάλιου λώρου HUVECs με ποικίλους παράγοντες περιλαμβανομένων της οξικής φορβόλης, της θρομβίνης ή του ενεργοποιητή πλασμινογόνου των ιστών δεν έχουν αποτέλεσμα στη σημαντική απελευθέρωση των PS μικροκυστιδίων παρά τις αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία μετά την ενεργοποίηση[55]. Παρ' όλα αυτά, μια πιο πρόσφατη έρευνα κατέδειξε ότι η HUVECs απελευθερώνει PS μικροκυτίδια μόνο μετά τη διέγερση με το λυτικό σύμπλεγμα του συμπληρώματος C5b-9, κάτι που αποτελεί μία φυσιολογική διαδικασία. Αργότερα άλλες επιστημονικές ομάδες ανέφεραν ότι αυτά τα κύτταρα απελευθερώνουν PS μικροκυτίδια μετά τη διέγερση με υψηλές συγκεντρώσεις ιονοφόρου ασβεστίου [54].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 Παραγωγή μικροκυστιδίων από κύτταρα

5.1.1 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων

Το ερυθροκύτταρο ήταν πάντα ένα σημαντικό αντικείμενο στην έρευνα της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας της πλασματικής μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένου και του σχηματισμού κυστιδίων. Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον στην εντός και εκτός ερυθροκυτταρική κυστιδιοποίηση αυξήθηκε, από τη συνειδητοποίηση ότι η κυστιδιοποίηση παίζει ρόλο σε όλα τα στάδια της ζωής του ερυθροκυττάρου[56]. Κατά την ερυθροποίηση, ο σίδηρος μεταφέρεται μέσα στην ερυθροβλάστη για τη σύνθεση της Hb με, διαμεσολαβούμενη από τον υποδοχέα, ενδοκυττάρωση κυστιδίων που περιέχουν συμπλέγματα υποδοχέων τρανσφερρίνης, τρανσφερρίνη και σίδηρο. Σε ένα μεταγενέστερο σημείο της τελικής ερυθροειδικής διαφοροποίησης, η κυστιδιοποίηση παίζει κρίσιμο ρόλο στην αναδιαμόρφωση της μεμβράνης του δικτυοερυθροκυττάρου, όταν ένας αριθμός διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα τρανσφερρίνης, αφαιρείται από την επιφάνεια του κυττάρου με εξωκυττάρωση. Τέλος, η κυστιδιοποίηση της πλασματικής μεμβράνης του ώριμου ερυθροκυττάρου δεν είναι μόνο ένα διαμεμβρανικό μέρος της φυσιολογικής διαδικασίας γήρανσης του ερυθροκυττάρου, αλλά αποτελεί και μία από τις αποθηκευτικές βλάβες του ερυθροκυττάρου στις αιμοδοσίες. Επίσης, παίζει κάποιο ρόλο στην παθολογία των αιμοσφαιρινοπαθειών και των ερυθροκυτταρικών μεμβρανοπαθειών [56].

Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων αποτελεί μία από τις αποθηκευτικές βλάβες που σχετίζεται άμεσα με την ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, τα ερυθροκύτταρα, αποβάλλοντας κυστίδια, χάνουν σταδιακά μεμβράνη. Αυτό συμβαίνει, υπό συγκεκριμένες συνθήκες in vivo, in vitro και ex

νίνο κατά την αποθήκευση του αίματος. Υπολογίζεται ότι το αίμα ενός υγιούς ενήλικα περιέχει κατά μέσο όρο 169 κυστίδια ερυθροκυτταρικής προέλευσης ανά μικρόλιτρο (μL) πλάσματος. Τα μικροκυστίδια είναι θραύσματα, τα οποία έχουν απορριφθεί από τη μεμβράνη (του πλάσματος) διεγερμένων ή αποπτωτικών κυττάρων. Σχετίζονται με διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της διακυτταρικής επικοινωνίας, της ομοιόστασης και της ανοσίας. Γενικά, η αντίληψη που επικρατεί είναι ότι η κυστιδιοποίηση αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό εξάλειψης των προϊόντων των κυτταρικών αποβλήτων [57, 58, 56, 59]. Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της έκτασης της κυστιδιοποίησης, είναι ο προσδιορισμός της ακετυλοχοληστεράσης και η μέτρηση της απελευθέρωσης φωσφολιπιδίων [56].

5.1.2 Διαδικασία κυστιδιοποίησης Ερυθρών αιμοσφαιρίων

Όπως προαναφέρθηκε, η παραγωγή κυστιδίων από τα ερυθροκύτταρα γίνεται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ζωής τους *in vivo*, όταν υπάρχει κάποια νόσος (ίσως τότε είναι και πιο εκτεταμένη) και κατά την αποθήκευση στις αιμοδοσίες. Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των κυστιδίων είναι η εικονική απουσία της σπεκτρίνης και της αγκυρίνης, δηλαδή των κύριων συστατικών του ερυθροκυτταρικού σκελετού, και ενός αέραίου κυτταροσκελετικού δικτύου σπεκτρίνης-ακτίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι οι μεμβράνες των κυστιδίων είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένες με μια ποικιλία πρωτεϊνών, σε σύγκριση με τη συγκέντρωσή τους στην άθικτη ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της πρωτεϊνικής τους σύνθεσης και της διαδικασίας της κυστιδιοποίησης. Γενικά, η κυστιδιοποίηση της μεμβράνης μπορεί να δημιουργηθεί είτε από μία ασυμμετρία στη σύνθεση της επιφάνειας της μεμβράνης, που ευνοεί την κύρτωσή της, είτε από την παραγωγή δυνάμεων (π.χ. από τον κυτταροσκελετό). Ενώ η λιπιδική σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων είναι πάντα ασύμμετρη, η αύξηση αυτής της ασυμμετρίας, για παράδειγμα υπό την επίδραση πρωτεϊνών όπως η φλιπάση, μπορεί να αυξήσει τις στερεοχημικές ροπές μέσα στη διπλοστιβάδα και να πυροδοτήσει το σχηματισμό

κυστιδίων. Ένα σημαντικό ρόλο στην ερυθροκυτταρική κυστιδιοποίηση είναι πιθανό να παίζει ο κυτταροσκελετός. Διαχωρίζοντας την ερυθροκυτταρική μεμβράνη σε τμήματα, ο κυτταροσκελετός επηρεάζει τόσο το ρυθμό διάχυσης των μεμβρανικών συστατικών, όσο και τη φυσική έκταση των ελεύθερων μεμβρανικών τμημάτων. Τα νημάτια σπεκτρίνης επηρεάζουν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες απωθώντας τις στερεοχημικά, γεγονός που τείνει να διαχωρίσει κάποιες πρωτεΐνες μακριά από τα νημάτια, και με ελκτικές αλληλεπιδράσεις με άλλα μεμβρανικά συστατικά που, ως εκ τούτου, συσσωρεύονται κοντά στα νημάτια. Το αποτέλεσμα είναι ένα μωσαϊκό από μεμβρανικά συστατικά, το οποίο αντανακλά τη γεωμετρία του δικτύου του κυτταροσκελετού και τη χημική συγγένεια των μεμβρανικών συστατικών. Η πιο προφανής διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό κυστιδίων είναι η συσσώρευση συγκεκριμένων ειδών μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν (κοινή) συγγένεια προς το σχηματισμό μεμβρανικών περιοχών. Μεμβρανικές περιοχές με αρκετά μεγάλο μέγεθος, δημιουργούν αυθόρμητα εξογκώματα στην επιφάνειά τους και θα αποσπαστούν ως κυστίδια. Για περιοχές και κυστίδια πολύ μικρού μεγέθους, συγκριτικά με το τυπικό μέγεθος των μονάδων του κυτταροσκελετού, η οδηγούμενη από τη συσσώρευση διαδικασία κυστιδιοποίησης μπορεί να προχωρήσει χωρίς απαραίτητα να επηρεάζεται από τον κυτταροσκελετό. Αυτή η διαδικασία, ενδεχομένως, να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό [85] νανοκυστιδίων με διάμετρο περίπου 25nm. Σε αυτήν την περίπτωση, είναι αναμενόμενο ότι οι περιοχές (αλλά και τα κυστίδια που προέρχονται από αυτές) θα έχουν σύνθεση, η οποία θα διαφέρει, ανάλογα με το μέγεθος του κυστιδίου. Η σύνθεση αυτή, αντιστοιχεί στην αυθόρμητη κύρτωση του κάθε μεμβρανικού συστατικού που συμμετέχει στο σχηματισμό περιοχών, από τις οποίες θα προέλθει κυστιδιοποίηση. Με αυτόν τον τρόπο, θα μπορούσε να εξηγηθεί γιατί τα κυστίδια διαφορετικού μεγέθους έχουν πολύ διαφορετικές μεμβρανικές συστάσεις. Οι επιδράσεις του κυτταροσκελετού στη διπλοστιβάδα μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: α) τη χημική σύνδεση των νηματίων της σπεκτρίνης στα διαμεμβρανικά συστατικά της μεμβράνης και β) τη δύναμη συμπίεσης που ασκεί ο κυτταροσκελετός στη διπλοστιβάδα. Αυτές οι δύο επιδράσεις συνδέονται μεταξύ

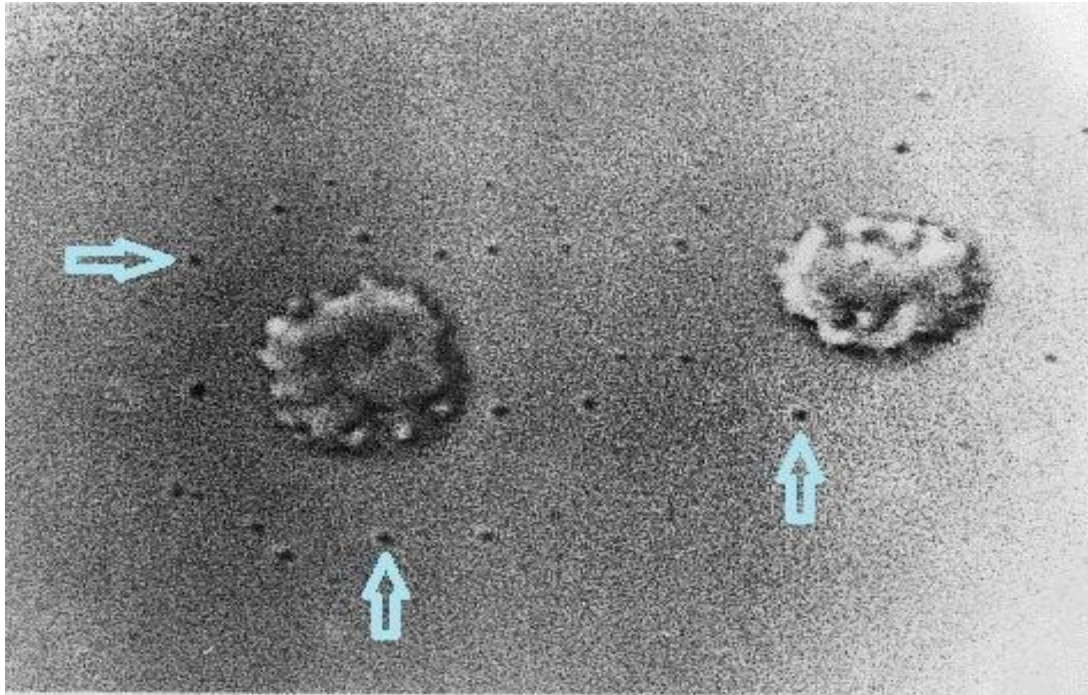
τους. Όλα τα κυστίδια περιέχουν πρωτεΐνη-ζώνη 3, όμως, από ότι φαίνεται, σε μία κατάσταση που την καθιστά μη λειτουργική ως θέση σύνδεσης του κυτταροσκελετού[60]. Για αυτό το λόγο, το κύριο γεγονός στο σχηματισμό των κυστιδίων φαίνεται να είναι το σπάσιμο του συνδέσμου μεταξύ της πρωτεΐνης-ζώνη 3 και του δικτύου της σπεκτρίνης, δηλαδή η λεγόμενη κάθετη σύνδεση, και όχι οι οριζόντιες αλληλεπιδράσεις στο τριμερές σύμπλεγμα σπεκτρίνης – ακτίνης – πρωτεΐνης. Η διαδικασία που οδηγεί σε διάσπαση αυτής της σύνδεσης μπορεί να διαφέρει. Από τη στιγμή που ο κυτταροπλασματικός τομέας της πρωτεΐνης-ζώνη 3 έχει θέσεις σύνδεσης υψηλής χημικής συγγένειας όχι μόνο για την αγκυρίνη, αλλά και για μετουσιωμένη Hb και για ένζυμα «κλειδιά» της γλυκόλυσης, τόσο η κατάσταση οξειδωσης, όσο και το ενεργειακό περιεχόμενο του ερυθροκυττάρου μπορεί επίσης να επηρεάζουν τη σύνδεση της αγκυρίνης στην πρωτεΐνη-ζώνη 3. Η σύνδεση και η δράση των γλυκολυτικών ενζύμων ρυθμίζεται από τις φωσφατάσες και τις κινάσες, υποδεικνύοντας ότι η μεταγωγή σήματος τόσο από ενδοκυττάριας, όσο και από εξωκυττάριας πυροδοτήσεις μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ λιπιδικής διπλοστιβάδας και κυτταροσκελετού. Όποιο και αν είναι το αίτιο της ύφεσης στην αλληλεπίδραση, έχει προταθεί ότι η αποδόμηση των συνδεδεμένων συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-ζώνης 3 – αγκυρίνης οδηγεί σε αυξημένη συμπίεση και δυσκαμψία του κυτταροσκελετού, προκαλώντας κύρτωση της διπλοστιβάδας και καταλήγοντας στο σχηματισμό κυστιδίων. Αυτά τα κυστίδια θα βλαστάνουν από τα ελεύθερα μεμβρανικά τμήματα που περιορίζονται από το κυτταροσκελετικό δίκτυο. Έτσι, θα έχουν πιο ετερογενή σύνθεση σε σύγκριση με τα νανοκυστίδια που σχηματίζονται, εξαιτίας μιας «καθαρής» διαδικασίας συσσώρευσης. Επίσης, το «άνοιγμα» του δεσμού σπεκτρίνης – διπλοστιβάδας περιορίζει την άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των νηματίων της σπεκτρίνης και των μεμβρανικών συστατικών, κάνοντάς τα πιο ευκίνητα και ελεύθερα να συσσωρευτούν [60].

5.1.3 Η κυστιδιοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων in vivo

Κατά τη διάρκεια της ζωής του in vivo, το ώριμο ερυθροκύτταρο χάνει σταδιακά τον όγκο του και την περιεκτικότητά του σε Hb. Επίσης, ελαττώνονται η επιφάνειά του και η περιεκτικότητά του σε λιπίδια, κυρίως λόγω της απελευθέρωσης κυστιδίων που περιέχουν Hb. Αυτή η διαδικασία παρουσιάζεται κατά τη διάρκεια της ζωής του ερυθροκυττάρου, αν και επιταχύνεται στο δεύτερο μισό της (υπό την προϋπόθεση να υπάρχει σπλήνας και να είναι λειτουργικός). Τα κυστίδια απομακρύνονται ταχύτατα από το μονοπυρηνικό φαγοκυτταρικό σύστημα, ιδίως από τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ. Η απομάκρυνσή τους, η οποία επέρχεται ταχύτατα, προκαλείται από τους συνδεδεμένους με την PS υποδοχείς εκκαθάρισης και από αυτοαντισώματα (π.χ. αυτόλογες IgGs), τα οποία, πυροδοτούν την αναγνώριση και την απομάκρυνση των γηρασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα (στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα)[58,56,59]. Ο σχηματισμός κυστιδίων μπορεί να χρησιμεύει ως ένα μέσο εκκαθάρισης των πλέον άχρηστων τμημάτων της μεμβράνης. Έτσι, το ερυθρό αιμοσφαίριο αποβάλλει τις μη λειτουργικές πρωτεΐνες και τα ενδεχομένως επιβλαβή αυτοαντιγόνα και συγχρόνως, «σώζεται» από πρόωρο θάνατο. Τα ειδικά κυτταρικά αυτοαντιγόνα γήρανσης (senescent cell-specific autoantigens, SCA) προέρχονται από την πρωτεΐνη-ζώνη 3. Πιθανολογείται ότι η παραγωγή των SCA ενεργοποιείται από τη σύνδεση μετουσιωμένης Hb στην κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης-ζώνη 3, προκαλώντας έτσι τη συσσωμάτωση ή/ και την αποδόμησή της. Τόσο η συσσωμάτωση, όσο και η αποδόμηση, ενδέχεται να οδηγήσουν σε σχηματισμό νεοαντιγόνων γήρανσης [58,56]. Τα κυστίδια που προέρχονται από ερυθροκύτταρα πρόσφατα ληφθέντος πλάσματος υγείων δοτών, ποικίλουν σε μέγεθος (200-800nm) και περιέχουν όλα τα συστατικά της Hb σε ένα μοτίβο ίδιο με αυτό των γηραιών ερυθροκυττάρων. Γενικά, από πρωτεομικές αναλύσεις προκύπτει ότι τα κυστίδια περιέχουν πολυκαιρισμένη κυτταροπλασματική Hb, όπως και πολυκαιρισμένη μεμβρανική πρωτεΐνη-ζώνη 3. Η παρουσία σημάτων εκκαθάρισης, όπως γηρασμένων κυτταρικών αντιγόνων και PS, είναι πιθανόν να ευθύνεται για την ταχύτατη απομάκρυνση των κυστιδίων [61,56].

5.1.4 Η κυστιδιοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων in vitro

Η απόπτωση ερυθροκυττάρων παρατηρείται επίσης και κάτω από άλλες συνθήκες, in vitro, οι οποίες προκαλούν τη (σχηματική) μετάβαση από δισκοκύτταρο σε εχινοκύτταρο. Τέτοιες είναι η εξάντληση του ATP και η υπερφόρτωση Ca^{2+} . Σε αυτές τις συνθήκες, έχει περιγραφεί πως παρουσιάζεται απόπτωση κυστιδίων στο άκρο των μεμβρανικών θραυσμάτων. Επίσης, πολλές μεμβρανοδραστικές ενώσεις (π.χ. απορρυπαντικά) που διαταράσσουν την οργάνωση των λιπιδίων της μεμβράνης, ή παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά των ιόντων δια μέσου της μεμβράνης, επάγουν το σχηματισμό κυστιδίων [56,59]. Όπως προαναφέρθηκε, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} , το σχήμα του ερυθροκυττάρου αλλάζει. Έχουμε δηλαδή, τη μετάβαση από δισκοκύτταρο σε εχινοκύτταρο. Επιπλέον, μικροκυτίδια απορρίπτονται από τις μικρολαχνωειδείς προσεκβολές των εχινοκυττάρων. Τα κυτίδια που προκαλούνται από το Ca^{2+} δεν περιέχουν φωσφατιδυλοχολίνη (phosphatidylcholine, PC), σπεκτρίνη, ακτίνη και γλυκοφορίνη, ενώ παρατηρούνται συγκεντρώσεις πρωτεΐνης-ζώνης 3 και ακετυλχολινεστεράσης[56].



