



Ελληνική Εταιρεία Μεταγγισιοθεραπείας

12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταγγισιοθεραπείας

Στρογγυλό Τραπέζι 3: Από τη Μετάγγιση στη Θρόμβωση: Υπάρχει σχέση;

Μικροκυστίδια: Μικρά αλλά Θαυματουργά!

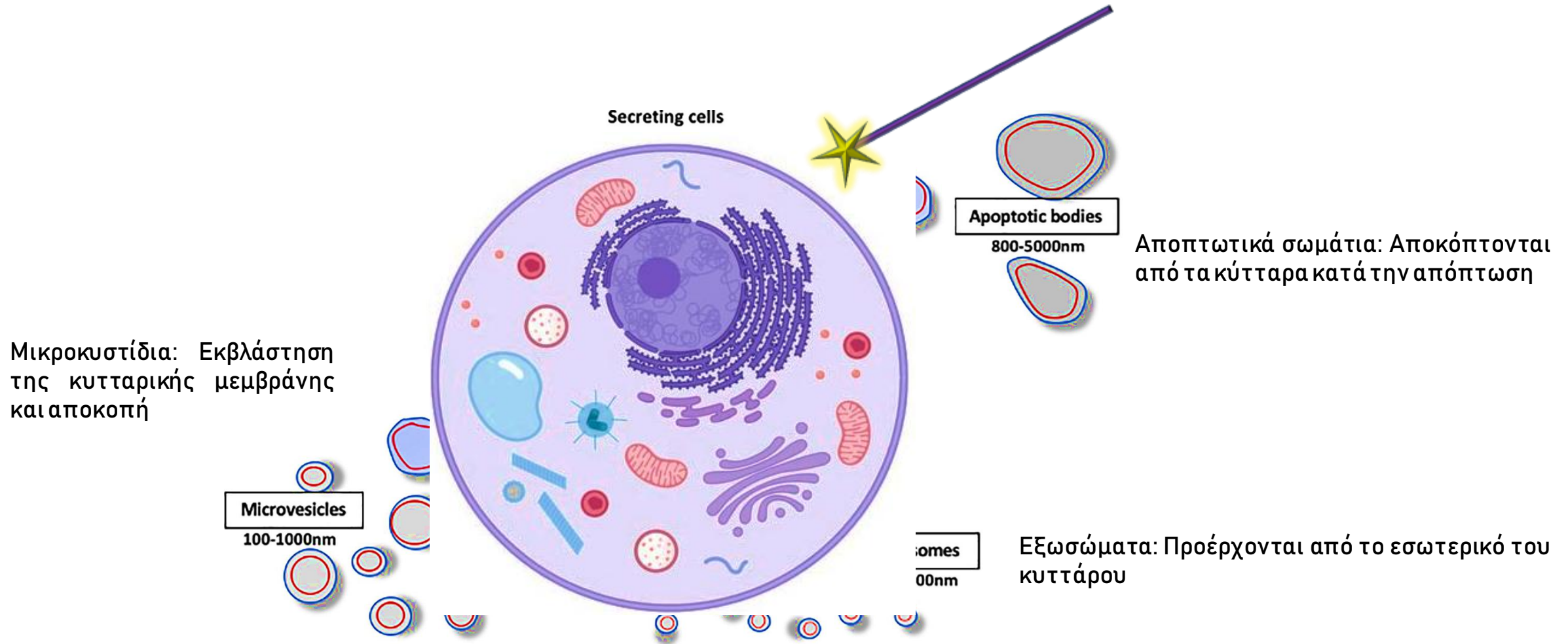
Χαρά Γεωργατζάκου & Αναστάσιος Γ. Κριεμπάρδης

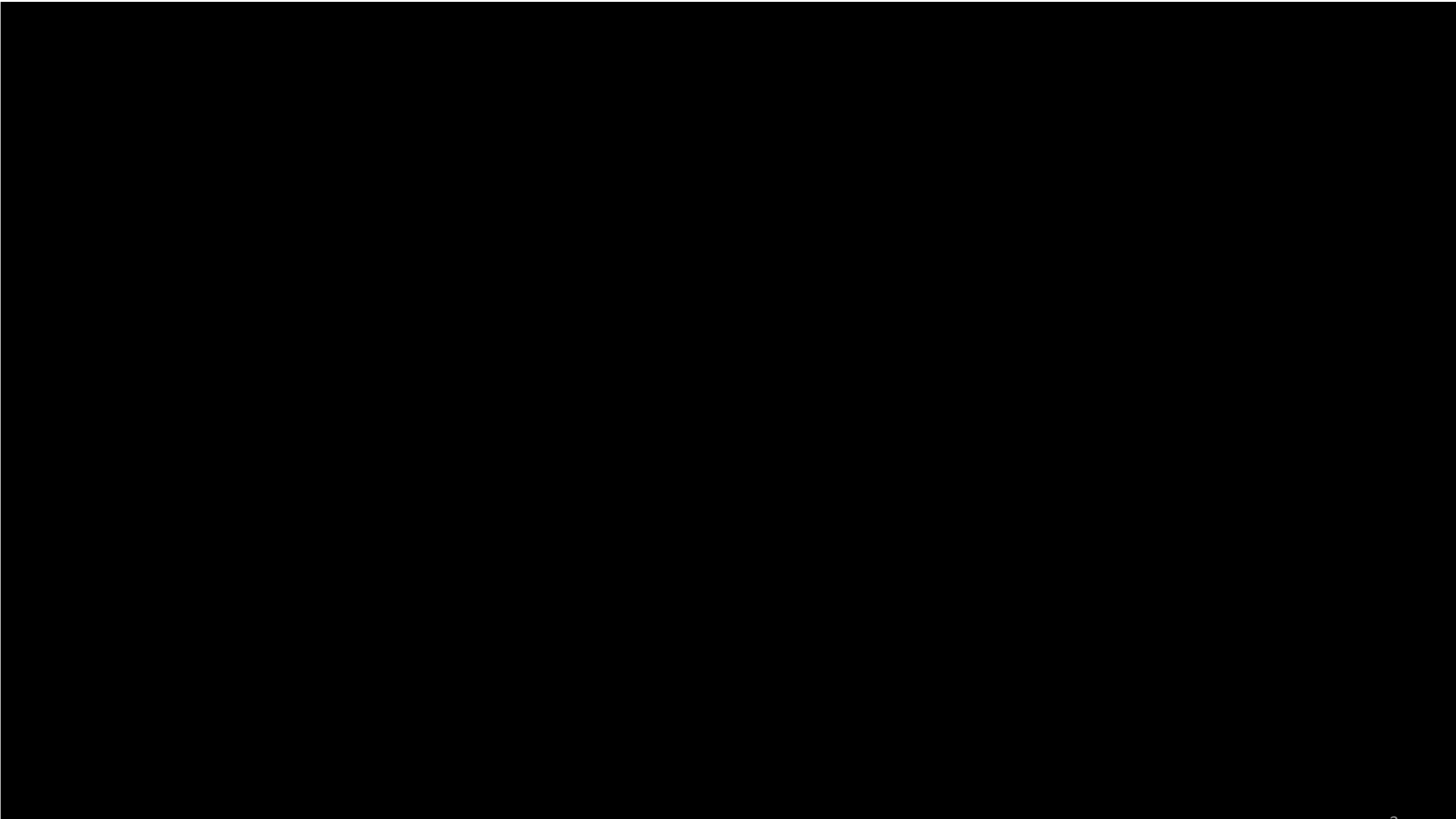


Θεσσαλονίκη 15-17 Οκτωβρίου 2021

Τι είναι κυστίδια;

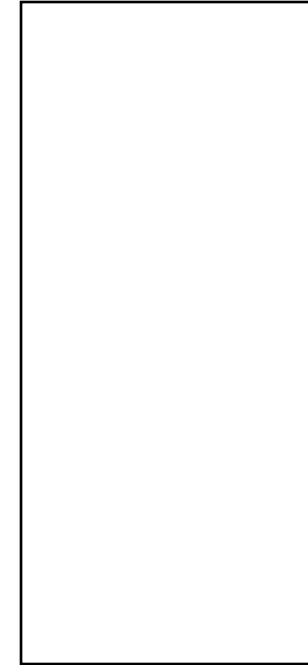
Και το θαύμα ξεκινά...





1967

- Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παράσχει στοιχεία για την παρουσία νέου βιολογικού υλικού στο φυσιολογικό πλάσμα ύστερα από υπερφυγοκέντρηση.
- Το υλικό προέρχεται μάλλον από αιμοπετάλια και πιθανά να έχει προπηκτική δράση.
- Το νέο βιολογικό υλικό προτείνεται να ονομαστεί «κυτταρική σκόνη».



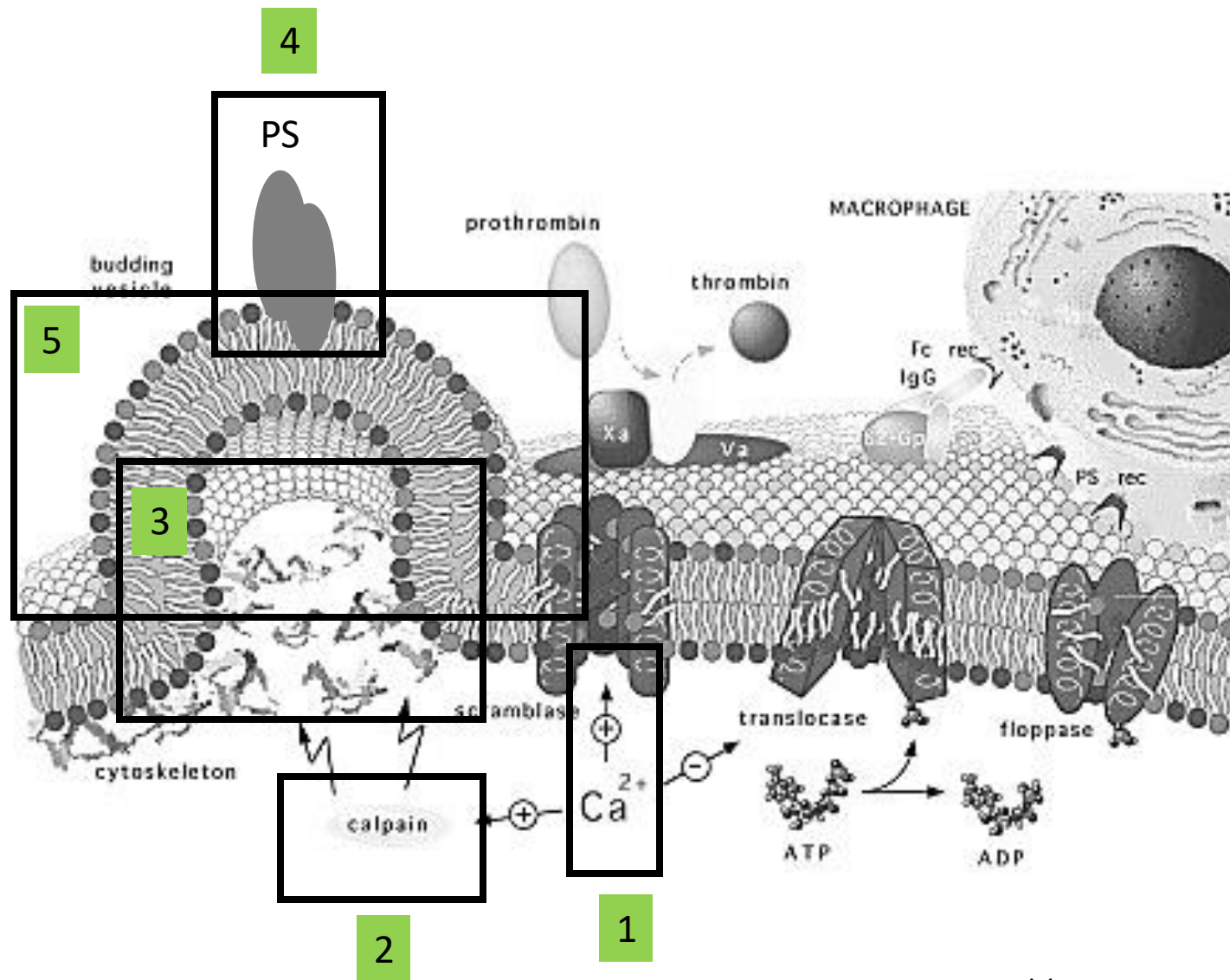
... το υλικό αποτελείται από συσσωματώματα κυτταρικής σκόνης...

