



**ΕΘΝΙΚΟ ΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ &  
ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΤΙΣ ΡΕΥΜΑΤΙΚΕΣ  
ΝΟΣΟΥΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

της

**Ελένης Ταμπάκη (Α.Μ.:2010165)**

**ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ ΑΘΗΝΑ 2013**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κουτσιλιέρης Μ. Καθηγητής**

**Κοτσιφάκη Ελένη, Αν. Καθηγήτρια**

**Μαυραγάνη Κ., Επίκουρη Καθηγήτρια**

## **ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ**

**Κοτσιφάκη Ελένη, Αν. Καθηγήτρια**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ.....	6
1.1 Ορισμός- Μορφολογία.....	6
1.2 Προέλευση Μικροσωματιδίων.....	7
1.3 Μηχανισμός Παραγωγής Μικροσωματιδίων.....	7
1.4 Σύγκριση Μικροσωματιδίων, Εξωσωμάτων και Αποπτωτικών Σωμάτων.....	12
1.4.1 Μικροσωματίδια VS Εξωσώματα.....	12
1.4.2 Μικροσωματίδια VS Αποπτωτικά Σώματα.....	16
1.5 Περιεχόμενο Μικροσωματιδίων.....	17
1.6 Μέτρηση μικροσωματιδίων –Κυτταρομετρία ροής.....	21
1.7 ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΡΕΥΜΑΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ.....	24
1.7.1 ΠΗΞΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ.....	25
1.7.2 ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	27
1.7.3 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ.....	28
1.7.4 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ.....	30
1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΡs ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ.....	35
1.8.1 Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος.....	39
1.8.2 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ.....	42
1.8.3 ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (APS).....	42
1.8.4 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (Systemic sclerosis).....	43
1.8.5 ΑΓΓΕΙΙΤΙΔΕΣ.....	44
1.9 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	45
1.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	47

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «ΜΟΡΙΑΚΗ & ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέπουσα την Αν. Καθηγήτρια Κοτσιφάκη Ελένη. Κύριο αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση του ρόλου των μικροσωματιδίων στις ρευματικές νόσους.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

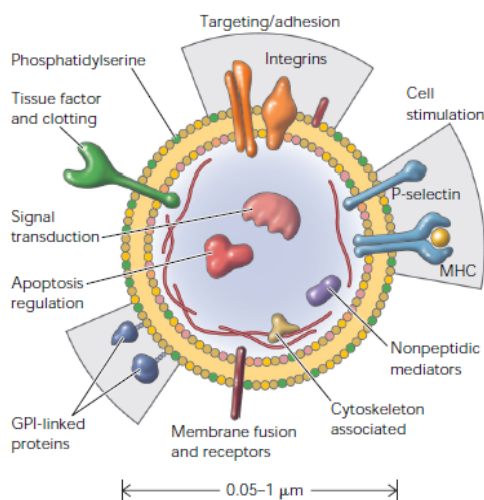
Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η ομοιόσταση είναι το αποτέλεσμα μιας λεπτής ισορροπίας μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εκφυλισμού (degenerescence). Τα κύτταρα διαφοροποιούνται, πολλαπλασιάζονται, επιτελούν συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες και στη συνέχεια υποβάλλονται σε προγραμματισμένο θάνατο ώστε τελικά να εκκαθαριστούν (clearance) μέσω της φαγοκυττάρωσης. Σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής το κύτταρο υποβάλλεται σε ποικίλα ερεθίσματα που οδηγούν στην απελευθέρωση μικρών θραυσμάτων της μεμβράνης, στα οποία συνήθως αποδίδεται ο όρος «μικροσωματίδια» (microparticles, **MPs**) ή «μικροκυστίδια». Τα μικροσωματίδια είναι μεγέθους 0,1 – 1,0 μm και καθώς αποκόπτονται από τα κύτταρα περιέχουν πυρηνικά, κυτταροπλασματικά και μεμβρανικά μόρια χαρακτηριστικά των προγονικών τους κυττάρων. Τα μόρια αυτά περιλαμβάνουν κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, μόρια προσκόλλησης, DNA, RNA και πυρηνικές πρωτεΐνες. Παρά το γεγονός ότι οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη δημιουργία MPs δεν είναι γνωστοί, τα βασικά στάδια που καθορίζουν τη διαδικασία επιγραμματικά είναι: η δημιουργία κυτταροπλασματικής προεξοχής, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η απώλεια της μεμβρανικής φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας και έκθεση στο εξωτερικό του κυττάρου της φωσφατιδυλοσερίνης με τον σχηματισμό μικροσωματιδίων να έπεται της δημιουργίας «φουσαλίδων» επάνω στην κυτταρική επιφάνεια κατά την εξέλιξη της απόπτωσης.

Η απελευθέρωση των μικροσωματιδίων αποτελεί φυσιολογικό μηχανισμό όλων δυνητικά των κυττάρων που εμποδίζει την αναγνώριση τους από τα μακροφάγα και την επακόλουθη φαγοκυττάρωσή. Μετά από ενεργοποίηση ή κάτω από συνθήκες κυτταρικού stress όπως η απόπτωση ή η φλεγμονή, η διαδικασία αυτή επιτείνεται και αυξάνεται η παραγωγή μικροσωματιδίων. Η δημιουργία των μικροσωματιδίων αντανακλά τη δυναμική ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού-επέκτασης, διέγερσης και θανάτου .

Τα μικροσωματίδια, που αρχικά θεωρήθηκαν αδρανή υπολείμματα του κυτταρικού θανάτου, φαίνεται ότι τελικά αποτελούν δομές με ποικίλες βιολογικές δράσεις και εμπλέκονται τόσο στην φυσιολογία όσο και στην παθογένεση ασθενειών. Έτσι αποτελούν διαμεσολαβητές της κυτταρικής επικοινωνίας μεταφέροντας πλήθος κυτταρικών συστατικών, αλλά και διεργασιών όπως είναι η φλεγμονή, η πήξη, η ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, η αντιγονοπαρουσίαση καθώς και η απόπτωση, μεταξύ πολλών άλλων.

Συγκεκριμένα, οι προ-φλεγμονώδεις και προ-θρομβωτικές ιδιότητες που τους αποδίδονται πλέον, μπορούν να επηρεάσουν την παθογένεση και την εξέλιξη τόσο των ρευματικών όσο και των ανοσοδιαμεσολαβούμενων ασθενειών (immune-mediated diseases). Στο πλαίσιο των ρευματικών ασθενειών, τα μικροσωματίδια φαίνεται να έχουν ρυθμιστική δράση τόσο στη θρόμβωση και τη φλεγμονή όσο και στην αγγειακή αντιδραστικότητα και την αγγειογένεση. Η παρατήρηση ότι, τα επίπεδα των μικροσωματιδίων στο αίμα ασθενών με ρευματική νόσο αυξάνουν δραστικά σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στο δείγμα ελέγχου, ενισχύει την άποψη ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και επιβεβαιώνει την εμπλοκή τους στην ανοσοπαθογένεια.

Καθώς το ενδιαφέρον για τα μικροσωματίδια αυξάνεται, απαιτούνται περισσότερες μελέτες -τόσο σε μοντέλα ζώων όσο και σε ασθενείς- που να διασαφηνίζουν τον ρόλο τους στην ανοσία, να παρέχουν σαφή στοιχεία για την εμπλοκή τους στην παθογένεια των ρευματικών νόσων και να επιβεβαιώνουν την δυνατότητά τους να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες αλλά και ως θεραπευτικοί στόχοι.



Εικόνα 1: Κυτταρικά μικροσωματίδια (Hugel B. et al, 2005)

## 1. ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

### 1.1 Ορισμός- Μορφολογία

Τα μικροσωματίδια περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1946 και αρχικά θεωρήθηκαν κυτταρικά «σκουπίδια» και ονομάζονταν «σκόνη αιμοπεταλίων». Αναφέρονταν δε ως κυστίδια με διάμετρο μικρότερη του 0,1 nm, χωρίς ιδιαίτερο ρόλο. (Wolf 1967).

Τα μικροσωματίδια αποτελούν πλέον σημαντικά συστατικά του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος του αίματος. Σήμερα ορίζονται ως το κλάσμα των μεμβρανικών κυστιδίων του αίματος που αποσπώνται από την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, είτε ως αποτέλεσμα μιας θεμελιώδους κυτταρικής διεργασίας –με στόχο τη διατήρηση της ομοιοστασίας– είτε στο πλαίσιο της κυτταρικής ενεργοποίησης και απόπτωσης.

Παρά την ετερογένειά τους στο μέγεθος, στην προέλευση, στο περιεχόμενο και στη σταθερότητα, ορίζονται ως τα μεμβρανικά κυστίδια του αίματος που στερούνται πυρήνα, έχουν μέγεθος που εμφανίζει εύρος από 0,1 έως 1,0 μm, και ενσωματώνουν πυρηνικά, κυτταροπλασματικά και μεμβρανικά μόρια, καθώς αποσπώνται από τα κύτταρα - διαδικασία που έπεται της δημιουργίας «φουσαλίδων» πάνω στην κυτταρική επιφάνεια (Distler et al 2005; Morel et al 2011; Van der Pol et al 2012, Burger et al 2013). Αν και έχουν χαρακτηριστικά κυττάρου (π.χ. μεμβρανοειδή δομή), είναι αρκετά μικρότερα σε μέγεθος και παρουσιάζουν ελλιπή σειρά των διαφόρων –ωμάτων (-omes) (π.χ. πρωτεώματος) τα οποία περιλαμβάνονται σε ένα κύτταρο (Pisetsky et al 2012).

Εκτός από τη συμμετοχή τους στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, θεωρούνται δομές με δυνητικά πολλαπλές βιολογικές δράσεις, ενώ υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι αποτελούν βασικούς μεσολαβητές στη διακυτταρική επικοινωνία (Distler et al 2005; Cocucci et al 2009). Οι υποκυτταρικοί αυτοί σχηματισμοί μπορούν να μεταφέρουν μια σειρά δραστικών μορίων μεταξύ των κυττάρων και να ρυθμίσουν διαδικασίες όπως είναι η φλεγμονή, η λοίμωξη, η πήξη, η θρόμβωση, η αγγειακή λειτουργία, η απόπτωση (Distler et al 2005; Pisetsky et al 2012). Στο πλαίσιο αυτών των ιδιοτήτων τους τα μικροσωματίδια φαίνεται να εμπλέκονται και στην παθογένεια ασθενειών του ανοσοποιητικού συστήματος και να λειτουργούν ως μοναδικά στοιχεία σηματοδότησης στην παθογένεια των ρευματικών νόσων (Ardoin et al 2007).

## 1.2 Προέλευση Μικροσωματιδίων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα μικροσωματίδια προκύπτουν από ενεργοποιημένα κύτταρα ή κύτταρα που υφίστανται απόπτωση και αποκόπτονται από την μεμβράνη τους ως σχηματισμένες δομές (Distler et al 2005, Flaumenhaft et al 2006; Bayer and Pisetsky 2010; Morel et al 2011).

Παρά το γεγονός ότι η πλειοψηφία των μικροσωματιδίων στο αίμα προέρχεται από τα αιμοπετάλια (**PMPs**) (Hugel et al 2005; Distler et al 2005; Ardoin et al 2007), και οι κλινικές έρευνες έχουν εστιαστεί κυρίως στην παραγωγή μικροσωματιδίων από κύτταρα του αιμοποιητικού (αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα, και λευκοκύτταρα) (Rautou et al 2011; Tissot et al 2010) και κύτταρα του αγγειακού συστήματος (Rautou et al 2011) –συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών κυττάρων- θεωρητικά, κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο που υφίσταται ενεργοποίηση ή θάνατο μπορεί να παράγει μικροσωματίδια. (Piccin et al 2007; Distler et al 2005; Nomura et al 2008). Ως εκ τούτου, ο σχηματισμός των μικροσωματιδίων αντιπροσωπεύει μία θεμελιώδη κυτταρική απόκριση, η οποία επηρεάζει τόσο το παραγόμενο μικροσωματίδιο, όσο και τα κύτταρα-στόχους με τα οποία αλληλεπιδρά (Gyorgy et al 2011; Distler et al 2005; Pisetsky et al 2012). Άλλα κύτταρα, μεταξύ των οποίων καρκινικά (Zahra et al 2011), λεία μυϊκά κύτταρα (Rautou et al 2011) και υμενοκύτταρα, μπορούν επίσης να παράγουν μικροσωματίδια, με τη διαφορά ότι αυτά είναι πιο εύκολα ανιχνεύσιμα στον ιστό προέλευσης ή σε περιοχές φλεγμονής (π.χ. στον αρθρικό υμένα ή το αρθρικό υγρό) παρά στο αίμα ( Distler et al 2005, Ardoin et al 2008).

Τα PMPs, που είναι η κυριότερη πηγή μικροσωματιδίων στο αίμα, προκύπτουν κυρίως μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αν και ο σχηματισμός τους από τα μεγακαρυοκύτταρα θεωρείται επίσης πιθανός (Flaumenhaft et al 2009). Δεδομένου ότι αποτελούν το όχημα μεταφοράς μορίων με προπηκτικές ιδιότητες, όπως είναι για παράδειγμα ο ιστικός παράγοντας (tissue factor ,TF), φαίνεται να προάγουν τη θρόμβωση (Mause et al 2005), με αποτέλεσμα να παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιαγγειακή νόσο, συμπεριλαμβανομένων και των ταχέως εξελισσόμενων μορφών που συνοδεύουν τις αυτοάνοσες νόσους (Knijff-Dutmer et al 2002).

## 1.3 Μηχανισμός Παραγωγής Μικροσωματιδίων

Στα εμπυρήνα κύτταρα, η απελευθέρωση των μικροσωματιδίων πραγματοποιείται, όπως έχει αναφερθεί, κατά την ενεργοποίηση ή κατά την αρχή της απόπτωσης. Μια σειρά ερεθισμάτων έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για το σχηματισμό ή

και την αναστολή της δημιουργίας των μικροσωματιδίων. Η γνώση αυτή στηρίζεται ως επί το πλείστον σε πειραματικά δεδομένα από *in vitro* μελέτες κυτταρικών σειρών.

Η απελευθέρωση μικροσωματιδίων από τα **αιμοπετάλια** φαίνεται να προκύπτει άμεσα από την ενεργοποίηση, αν και η διαδικασία μπορεί να είναι παρόμοια με εκείνη που συμβαίνει κατά την απόπτωση (Beyer and Pisetsky 2010).

Στα αιμοπετάλια, προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα όπως ο LPS (λιποπολυσακχαρίτης) (Stahl et al 2011), ο διαλυτός προσδέτης CD-40 (Prasad et al 2003), και κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και η ερυθροποιητίνη (Nomura et al 2000), μπορούν δυνητικά να προκαλέσουν τη δημιουργία «φουσαλλίδας» και την απελευθέρωση MPs. Επιπρόσθετα, μπορούν να επάγουν το ίδιο αποτέλεσμα διάφοροι μεσολαβητές της πήξης, συμπεριλαμβανομένης της θρομβίνης (Terrisse et al 2010), του κολλαγόνου (Takano et al 2004) και του πεπτιδίου –ενεργοποιητή του υποδοχέα της θρομβίνης (TRAP, thrombin-receptor-activating peptide) (Tschuor et al 2008). Τέλος, η νοραδρεναλίνη (Tschuor et al 2008), ο ιονοφορέας ασβεστίου A23187 (Nomura et al 2000), το ADP και η υψηλή διαμητική πίεση (Azevedo 2012), φαίνεται επίσης να οδηγούν στο σχηματισμό μικροσωματιδίων. Αντιθέτως, η αναστολή του Syk (Lhermusier et al 2011) και η εποπροστενόλη (συνθετικό άλας της προστακυκλίνης) (Tamburelli et al 2011) φαίνεται να σχετίζονται με μείωση στο σχηματισμό MPs.

Όπως και στην περίπτωση των αιμοπεταλίων, διάφορα προ-φλεγμονώδη ερεθίσματα αποτελούν δυνητικά ερεθίσματα που οδηγούν στην δημιουργία MPs από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (**EMPs**). Ο TNF-α (Brown et al 2011; Peterson et al 2008), ο LPS (Del Turco et al 2007), η IL-1α (Abid Hussein et al 2007), η CRP (Devaraj et al 2011) φαίνεται να λειτουργούν ως ερεθίσματα για τη δημιουργία EMPs. Ομοίως, διάφοροι προπηκτικοί παράγοντες, όπως η θρομβίνη (Simoncini et al 2009), ο PAI-1 (Brodsky et al 2002) καθώς και μια σειρά ουρεμικών τοξινών (Faure et al 2006) φαίνεται να σχετίζονται με τη δημιουργία μικροσωματιδίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Άλλα ερεθίσματα, που φαίνεται επίσης να εμπλέκονται, είναι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης (Terrisse et al 2010), η Ang II (Burger et al 2011) η έλλειψη του αυξητικού παράγοντα [(Jimenez et al 2003 (b))] και οι ROS (Burger et al 2011). Στον αντίποδα, οι στατίνες (Burger et al 2011) και το NO έχουν κατασταλτική δράση στο μηχανισμό σχηματισμού EMPs.

Σειρά πειραματικών δεδομένων υποδεικνύουν διάφορα ερεθίσματα ικανά να οδηγήσουν στη δημιουργία MPs, τόσο στα λευκοκύτταρα –που αποτελούν άλλη μια σημαντική πηγή μικροσωματιδίων στο πλάσμα– όσο στα μονοκύτταρα, στα T-



κύτταρα και στα μακροφάγα (Terisse et al 2010; Ullal and Pisetsky 2010; Mastronardi et al 2011).

Στο πλαίσιο των ρευματικών νόσων, μπορούν να προκύψουν μικροσωματίδια από ουδετερόφιλα μετά την ενεργοποίηση των τελευταίων με ANCA αντισώματα (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) (Hong et al 2012). Τα μικροσωματίδια που προκύπτουν, περιέχουν ένζυμα των ουδετεροφίλων, όπως μυελοπεροξυδάση (MPO) και πρωτεΐνωση -3 (PR3), που αποτελούν βασικούς αντιγονικούς στόχους στη συστηματική αγγειίτιδα.

Καθώς ορισμένα από τα ερεθίσματα που μπορούν να οδηγήσουν στην απελευθέρωση των μικροσωματιδίων (όπως η ενδοτοξίνη) δύνανται επίσης να προκαλέσουν απόπτωση, η παραγωγή των μικροσωματιδίων λόγω έντονης ενεργοποίησης θα μπορούσε στην πραγματικότητα να είναι άμεση συνέπεια της απόπτωσης (Beyer and Pisetsky 2010).

Ο σχηματισμός των MPs έπεται της δημιουργίας «φυσάλιδας» στην κυτταροπλασματική επιφάνεια του κυττάρου [Morel et al 2011 (a)]. Κατά την δημιουργία της «φυσάλιδας», η μεμβράνη του κυττάρου σχηματίζει κυτταροπλασματικές προεξοχές, οι οποίες μπορούν να αποσπαστούν από το κύτταρο με σχάση του μεμβρανικού μίσχου (stalk fission). Παρά το γεγονός ότι οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη δημιουργία MPs - και έχουν προκύψει κατά κύριο λόγο από *in vitro* έρευνες- δεν είναι γνωστοί, τα βασικά στάδια που καθορίζουν τη διαδικασία επιγραμματικά είναι: η δημιουργία κυτταροπλασματικής προεξοχής, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η απώλεια της μεμβρανικής φωσφολιπιδικής ασυμμετρίας και η ενεγοποίηση των 3 ενζύμων, φλιπάση, φλοπάση και σκραμπλάση.

Στα κύτταρα σε φάση ηρεμίας, η φωσφολιπιδική κατανομή της πλασματικής διπλοστοιβάδας χαρακτηρίζεται από ασυμμετρία με τα αμινοφωσφολιπίδια [φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλοινωσιτόλη] να εντοπίζονται στην εσωτερική στοιβάδα και τα ουδέτερα φωσφολιπίδια στην εξωτερική.