Εικόνα 17: Κυστιδιοποίηση σε ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια. Παρατηρούνται (έξω)κυστίδια (βέλη) γύρω από τα γονεϊκά ερυθροκύτταρα [60].

Υπάρχει ένας αρνητικός συσχετισμός μεταξύ της ερυθροκυτταρικής περιεκτικότητας σε ATP και της ποσότητας των κυστιδίων. Η εξάντληση του ATP προκαλεί τις ίδιες μορφολογικές αλλαγές με την αύξηση Ca^{2+} , όμως οι πρωτεϊνικές συνθέσεις των κυστιδίων που προκαλούνται από εξάντληση του ATP, αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και αποθήκευση, διαφέρουν. Αν στα παραπάνω συμψηφιστούν τόσο οι διαφορές στην πρωτεϊνική και φωσφολιπιδική σύσταση, όσο και αυτές στο μέγεθος και το σχήμα των κυστιδίων που προκαλούνται από ποικίλες μεμβρανοδραστικές ενώσεις (π.χ. αμφιφιλίνες, λυσοφωσφατιδικό οξύ), τότε συμπεραίνεται ότι η σύνθεση των κυστιδίων διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής τους. Επίσης, υποστηρίζεται η θεωρία ότι πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης είναι πιθανόν να εμπλέκονται στο μηχανισμό παραγωγής τους [56].

5.2 Η κυστιδιοποίηση των αιμοπεταλίων (Platelets)

Η πλειοψηφία των κυκλοφορούντων MVs στο πλάσμα του αίματος προέρχονται από αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης ή, όπως έχει προταθεί πρόσφατα, από μεγακαρυοκύτταρα [62]. In vitro, τα pMVs σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διέγερσης των αιμοπεταλίων με κολλαγόνο, θρομβίνη ή ADP. Στρές και συναισθηματική ένταση/ταραχή επίσης προωθεί το σχηματισμό pMV. Τα pMVs ανιχνεύονται εύκολα από FC χρησιμοποιώντας δείκτες CD41, CD42, CD61, και CD62. Παρόμοια με τα eMVs στην ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, τα pMVs θεωρούνται ως δείκτες αιμοπεταλιακής ενεργοποίησης. Επομένως, πολυάριθμες ασθένειες χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα pMVs, περιλαμβάνοντας καρδιαγγειακές παθήσεις, αυτοάνοσα νοσήματα [63] και διαβήτη τύπου II. Τα pMVs μπορούν επίσης να εκθέσουν φωσφατιδυλσερίνη και ιστικό παράγοντα και μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην παθογένεια αγγειακών παθήσεων λόγω του υψηλού θρομβογονικού τους δυναμικού. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι όχι μόνο το πλάσμα αίματος αλλά και το αρθρικό υγρό από RA ασθενείς περιέχει υψηλά ποσά pMVs [64] και ενεργοποιεί αρθρικούς ινοβλάστες μέσω του περιεχομένων τους σε IL-1. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, πολυάριθμες δημοσιεύσεις έχουν παρουσιάσει τα αυξημένα επίπεδα των στο πλάσμα αίματος από ασθενείς με ποικίλες ρευματικές παθήσεις. [63]. Τα pMVs χαρακτηρίζονται από επιφάνεια η οποία ευνοεί ιδιαίτερα την προσκόλληση και μπορεί να δεσμευθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα λευκοκύτταρα και σε μητρικά μόρια [65]. Επιπλέον, προσκολλημένα MVs μπορούν επίσης να μεταφέρουν GPIIb/IIIa σε κύτταρα, όπως ουδετερόφιλα [66], οδηγώντας σε κυτταρική ενεργοποίηση. Περιληπτικά, τα pMVs ενδεχομένως αντιπροσωπεύουν νέους «πρωταγωνιστές» στο δίκτυο της φλεγμονής και της αυτοανοσίας.

5.2.1 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων περιλαμβάνει μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων, συμπεριλαμβανομένων: της αλλαγής σχήματος, της μετατόπισης των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης, της εξωκυττάρωσης των περιεχομένων κοκκίων και το σχηματισμό μικροκυστιδίων. Ο σχηματισμός μικροκυστιδίων έχει καταδειχθεί *in vitro* χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής μετά από διέγερση με το ιονοφόρο ασβέστιο A23187, τη θρομβίνη, το κολλαγόνο, και τον υποδοχέα θρομβίνης, το πεπτίδιο αγωνιστή SFLLRN[1,2]. έχει επίσης παρατηρηθεί ο σχηματισμός μικροκυστιδίων *in vivo* σε περιπτώσεις υψηλής αιμορραγίας καθώς και σε πέντε κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συμπεριλαμβανομένων της ιδιοπαθούς θρομβοπενικής πορφύρας[6] και της καρδιοαναπνευστικής παράκαμψης (*by pass*)[7]. Μολονότι ο φυσιολογικός ρόλος των αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων παραμένει να καθοριστεί, τόσο η προπηκτική [8-9] όσο και η αντιπηκτική [10] δραστηριότητα έχουν αποδοθεί σε αυτά. Ο σχηματισμός μικροκυστιδίων συνδέεται στενά με την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στο εξωτερικό φύλλο της κυτταρικής μεμβράνης του αιμοπεταλίου. Η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης συμβάλλει τόσο στην απελευθέρωση μικροκυστιδίων όπως προαναφέρθηκε [11,12] καθώς και στην παροχή μιας ανιονικής επιφάνειας για την δέσμευση των παραγόντων πήξης VIII, Va [13, 14] και Xa [15]. Έτσι τα μικροκυστίδια έχουν τη δυνατότητα να εξασκούν μία προπηκτική λειτουργία σε μία αρκετά μεγάλη απόσταση από τη θέση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Τα μικροκυστίδια των αιμοπεταλίων περιέχουν διάφορες επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες (GP) όπως η GPIb, οι αλυσίδες aIIb της ιντερκρίνης, β3 και β1 [5,7,16] και η P-σελεκτίνη, οι οποίες μετακινούνται από τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα στην κυτταρική επιφάνεια μετά την ενεργοποίηση. Η παρουσία αυτών των γλυκοπρωτεϊνών στην απελευθέρωση των μικροκυστιδίων μπορεί να έχει σημασία για την αλληλεπίδραση μεταξύ τους ή με άλλα κύτταρα [17] του ινώδους [18].

5.2.2 Διαδικασίες αιμοπεταλιαφαίρεσης και δειγματοληψία αίματος(πειραματικό).

Ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αναλύσει τα PMPs στο αίμα των δοτών για αιμοπεταλιοφέρηση και των αιμοπεταλιακών προϊόντων με τη χρήση τριών διαφορετικών μεθόδων. Η τοπική επιτροπή δεοντολογίας ενέκρινε το πρωτόκολλο της μελέτης (17 Δεκεμβρίου του 2008). Πριν την δωρεά αιμοπεταλίων, κάθε αιμοδότης είχε ενημερωθεί σχετικά με το πρωτόκολλο της μελέτης και ζήτησε τη συμμετοχή στη μελέτη. Αν ο δότης δεχόταν τους όρους και ένα αυτοματοποιημένο σύστημα συλλογής αίματος (Trima, CaridianBCT, Lakewood, Κολοράντο) ήταν διαθέσιμο, η δωρεά PLTs ήταν μια διαδικασία ρουτίνας και επιπλέον δείγματα αίματος ελήφθησαν για ανάλυση MPs. Εάν η μέτρηση των PLTs του δότη ήταν λιγότερο από $230 \times 10^9 / L$ συλλεγόταν μια ενιαία μονάδα-PLT (SPU), ενώ πάνω από αυτή την τιμή παραγόταν μία διπλή μονάδα (DPU). Τριάντα ένας υγιείς δότες αίματος (18 άνδρες και 13 γυναίκες) υποβλήθηκαν σε αιμοπεταλιαφαίρεση. Όλοι οι αιμοδότες έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση σύμφωνα με τις γερμανικές και ευρωπαϊκές ρυθμίσεις για αιμοπεταλιοφέρηση και έπειτα από μελέτη του πρωτοκόλλου. Για την ανάλυση των MPs πριν και μετά την αιμοδοσία, συλλέχθηκε ένα επιπλέον δείγμα αίματος, όγκου 5 ml με αντιπηκτικό (0,5 ml κιτρικού νατρίου-, $0,109 \text{ mol} / L$). Οι SPU περιείχαν κατά μέσο όρο 3×10^{11} PLTs σε 250 mL πλάσματος, ενώ στις DPU ήταν περίπου 6×10^{11} PLTs σε 500 mL πλάσματος. Η αιμοπεταλιοφέρηση διεξήχθη με ένα διαχωριστή κυττάρων (Trima Accel, Λογισμικό Έκδοση 5.1, CaridianBCT), χρησιμοποιώντας τυποποιημένες διαδικασίες. Οι ρυθμίσεις του οργάνου ήσαν οι ακόλουθες: η αντιπηκτική αναλογία ήταν 11:1, η διαχείριση κλήρωση ήταν έξι, η διαχείριση της επιστροφής ήταν τέσσερα, και η μέγιστη ροή ήταν στο μέσο. Μία ώρα μετά την αιμοπεταλιοφέρηση, ένα δείγμα 3 ml του προϊόντος των PLTs ελήφθη για ανάλυση MPs [18].

5.2.3 Απομόνωση αιμοπεταλίων (ερευνητικό)

Ολικό αίμα, που λαμβάνεται από υγιείς δότες που δεν είχαν χρησιμοποιήσει ασπιρίνη την προηγούμενη εβδομάδα, υποβάλλεται σε αντίπηξη με κιτρικό νάτριο σε αραιώση 1/10 και με συγκέντρωση 0,13 mol/l. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) ελήφθη με φυγοκέντρηση στα 180g για 10 λεπτά στους 22 ° C. Το PRP αναμειγνύεται σε αναλογία 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα Krebs Ringer, pH 5.0 (4 mmol / L KOI, 100 mmol / L NaCl, 20 mmol / L NaHCO₃, 2 mmol / L Na₂SO₄, 4.7 mmol / L κιτρικού οξέος, 14.2 mmol / L τρι-κιτρικό νάτριο), και ο σβώλος αιμοπεταλίων πλένεται δύο φορές με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 6.0. Τέλος, τα δείγματα του πλυμένου αιωρήματος αιμοπεταλίων επαναραιοποιούνται σε Krebs-Ringer ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7.4), που περιέχει 100 μmol / L του αΐη-β3 dRGDW αναστολέα για την αποφυγή συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. EUTA (5 mmol / L τελική συγκέντρωση) προστίθενται στο εναιώρημα λίγο πριν την ενεργοποίηση για να αποτραπεί συσσωμάτωση των κυστιδίων που απελευθερώνεται, και 5 mmol / L (τελική συγκέντρωση) του αναστολέα πρωτεάσης 4 - (2-αμινοαιθυλ)-βενζολοσουλφονυλφθορίδιο (AEBSF Boehringer Mannheim, Mannheim, Γερμανία) προστίθενται επίσης στο αιώρημα [18].

5.3 Κυστιδιοποίηση λευκών αιμοσφαιρίων (WBCs)

Τα λευκοκύτταρα έχουν ένα μοναδικό φυσιολογικό ρόλο στη φλεγμονή, στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού, και τη θρόμβωση. Μετά την έκθεση σε διάφορα ερεθίσματα όπως λιποπολυσακχαρίδια, παρατηρείται απελευθέρωση μικροκυστιδίων από μονοκύτταρα. Μονοκύτταρα εκφράζουν CD14, ο υποδοχέας λιποπολυσακχαρίτη έντονα στην επιφάνειά τους, ενώ τα κοκκιοκύτταρα εκφράζουν ασθενώς CD14 . Έτσι, τα κυστίδια που προέρχονται από μονοκύτταρα έχουν αναγνωριστεί από την επιφανειακή έκφραση του CD14. Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από ουδετερόφιλα έχουν εντοπιστεί στο αίμα των φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με μηνιγγιτιδοκοκκική σήψη. Τυπικά, τα μικροκυστίδια που προέρχονται από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα

προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας ειδικούς δείκτες λευκοκυττάρων (λακτοφερίνη ή CD66b). MPs που προέρχονται από λεμφοκυττάρια έχουν ταυτοποιηθεί με χρήση ειδικών δεικτών λεμφοκυττάρων (CD4 και CD8 δείκτες) [82].

5.4 Μηχανισμοί σχηματισμού ενδοθηλιακών μικροκυστιδίων

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν εξωσώματα (exosomes), ενδοθηλιακά MVs (συχνά αναφερόμενα ως EMPs) και αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies). Τα eMVs σχηματίζονται *in vitro* μετά από διέγερση με λιποσακχαρίδη, ενεργές οξυγόνου και κυτοκίνες. Είναι ανιχνεύσιμα στο ανθρώπινο πλάσμα με FC χρησιμοποιώντας ενδοθηλιακά κύτταρα-ειδικούς δείκτες (CD54, CD62E, CD62P, CD31, CD106, CD105, CD144, CD146) [83]. Παρόλους τους περιορισμούς του FC, τα eMVs θεωρούνται δείκτες φλεγμονής, ενδοθηλιακού τραύματος και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας [84, 85]. Καθώς η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία αποτελεί γνωστό παράγοντα πρόβλεψης μελλοντικών καρδιοαγγειακών παθήσεων, τα eMVs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες αγγειακής υγείας. Τα eMVs είναι αυξημένα στο πλάσμα του αίματος ασθενών με οξείες και χρόνιες αγγειακές διαταραχές, που περιλαμβάνουν το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [86], σοβαρή υπέρταση [87], τελικού σταδίου νεφρική ανεπάρκεια [85] και πνευμονική αρτηριακή υπέρταση [88, 89]. Τα eMVs έχουν αμφιλεγόμενο ρόλο στην παθογένεια των αγγειακών ασθενειών [90]. Τα eMVs ίσως συμβάλλουν στο αγγειακό τραύμα και είναι ικανά να προκαλέσουν ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, βλάπτοντας την αγγειακή χαλάρωση και προωθώντας την αγγειακή σκλήρυνση [91]. Επιπλέον, η φωσφατιδυλσερίνη (phosphatidyl-serine) και/ή ο ιστικός παράγοντας (tissue factor) θετικός σε eMVs προάγουν τη πήξη και τη θρόμβωση. Από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επάγουν αγγειογένεση ή να προάγουν την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [92]. Η τρέχουσα γνώση των μηχανισμών της ενδοθηλιακής κυστιδιοποίησης προέρχεται κυρίως από πειράματα σε απομονωμένα ή καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα που τεκμηριώνουν την ικανότητά τους να παράγουν MPs μετά την ενεργοποίηση

από μια ποικιλία ερεθισμάτων. Κατά τους Combes και συνεργάτες περιγράφεται πρώτα η παραγωγή EMPs από ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας διεγερμένα από TNP-α. Εκτός από TNP-α, άλλοι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και επίσης βακτηριακοί λιποπολυσακχαρίτες, αντιδραστικά είδη οξυγόνου, αναστολείς του ενεργοποιητή πλασμινογόνου , θρομβίνης , καμπτοθεκίνη , C-αντιδρώσα πρωτεΐνη , και ουραιμικές τοξίνες είναι σε θέση να επάγουν την *in vitro* παραγωγή EMPs. Το ενδογενές νιτρικό οξείδιο υγραίνει την απελευθέρωση του EMP στην διέγερση με C-αντιδρώσα πρωτεΐνη με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει τετραυδροβιοπτερίνη. Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί που εμπλέκονται στην απελευθέρωση EMPs *in vivo* παραμένουν άγνωστοι, η ισχυρή αντίστροφη σχέση μεταξύ αρτηριακής πίεσης και διάτμησης των κυκλοφορούντων επιπέδων EMPs σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου δείχνει ότι τα χαμηλά επίπεδα στρες τονώνουν την απελευθέρωση EMPs [93].

Η απελευθέρωση EMPs στο εξωκυτταρικό υγρό είναι η συνέπεια της εκολαπτόμενης πλασματικής μεμβράνης λόγω της διαταραχής της ασυμμετρίας των δύο μεμβρανών φωσφολιπιδίων και της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού. Είναι εν γένει αποδεκτό ότι η αναδιαμόρφωση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση ή ενεργοποίηση, οδηγεί σε έκθεση PS στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης ως συνέπεια της ασβεστιο-εξαρτώμενης δυσρύθμισης της σκραμπλάσης, φλιπάσης/ABC1 και τρανσλοκάσης / φλιπάσης δραστηριοτήτων [93]. Πολύ λίγες μελέτες έχουν αναλύσει τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μια μελέτη με βάση την ανάλυση των χαρακτηριστικών γονιδίων έχει αναγνωρίσει ένα πρωτότυπο «μονοπάτι» που προκαλείται από θρομβίνη, ανάλογα με την πυρηνική ενεργοποίηση του παράγοντα-κΒ, και τη συμμετοχή της Rho-κινάσης ROCK-II στην ενεργοποίηση από κασπάση 2 απουσία νεκρωτικών κυττάρων. Ο μηχανισμός αυτός προχωρά με 2 βήματα: Μία πρώτη φάση που εμφανίζεται νωρίς μετά την πρόσδεση θρομβίνης στον υποδοχέα της πρωτεάσης-ενεργοποιημένου υποδοχέα-1 (PAR-1) και μία δεύτερη φάση που εξαρτάται από τα μεταγραφικά γεγονότα που

προκαλούνται από τη θρομβίνη και τη συμμετοχή TRAIL/Apo2L, μια κυτοκίνη που ανήκει στην TNP-α υπεροικογένεια. Ο παράγοντας μεταγραφής πυρηνικού παράγοντα-κΒ ήταν απαραίτητος τόσο για γρήγορη όσο και για αργή παραγωγή των EMPs από τα θρομβίνο-διεγερμένα κύτταρα. Ως πρόσθετοι στόχοι της επαγόμενης από θρομβίνη απόπτωσης EMPs, το πρότυπο γονίδιο μελέτης προσδιόρισε επίσης την ιντερλευκίνη-1 και την ιντερλευκίνη-1Ra, οι οποίες πρωτεΐνες προσαρμογέα στρατολογούν και TRAF6 IRAQ1 και ενεργοποιούν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην ενίσχυση της EMP απελευθέρωσης [93]. Κατά συνέπεια, η φλεγμονώδεις μεσολαβητές που ρυθμίζονται από θρομβίνη αντιπροσωπεύουν μια αυτοκρινή οδό που ενισχύει την ενδοθηλιακή κυστιδιοποίηση. Το αν ή όχι οι ενδοκυττάρια οδοί που ρυθμίζουν την απελευθέρωση EMPs σχετίζονται με τη γενική φλεγμονώδη αντίδραση παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα. Μια πρόσφατη μελέτη προσδιόρισε την p38 μιτογόνο ενεργοποιημένη κινάση πρωτεΐνης ως μια κρίσιμη οδό για την παραγωγή των προφλεγμονωδών EMPs. Σε αυτή τη μελέτη, η EMP απελευθέρωση πυροδοτείται από την ενεργοποίηση του TNP-α αυξάνοντας την απελευθέρωση του διαλυτού ICAM-1 που εκκρίνονται από ενδοθηλιακά κύτταρα, παρέχοντας έτσι ενίσχυση της ενδοθηλιακής απόκρισης σε φλεγμονή[93].