Wolf, 1967, Brit J Haematol

Λίγη ιστορία ... [2] ...

Πώς παράγονται τα μικροκυστίδια;

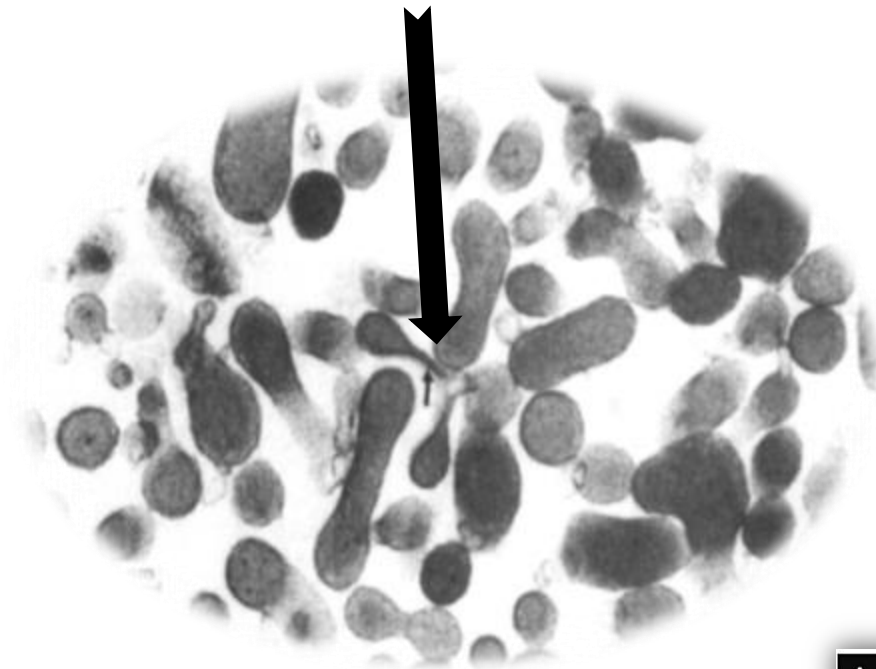
1. Αύξηση ενδοκυτταρικού ασβεστίου.
2. Ενεργοποίηση της καλπαΐνης.
3. Απώλεια φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας.
4. Εξωτερίκευση PS στην κυτταρική μεμβράνη.
5. «Φυσαλιδοποίηση» και αποκοπή μικροκυστιδίων.



Zwaal & Schroit 1997, Blood 89 (4):1121-1132

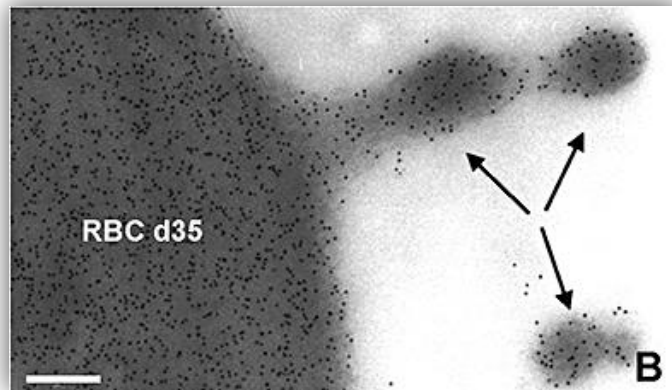
Λίγη ιστορία ... [3] ...

1. Στην πρώτη μελέτη υπερδομής μικροκυστιδίων σε αποθηκευμένο ολικό αίμα.
2. Βρέθηκε ότι τα μικροκυστίδια είχαν διαφορετικό μέγεθος και παρουσίαζαν χαρακτηριστικές ουρές.



Greenwalt et al., 1984, Vox Sang

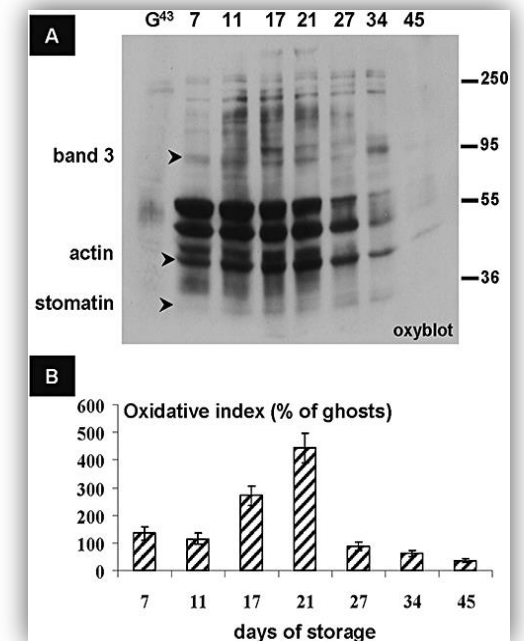
24 χρόνια αργότερα... 2008



Kriebardis et al., 2008, Transfusion

Σε άλλη μελέτη μικροκυστιδίων σε αποθηκευμένα ΣΕ βρέθηκε ότι:

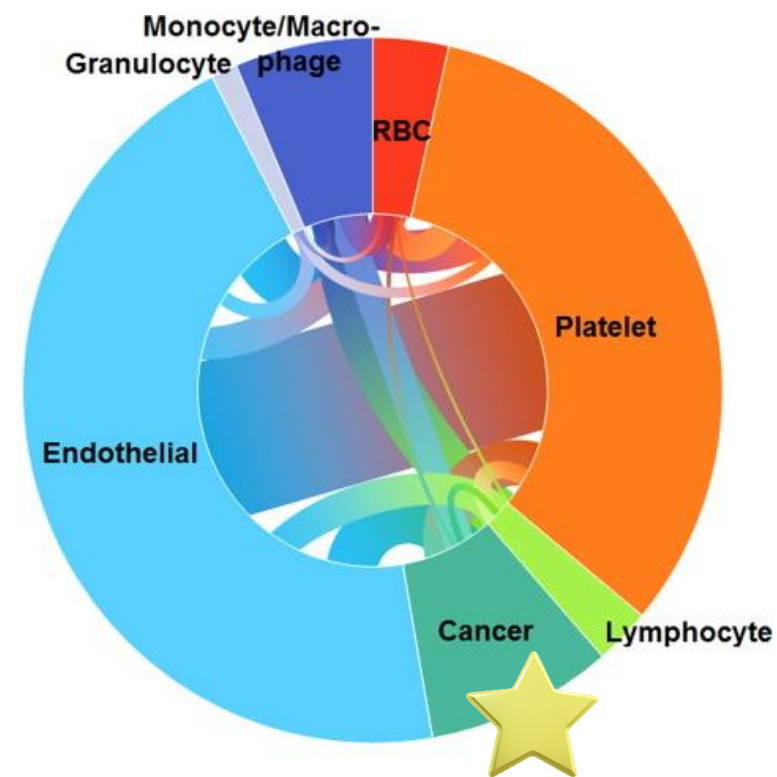
1. Τα μικροκυστίδια περιέχουν οξειδωμένες πρωτεΐνες του ερυθροκυττάρου.
2. Η αποβολή οξειδωμένων πρωτεϊνών από το ερυθροκύτταρο προσφέρει μία ευκαιρία στα ΣΕ να επιβιώσουν στο κλειστό περιβάλλον του ασκού.



↙ ↗ Τι αναφέρει η βιβλιογραφία για τα μικροκυστίδια;

1. Αύξηση των μελετών τα τελευταία χρόνια.
2. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα μικροκυστίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων.
3. Μικροκυστίδια – καρκίνος – μετάσταση – θρόμβωση.
4. Διδασκόμαστε την επικοινωνία των μικροκυστιδίων με τα κύτταρα.

Δημοσιεύσεις			
Χρονική περίοδος	Microvesicles	Microparticles	Σύνολο
1952-2000	573	1.409	1.982
2001-2010	875	5.071	5.946
2011-2021	5.984	14.438	20.422



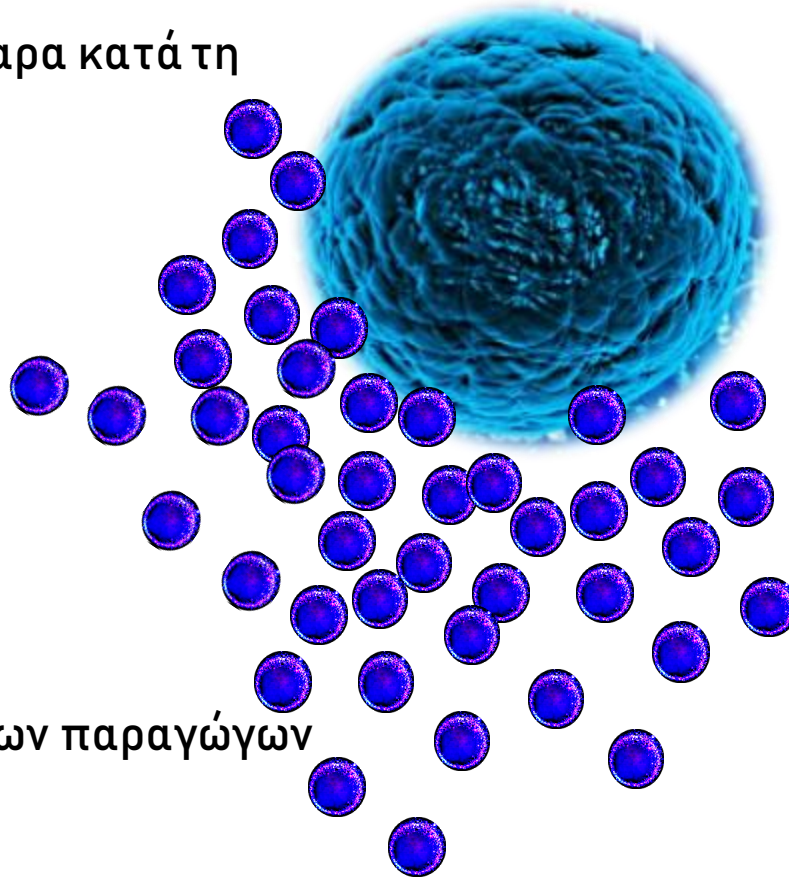
Larson et al, 2004, Free Radical Biology and Medicine

Τελικά τα μικροκυστίδια είναι μαγική σκόνη ή κυτταρικά σκουπίδια;

Παράγονται από τα περισσότερα κύτταρα κατά τη διάρκεια:

1. της κυτταρικής ανάπτυξης,
2. του τραυματισμού και της βλάβης,
3. της φλεγμονής,
4. της υποξίας,
5. του οξειδωτικού στρες,
6. της γήρανσης,
7. της παρασκευής και αποθήκευσης των παραγώγων αίματος κ.α.