Η λιπιδική αρχιτεκτονική της μεμβράνης ρυθμίζεται από μια σειρά ενζύμων: 1) την αμινοφωσφολιπιδική τρανσλοκάση ή **φλιπάση**, ειδική για την προς τα μέσα κατεύθυνση της φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από υψηλά επίπεδα ασβεστίου (Belenzay et al 1993; Fox et al 1991) 2) τη **φλοπάση**, η οποία καταλύει την προς τα έξω κίνηση της

φωσφατιδυλοσερίνης κατά την κυτταρική ενεργοποίηση (Connor et al 1992) και 3) τη λιπιδική **σκραμπλάση**, που προωθεί την μη ειδική, αμφίδρομη ανακατανομή των φωσφολιπιδίων κατά μήκος της διπλοστοιβάδας και ενεργοποιείται κατά την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου (Hugel et al, 2005; Zwaal and Bevers 1993). Απουσία ερεθισμάτων και σε κανονικές συγκεντρώσεις ασβεστίου, μόνο η φλιπάση είναι ενεργή επιτρέποντας την εντόπιση των αμινοφωσφολιπιδίων στο εσωτερικό της στοιβάδας. Μια σημαντική και σταθερή αύξηση του κυτοσολικού  $Ca^{2+}$ , ταυτόχρονα με την διέγερση των κυτάρων από πλήθος ερεθισμάτων μπορεί να οδηγήσει στην κατάρρευση της ασυμμετρίας της μεμβράνης μέσω της διέγερσης των δραστηριοτήτων της σκραμπλάσης και της φλοπάσης και της ταυτόχρονης αναστολής της φλιπάσης --αλλαγές που ευνοούν τον σχηματισμό των μικροσωματιδίων.

Η πιο αξιοσημείωτη αλλαγή στην κατανομή των λιπιδίων είναι η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (Hugel et al, 2005). Το γεγονός αυτό κατά την απόπτωση έχει σημαντικές βιολογικές επιπτώσεις, καθώς μπορεί να ενεργοποιήσει τόσο την πήξη όσο και την πρόσληψη των κυτάρων που βρίσκονται στη φάση θανάτου (και πιθανώς και των μικροσωματιδίων) από τα μακροφάγα με ενδοκύτωση ( Zwaal and Bevers 1983, Willekens et al 2005; Terrisse et al 2010; Hanayama et al 2002; Beyer and Pisetsky 2010).

Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου –εκτός από την τροποποίηση της δραστηριότητας των πρωτεϊνών που διατηρούν την ασυμμετρία της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας– ενεργοποιεί ασβεστιο-εξαρτώμενες ενζυμικές πρωτεάσες, όπως η κυστεινική πρωτεϊνάση **καλπαΐνη** (η οποία απελευθερώνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και διασπά τα κυτταροσκελετικά ινίδια συμβάλλοντας στην αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης) (Shcherbina et al 1999) και η **γκελσολίνη** (η οποία κόβει τα ινίδια της ακτίνης διευκολύνοντας την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση).

Η απελευθέρωση των μικροσωματιδίων κατά την απόπτωση εξαρτάται από τις Rho-πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις Rho-εξαρτώμενες κινάσες ROCK 1 (VanWijk et al 2003). Στα αποπτωτικά κύτταρα, οι Rho-εξαρτώμενες κινάσες (οι οποίες εμπλέκονται στην οργάνωση της ακτίνης και στην αλληλεπίδραση του κυτταροσκελετού με ενδοκυττάρια μεμβράνες) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία πλασματικών «φουσαλίδων» και στη μετεγκατάσταση των θραυσμάτων

DNA μέσα σε αυτές καθώς και στα αποπτωτικά σωματίδια ( Sebbagh et al 2001; Coleman et al 2001).

Έρευνες παρέχουν ενδείξεις ότι σε αυτή τη μετεγκατάσταση της PS μετέχει και η εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ είναι πιθανή η ύπαρξη ασβεστιο-εξαρτώμενων μηχανισμών για την απελευθέρωση των μικροσωματιδίων, πέραν αυτών που εξαρτώνται από την καλπαΐνη [Morel et al (a) 2011].

Η απελευθέρωση των μικροσωματιδίων πραγματοποιείται, σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί, κατά την ενεργοποίηση ή κατά την αρχή της απόπτωσης. Όπως έγινε γνωστό από *in vitro* συστήματα, κατά την απόπτωση η απελευθέρωση των μικροσωματιδίων έπεται της αρχικής δημιουργίας «φουσαλίδων» στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης [Morel et al 2011 (a)]. Η διαδικασία της δημιουργίας «φουσαλίδων» εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση των ελαφριών αλυσίδων της μιοσίνης --διαδικασία που διαμεσολαβείται από τις Rho πρωτεϊνικές κινάσες (Mills et al 1998; Sebbagh et al 2001). Είναι σημαντικό το ότι, ενώ εκατοντάδες «φουσαλίδες» σχηματίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, μόνο μερικά μικροσωματίδια απελευθερώνονται από κάθε κύτταρο (Pisetsky et al 2012)

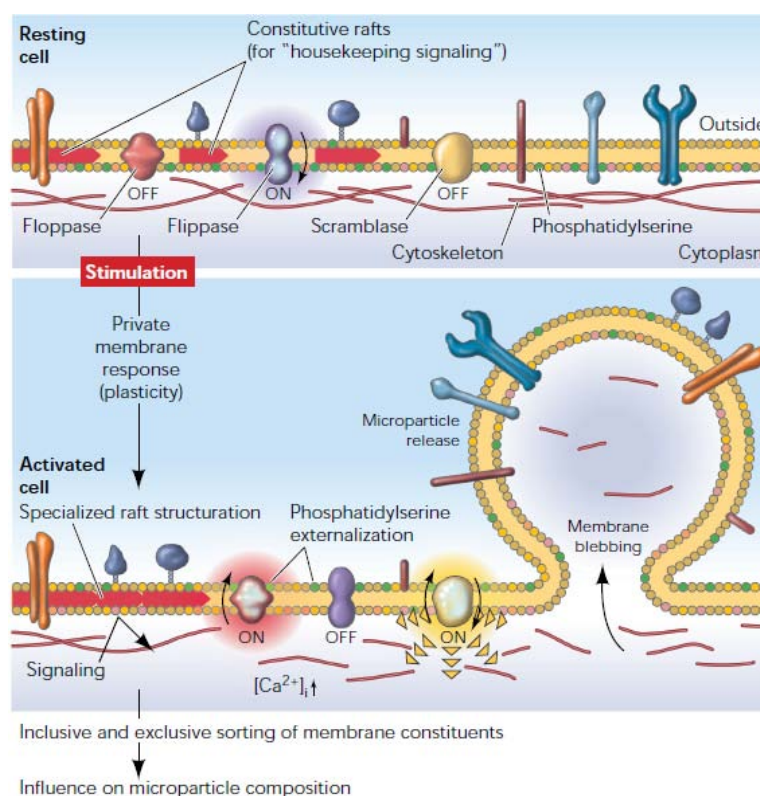
Η λειτουργία της «φουσαλίδας» (και ακολούθως της απελευθέρωσης του σωματιδίου) δεν είναι κατανοητή, αλλά εικάζεται ότι αυτή η διαδικασία μπορεί να ρυθμίζει τον όγκο του κυττάρου κατά την αποπτωτική συρρίκνωση (Pisetsky et al, 2012).

Σε αντίθεση με τον ουσιαστικά αδιευκρίνιστο μηχανισμό δημιουργίας «φουσαλίδων», ο σχηματισμός των μικροσωματιδίων, όπως και των αποπτωτικών σωμάτων, μπορεί να αποτελεί βασική στρατηγική του κυττάρου στην διαδικασία διευθέτησης των συνεπειών του κυτταρικού θανάτου (Willekens et al 2005; Munoz et al 2010) Ίσως η δημιουργία MPs διευκολύνει την εκκαθάριση των κυτταρικών υπολειμμάτων.

Εικάζεται ότι το μικρό μέγεθός τους και η συμπαγής δομή τους τα καθιστά πιο «ελκυστικά» για τα φαγοκύτταρα, τα οποία στρατολογούνται προκειμένου να μειώσουν τις προ-θρομβωτικές και προ-φλεγμονώδεις διαδικασίες που πυροδοτεί ο κυτταρικός θάνατος. Είναι ωστόσο πιθανό, τα MPs να καταφέρουν να ξεφύγουν της εκκαθάρισης –ακριβώς λόγω του μικρού μεγέθους τους συγκριτικά με τα μεγαλύτερα αποπτωτικά σώματα- και να μεταφέρουν βιολογικά ενεργές ουσίες από τον τόπο του θανάτου σε απομακρυσμένες περιοχές. Ωστόσο, όταν υπάρχει υπερπαραγωγή ή

κάποιου είδους δυσλειτουργία του μηχανισμού, τότε δημιουργούνται οι προϋποθέσεις για την ανάπτυξη αυτοανοσίας ( Batoo et al 2013).

Ο σχηματισμός των μικροσωματιδίων μπορεί επίσης να βοηθήσει τα κύτταρα να αποτοξινωθούν, καθώς επιβλαβείς ουσίες (συμπεριλαμβανομένων των χημειοθεραπευτικών ή ενεργοποιημένων κασπασών) «συσκευάζονται» για να αφαιρεθούν (Husein et al 2007; Golden – Baron et al 2011; Pisetsky et al, 2012).



Εικόνα 2: Η απόκριση της πλασματικής μεμβράνης στη κυτταρική διέγερση (Hugel et al, 2005)

## 1.4 Σύγκριση Μικροσωματιδίων, Εξωσωμάτων και Αποπτωτικών Σωμάτων

Τα μικροσωματίδια αντιπροσωπεύουν μόνο έναν τύπο κυστιδίων που απελευθερώνονται από τα κύτταρα. Τα άλλα βασικά είδη κυστιδίων είναι τα **εξωσώματα** και τα **αποπτωτικά σώματα** (Distler et al, 2005; Gyorgy et al, 2011)

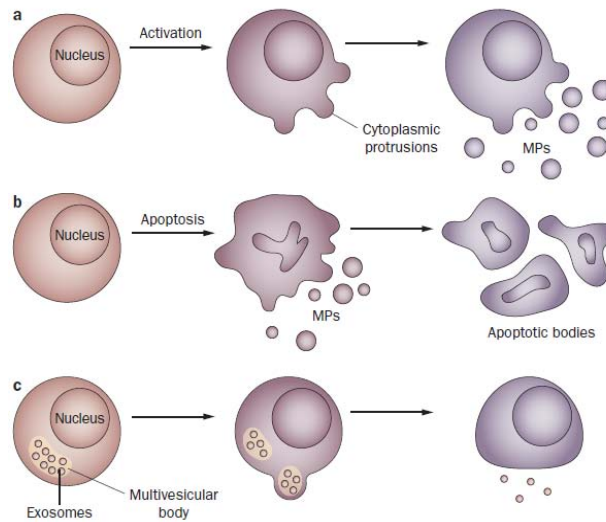
### 1.4.1 Μικροσωματίδια VS Εξωσώματα

Σε αντίθεση με τα μικροσωματίδια, που σχηματίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου, τα εξωσώματα παράγονται εσωτερικά. Πρόκειται για προσχηματισμένα κυστίδια, που προκύπτουν μέσα από μια πολυσύνθετη διαδικασία (Mathivanan et al

2010), είναι οργανωμένα σε πολυκυστιδικά σώματα και απελευθερώνονται με εξωκύτωση στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μετά από σύντηξη των τελευταίων με την κυτταρική μεμβράνη (Denzer et al 2000 (b); Stoorvogel et al 2002; Distler et al, 2005). Τα εξωσώματα είναι μικρότερα και πιο ομοιογενή στο μέγεθος από τα μικροσωματίδια, με διάμετρο που κυμαίνεται από 40 έως 100 nm (Stoorvogel et al 2002) και επικαλύπτονται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα (Distler et al 2005; Blanchard et al 2002). Η απελευθέρωσή τους από τα ευκαρυωτικά κύτταρα, είτε αποτελεί μέρος των βασικών κυτταρικών λειτουργιών, είτε προκύπτει μετά από ενεργοποίηση (Mathivanan et al 2010; Gyorgy et al 2011). Τα εξωσώματα – όπως και τα μικροσωματίδια – εκθέτουν επιφανειακούς υποδοχείς που καθορίζονται από το γονικό κύτταρο (Denzer et al 2000; Blanchard et al 2002; Gasser et al 2003; Distler et al 2005). Ανιχνεύονται στο πλάσμα, στα ούρα, στο μητρικό γάλα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage fluid, BAL) (Simpson et al 2008).

Τα εξωσώματα περιέχουν μόνο κυτοσολικά συστατικά, ενώ δεν περιέχουν πρωτεΐνες από οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο ή το σύστημα Golgi. Τα εξωσώματα μπορούν επίσης να φέρουν RNA για τη μεταφορά πληροφοριών σε άλλα κύτταρα και ρυθμιστικό mi-RNA, αλλά δεν περιέχουν καθόλου πυρηνικά μόρια. (They et al 2002; Gyorgy et al 2011).

Αν και προκύπτουν από το εσωτερικό των κυττάρων, τα εξωσώματα μόλις εγκαταλείψουν τα κύτταρα μπορούν να είναι λειτουργικά ενεργά και να αποκτήσουν ανοσολογικές ιδιότητες διεγείροντας το επίκτητο ή ειδικό σκέλος της ανοσίας. Για παράδειγμα, τα εξωσώματα που προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα μπορούν να συνδεθούν με τα θυλακικά δένδριτικά κύτταρα και να λειτουργήσουν στην αντιγονοπαρουσίαση [Denzer et al 2000 (b)], ενώ τα εξωσώματα από τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα μπορούν να μεσολαβήσουν στην θανάτωση συγκεκριμένων κυττάρων (Monleon et al 2001; Distler et al, 2005).



Εικόνα 3: Ο σχηματισμός και η απελευθέρωση των μικροσωματιδίων, των εξωσωμάτων και των αποπτωτικών σωμάτων: α) τα μικροσωματίδια προκύπτουν από την εξωτερική προεξοχή της μεμβράνης του κυττάρου κατά την κυτταρική ενεργοποίηση ή απόπτωση. Η δημιουργία «φουσαλίδας», η αποβολή και η αποκοπή από την κυτταρική μεμβράνη αποτελούν σημαντικά βήματα της δημιουργίας μικροσωματιδίων. β) Η συρρίκνωση του κυττάρου, χαρακτηριστικό γνώρισμα της απόπτωσης, οδηγεί στην παραγωγή αποπτωτικών σωμάτων. Οι αποπτωτικές «φουσαλίδες» περιέχουν υπολείμματα από τις διαδικασίες αποδόμησης (degradation) κατά την απόπτωση, συμπεριλαμβανομένων κυτταροπλασματικών και πυρηνικών συστατικών. γ) Τα εξωσώματα προέρχονται από πολυκυστιδικά σώματα (Beyer C and Pisetsky D, 2010).

Πίνακας 1: Βασικά χαρακτηριστικά κυστιδίων μεμβράνης (Gyorgy B. et al, 2011)

	<b>ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ</b>	<b>ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΑ</b>	<b>ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΣΩΜΑΤΑ</b>
<b>Μέγεθος</b>	~ 50 – 100 nm	100 – 1.000 nm (~100 – 400 nm στο πλάσμα του αίματος)	1 – 5 μm
<b>Μηχανισμός παραγωγής</b>	Με εξωκύττωση των πολυκυστιδικών φορέων	Με «φουσαλίδα» στην πλασματική μεμβράνη	Με απελευθέρωση από τις «φουσαλίδες» των κυττάρων που υφίστανται απόπτωση
<b>Απομόνωση</b>	Διαφορική φυγοκέντρηση και κλίση συγκέντρωσης σακχαρόζης, 100.000 – 200.000 g, πυκνότητα κυστιδίου 1,13 – 1,19 g/ml	Διαφορική φυγοκέντρηση, 18.000 – 20.000 g	Δεν υπάρχουν θεσμοθετημένα πρωτόκολλα. Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν συγκαλλιέργεια με αποπτωτικά κύτταρα αντί της απομόνωσης των αποπτωτικών σωμάτων
<b>Ανίχνευση</b>	TEM, western blotting, φασματομετρία μάζας, κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομετρία ροής	Κυτταρομετρία ροής
<b>Βέλτιστη χαρακτηριζόμενη κυτταρική πηγή</b>	Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και όγκοι	Αιμοπετάλια, ερυθρά αιμοσφαίρια και ενδοθηλιακά κύτταρα	Κυτταρικές γραμμές
<b>Δείκτες</b>	Σύνδεση αννεξίνης V, CD63, CD81, CD9, LAMP1, TSG101	Σύνδεση αννεξίνης V, ιστικός παράγοντας (TF) και ειδικοί κυτταρικοί δείκτες	Σύνδεση αννεξίνης V, περιεκτικότητα DNA

### 1.4.2 Μικροσωματίδια VS Αποπτωτικά Σώματα

Τα αποπτωτικά σώματα αντιπροσωπεύουν τα συμπυκνωμένα υπολείμματα από τη συρρίκνωση των αποπτωτικών κυττάρων, καθώς και μεγάλων υποκυτταρικών θραυσμάτων, τα οποία αποσπώνται από το κύτταρο κατά τη φάση του θανάτου.

Ενώ ο κυτταρικός θάνατος είναι μια κοινή παράμετρος στην απελευθέρωση σωματιδίων, ο σχηματισμός ωστόσο των μικροσωματιδίων φαίνεται να διαφέρει από την παραγωγή των αποπτωτικών σωμάτων. Ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωμάτων είναι το τελικό αποτέλεσμα του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. Η αποβολή των μικροσωματιδίων πραγματοποιείται κυρίως κατά την φάση της πρώιμης απόπτωσης, ενώ τα αποπτωτικά σώματα σχηματίζονται στα τελευταία στάδια αυτής της διαδικασίας (Thery et al 2001; Distler et al 2005; Beyer and Pisetsky 2010).

Αν και προκύπτουν κατά την απόπτωση, τα μικροσωματίδια είναι διαφορετικά από τα αποπτωτικά σώματα. Μετά την επαγωγή της απόπτωσης, η χρωματίνη συμπυκνώνεται, το κύτταρο συρρικνώνεται και υφίσταται αναδιάταξη, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό «φυσάλιδων». Τελικά, τα αποπτωτικά κύτταρα διαλύονται και θρυμματίζονται, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό δομών, επικαλυμμένων με μεμβράνη, τα λεγόμενα αποπτωτικά σώματα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε αντίθεση με τα μικροσωματίδια, τα οποία απελευθερώνονται κατά τα πρώτα στάδια της απόπτωσης, τα αποπτωτικά σώματα σχηματίζονται στα τελικά στάδια του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Elmore et al 2007; Gyorgy et al 2011). Εκτός από την κινητική της παραγωγής τους, τα μικροσωματίδια και τα αποπτωτικά σώματα *διαφέρουν στο μέγεθος* -με τα αποπτωτικά σώματα να είναι αρκετές φορές μεγαλύτερα σε διάμετρο και όγκο- (περίπου 1-5μm) (Gyorgy et al 2011), *στη σύνθεση*, με τα αποπτωτικά σώματα να φέρουν σημαντικό μέρος του πυρηνικού υλικού (Thery et al 2001; Hristov et al 2004; Elmore 2007), *και στη διαπερατότητα της μεμβράνης* (Dignat-George and Boulanger 2011). Κατά την διάρκεια της απόπτωσης δεν είναι πάντα εφικτός, σε ό,τι αφορά το μέγεθος, το περιεχόμενο και τη δυναμική της έκφρασης, ένας αυστηρός διαχωρισμός των αποπτωτικών σωμάτων από τα μικροσωματίδια (Distler et al 2005).

Η κατάτμηση του αποπτωτικού κυττάρου σε σώματα φαίνεται να διευκολύνει τον φαγοκυτταρικό καθαρισμό. Παρά τις διαφορές στο μέγεθος και στην χρονική πορεία που ακολουθείται για την παραγωγή τους, τόσο τα μικροσωματίδια όσο και τα αποπτωτικά σώματα προέρχονται από διαδικασίες αποσυναρμολόγησης του



κυττάρου, ώστε να διευκολυνθεί η φαγοκυττάρωση και η ασφαλής αφαίρεση οποιουδήποτε ανοσοδιεγερτικού υλικού που μπορεί να παραχθεί κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου (Munoz et al 2010). Σε αντίθεση με τις μεγάλες διαστάσεις των αποπτωτικών σωμάτων, το μικρό μέγεθος των μικροσωματιδίων τους επιτρέπει να αποφεύγουν τα φαγοκύτταρα και να μετατοπίζονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, ώστε να συμβάλλουν στην σηματοδότηση (μεταγωγή σήματος) τοπικών αλλά και απομακρυσμένων θέσεων (Pisetsky et al 2012).