5.5 Σχηματισμός κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, σχηματισμός μικρομορίων

Τα κύτταρα περιβάλλονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη, που αποτελείται από διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων. Οι δυο αυτές στιβάδες έχουν διαφορετικά είδη φωσφολιπιδίων. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα δυο είδη αμινοφωσφολιπιδίων που κυρίως σχηματίζουν την εσωτερική στιβάδα της μεμβράνης είναι η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE), ενώ τα κύρια φωσφολιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη. Τα αμινοφωσφολιπίδια είναι αρνητικά φορτισμένα, ενώ αυτά της εξωτερικής μεμβράνης είναι ουδέτερα. Η ασύμμετρη

κατανομή των φωσφολιπιδίων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη διατηρείται από τρία κύρια ενζυμικά συστήματα: φλιπάση, φλοπάση και σκραμπλάση. Η φλιπάση, μια εσωτερική αντλία, είναι ένας ATP-εξαρτώμενος αμινοφωσφολιπιδικός μεταφορέας που είναι υπεύθυνος για τη γρήγορη και ειδική μετακίνηση των PS και PE από την εξωτερική στην εσωτερική στιβάδα αντίθετα προς την ηλεκτρική κλίση. Η φλοπάση είναι ένας ATP-εξαρτώμενος φωσφολιπιδικός μεταφορέας, λιγότερο ειδικός και πιο αργός σε σχέση με την φλιπάση. Είναι μια εξωτερική αντλία που διευκολύνει την μεταφορά των φωσφολιπιδίων από την εσωτερική στην εξωτερική στιβάδα. Η σκραμπλάση είναι ένα ATP-εξαρτώμενο, αλλά και Ca^{2+} -εξαρτώμενο ένζυμο που επιτρέπει σε μη ειδικά φωσφολιπίδια να κινούνται ελεύθερα μεταξύ των στιβάδων.[94]

Κατά την απόπτωση ή την ενεργοποίηση των κυττάρων, η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων εξαφανίζεται. Καθώς η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} αυξάνεται, ενεργοποιούνται-διεγείρονται η σκραμπλάση και η φλοπάση και παρεμποδίζεται η δράση της φλιπάσης. Συνεπώς, τα αρνητικά φορτισμένα αμινοφωσφολιπίδια (PS και PE) τόσο των κυττάρων όσο και των MPs παραμένουν εκτεθειμένα στην εξωτερική κυτταροπλασματική πλευρά κι είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με το εξωτερικό περιβάλλον. Η αλληλεπίδραση αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό πήξης και στην απόπτωση[95,96]. Οι μεταβολές στην έκθεση των φωσφολιπιδίων οδηγούν στην εκκόλαψη της μεμβράνης και απελευθέρωση των MPs. Αντιθέτως, η Ca^{2+} εξαρτώμενη πρωτεάση καταστρέφει τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχήμα του κυττάρου και την μηχανική σταθερότητα της μεμβράνης. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στο σχηματισμό των MPs με διαφορετική αναλογία των PS στην εξωτερική τους επιφάνεια και στην απελευθέρωσή τους(εικόνα 2). Επίσης, σε μερικές περιπτώσεις τα MPs μπορεί να απελευθερωθούν σε λιγότερο ελεγχόμενες καταστάσεις, όπως από νεκρά κύτταρα ή κατά την μηχανική καταστροφή των κυττάρων. Οι έρευνες οι οποίες είναι ακόμα σε εξέλιξη προσπαθούν να ρίξουν φως στις διαφορές μεταξύ των απελευθερούμενων MPs και των αποπτωτικών κυστιδίων, ακόμα κι αν οι μηχανισμοί είναι όμοιοι[95,96]

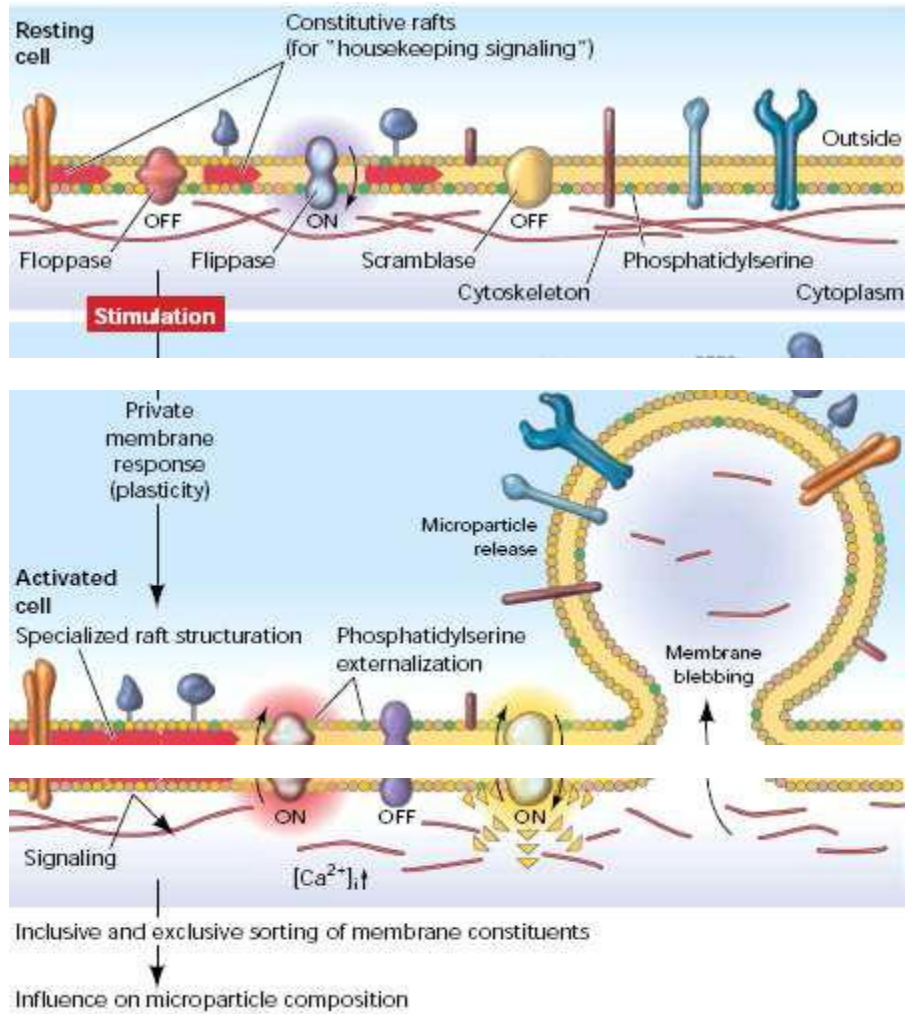


Figure 2 : The plasma membrane response to cell stimulation The plasma membrane is a well-structured entity characterized by a controlled transverse distribution of lipids and proteins between the two leaflets but also by a lateral organization in domains termed "rafts". (From Hugel et al. [95]).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Μέτρηση των επιπέδων των MPs χρησιμοποιώντας Λειτουργικές Δοκιμασίες

Υπάρχουν πολλοί τρόποι μέτρησης των MPs. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των διαφόρων MPs κυτταρικής προέλευσης, αν και υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με το όριο ανίχνευσης[97]. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η μικροσκοπία ατομικής δύναμης και η δυναμική σκέδαση φωτός μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του μεγέθους των MPs, αλλά δεν παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις βιολογικές ιδιότητες των MPs[98]. Η μέτρηση του επιπέδου των αντιγόνων του TF στα MPs έχει πρόσφατα επανεξεταστεί[99,100]. Τα πλεονεκτήματα των λειτουργικών δοκιμασιών είναι η υψηλή ευαισθησία, η απλότητα και η χρήση των καλά καθορισμένων αντιδραστηρίων. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος είχαν υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας του TF των MPs από ότι οι υγιείς μάρτυρες, ενώ η δοκιμασία αντιγόνων του TF απέτυχε να ανιχνεύσει κάποια διαφορά[101]. Ωστόσο, οι λειτουργικές δοκιμασίες δεν παρέχουν καμία πληροφορία σχετικά με την κυτταρική προέλευση των MPs ή τις φυσικές τους ιδιότητες. Ιδανικά, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας συνδυασμός των μεθόδων για να βρεθούν τα χαρακτηριστικά των MPs. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρουσία της PS στην επιφάνεια των MPs επιτρέπει τη συσσώρευση διαφόρων συμπλεγμάτων παραγόντων πήξης στα MPs. Μια δοκιμασία, που ονομάζεται Δοκιμασία δραστηριότητας του MP Zymurphen (Hyphen BioMed), ποσοτικοποιεί το επίπεδο της PS στα MPs[102]. Εν συντομία, τα PS+ MPs προσδένονται σε μια πλάκα της ELISA επικαλυμμένη με ανεξίνη V-στρεπταβιδίνη και επωασμένη με FV, FX και προθρομβίνη για το σχηματισμό του συμπλόκου προθρομβινάσης, η οποία διασπά την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Ένα υπόστρωμα με δείκτη για την θρομβίνη προστίθεται για να αξιολογηθούν τα επίπεδα της θρομβίνης. Μία άλλη δοκιμασία, η Proag PPL (Stago), μετρά την πηκτική δραστηριότητα των MPs που προστίθενται στο πλάσμα ελεύθερο φωσφολιπιδίων που έχει ληφθεί από χοίρους.[33] Ισοί όγκοι πλάσματος εξέτασης και πλάσματος ελεύθερου φωσφολιπιδίων αναμιγνύονται πριν την προσθήκη του FXa, και ο χρόνος πήξης μετράται. Το επίπεδο των

φωσφολιπιδίων στο δείγμα με τη μορφή των MPs υπολογίζεται χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη με συνθετικά φωσφολιπίδια[103].

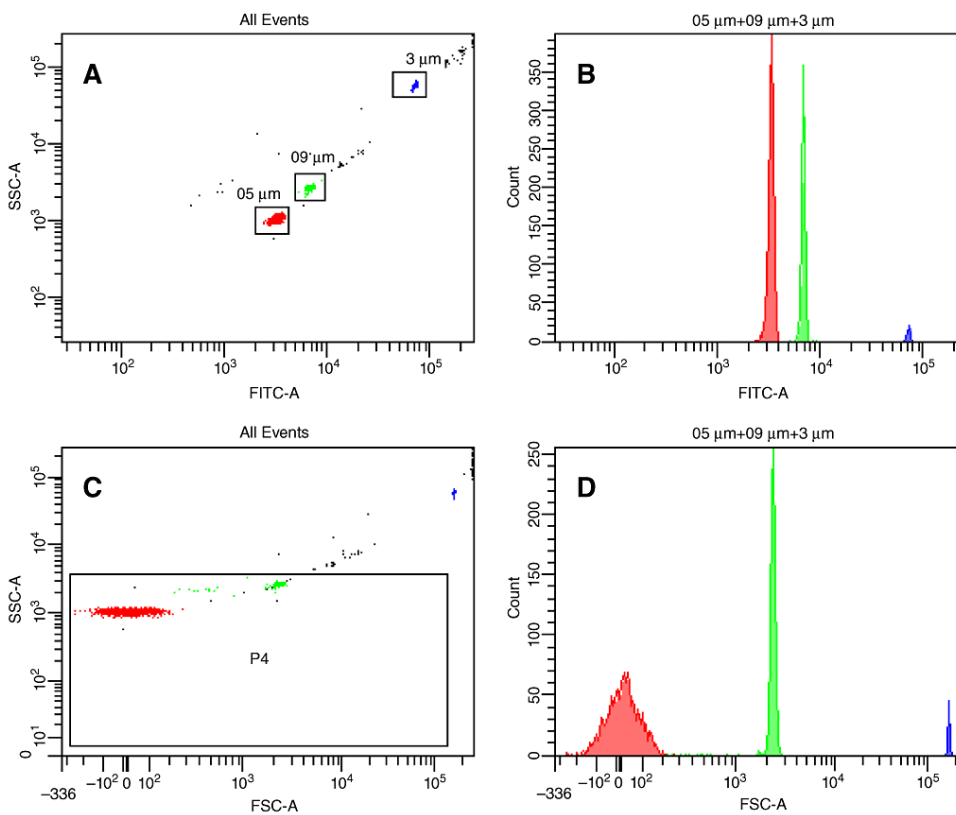
6.2 Μέθοδοι για την ανάλυση MPs

6.2.1 FCM ανάλυση

Η PMP συγκέντρωση προσδιορίστηκε με κυτταρόμετρα ροής (FACSCanto II, BD Biosciences, Σαν Χοσέ, Καλιφόρνια) που είναι εξοπλισμένα με το λογισμικό του (DIVA, έκδοση 6.1.3, BD Biosciences). Τα αποθηκευμένα δείγματα που περιέχουν κατεψυγμένο πλάσμα ελήφθησαν από την κατάψυξη και αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα δείγματα βάφτηκαν με φθοριοχρώμιο επισημασμένο με μονοκλωνικά αντισώματα, CD41-φυκοερυθρίνη (PE Clone HIP8) από την Becton Dickinson, μετά από αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης αννεξίνης. Αννεξίνη V ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) αραιώθηκε 1 προς 10, με ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης αννεξίνης. Χρώση των PMPs για την ποσοτική ανάλυση διεξήχθη σε σωλήνες (TruCount, BD Biosciences), ως εξής: 30 μl πλάσματος μεταφέρθηκαν με πιπέτα μέσα σε ένα σωλήνα TruCount και αναμίχθηκαν ήπια με 10 μl CD41-PE και 10 μl αννεξίνη V διαλύματος εργασίας. Μετά από επώαση 30 λεπτών στο σκοτάδι, προσθέσαμε 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος χρώσης αννεξίνης μέσα στον σωλήνα[104].

Μια μέθοδος φθορισμού για την μέτρηση κυστιδίων χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των MPs. Για την ανάλυση δείγματος, οι ρυθμίσεις του οργάνου FCM έχουν ρυθμιστεί ως ακολούθως: ένα μόνο-χρωματισμένο δείγμα με αννεξίνη V-FITC χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή των τάσεων των PMPs για FITC και PE. Μονο-χρωματισμένα διαλύματα ελέγχου (controls) χρησιμοποιήθηκαν για την αντιστάθμιση μεταξύ των FITC και PE. Η κύρια στρατηγική ήταν η εξής: φθορίζοντα βαθμονομημένα σφαιρίδια υπομικρομέτρου (Megamix σφαιρίδια, Stago, Asnières sur Seine, Γαλλία) διαφορετικού μεγέθους χρησιμοποιήθηκαν για βαθμονόμηση του κυτταρομέτρου και για να ορίσουν το εύρος μεγέθους των MPs που

ανιχνεύεται με FCM. Τα Megamix σφαιρίδια περιέχουν τρεις διαφορετικούς πληθυσμούς από φθορίζοντα σφαιρίδια μεγέθους 3, 0,9 και 0,5 μm ανιχνεύονται στον διάλυο FITC (Σχ. 1A και 1B). Τα megamix σφαιρίδια είναι πίσω περίφραξη σε μία εμπρόσθια σκέδαση (FSC)-πλευρική σκέδαση (SSC) οικόπεδο (Σχ. 1C) και μία πύλη (P4) ορίζεται για τον προσδιορισμό PMPs ενός μεγέθους μεταξύ 0,5 και 0,9 μm με φυσική σκέδαση (Σχ. 1C). Σύμφωνα με ότι το εύρος του ορίου ανίχνευσης των PMPs είναι μεταξύ 0,5 και 0,9 SSC μm. σηματοδότησε το άνω όριο του σφαιριδίου πληθυσμού με μέγεθος 0,9 μm[104].

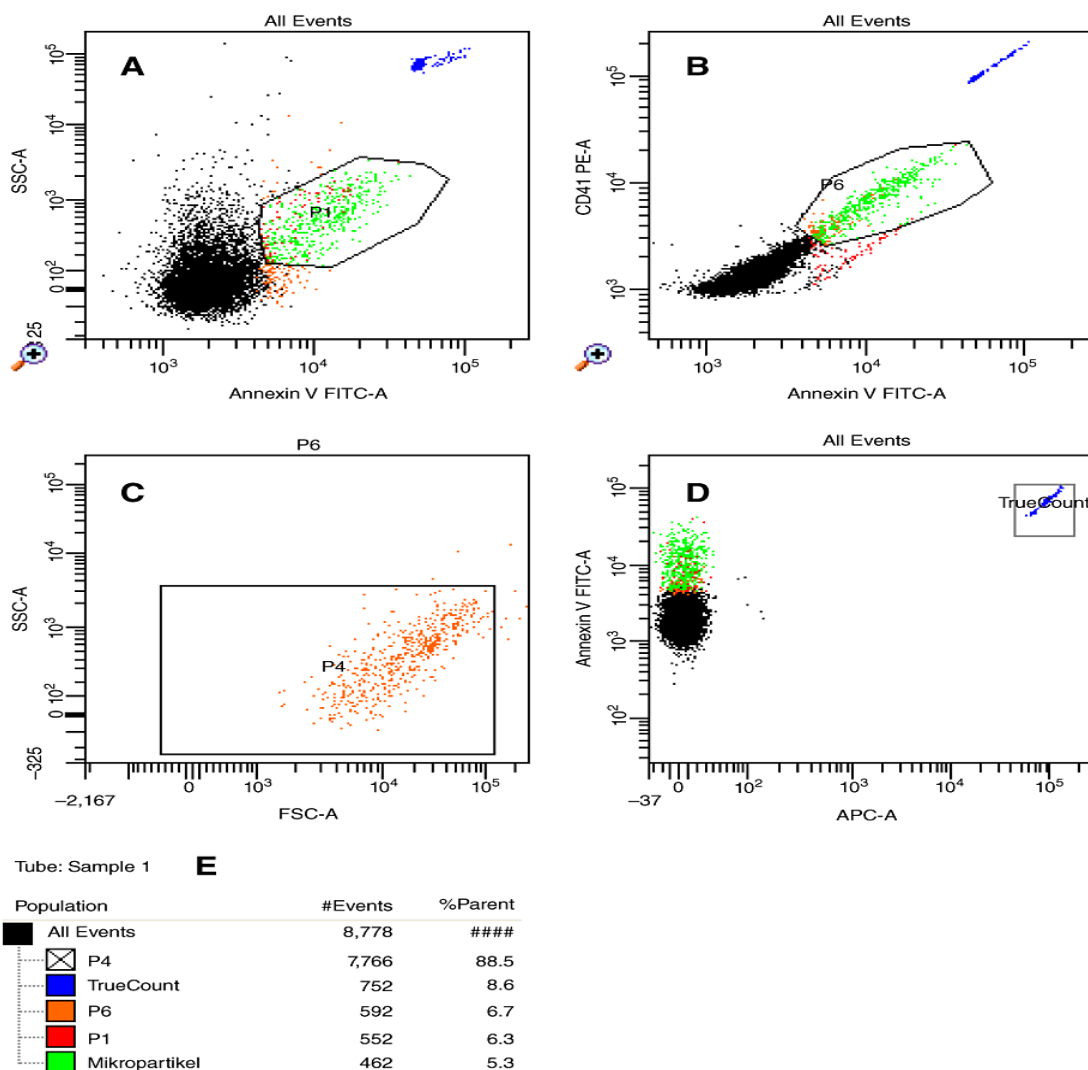


Σχήμα 1.