Clancy et al., 2021, FASEB Bioadv



Cell Dust



Μεθοδολογία προσέγγισης

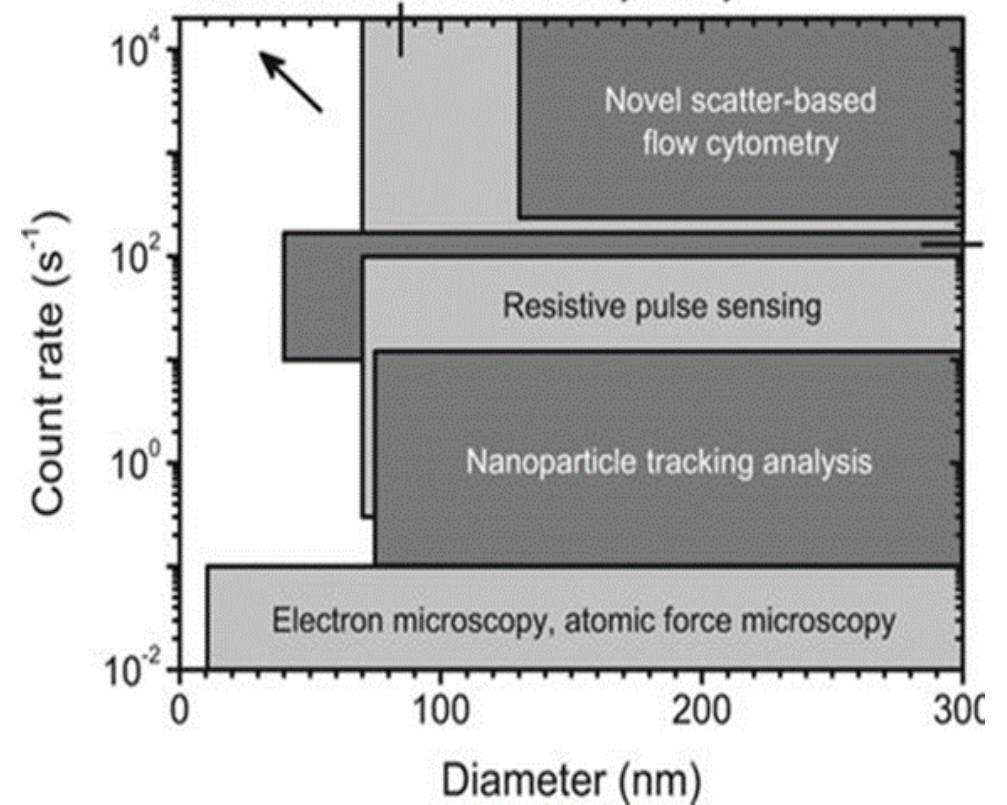
Μεμονωμένες τεχνικές:

1. Flow cytometry
2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)
3. Electron microscopy
4. Resistive Pulse Sensing (tRPS, qNano)
5. Atomic Force Microscopy

Μαζικές τεχνικές:

1. Western blotting
2. "Omic" methods: mass spectrometry, RT-qPCR
3. Functional assays: measurement of procoagulant activity, ...
4. Surface-sensitive methods: SPR, SPFS, ..

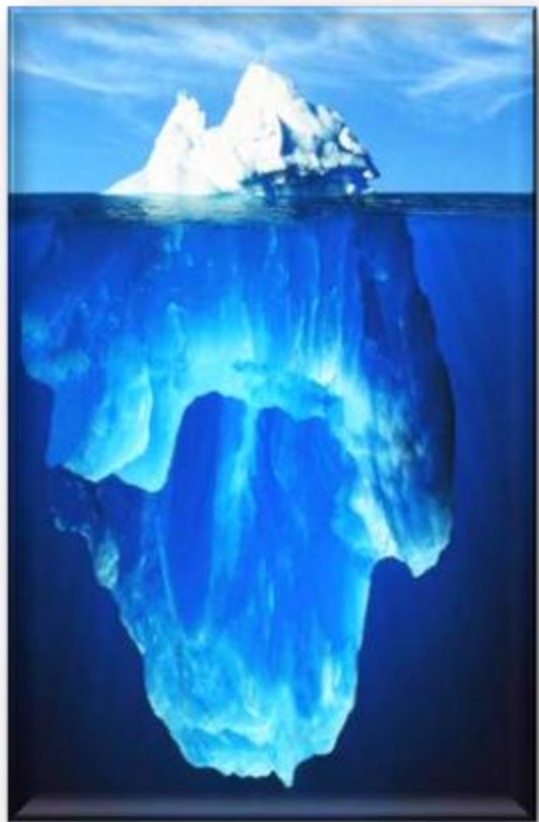
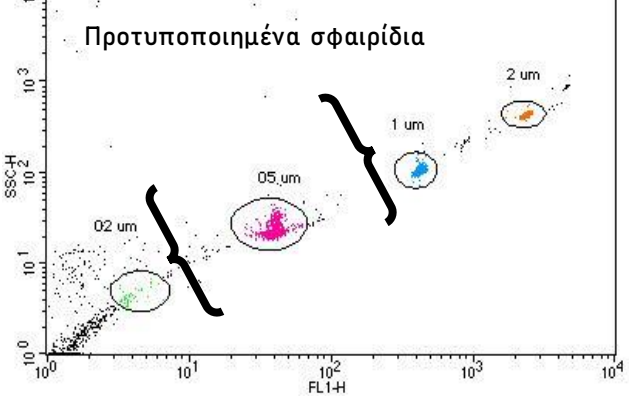
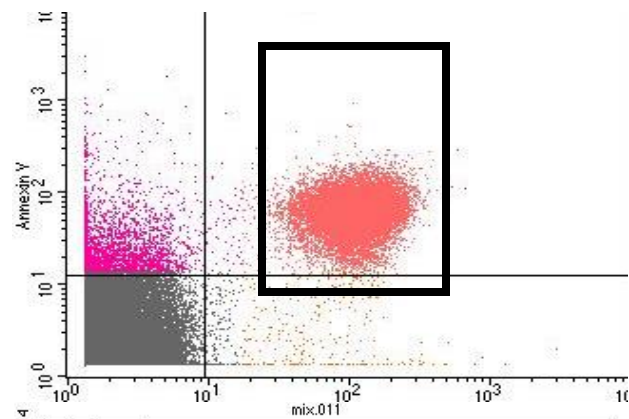
Coumans et al., 2017, Circulation Research



<50nm μικροκυστίδια

Κυτταρομετρία ροής & Nanoparticle Tracking Analysis

Κυτταρομετρία ροής



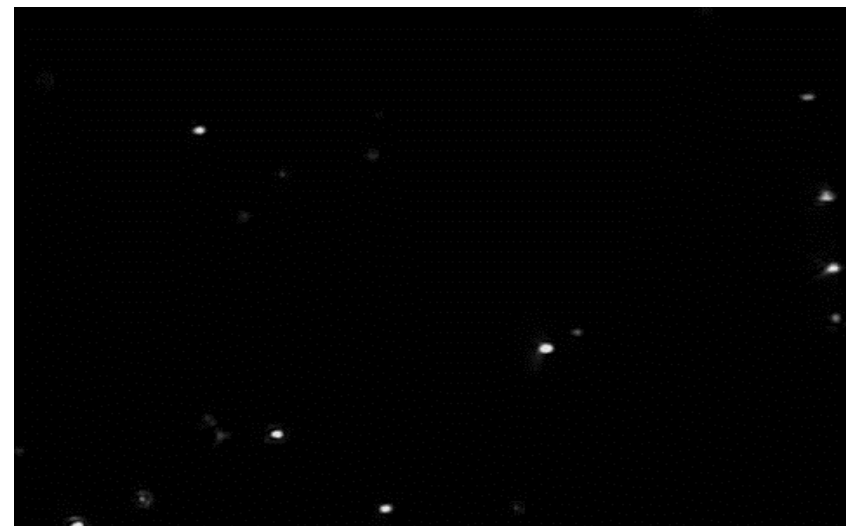
1 μm

200 nm

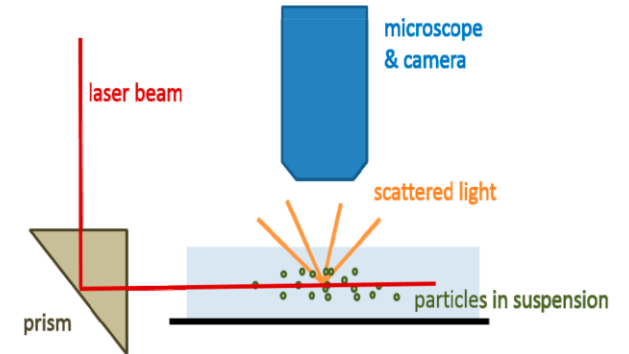
κυστίδιο

50 nm

Nanoparticle Tracking Analysis



Μπορούμε να ταυτοποιήσουμε νανοκυστίδια μέχρι 20nm ...

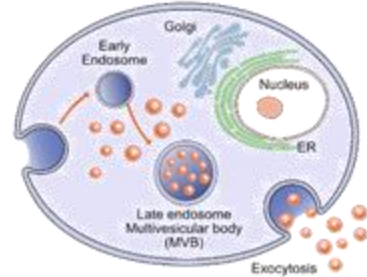


200nm

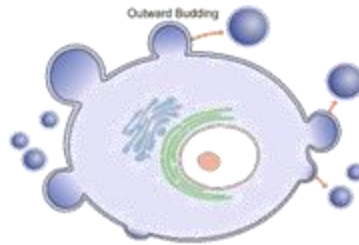
Προσοχή στα σκουπίδια ή το θόρυβο!

A) Ποιο είναι το μέγεθος των μικροκυστιδίων;

1) 30-150nm



2) 100nm-1000nm



3) 1000nm-5000nm



B) Ο χαρακτηρισμός των μικροκυστιδίων γίνεται βάσει:

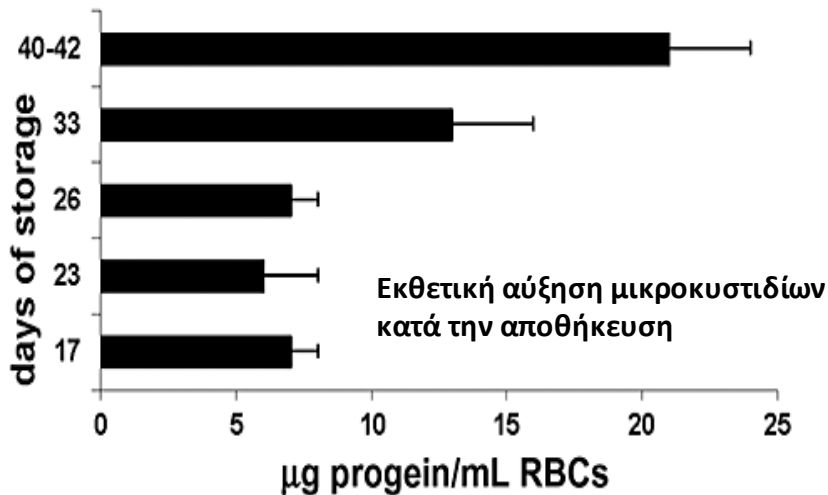
- 1) Της παρουσίας της PS στην επιφάνειά τους;
- 2) Του μεγέθους τους;
- 3) Επιφανειακών δεικτών που είναι χαρακτηριστικοί των μητρικών κυττάρων και του μεγέθους τους;

Γ) Πότε παράγουν μικροκυστίδια τα κύτταρα;

- 1) Φυσιολογικά κατά την κυτταρική ανάπτυξη;**
- 2) Σε παθολογικές καταστάσεις (οξειδωτικό στρες, φλεγμονή, κυτταρική γήρανση κ.α.);**
- 3) Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις;**

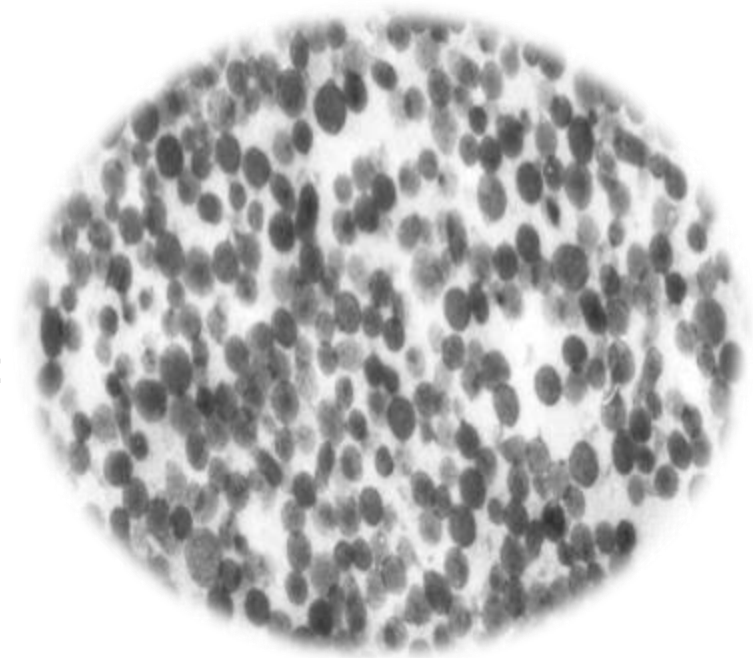
Αποθήκευση παραγώγων αίματος και μικροκυστίδια

1. Μικροκυστίδια ανιχνεύονται σε όλα τα παράγωγα του αίματος.
2. Παράγονται κατά την παρασκευή και την αποθήκευση παραγώγων (*συνθήκες φυγοκέντρησης, θερμοκρασία κτλ*).
3. Υπάρχει διακύμανση του αριθμού τους ανάλογα με:
 - τον αιμοδότη (*ηλικία, φύλο, κ.α.*)
 - τις συνθήκες αποθήκευσης (*συντηρητικό διάλυμα, θερμοκρασία*)