Τα αποπτωτικά σώματα μπορούν να αποτελέσουν πηγή αυτοαντιγόνων και ως τέτοια να επάγουν τις διαδικασίες φλεγμονής και αυτοανοσίας στον ερυθρηματώδη λύκο (Casciola-Rosen et al 1994).

### **1.5 Περιεχόμενο Μικροσωματιδίων**

Η σύσταση της μεμβράνης και το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο των μικροσωματιδίων καθορίζονται από το γονικό κύτταρο. Μετά την απελευθέρωσή τους τα μικροσωματίδια διατηρούν στη μεμβράνη τους επιφανειακές πρωτεΐνες από το κύτταρο προέλευσης. Η κυτταρική προέλευση των μικροσωματιδίων καθορίζεται από την έκφραση αυτών των ειδικών κυτταρικών δεικτών (Jy et al 2004).

Εκτός από τους ειδικούς επιφανειακούς δείκτες, τα μικροσωματίδια φέρουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων, τα οποία ενσωματώνονται στην μεμβρανική δομή καθώς το μικροσωματίδιο εγκαταλείπει το πατρικό κύτταρο με έναν, μάλλον όχι τυχαίο, τρόπο, ενώ η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωτερική τους επιφάνεια αποτελεί ένα γενικό κατά κύριο λόγο χαρακτηριστικό τους

Μιά σειρά δεικτών χρησιμοποιείται για τον καθορισμό της προέλευσης των μικροσωματιδίων. Μερικοί θεωρούνται βασικοί κυτταρικοί δείκτες, ενώ άλλοι είναι πιο ευαίσθητοι στη διέγερση. Για παράδειγμα, τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκθέτουν τους χαρακτηριστικούς για τα ενδοθηλιακά κύτταρα δείκτες CD146, CD144, CD51, CD105, CD31+/CD42a-, and CD62E, αυτά που προέρχονται από τα μακροφάγα, τον δείκτη CD14, αυτά που προέρχονται από τα αιμοπετάλια, τους δείκτες CD42a/b, CD41a/b and CD61, αυτά που προέρχονται από τα ερυθροκύτταρα, τον δείκτη CD235a, ενώ αυτά που προέρχονται από τα λευκοκύτταρα και τους υποπληθυσμούς τους τους δείκτες CD45, CD14, CD3, CD4, CD8, CD20 and CD66b (Jy et al 2004; Gelderman and Simak 2008).

Άλλοι επιφανειακοί και κυτταρικοί δείκτες μπορούν να προσδιορίσουν διαφορετικούς υποπληθυσμούς μικροσωματιδίων. Για παράδειγμα, τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από τα αιμοπετάλια μπορούν να χαρακτηριστούν από τους επιφανειακούς δείκτες CD42b, CD49, CD61, καθώς επίσης και από τους λυσοσωμικούς δείκτες CD68 ή CD63 (Horstman et al 2004; Beyer and Pisetsky 2010). Από τα συστατικά του μικροσωματιδίου, η φωσφατιδυλοσερίνη (PS), κοινό χαρακτηριστικό των περισσότερων μικροσωματιδίων, και οι επιφανειακοί δείκτες αποτελούν και τα πιο σημαντικά συστατικά, καθώς αυτά συνιστούν εργαλεία ανίχνευσης των μικροσωματιδίων μέσω της κυτταρομετρίας ροής (Dey-Hazra 2010).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει περιορισμένη πληροφόρηση σχετικά με το πρωτεόσωμα των μικροσωματιδίων, μελέτες στα αιμοπετάλια και στα μακροφάγα υποδηλώνουν ετερογένεια στην σύστασή τους, η οποία καθορίζεται από την **κυτταρική προέλευση** του μικροσωματιδίου, το **ερέθισμα** και την **φυσιολογική κατάσταση του γονικού κυττάρου** (Bernimouli 2009 ; Baron 2012 ;Pisetsky et al, 2012).

Για παράδειγμα, *in vitro* έρευνες έχουν δείξει ότι ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιημένα με TNF απελευθερώνουν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά διακριτά μικροσωματίδια, σε σύγκριση με αυτά που απελευθερώνονται από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι σε φάση κυτταρικού θανάτου (λόγω έλλειψης, για παράδειγμα, του αυξητικού παράγοντα) [Jimenez et al 2003 (b)]. Τα σωματίδια αυτά μπορεί να διαφέρουν στο μέγεθος, στη φωσφολιπιδική και πρωτεϊνική σύσταση καθώς και στη βιολογική τους δράση (Nejlund 2012). Επιπρόσθετα, πρωτεομικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει ότι το φάσμα των πρωτεϊνών που ανευρίσκεται στα MPs και απελευθερώνονται σε *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων, εξαρτάται εν μέρει από το ερέθισμα που προκάλεσε το σχηματισμό τους (Miguet et al 2006).

Κατά τον σχηματισμό της «φουσαλίδας», η αναδιαμόρφωση της κυτταρικής επιφάνειας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση ή ελάττωση διαφόρων συστατικών του παραγόμενου μικροσωματιδίου σε σχέση με το προγονικό κύτταρο (Biro et al 2005). Καθώς τα μικροσωματίδια έχουν την τάση να προκύπτουν από περιοχές της μεμβράνης που περιέχει «λιπιδικές σχεδίες», το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των μικροσωματιδίων ενδέχεται να διαφέρει από το συνολικό περιεχόμενο της μεμβράνης (Del Conde et al; 2005, Pisetsky et al 2012). Λόγω της πλαστικότητας της πλασματικής μεμβράνης στις περιοχές που καλούνται «λιπιδικές σχεδίες» –περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και συγκεκριμένη σύσταση πρωτεϊνών και λιπιδίων– ένα δεδομένο ερέθισμα μπορεί να προκαλέσει μια «ειδική» γι' αυτό αντίδραση και να

οδηγήσει στον σχηματισμό μικροσωματιδίων με συγκεκριμένη σύσταση. Το γεγονός αυτό εξηγεί πώς τα μικροσωματίδια που προέρχονται από το ίδιο κύτταρο μπορεί να εκφράζουν διαφορετικούς επιφανειακούς δείκτες και να έχουν διαφορετική σύνθεση πρωτεϊνών και λιπιδίων (Hugel et al 2005).

#### ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ



#### ΑΠΟΠΤΩΣΗ



Εικόνα 4: Μηχανισμός απελευθέρωσης μικροσωματιδίων από εμπύρρηνα κύτταρα (Pisetsky D. et al, 2012)

Στην παραπάνω εικόνα (Εικόνα 4) απεικονίζονται οι δύο κύριοι μηχανισμοί παραγωγής και απελευθέρωσης μικροσωματιδίων στα εμπύρρηνα κύτταρα και πώς αυτοί επηρεάζουν τη σύσταση των παραγόμενων μικροσωματιδίων. Κατά την ενεργοποίηση των κυττάρων, οι «φουσαλίδες» (που απεικονίζονται ως μικροί κύκλοι) σχηματίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και απελευθερώνονται. Δεδομένου ότι το κύτταρο είναι άθικτο, τα μικροσωματίδια που απελευθερώνονται δεν περιέχουν συστατικά του πυρήνα. Αντιθέτως, κατά την απόπτωση, το κύτταρο υφίσταται δραστικές αλλαγές: συρρίκνωση, κατακερματισμός (fragmentation) του πυρήνα και μετακίνηση των συστατικών του στις σχηματιζόμενες στην επιφάνεια του κυττάρου «φουσαλίδες». Η απελευθέρωση του μικροσωματιδίου συνήθως συμβαίνει κατά τα τελευταία στάδια της διαδικασίας απόπτωσης. Ως εκ τούτου, τα παραγόμενα μικροσωματίδια περιέχουν συστατικά του πυρήνα – τα οποία απεικονίζονται με σκούρο μπλε στην παρακάτω εικόνα (Pisetsky et al 2012).

Τα μικροσωματίδια μπορούν να εκφράσουν δείκτες φλεγμονής, αυξητικούς παράγοντες, μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) και κυτοκίνες, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή ανοσοαποκρίσεων από τα μικροσωματίδια (Taraboletti et al 2002; MacKenzie et al 2001). Τα μικροσωματίδια από αιμοπετάλια και μονοκύτταρα εκφράζουν τον ιστικό παράγοντα (TF), ο οποίος μαζί με τη

φωσφατιδυλοσερίνη ευθύνεται για τις προπηκτικές τους ιδιότητες. Επίσης, τα μικροσωματίδια μπορεί να περιέχουν μικρά μόρια μεταβολιτών (π.χ. ταυρίνη) που υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Jin et al 2005; Mary et al 2009; Bernimoulin et al 2009; Pisetsky et al 2012).

Ταυτόχρονα με τα μεμβρανικά και τα κυτταροπλασματικά συστατικά, τα μικροσωματίδια περιέχουν πυρηνικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των DNA, RNA (rRNA, mRNA και microRNA) και νουκλεϊκών πρωτεϊνών (Valadi et al 2007; Risitano et al 2012). Η παρουσία του RNA -και κυρίως του miRNA, που έχει ρυθμιστική δραστηριότητα- στα μικροσωματίδια είναι ενδεικτική του ρόλου τους ως προς τη μεταφορά πληροφοριών (Hunter et al 2008).

Ο μηχανισμός της απόπτωσης χαρακτηρίζεται από τη μεταφορά μορίων από τον πυρήνα του κυττάρου –μέσω του κυτταροπλάσματος– στις «φουσαλίδες» (Casciola – Rosen LA et al 1994; Pisetsky et al; 2012). Ενώ ο μηχανισμός αυτής της κυτταρικής αναδιάταξης δεν είναι γνωστός, το τελικό αποτέλεσμα είναι ο μετασχηματισμός των συστατικών του πυρήνα σε μια μορφή που τα καθιστά περισσότερο προσβάσιμα στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ παράλληλα προστατεύονται από την αποικοδόμηση των νουκλεασών και των πρωτεασών (Barteneva 2013). Καθώς αυτά κυκλοφορούν στο αίμα καθίστανται πλούσια πηγή εξωκυτταρικών αυτοαντιγόνων και, ως τέτοια, διεγείρουν τους αντίστοιχους υποδοχείς (τόσο τύπου – Toll όσο και μη – Toll) στον συστηματικό ερυθματώδη λύκο και σε αντίστοιχες αυτοάνοσες ασθένειες (Lafyatis and Marshak-Rothstein 2007). Επιπρόσθετα, τα ανοσοσύμπλοκα με αυτοαντιγόνα, που παρουσιάζονται από τα μικροσωματίδια, μπορούν να επάγουν ανοσιακές αποκρίσεις, όπως την παραγωγή ιντερφερόνης τύπου 1(Nielsen et al 2011).

Πιο συγκεκριμένα, στα πλαίσια της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του ερυθματώδη λύκου, *in vitro* έρευνες (Morel et al 2011; Mause and Weber 2010; Fox et al 1991) έδειξαν ότι τα μικροσωματίδια που παράγονται κατά την απόπτωση φέρουν ως κύρια συστατικά πυρηνικά μόρια, όπως DNA, ιστόνες και HMGB1. Τα μόρια αυτά μπορούν δυναμικά να επάγουν αγγειακές και μη ειδικές αυτοάνοσες αντιδράσεις, καθώς επίσης και τη δημιουργία ειδικών αυτοαντισωμάτων. Το DNA στα μικροσωματίδια φαίνεται να είναι άμεσα διαθέσιμο για σύνδεση με τα αντι-DNA αντισώματα (Mause and Weber 2010), υποδηλώνοντας έτσι είτε επιφανειακή εντόπιση στο εν λόγω μόριο είτε μια πολύ πορώδη δομή που επιτρέπει προσβασιμότητα στο εσωτερικό του. Επομένως, η δομή των μικροσωματιδίων φαίνεται να είναι δυναμική: καθώς η διαπερατότητα της μεμβράνης επιτρέπει την

ανταλλαγή μορίων μεταξύ του εσωτερικού των μικροσωματιδίων και του περιβάλλοντος γύρω από αυτά, στην επιφάνεια του μικροσωματιδίου μπορούν επίσης να προσδεθούν και διάφορες πρωτεΐνες ορού. Για παράδειγμα, πρωτεομικές μελέτες έδειξαν την παρουσία ανοσοσφαιρίνης και συστατικών του συμπληρώματος στις δομές των μικροσωματιδίων (Pisetsky et al 2012). Αυτά τα μόρια θα μπορούσαν να προσδεθούν στα μικροσωματίδια μετά την αποκοπή τους από τα κύτταρα ή να επικαθίσουν στην επιφάνεια των κατεστραμμένων κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, η απελευθέρωση μεμβρανικών περιοχών θα μπορούσε να αποτελέσει προστατευτικό μηχανισμό για την απομάκρυνση συμπλεγμάτων που δυνητικά θα απειλούσαν το κύτταρο με λύση (Pilzer et al 2005; Pisetsky et al 2012).

### **1.6 Μέτρηση μικροσωματιδίων –Κυτταρομετρία ροής**

Η κυτταρομετρία ροής ή FACS (fluorescence-activated cell sorting) αποτελεί την πιο κοινή τεχνική για τον προσδιορισμό του αριθμού, του μεγέθους και των ιδιοτήτων των MPs (Pudu et al 2010).

Οι ιδιότητες των μικροσωματιδίων παρέχουν την βάση για τη μέτρησή τους μέσω της κυτταρομετρίας ροής, είτε με σκέδαση του φωτός για το μέγεθος είτε με φθορισμό για την ανίχνευση επιφανειακών δεικτών. Καθώς η σύνθεση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της μεμβράνης του μικροσωματιδίου μοιάζει με εκείνη του κυττάρου από το οποίο απελευθερώνεται, η ανάλυση των δεικτών της επιφάνειας του μικροσωματιδίου μέσω της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να προσδιορίσει την προέλευση των μικροσωματιδίων.

Παρά την αποδεδειγμένη αξία της μεθόδου, δεν έχει θεσπιστεί ένα διεθνές πρωτόκολλο για τη διαδικασία των δειγμάτων. Τα συνήθη κριτήρια που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των MPs είναι μέγεθος σωματιδίων μικρότερο του 1 μm και σωματίδια θετικά στη φωσφατιδυλοσερίνη (PS positive), η οποία ανιχνεύεται από τη δέσμευση της στην συνδεδεμένη με φθοριοχρώματα (fluorescent labelled) αννεξίνη V (Koopman et al 1994; Hugel et al 2004; Jayachandran et al 2012).

Ωστόσο, εκτός από την αννεξίνη V, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κριτήρια ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης, όπως η έκφραση ειδικών αντιγόνων, ανάλογων της κυτταρικής προέλευσης. Μονοκλωνικά αντισώματα -συνδεδεμένα με φθορίζουσες χρωστικές- έναντι ειδικών επιφανειακών δεικτών, επιτρέπουν την

ανίχνευση συγκεκριμένων υποπληθυσμών MPs ανάλογα με το κύτταρο προέλευσης ( Ardoin et al 2007). Για κάθε κυτταρικό τύπο μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι δείκτες, αλλά η επιλογή διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων. Τα κριτήρια που χρησιμοποιεί η κυτταρομετρία ροής παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη αντιγόνων στην επιφάνεια, αλλά όχι σχετικά με τη λειτουργικότητά τους.

Η κυτταρομετρία ροής, μέθοδος που παρέχει πλήθος πληροφοριών, καλείται να επιλύσει μια σειρά τεχνικών δυσκολιών και προκλήσεων. Η ακριβής ποσοτική εκτίμηση εμποδίζεται από το μικρό μέγεθος των μικροσωματιδίων, τη χαμηλή πυκνότητα επιφανειακών δεικτών και τη ποικιλία στην έκφραση των επιφανειακών δεικτών ανάμεσα στα μικροσωματίδια (Lacroix et al 2012).

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η αντιγονική σύσταση και κατανομή μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στην κυτταρική επιφάνεια και την επιφάνεια των παραγόμενων μικροσωματιδίων. Οι δείκτες της κυτταρικής επιφάνειας επιτρέπουν την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υποπληθυσμών των σωματιδίων, αν ο δείκτης πυκνότητας είναι αρκετός ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση. Εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους, το ποσό οποιουδήποτε επιφανειακού δείκτη μειώνεται δραστικά σε σύγκριση με το πατρικό ανέπαφο κύτταρο, περιορίζοντας έτσι την ανίχνευση. Συγκεκριμένα, καθώς η διάμετρος των μικροσωματιδίων είναι 10-100 φορές μικρότερη από αυτή των κυττάρων, η μείωση της συνολικής τους επιφάνειας είναι της τάξης του  $10^4$ , περιορίζοντας έτσι κατά πολύ την ανίχνευση των επιφανειακών δεικτών.

Ένας βασικός περιορισμός της κυτταρομετρίας ροής είναι το πολύ μικρό μέγεθος των MPs (μικρότερο από 0,3  $\mu\text{m}$ ). Οι παραδοσιακοί ανιχνευτές FACS είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι για την ποσοτικοποίηση δομών με μέγεθος παρόμοιο με αυτό των κυττάρων και έτσι τα MPs είναι μικρότερα από το κατώφλι ανίχνευσης (Dragovic et al 2011) με αποτέλεσμα να μην είναι πάντα εφικτή η ανίχνευσή τους. Μικροσωματίδια με μέγεθος μικρότερο από το μήκος κύματος της δέσμης laser που χρησιμοποιείται μπορεί να μην ανιχνεύονται.

Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον εστιάζεται σε άλλες φυσικές μεθόδους ανίχνευσης με μεγαλύτερη ευαισθησία, όπως στους νέες γενιάς αναλυτές με μικρότερο κατώφλι ανίχνευσης ή στο μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM). Ωστόσο, αυτές οι νέες τεχνολογίες διανύουν ακόμη το δοκιμαστικό τους στάδιο και χρειάζονται περαιτέρω τελειοποίηση (Ardoin et al 2007).

Η εξωτερίκευση της PS στην επιφάνεια των μικροσωματιδίων είναι κοινώς αποδεκτή, ωστόσο έρευνες έχουν αναγνωρίσει σωματίδια στο εύρος μεγέθους των μικροσωματιδίων που εκφράζουν ειδικούς δείκτες προσδιοριστικούς του κυττάρου προέλευσης, αλλά δεν συνδέονται με την αννεξίνη V. Η ύπαρξη MPs που δεν εκθέτουν PS δεν είναι αδιαμφισβήτητη, υποδηλώνοντας είτε ετερογένεια στον μηχανισμό παραγωγής των μικροσωματιδίων, είτε την παρουσία φωσφατυδιλοσερίνης σε συγκεντρώσεις κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Εάν τα κυστίδια αυτά θεωρηθούν μικροσωματίδια, τεχνικές μέτρησης που βασίζονται στην αννεξίνη V (κυτταρομετρία ροής και ELISA) μπορεί να μην επιτρέψουν την ακριβή εκτίμηση του συνολικού αριθμού (Abid-Hussein 2003; Orozko and Lewis 2010).

Η παρουσία νουκλεϊκών οξέων στα μικροσωματίδια παρέχει άλλη μια παράμετρο μέτρησης των μικροσωματιδίων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, μέσω της χρήσης φθορίζουσών χρωστικών ουσιών (π.χ. SYTO 13) (Jy et al 2004; Gelderman and Simak 2008) που συνδέονται στο DNA και το RNA. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιείται για μικροσωματίδια που προκύπτουν από εμπύρηντα κύτταρα και επιτρέπει την ανίχνευση μικροσωματιδίων με μέγεθος μικρότερο των 200 nm (Ullal et al 2010). Η χρήση χρωστικών που συνδέονται με τα νουκλεϊκά οξέα, μπορεί να δώσει πληροφορίες για το κύτταρο προέλευσης των σωματιδίων, καθώς τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από εμπύρηντα κύτταρα (π.χ. λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα), έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νουκλεϊκά οξέα, συγκρινόμενα με αυτά που προκύπτουν από τα αιμοπετάλια.

Σημαντικά ζητήματα που μπορούν να επηρεάσουν την ανάλυση των σωματιδίων αφορούν τις συνθήκες λήψης του αίματος (π.χ. αντιπηκτικό και διάμετρος βελόνας για τη λήψη αίματος) και τους χειρισμούς που ακολουθούνται (π.χ. φυγοκέντριση, διάρκεια και θερμοκρασία αποθήκευσης, συνθήκες απόψυξης), οι οποίοι μπορούν να τροποποιήσουν τον φαινότυπο των μικροσωματιδίων (Shah et al 2008).

Εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης των μικροσωματιδίων αποτελούν οι δοκιμασίες ανοσοπροσοφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως (δοκιμασία Elisa) και η NTA ανάλυση (nanoparticle tracking analysis) (Osumi et al 2001; Dragovic et al 2011).

Η μέτρηση μικροσωματιδίων με την ανάλυση Elisa βασίζεται στην ανίχνευση δευτερογενών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, πρωτεύων αντίσωμα έναντι μορίων της κυτταρικής επιφάνειας συνδέεται με τα σωματίδια του δείγματος η ανίχνευση των

οποίων βασίζεται στο δευτερογενές αντίσωμα ή σε μια λειτουργική δοκιμασία (πχ. θρόμβωση). Στην Elisa οι κυψέλες των πλακιδίων καλύπτονται με αντίσωμα αννεξίνης V ή άλλο αντίσωμα ειδικό για την ανίχνευση μικροσωματιδίων. Μετά την πλύση, ένα μείγμα που περιέχει προθρομβίνη, τον παράγοντα Χα, τον παράγοντα Va και ασβέστιο εισάγεται στις κυψελίδες. Η φωσφατιδυλοσερίνη στην επιφάνεια των μικροσωματιδίων επιτρέπει την ενεργοποίηση της προθρομβίνης σε θρομβίνη. Η παραγόμενη ποσότητα θρομβίνης υπολογίζεται με τη βοήθεια ειδικής χρωμογόνου ουσίας (Osumi et al 2001). Άλλη μέθοδος βασίζεται στην έκθεση του TF και την ανίχνευσή του με anti-TF αντίσωμα συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (Lee et al 2011). Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι, επιτρέπει την ανίχνευση και των πιο μικρών σε μέγεθος MPs, μιας και το μέγεθος δεν αποτελεί κριτήριο για τη μέθοδο. Ωστόσο, απαιτείται προσοχή στις μεθόδους προετοιμασίας του δείγματος μιας και η Elisa δεν επιτρέπει τη διάκριση των MPs από κύτταρα, εξωσώματα ή αποπτωτικά σώματα που μπορεί να συνυπάρχουν στο δείγμα. Επιπλέον, η μέθοδος δε χρησιμοποιείται στην αξιολόγηση της συγκέντρωσης των MPs παρά μόνο στην εκτίμηση της συγκέντρωσης του δείγματος σε φωσφατιδυλοσερίνη.

## 1.7 ΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΙΣ ΡΕΥΜΑΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ

Τα μικροσωματίδια εμφανίζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, οι οποίες εμπλέκονται σε αρκετές και διαφορετικές ασθένειες λειτουργώντας ως σημαντικοί δυνητικοί μεσολαβητές στην παθογένεια της νόσου. Μελέτες σε ασθενείς με μεγάλο εύρος ρευματικών και μη ασθενειών έδειξαν σημαντικές αυξήσεις στον αριθμό των μικροσωματιδίων, συγκριτικά με τον αντίστοιχο του πληθυσμού ελέγχου, ενισχύοντας έτσι την χρήση τους ως βιοδείκτες. Πράγματι, η χρήση των μικροσωματιδίων ως βιοδεικτών, μπορεί να παρέχει σημαντική πληροφόρηση αναφορικά με την εξέλιξη της παθογενετικής διαδικασίας, η οποία θα μπορούσε να αξιοποιηθεί κλινικά για την εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου και για την πρόβλεψη συγκεκριμένων γεγονότων (Beyer and Pisetsky 2010; Pisetsky et al 2012). Οι αυξήσεις αυτές είναι πιο σημαντικές σε ασθένειες με ισχυρή αγγειακή συμμετοχή, υποδεικνύοντας ότι τα μικροσωματίδια που εμπλέκονται κατά κύριο λόγο είναι αυτά που προέρχονται από τα αιμοπετάλια (platelet MPs-**PMPs**). Ωστόσο, εκτός των άλλων κυτταρικών τύπων, έχει επίσης αναφερθεί αύξηση των μικροσωματιδίων που προέρχονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (**EMPs**) (Combes et al 1999; Oyabu et al 2011). Η αύξηση του αριθμού των PMPs και EMPs μικροσωματιδίων σε ασθένειες που εμπλέκεται το



αγγειακό σύστημα, είναι σύμφωνη τόσο με την προέλευση των μικροσωματιδίων - μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου- όσο και με την ικανότητα των σωματιδίων να προωθούν την θρόμβωση και να ενεργοποιούν το ενδοθήλιο (Bucciarelli et al 2011; Pisetsky et al 2012).

Στο πλαίσιο των ρευματικών ασθενειών τα μικροσωματίδια μπορούν να ρυθμίσουν την **θρόμβωση**, την **αγγειακή αντιδραστικότητα**, την **αγγειογένεση**, την **αιμόσταση**, την **ανοσία** και την **φλεγμονή** ( Morel et al 2011 (b); Beyer et al, 2010; Barteneva et al 2013). Πιο συγκεκριμένα, αναφορικά με αυτές τις ασθένειες, τα μικροσωματίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των ρευματικών νόσων, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθρηματώδης λύκος, το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, η αγγειίτιδα και η προοδευτική συστηματική σκλήρυνση (Distler et al 2005), καταστάσεις που χαρακτηρίζονται τόσο από την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και από αγγειακές ανωμαλίες, συμπεριλαμβανομένης της θρόμβωσης (Pisetsky et al 2012; Burger et al 2013).

### 1.7.1 ΠΗΞΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

Εκτεταμένες έρευνες για τον ρόλο των μικροσωματιδίων στην φυσιολογική ρύθμιση της πήξης και την εμπλοκή τους στη θρόμβωση έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως όσον αφορά τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα αιμοπετάλια (**PMPs**), δεδομένου ότι αυτά παρέχουν την καταλυτική επιφάνεια για τη συναρμολόγηση του ενζυμικού συμπλέγματος της προθρομβινάσης (prothrombinase complex) και επιταχύνουν τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη (Chou et al 2004; Meziani et al 2008). Τα μικροσωματίδια εκφράζουν *φωσφατιδυλοσερίνη* (*PS*) σε αφθονία, η οποία προσφέρει πολλαπλές θέσεις δέσμησης για τους παράγοντες πήξης II, Va και Xa (Horstman et al 2004; Michelson et al 2000; Beyer and Pisetsky 2010). Παρουσία ιόντων ασβεστίου, οι παράγοντες Xa και Va σχηματίζουν το αποκαλούμενο σύμπλεγμα προθρομβινάσης, το οποίο καταλύει την μετατροπή της προθρομβίνης (παράγοντας II) σε θρομβίνη. Αυτή τους η ιδιότητα τα καθιστά παράγοντες υψηλής προπηκτικότητας [Morell et al (b) 2011)]. Ο φυσιολογικός ρόλος των PMPs στην αιμόσταση καταδεικνύεται από το γεγονός ότι η ανεπαρκής δημιουργία PMPs οδηγεί σε αιμορραγικές διαταραχές (Castaman et al 1997; Meziani et al 2008). Ωστόσο, η προπηκτική δράση των μικροσωματιδίων δεν περιορίζεται μόνο στα PMPs, καθώς τα μικροσωματίδια από τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να έχουν παρόμοια δράση (Beyer and Pisetsky 2010).

Τα PMPs εκθέτουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια, που αποτελούν

θέσεις πρόσδεσης για τους ενεργοποιημένους παράγοντες πήξης, προσδίδοντας έτσι στα PMPs προ-θρομβωτικές ιδιότητες. Τα PMPs συνδέονται στην υπενδοθηλιακή θεμέλια ουσία (subendothelial matrix), προσκολλώνται στα ενεργοποιημένα από τη θρομβίνη ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells-ECs) μέσω των υποδοχέων GPIIb/IIIa και παρέχουν θέσεις πρόσδεσης για το διαλυτό ινωδογόνο. Στη συνέχεια, το ινωδογόνο λειτουργεί σαν μόριο διασύνδεσης (bridging molecule) μεταξύ των αιμοπεταλίων και του GPIIb/IIIa των PMPs, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και στην αθηροσκλήρυνση (Morel et al 2006; Meziani et al 2008).

Τα PMPs φαίνεται να αποτελούν βασικούς φορείς του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet – activating factor, PAF), έναν φωσφολιπιδιακό παράγοντα που σχετίζεται με την παθογένεση της φλεγμονής. Αν και η σύνδεση του PMP στο ινωδογόνο και τη φμπρονεκτίνη αναστέλλεται ισχυρά από έναν αναστολέα του GPIIb/IIIa, ωστόσο χρησιμοποιώντας τον ίδιο αναστολέα παρατηρείται ασθενής αναστολή της σύνδεσης των μικροσωματιδίων στο κολαγόνο 1 και 3, κάτι που αποδεικνύει ότι το κολαγόνο δεν αποτελεί τον βασικό συνδέτη του GPIIb/IIIa, των μικροσωματιδίων και των αιμοπεταλίων (Wolf et al 2006).

Η κατανόηση του ρόλου των μικροσωματιδίων στην αιμόσταση άλλαξε δραματικά με την ανακάλυψη του *ιστικού παράγοντα (TF)* σε αιμοπετάλια και μικροσωματίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια [Muller et al 2003; Scholz et al 2002; Morell et al (b) 2011]. Πριν από αυτήν την ανακάλυψη, ο ιστικός παράγοντας, ο κύριος εκκινητής της πήξης στα αιμοπετάλια, θεωρούνταν προσβάσιμος στα κυκλοφορούντα συστατικά του αίματος μόνο αφού είχε προκύψει ενδοθηλιακή βλάβη. Η φλεγμονή οδηγεί στην έκφραση του ιστικού παράγοντα. Τα μικροσωματίδια εκφράζουν τον ιστικό παράγοντα στην επιφάνειά τους, όπως ακριβώς εκφράζουν την φωσφατιδυλοσερίνη, μια και η ενεργοποιημένη του μορφή απαιτεί την παρουσία της. Οι δύο παράγοντες συνεργάζονται στη συναρμολόγηση του ενζυμικού συμπλέγματος της προθρομβινάσης [Morell et al (b) 2011].

Εκτός από την έκφραση των PS και TF, τα μικροσωματίδια εκφράζουν επίσης τον παράγοντα von Willerbrand, που προάγει τη συγκέντρωση των αιμοπεταλίων, και τον συνδέτη της P-σελεκτίνης (P-selectin glycoprotein ligand 1), ο οποίος εντοπίζεται από κοινού με τον ιστικό παράγοντα και παρέχει δυνατότητα πρόσδεσης (intercellular adhesion) σε αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα και μακροφάγα (Ardoin 2007, Morell 2011). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα μονοκύτταρα μεταξύ άλλων κυτταρικών τύπων, όπως λευκοκύτταρα και ινοβλάστες, μπορούν επίσης να εκφράσουν τον ιστικό παράγοντα και έτσι τα μικροσωματίδια να αποτελέσουν μέσο

σύζευξης της φλεγμονής και της πήξης ενισχύοντας τις θρομβωτικές τάσεις των ρευματολογικών ασθενειών (Del Conde et al 2005; Muller et al 2003; Scholz et al 2002; Siddiqui et al 2002; Beyer and Pisetsky 2010).

### 1.7.2 ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Τα μικροσωματίδια μπορούν να επηρεάσουν ποικίλες διαδικασίες του αγγειακού συστήματος, ενώ υπάρχει στενή σχέση ανάμεσα στις προ-πηκτικές ιδιότητες των μικροσωματιδίων και στην επίδρασή τους στα αιμοφόρα αγγεία. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι, ορισμένοι υποπληθυσμοί μικροσωματιδίων μπορούν να προκαλέσουν αγγειογένεση και αγγειακή αναδιαμόρφωση. Έρευνες που κομίζουν διαφορετικά συμπεράσματα βασίζονται σε ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές των MPs, που έχουν ποικίλη προέλευση και προκαλούνται από διαφορετικά ερεθίσματα.

Γενικά, τα μικροσωματίδια φαίνεται να επιδρούν τόσο στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όσο και στα λεία μυϊκά κύτταρα, και κατά συνέπεια, να ρυθμίζουν την αγγειακή αντιδραστικότητα καθώς και την αγγειογένεση. Οι ενδοθηλιακές αντιδράσεις μπορούν να είναι άμεσες (απελευθέρωση διαφόρων παραγόντων) ή επιγενόμενες (ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη δομή και την λειτουργία του αγγειακού τοιχώματος). Γενικά, οι έρευνες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι τα EMPs αφενός προκαλούν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αφετέρου αυξάνονται σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με ενδοθηλιακή δυσλειτουργία (Kim et al 2004; Martin et al 2004; Pfister 2004; Van Wijk et al 2003; Brodsky et al 2004 ).

Ορισμένες από αυτές τις έρευνες, υποδεικνύουν ότι τα μικροσωματίδια μετέχουν στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, κυρίως μέσω του μηχανισμού μείωσης παραγωγής του NO (ένας ισχυρός αγγειοδιασταλτικός, αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας και βασικός παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων) (Meziani et al 2008). Για παράδειγμα, EMPs βρέθηκε να αναστέλλουν την NO εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή σε αορτές αρουραίων (Brodsky et al 2004), ενώ PMPs μπορούν να επάγουν την έκφραση της κυκλο-οξυγενάσης 2, οδηγώντας στην απελευθέρωση του αγγειοδιασταλτικού μεσολαβητή προστακυκλίνη (Nieuwland et al 2000). Τα μικροσωματίδια μπορούν να δράσουν άμεσα στα λεία μυϊκά κύτταρα μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα κB (NF – κB). Έτσι οδηγούν σε αυξημένη έκφραση του iNOS και του COX – 2 και σε επακόλουθη αύξηση της παραγωγής NO και προστακυκλίνης, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα αιφνίδια

αγγειοσύσπαση (Tesse et al 2005; Meziani et al 2008). Σε άλλη έρευνα, αποδείχθηκε πειραματικά ότι τα PMPs, πηγή θρομβοξάνης A2, μπορούν να ρυθμίσουν τον αγγειακό τόνο σε λαγούς (Pfister 2004).

Άλλη μία σημαντική επίδραση των μικροσωματιδίων στο αγγειακό σύστημα, είναι η ικανότητά τους να επάγουν την *αγγειογένεση*. Συγκεκριμένα, σε *in vitro* και *in vivo* μοντέλα ισχαιμικής καρδιοπάθειας, φάνηκε ότι τα PMPs μπορούν να διεγείρουν την αγγειογένεση και την επαναγγείωση. Η διέγερση της αγγειογένεσης με μικροσωματίδια μπορεί να μεσολαβείται, τουλάχιστον εν μέρει, από τον αγγειακό ενδοθηλιακό παράγοντα ανάπτυξης (vascular endothelial growth factor – VEGF) (Beyer and Pisetsky 2010). Επίσης, PMPs που απομονώθηκαν από υγιή άτομα προκαλούν τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων όταν προστίθενται σε καλλιέργειες των τελευταίων. (Kim et al, 2004; Meziani et al 2008)

Φαίνεται ότι η επιφάνεια των EMPs παρουσιάζει δραστικότητα πρωτεάσης (protease activity) του τύπου των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) υποδεικνύοντας την συμμετοχή τους στην διάσπαση της εξωκυττάριας ουσίας, που αποτελεί βασικό στάδιο για την αγγειακή αναδιαμόρφωση [Taraboletti et al 2002; Distler et al 2005 (b)].

### **1.7.3 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑ.**

Τα μικροσωματίδια φαίνεται να συμβάλλουν στις διαδικασίες φλεγμονής αλλά και ταυτόχρονα να προκύπτουν από αυτή. Διάφορα προφλεγμονώδη ερεθίσματα προκαλούν την απελευθέρωση μικροσωματιδίων, όταν ταυτόχρονα μια σειρά *in vitro* και *in vivo* έρευνες υποδεικνύουν την άμεση εμπλοκή τους στην φλεγμονώδη αντίδραση. Τα μικροσωματίδια προάγουν μια μορφή ανοσιακής αντίδρασης που καλείται «άσηπτη φλεγμονή» και χαρακτηρίζεται από την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών (κυτοκίνες και χημιοκίνες) ταυτόχρονα με τη στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων (Chen and Numez 2010). Ο ρόλος τους στην έκκριση κυτοκινών και στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις καθιστά τα μικροσωματίδια βασικούς μεσολαβητές της φλεγμονής.

Κατά τις φλεγμονώδεις διαδικασίες τα αντιπηκτικά μονοπάτια υφίστανται κατιούσα ρύθμιση (down regulation) και επάγεται η φλεγμονώδης απόκριση. Ένα από τα ερεθίσματα που μπορούν να οδηγήσουν στην απελευθέρωση μικροσωματιδίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι το οξειδωτικό stress (VanWijk et

al 2003). Τα ενδοθηλιακά MPs διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη οξειδωμένα φωσφολιπίδια -ως απόρροια του οξειδωτικού stress- τα οποία οδηγούν στην προσκόλληση των μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και στην ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων *in vitro* (Huberet al 2002). Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν μόρια προσκόλλησης, όπως είναι ο VCAM -1, ο ICAM-1 και η E- σελεκτίνη προσελκύοντας στο σημείο της φλεγμονής λευκοκύτταρα. Τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από τα λευκοκύτταρα εκφράζουν επίσης προσδέτες και έτσι, εκτός των λευκοκυττάρων, και τα LMPs προσκολλώνται στα μόρια προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η λευκο-ενδοθηλιακή προσκόλληση οδηγεί στην απελευθέρωση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων στον υπενδοθηλιακό χώρο (innermost layer) των ενδοθηλιακών κυττάρων, αποτελώντας ένα σημαντικό γεγονός στην έναρξη της φλεγμονής (Nejlund 2012).

Στα πρώιμα στάδια της φλεγμονής τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών παραγόντων από τα μακροφάγα, όπως του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης (transforming growth factor, TGF- $\beta$ ), καταστέλλοντας έτσι την διαδικασία της φλεγμονής (Gasser and Schifferli 2004). Η καταστολή των προ-φλεγμονωδών μηχανισμών στα πρώιμα στάδια αποδίδεται ως επί το πλείστον στα LMPs (Reid and Webster 2012). Η προστατευτική τους δράση οφείλεται τόσο στο ότι αποτελούν φορείς της πρωτεΐνης Αννεξίνη 1 (AnxA1) που έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες - όσο και στην ανασταλτική τους δράση έναντι της έκκρισης προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-8 και ο TNF- $\alpha$ , αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την εξέλιξη της φλεγμονής (Gasser and Schifferli 2004).

Σε πιο όψιμα στάδια της φλεγμονής, ωστόσο, τα μικροσωματίδια μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως IL - 1 $\beta$ , IL - 6, MCP - 1 και TNF (Mesri and Altieri 1999; Scanu et al 2008; Neri 2011). Με την μεταφορά και την απελευθέρωση μεσολαβητών της φλεγμονής τα μικροσωματίδια καθίστανται ικανά να μεταφέρουν πληροφορίες και σήματα σε μεγάλες αποστάσεις (Beyer and Pisetsky 2010) .

Στο πλαίσιο της φλεγμονής, τα μικροσωματίδια μπορούν να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή, είτε μέσω αδρανοποίησης είτε μέσω θανάτωσης φλεγμονωδών κυττάρων. Μία σειρά πληθυσμών μικροσωματιδίων φαίνεται να εκφράζουν τον Fas προσδέτη (FasL - μέλος της υπεροικογένειας TNF) στην επιφάνειά τους και με αυτόν τον τρόπο να επάγουν την απόπτωση φλεγμονωδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων, των κυκλοφορούντων αγγειογενετικών

κυττάρων (circulating angiogenic cells), και των T- και B- κυτταρικών σειρών μέσω της πυροδότησης της οδού του Fas υποδοχέα (Distler et al 2005; Distler et al 2011). Τα μικροσωματίδια που φέρουν τον FasL μπορούν να αποτελέσουν ισχυρό επαγωγέα της απόπτωσης, σε αντίθεση με τον διαλυτό FasL που φαίνεται να παρουσιάζει ασθενή προαποπτωτική δράση. (Beyer and Pisetsky 2010). Η δράση αυτή, ενώ μπορεί να ελέγξει τις ανεπιθύμητες συνέπειες της φλεγμονής, μπορεί ωστόσο να οδηγήσει σε καταστροφικά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, MPs που προκύπτουν από καρκινικά κύτταρα και εκφράζουν τον Fas προσδέτη μπορούν να επάγουν την απόπτωση των T-κυττάρων και να διευκολύνουν με τον τρόπο αυτό τη διαφυγή καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό κατά την καρκινογένεση (Andreola et al 2002).