Φυσικές κηλίδες διασποράς καθορισμού Megamix μικροκυστιδίων διαφορετικού μεγέθους. (A, B) τα διαφορετικά μεγέθη Megamix σφαιριδίων σημασμένων με διαφορετική ποσότητα της φθορίζουσας χρωστικής στο FITC κανάλι. Αυτές οι διαφορετικές ιδιότητες χρώσης χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των σφαιριδίων. Τα μικρότερα σφαιρίδια (0,5 μm) δείχνουν φθορισμό (θέση στην αριστερή πλευρά), και οι μεσαίου μεγέθους χάντρες (0,9 μm) είναι μέσα θετικά (περίφραξη στη μεσαία θέση). Τα μεγαλύτερα σφαιρίδια (3 μm) είναι τα λαμπρότερα (θέση στη δεξιά πλευρά). (C, D) Φυσικές ιδιότητες σκέδασης του Megamix χάντρες. Σύμφωνα με τους ιδιότητες φθορισμού, χάντρες είναι back-περίφραξη σε FSC-SSC plot (C). Πύλη P4 ορίζεται για τον προσδιορισμό περιοχής PMP μεταξύ 0,5 και 0,9 μm. SSC σηματοδοτεί το ανώτερο όριο του σφαιριδίου πληθυσμού με μέγεθος 0,9 μm[104].

Όπως περιγράφεται από τον Lacroix και τους συνεργάτες του, για τα BD μέσα το ανώτερο όριο της πύλης FSC θα πρέπει να παραταθεί για τα PMPs σε

σύγκριση με τα Megamix σφαιρίδια. Σφαιρίδια και PMP δείχνουν ελαφρώς διαφορετικές ιδιότητες διασποράς στις λεγόμενες χαμηλές FS πλατφόρμες με μια λιγότερο σταθερή γωνία στην FSC μεταβλητή. Έχει αποδειχθεί ότι σε BD μέσα, η μεταβλητή ΕΣΕ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διακρίνει σωματίδια διαφορετικού μεγέθους. Ως εκ τούτου, ορίζεται το ανώτατο όριο για PMP σύμφωνα με τις ΕΣΕ ιδιότητες των σωματιδίων Megamix και άφησε αυτό το ανώτατο όριο αμετάβλητο στην SSC κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των PMPs. (Σχήματα 1 και 2)[104].



Σχήμα 2. Χαρακτηριστικά και περιφραγή των PMPs. Ένας συνδυασμός των πυλών χρησιμοποιείται για να ορίσει PMP. (A) PMPs πρώτα ορίζεται ως CD41-θετικών γεγονότων σε ένα πεδίο ανεξίτη V-SSC. (B) Δεύτερη PMPs είναι περιφραγμένη σε CD41-αννεξίν πεδίο V ως διπλά θετικά γεγονότα (P6). Άλλες ανεξίτη V-FITC-θετικών μικροκυστιδίων, οι οποίες είναι αρνητικές για CD41-PE, εξαιρούνται από την πύλη PMP. (C) Εκδηλώσεις στο P1 και P6 είναι πίσω-περιφραγμένο σε FSC-SSC πεδίο. PMPs πρέπει να εμπίπτουν στην περιοχή της P4, η οποία έχει ρυθμιστεί σύμφωνα με

Megamix σφαιρίδια (Εικ. 1). Τα σφαιρίδια TruCount προσδιορίζονται σύμφωνα με ισχυρό θετικό σήμα τους σε FITC και αλλοφυκοκυανίνη. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τα αποτελέσματα των δειγμάτων. Η Εκδήλωση είναι που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των απόλυτων αριθμών PMPs. Για την ανίχνευση PMPs, η πύλη φθορισμού χαρακτηρίστηκε για αννεξίνη V-FITC και CD41-PE ως διπλά θετικά γεγονότα. Ως εσωτερικός έλεγχος ισοτύπου για αποζημίωση αννεξίνη V-FITC-CD41 θετικά αλλά-PE-αρνητικά γεγονότα χρησιμοποιήθηκαν. Τα μικροκυτίδια θετικά σε V-FITC, τα οποία είναι αρνητικά για CD41-PE, εξαιρούνται από την πύλη PMP. Από το σχήμα 2B είναι φανερό ότι τα CD41-PE-αρνητικά MPs καθώς και υπολείμματα (που είναι παρόμοιου μεγέθους με τα MPs) είναι αρνητικά για το CD41-PE, υποδεικνύοντας την ειδικότητα της χρώσης. Στο FSC-SSC «οικόπεδο» (Σχ. 2C), η περιοχή περιέχει P4 PMPs μιας τάξης μεγέθους μεταξύ 0,5 και 0,9 μm, που ορίζεται από τα όρια των Megamix σφαιριδίων (βλέπε Εικ. 1C) και από το περιοχές P1 (Σχ. 2A) και P6 (Σχήμα 2B), οι οποίες περιέχουν αννεξίνη V-FITC και CD41-PE διπλά θετικά γεγονότα. TruCount σωλήνες χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των PMPs. Τα σφαιρίδια TruCount προσδιορίζονται σε οικόπεδο αλλοφυκοκυανίνης έναντι FITC (Σχήμα 2D) και τοποθετούνται σύμφωνα με τα ισχυρά θετικά σήματα τους, σε δύο κανάλια ανίχνευσης [104].

Για τον υπολογισμό των PMPs ανά μικρολίτρο, εφαρμόζεται ο ακόλουθος τύπος σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών:

$$PMPs \times 10^6/L = PMP \text{ events} / TruCount \text{ events} \times 1714 (\times 10^6) / L \quad [104]$$

6.2.2 Τεχνική ELISA για τη δραστικότητα των MPs

Η μέτρηση της προληκτικής δραστικότητας των MPs στο πλάσμα πραγματοποιείται με την Zymurhen MP δραστικότητα ELISA, μια προθρομβινική δοκιμασία, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, με τη χρήση ενός αναγνώστη ELISA (CODA, Bio-Rad, Munich, Germany), μετρώντας δείγματα σε ένα μήκος κύματος των 405 nm. Κατεψυγμένα δείγματα πλάσματος αποψύχθηκαν στους 37 ° C για 15 λεπτά, παρασκευάστηκαν για ανάλυση σε θερμοκρασία δωματίου, και αναλύθηκαν μέσα σε 4 ώρες [104,105].

Τα δείγματα πλάσματος και οι μάρτυρες δοκιμάστηκαν σε αραιώση 1:20 σε αραιωτικό δείγματος και επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Κάθε 100 μL του αραιωμένου δείγματος 1:20, τα 1:20 αραιωμένοι μάρτυρες, καθώς και δείγμα (τυφλό) χρησιμοποιήθηκαν για ELISA. Η απόδοση και τα χαρακτηριστικά ανιχνεύσεως ήταν τα εξής: όριο ανίχνευσης μικρότερο ή ίσο με 0,05 nmol, ενδοαναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (CV), 3% έως 8% και

διαεκτελεστικό CV, 5% έως 10%. Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) που περιέχεται στα MPs μετράται με την ενεργοποίηση της προθρομβίνης σε θρομβίνη (αρχή της δοκιμασίας) και PL είναι η μεταβλητή περιορισμού του ρυθμού της αντίδρασης. Δοκιμάστηκαν αραιωμένο δείγμα πλάσματος, συμπληρωμένο με ασβέστιο, παράγοντα (F) Xa, και αναστολείς θρομβίνης. Εισήχθη εντός της μικροπλάκας για να επικαλυφθεί καλά με στρεπταβιδίνη και βιοτινυλιωμένη ανασυνδυασμένη με αννεξίνη V. Μετά από επώαση και τα βήματα πλύσης, το FXa-FVa μίγμα που περιέχει ασβέστιο εισάγεται. MPs δεσμεύονται με αννεξίνη V και εκέτουν την φωσφολιπιδική τους επιφάνεια που ακολουθείται από την παραγωγή θρομβίνης ανάλογα με τη συγκέντρωση PL στο δείγμα. Η δημιουργία θρομβίνης μετράται με το φωτόμετρο του CODA αναλυτή στα 405 nm με την ειδική δραστηριότητα της επί του υποστρώματος θρομβίνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως νανομοριακά ισοδύναμα PS χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με λιποσώματα με γνωστή σύνθεση και η συγκέντρωση από PLTs [104,105].

6.2.3 MP ανίχνευση με την προπηκτική PL-εξαρτώμενη δοκιμασία πήξεως του χρόνου

Η STA-προπηκτική-PPL δοκιμασία (Diagnostica Stago SAS, Asnières sur Seine, Γαλλία) είναι μία προπηκτική δοκιμασία, που μετρά μια προπηκτική PL-εξαρτώμενη από το χρόνο πήξης (CT) και διευκρινίζει τις διαφορές μεταξύ του κανονικού πλάσματος και του πλάσματος που περιέχει μικροκυστίδια. Προθρομβωτικά φωσφολιπίδια εκθέτοντας μικροκυστίδια συντομεύουν το ενεργοποιημένο PX, ενεργοποιημένου CT (XACT) 0.22 PL-IiAOI πλάσμα (Αντιδραστήριο 1), καθιστώντας τη δοκιμασία υπό την παρουσία ασβεστίου ευαίσθητη σε δείγματα που περιέχουν PL. Αντιδραστήριο 2 ενεργοποιεί τον καταρράκτη της πήξης με θρομβίνη παραγωγής από πήξης FXa. Η παρασκευή των δειγμάτων πλάσματος και η διαδικασία δοκιμασίας εκτελέστηκε ακολουθώντας τις οδηγίες των κατασκευαστών για την STA-Procoag-PPL πήξης. Αφού αποψύχθηκαν όλα τα μη αραιωμένα δείγματα πλάσματος που πρόκειται να δοκιμαστούν φορτώθηκαν σε

ένα πλήρως αυτοματοποιημένο τυχαίας προσπέλασης αναλυτή πήξης, για τις δοκιμασίες πήξης (STA-compact Diagnostica Stago, Richmond, VA)[106]. Τα δείγματα αίματος μετάγγισης των υγιών δοτών αίματος χρησιμοποιήθηκαν για να καθοριστεί το εύρος των τιμών για αυτή τη δοκιμασία πήξης σε φυσιολογικά-υγιή άτομα. Όσον αφορά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, οι προαναλυτικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται στη μελέτη πρέπει να καθοριστούν [104].

6.2.4 Στατιστική ανάλυση

Ένα πακέτο λογισμικού (IBM SPSS Statistics, Release 19,0, IBM Corp, Άρμονκ, Νέα Υόρκη) χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση. Η κανονική κατανομή των μεταβλητών ελέγχθηκε με τη Shapiro-Wilks δοκιμή. Μία σύγκριση των δεδομένων μεταξύ των PMPs που αναλύθηκαν με FCM και την MP ενεργότητα που αναλύθηκε με ELISA ή μια δοκιμασία πήξης διεξήχθη μεταξύ SPUs και DPUs με τη χρήση της δοκιμής t για κανονικά κατανομημένα δεδομένα. Συνδυασμένα ζεύγη του Wilcoxon υπέγραψαν-rank test χρησιμοποιήθηκαν για μεταβλητές που δεν κατανέμονται κανονικά. Διαφορές των δεδομένων θεωρούνται σημαντικές όταν οι ρ τιμές ήταν λιγότερο από 0,05 ($\rho < 0,05$). Τα αποτελέσματα στους πίνακες υπολογίστηκαν σαν μέση τιμή και τυπική απόκλιση (SD). Γραμμικές ενώσεις μεταξύ δύο μεταβλητών διαπιστώθηκαν με τη δοκιμασία Pearson r. Οι τύποι υπολογισμού ήταν ως ακολούθως [104]:

Κυτταρική απόδοση = συγκέντρωση κυττάρων (ανά κ.εκ.) × όγκος της συγκομιδής (κ.εκ.)

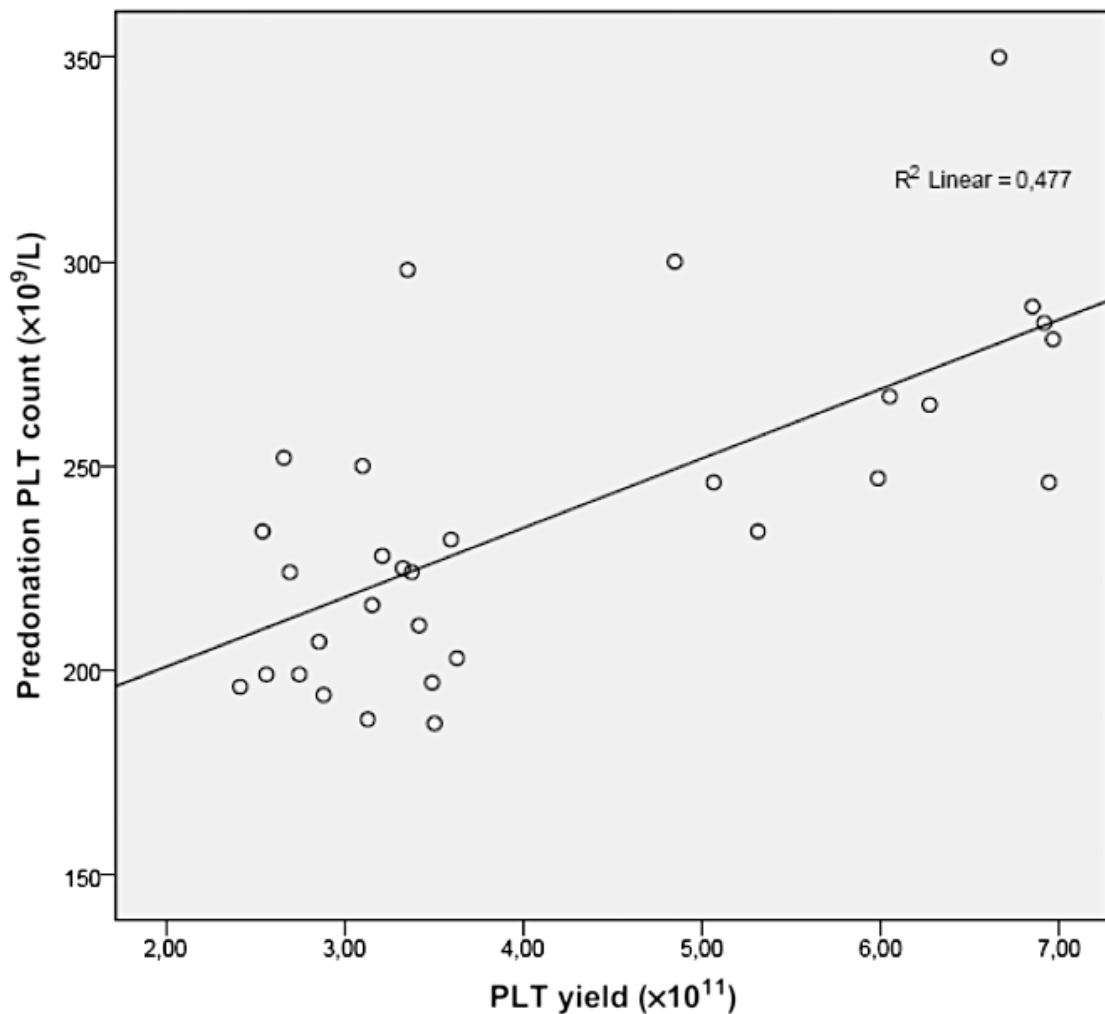
Ποσοστό συλλογής = παραγωγή κυττάρων ανά λεπτό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

συγκεκριμένα αποτελέσματα του Δότη στα SPU και τα DPU υποσύνολα

Ο Πίνακας 1 δίνει μια γενική εικόνα σχετική με το αίμα του δότη πριν και μετά τις 31 δωρεές αιμοπεταλιοφέρνησης, 20 και 11 SPUs, DPUs, μετρούμενη με μετρητή

αίματος. Εκτός από την υψηλότερη προαιμοδοσία Η PLT σε πρόσωπα που δώρισε DPU, έδειξε συγκρίσιμα στοιχεία του αίματος και του συνολικού όγκου του αίματος. Η μέτρηση PLTs κυμαίνονταν μεταξύ 187×10^9 και $298 \times 10^9 / L$ σε SPU δωρητές και κυμαίνονταν από 234×10^9 έως $350 \times 10^9 / L$ σε DPU δωρητές, αντίστοιχα. Η προαιμοδοσία PLT δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των 18 αρσενικών ($230 \times 10^9 \pm 32 \times 10^9 / L$) και των 13 γυναικών δοτών ($251 \times 10^9 \pm 46 \times 10^9 / L$) και αυτό συσχετίζεται σημαντικά με PLT αποδόσεις με μια τιμή r του 0.69 [104].



Σχήμα 3. Διάγραμμα διασποράς της αυτομετάγγισης Η PLT και PLT απόδοση. Το διάγραμμα διασποράς δείχνει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της μετάγγισης Η PLT και PLT αποδόσεων των προϊόντων αιμοπεταλιοφέρησης[104].

PMP συγκέντρωση αναλύθηκε με FCM. Σε σύγκριση με τις SPU δωρεές βρέθηκε 5% χαμηλότερος αριθμός μετάγγισης των PMPs στο υποσύνολο DPU. Προ-και postdonation τιμές για PMPs δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των SPU DPU και δωρεών. FCM ανάλυση έδειξε αύξηση των PMPs κατά 34% ($p = 0,37$) σε σύγκριση των προ-και postdonation H SPU σε χορηγούς, ενώ postdonation H PMP της DPU χορηγούς μειώθηκε κατά 16% ($p = 0,51$). Με την μέθοδο της ELISA βρέθηκε μία περισσότερο έντονη (62%) και σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των MPs σε σύγκριση με δείγματα αίματος μετάγγισης από SPU δωρεές ($p = 0,003$). Στην υποομάδα DPU η διαφορά (22%) δεν ήταν σημαντική. Η PMP μετάγγιση από 18 άνδρες ($1,35 \times 10^9 \pm 1,24 \times 10^9 / L$) και 13 γυναίκες δότες ($1,03 \times 10^9 \pm 1,07 \times 10^9 / L$) δεν αποκαλύπτουν διαφορά μεταξύ των δύο φύλων. Η μετάγγιση των PLTs και PMPs δεν συσχετίζονται σημαντικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συγκέντρωση PMP δεν εξαρτάται από την προκατάθεση αίματος PLT μετράνε. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ H PMP σε δείγματα μετάγγισης και σε APC. Η MP δραστηριότητα αναλύεται με τη μέθοδο ELISA ή με δοκιμασία πήξεως [104].