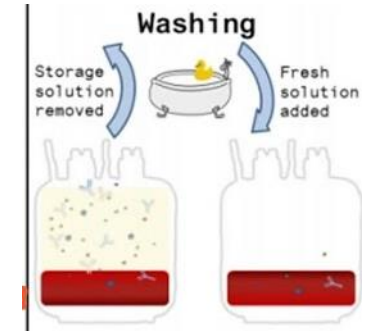
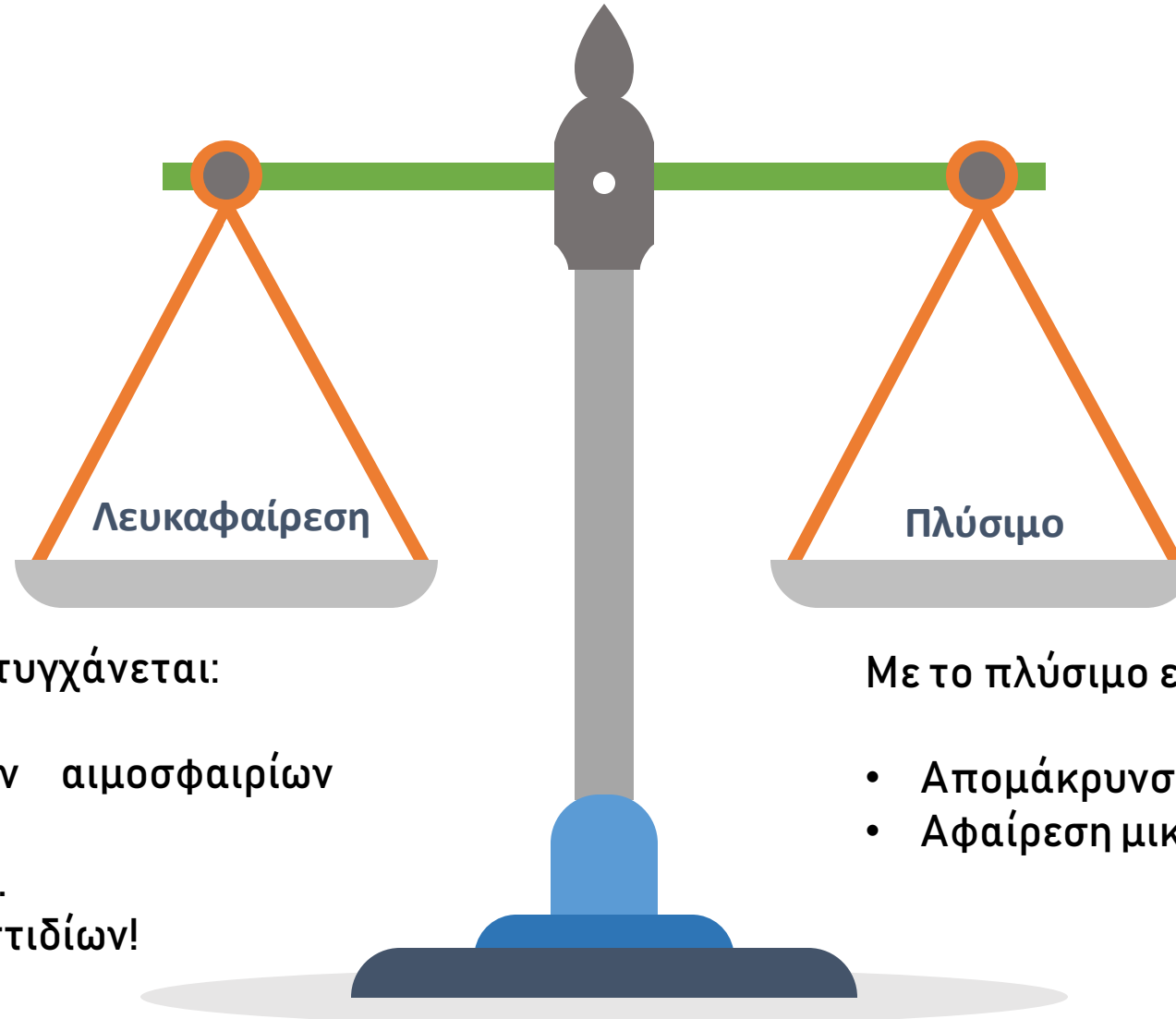
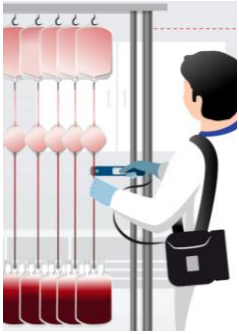
Ετερογενής πληθυσμός σε ασκό:

- Nanoparticles: 60-80nm
- Microparticles: 100-1000nm



Kriebardis et al., 2008, Transfusion

Λευκαφαίρεση ή πλύσιμο των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων



Με την λευκαφαίρεση επιτυγχάνεται:

- Απομάκρυνση λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων.
- Μείωση της αιμόλυσης.
- Αλλά αύξηση μικροκυστιδίων!

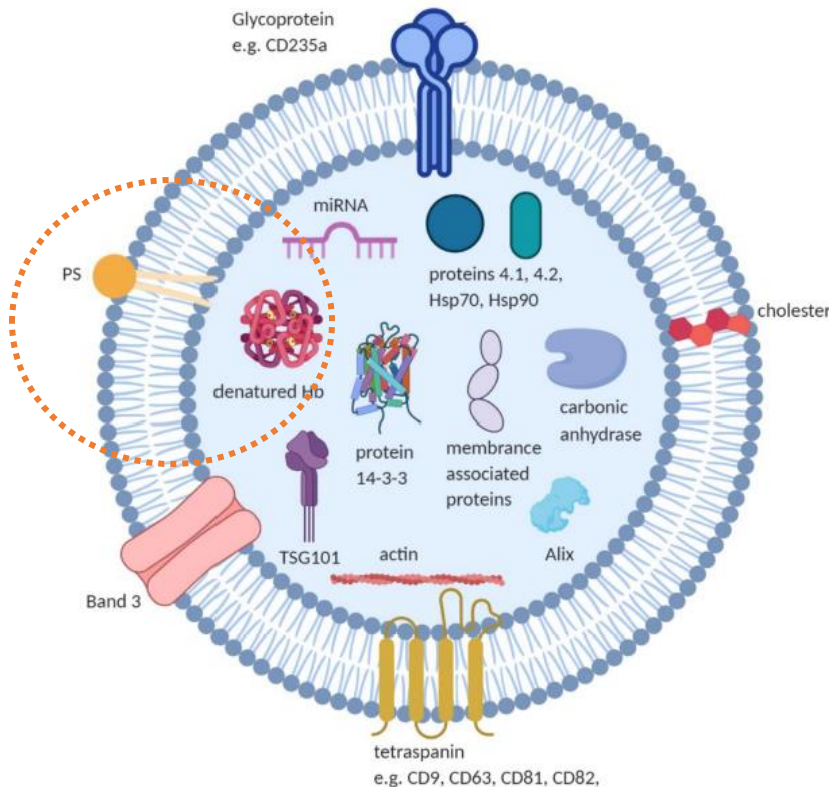
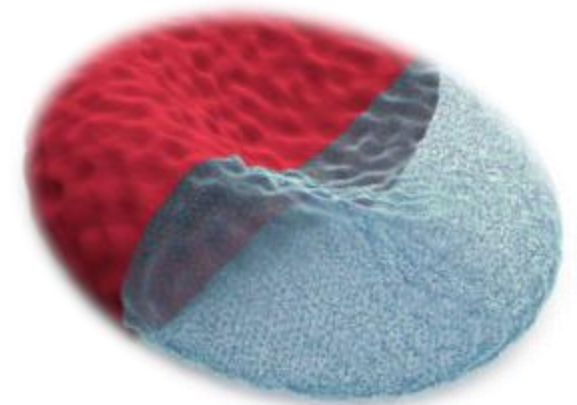
Με το πλύσιμο επιτυγχάνεται:

- Απομάκρυνση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης.
- Αφαίρεση μικροκυστιδίων.

Pulliam et al., 2021, Surgery

Γενικά

- Η κυστιδιοποίηση είναι μια απόλυτα ελεγχόμενη διαδικασία.
- Τα μικροκυστίδια εμπλέκονται σε ανοσολογικές αντιδράσεις, στην αιμόσταση, στην φλεγμονή κ.α.



Τι μπορούν να προκαλέσουν μετά τη μετάγγιση:

1. Φλεγμονή.
2. Μετεγχειρητική θρόμβωση.
3. TRALI – μη ανοσολογικός τραυματισμός πνευμόνων.
4. TRIM – ανοσοτροποποίηση σχετιζόμενη με μετάγγιση.
5. Αλλοανοσοποίηση (*φέρουν αντιγόνα των ομάδων αίματος*).

Nguyen et al., 2017

Μονοξειδίο του αζώτου -NO

- Το NO είναι ένα σηματοδοτικό μόριο και έχει δείξει να ρυθμίζει τη ροή αίματος.
- Δε διαπερνά εύκολα το ερυθροκύτταρο.
- Υπάρχει μεγάλη διαπερατότητα NO στα μικροκυστίδια.

Liu et al., FRBM, 2013; Roback GD, Hematology, 2011

Το NO είναι: Αγγειοδιασταλτικό και αντιοξειδωτικό.

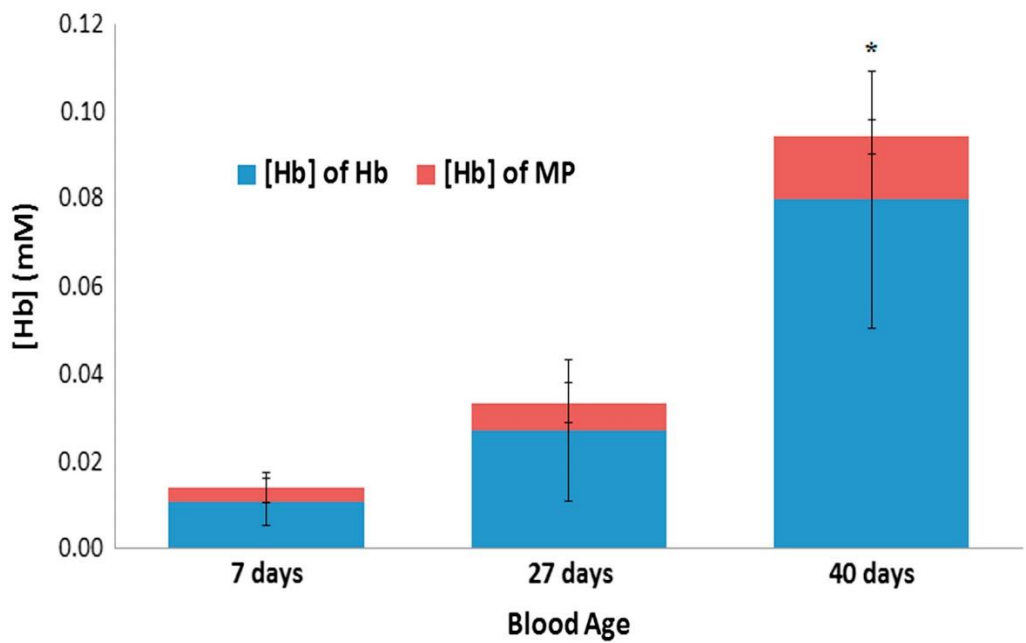
Η μετάγγιση αποθηκευμένων για μεγάλο χρονικό διάστημα ΣΕ έχει ενοχοποιηθεί



Ισχαιμία, υπέρταση, ενδοθηλιακή βλάβη, πολυοργανική ανεπάρκεια

Ποιος είναι ο μηχανισμός;