#### **1.7.4 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ**

Τα μικροσωματίδια, ενώ αρχικά θεωρήθηκαν κυτταρικά υπολείμματα χωρίς βιολογικό ρόλο, σήμερα φαίνεται να συνιστούν σημαντικούς μεσολαβητές της κυτταρικής επικοινωνίας. Πιο συγκεκριμένα, *το μικρό τους μέγεθος* -που τους επιτρέπει να διατρέχουν όλο το κυκλοφορικό σύστημα- και *το περιεχόμενό τους* σε μόρια-συνδέτες, υποδοχείς, συνυποδοχείς, ενεργά λιπίδια, mRNA και mi RNA, καθιστούν τα μικροσωματίδια ικανά να ρυθμίζουν την τοπική και απώτερη σηματοδότηση μεταβάλλοντας τις βιολογικές ιδιότητες των κυττάρων-στόχων. Αυτό το διακυτταρικό σύστημα μεταφοράς, που διαμεσολαβείται από τα μικροσωματίδια, επιτρέπει την εγκαθίδρυση ενός ολοκληρωμένου δικτύου επικοινωνίας, στο οποίο συγκεκριμένες ιδιότητες και πληροφορίες μπορούν να μοιραστούν μεταξύ των κυττάρων, επιτρέποντας έτσι τον συντονισμό πολύπλοκων διεργασιών, όπως η ανοσορύθμιση και η διατήρηση του ομοιοστατικού μηχανισμού (Maue and Weber 2010).

Γενικότερα, φαίνεται ότι ανάλογα με την προέλευση και τη σύστασή τους τα MPs μπορούν να διεγείρουν τα κύτταρα με ποικίλους μηχανισμούς, μεταξύ των οποίων είναι και η εκλεκτική μεταφορά μορίων με ρόλο υποδοχέως ή μεσολαβητή – όπως το αραχιδονικό οξύ- που διαθέτουν ανοσο-διεγερτικές ιδιότητες (Barry et al 1997; Jungel et al 2007) (Εικόνα 5β). Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της μεταφοράς δεν είναι απόλυτα αποσαφηνισμένος, πιστεύεται όμως ότι τα MPs αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα-στόχους, είτε με **άμεση επαφή**, είτε μέσω διαδικασίας συγχώνευσης-**σύντηξης** (fusion), είτε μέσω **εγκόλπωσης** του μικροσωματιδίου από το κύτταρο-αποδέκτη (engulfment) (Εικόνα 5).

Ειδικότερα, έρευνες υποδεικνύουν ότι τα μικροσωματίδια επιτυγχάνουν τη δράση τους μέσω της άμεσης φυσικής επαφής-αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα-στόχους (Burger et al 2011; Terisse et al 2010; Faille et al 2011) . Για παράδειγμα, τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από αιμοπετάλια διασυνδέονται άμεσα, μέσω της γλυκοπρωτεΐνης Ib, με τα ουδετερόφιλα, που αντιστοίχως εκφράζουν την ιντεγκρίνη αΜβ2 (Lo et al 2006). Η επικοινωνία μεταξύ MPs και κυττάρων-στόχων, η οποία διαμεσολαβείται από ιντεγκρίνες, έχει επίσης αναφερθεί για μικροσωματίδια που προκύπτουν από ενδοθηλιακά κύτταρα (Terisse 2010), λεία μυϊκά κύτταρα (Essayagh et al 2005) και ουδετρόφιλα (Pluskota et al 2008)

Οι επιφανειακές αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούνται από επιφανειακούς υποδοχείς. Τα MPs εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια προσκόλλησης μέσω των οποίων, είτε πραγματώνουν την τροποποίηση της κυτταρικής συμπεριφοράς, είτε «συλλαμβάνονται» από τα κύτταρα –στόχους (Fujimi et al 2003; Press et al 2012; Rautou et al 2011). Επιπρόσθετα, τα MPs συμμετέχουν στην εκλεκτική απελευθέρωση αδιάλυτων πρωτεϊνών, όπως είναι οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς (CCR5, TF, EGFR, κλπ) καθώς και άλλων μορίων που εμπλέκονται στην ανοσοτροποποίηση (They et al 2009; Al-Nedawi et al 2008; Mack et al 2000).

Τα MPs επιτυγχάνουν το βιολογικό τους ρόλο, εκτός από τις επιφανειακές αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων υποδοχείς με τα κύτταρα-στόχους, κυρίως **μέσω μεταφοράς του περιεχομένου τους** (βιοενεργά λιπίδια πχ.PAF, πρωτεΐνες και RNA (Diehl et al 2012; Mueller et al 2011) στα κύτταρα με τα οποία αλληλεπιδρούν (recipient) (Watanabe et al 2003; Cardo et al 2008). Τα MPs μπορούν να ενσωματωθούν από τα μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά και άλλα κύτταρα. Η ενσωμάτωση μπορεί να επηρεάσει τόσο τα φαινοτυπικά όσο και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του κυττάρου-στόχου. Ένας από τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος από τα MPs είναι η **σύντηξή τους** με ένα κύτταρο-στόχο και η μεταφορά σε



αυτό του περιεχομένου τους. Αυτή η διαδικασία μεταφοράς μεμβρανικών θραυσμάτων έχει περιγραφεί και κατά το παρελθόν ως «τρογοκύτωση» (trocytosis) στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Kim et al 2003).

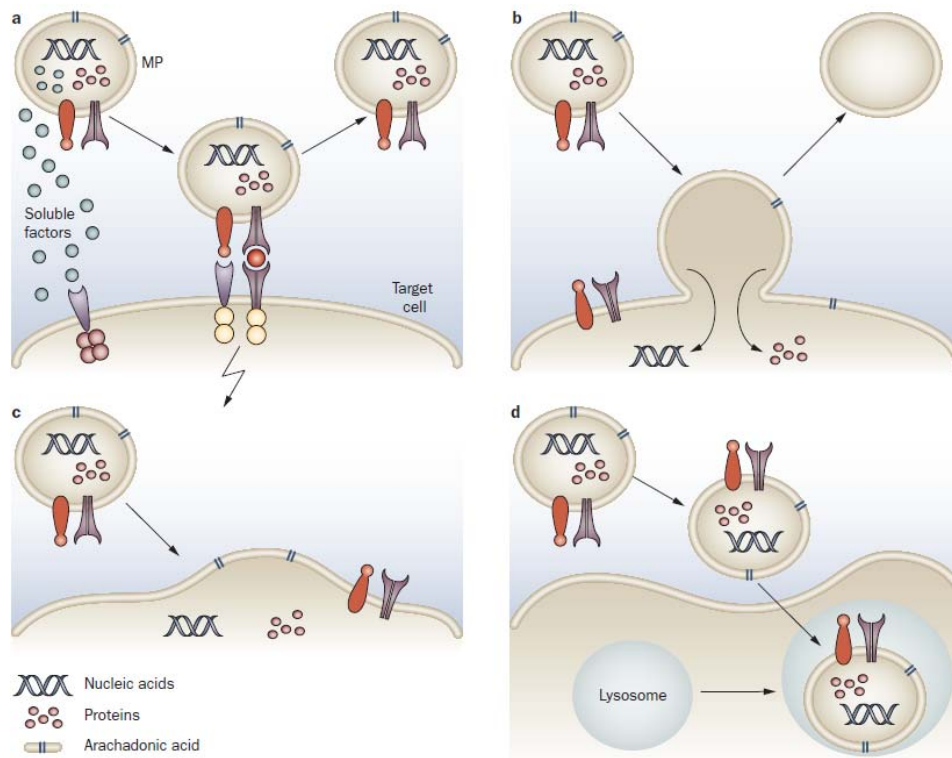
«Τρογοκύτωση» (trocytosis) καλείται η διαδικασία μεταφοράς μορίων μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού, κατά την οποία τα κύτταρα δέχονται μεμβρανικό και κυτοσολικό υλικό προερχόμενο από άλλα κύτταρα (David DM, 2007). Αν και η «τρογοκύτωση» θεωρείται μορφή αλληλεπίδρασης κυρίως μεταξύ κυττάρων, πιθανολογείται ότι επίσης συμβαίνει μεταξύ κυττάρων και MPs και ευθύνεται ως ένα βαθμό για τη δράση τους. Οι ακριβείς μηχανισμοί που διέπουν τη σύντηξη είναι αδιευκρίνιστοι προς το παρόν, ωστόσο φαίνεται να απαιτείται τόσο υδρόλυση του ATP όσο και αύξηση της συγκέντρωσης  $Ca^{2+}$  (Langer and Bokemeyer 2012; Newland et al 2010). Η μεταφορά αυτή μπορεί να μεταβάλλει δραματικά τις ιδιότητες του κυττάρου-αποδέκτη, για παράδειγμα λόγω αύξησης στη συγκέντρωση ενός ρυθμιστικού RNA ή ακόμα ενός νέου μεμβρανικού υποδοχέα. Η μεταφορά υποδοχέων μπορεί να αυξήσει την κυτταρική απόκριση ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου, ενώ αυτή η μεταφορά μπορεί να αυξήσει την κυτταρική ευαισθησία απέναντι στη μόλυνση (π.χ. έναντι του ιού HIV) από οργανισμούς που απαιτούν ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς για την είσοδό τους στο κύτταρο (Ardoin and Pissetsky 2008; Muradiharan-Chari et al 2010; Mack et al 2000). Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη miRNA μέσα σε μικροσωματίδια (Diehl et al 2012) και εικάζεται ότι η μεμβράνη τους δρά προστατευτικά έναντι της αποδόμησης των κυκλοφορούντων μεταγράφων από τις RNAάσες του αίματος.

Άλλος μηχανισμός μεταφοράς του περιεχομένου των μικροσωματιδίων είναι η εσωτερικεύσή τους με το μηχανισμό της φαγοκυττάρωσης ή της μακροπυνοκύτωσης από τα κύτταρα-στόχους. Κατά τη διαδικασία αυτή το περιεχόμενο των μικροσωματιδίων εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσα σε μεμβρανική «θήκη», σε αντίθεση με την απευθείας μεταφορά του μετά από την σύντηξη του μικροσωματιδίου με την κυτταρική μεμβράνη. Έρευνες έχουν διαπιστώσει ότι εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα ενθυλακώνουν PMPs, τα οποία φαίνεται να αποτελούν στη συνέχεια στόχο των λυσοσωμάτων (Faille et al 2011). Υπό αυτές τις προϋποθέσεις, η φαγοκύτωση των MPs και η εν συνεχεία σύνδεσή τους με τα λυσοσώματα, εισάγει μεν στα κύτταρα το περιεχόμενό τους, το οποίο όμως είναι πιθανόν να μην παρουσιάσει βιολογικές δράσεις.



**Στο πλαίσιο της φλεγμονής** τα μικροσωματίδια συμμετέχουν σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και μεταξύ λευκοκυττάρων (Forlow et al 2000) και ενδοθηλιακών κυττάρων (Baj-Krzyworzecka et al 2002). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιούν για τη διασύνδεση των κυττάρων μεμβρανικούς υποδοχείς προσκόλλησης, όπως η P-σελεκτίνη και ο PAF (platelet activating factor). Για παράδειγμα, τα PMPs μπορούν να προάγουν τη διασύνδεση μεταξύ λευκοκυττάρων (leukocyte–leukocyte aggregation), πιθανόν μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποδοχέα της P-σελεκτίνης που εκφράζεται στην επιφάνειά τους και του συνδέτη τους πάνω στα λευκοκύτταρα (Forlow et al 2000) .

Στο πλαίσιο αυτού του ρόλου τα PMPs μπορούν να διαμεσολαβήσουν στη σύνδεση λευκοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα ( Baj-Krzyworzecka et al 2002). Ο μηχανισμός στον οποίο στηρίζεται η ανοσολογική τροποποίηση που διαμεσολαβείται από τα μικροσωματίδια είναι η μεταφορά αραχιδονικού οξέος από τα μικροσωματίδια στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα επιτείνοντας με αυτό τον τρόπο την προσκόλλησή τους (Barry et al 1997; Barry et al; 1998). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από τα λευκοκύτταρα μπορούν να αλλάξουν τον φαινότυπο των επιθηλιακών κυττάρων μέσω της μεταφοράς στα τελευταία λευκοκυτταρικών αντιγόνων. Η παθητική απόκτηση του λευκοκυτταρικού φαινοτύπου και η αλλαγή των ιδιοτήτων των επιθηλιακών κυττάρων μπορούν να προκύψουν τόσο από μεταφορά προσχηματισμένων πρωτεϊνών, όσο και από μεταφορά νουκλεϊκών οξέων, όπως ρυθμιστικό microRNA ή mRNA που υφίσταται μεταγραφή.



Εικόνα 5 Μηχανισμοί ανοσοτροποποίησης από τα MPs

Τα MPs αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα-στόχους με ποικίλους τρόπους:

α) Διαλυτοί μεσολαβητές που ελευθερώνονται από τα MPs (π.χ. IL-1 $\beta$ ) μπορούν να δεσμευτούν σε υποδοχείς του κυττάρου-στόχου και να ενεργοποιήσουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση

β) Τα MPs μπορούν να έρθουν σε στενή επαφή με τα κύτταρα-στόχους και να τους μεταφέρουν εκλεκτικά μεμβρανικά συστατικά (π.χ. αραχιδονικό οξύ), κυτοπλασματικές πρωτεΐνες, και νουκλεϊκά οξέα που μπορούν να αλλάξουν τις λειτουργίες του κυττάρου μέχρι και την απόκτηση φλεγμονώδους φαινότυπου.

γ) Σύντηξη των MPs με τα κύτταρα-στόχους οδηγεί σε μη εκλεκτική μεταφορά μεμβρανικών, κυτοσολικών και πυρηνικών συστατικών. Η σύντηξη μπορεί να αλλάξει δραστικά την εμφάνιση και τις ιδιότητες του κυττάρου-στόχου.

δ) Τα MPs μπορούν να εγκλωπωθούν από τα κύτταρα στόχους. Τα συστατικά τους μπορούν να ακολουθήσουν τη διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης και μεταξύ άλλων να ενεργοποιήσουν υποδοχείς των νουκλεϊκών οξέων (Beyer C and Pisetsky D 2010).

## 1.8 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ MPs ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ) αποτελεί μια χρόνια αυτοάνοση νόσο η οποία προκαλεί αρθρική παραμόρφωση και πόνο αλλά και συστηματικές εκδηλώσεις, όπως ταχέως εξελισσόμενη αθηροσκλήρυνση που αποτελεί και προγνωστικό δείκτη αυξημένης θνητότητας. Στα πλαίσια της νόσου γενετικοί παράγοντες, επιγενετικές τροποποιήσεις και περιβαλλοντικοί παράγοντες αλληλεπιδρούν οδηγώντας στην παραγωγή ειδικών αυτοαντισωμάτων πχ. αντισώματα έναντι κιτρολλινοποιημένων πρωτεϊνών (anti-citrullinated protein antibodies ή ACPAs), στην αρθρική φλεγμονή και στην καταστροφή των οστών. Αυτές οι διεργασίες διαμεσολαβούνται σε μεγάλο βαθμό από κυτοκίνες όπως είναι ο TNF- $\alpha$ , η IL-6 και η IL-1, που αποτελούν και τη βάση της θεραπευτικής αγωγής.

Η θρόμβωση, η αγγειογένεση, και η φλεγμονή είναι στενά συνδεδεμένες, ενώ οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις μπορούν, εν μέρει τουλάχιστον, να ρυθμιστούν από τα μικροσωματίδια. Τα μικροσωματίδια **αποτελούν τον σύνδεσμο μεταξύ αυτών των θεμελιωδών διαδικασιών**, τόσο σε συστηματικά νοσήματα όσο και σε νοσήματα των επιμέρους οργάνων. *Ειδικότερα, στην παθογένεση των ρευματικών νόσων η φλεγμονή, η θρόμβωση και η αγγειογένεση κατέχουν επίσης ρόλο – κλειδί, με την εξέλιξη της ασθένειας να χαρακτηρίζεται από ταχέως εξελισσόμενη αθηρωμάτωση.*

Για παράδειγμα, τα PMPs μπορούν να εκφράσουν θρομβοσπονδίνη, η οποία αφενός ρυθμίζει τη δράση του παράγοντα von Willebrand, αφετέρου μετέχει στο σύστημα του συμπληρώματος και προάγει την αγγειογένεση (Beyer and Pisetsky 2010; Hugel et al 2005). Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι στο αρθρικό υγρό τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από τα κοκκιοκύτταρα και τα μονοκύτταρα έχουν υψηλό προ-θρομβωτικό δυναμικό, που οφείλεται στην έκφραση του παράγοντα VII (Berckmans et al 2002). Τα μικροσωματίδια μπορούν επίσης να μεσολαβήσουν στην αναδιαμόρφωση των ιστών, η οποία επιτρέπει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι τα μικροσωματίδια που απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (EMPs) μετά από διέγερση, φέρουν μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (matrix metalloproteinases – MMPs) και επάγουν την ιστική αναδιαμόρφωση που απαιτείται πριν την αγγειογένεση [Beyer and Pisetsky 2010; Distler et al 2005(b)].

Δεδομένης της στενής σχέσης μεταξύ κυτοκινών και παραγωγής MPs από τα

κύτταρα του ανοσοποιητικού, πολλές έρευνες εστιάζουν πλέον στο ρόλο των MPs τόσο στις αρθρικές όσο και στις εξωαρθρικές εκδηλώσεις της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, υποδεικνύοντας ότι τα επίπεδά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες (Ardoin and Pisetsky 2008). Ανάλογα με το στάδιο της νόσου, τα μικροσωματίδια μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες στο καθορισμό διαφόρων υποτύπων ασθενών, στην αξιολόγηση της δραστηριότητας της νόσου, καθώς και στην πρόγνωση.

Στις αρχικές έρευνες σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, βρέθηκε ότι τα επίπεδα των PMPs **στο αίμα** είναι αυξημένα και φαίνεται να σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου (disease activity) (Knijff-Dutmer et al 2002).

Ενώ τα PMPs ανευρίσκονται αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, **στο αρθρικό υγρό** φαίνεται να κυριαρχούν τα MPs που προκύπτουν κυρίως από κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα (Berckmans et al 2002). Ταυτόχρονα όμως μπορούν να ανευρεθούν MPs από T-κύτταρα, B-κύτταρα, αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα (Berckmans et al 2002; Berckmans et al 2005; Biro E et al 2007). Τα MPs του αρθρικού υγρού ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλες φλεγμονώδεις αρθρίτιδες μπορούν να προκαλέσουν τον εξαρτώμενο από τους παράγοντες TF-παραγόντα VII σχηματισμό θρομβίνης. Η τοπική υπερπηκτικότητα μπορεί να πυροδοτήσει την ενδοαρθρική φλεγμονή και τη δημιουργία ινωδών αποθέσεων που είναι γνωστές ως «ρομβοειδείς κρύσταλλοι» (rice bodies) (Berckmans et al 2002; Berckmans et al 2005; Biro E et al 2007).

Εκτός από την προαγωγή της φλεγμονής, τα MPs συμβάλλουν στη διάβρωση του χόνδρου και του οστού επιδρώντας στους αρθρικούς ινοβλάστες. Όπως έδειξαν *in vitro* μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από ασθενείς με PA και άλλες φλεγμονώδεις αρθρίτιδες, κατά την επώαση υμενοκυττάρων (κύτταρα που προσομοιάζουν στους ινοβλάστες) με αυτόλογα MPs, φάνηκε ότι τα μικροσωματίδια μπορούν να διεγείρουν τα υμενοκύτταρα στην **απελευθέρωση χημειοκινών και κυτοκινών**, όπως IL – 6, IL – 8, CCL2, MCP – 2, ICAM – 1 (intercellular adhesion molecule – 1), RANTES και VEGF, ο οποίος προσελκύει επιπρόσθετα λευκοκύτταρα στο σημείο της φλεγμονής (Distler et al 2005). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα μικροσωματίδια που ελήφθησαν από υγρό ασθενών με αδιαφοροποίητες μορφές της νόσου προκάλεσαν επίσης την παραγωγή κυτοκινών και χημειοκινών, υποδεικνύοντας την ύπαρξη βιολογικά δραστικών MPs και σε αυτές τις μορφές.