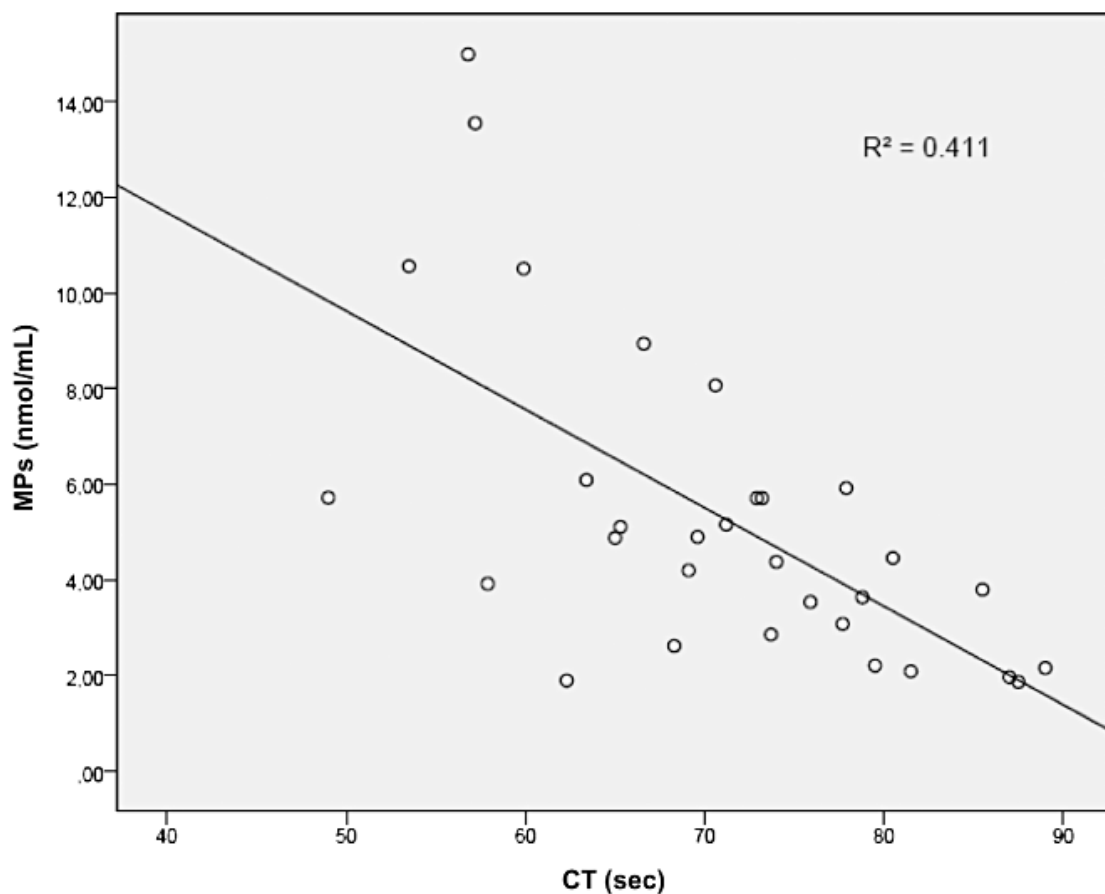
6.2.5 Αποτελέσματα PMPs κυστιδίων και δραστηριότητα τους σε προϊόντα της APC (ερευνητικό)

Τα αποτελέσματα για PLT και τη συγκέντρωση των PMP SPUs και DPUs παρουσιάζονται στους Πίνακες (Δότες αίματος με συγκέντρωση πάνω PLT $230 \times 10^9 / L$ παρήγαγε DPUs με σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις PLT λόγω της επιμήκυνσης του χρόνου αιμοδοσίας και καλύτερη απόδοση συλλογής PLT. Η συγκέντρωση των PLT SPUs και DPUs ήταν σχεδόν ίσες. Συγκέντρωση PMP, ωστόσο, ήταν περισσότερο από τρεις φορές υψηλότερο σε SPUs, που αντιστοιχούν σε υψηλότερα ποσοστά συλλογής, και κατά συνέπεια προκαλείται υψηλότερες αποδόσεις PMP σε σύγκριση με SPUs DPUs. Τόσο η ELISA και η δοκιμασία πήξεως προπηκτική βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα MP σε σύγκριση με SPUs DPUs. Σε αντίθεση, τα ποσοστά συλλογής PLT ήταν σημαντικά υψηλότερες

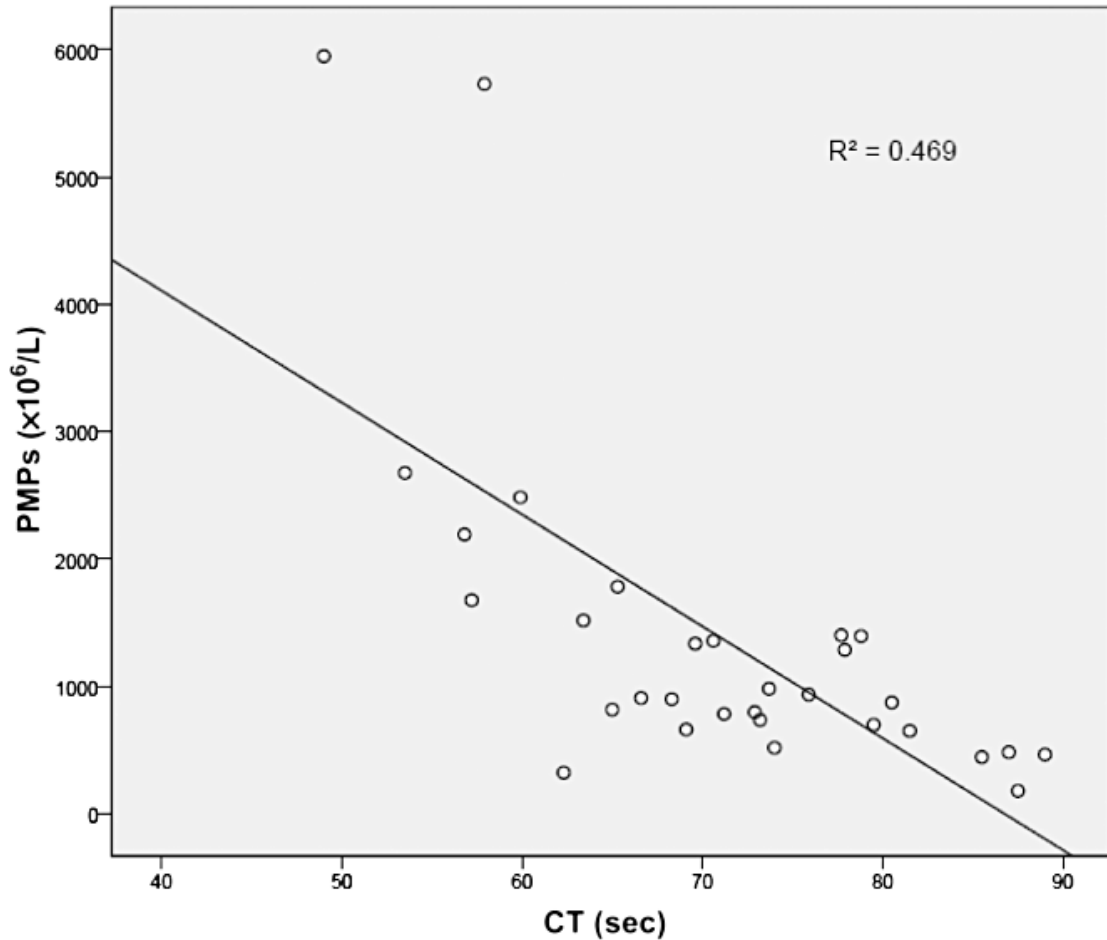
στην υποομάδα DPU. Αδύναμη αλλά σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ επεξεργασμένα όγκο αίματος (PBv) και PLT PMPs σε προϊόντα ($r = -0,42$, $\rho = 0,019$) και μεταξύ PBv και MP δραστικότητα αναλύθηκαν με ELISA ($r = -0.44$, $\rho = 0.014$), ή από το STA-Procoag-PPL δοκιμασία πήξεως ($r = 0.49$, $\rho = 0.005$). Η ACD-A όγκος είναι ένας άλλος παράγοντας υψηλή συσχέτιση με PBv ($r = 0.94$, $\rho < 0.001$). Κατά συνέπεια, ACD-A όγκου συσχετίζεται επίσης καλώς με PMPs σε προϊόντα, αναλύθηκαν με FCM ($r = -0,56$, $\rho = 0,007$), με ELISA ($r = -0.61$, $\rho = 0.002$), ή από το STA-Procoag-PPL πήξης δοκιμασίας ($r = 0.57$, $\rho = 0.004$). Σύντομος χρόνος επεξεργασίας και χαμηλή PBv στην αιμοπεταλιοφέρση φαίνεται να σχετίζεται με την υψηλότερη συγκέντρωση PMP και δράση MP σε APC[104].

6.2.6 Σύγκριση των τριών διαφορετικών μεθόδων για την ανίχνευση MPs

Η ανάλυση FCM Η PMP συγκρίθηκε με δραστικότητα MP μετρήθηκε με ELISA και μια προπηκτική ανίχνευση πήξεως, βαθμονομημένη για δοκιμή MP. Πρίν και μετά την αιμοδοσία των δοτών δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές για την PMP ή MP δραστηριότητα εκτός από τη σημαντική αύξηση της δραστικότητας MP (ELISA) στο υποσύνολο SPU. Όσον αφορά την PMP και MP δραστηριότητα, PLT προϊόντα, ωστόσο, διέφερε σημαντικά από τα δείγματα αίματος των δωρητών. Όλες οι τρεις δοκιμές για ανάλυση MP αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων αίματος του δότη και τα APCs. Αποτελέσματα της STA-Procoag-PPL δοκιμασίας πήξης για δραστικότητα των MPs συσχετίζεται με Η PMP λαμβάνεται με FCM ($r = -0,685$, $\rho < 0.001$) και επίσης η δράση των MPs μετρήθηκε με ELISA ($r = -0,641$, $\rho < 0,001$? Σχ. . 4 και 5). Αύξηση της περιεκτικότητας σε MPs και μειώνει την προπηκτική δραστηριότητα CT της STA-Procoag-PPL δοκιμασίας πήξης (βλέπε σχήματα. 4 και 5).



Σχήμα 4. Διάγραμμα διασποράς της MP δραστηριότητας (ELISA) και προπηκτικών CT. Το διάγραμμα διασποράς δείχνει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας MP που μετρήθηκε με ELISA και την πηκτική CT. Υψηλότερη περιεκτικότητα MP συσχετίστηκε με μικρότερη αξονική τομογραφία.[104]



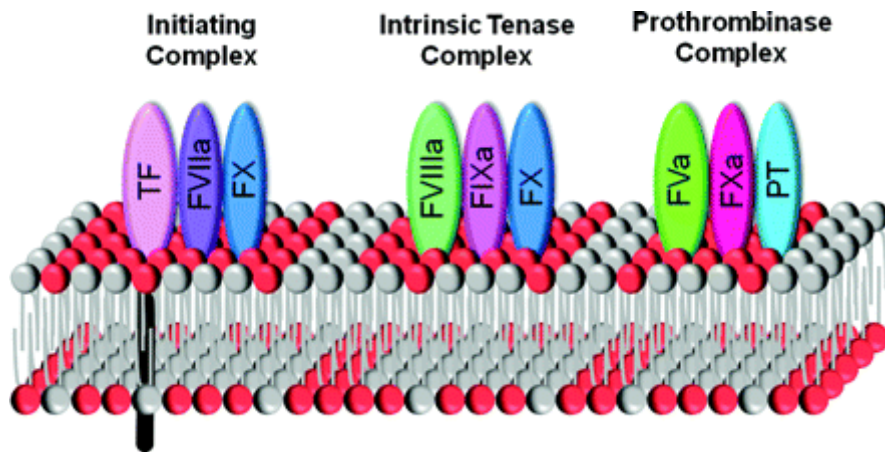
Σχήμα 5. Διάγραμμα διασποράς των Η PMP και προπηκτικών CT. Το διάγραμμα διασποράς δείχνει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ Η PMP και της προπηκτικής CT. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τον προηγούμενο αντίστροφο συσχετισμό μεταξύ της δραστηριότητας MP που μετρήθηκε με ELISA και το προπηκτικό CT υποδεικνύοντας ότι υψηλότερη συγκέντρωση PMPs συντομεύει επίσης την δοκιμασία πήξεως[104].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση και την θρόμβωση (Προθρομβωτικές - προπηκτικές Ιδιότητες των MPs).

7.1.1 Ο ρόλος του PS

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη των φυσιολογικών κυττάρων έχει ασύμμετρη κατανομή των λιπιδίων στην εσωτερική και την εξωτερική στιβάδα. Τα ανιονικά φωσφολιπίδια, όπως η PS, η οποία βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στην εσωτερική μονοστιβάδα. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των MPs παρατηρείται απώλεια της ασυμμετρίας της μεμβράνης με τα ιοντικά φωσφολιπίδια να μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη του MP[19]. Ουσιαστικά, η παρουσία του PS αυξάνει σημαντικά την προπηκτική-προθρομβωτική δραστηριότητα των MPs, διότι διευκολύνει τη συσσώρευση των συστατικών του καταρράκτη της πήξης. Αυτό οφείλεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικά φορτισμένων περιοχών του γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος (GLA) των πρωτεϊνών πήξης και της PS στην μεμβράνη. Στις πρωτεΐνες πήξης που περιέχουν περιοχές GLA περιλαμβάνονται οι παράγοντες VII (FVII), IX και X και η προθρομβίνη (Σχήμα 1). Η PS στην επιφάνεια των MPs μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια παράγουν PS+ MPs, αν και σε μία μελέτη βρέθηκαν τόσο PS+ MPs όσο και PS- MPs[107].



Συγκέντρωση των συμπλόκων πήξης σε PS + μεμβράνη φωσφολιπιδίων. Συμπλέγματα πήξης (TF: FVIIa, FVIIIa:FIXa και FVa:FXa) συγκεντρώνονται σε μια επιφάνεια της μεμβράνης. Η παρουσία των ανιοντικών φωσφολιπιδίων, όπως PS (κόκκινο), διευκολύνει την πρόσδεση του FVIIa, FIXa, FXa και της προθρομβίνης(PT) μέσω αλληλεπίδρασης με τους Gla τομείς εντός των πρωτεϊνών. Τα Φωσφολιπίδια που προέρχονται από την εξωτερική μεμβράνη πριν από τη διακοπή της μεμβράνης φαίνεται με γκρι χρώμα [107].

7.1.2 Ο ρόλος του TF

Ο TF είναι ένας υποδοχέας για τον FVII / VIIa (Σχήμα 1). Το σύμπλοκο TF: FVIIa ενεργοποιεί τόσο τον FX όσο και τον FIX για να ξεκινήσει η πήξη του αίματος[108]. Η παρουσία του TF στα MPs αυξάνει δραματικά την προπηκτική δραστηριότητα-δραστηριότητά τους. Ο TF εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον FVII /FVIIa, και επομένως τα TF+ MPs στο αίμα δεσμεύουν εύκολα τον FVII /FVIIa. Το σύμπλεγμα TF: FVIIa ρυθμίζεται από τον αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI)[109]. Αυτού του τύπου αναστολέας συντίθεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυκλοφορεί στο αίμα για να εμποδίζει τη μη κατάλληλη ενεργοποίηση του καταρράκτη[109]. Αναστέλλει το σύμπλοκο TF: FVIIa, μαζί με τον παράγοντα FXa. Συνεπώς, είναι πιθανό ορισμένα σύμπλοκα TF: FVIIa που υπάρχουν στα MPs του αίματος να απενεργοποιούνται από τον TFPI. Ορισμένες τροποποιήσεις του TF, όπως μετά τη γλυκοζυλίωση, μπορεί επίσης να επηρεάσουν την δραστηριότητά του[110,111]. Αυτό σημαίνει ότι τα TF+ MPs από διαφορετικές κυτταρικές πηγές μπορεί να έχουν διαφορετικές προπηκτικές δραστηριότητες. Επιπλέον, το σύμπλοκο TF: FVIIa μπορεί να βρεθεί σε συνθήκες χαμηλής (encrypted) και υψηλής δραστηριότητας, πράγμα που οφείλεται σε διαφορετική προσαρμογή του TF.[112] Αυτή η αύξηση στη δραστηριότητα του TF συνδέθηκε με μια αύξηση στην PS, η

οποία οδήγησε ορισμένους ερευνητές να προτείνουν ότι η PS μπορεί να προκαλέσει μια διαμορφωτική αλλαγή στον TF η οποία αυξάνει τη συγκεκριμένη δραστηριότητά του[112]. Έχουν προταθεί και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης του TF, και είναι πιθανό να υπάρχουν διαφορετικοί μηχανισμοί που να ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του TF: FVIIa στα MPs που προέρχονται από διαφορετικό τύπο κυττάρων[113]. Μερικοί ερευνητές αναφέρουν ότι τα MPs στο αίμα περιέχουν τον TF σε μια κατάσταση χαμηλής δραστηριότητας για την πρόληψη της ακούσιας ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα επίπεδα της PS στα MPs είναι χαμηλότερα από το βέλτιστο επίπεδο για την πλήρη δραστηριότητα του TF. Εάν αυτή η θεωρία είναι σωστή, η ψύξη των MPs θα αυξήσει τόσο τα επίπεδα της PS στην εξωτερική μεμβράνη όσο και τη δραστηριότητα του TF. Ωστόσο, η δραστηριότητα του TF των MPs που απομονώθηκαν από το πλάσμα των ασθενών που υποβάλλονται σε ολική αρθροπλαστική γόνατος, δεν αυξήθηκε με την θεραπεία με την ιονομυκίνη ή με την ψύξη [114].

Άλλη ομάδα, επίσης, δε βρήκε καμία διαφορά στη δραστηριότητα του TF σε φρέσκα έναντι των κατεψυγμένων MPs που απομονώθηκαν από υγιή άτομα και από καρκινικούς ασθενείς [115]. Επιπλέον, η ψύξη των MPs δεν αυξάνει τα επίπεδα της PS (προσωπικής επικοινωνίας). Επιλέχθηκαν MPs προερχόμενα από μονοκύτταρα του ανθρώπου ολικού αίματος που διεγέρθηκαν-ενεργοποιήθηκαν με βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Σύμφωνα με άλλες μελέτες, τα κατεψυγμένα MPs είχαν την ίδια δραστηριότητα του TF όπως και τα φρέσκα MPs (R. Lee και N. Mackman, αδημοσίευτα στοιχεία, 2011).

Συμπεράσματα:

Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο TF είναι πλήρως ενεργοποιημένος στα «πλυμένα» MPs και ότι τα επίπεδα της PS δεν είναι περιοριστικά.