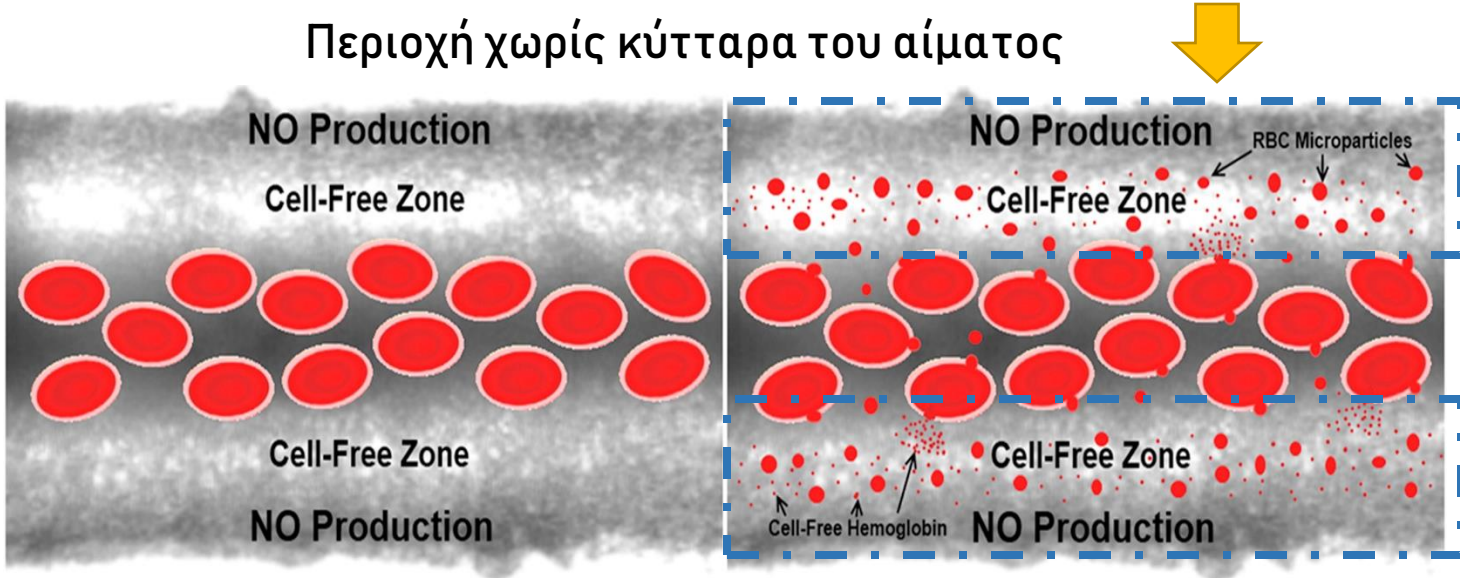
Μονοξείδιο του αζώτου – αιμόλυση και μικροκυστίδια



Κατά την αποθήκευση ΣΕ έχει παρατηρηθεί αύξηση της αιμόλυσης και της αιμοσφαιρίνης μέσα στα μικροκυστίδια.

Roback GD, 2011, Hematology

Αγγειοσυστολή



Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και τα μικροκυστίδια εισχωρούν στην περιοχή χωρίς κύτταρα και δεσμεύουν το NO

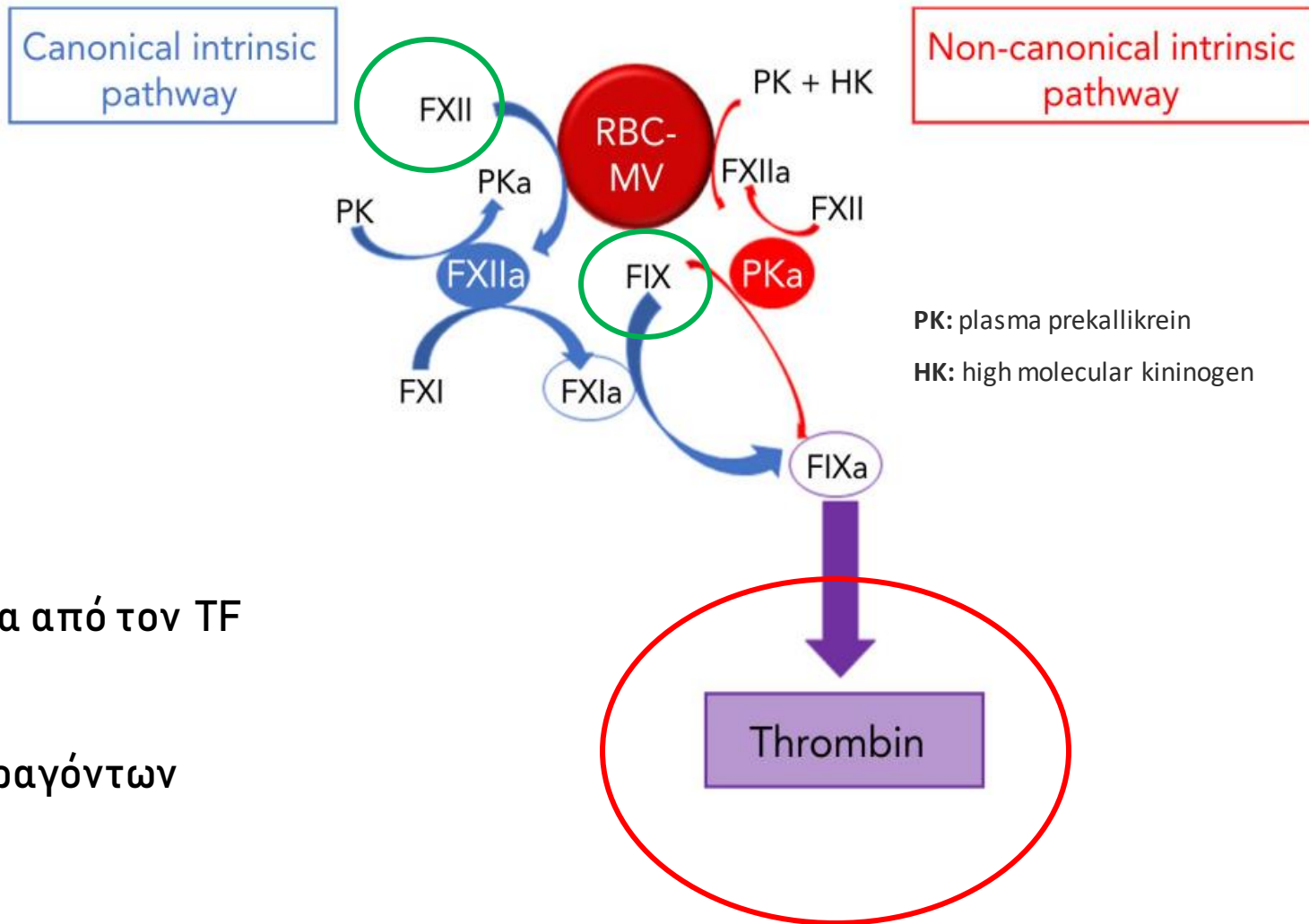
Liu et al., 2013, Free Radical Biol and Medicine

Τα μικροκυστίδια βοηθούν την αιμόσταση;

• Είναι ικανά να παράγουν θρομβίνη:

1. Με τη βοήθεια του παράγοντα FXII ανεξάρτητα από τον TF

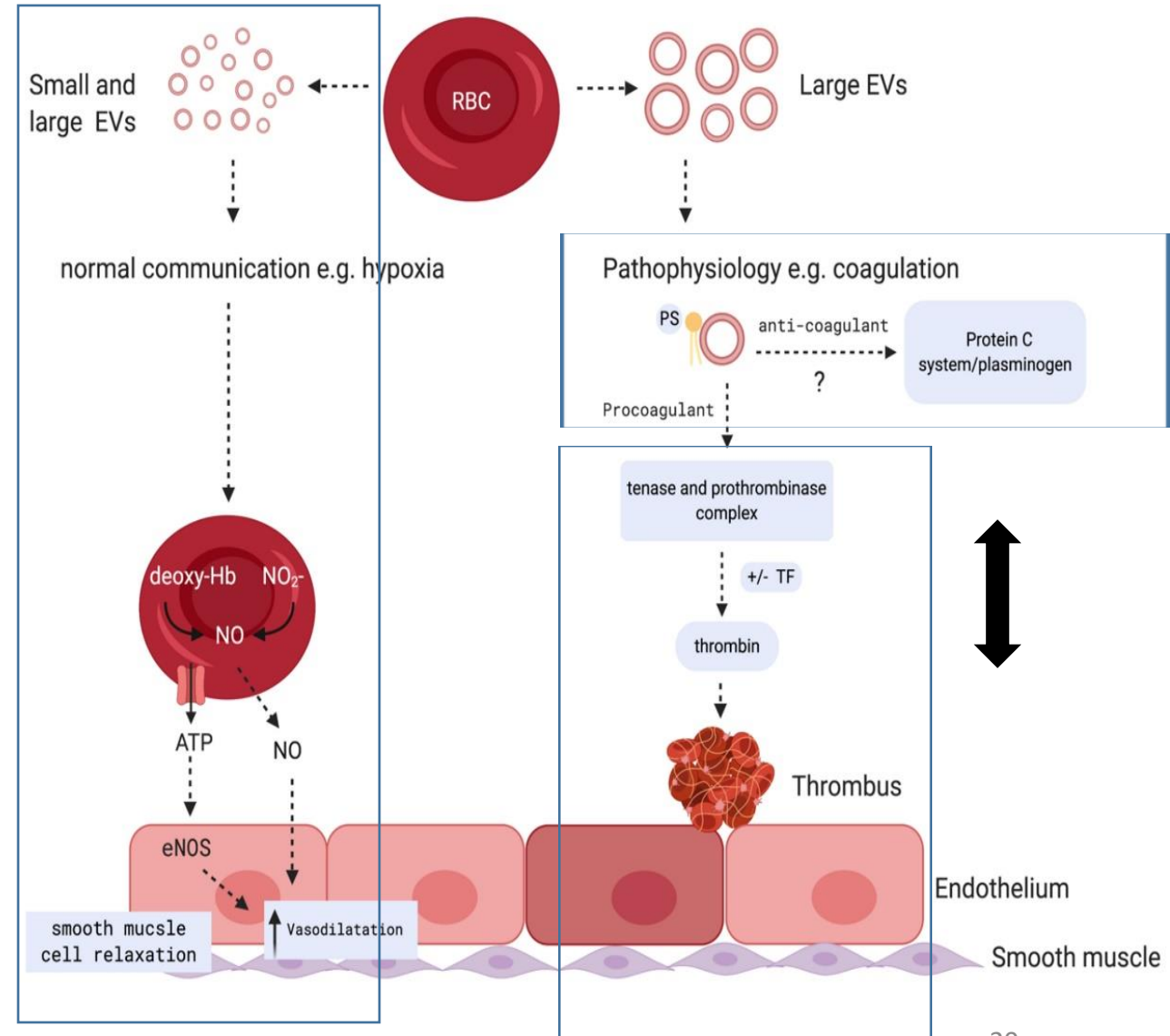
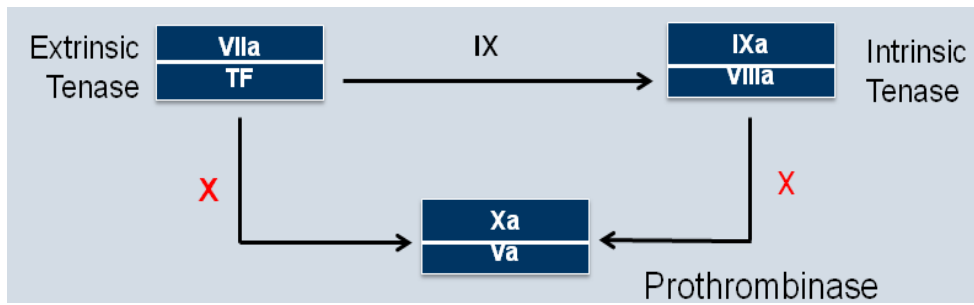
2. Με τη βοήθεια το παράγοντα FIX απουσία παραγόντων FXII και FXI



Noubouossie et al., 2020, Blood

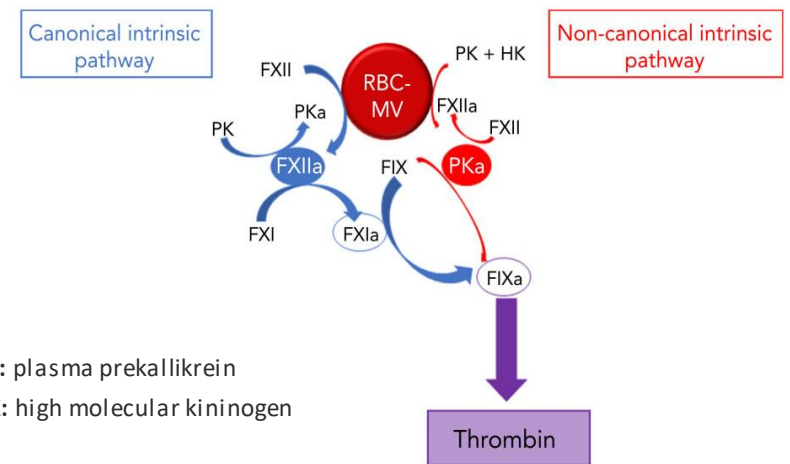
Έχουν προθρομβωτικές και αντιπηκτικές ιδιότητες;

- Στην υποξία ευθύνονται για την παραγωγή NO με τη βοήθεια του ενδοθηλιακού NO (eNOS).
- Προκαλούν αγγειοδιαστολή και χαλάρωση λείων μυϊκών ινών.
- Βοηθούν στην δημιουργία συμπλόκων τενάσης και προθρομβινάσης μέσω της φωσφατιδυλοσερίνης και προάγουν την δημιουργία θρομβίνης.
- Αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη S και ενεργοποιούν την πρωτεΐνη C και το πλασμινογόνο.