Το σύστημα του συμπληρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση

της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και υπάρχουν ενδείξεις, προερχόμενες τόσο από αρθρικό υμένα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα όσο και από ζωικά μοντέλα, ότι η ενεργοποίηση αφορά τόσο το κλασικό όσο και το εναλλακτικό μονοπάτι (Okroj et al 2007). Ένδειξη της ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω του κλασικού μονοπατιού, το οποίο οδηγεί στη συγκέντρωση των κυττάρων φλεγμονής, αποτελεί το γεγονός ότι ο αριθμός των C1q συνδεδεμένων μικροσωματιδίων είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση των μικροσωματιδίων που συνδέονται με τα μόρια IgG και IgM ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Biro et al 2007).

Η ανεύρεση εναποθέσεων στον αρθρικό χόνδρο ασθενών με PA, οι οποίες περιέχουν ανοσοσφαιρίνες συνδεδεμένες με το C3 συστατικό του συμπληρώματος, δείχνει ότι τα μικροσωματίδια μπορούν να ενεργοποιήσουν το κλασικό μονοπάτι του συμπληρώματος, όχι μόνο *in vitro* αλλά και πιθανόν *in vivo* (Gasser et al 2003; Gasser and Schifferli 2005).

Επιπλέον, έρευνες έδειξαν ότι στο αρθρικό υγρό ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα παρατηρείται αυξημένος αριθμός μικροσωματιδίων προερχόμενων από τα λευκοκύτταρα (LMPs) που συνδέονται με τα C1q, C4 και C3 συστατικά του συμπληρώματος, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα του αίματος ήταν σαφώς μικρότερα, τόσο σε ασθενείς με PA όσο και στον πληθυσμό ελέγχου (Biro et al 2007).

Εκτός από το ρόλο τους ως προ-φλεγμονώδεις και προ-θρομβωτικοί μεσολαβητές, τα μικροσωματίδια μπορούν να συμβάλλουν στην παθογένεση των ρευματικών ασθενειών και ειδικότερα της ρευματικής αρθρίτιδας με τον **σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων**. Έτσι, τα σωματίδια που προέρχονται από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα –αλλά και συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο- μπορεί να έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις IgG στην επιφάνειά τους (Ullal et al 2011).

Ένας σημαντικός αριθμός των μικροσωματιδίων που συγκροτούν αυτά τα ανοσοσυμπλέγματα (mpICs) προέρχονται από τα αιμοπετάλια και εκφράζουν το CD41. Τα mpICs προκύπτουν από τη σύνδεση αυτοαντισωμάτων σε κιτρολλινοποιημένες πρωτεΐνες (όπως βιμεντίνη και ινωδογόνο) καθώς και σε ιστόνες. Τα ανοσοσυμπλέγματα αυτά είναι δυνητικά προφλεγμονώδη και προκαλούν την έκλυση λευκοτριένιων από τα ουδετερόφιλα σε *in vitro* μοντέλα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι τα μικροσωματίδια που απομονώνονται από αρθρικό υγρό ασθενών με ψωριακή αρθρίτιδα δεν παρουσιάζουν αντίστοιχη προφλεγμονώδη δραστηριότητα (Cloutier et al 2013).

Η ειδικότητα της δέσμευσης των αντισωμάτων στα σωματίδια δεν είναι γνωστή. Είναι πάντως πιθανό, η παρουσία των αντισωμάτων στην επιφάνεια των σωματιδίων να προκύπτει περισσότερο από τη δέσμευσή τους σε Fc υποδοχείς που εκφράζονται σε συγκεκριμένα μικροσωματίδια, παρά από τη δέσμευση σε αντιγόνα που εκτίθενται στην επιφάνεια (Pisetsky et al 2012).

Βασικό χαρακτηριστικό της καταστροφής των αρθρώσεων στην ρευματοειδή αρθρίτιδα είναι η παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να αποικοδομήσουν την εξωκυττάρια ουσία των χόνδρων και των οστών οδηγώντας στην καταστροφή τους και στην παραμόρφωση της άρθρωσης. *In vitro* έρευνες δείχνουν ότι σε κάποιο στάδιο της αρθρίτιδας τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από μονοκύτταρα και T-κύτταρα δύνανται να επάγουν την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (MMPs), και πιο συγκεκριμένα τις MMP-1, MMP3, MMP9 και MMP13 καθώς και άλλους μεσολαβητές από υμενοκύτταρα -- διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει στη βλάβη και καταστροφή της άρθρωσης [Distler et al 2005 (b)]. Η παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών -καθώς και χημοκινών- από τα μικροσωματίδια προκύπτει μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB, ο οποίος υπερεκφράζεται στο φλεγμόντα αρθρικό υμένα (synovium) (Berckmans et al 2005).

Στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας συνεισφέρουν και τα Β-λεμφοκύτταρα συμμετέχοντας τόσο στη φυσική ανοσία, και συγκεκριμένα στην αντιγονοπαρουσίαση, όσο και στις διαδικασίες της επίκτητης ανοσίας, κυρίως μέσω της παραγωγής αντισωμάτων με κυρίαρχα τα ACPA ( Raptopoulou et al 2007). Για τον λόγο αυτό, η θεραπεία έναντι των Β-κυττάρων με ριτουξιμάμπη (rituximab) μπορεί να είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με PA που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη (Edwards et al 2004). Έχει αποδειχθεί σε *in vitro* συστήματα ότι τα MPs μπορούν να συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των Β-κυττάρων μέσω διαλυτών μεσολαβητών (Messer et al 2009). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι μικροσωματίδια, από αρθρικό υγρό ασθενών με PA αλλά και οστεοαρθρίτιδα, προκαλούν την παραγωγή IL-6, IL-8 και BAFF σε συγκαλλιέργειες με υμενοκύτταρα που προσομοιάζουν σε ινοβλάστες (fibroblasts like synoviocytes, **FLSs**). Ο BAFF είναι μέλος της υπερικογένειας του TNF-α που παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, στην επέκταση και στην αντίσταση έναντι της απόπτωσης των Β-κυττάρων (Schneider et al 2003). Εικάζεται ότι τα μικροσωματίδια προωθούν την συμμετοχή των Β-κυττάρων στις αυτοάνοσες αντιδράσεις μέσω της ενεργοποίησης των FLSs.

Τέλος, ανάμεσα στις άλλες διαδικασίες που επιτείνουν την παθογένεση της PA, είναι και η αγγειογένεση. Η αγγειογένεση φαίνεται να παίζει ρόλο στην υποστήριξη του φλεγμένοντα και διογκούμενου αρθρικού υμένα (Konisti et al 2012). Όπως δείχνουν *in vitro* συστήματα, τα PMPs που εκφράζουν το CD 40 μπορούν να παίξουν ρόλο στην αγγειογένεση μέσω της επαγωγής του VEGF (Beyer and Pisetsky 2010), ενώ MPs από αρθρικό υγρό ασθενών με PA μπορούν να επάγουν την παραγωγή των προ-αγγειογενετικών ELR+ χημειοκινών (Reich et al 2011).

Εν κατακλείδι, όλες οι πληροφορίες επιβεβαιώνουν ότι τα MPs αποτελούν τους μεσολαβητές σε κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση του αρθρικού υμένα και σε αρθρική βλάβη (Ardoin and Pisetsky 2008).

### 1.8.1 Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος

Ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Σ.Ε.Λ.) αποτελεί αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι του DNA –μεταξύ άλλων πυρηνικών μορίων (antinuclear antibodies ή ANAs). Τα αντισώματα αυτά μπορούν να σχηματίσουν ανοσοσυμπλέγματα που προάγουν την παθογένεση μέσω της έκκρισης κυτταροκινών, της εναπόθεσής στους νεφρούς και της εγκατάστασης νεφρίτιδας. Η παραγωγή ιντερφερόνης και ειδικά της ιντερφερόνης -1, αντανάκλα την ανοσολογική δραστηριότητα του DNA στο εσωτερικό του κυττάρου, η οποία μετά τη δέσμευσή του με αντισώματα τροποποιείται, έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η είσοδος του DNA μέσα στα κύτταρα και η πρόσβασή του σε υποδοχείς ειδικούς για τα νουκλεϊκά οξέα που εντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων (Boule et al 2004; Tian et al 2007; Pisetsky and Ullal 2010). Οι υποδοχείς αυτοί περιλαμβάνουν τόσο υποδοχείς τύπου Toll (TLR9) όσο και μη Toll υποδοχείς .

Τα αντιγόνα που συγκροτούν τα ανοσοσύμπλοκα προκύπτουν από το νουκλέωμα, που αποτελεί μια «δεξαμενή» κυκλοφορούντων στο αίμα μακρομορίων και συνίσταται από DNA, RNA, και πυρηνικές πρωτεΐνες, τα οποία απελευθερώνονται από τα κύτταρα. Ο κυτταρικός θάνατος αποτελεί την κύρια πηγή αυτών των μορίων. Το εξωκυτταρικό DNA ανευρίσκεται τόσο σε διαλυτή μορφή όσο και σε πακεταρισμένη - διαμερισματοποιημένη μορφή, με τα μικροσωματίδια που δημιουργούνται *in vitro* να παρουσιάζουν αντιγονικά ενεργό DNA. Εν κατακλείδι, τα ευρήματα αυτά ενισχύουν το ότι ο κυτταρικός θάνατος είναι καθοριστικό γεγονός στην παθογενετική διαδικασία του Σ.Ε.Λ. παρέχοντας το κυκλοφορούν DNA, βασικό συστατικό της συγκρότησης ανοσοσυμπλεγμάτων ( Pisetsky and Ullah 2010).

Ο καθοριστικός ρόλος του κυτταρικού θανάτου στη δημιουργία αποθέματος

εξωκυτταρικού DNA στον Σ.Λ.Ε. επιβεβαιώνεται από έρευνες που έδειξαν ότι οι ασθενείς με λύκο παρουσιάζουν είτε αύξηση του κυτταρικού θανάτου είτε βλάβη στον μηχανισμό εκκαθάρισης των νεκρών κυττάρων ( Munoz et al 2010). Στο πλαίσιο αυτό οι ασθενείς με λύκο παρουσιάζουν αυξημένο αντιγονικό εαυτό-DNA, που οδηγεί είτε στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων είτε στη δημιουργία παθογενετικών συμπλεγμάτων.

Στο πλαίσιο της φλεγμονής και των αγγειακών ανωμαλιών –χαρακτηριστικών του Σ.Ε.Λ.- η παρουσία των MPs στο περιφερικό αίμα θα μπορούσε να αποτελεί βασικό βιοδείκτη, που να αντανάκλα δυσλειτουργία των βασικών κυτταρικών πληθυσμών οι οποίοι προκαλούν την ασθένεια. Έρευνες έχουν διαπιστώσει αυξημένα επίπεδα PMPs σε ασθενείς με Σ.Λ.Ε. (Jungel et al 2007) ενώ σε μία από αυτές τα αυξημένα επίπεδα PMPs παρουσίαζαν συσχέτιση με τη δημιουργία θρομβίνης αλλά όχι με την ενεργότητα της νόσου ή την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (Jodo et al 2001 ).

Τα αποπτωτικά κύτταρα υπό κανονικές συνθήκες δεν θα έπρεπε να επάγουν ανοσολογική απόκριση, ωστόσο αυτό ακριβώς φαίνεται να συμβαίνει στον αυτοάνοσο ερυθματώδη λύκο. Με ποιο μηχανισμό τα αποπτωτικά κύτταρα ή οι πρωτεΐνες που προέρχονται από αποπτωτικά κύτταρα επάγουν την ανοσολογική απόκριση κατά τον ερυθματώδη λύκο, παραμένει υπό διερεύνηση (Dieker et al 2009). Οι έρευνες που αφορούν στην αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα είναι εκτενείς (Ravichandran et al 2007; Dieker et al, 2009). Γενικά θεωρείται ότι τα αποπτωτικά κύτταρα δεν επάγουν προφλεγμονώδη απόκριση ή ακόμα επάγουν την ανοσιακή ανοχή (Dieker et al 2009) και η νέκρωση οδηγεί στην ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Ωστόσο, οι παραπάνω διαπιστώσεις δεν έχουν απόλυτη ισχύ, καθώς φαίνεται ότι τα αποπτωτικά κύτταρα μπορούν να ενισχύσουν μια ανοσιακή απόκριση ( Dieker et al 2009).

Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται εν μέρει από την απελευθέρωση μιας πρόσφατα αναγνωρισμένης τάξης μορίων, που καλούνται αλαρμίνες (Bianci 2007; Dieker et al 2009). Τα μόρια αυτά ενώ έχουν την φυσιολογική τους δράση μέσα στο κύτταρο, μπορούν ωστόσο να δράσουν ως κυτοκίνες όταν απελευθερώνονται. Γενικά, τα αποπτωτικά κύτταρα διαθέτουν ποικίλους μηχανισμούς για να κρατούν τις αλαρμίνες μέσα στο κύτταρο και να εμποδίζουν την ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος. Αν και αυτοί οι μηχανισμοί παραμένουν γενικά αδιευκρίνιστοι, πλήθος μελετών που αφορούν στο κλασικό μόριο αλαρμίνης HMGB1 (extracellular high mobility group box protein 1)



έχουν αποκαλύψει σημαντικές πληροφορίες (Dieker et al 2009). Το μόριο αυτό (HMGB1) είναι μια πρωτεΐνη, που η δράση της εξαρτάται από τη θέση στην οποία εντοπίζεται (Ardoin and Pisetsky 2008; Dieker et al 2009). Όταν είναι μέσα στον πυρήνα σχετίζεται με την δομή των χρωμοσωμάτων, την ελίκωση του DNA και τη ρύθμιση της μεταγραφής. Έξω από το κύτταρο, μπορεί να έχει έναν εντελώς διαφορετικό ρόλο και να λειτουργήσει σαν προφλεγμονώδης κυτοκίνη με δράσεις παρόμοιες με αυτές του TNFα. Η HMGB1 μπορεί να απελευθερωθεί από νεκρωτικά κύτταρα, καθώς και από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα των τελικών προιόντων υψηλής μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης (advanced glycosylation products - RAGE) ή σε Toll υποδοχείς (TLR) (Ardoin and Pisetsky 2008; Dieker et al 2009). Στα αποπτωτικά κύτταρα το HMGB1 παραμένει μέσα στο κύτταρο δεσμευμένο στην υποακετυλιωμένη χρωματίνη, ωστόσο τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν ένα μέρος της HMGB1, η οποία καθίσταται ανενεργή από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται από τα μιτοχόνδρια (Scaffidi et al 2002; Kazama et al 2008; Dieker et al 2009). Σε όψιμα στάδια της απόπτωσης τα αποπτωτικά κύτταρα απελευθερώνουν σωματίδια χρωματίνης που περιέχουν HMGB1 και μπορούν να ενεργοποιήσουν έτσι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, εφόσον τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απομακρυνθούν εγκαίρως. Ενδιαφέρον έχει η έρευνα που δείχνει ότι η χρωματίνη που απομονώνεται από την κυκλοφορία ασθενών με λύκο είναι συνδεδεμένη με το μόριο HMGB1. *Συμπερασματικά, η σύνδεση της χρωματίνης με επικίνδυνα μόρια μπορεί να αυξήσει την ικανότητα των αποπτωτικών μικροσωματιδίων να επάγουν αυτοάνοση απόκριση* (Dieker et al 2009).

Η σχέση μεταξύ ενεργότητας της νόσου και αυξημένων επιπέδων HMGB1 και μικροσωματιδίων στο αίμα παρέχει νέα στοιχεία για τους μηχανισμούς της φλεγμονής και της αυτοανοσίας και υποδεικνύει πιθανούς στόχους για θεραπευτικές παρεμβάσεις (Ardoin and Pisetsky 2008).

Στο πλαίσιο των φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νόσων, κυτταρικός θάνατος σε μεγαλύτερη έκταση ή βλάβη στην εκκαθάριση των υπολειμμάτων των νεκρών κυττάρων, μπορεί να έχουν σημαντική συνεισφορά στις ανοσολογικές διαταραχές που αποτελούν τη βάση της αυτοανοσίας. Πλήθος ερευνών υποδεικνύουν ότι δύο βασικά προϊόντα του κυτταρικού θανάτου, τα μικροσωματίδια και οι HMGB1, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή και στην παθογένεση αυτοάνοσων καταστάσεων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος. Οι δύο αυτές δομές μπορούν επίσης να προκύψουν και κατά την κυτταρική

ενεργοποίηση, αν και η στενή σχέση μεταξύ ενεργοποίησης και απόπτωσης από ενεργοποίηση μπορεί να κάνει πιο περίπλοκη την ερμηνεία της προέλευσης των μικροσωματιδίων (Ardoin and Pisetsky 2008).

### **1.8.2 ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΗ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΟ ΕΡΥΘΗΜΑΤΩΔΗ ΛΥΚΟ**

Δεδομένα από μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι τα καρδιοαγγειακά επεισόδια αποτελούν βασική επιπλοκή ρευματικών νόσων, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Η επιτάχυνση αυτής της εκδήλωσης δύναται να αντανακλά την ένταση της φλεγμονής, αν και η αυξημένη πήξη του αίματος και η θρόμβωση μπορεί να διαδραματίζουν επίσης κάποιο ρόλο.

Ως εκ τούτου, τα PMPs που παράγονται ως αποτέλεσμα της διαμηκτικής τάσης (shear stress) κατά την αθηροσκλήρυνση μπορούν να προκαλέσουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μπορούν να προσκολληθούν στο αγγειακό τοίχωμα, να εισέλθουν στην αθηρωματική πλάκα και να επάγουν την φλεγμονή. Επιπρόσθετα, οι προ-πηκτικές ιδιότητες των PMPs μπορούν να επάγουν την θρόμβωση και την δημιουργία θρόμβων. Καθώς ο αριθμός των PMPs αυξάνεται σε ασθενείς με ρευματικές νόσους, συμπεριλαμβανομένων του ερυθματώδη λύκου και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αυτά τα μικροσωματίδια μπορεί γενικά να επαυξάνουν την νοσηρότητα και την θνησιμότητα. (Pereira et al 2006; Nomura et al 2001; Nagahama et al 2001; Beyer and Pisetsky 2010).

### **1.8.3. ΑΝΤΙΦΩΣΦΟΛΙΠΙΔΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ (APS)**

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο αποτελεί αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από θρόμβωση, ενεργοποίηση της απόπτωσης και ανεύρεση υψηλών επιπέδων παθογενετικών αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (aPL). Το σύνδρομο αυτό σχετίζεται με διάφορες επιπλοκές της κύησης, όπως περιγενετική θνησιμότητα, αποβολές και προεκλαμψία ( Willis et al 2012).

Εξαιτίας των προ-πηκτικών ιδιοτήτων τους, ένας αριθμός μελετών σύγκρινε την έκφραση μικροσωματιδίων στο αίμα ασθενών με διάφορες υποτύπους - κατηγορίες της νόσου.

Συγκεκριμένα, τα PMPs φαίνεται να σχετίζονται με ένα από τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, το αντίσωμα έναντι της λιποπρωτεΐνης Η, υποδεικνύοντας την άμεση εμπλοκή τους στην παθογένεια του συνδρόμου (Ardoin et

al 2007). Άλλη έρευνα έδειξε ότι ο αριθμός των PMPs ήταν αυξημένος μόνο σε ασθενείς με APL και προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης (Jy et al 2007), ενώ πρόσφατη έρευνα (Vikefors et al 2012) έδειξε αύξηση του αριθμού μόνο των EMPs και MMPs αλλά όχι των PMPs. Σε έρευνα ασθενών με πρωτοπαθές αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, συστηματικό ερυθματώδη λύκο και ρευματοειδή αρθρίτιδα τα επίπεδα των PMPs δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των τριών ομάδων, αν και διάφοροι ασθενείς με ΣΛΕ έδειξαν αύξηση των MPs (Joseph et al 2001).