7.1.3 Μεταφορά πρωτεϊνών, mRNA και microRNA στα κύτταρα στόχους

Γενικώς τα μικροκυτίδια ενσωματώνουν μία ποσότητα του κυτταροπλάσματος και επομένως κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, mRNA και microRNA (miRNA) κατά τη διάρκεια της απελευθέρωσής τους. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι συγκαλλιεργώντας διαφορετικά κύτταρα έχει επιπτώσεις στην μεταφορά μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών συστατικών ανάμεσα σε πληθυσμούς. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τα κύτταρα υποβάλλονται σε λειτουργικές και μοριακές αλλαγές, οι οποίες συχνά έχουν ως αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό των ενήλικων κυττάρων σε πολυδύναμα κύτταρα, μια διαδικασία γνωστή ως επιγενετικός ή πυρηνικός επαναπρογραμματισμός. Ωστόσο οι μηχανισμοί αυτοί χρίζουν περεταίρω διευκρίνισης, καθώς διάφορες ομάδες έχουν αναφέρει τη χρήση κυτταρικών συστατικών για τον επιγενετικό αναπρογραμματισμό κυττάρων στόχων. Τμήματα κυττάρων, όχι μόνο από τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ή τα πολυδύναμα καρκινικά κύτταρα, αλλά επίσης και από διαφοροποιημένα κύτταρα όπως τα κύτταρα του μυοκαρδίου, έχει βρεθεί ότι μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα. Επίσης, διαπερατοί ινοβλάστες άρχισαν να εκφράζουν ποικιλία γονιδίων χαρακτηριστικών για τα λεμφοκύτταρα, μετά από έκθεσή τους σε τμήματα από κύτταρα της λέμφου [54].

Με εξαίρεση μερικές εκθέσεις για την μεταφορά miRNA από τα μικροκυτίδια και τα εξωσώματα, έρευνες περιγράφουν μια επακόλουθη φαινοτυπική αλλαγή στα κύτταρα παραλήπτες, όπως περιγράφεται παρακάτω στο τμήμα που αφορά τα μικροκυτίδια στην επεμβατική ανάπτυξη και μετάσταση. Σε αυτή την περίπτωση η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης είναι σπάνια. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο μικροκυτιδίων που προέρχονται από ποντίκια, πρόσφατα εμφανίστηκε ότι τα μικροκυτίδια μπορεί όντως να συνεισφέρουν στον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό των κυττάρων στόχων. Προσθήκη... μικροκυτιδίων βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση και την επέκταση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων του ποντικού και των προγονικών κυττάρων και

αυξορύθμισε την έκφραση των δεικτών για τα πρόωρα πολυδύναμα και αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα. Τα μικροκυστίδια προκάλεσαν επίσης φωσφορυλίωση του και της σερίνης-θρεονίνης κινάσης AKT. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι τα μικροκυστίδια ήταν εμπλουτισμένα με mRNA ποικιλίας πολυδύναμων παραγόντων μεταγραφής σε σχέση με τα γονικά κύτταρα και αυτό το mRNA μπορούσε να μεταφερθεί σε κύτταρα στόχους και να μεταφραστεί στις αντίστοιχες πρωτεΐνες [54].

7.2 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στη εξέλιξη και τη διάγνωση του καρκίνου

Ο σύνθετος ρόλος των κυστιδίων σε ασθένεια μπορεί να περιγραφεί πολύ καλά από την πιο καλά μελετημένη ασθένεια για αυτό το θέμα, τον καρκίνο. Όπως και σε άλλες ασθένειες ο κύριος ρόλος των μικροκυστιδίων που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα φαίνεται να είναι ότι καθορίζουν την εξέλιξη της ασθένειας σαν να είναι από μόνα τους η κύρια αιτία της ίδιας της ασθένειας. Τα μικροκυστίδια από καρκινικά κύτταρα, διευκολύνουν την εξέλιξη του καρκίνου με πολλούς διαφορετικούς τρόπους. Στον καρκίνο, τα ογκογόνα μονοπάτια καθορίζουν την παραγωγή των MPs και οι ογκοπρωτεΐνες μπορούν να ενσωματώνονται μέσα στο φορτίο των MPs (oncosomes). Τα ογκογόνα μονοπάτια μπορεί επίσης να διεγείρουν την παραγωγή των MPs φέροντας τον ιστικό παράγοντα και συμβάλλοντας στην καρκινική διαταραχή της πήξης. Επιπροσθέτως, το φορτίο των MPs μπορεί να περιλαμβάνει διάφορους υποδοχείς, αντιγόνα, βιοδραστικά μόρια και άλλα είδη ικανά να διεγείρουν την ανάπτυξη του όγκου, την ανοσοανοχή, εισβολή, αγγειογένεση και μετάσταση. Τα MPs προέρχονται όχι μόνο από τα κύτταρα του όγκου, αλλά και από αιμοπετάλια, ενδοθήλιο και από φλεγμονώδη κύτταρα. Μάλιστα, τα κυκλοφορούντα MPs περιέχουν μοριακές πληροφορίες που σχετίζονται με τις καρκινικές διαδικασίες και μπορεί να χρησιμεύσουν ως δεξαμενή προγνωστικών και προβλεπτικών βιοδεικτών για την παρακολούθηση της γενετικής εξέλιξης του όγκου, της αγγειογένεσης, θρόμβωσης και αποκρίσης σε

στοχευμένες θεραπείες [116]. Ο ρόλος τους αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο στον καρκίνο, και ιδιαίτερα σε κάθε πτυχή της νόσου, όπως στη διαταραχή της πήξης στον καρκίνο [117-121], στην ενεργοποίηση παραγωγής στρώματος [122] στην ανάπτυξη του όγκου [123], εγκατάσταση των βλαστικών κυττάρων [124], στην εισβολή, αγγειογένεση [125,126,128,] μετάσταση-61 και την ανοσοποιητική απόκριση [130,131,127,133,134]. Επιπλέον, οι ξεχωριστές μοριακές ιδιότητες των MPs που βρίσκονται στην κυκλοφορία και στα υγρά του σώματος των ασθενών με καρκίνο, τα καθιστούν δυνητικά χρήσιμα ως μία νέα και μοναδική πηγή πληροφοριών σχετικών με τη νόσο [131-133]. Αν και αυτή η περιοχή εξακολουθεί να διερευνάται (π.χ., ως πηγή βιοδεικτών), μία σημαντική ζήτηση για τέτοιους δείκτες αντικατοπτρίζει τη φυσική πολυπλοκότητα που υφίσταται-υπάρχει όσον αφορά την εξατομικευμένη φροντίδα των ασθενών, την ακριβή μοριακή διάγνωση και την παρακολούθηση των επιπτώσεων των στοχευμένων θεραπειών.

Τα κρίσιμα ερωτήματα που ίσως θα πρέπει να αντιμετωπιστούν, πριν τα MPs γίνουν πλήρως κατανοητά και να χρησιμοποιηθούν, είναι εκείνα γύρω από την βιογένεσή τους, τους βιολογικούς τους ρόλους και την λειτουργική εμπλοκή τους στην παθογένεση του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό, οι βιολογικές λειτουργίες εκτελούνται από ομάδες κυττάρων των οποίων οι δράσεις πρέπει να συντονίζονται από την ενδοκυτταρική επικοινωνία. Σύμφωνα με αυτή την άποψη, η ανταλλαγή των σημάτων συνήθως αποδίδεται σε ειδικά μόρια και τους αντίστοιχους (συγγενείς) υποδοχείς. Αυτή η ανταλλαγή πληροφοριών μπορεί να είναι με μια άμεση επαφή ή με απελευθέρωση μεσολαβητών, οι οποίοι μπορεί επίσης να κυκλοφορούν στο αίμα και τα υγρά του σώματος και να δρουν τοπικά ή συστηματικά. Τέτοιες πληροφορίες ενεργοποιούν ενδοκυττάρια δίκτυα σηματοδότησης [135]. είτε προς μία είτε προς δύο κατευθύνσεις [136], αλλάζοντας έτσι την κυτταρική συμπεριφορά. Επιπρόσθετα σε αυτές τις διεργασίες, άμεση πρόσληψη παραγόντων, ενζύμων και σωματιδίων έχει επίσης περιγραφεί σε αρκετές περιπτώσεις και έχει βρεθεί ότι προκαλούν αναδιατάξεις του ενδοκυτταρίου μηχανισμού [137,138].

7.3 Ενδοκυττάρια επικοινωνία

Σχετικά με την επικοινωνία. Τα κυστίδια από καρκινικά κύτταρα μπορεί να καταστείλουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Συμπληρωματικά λοιπόν η ανταλλαγή ενός υποδοχέα ογκογενετικού αυξητικού παράγοντα ανάμεσα σε κύτταρα γλοιοβλαστικά γίνεται με τη μεσολάβηση εξωσωμάτων. Επιπλέον κυστίδια προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα περιέχουν αγγειογεννητικούς παράγοντες όπως ο VEGF, ο οποίος προωθεί την αγγειογένεση και έτσι την ανάπτυξη του καρκίνου. Σχετικά με την προστασία, τα κυστίδια καρκινικής προέλευσης περιέχουν αυξημένα επίπεδα χημειοθεραπευτικών ή μεταβολιτών τους, συμβάλλοντας έτσι στην αντίσταση στα φάρμακα. Σε σχέση με την ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας, τα γλοιοβλαστικά κύτταρα είναι ικανά να απελευθερώνουν εξωσώματα που περιέχουν mRNA. Αυτό το mRNA παρελήφθη και εκφράστηκε από μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία έγιναν πρηνή για να διευκολύνουν την επιπλέον ογκογένεση. Έτσι λοιπόν η διακυτταρική ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας από μικροκυστίδια προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα μπορεί να προάγει την εξέλιξη του όγκου.[116]

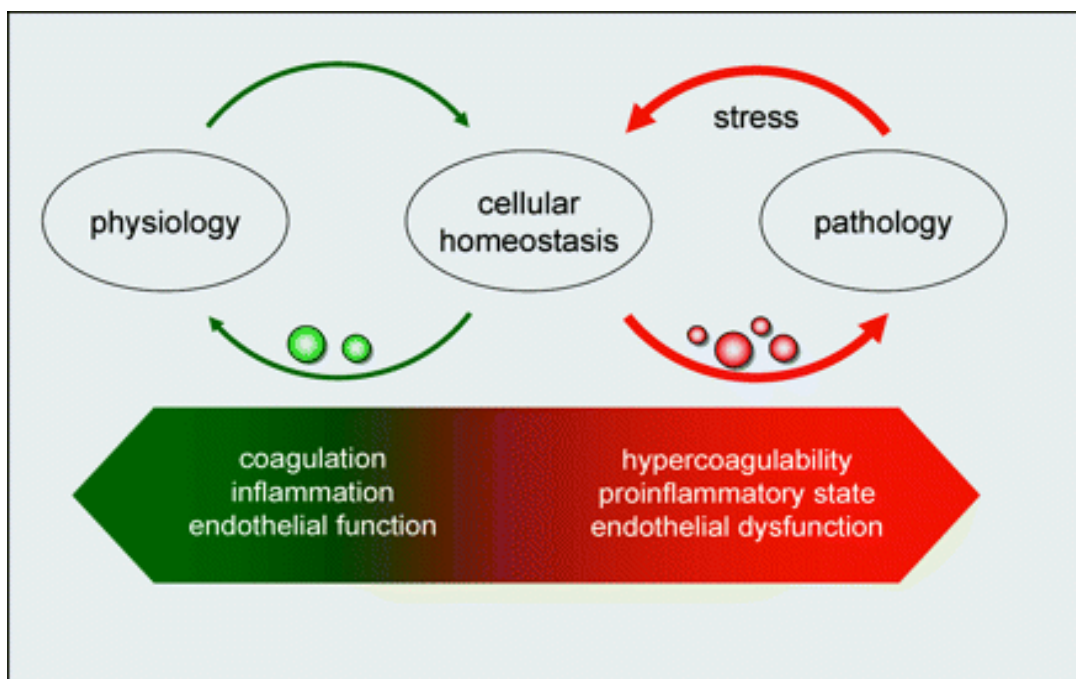
Συμπεράσματα

Συμπεραίνεται λοιπόν πως η παρουσία των μοναδικών μικροκυστιδίων και εξωσωμάτων καρκινικής προέλευσης ή τα μηνύματα τα οποία εμπεριέχονται σε τέτοιου είδους κυστίδια, μπορούν να μας προσφέρουν νέες δυνατότητες κυρίως όσον αφορά τη διάγνωση του καρκίνου.[116]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

8.1 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στις καρδιαγγειακές νόσους

Σε πολλές έρευνες κυριαρχεί η άποψη πως τα μικροκυστίδια που κυκλοφορούν είναι επιβλαβή, συμβάλλοντας στην CVD και τον κίνδυνο της καρδιαγγειακής νόσου [139]. Ωστόσο εκτός από τις δυνητικά επιβλαβείς επιδράσεις τους, κύτταρα που προέρχονται από μικροσωματίδια μπορούν επίσης να είναι ευεργετικά για την προστασία ενάντια στην κυτταρική και την αγγειακή βλάβη. Αυτό συνοψίζεται στην εικόνα. Ως εκ τούτου, δεν είναι έκπληξη το γεγονός ότι και τα αυξημένα αλλά και τα χαμηλότερα επίπεδα των κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων έχουν συσχετιστεί με (παράγοντες κινδύνου) CVD[2]. Για παράδειγμα, το κάπνισμα είναι ένας καθιερωμένος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο και έχει αναφερθεί ότι οδηγεί σε αιμοστατικές, αιμοπεταλιακές και ενδοθηλιακές ανωμαλίες. Αν και οι αριθμοί των αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων έτειναν να είναι χαμηλότεροι σε νέους άνδρες σε σύγκριση με τους μη καπνίζοντες μάρτυρες, τα επίπεδα κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών μικροσωματιδίων ήταν αυξημένα σε παθητικούς καπνιστές, και η έκθεση των ανθρώπινων μονοκυττάρων σε καπνό αύξησε την απελευθέρωση (TF-εκθέτοντας) μικροκυστιδίων. Είναι σαφές ότι το κάπνισμα επηρεάζει την απελευθέρωση των μικροσωματιδίων. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό είναι πιθανό να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, τη συγκέντρωση και τη διάρκεια έκθεσης [139].



Εικόνα 2 (Προτεινόμενο μοντέλο που περιγράφει τον ρόλο των μικροκυστιδίων στην καρδιαγγειακή υγεία και την ασθένεια. Τα κύτταρα απελευθερώνουν μικροκυστιδία (αριστερά, πράσινο) για να εξασφαλίσει την ομοιόσταση. Αυτά τα μικροκυστιδία συμβάλλουν στην ρύθμιση των φυσιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένων της (αντι)πήξης, της φλεγμονής, και της ρύθμισης των ενδοθηλιακών λειτουργιών. Υπό φυσιολογικές (στρες) συνθήκες, τα κύτταρα απελευθερώνουν μικροκυστιδία που διαφέρουν στον αριθμό, τη σύνθεση και τη λειτουργία (δεξιά, κόκκινο), συμβάλλοντας έτσι σε μια δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, ως μέρος της εξέλιξης της καρδιαγγειακής νόσου).

ΠΗΓΗ Maarten E. Tushuizen, Michaela Diamant, Auguste Sturk, Rienk Nieuwland. Cell-Derived Microparticles in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011; 31: 4-9 [139]

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, αυξημένα αιμοπεταλιακά μικροκυστιδία αναφέρονται σε ασθενείς με τύπου 1 και 2 διαβήτη, υπερλιπιδαιμία, παχυσαρκία / μεταβολικό σύνδρομο, και υπέρταση. Έτσι, βρέθηκε ότι σε δείγματα πλάσματος από ασθενείς με χρόνια σοβαρή υπέρταση σε σύγκριση με τους ασθενείς με ήπια υπέρταση και τους ελέγχους, εκτίθενται περισσότερα μικροσωματίδια αιμοπεταλίων/ενδοθηλιακών κυττάρων. Σε αυτούς τους ασθενείς, οι αυξημένοι αριθμοί των μικροκυστιδίων είναι πιθανόν να αντικατοπτρίζουν την κυτταρικό στρες των ενδοθηλιακών κυττάρων και αιμοπεταλίων. Επιπρόσθετα, μικροκυστιδία από το πλάσμα των υπέρτασικών ασθενών με εξασθενημένο πολλαπλασιασμό, λευκωματουρία και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων και αυξημένη την ενδοθηλιακή παραγωγή υπεροξειδίου του

υδρογόνου, την κυτταρική γήρανση, και την απόπτωση μικροκυστιδίων σε σύγκριση με υπερτασικούς ασθενείς με νορμολευκωματινουρία. Αυτό υποδηλώνει ότι η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων συμβάλλει στην εξέλιξη της βλάβης του ενδοθηλίου, η οποία θα μπορούσε στη συνέχεια να οδηγήσει σε ένα φαύλο κύκλο. Έχουν υψηλούς αριθμούς κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων διαφορετικής κυτταρικής προέλευσης, που έχουν συσχετιστεί με υποκλινική αθηροσκλήρωση, που μετράται με το πάχος της έσω-μέσω καρωτίδας και τις αποτιτανώσεις της στεφανιαίας αρτηρίας, ποσοτικά με αξονική τομογραφία. Πρόσφατα, προτάθηκε ότι τα κυκλοφορούντα μικροκυστίδια είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που συνδέεται με την αναδιαμόρφωση της καρωτιδικής αρτηρίας, με υψηλό αριθμό κυκλοφορούντων μικροκυστιδίων προλαμβάνεται η αντισταθμιστική αναδιαμόρφωση σε σκάφη με αυξημένο πάχος του έσω-μέσου χιτώνα της καρωτίδας. Επιπροσθέτως, ενδοθηλιακά μικροκυστίδια που εκθέτουν T-cadherin ήταν αυξημένα σε ασθενείς με υποκλινική αθηροσκλήρωση σε σύγκριση με υγιή άτομα και σε ασθενείς με εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η απόπτωση των T-cadherin-θετικών μικροκυστιδίων αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό που μπορεί να μετατοπίσει την ισορροπία στην κυτταρική αντίδραση, στο στρες των prosurvival συστημάτων σηματοδότησης, που μόνο αργότερα ακολούθησε επιβλαβείς και αποπτωτικές φάσεις. Αυτό δείχνει ότι η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων εξασθενεί την αναδιαμόρφωση της έξω αρτηρίας σε ασθενείς με (υποκλινική) αθηροσκλήρωση. Ωστόσο απαιτούνται μελέτες για να αποδειχθεί οριστικά ο αιτιολογικός ρόλος των μικροκυστιδίων στην αρτηριακή αναδιαμόρφωση [139].