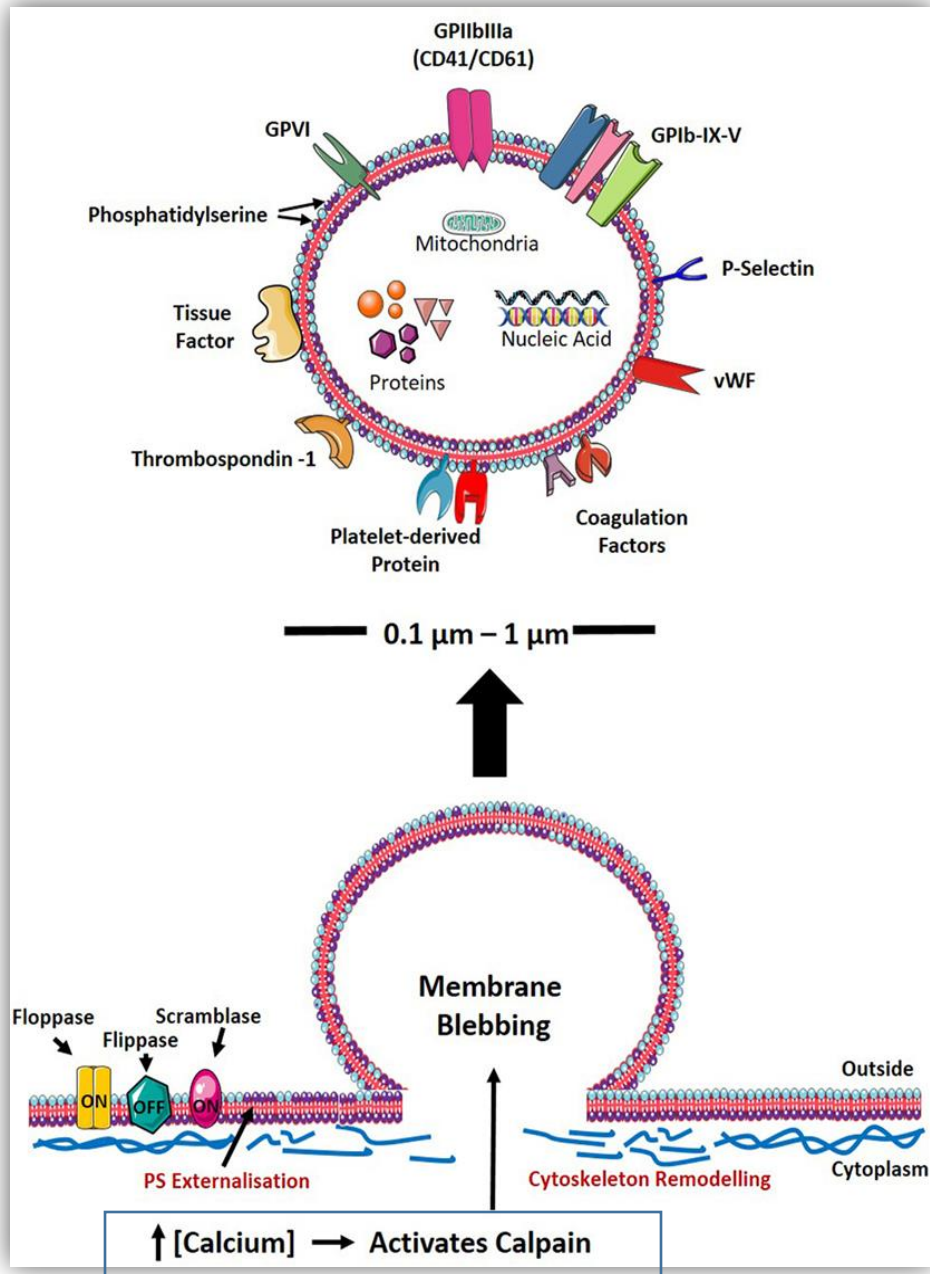
Δ) Ποιος είναι ο πιθανός ρόλος των μικροκυστιδίων των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη μετάγγιση;

- 1) Συμμετέχουν στην αιμόσταση (πήξη και ινωδόλυση);
- 2) Έχουν ανοσοτροποποιητική δράση;
- 3) Συμμετέχουν στη ρύθμιση αγγειοδιαστολής/αγγειοσυστολής;
- 4) Ισχύουν όλα τα παραπάνω.



Γένεση

60-90% των μικροκυστιδίων είναι αιμοπεταλιακής προέλευσης!!!

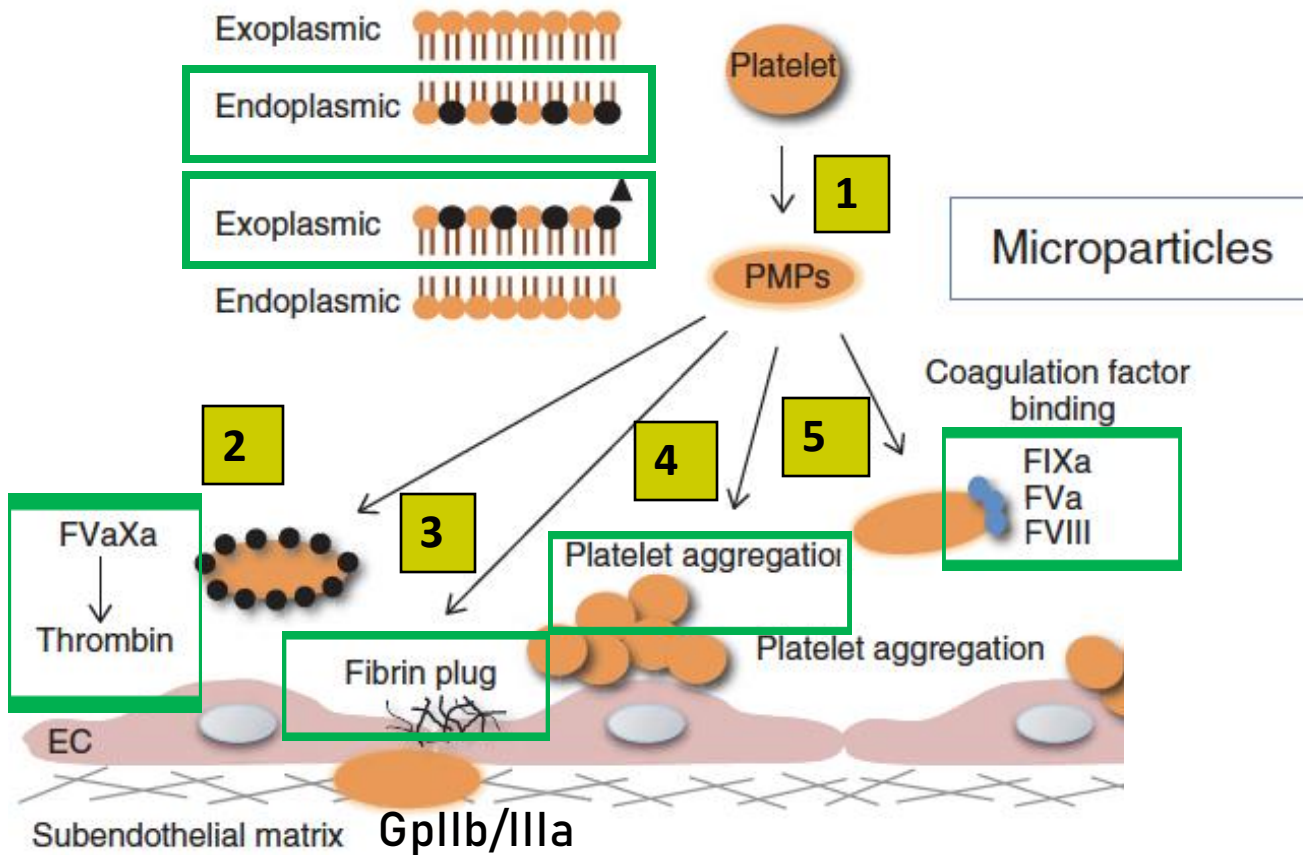


- Αύξηση ενδοκυττάριου Ca^{+2} - ενεργοποίηση καλπαΐνης - αναδιοργάνωση κυτταροσκελετού.
- Μικροκυστιδιοποίηση.
- Εξωτερίκευση PS.

Ενεργοποίηση προθρομβινάσης

Ενεργοποίηση TF

Πυροδότηση φαγοκυττάρωσης



1. Έκθεση φωσφατιδυλοσερίνης από τα μικροκυστίδια αιμοπεταλίων.

2. Ενεργοποιούνται οι παράγοντες FVa & FXa και ο TF. Παραγωγή θρομβίνης.

3. Τα μικροκυστίδια προσκολλώνται στο ενδοθήλιο.

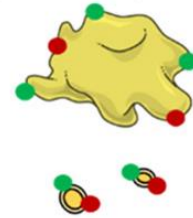
4. Τα αιμοπετάλια αλληλοεπιδρούν με τα μικροκυστίδια.

5. Ενεργοποιούν παράγοντες όπως ο FIXa, FVa, FVIIIa.

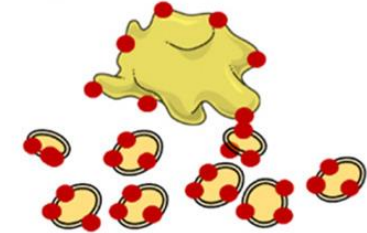
• TRALI – μη ανοσολογικός τραυματισμός πνευμόνων

Τα μικροκυστίδια που προέρχονται από αποθηκευμένα αιμοπετάλια ευθύνονται για την εμφάνιση TRALI.

1 day - stored platelets



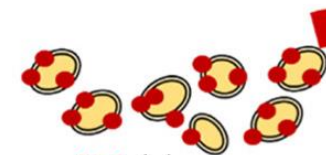
5 days - stored platelets



1 day - stored platelet extracellular vesicles (EVs)



5 days - stored platelet EVs



Ενδοθηλιακός φραγμός

Βλάβη φραγμού

S1P ↑

long chain ceramides ↓

S1P ↓↓

long chain ceramides ↑↑

intra-vascular fluid

Πνευμονικά ενδοθηλιακά κύτταρα

extravasated fluid

transfusion-related acute lung injury

McVey et al., 2021, Blood

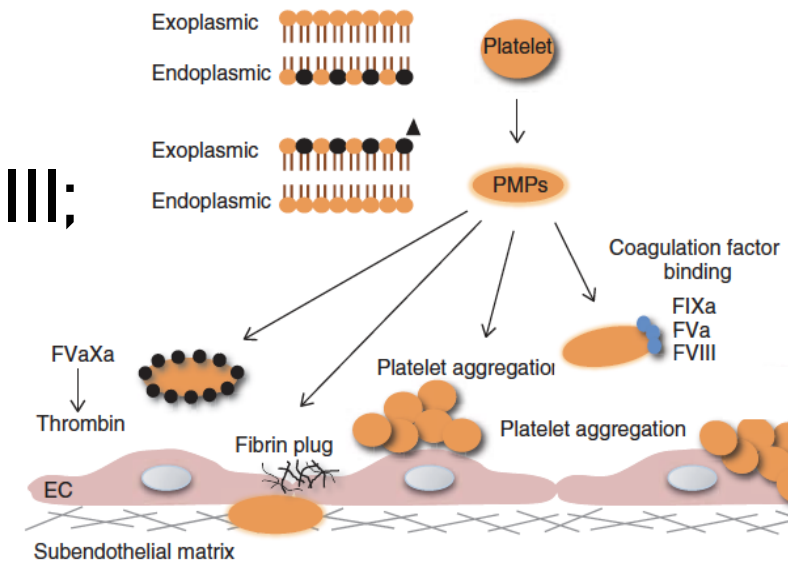
Γιατί τα μικροκυστίδια αιμοπεταλίων βρέθηκε να έχουν:

- αυξημένο κεραμιδίο.
- μειωμένη περιεκτικότητα σε 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P).