Αντιθέτως, τα επίπεδα των μικροσωματιδίων που προέρχονται απο ενδοθηλιακά κύτταρα EMPs, ήταν αυξημένα σε ασθενείς με APS, σε σύγκριση με τον πληθυσμό ελέγχου και την ομάδα με θρόμβωση μη σχετιζόμενη με APS. Σε *in vitro* έρευνες, προσθήκη πλάσματος από ασθενείς με APS σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα οδήγησε σε σημαντική αύξηση των παραγόμενων EMPs (Dignat-George et al 2004). Σύμφωνα με άλλη έρευνα (Jy W. et al 2007), ασθενείς με aPL παρουσίασαν αυξημένο αριθμό EMPs, αν και η αύξηση αυτή δεν εμφάνισε συσχέτιση με προηγούμενο ιστορικό θρόμβωσης. Πρόσφατη έρευνα δείχνει αυξημένα EMPs που εκφράζουν τον ιστικό παράγοντα TF σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (Vikefors et al 2012) σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό. Όπως έχει εξακριβωθεί, στο APS ο ιστικός παράγοντας ενεργοποιεί τον καταρράκτη της πήξεως μέσω της εξωγενούς οδού και η ανιούσα ρύθμισή του (upregulation) διαμεσολαβείται από τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα ( Ruiz-Irastorza et al 2010).

Εν κατακλείδι, οι μελέτες αυτές ενοχοποιούν τα μικροσωματίδια για την παθογένεια του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, αναφέρουν αυξημένους αριθμούς μικροσωματιδίων που προέρχονται κυρίως από το ενδοθήλιο (EMPs), αλλά σε κάποιες περιπτώσεις και από τα αιμοπετάλια (PMPs), υποδεικνύοντας τον ρόλο των μικροσωματιδίων στα θρομβωτικά επεισόδια σε ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο. Από αυτά τα ευρήματα συνάγεται ότι το APL μάλλον προκαλεί χρόνια ενδοθηλιακή ενεργοποίηση ή βλάβη που οδηγεί στην αυξημένη παραγωγή EMPs. Αντίθετα, μόνο συγκεκριμένες aPL υπότυποι-κατηγορίες της νόσου μπορούν να ενεργοποιήσουν τα αιμοπετάλια και την απελευθέρωση PMPs που αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης. Έτσι, τα PMPs μπορούν πιθανόν να αποτελέσουν έναν βιοδείκτη για τον κίνδυνο θρόμβωσης σε άτομα με aPL (Beyer and Pisetsky 2010).

#### **1.8.4. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (Systemic sclerosis)**

Η Συστηματική σκλήρυνση (SSc) ή Σκληρόδερμα αποτελεί νόσο του συνδετικού ιστού, άγνωστης παθογένειας, που επηρεάζει το δέρμα και διάφορα εσωτερικά όργανα. Η νόσος χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των κυττάρων του

ανοσοποιητικού, περιφερική αγγειοπάθεια, ανεύρεση αυτοαντισωμάτων και ιστική ίνωση, ενώ οι κλινικές της εκδηλώσεις είναι αποτέλεσμα περίπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Ένα από τα πρωιμότερα στάδια στην παθογένεση της νόσου είναι η ενδοθηλιακή βλάβη και απόπτωση, γεγονός που οδηγεί σε απώλεια των τριχοειδών αγγείων (Sgong et al 1996). Ο αντιστάθμιστικός μηχανισμός φαίνεται να δυσλειτουργεί και να είναι ανεπαρκής οδηγώντας στη δημιουργία γιγαντιαίων τριχοειδών με ελικώσεις (Cutolo et al 2003).

Έχει διαπιστωθεί ότι ο συνολικός αριθμός των μικροσωματιδίων είναι αυξημένος στο αίμα ασθενών με συστηματική σκλήρυνση σε σύγκριση με τους πληθυσμούς ελέγχου (Guiducci et al 2008). Εκτός από την αύξηση στο συνολικό αριθμό παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις και σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς μικροσωματιδίων και κυρίως στα PMPs, EMPs, MMPs (μικροσωματίδια που προκύπτουν από μονοκύτταρα) αλλά και σε αυτά που προκύπτουν από τα T κύτταρα (TMPs), υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση των αντίστοιχων κυττάρων στη συστηματική σκλήρυνση (Guiducci et al 2008). Η κυριότερη πηγή μικροσωματιδίων είναι αυτά που προκύπτουν από τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Guiducci et al 2008; Nomura et al 2009). Το «παράδοξο» φάνηκε να είναι η αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ συνολικού αριθμού μικροσωματιδίων και των PMPs με το MRSS score (Rodnan skin thickness score) που χρησιμοποιείται στην αξιολόγηση της ινώδους πάχυνσης του δέρματος. Συγκεκριμένα τα υψηλά επίπεδα μικροσωματιδίων σχετίζονται με ηπιότερη δερματική ίνωση στην SSc (Guiducci 2008). Το εύρημα αυτό φαίνεται να είναι σύμφωνο με την γνώση ότι τα μικροσωματίδια μπορούν δυνητικά να επάγουν την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας (MMP-1, MMP-3, MMP-9, και MMP-13). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα μικροσωματίδια μετέχουν στο μετριασμό των εκδηλώσεων της νόσου, όσον αφορά την ίνωση, ασκώντας μάλλον άμεση αντιινώδη δράση στους ινοβλάστες.

Καθώς ο αντισταθμιστικός μηχανισμός της δημιουργίας νέων αγγείων φαίνεται να είναι ανεπαρκής, και δεδομένου του ρόλου των μικροσωματιδίων στην αγγειογένεση, μεταβολή στον αριθμό και στις λειτουργίες των μικροσωματιδίων θα μπορούσε να συναποτελεί γενεσιουργό αιτία για τη διαταραχή της αγγειογένεσης στο πλαίσιο της συστηματικής σκλήρυνσης (Bayer and Pisetsky 2010).

### 1.8.5. ΑΓΓΕΙΙΤΙΔΕΣ

Ετερογενής ομάδα σχετικά σπάνιων, πολύπλοκων και σοβαρών νοσημάτων με κοινές παθοφυσιολογικές, εργαστηριακές και κλινικές εκδηλώσεις, με χαρακτηριστικό γνώρισμα την φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση και την νέκρωση του αγγειακού τοιχώματος. Η κλινική εικόνα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη θέση, το

μέγεθος των προσβεβλημένων αγγείων (τοπική ή συστηματική μορφή) και τον τύπο της φλεγμονής

Διάφορες μελέτες έδειξαν αυξημένα επίπεδα των PMPs, LMPs (leukocyte – derived MPs) και EMPs κατά την οξεία φάση της αγγειίτιδας, με τους ασθενείς σε φάση ύφεσης να εμφανίζουν φυσιολογικά επίπεδα ( Daniel et al 2006; Erdbruegger et al 2008). Η αύξηση του αριθμού των EMPs φαίνεται να σχετίζεται με την φλεγμονή και βλάβη των αιμοφόρων αγγείων, γεγονός που υποδηλώνει την δυνητική χρήση τους ως βιοδεικτών για την εξελισσιμότητα και ενεργότητα της νόσου. Σύγκριση του αριθμού των μικροσωματιδίων στο αίμα με εκείνο των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων, -που αποτελούν έναν άλλο πιθανό βιοδείκτη για τις αγγειίτιδες-, δείχνει ότι και οι δύο δείκτες σχετίζονται με τη δραστηριότητα της νόσου, στις ANCA σχετιζόμενες αγγειίτιδες, ενώ τα επίπεδα των μικροσωματιδίων μειώνονται γρηγορότερα κατά τη φάση της ύφεσης ( Erdbruegger et al 2008; Beyer and Pisetsky 2010). Τα επίπεδα των EMPs, εκτός από τις ενεργές αγγειίτιδες των ενηλίκων, αυξάνονται και σε διάφορες αγγειίτιδες των παιδιών και σχετίζονται με την ενεργότητα της νόσου (Brogan and Dillon 2004). Τα PMPs και τα μικροσωματίδια που προκύπτουν από κοκκιοκύτταρα αυξάνονται σημαντικά στην οξεία φάση ασθενών με διάφορες νεφροπάθειες (Daniel et al 2006)

## **1.9 ΤΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΩΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ**

Ενώ αρχικά θεωρήθηκαν αδρανή κυτταρικά υπολείμματα, τα μικροσωματίδια φαίνεται να παρουσιάζουν προ-φλεγμονώδη και προ-θρομβωτική δραστηριότητα, μέσω των οποίων δύνανται να επηρεάσουν την παθογένεση και την πορεία ρευματικών και άλλων ανοσοδιαμεσολαβούμενων ασθενειών. Τα μικροσωματίδια παρέχοντας πληροφορίες που σχετίζονται με την ενεργοποίηση και τον θάνατο συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών μπορούν να αποτελέσουν μοναδικούς βιοδείκτες, και παρά τις τεχνικές προκλήσεις που παρουσιάζει η μέτρησή τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες και στις ρευματικές νόσους. Ο προσδιορισμός των μικροσωματιδίων ως βιοδεικτών θα συνέβαλε στην αποσαφήνιση των διαφόρων παθογενετικών μηχανισμών και των επιδράσεών τους σε ποικίλους ιστούς και όργανα .

Έρευνες σε ασθενείς με ρευματικές νόσους έδειξαν σημαντικές αυξήσεις στον αριθμό των μικροσωματιδίων σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αριθμό στους

πληθυσμούς ελέγχου. Αυτό ενόχισε την έρευνα πάνω στη χρήση τους ως βιοδείκτες. Οι αυξήσεις αυτές φαίνεται να είναι πιο σημαντικές σε καταστάσεις που εμπλέκεται και το αγγειακό σύστημα και φαίνεται να αφορούν κατά κύριο λόγο αύξηση των PMPs αλλά και των EMPs (Brogan and Dillon 2004; Guiducci et al 2008; Dignat-George et al 2004). Επιπρόσθετα ωστόσο, έρευνες έχουν καταδείξει σε συστηματικές αυτοάνοσες νόσους αυξήσεις και στον αριθμό μικροσωματιδίων που προέρχονται από λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και λευκοκύτταρα, αντανακλώντας τη δική τους εμπλοκή στις διαδικασίες φλεγμονής και ανοσιακής απόκρισης. Αύξηση στον αριθμό των MPs έχει καταγραφεί στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στον συστηματικό ερυθρελαιώδη λύκο, στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, στις αγγειίτιδες και στην προοδευτική συστηματική σκλήρυνση. Όλα τα παραπάνω νοσήματα είναι αυτοάνοσα με εμφάνιση αγγειακών ανωμαλιών. Δεν έχει καταστεί ξεκάθαρο αν η αύξηση του αριθμού οφείλεται σε αυξημένη παραγωγή μικροσωματιδίων ή σε βλάβη στον μηχανισμό εκκαθάρισης και απομάκρυνσης.

Τα μικροσωματίδια δύνανται να αποτελέσουν νέους βιοδείκτες, η μέτρηση των οποίων μπορεί να αποκαλύψει την κατάσταση των ιστών που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Συγκεκριμένα, οι αυξήσεις, είτε του συνολικού αριθμού των μικροσωματιδίων, είτε των διαφορετικών υποπληθυσμών τους, δεν είναι τόσο ειδικές ώστε να επιτρέπουν τη διαφορική διάγνωση. Ωστόσο, η μέτρηση των μικροσωματιδίων μπορεί να βοηθήσει στην αποσαφήνιση της κατάστασης των ιστών –στόχων της ασθένειας, ειδικά του αγγειακού συστήματος, με απλές μη επεμβατικές εξετάσεις αίματος. Πράγματι, η ανίχνευση μικροσωματιδίων σε δείγματα περιφερειακού αίματος μπορεί να διευκολύνει την αξιολόγηση συγκεκριμένων ιστών (όπως π.χ. αγγεία), στους οποίους η πρόσβαση δεν είναι εύκολη χωρίς τη διενέργεια βιοψίας.

Επιπλέον, η μέτρηση των μικροσωματιδίων παρέχει πληροφορίες για διαδικασίες (π.χ. ανοσολογική ενεργοποίηση κυττάρου) που εμπλέκουν μόνο έναν περιορισμένο πληθυσμό κυττάρων στο αίμα ή τον ιστό. Τέτοια δεδομένα είναι χρήσιμα τόσο για τη μακροχρόνια αξιολόγηση του ασθενή, όσο και για την αξιολόγηση νέων αλλά και υφιστάμενων θεραπειών.

Ωστόσο, παρά την συσχέτιση του αριθμού των μικροσωματιδίων με την ενεργότητα της νόσου, η πλήρης διασαφήνιση του ρόλου τους εξακολουθεί να είναι δύσκολη. Το γεγονός αυτό καταδεικνύουν έρευνες που δείχνουν ότι οι αυξήσεις στον αριθμό των MPs δεν είναι σταθερές στις διάφορες ρευματικές νόσους, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί και να δείχνουν παράδοξη σχέση με την ενεργότητά

της. Για παράδειγμα, έρευνα σε ασθενείς με ΣΕΛ έδειξε μείωση του ολικού αριθμού μικροσωματιδίων σε σχέση με αυτόν του πληθυσμού ελέγχου (Sellam et al 2009; Guiducci et al 2008;Nielsen et al 2011), ενώ σε ασθενείς με συστηματική σκλήρυνση ο αριθμός των MPs ήταν αντίστροφα ανάλογως της δερματικής πάχυνσης. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι τα μικροσωματίδια συνδέονται μεταξύ τους ή με άλλα κύτταρα -γεγονός που εμποδίζει την ανίχνευσή τους από την κυταρρομετρία ροής- είτε στο γεγονός ότι κάποιοι υποπληθυσμοί έχουν αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα.

Λόγω τεχνικών προβλημάτων στις τρέχουσες αναλυτικές προσεγγίσεις, η μέτρηση των μικροσωματιδίων δεν έχει ενσωματωθεί στον έλεγχο ρουτίνας κατά την κλινική πράξη. Ωστόσο, με κάποιες βελτιώσεις η μέτρηση των μικροσωματιδίων θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στο σώμα των δοκιμασιών που στοχεύουν στη θεραπευτική ανταπόκριση και στην πρόγνωση. Προκειμένου να καθιερωθούν τα μικροσωματίδια ως βιοδείκτες των ρευματικών νόσων χρειάζεται περαιτέρω τυποποίηση των τεχνικών απομόνωσης και ποσοτικοποίησης.

## **1.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Τα μικροσωματίδια εμφανίζονται ως σημαντικοί μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας στο πλαίσιο των ρευματικών ασθενειών. Όπως οι κυτταροκίνες και άλλοι μεσολαβητές του ανοσοποιητικού συστήματος, τα μικροσωματίδια έχουν πολλές δράσεις και μπορούν να επηρεάσουν πολλαπλά στάδια κατά την παθογένεια της νόσου. Είναι σημαντικό το ότι τα μικροσωματίδια αποτελούν το σύνδεσμο μεταξύ φλεγμονής, θρόμβωσης και αγγειογένεσης, διαδικασίες-κλειδιά τόσο σε συστηματικά νοσήματα όσο και σε νοσήματα των επιμέρους οργάνων. Καθώς μπορούν να ποσοτικοποιηθούν στο αίμα, τα μικροσωματίδια λειτουργούν ως νέοι βιοδείκτες για την κατάσταση άλλως απρόσιτων ιστών (όπως το ενδοθήλιο), που αποτελούν σημαντικές θέσεις φλεγμονής και βλάβης. Παρόμοια με άλλους ρευματικούς βιοδείκτες, ο προσδιορισμός των υποομάδων των μικροσωματιδίων μπορεί να βελτιώσει τη διάγνωση, καθώς και την «σταδιοποίηση» της νόσου. Παρ' όλα αυτά, για την επέκταση της έρευνας των μικροσωματιδίων και την κλινική ανάλυση, υπάρχει ανάγκη περαιτέρω τυποποίησης των τεχνικών απομόνωσης, ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των μικροσωματιδίων.

Εκτός από τον ρόλο των μικροσωματιδίων ως βιοδεικτών, περαιτέρω έρευνα θα διασαφηνίσει στο μέλλον τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τα μικροσωματίδια αλλά και θα οδηγήσει στη χρησιμοποίησή τους ως θεραπευτικούς στόχους. Οι τρέχουσες προσεγγίσεις ωστόσο θα μπορούσαν να τροποποιήσουν τον αριθμό και τη δράση των μικροσωματιδίων. Έτσι, μη εκλεκτική απομάκρυνση των μικροσωματιδίων θα μπορούσε να συνεισφέρει στις θεραπευτικές επιδράσεις της πλασμαφαίρεσης στο πλαίσιο της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας ή της αρθροκέντησης (arthrocentesis) στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. Εκλεκτικές θεραπείες εξάλλου θα μπορούσαν να προσφέρουν περισσότερο θετικά αποτελέσματα, είτε αναστέλλοντας την απελευθέρωση μικροσωματιδίων είτε τροποποιώντας τη δράση τους.

Τέλος, καθώς τα μικροσωματίδια μπορούν να μεταφέρουν επιλεκτικά το περιεχόμενό τους στα κύτταρα, «φόρτωμα» των μικροσωματιδίων με φάρμακα θα μπορούσε να κάνει πιο στοχευμένη τη θεραπεία και να εισηγηθεί εναλλακτικούς τρόπους επηρεασμού της ρευματικής νόσου με βάση τις ιδιότητες των μικροσωματιδίων (Beyer C and Pisetsky D, 2010).

Η περισσότερα υποσχόμενη χρήση των MPs ως θεραπευτικών εργαλείων είναι η δημιουργία *in vitro* γενετικά τροποποιημένων MPs και η επακόλουθη τροποποίηση κυτταρικών λειτουργιών. Έχει φανεί ότι γενετικά τροποποιημένα μικροσωματίδια μπορούν να υπερεκφράσουν πρωτείνες απλά αναγκάζοντας τα κύτταρα-προέλευσης να τα συνθέσουν. Επιπρόσθετα, τα MPs μπορούν να μεταφέρουν και να ενσωματώσουν mRNA στα κύτταρα-στόχους και με αυτό τον τρόπο να τροποποιήσουν το φαινότυπο και τις ιδιότητές τους (Benameur T et al, 2009)



## BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

1. Abid Hussein MN, Boing An, Sturk A , et al. Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* 2007; 98:1096-107.
2. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelia cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Throm Haemost* 2003; 1: 2434-43.
3. Al-Nedawi K, Meehan K, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J: Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008, 10:619–624
4. Amabile N, et al. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177:1268–1275.
5. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, *et al*. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002; 195:1303-16
6. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007; 66: 159-65
7. Ardoin SP, Pisetsky DS. The role of cell death in the pathogenesis of autoimmune disease: HMGB1 and microparticles as intercellular mediators of inflammation. *Mod Rheumatol* 2008; 18:319–326.
8. Azevedo LCP. Microparticles and Exosomes: Are They Part of Important Pathways in Sepsis Pathophysiology, In: Fernandez R, Ed. *Severe Sepsis and Septic Shock - Understanding a Serious Killer*. InTech, 2012. Available at: <http://www.intechopen.com/books/severe-sepsis-and-septic-shock-understanding-a-serious-killer/MPs-and-exosomes-are-they-part-of-important-pathways-in-sepsis-pathophysiology>
9. Baj-Krzyworzek M, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp. Hematol*. 2002; 30: 450–459.
10. Bakouboula B, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177: 536–543.
11. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J. Clin. Invest*. 1997; 99: 2118–2127.

12. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald, GA. Modulation of monocyte endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 136–144.
13. Barteneva N, Fasler-Kan E, Bernimoulin M et al. Circulating microparticles :square the circle. *BMC Cell Biology* 2013; 14:23.
14. Bato S, Abbasian N, Burton J and Stover C. Microparticles and their roles in inflammation : a review. *The Open Immunology Journal* 2013; 6:1-14
15. Benameur T, Andriantsitohaina R, Martínez CM. Therapeutic potential of plasmamembrane-derived microparticles. *Pharmacological Reports.* 2009; 61:49–57
16. Beleznavy Z, Zachowski A, Devaux PF, et al. ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry* 1993; 32: 3146–52.
17. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan MC, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:2857–66.
18. Berckmans RJ, et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7:R536–R544.
19. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, et al. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *Thromb Haemost* 2009; 7:1019-28.
20. Bevers EM., Comfurius P, Van Rijn JL., Hemker HC, Zwaal R F. Generation of prothrombin- converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur. J. Biochem.* 1982; 122:429–436.
21. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6: 21-9.
22. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007; 81:1-5.
23. Biro, E., Akkerman, J. W., Hoek, F. J., Gorter, G., Pronk, L. M., Sturk, A. and Nieuwland, R. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J. Thromb. Haemostasis* 2005; 3: 2754–2763
24. Biro E, et al. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann. Rheum. Dis.* 2007; 66:1085–

- 1092.
25. Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *J Immunol.* 2002; 168:3235–41.
  26. Boule MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Toll-like receptor 9- dependent and –independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 2004; 199:1631–1640.
  27. Brodsky, SV, Malinowski, K., Golightly, M., Jesty, J. and Goligorsky, M. S. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation* 2002; 106: 2372–2378
  28. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1910–H1915.
  29. Brogan PA., Dillon MJ. Endothelial microparticles and the diagnosis of the vasculitides. *Intern Med.* 2004; 43:1115–1119.
  30. Brown, M. D., Fearheller, D. L., Thakkar, S., Veerabhadrapa, P. and Park, J. Y Racial differences in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced endothelial microparticles and interleukin-6 production. *Vasc. Health Risk Manag* 2002; 7: 541–550
  31. Bucciarelli P, Martinelli I, Artoni A et al. Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism. *Thromb Res* 2011, doi:10.1016/j.thromres.2011.08.020.
  32. Burger, D., Montezano, A. C., Nishigaki, N., He, Y., Carter, A. and Touyz, R. M. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via Ang II receptor type I/NADPH oxidase/Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:1898–1907
  33. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond).* 2013; 124(7): 423-41.
  34. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179:1317-30.
  35. Cardo LJ, Wilder D, Salata J: Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection. *Transfus Apher Sci* 2008, 38:117–125
  36. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, and Rodeghiero F. Characterization of a novel disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet

- microvesicle generation. *Br J Haematol* 1997; 96: 458–463.
37. Chen, G. Y. and Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol* 2010; 10: 826–837
  38. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B: Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104: 3190-3197.
  39. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med* 2013; 5:235–49
  40. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009; 19:43–51.
  41. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 339–45
  42. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest.* 1999; 104:93-102.
  43. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and proteinmediated process. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:19412–19417.
  44. Cutolo M, Grassi W, Matucci Cerinic M. Raynaud's phenomenon and the role of capillaroscopy [review]. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3023–30.
  45. Daniel L, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int* 2006; 69:1416–1423.
  46. David DM. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nature Rev Immunol.* 2007; 7:238-43.
  47. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106:1604-11.
  48. Del Turco, S., Basta, G., Lazzerini, G., Evangelista, M., Rainaldi, G., Tanganelli, P., Camera, M., Tremoli, E. and De Caterina, R. Parallel decrease of tissue factor surface exposure and increase of tissue factor microparticle release by the *n*-3 fatty acid docosahexaenoate in endothelial cells. *Thromb. Haemostasis* 2001; 98: 210–219

49. Denzer K, Van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, De Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 2000; 165:1259–65.
50. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HFG, et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* 2000; 113: 3365-74.
51. Devaraj, S., Kumaresan, P. R. and Jialal, I. C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: further evidence of endothelial dysfunction. *Clin. Chem.*2011; 57: 1757–1761
52. Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, *et al.* Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6: 1125-33.
53. Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., Helbing, T., El-Osta, A., Jowett, J. B. and Peter, K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.* 2010; 93: 633–644
54. Dieker J , Muller S . Post-translational modifications, subcellular relocation and release in apoptotic microparticles: apoptosis turns nuclear proteins into autoantigens. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009; 47(3): 343-348.
55. Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, Ziemann M, Helbing T, El-Osta A, Jowett JB, Peter K: Microparticles: major transport vehicles for distinct miRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 2012, 93:633–634
56. Dignat-George, F. and Boulanger, C. M. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2011; 31: 27–33
57. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid antibody syndrome. *Thromb Haemost* 2004; 91:667–73.
58. Distler JH, et al. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 3337–3348.
59. (b) Distler JH, Jungel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, 3rd, Gay RE, Michel BA et al.: The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102, 2892–2897

60. Distler JH, Akhmetshina A, Dees C, Jungel A, Sturzl M, Gay S et al. Induction of apoptosis in circulating angiogenic cells by microparticles. *Arthritis Rheum* 2011; 63(7):2067-77.
61. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J et al. Efficacy of B-celltargeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350:2572–81
62. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol* 2007; 35: 495–516.
63. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology* 2008; 47:1820\_5.
64. Essayagh, S., Brisset, A. C., Terrisse, A. D., Dupouy, D., Tellier, L., Navarro, C., Arnal, J. F. and Sie, P. Microparticles from apoptotic vascular smooth muscle cells induce endothelial dysfunction, a phenomenon prevented by  $\beta$ 3-integrin antagonists. *Thromb. Haemostasis* 2005; 94:853–858
65. Faille, D., El-Assaad, F., Mitchell, A. J., Alessi, M.-C., Chimini, G., Fusai, T., Grau, G. E. and Combes, V Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 16: 1731–1738
66. Faure, V., Dou, L., Sabatier, F., Cerini, C., Sampol, J., Berland, Y., Brunet, P. and Dignat-George, F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J. Thromb. Haemostasis* 2006; 4, 566–573
67. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, *et al.* Megakaryocytederived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009; 113: 1112-21.
68. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte–leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 2000; 95:1317–23
69. Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem* 1991; 266: 13289-95.
70. Fujimi S, Ogura H, Tanaka H, Koh T, Hosotsubo H, Nakamori Y, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H: Increased production of leukocyte microparticles with enhanced expression of adhesion molecules from activated polymorphonuclear leukocytes in severely injured patients. *J Trauma* 2003, 54:114–119.
71. Gasser O, et al. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Cell Res.* 2003; 285: 243–257.

73. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 2004; 104(8):2543-8.
74. Gasser O, Schifferli JA. Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. *Exp Cell Res* 2005; 307:381–7.
75. Gelderman MP, Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol* 2008; 484:79-93.
76. Guiducci S, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2845–2853.
77. Gyorgy B, et al. Post-translational modifications, subcellular relocation and release in apoptotic microparticles: apoptosis turns nuclear proteins into autoantigens. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 67:2667-2688.
78. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002, 417:182–187.
79. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med.* 2004; 53:210–230.
80. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004; 104:2761–6.
81. Huber J, Vales A, Mitulovic G, *et al.* Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 101-7.
82. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L: Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128:1796–1804.
83. Hugel B., Zobairi, F. and Freyssinet, J. M. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J. Thromb. Haemostasis* 2004; 2: 1846–1847
84. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet, JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*.2005; 20: 22–27.
85. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB: Detection

- of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008, 3:e3694
86. Hong, Y., Eleftheriou, D., Hussain, A. A., Price-Kuehne, F. E., Savage, C. O., Jayne, D., Little, M. A., Salama, A. D., Klein, N. J. and Brogan, P. A. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; 23: 49–62
  87. Jayachandran, M., Miller, V. M., Heit, J. A. and Owen, W. G. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J. Immunol. Methods* 2012; 375: 207–214
  88. (a) Jimenez JJ, et al. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol.* 2003;123:896–902.
  89. (b) Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res.* 2003; 109: 175–80.
  90. Jin M, Drwal G, Bourgeois T, et al. Distinct proteome features of plasma microparticles. *Proteomics* 2005; 5:1940-52.
  91. Jodo S, et al. Apoptosis-inducing membrane vesicles. A novel agent with unique properties. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 39938–39944.
  92. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol* 2001;115: 451–9.
  93. Jungel A, et al. Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:3564–3574.
  94. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2(10):1842-51.
  95. Jy W et al. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res.* 2007; 21: 319–325.
  96. Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity.* 2008; 29: 21-32.
  97. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW,



- Bae JM, Kim S: Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003, 39:184–191.
98. Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN: Platelet microparticles induce angiogenesis *in vitro*. *Br J Haematol* 2004; 124:376–384.
  99. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:1498–503
  100. Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia—a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8:153–62
  101. Koppler B, Cohen C, Schlondorff D, et al. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* 2006; 36:648-658.
  102. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84:1415–20.
  103. Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P. and Dignat-George, F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin. Thromb. Hemostasis* 2010; 36: 807–818
  104. Lafyatis R, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors and innate immune responses in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:222
  105. Langer F, Bokemeyer C: Crosstalk between cancer and haemostasis: implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Haemostaseologie* 2012, 32:95–104.
  106. Lee RD, Barcel DA, Williams JC, et al. Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasmaderived microparticle tissue factor activity. *Thromb Res.* 2011; in press: doi:10.1016/ j.thromres.2011.06.004
  107. Lhermusier, T., van Rottem, J., Garcia, C., Xuereb, J. M., Ragab, A., Martin, V., Gratacap, M. P., Sie, P. and Payrastre, B. The Syk-kinase inhibitor R406 impairs platelet activation and monocyte tissue factor expression triggered by heparin-PF4 complex directed antibodies. *J. Thromb. Haemostasis* 2011; 9: 2067–2076.
  108. Lo, S. C., Hung, C. Y., Lin, D. T., Peng, H. C. and Huang, T. F. Involvement of platelet glycoprotein Ib in platelet microparticle mediated neutrophil activation. *J. Biomed. Sci.* 2006; 13: 787–796
  109. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived

- microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000; 6:769–75.
110. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E et al. Rapid secretion of interleukin-1b by microvesicle shedding. *Immunity* 2001; 8:825\_35
  111. Martin S, Tesse A, Hugel B, Martýnez MC, Morel O, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation.* 2004; 109:1653–1659.
  112. Mastronardi, M. L., Mostefai, H. A., Soleti, R., Agouni, A., Martinez, M. C. and Andriantsitohaina, R. Microparticles from apoptotic monocytes enhance nitrosative stress in human endothelial cells. *Fundam. Clin. Pharmacol* 2011; 25, 653–660
  113. Mathivanan, S., Ji, H. and Simpson, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 2010; 73, 1907–1920
  114. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1512–8
  115. Mause SF, Weber C. MPs: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047-57.
  116. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R: Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* 2008; 60: 75–84.
  117. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet JM et al. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R40.
  118. Mesri, M. and Altieri, D. C. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:23111–23118
  119. Michelson AD, Rajasekhar D, Bednarek FJ, Barnard MR. Platelet and platelet-derived microparticle surface factor V/Va binding in whole blood: differences between neonates and adults. *Thromb Haemost.* 2000; 84:689–694.
  120. Miguet L, Pacaud K, Felden C, et al. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics.* 2006; 6: 153–71.
  121. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is

- regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 1998;140:627–36.
122. Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, et al. Differential secretion of Fas ligand or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 2001; 167:6736–44.
  123. Morel O, Toti F, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet JM: Procoagulant microparticles: 'criminal partners' in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006, 35, 15–22
  124. (a) Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J. M. and Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31: 15–26
  125. (b) Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F: Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity and thrombosis. *Semin Immunopathol* 2011, 33:469–486.
  126. Mueller G, Schneider M, Biemer-Daub G, Wied S: Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis. *Cell Signal* 2011; 23:1207–1223
  127. Muller I, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003; 17:476–478.
  128. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Hermann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:280–289.
  129. Muradharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C: Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 2010; 123:1603–1611
  130. Nagahama M, et al. Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*.2001; 33:85–94.
  131. Neri, T., Armani, C., Pegoli, A., Cordazzo, C., Carmazzi, Y., Brunelleschi, S., Bardelli, C., Breschi, M. C., Paggiaro, P. and Celi, A. Role of NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$  in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles. *Eur. Respir. J.* 2011; 37: 1494–1502.
  132. Nielsen CT, Ostergaard O, Johnsen C et al. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011; 63:3067\_77.
  133. Nejlund S. An Evaluation of Two Novel Detection Methods for

- Characterisation of microparticles in Plasma. Master thesis. Aalborg University, Denmark; 2012. [Online] Available at: [http://projekter.aau.dk/projekter/files/63500618/Group\\_958\\_Master\\_thesis\\_Sept2011\\_June2012.pdf](http://projekter.aau.dk/projekter/files/63500618/Group_958_Master_thesis_Sept2011_June2012.pdf)
134. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, et al.: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930–935.
  135. Nieuwland R, van der Post JA, Lok CA, Kenter G, Sturk A: Microparticles and exosomes in gynecologic neoplasia. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36:925–929.
  136. Nomura, S., Nakamura, T., Cone, J., Tandon, N. N. and Kambayashi, J. Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry* 2000; 40: 173–181
  137. Nomura S, et al. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 158: 277–287.
  138. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y: Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res*, 2008; 123: 8–23.
  139. Nomura, S., Inami, N., Ozaki, Y., Kagawa, H. & Fukuhara, S. Significance of microparticles in progressive systemic sclerosis with interstitial pneumonia. *Platelets* 2009; 19:192–198
  140. Okroj M, Heinegard D, Holmdahl R, Blom AM. Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med* 2007; 39:517–30.
  141. Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma. *Cytometry. Part A : J Int Soc Anal Cytol* 2010; 77: 502-14.
  142. Osumi, K., Ozeki, Y., Saito, S., Nagamura, Y., Ito, H., Kimura, Y., Ogura, H. and Nomura, S. Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thromb. Haemostasis* 2001; 85: 326–330
  143. Oyabu C, Morinobu A, Sugiyama D et al. Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol* 2011; 38:680-4.
  144. Pereira J, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost.* 2006; 95:94–99.
  145. Peterson, D. B., Sander, T., Kaul, S., Wakim, B. T., Halligan, B., Twigger S, Pritchard, Jr, K. A., Oldham, K. T. and Ou, J. S Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF- $\alpha$ -derived endothelial microparticles. *Proteomics*

- 2008; 8: 2430–2446
146. Pfister SL. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension*. 2004; 43: 428–433.
  147. Pilzer D, Gasser O, Moskovich O et al. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance immunity and cancer. *Springer Semin Immun* 2005; 27:375–87.
  148. Pirro M, Schillaci G, Bagaglia F, et al. Microparticles derived from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2008; 197: 757–67.
  149. Pisetsky DS, Ullal AJ, Gauley J, Ning TC Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology*. 2012; 51:1737–1746.
  150. Pisetsky DS, Ullal AJ. The Blood Nucleome in the Pathogenesis of SLE. *Autoimmun Rev*. 2010; 10(1): 35–37.
  151. Pluskota, E., Woody, N. M., Szpak, D., Ballantyne, C. M., Soloviev, D. A., Simon, D. I. and Plow, E. F. Expression, activation, and function of integrin  $\alpha M\beta 2$  (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood* 2008;112; 2327–2335
  152. Raptopoulou A, Sidiropoulos P, Katsouraki M, Boumpas DT. Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007; 44:339–63.
  153. Rautou, P. E., Vion, A. C., Amabile, N., Chironi, G., Simon, A., Tedgui, A. and Boulanger, C. M. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res* 2011; 109: 593–606
  154. Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth* 2012; 109: 503–13
  155. Reich N, Beyer C, Gelse K et al. Microparticles stimulate angiogenesis by inducing ELR(+) CXC-chemokines in synovial fibroblasts. *J Cell Mol Med* 2011; 15:756–62.
  156. Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome *Lancet* 2010; 376: 1498–509.
  157. Zahra, S, Anderson, JA, Stirling, D. and Ludlam, C. A. Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol* 2011; 152, 688–700
  158. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21(3):157–71.
  159. Prasad, K. S., Andre, P., He, M., Bao, M., Manganello, J. and Phillips, D. R. Soluble CD40 ligand induces  $\beta 3$  integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;

- 100: 12367–12371.
160. Press JZ, Reyes M, Pitteri SJ, Pennil C, Garcia R, Goff BA, Hanash SM, Swisher EM: Microparticles from ovarian carcinomas are shed into ascites and promote cell migration. *Int J Gynecol Cancer* 2012, 22:546–552.
  161. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 2010; 26:140-5.
  162. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, Nalbone G, Castier Y, Leseche G, Lehoux S, Tedgui A, Boulanger CM: Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res* 2011, 108:335–343
  163. Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Exp Cell Res* 2009;315: 760–8.
  164. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE: Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* 2012; 119:6288–6295
  165. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418: 191-5.
  166. Scanu, A., Molnarfi, N., Brandt, K. J., Gruaz, L., Dayer, J. M. and Burger, D. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J. Leukocyte Biol* 2008; 83, 921–927
  167. Schiller M, Bekeredijan-Ding I, Heyder P et al. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early states of apoptosis. *Cell Death Differ* 2008; 15: 183-91.
  168. Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost.* 2002; 88:1033–1038.
  169. Schneider P, Tschopp J. BAFF and the regulation of B cell survival. *Immunol Lett* 2003; 88:57–62.
  170. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; 3:346–52.
  171. Sellam J, Proulle V, Jungel A, Ittah M, Miceli RC, Gottenberg JE, Toti F, Benessiano J, Gay S, Freyssinet JM, Mariette X: Increased levels of

- circulating microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 2009, 11:R156
172. Shah MD, Bergeron AL, Dong JF, Lopez JA. Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets* 2008; 19:365–72
  173. Shcherbina A, Remold-O'Donnell E. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses. *Blood*. 1999; 93: 4222–3
  174. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 98:785–92.
  175. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis J L. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets*. 2002; 13:247–25
  176. Simoncini, S., Njock, M. S., Robert, S., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Harle, J. R., Nguyen, C., Dignat-George, F. and Anfosso, F. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ. Res.* 2009;104: 943–951
  177. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. *Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity.* *J Biol Chem* 1989; 264: 17049-57.
  178. Simpson, R. J., Jensen, S. S. and Lim, J. W. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008; 8: 4083–4099
  179. Stahl, A. L., Sartz, L. and Karpman, D. Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2011; 117: 5503–5513
  180. Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J. and Raposo, G The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 2002; 3: 321–330
  181. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, et al. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. 2010; 468: 834–8.
  182. Takano, K., Asazuma, N., Satoh, K., Yatomi, Y. and Ozaki, Y. Collagen-induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. *Platelets* 2004;15: 223–229
  183. Tamburrelli, C., Crescente, M., Izzi, B., Barisciano, M., Donati, M. B., de Gaetano, G. and Cerletti, C. Epoprostenol inhibits human platelet-leukocyte

- mixed conjugate and platelet microparticle formation in whole blood. *Thromb. Res.* 2011; 128: 446–45
184. Taraboletti G, et al. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol.* 2002; 160:673–680.
  185. Terrisse, A. D., Puech, N., Allart, S., Gourdy, P., Xuereb, J. M., Payrastre, B. and Sie, P. Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *J. Thromb. Haemostasis* 2010; 8, 2810–2819.
  186. Tesse A, Martinez MC, Hugel B et al. Upregulation of proinflammatory proteins through NF- $\kappa$ B pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2522-7.
  187. Thery, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 569–579..
  188. Thery C, Ostrowski M, Segura E: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:581–593
  189. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature Immunol* 2007; 8: 487–497.
  190. Tissot, J. D., Rubin, O. and Canellini, G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr. Opin. Hematol* 2010; 17: 571–577
  191. Tschuor, C., Asmis, L. M., Lenzlinger, P. M., Tanner, M., Harter, L., Keel, M., Stocker, R. and Stover, J. F. *In vitro* norepinephrine significantly activates isolated platelets from healthy volunteers and critically ill patients following severe traumatic brain injury. *Crit. Care* 2008; 12, R80
  192. Ullal AJ, Pisetsky DS. The release of microparticles by Jurkat leukemia T cells treated with staurosporine and related kinase inhibitors to induce apoptosis. *Apoptosis.* 2010; 15: 586–96.
  193. (b)Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich C. Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in vitro systems. *Cytometry A.* 2010; 77: 294–301.
  194. Ullal AJ, Reich CF 3rd, Clowse M et al. Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and nucleosomes in systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2011; 36: 173-80.
  195. Valadi H, Ekstroem K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Loetvall JO:



- Exosomemediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007, 9:654–659.
196. Van der Pol E, Boeing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R: Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 2012; 64:676–705.
  197. VanWijk MJ, VanBavelb A, Sturkc A, Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovas Res.* 2003; 59: 277–287.
  198. Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, *et al.* Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus* 2012; 21: 802-5.
  199. Wolf P, Nghiem DX, Walterscheid JP, Byrne S, Matsumura Y, Matsumura Y, Bucana, *et al.* Platelet-activating factor is crucial in psoralen and ultraviolet A-induced immune suppression, inflammation, and apoptosis. *Am J Pathol.* 2006; 169:795–805.
  200. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, Zimmerman GA, Mc Inthyre TM: Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem* 2003, 278:33161–33168.
  201. .Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13(3):269-88.
  202. Willis R, Harris EN, Pierangeli SS. Pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 305-21
  203. .Zwaal RF, Bevers EM. Platelet phospholipid asymmetry and its significance in hemostasis. *Subcell Biochem.* 1983; 9: 299–334.
  204. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochem Soc Trans.* 1993; 21: 248–53.
  205. Willekens, F. L., Werre, J. M., Kruijt, J. K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y. A., van den Bos, A. G., Bosman, G. J. and van Berkel, T. J. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* 2005; 105: 2141–2145