Ένα σημαντικό κλινικό ερώτημα είναι αν τα μικροκυστίδια είναι δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου και αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της έκβασης CVD σε σημαντικούς πληθυσμούς. Πρόσφατα αναφέρθηκαν στους αριθμούς των αιμοπεταλιακών, λευκοκυτταρικών, ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων μικροσωματιδίων. Από τις 4 μελέτες, μόνο η πρώτη περιλαμβάνεται μια προοπτική έρευνας, στην οποία 488 ασθενείς με διάφορους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα παρατηρήθηκαν

κατά μέσο όρο 36 μηνών. Η προσθήκη των ενδοθηλιακών (CD144 +) μικροκυστιδίων στο μοντέλο κινδύνου Framingham βελτίωσε την κατάταξη του κινδύνου και εμφανίστηκε ως ένας σημαντικός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μελλοντικά γεγονότα CVD σε πληθυσμό υψηλού κινδύνου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά και υποδηλώνουν ότι οι περισσότερες προοπτικές μελέτες είναι απαραίτητες για την περαιτέρω λεπτομέρεια στην προγνωστική αξία των μικροκυστιδίων που προέρχονται από κύτταρα σε άτομα που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για καρδιαγγειακή νόσο. Η έλλειψη μεγάλου εύρους μελετών, στις οποίες μικροσωματίδια μετρώνται συνήθως μπορεί να είναι εν μέρει λόγω του γεγονότος ότι η μέτρηση των μικροκυστιδίων εξακολουθεί να είναι περίπλοκη και περίτεχνη. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός (ατομικά) μικροκυστιδίων και άλλα κυστιδίων παραμένει δύσκολη λόγω του μικρού μεγέθους και της ετερογένειας τους, η οποία έχει οδηγήσει σε σύγχυση και μερικές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ εργαστηριακών ομάδων[3-5]. Επιπλέον, η ανίχνευση των σπάνιων μικροκυστιδίων (π.χ., ενδοθηλιακά μικροκυστίδια) παραμένει μια πραγματική πρόκληση [139].

8.2 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην αθηρογένεση

Τα μικροκυστίδια είναι σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο [14,85]. Μολονότι ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων φαίνεται να είναι μία παθητική απόπτωση των μικροκυστιδίων μεμβράνης από δυσλειτουργικά ECs, μπορούν να αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά δυνητικό κλινικά μονοπάτι που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των διαφόρων φυσιολογικών διεργασιών επανόρθωσης. Για παράδειγμα, η πειραματική μυϊκή ισχαιμία προκαλεί μια εντατική παραγωγή των αποπτωτικών annexin V + μικροκυστιδίων από τα ECs [86]. Μικροκυστίδια απομονώθηκαν από ισχαιμικούς μύες επάγοντας μια πιο ισχυρή διαφοροποίηση του μυελού των οστών μονοκύτταρων κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα που μοιάζουν με μικροκυστίδια από μη ισχαιμικά άκρα [86]. Κυστίδια από απόπτωση των ECs και τα ECs που ενεργοποιούνται από φλεγμονώδεις παράγοντες

επιταχύνουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών (μονοπύρηννα) και την ενίσχυση των ικανοτήτων τους στην αγγειογενετική *in vivo* [86]. Ωστόσο, ο Koga και οι συνεργάτες [12] έχουν δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα των μικροκυστιδίων είναι καλοί προγνωστικοί παράγοντες για CAD, ακόμα πιο ισχυροί σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου. Αυτή η απόκλιση μπορεί είτε να πηγάζει από την αδυναμία της MP-μεσολαβούμενης αγγειογένεσης να ισορροπήσει επαρκώς προοδευτική ισχαιμία και / ή την παρουσία άλλων σήμερα άγνωστων μηχανισμούς που συνδέουν την υπερβολική εκβλάστηση της ECS και την αθηρογένεση.

Ωστόσο, τα μικροκυστίδια μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει να είναι υπεύθυνα για την προθρομβωτική κατάσταση που συνδέεται με το CAD. Πράγματι, τα μικροκυστίδια ενεργά απελευθερώνονται από δυσλειτουργικά αιμοπετάλια δεσμεύονται από το ενδοθήλιο και προωθούν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με στεφανιαία αθηροσκλήρωση [87]. Επιπλέον, οι τοπικές ενδοθηλιακές βλάβες κατά τη διάρκεια των διαδερμικών παρεμβάσεων σχετίζονται με την προσωρινή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και συνοδεύονται από άμεση (μέσα σε περίπου 15 λεπτά) αποβολή PMPs, ιδιαίτερα σε εκείνους που υποβάλλονται σε χειρουργία στεφανιαίων [88]. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα ακόμη και παρά τη βέλτιστη αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία και την έλλειψη των κλασικών δεικτών ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (π.χ. κανονική διαλυτή P-σελεκτίνη επίπεδα) [88]. Σημειώνεται πως κατά τη διάρκεια του σχηματισμού PMP σε στεφανιαία χειρουργία φαίνεται να διαμεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από αιμοπεταλιακούς GPIIb / IIIa υποδοχείς και από έγχυση των αναστολέων των αιμοπεταλιακών GPIIb / IIIa υποδοχέων και εμποδίζει την απελευθέρωση PMP. Η συστημική φύση της αθηροσκλήρωσης αντικατοπτρίζεται στις MP-διαταραχές που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με διαφορετική θέση πλάκας. Οι ασθενείς με καρωτιδικές πλάκες έχουν υψηλότερα επίπεδα των μεγάλων PMPs από άτομα χωρίς καρωτιδική αθηροσκλήρωση, ακόμη και μετά τις προσαρμογές για τους παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου [89]. Τα υψηλά επίπεδα CD11a + και CD105 + μικροκυστιδίων συνδέθηκαν με εσωτερική καρωτιδική αναδιαμόρφωση σε

άτομα με τη μεγαλύτερη έσω-μέσου πάχους, ακόμη και πριν από την αθηροσκλήρωση ήταν ανιχνεύσιμα [90]. Επίπεδα PMPs συσχετίζονται σημαντικά τόσο με έσω-μέσου πάχους και παρουσίας ενδοκράνιας στένωσης, αλλά δεν μπορεί να προβλέφθει υποκλινική επιβάρυνση της αθηροσκλήρωσης σε ασυμπτωματικά άτομα [91, 92]. Η απόπτωση των PMPs επίσης ενισχύεται σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο, μετά από μία στενού βαθμού αιμοπεταλιακή υπεραντιδραστικότητα [85, 93]. Σε ασθενείς με αρτηριακή αποφρακτική αρτηριοσκληρωτική, τα PMPs αυξάνονται περαιτέρω από αγγειοχειρουργική παράλληλα με τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-6) [94]. Μικροκυστίδια παράγονται επίσης εντός αθηρωματικών πλάκων, κατά κύριο λόγο από τα κύτταρα λευκοκυτταρικής προέλευσης [95]. Η παρουσία των ανοσοσφαιρινών έγκλειστων μέσα σε πλάκα που περιέχουν μικροκυστίδια υποδηλώνει δυνατότητες για ανοσοτροποποιητικό ρόλο τους. Η συντριπτική πλειοψηφία (> 90%) των μικροκυστιδίων που περιέχουν ανοσοσφαιρίνη G είναι CD14+ και δείχνει την μονοκυττάρικη \ μακροφαγική καταγωγή τους [95]. Παρά το γεγονός ότι οι λεπτομερείς βιολογικοί ρόλοι της πλάκας από όπου προέρχονται τα κυστίδια είναι ελάχιστα κατανοητή και μπορούν ίσως να χρησιμεύσουν ως ρυθμιστικοί αγγελιοφόροι που συμμετέχουν στην ενορχήστρωση των ανοσοποιητικών / φλεγμονωδών αποκρίσεων σε μία αθηρωματική πλάκα. Επιπλέον, τα μικροκυστίδια που απομονώνονται από τις ανθρώπινες αθηρωματικές αλλοιώσεις εκφράζουν το CD40 συνδέτη, ενεργοποίηση ECs και εμφανίζονται για την τόνωση της ενδο-πλάκα νεοαγγείωσης, την εξέλιξη της πλάκας και της αποσταθεροποίησής της [96]. Επιπλέον, ορισμένα είδη κυστιδίων μπορούν να προωθήσουν την αγγειακή φλεγμονή και την έκφραση των φλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ. TNF-α) από τα ECs [97]. Είναι σημαντικό ότι, ακόμη και σταθερές ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές πλάκες παράγονται μικροκυστίδια μεμβράνης με προπηκτικό δυναμικό (κυρίως της μονοκυτταρικής και λεμφοκυτταρικής καταγωγής) κατά τη διαδικασία της απόπτωσης [98]. Ωστόσο, αν και τα μικροκυστίδια είναι πιθανό να διευκολύνουν την αθηρογένεση και

προθρομβωτική κατάσταση, τα περισσότερα δεδομένα δείχνουν πως είναι απολύτως απαραίτητα για τη δημιουργία παθοφυσιολογιών.

8.3 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων στις φλεγμονές

Παρόμοια με την πήξη, φλεγμονώδεις διεργασίες συμβάλλουν στην παθογένεση της αγγειακής αθηροθρομβωτικής ασθένειας[26]. ασθενείς με αυξημένα επίπεδα πλάσματος των δεικτών φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης, είναι σε υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης CVD, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με διαβήτη, το μεταβολικό σύνδρομο, και χρόνια συστηματικής φλεγμονώδους ή αυτοάνοσης νόσου (π.χ., ρευματοειδή αρθρίτιδα) [26, 27]. μικροσωματίδια μπορούν να συμβάλουν σε φλεγμονώδεις αποκρίσεις με διάφορους μηχανισμούς[3,5]. Για παράδειγμα, μικροσωματίδια από λευκοκύτταρα διεγείρουν την έκφραση των προφλεγμονωδών γονιδίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα, που οδηγεί στην παραγωγή των κυτοκινών και λευκοκυτταρικών-ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης κυττάρου *in vitro*. [28] Εξάλλου, μικροσωματίδια σε δείγματα πλάσματος από ασθενείς υψηλού κινδύνου εκθέτουν συστατικά του συμπληρώματος (C1q, C3 και C4) και αρκετά μόρια ενεργοποιητών (π.χ., C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και IgG (αλλά όχι C-αντιδρώσα πρωτεΐνη) σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου[29, 30]. Αλλά και πάλι, μικροσωματίδια μπορούν επίσης να έχουν μια ευεργετική λειτουργία στη φλεγμονώδη απόκριση. Μικροσωματίδια από πολυμορφοπύρηνα λευκοκύτταρα περιέχουν την λειτουργικά ενεργό αντι-φλεγμονώδη πρωτεΐνη Annexin 1, Annexin 1 περιέχουν και τα μικροκυστίδια που αναστέλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των λευκοκυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και σε ένα ζωικό μοντέλο *in vivo*[31]. Ως εκ τούτου, στην υγεία, μικροσωματίδια μπορούν να επηρεάσουν τόσο προφλεγμονώδεις και αντι-φλεγμονώδεις διεργασίες, εξασφαλίζοντας έτσι την κατάλληλη φλεγμονώδη απόκριση. Σε νόσους όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή αθηροσκλήρωση, αυξημένη και παρατεταμένη παρουσία τους, αλλοιωμένες

ιδιότητες και οι δραστηριότητες τους μπορούν να καταστούν επιβλαβείς και συμβάλλουν στη συνολική αγγειακή αλλοίωση[31].

Ασθένειες	Τύποι κυστιδίων	Αλλοιώσεις των εξωκυτταρικών κυστιδίων	Πηγές
Αυτοάνοσα νοσήματα			
Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος	<i>pMVs και eMVs</i>	Αυξημένα επίπεδα των <i>pMVs</i> και <i>eMVs</i> στο πλάσμα του αίματος	[93]
Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο	<i>pMVs και eMVs</i>	Αυξημένα επίπεδα των <i>eMVs</i> και <i>pMVs</i> στο πλάσμα του αίματος	[93]
Η ρευματοειδής αρθρίτιδα	<i>pMVs</i>	Αυξημένα επίπεδα των <i>pMVs</i> στο πλάσμα του αίματος, αυξημένα επίπεδα της ανεξίτης <i>MVs V</i> και <i>pMVs</i> στο αρθρικό υγρό	[93]
Συστηματική σκλήρυνση	<i>pMVs, eMVs και IMVs</i>	Αυξημένα επίπεδα των <i>eMVs, pMVs</i> και <i>IMVs</i> στο πλάσμα του αίματος	[93]
Αγγειίτιδα	<i>pMVs, eMVs και IMVs</i>	Αύξηση του αριθμού των <i>pMVs</i> και <i>IMVs</i> σε οξεία αγγειίτιδα και αύξηση του αριθμού των <i>pMVs</i> και <i>eMVs</i> σε συστηματική αγγειίτιδα	[93]
Σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1	<i>pMVs, eMVs</i>	Αύξηση του αριθμού των <i>eMVs</i> και <i>pMVs</i> , αυξημένη ολική <i>MV</i> προπηκτική δραστηριότητα	[93]
Σκλήρυνση κατά πλάκας	<i>pMVs, eMVs</i>	Αυξημένα επίπεδα των <i>pMVs</i> και αυξημένα επίπεδα <i>eMVs</i> κατά τη διάρκεια της έξαρσης	[93]
Καρδιαγγειακά νοσήματα			
Οξύ στεφανιαίο σύνδρομο	<i>pMVs, eMVs</i>	Τα υψηλά επίπεδα των προπηκτικών και <i>eMVs pMVs</i> είναι παρόντα στο κυκλοφορούν αίμα των ασθενών. Υψηλό επίπεδο <i>eMV</i> συνδέθηκε με υψηλού κινδύνου αγγειογραφικές	[93]

		βλάβες σε ασθενείς με οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Επίπεδα eMVs μπορεί να προβλέψουν μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάντων σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	
Υπέρταση	eMVs, pMVs	Επίπεδα eMVs και pMVs συσχετίζονται με την πίεση του αίματος. Υπερτασικοί ασθενείς με μικρολευκωματινουρία έχουν υψηλότερα επίπεδα eMVs σε σύγκριση με υπερτασικούς ασθενείς χωρίς μικρολευκωματινουρία	[93]
Πνευμονική υπέρταση	pMVs, eMVs, IMVs	Τα eMVs προβλέπουν τη σοβαρότητα της πνευμονικής υπέρτασης. Αυξημένα επίπεδα των eMVs, pMVs, και IMVs προβλέπουν αγγειακή φλεγμονή και υπερπηκτικότητα	[93]
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια	eMVs	Τα αποπτωτικά eMVs είναι αυξημένα σε ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Επιπλέον, τα επίπεδα των eMVs συσχετίζονται με NYHA λειτουργικές κατηγορίες. Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση καρδιάς λόγω καρδιακής ανεπάρκειας δείχνουν αλλαγμένους φαινότυπους των eMVs	[93]
Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) και φλεβική θρομβοεμβολή	eMVs, pMVs	Τα pMVs και eMVs είναι αυξημένα σε ασθενείς με DVT. Συνολικός αριθμός MVs μπορεί να χρησιμεύσει ως νέος δείκτης για την DVT. Κυκλοφορούν αυξημένα MVs και pMVs σε ασθενείς με	ε29

		οξεία πνευμονική εμβολή	
Νόσου Buerger	pMVs	Τα pMVs είναι δείκτες της έξαρσης	[93]
Αθηροσκλήρωση	IMVs, pMVs	CD11 θετική δοκιμασία IMVs μπορεί να προβλέψει υποκλινική αθηροσκλήρωση. Τα pMVs είναι αυξημένα σε άτομα με αθηροσκλήρωση	[93]
Αγγειακό εγκεφαλικό διαταραχές	pMVs, eMVs, IMVs και erythrocyte MVs	Τα pMVs είναι αυξημένα σε παροδικά ισχαιμικά επεισόδια, lacunar έμφρακτα και πολυεμφρακτική άνοιες. pMVs, eMVs, IMVs και των ερυθροκυττάρων MVs είναι αυξημένα σε ασθενείς με υπαραχνοειδή αιμορραγία και είναι δείκτες του αγγειοσπασμού. Που κυκλοφορεί eMV φαινοτυπική προφίλ αντικατοπτρίζουν ιδιαίτερες φαινότυπους των αγγειακή εγκεφαλική νόσο	[93]
Αιματολογικές ασθένειες			
Παροξυσμική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία	eMVs	Αυξημένα επίπεδα των eMVs	[93]
Δρεπανοκυτταρική αναιμία	eMVs, pMVs, erythrocyte-MVs,	Αυξημένα επίπεδα των συνολικών MVs, eMVs, pMVs και των ερυθροκυτταρικών MVs, ιδιαίτερα σε δρεπανοκυτταρική κρίση κυτταρική	[93]
Ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα (ITP)	pMVs	pMVs είναι αυξημένα σε ασθενείς με οξεία ITP και μειώνεται σε χρόνιες ITP	[93]
Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα	eMVs	Αυξημένα επίπεδα των eMVs	[93]
Καρκίνος			
Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα	Εξωσώματα	Αυξημένα επίπεδα των εξωσωμάτων και miRNA στο	[93]

		πλάσμα του αίματος των ασθενών.	
Γλοιοβλάστωμα	Προερχόμενα από τον όγκο εξωσώματα	Ανιχνεύονται εξωσώματα στον ορό από ασθενείς	[93]
Ο καρκίνος των ωοθηκών	Προερχόμενα από τον όγκο εξωσώματα	Εξωσωμικό miRNA από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών εμφάνισε διακριτά προφίλ σε σύγκριση με ασθενείς με καλοήγη νόσο	[93]
Ο καρκίνος του προστάτη	Προερχόμενα από τον όγκο εξωσώματα στο αίμα και τα ούρα	Ανίχνευση όγκο-ειδικών exosomes στο αίμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν δοκιμή διαλογής. Ακράτεια exosomes περιέχουν βιοδείκτες για τον καρκίνο του προστάτη	[93]
Καρκίνος του παχέος εντέρου	Προερχόμενα από τον όγκο εξωσώματα	Ανίχνευση όγκο-ειδικών εξωσωμάτων στο αίμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια δοκιμή διαλογής	[93]
Γαστρικός καρκίνος	pMVs	pMVs είναι εμφανώς αυξημένα σε ασθενείς με νόσο σταδίου IV και μπορεί να είναι χρήσιμα για τον εντοπισμό μεταστατικών γαστρικών ασθενών.	[93]
Μελάνωμα	Εξωσώματα	Αυξημένα CD63 και caveolin 1 στα εξωσώματα	[93]
Καρκίνος του στόματος	Εξωσώματα	Οι οροί των ασθενών με ενεργό πλακώδες καρκίνωμα στόματος περιέχουν FasL και εξωσώματα	[93]
Καρκίνος συνδεδεμένων θρόμβωση	TF ⁺ MVs	Οι TF Mv είναι αυξημένα σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνωμα, πολλαπλό μυέλωμα, του μαστού και αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος	[93]
Άλλες ασθένειες			
Νόσου του	pMVs	pMVs φέρουν αμυλοειδές β	[93]

Alzheimer		επί της επιφανείας τους	
Τύπου 2 σακχαρώδη διαβήτης	pMVs, IMVs	Αυξημένα επίπεδα των pMVs, ιδιαίτερα σε ασθενείς με κλινικά εμφανή αθηροσκλήρωση, αυξημένο ποσοστό του TF και των MVs. Οι ασθενείς με νεφροπάθεια έχουν υψηλότερο αριθμό των μονοκυττάρων-MVs	[93]
Μεταβολικό σύνδρομο	Mn εκθέτοντας TF, eMVs	Το επίπεδο των MVs TF εκθέτοντας συσχετίζονται με τα συστατικά του μεταβολικού συνδρόμου. Pioglitazon έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τα επίπεδα EMV σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο	[93]
Τελικού σταδίου νεφρική νόσο	eMVs, PMVs	Η ανεξίτη V + Mn, pMVs, eMVs είναι αυξημένα σε ασθενείς με τελικού σταδίου νεφρική νόσο και σε ασθενείς που κάνουν αιμοκάθαρση. Τα eMVs προβλέπουν αγγειακή δυσλειτουργία και αποτελούν δείκτη της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας	[93]
Αποφρακτική άπνεια ύπνου	pMVs, IMVs, eMVs	Η συνολική ανεξίτη V +στα MVs, pMVs, IMVs και eMVs είναι αυξημένη	[93]
Προεκλαμψία	eMVs, IMVs, pMVs, syncytiotrophoblast MVs.	Αυξημένα επίπεδα των eMVs, συγκυτιοτροφολάστων pMVs IMVs Mn και	[93]
Σήψη	pMVs, EMVS, MVs κοκκιοκυττάρων	Οι pMVs και eMVs αυξημένα σε σηπτικό σοκ, αλλά η αύξησή τους προβλέπει θετικά αποτελέσματα. Οι ασθενείς με μηνιγγιτιδοκοκκική σηψαιμία έχουν αυξημένους αριθμούς των pMVs και κοκκιοκυττάρων που προέρχονται από Mn	[93]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

9. Συμπεράσματα – Μελλοντικές Προοπτικές

Τα ΜΡ θεωρούνται απαραίτητα για την αιμόσταση, καθώς εκθέτουν φωσφολιπίδια στην επιφάνειά τους παρέχοντας θέσεις-σημεία πρόσδεσης για ενεργοποιημένα συμπλέγματα θρομβωτικών παραγόντων. Έμφαση στη σημασία των αιμοπεταλιακών ΜΡ δίνεται με την παρατήρηση ότι η τους είναι 10-100 φορές πιο προθρομβωτική από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια [21]. Πρόσφατες μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι κυκλοφορούντα ΜΡ συσσωρεύονται, πυροδοτούν και υποστηρίζουν το σχηματισμό θρόμβου στη τραυματισμένη περιοχή [22].