Πλύσιμο των αιμοπεταλίων πιθανά να μειώνει την εμφάνιση TRALI....

Ε) Πώς επιδρούν τα αιμοπεταλιακά μικροκυστίδια στην αιμόσταση;

- 1) Με την έκθεση PS (Va, Xa, TF);
- 2) Με την πρόσδεση σε υπο-ενδοθηλιακή μήτρα μέσω GPIIb/IIIa – συσσώρευση PLTs;
- 3) Με θέσεις πρόσδεσης για τους FIX, FX και FVIII;
- 4) Όλα τα παραπάνω;



ΣΤ) Ποιο από τα παρακάτω ισχύει για τα μικροκυστίδια αίματος;

- 1) Είναι απαραίτητα για την ομοίωση της αιμόστασης;
- 2) Μπορούν να οδηγήσουν μετα-μεταγγισιακές επιπλοκές;
- 3) Έχουν ινωδολυτική δράση;
- 4) Ισχύουν όλα τα παραπάνω;

Ζ) Ποιο από τα παρακάτω ισχύει για τη φωσφατιδυλοσερίνη των μικροκυστιδίων;

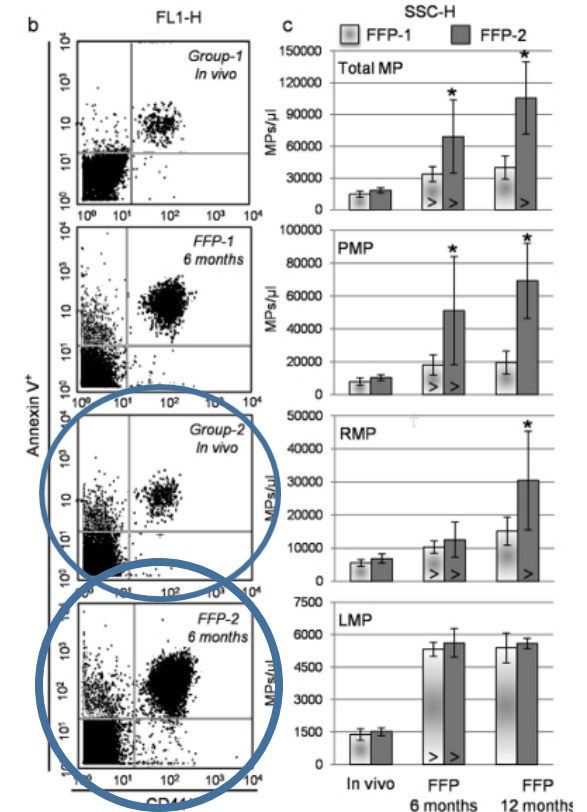
- 1) Είναι το μοναδικό μόριο με το οποίο τα MVs συμμετέχουν στην αιμόσταση;
- 2) Είναι το κύριο μόριο με το οποίο τα MVs συμμετέχουν στην αιμόσταση;
- 3) Συμμετέχει στη μεταφορά κυστιδιακού υλικού σε κύτταρα στόχους;
- 4) Είναι ένα γενικό μόριο χαρακτηρισμού των μικροκυστιδίων καθώς υπάρχει στην επιφάνεια όλων;

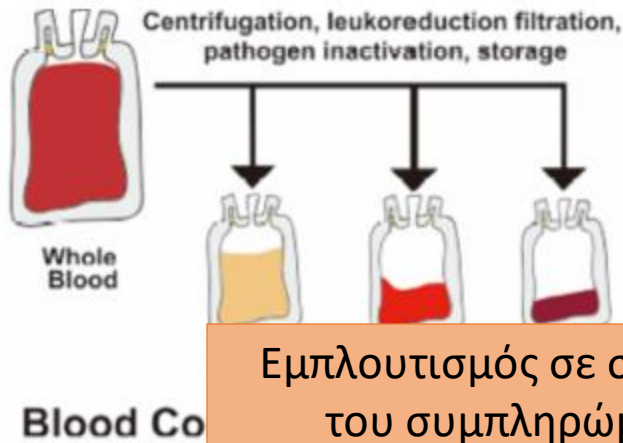
Τι κυστίδια έχουν βρεθεί στο FFP και το κρυοκαθίζημα;

1. Μικροκυστίδια κυρίως αιμοπεταλίων.
2. Παράγονται κατά την παρασκευή (φυγοκέντρωση).
3. Στη βαθιά κατάψυξη/απόψυξη τα μικροκυστίδια αυξάνονται εάν στο παράγωγο υπάρχουν κύτταρα αίματος!
4. Προκαλούν θρομβωτικά επεισόδια.

Το FFP που προέρχεται από φυγοκέντρωση ολικού αίματος στους 4°C, χωρίς την παραγωγή αιμοπεταλίων, περιέχει περισσότερα μικροκυστίδια αιμοπεταλιακής προέλευσης.

Μία μονάδα κρυοκαθιζήματος περιέχει αριθμό μικροκυστιδίων ίσο με 4×10^9 PLTs

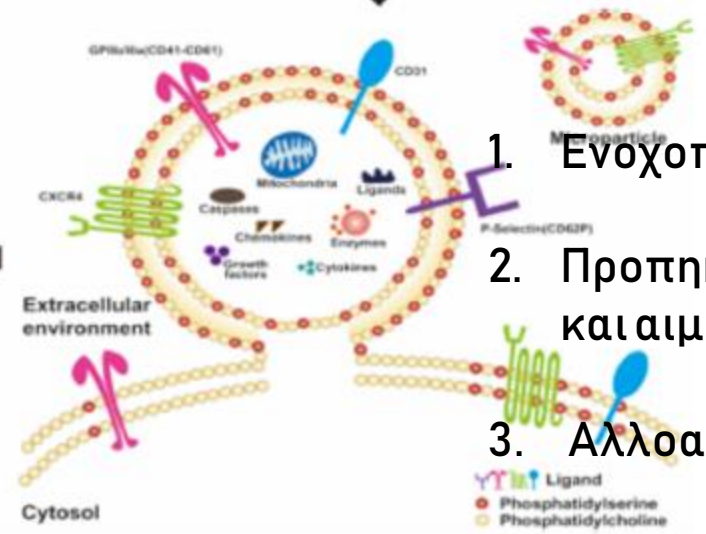
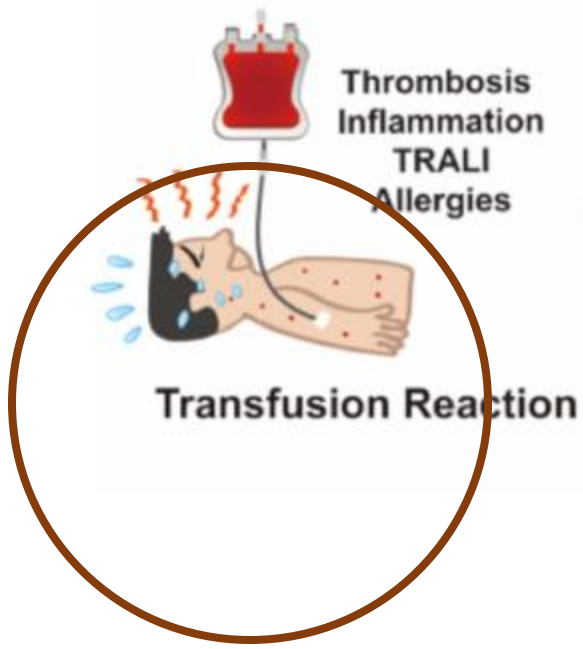




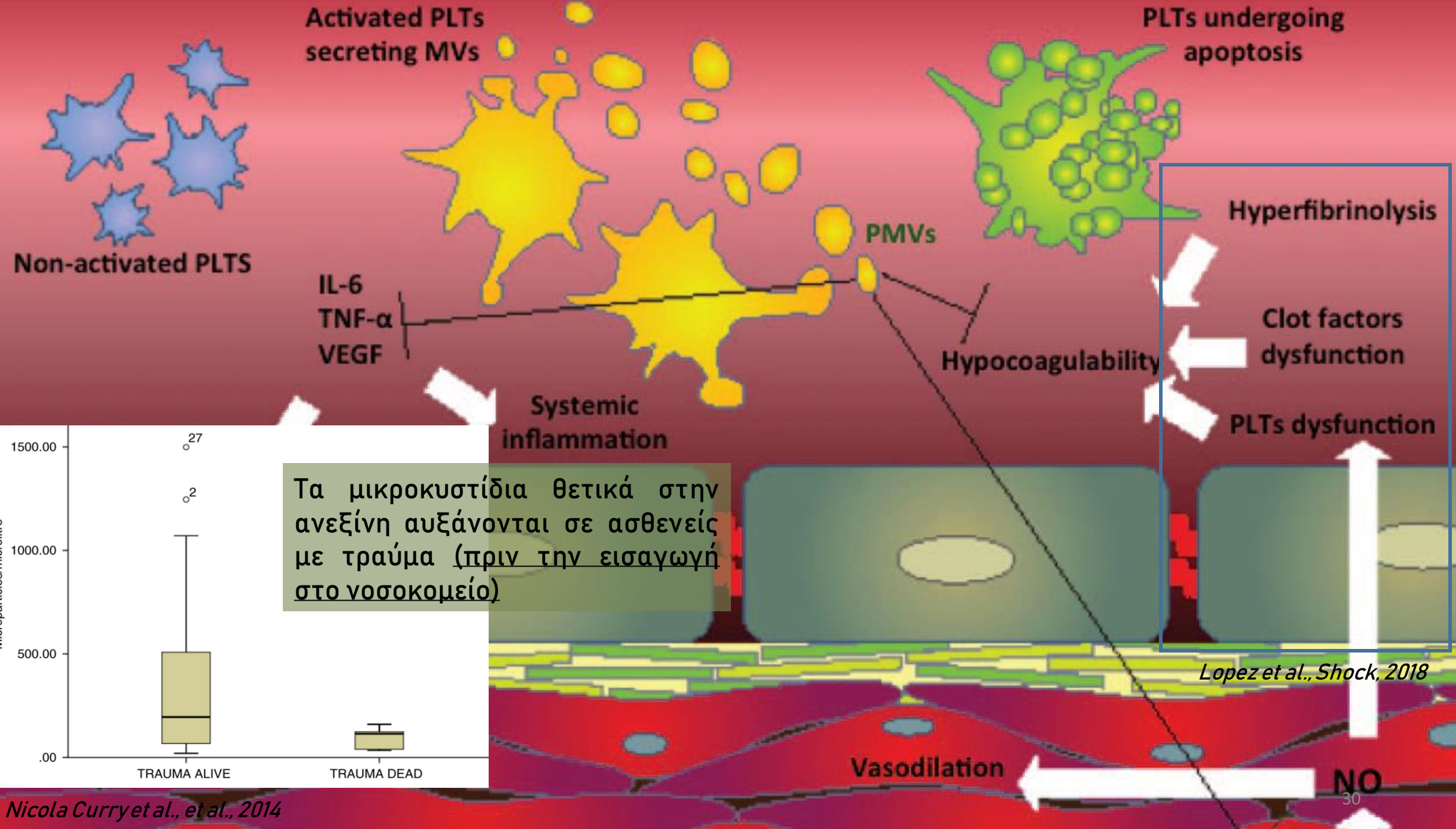
εις από

Εμπλουτισμός σε συστατικά του συμπληρώματος.