Με βάση πρόσφατα συγκλίνοντα δεδομένα, εκτιμούμε ότι υπάρχει υπάρχει ένα προηγουμένως ανεπαρκώς αναγνωρισμένο, σύνθετο και δυναμικό εξωκυτταρικό αγγειακό τμήμα. Ανάλογα με την λειτουργική κατάσταση των κυττάρων στους ιστούς, η σύνθεση του τμήματος αυτού μπορεί να αλλάξει χωρικά/τοπικά και προσωρινά. Η πλαστικότητα του τμήματος/διαμερίσματος μπορεί να επιτρέψει την προσαρμογή σε μεταβαλλόμενες συνθήκες, και η εξελικτικά συντηρημένη φύση της υποδεικνύει αποτελεσματικές και ζωτικής σημασίας βιολογικές λειτουργίες αυτού του διαμερίσματος. Συλλογικά, συστατικά του διαμερίσματος αυτού αντιπροσωπεύουν μεγάλες περιοχές επιφάνειας της μεμβράνης, και το ποσό τους στην εξωκυττάριο χώρο μπορεί να εκτιμηθεί καλύτερα βάσει του λιπιδικού περιεχομένου της μεμβράνης τους ή βάσει της αναλογίας λιπιδίων / πρωτεϊνών. Βιολογικά συστήματα στα οποία κυστίδια απελευθερώνονται σε μεγάλους όγκους εξωκυτταρικού υγρού, όπως το πλάσμα αίματος ή κάποιο μέσο καλλιέργειας ιστού (όπου δεν έχουν «πιαστεί/καταληφθεί» άμεσα από περιβάλλοντα κύτταρα), παρέχουν κάποιες ενδείξεις σχετικά με την έκταση του σχηματισμού κυστιδίων και την αποτελεσματικότητα της εκκαθάρισης στους ιστούς. Η μοριακή σύνθεσή τους δείχνει εντυπωσιακές ομοιότητες,

συμπεριλαμβανομένης της κοινής παρουσίας κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών, της λιπιδική σύνθεσης της μεμβράνης και της εξωτερικευμένης φωσφατιδυλοσερίνης, για να αναφέρουμε μόνο μερικά παραδείγματα. Η κατανομή των μεγεθών είναι άλλη μια περιοχή επικάλυψης. Ακόμη και αν δεν χαρακτηρίζεται λεπτομερώς, μπορεί να υποτεθεί ότι η πρόσληψη και η απομάκρυνση από τα κύτταρα γίνεται με παρόμοιους ή πανομοιότυπους μοριακούς μηχανισμούς. Παρόμοια με τις κυτοκίνες που αποτελούν ένα δίκτυο επικοινωνίας, τα EVs μπορούν να ασκήσουν τα καθήκοντά τους σε ένα δίκτυο, το οποίο ενεργεί σε ένα συγκεκριμένο πλαίσιο με πολλούς άλλους παίκτες. Ο μακρύς κατάλογος των ιατρικών επιπτώσεων, που επηρεάζουν διαφορετικά όργανα, δικαιολογεί τα συστήματα με τα οποία η βιολογία προσεγγίζει τη μελέτη των EVs. Η κατανόηση αυτού του τμήματος αμφισβητεί τα τρέχοντα παραδείγματα που σχετίζονται με τους μηχανισμούς της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας και ρύθμισης του ανοσοποιητικού. Μπορεί επίσης να ανοίξει νέες προοπτικές στη μεταγραφική (translational) ιατρική, τόσο στη διαγνωστική/διάγνωση όσο και στη θεραπεία.

Βιβλιογραφία

1. Hajdu SI. Blood transfusion from antiquity to the discovery of the Rh factor. *Ann Lab Sci* 2003; 33: 471-3.
2. Learoyd P. A short history of blood transfusion. *NBS-Scientific & Technological Training (STT)* 2006; 042: 1-18.
3. 'Αιματολογία 2' Δρ. Άννα Ιωαννίδου – Παπακωνσταντίνου EN ISO 9001:2000
4. 'Αιμοδοσία' Γιώργος Μπόλλας, Αλεξάνδρα Τζιμογιάννη-Ιωαννίδου. ISBN: 960-8105-76-5. 2005
5. Pavenski K, Saidenberg E, Lavoie M, Tokessy M, Branch DR. Red blood cell storage lesions and related transfusion issues: a Canadian Blood Services research and development symposium. *Transfus Med Rev* 2012; 26: 68-84.
6. Sturgis CC. The history of blood transfusion. *Bull Med Libr Assoc* 1942; 30: 105–112
7. Miura AB. History of blood transfusion--development and future of blood transfusion in Japan. *Nihon Rinsho* 1997; 55: 2189-94.
8. Med Secoli. (2005) [Blood as therapy, therapy through the blood]. Marinozzi S, Conforti M. *Med Secoli*. 2005; 17(3):695-719.
9. Harefuah. (2005) [The history of blood transfusions]. *Rimar Y. Harefuah*. 2005 Apr; 144(4):296-9, 301.
10. Franco Verlicchi, Giuseppina Facco, Michela Macrì, Stefano Antoncecchi, Pietro Bonomo
Blood Transfus. 2011 October; 9(4): 430–435. doi: 10.2450/2011.0023-10
11. Sandra McCutcheon, Anthony Richard Alejo Blanco, E. Fiona Houston, et al *PLoS One*. 2011; 6(8):e23169. Published online (2011) doi: 10.1371/journal.pone.0023169

12. Laura Porretti, Alessandra Cattaneo, Elena Coluccio, Elena Mantione, Federico et al *Blood Transfus.* (2012) July; 10(3): 351–359. Published online 2012 February 22. doi: 10.2450/2012.0089-11
13. Queloz PA, Thadikaran L, Crettaz D, Rossier JS, Barelli S, Tissot JD. Proteomics and transfusion medicine: future perspectives. *Proteomics* 2006 October;6(20):5605-14.
14. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 12th ed. 2006
15. Purdy FR, Tweeddale MG, Merrick PM. Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. *Can J Anaesth* (1997) ;44(12):1256-61.
16. Zallen G, Offner PJ, Moore EE, Blackwell J, Ciesla DJ, Gabriel J, Denny C, Silliman CC. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* (1999);178(6):570-2.
17. Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, Lindhout T, Curvers J. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol* (2006) August;134(3):307-13.
18. George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane microparticles in blood bank fresh frozen plasma and cryoprecipitate. *Blood.* (1986); 68:307–9. [PubMed: 3087440]
19. Inaba K, Branco BC, Rhee P, Holcomb JB et al. (Arch Surg.2010)Impact of ABO identical vs ABO-compatible nonidentical plasma transfusion in trauma patients.; 145:899–906. [PubMed: 20855762]
20. Lamboo M, Poland DC, Eikenboom JC, Harvey MS, et al (Transfus Med. 2007). Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures.; 17:182–6. [PubMed:
21. AABB Guidelines and standards for blood banks and transfusion services. 24. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; (2006).
22. Kakaiya RM, Morse EE, Panek S.(1984) Labile coagulation factors in thawed fresh frozen plasma prepared by two methods. *Vox Sang*;46: 44-6.

23. O'Neill EM, Rowley J, Hansson-Wicher M, et al (1999) Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. *Transfusion* ;39: 488-91.
24. Sidhu RS, Le T, Brimhall B, Thompson H.(2006) Study of coagulation factor activities in apheresed thawed fresh frozen plasma at 1-6 degrees C for five days. *J Clin Apher* ;21: 224-6.
25. O'Shaughnessy DF, Atterbury C, et al;(2004) Guidelines for the use of fresh frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. British Committee for Standards in Haematology. Blood Transfusion Task Force. *Br J Haematol* 126(1):11-28
26. United Kingdom Blood Transfusion Services. Guidelines for the blood transfusion services in the United Kingdom, 7th ed. (2005), TSO
27. US Food and Drug Administration. Guidance for industry. An acceptable circular of information for the use of human blood and blood components; 12 September 2003
28. Thiele T, Kellner S, Hron G, Wasner C, et al. (2011) Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion*, doi: 10.1111/j.1537-2995
29. Sountaka AM, Silveura A, Söderström T, Nlombäck M. Occurrence of cold activation of transfusion plasma during storage at +4 degrees C. *Vox Sang* (2005); 88(3):172-180
30. Keller MK, Pruss A, Spies C et al (2009). Comparison of Clotting Factor Stability in FFP and S/D-treated Plasma and Stored for 6 days at 4°C, Poster 691 SCCM
31. Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, Heine U (1981) Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 645(1):63–70
32. Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 97(2):329–339
33. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101(3):942–948
34. Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B (2010) Membrane budding. *Cell* 143(6):875–87

35. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V et al (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10(5):619–624
36. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M et al (2009) Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome dissemination pathway. *Blood* 113(12):2732–2741
37. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183(3):1161–1172
36. Chargaff E, West R (1946) The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166(1):189–197
37. Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13(3):269–288
2. Thery C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9(8):581–593
38. Gyorgy B, Módos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzas EI (2011) Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes due to shared biophysical parameters. *Blood* 117(4):e39–48
35. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19(2):43–51
40. Smalley DM, Sherman NE, Nelson K, Theodorescu D (2008) Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res* 7(5):2088–2096
41. Baroni M, Pizzirani C, Pinotti M et al (2007) Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J* 21(8):1926–1933
42. Kahner BN, Dorsam RT, Kunapuli SP (2008) Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci* 13:433–439
43. György B, Szabó et al (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *68*:2667-88.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239–257

45. Sulston JE, Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56(1):110–156
46. Fixsen W, Sternberg P, Ellis H, Horvitz R (1985) Genes that affect cell fates during the development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50:99–104
47. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC (2004) Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 104(9):2761–2766
48. Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6(1):21–29
49. Bellone M, Iezzi G et al (1997) Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 159(11):5391–5399
50. Cocca BA, Cline AM, Radic MZ (2002) Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. *J Immunol* 169(1):159–166
51. Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13(3):269–288
52. Thery C, Ostrowski M, Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9(8):581–593
53. Silverman JM, Reiner NE (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* 13(1):1–9
54. Inal JM, Ansa-Addo EA, Stratton D, Kholia S et al (2012). Microvesicles in health and disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 60(2):107-21
55. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT et al (1990) Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem* 265:3809–3814
56. Gov N, Cluitmans J, Sens P, Bosman GJCGM. (2009) Cytoskeletal Control of Red Blood Cell Shape: Theory and Practice of Vesicle Formation. *Adv in Plan Lip Bil and Lipos*; 10.

57. Salzer U, Zhu R, Luten M, Isobe H et al (Transfusion 2008);. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. 48: 451-62.
58. Bosman GJ, Lasonder E, Luten M et al (Transfusion 2008). The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions.; 48: 827-35.
59. Kriebardis AG, Antonelou MH et al (Transfusion 2008). RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation, and signaling components.; 48: 1943-53.
60. Wagner GM, Chiu DT, Qju JH, Heath RH, Lubin BH (Blood 1987). Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs.; 69: 1777-81.
61. Hess JR, Grazzini G. Blood proteomics and transfusion safety. J Proteomics (2010); 73: 365-7.
62. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J. et al (2009) Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. Blood 113(5):1112–1121.
63. Beyer C, Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol 6(1):21–29
64. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF et al (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. Science 327(5965):580–583
65. Li X, Cong H (2009) Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome. Tex Heart Inst J 36(2):134–139
66. Salanova B, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC, Kettritz R (2007) Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. J Biol Chem 282(38):27960–27969
67. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. Thromb Haemost. 2009;101:439–451.
68. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: Disrupting the vascular homeostasis equation? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:2594–2604.
69. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. Br J Haematol.1967;13:269–288.

70. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1687–1693
71. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989;134:1087–1097.
72. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2311–2315
73. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood.* 2005;105:2764–2770
74. Osterud B, Breimo ES, Olsen JO. Blood borne tissue factor revisited. *Thromb Res.* 2008;122:432–434.
75. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001;85:639–646.
76. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood.* 2004;103:4545–4553
77. Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, Wang JG, Hyrien O, Hathcock J, Mackman N, Taubman MB. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost.* 2008;6:1983–1985
78. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: A link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost.* 2007;5:520–527.
79. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: A link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost.* 2007;5:520–527.
80. Johnson GJ, Leis LA, Bach RR. Tissue factor activity of blood mononuclear cells is increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost.* 2009;102:728–734
81. Johnson GJ, Leis LA, Bach RR. Tissue factor activity of blood mononuclear cells is increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost.* 2009;102:728–734

82. Characterizing blood microparticles(2008) Technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag.* (4): 769–774.
83. Dignat-George F, Boulanger CM (2011) The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(1):27–33
84. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G (2006) Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1):112–116
85. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A et al (2005) Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16(11):3381–3388
86. Mallat Z, Benamer H, et al (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101(8):841–843
87. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM et al (2003) Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 41(2): 211–217
88. Amabile N, et al (2008) Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177(11):1268–1275
89. Chironi GN, Boulanger CM, et al (2009) Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 335(1):143–151
90. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A et al (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9(6):654–659
91. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D’SouzaSchorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 123(Pt 10):1603–1611
92. Flaumenhaft R, Dilks JR et al (2009) Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113(5):1112–1121
93. György B, Szabó TG, et al (2011) 68(16):2667-88. *Cell Mol Life Sci.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.

94. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* (1999) 18;1439(3):317-30
95. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM(2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20:22-7.
96. Simak J, Gelderman MP.(2006) Cell membrane microparticles in blood and blood products:potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* (1):1-26.
97. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. (Hemost.2010) Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb*; 36:807–818.
98. Williams JC, Mackman N. Mps or lcs (Blood. 2011);117:1101–1102.
99. Key NS, Mackman N.(. *Semin Thromb Hemost.* 2010) Tissue factor and its measurement in whole blood, plasma, and microparticles;36:865–875.
100. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:15–26.
101. Khorana AA, Francis CW et al. (Thromb- Haemost. 2008) Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer.;6:1983–1985
102. Aupeix K, Hugel B, Martin T et al (1997). The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in hiv-1 infection. *J Clin Invest.* ;99:1546–1554.
103. Van Dreden P et al .Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipid as prognostic factors for acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009;20:635–641.
104. Erwin F.Strasser,Sebastian Happ et al (Jan 2013) Microparticle detection in platelet products by three different methods.
105. Pigault C, Follenius-Wund A, et al (*J Mol Biol* 1994). Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidyl-serine-containing liposomes. ;236:199-208.

106. Van Dreden P, Rousseau A et al. *Blood Coagul Fibrinolysis* (2009);20:494-502. Clinical evaluation of a new functional test for detection of plasma procoagulant phospholipids.
107. Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using new digital flow cytometer. *Cytometry A*. 2007;71:38-45.
108. Mackman N, Tilley RE, Key NS (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;27:1687–1693.
109. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.*(1995);74:90–93
110. Butenas S, Orfeo T, Mann KG(2009). Tissue factor in coagulation: which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ;29:1989–1996.
111. Krudysz Amblo J et al (*JBiolChem*.2010) Carbohydrates and activity of natural and recombinant tissue factor. ;285:3371–3382.
112. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc* (2006);26:456–461
113. Chen VM, Ahamed J et al (*Biochemistry*.2006) Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. ;45:12020–12028
114. Johnson GJ, Leis LA, Bach RR.(2009) Tissue factor activity of blood mononuclear cells is increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost.*;102:728–734.
115. Tesselaar ME et al. *J Thromb Haemost* (2007). Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? ;5:520–527.
116. Janusz Rak (Sem. Hem and Throm(2010), Microparticles in Cancer
117. Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol* 2009;22(1):61–69
118. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009;101(3):439–451

119. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, et al. Tumor Shedding and coagulation. *Science* 1981;212(4497):923–924
120. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005;106(5):1604–1611
121. Doeuvre L, Angles-Cano E. Cell-derived microparticles unveil their fibrinolytic and proteolytic function [in French]. *Med Sci (Paris)* 2009;25:37–44
122. Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer* 2009;125(7): 1595–1603
123. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(10): 3794–3799
124. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 2009;69(3):785–793
125. Angelucci A, D'Ascenzo S, Festuccia C, et al. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2000;18(2):163–170
126. Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, Zöllner M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Res* 2006;66(14):7083–7094
127. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Giusti I, et al. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* 2006;8(2):96–103
128. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 113(5):752–760
129. Hao S, Ye Z, Li F, et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol* 2006;28(2):126–131
130. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of

cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006;20(9):1487–1495

131. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008;10(5):619–624

132. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Giusti I, et al. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* 2006;8(2):96–103

133. Skog J, Wu"rdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promotetumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–1476

134. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001;7(3):297–303

135. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006);7(7):505–516

136. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* (2001);411(6835):355–365

137. Pawson T. Protein modules and signalling networks. (1995) *Nature*;373(6515):573–580

138. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, et al. (2010) Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med*;16(2):219–223

139. Maarten E. Tushuizen, Michaela Diamant, Auguste Sturk, Rienk Nieuwland. Cell-Derived Microparticles in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.(2011); 34-9