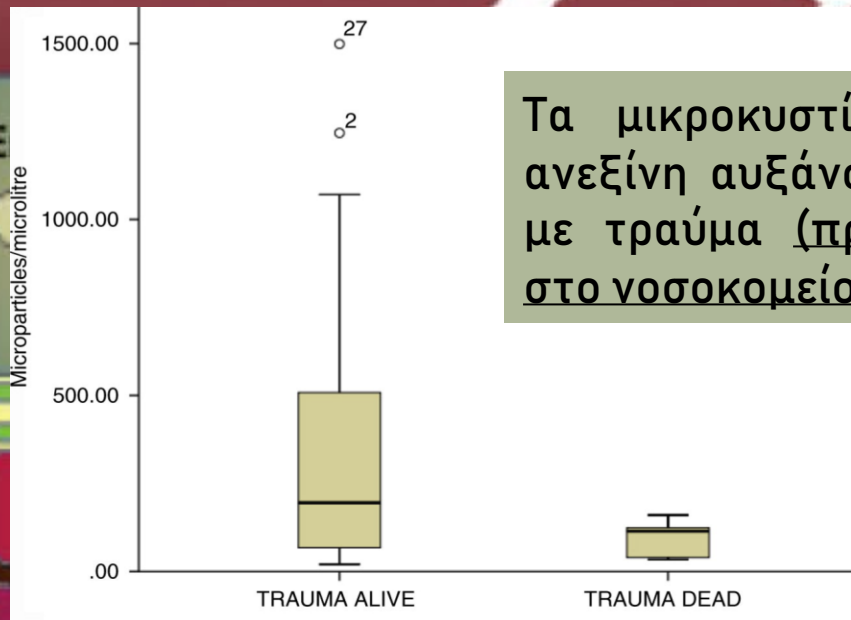
Έκφραση φωσφατιδυλοσερίνης, ανοσοσφαιρινών και TF.



1. Ενοχοποιούνται για TRALI & TRIM.
2. Προπηκτικές, ανοσοκατασταλτικές, αλλεργικές και αιμολυτικές αντιδράσεις.
3. Αλλοανοσοποίηση και αγγειοσυστολή.
4. Παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών.



Τα μικροκυστίδια θετικά στην ανεξίνη αυξάνονται σε ασθενείς με τραύμα (πριν την εισαγωγή στο νοσοκομείο)

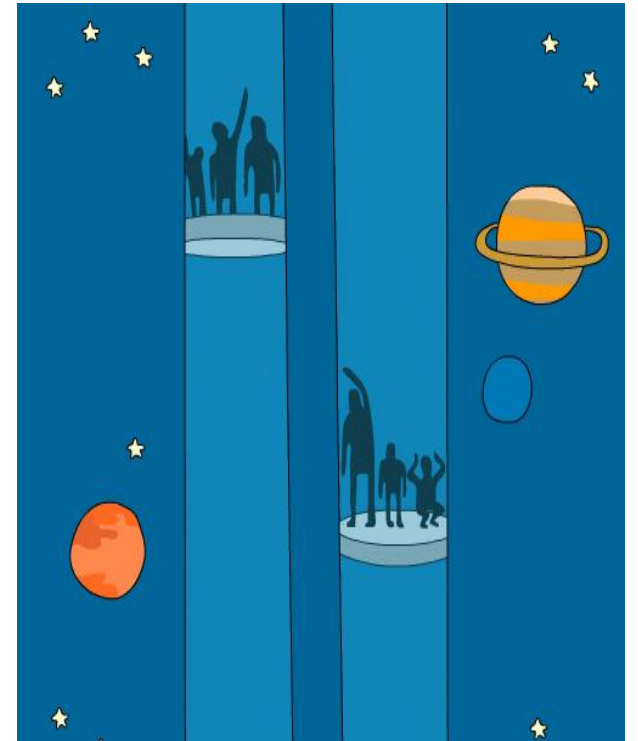


Lopez et al., Shock, 2018

Μελλοντικές προτάσεις

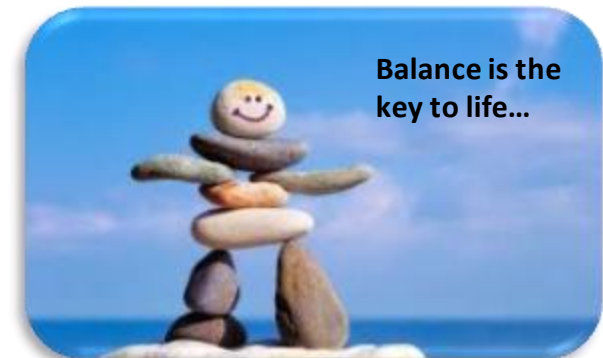
Να αναπτυχθούν τεχνολογίες και μέθοδοι για:

- την αφαίρεση των μικροκυστιδίων από τα παράγωγα αίματος στους τακτικά μεταγγιζόμενους ασθενείς *(θαλασσαιμίες κ.α.)*.
- Τον εμπλουτισμό των παραγώγων αίματος με μικροκυστίδια στη μαζική μετάγγιση / τραύμα.



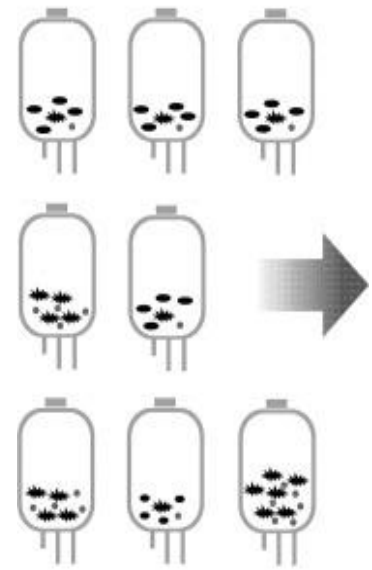
Η) Η παρουσία των ΜΝs στα παράγωγα αίματος:

- 1) Είναι επιβλαβής γιατί οδηγεί σε μετα-μεταγγισιακές επιπλοκές (θρομβωτικά επεισόδια, ανοσοκαταστολή, αλλοανοσοποίηση κα.);
- 2) Είναι επωφελής λόγω της αντι-φλεγμονώδους και ινωδολυτικής τους ικανότητας;
- 3) Ισχύουν όλα και δεν ισχύει τίποτα από τα παραπάνω.

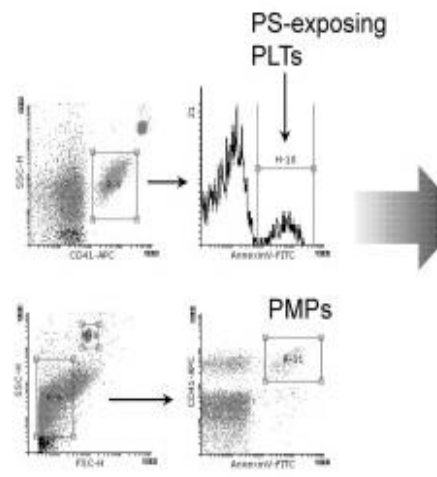


Τι προτείνεται για τα παράγωγα αίματος και τη μετάγγιση ;

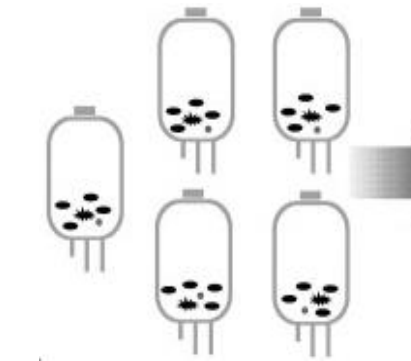
Αιμοπετάλια



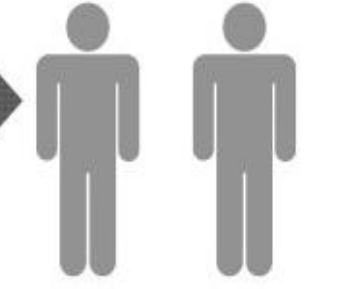
Μέτρηση PS στα μικροκυστίδια και στα PLTs



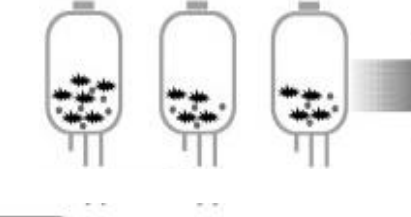
Μειωμένη έκφραση PS στα MVs & PLTs



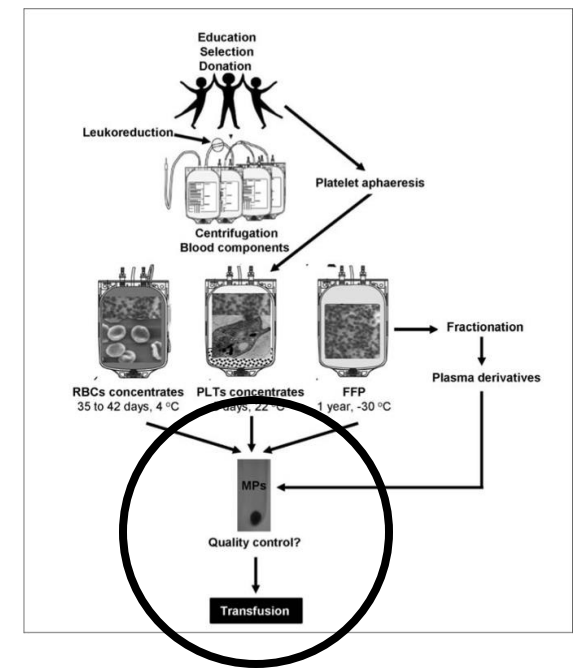
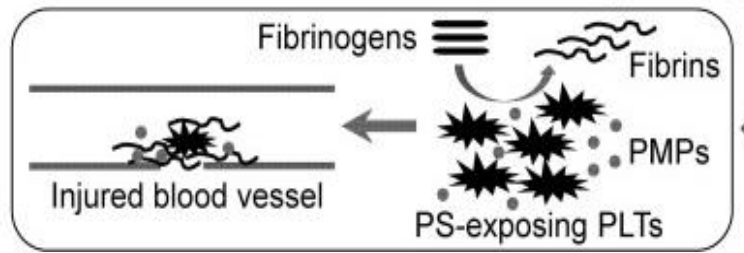
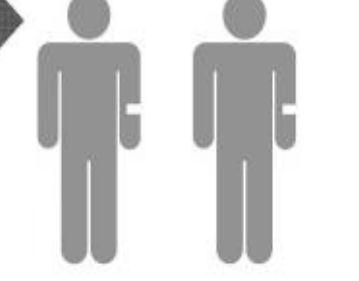
Ασθενείς χωρίς αιμορραγία



Αυξημένη έκφραση PS στα MVs & PLTs



Ασθενείς με ενεργό αιμορραγία



Kriebardis et al., 2012, Blood Transfusion

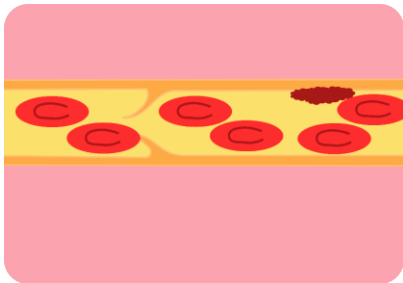
Μικροκυστίδια

Θρόμβωση

Προ-φλεγμονώδη
Προ-θρομβωτικά

Αιμορραγία

Αντι-φλεγμονώδη
Αντι-θρομβωτικά



Take home message ... Μικροκυστίδια

1. Απελευθερώνονται από όλα τα κύτταρα και είναι άφθονα στην κυκλοφορία του αίματος.
2. Υπάρχουν στα παράγωγα του αίματος.
3. Η αιμοληψία, η παρασκευή και η αποθήκευση επηρεάζουν την κυστιδιοποίηση.
4. Αιμοεπαγρύπνηση: δεν είναι ακόμα γνωστή η παραγωγή μικροκυστιδίων από τις νέες τεχνολογίες παρασκευής παραγώγων αίματος (*αδρανοποίηση, βαθεία κατάψυξη κυττάρων κ.α.*).
5. Χρειάζονται κλινικές μελέτες για τις παθολογικές επιπτώσεις της μετάγγισης από μικροκυστίδια.
6. Συμβάλλουν αποτελεσματικά στην αιμορραγία.

