



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

Διπλωματική Εργασία

«ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΚΥΣΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΑ ΠΟΥ
ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΚΛΑΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ»

ΟΝΟΜΑ : ΚΟΚΚΙΝΟΓΕΝΗ ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ

Αριθμός Μητρώου: 20171022

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : κα. ΠΟΛΙΤΟΥ ΜΑΡΙΑΝΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη

Abstract

Γλωσσάρι

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: Εισαγωγικά στοιχεία

1.1 Η μετάγγιση αίματος στα πρώτα της βήματα

1.2 Η αιμοδοσία στην σύγχρονη εποχή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: Παράγωγα αίματος - Παράγοντες πήξης

2.1 Τα παράγωγα του αίματος

2.1.1 Επισκόπηση

2.1.2 Συμπυκνωμένα ερυθρά

2.1.3 Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια

2.1.4 Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

2.1.5 Ασταθή παράγωγα

2.1.6 Σταθερά παράγωγα

2.2 Οι παράγοντες πήξης του αίματος

2.3 Παράγοντες που εξαρτώνται από την βιταμίνη K

2.4 Παράγοντες επαφής

2.5 Παράγοντες ευαίσθητοι στην θρόμβωση

2.6 Φωσφολιπίδια και ιόντα ασβεστίου

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

3.1.1 Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

3.1.2 Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

3.2 Μετάγγιση φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος

3.2.1 Ενδείξεις

3.2.2 Χορήγηση

3.2.3 Μαζική μετάγγιση

3.2.4 Αντιμετώπιση της εκσεσημασμένης αιμορραγίας

3.3 Αρχές φυγοκέντρωσης

3.4 Αρχές διαχωρισμού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: Τα μικροκυστίδια

4.1 Είδη και χαρακτηριστικά

4.2 Η δημιουργία των μικροκυστιδίων από τα κύτταρα

4.3 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων

4.4 Βιοχημική σύνθεση

4.5 Μηχανισμός απελευθέρωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: Η παραγωγή των μικροκυστιδίων αναλυτικά

5.1 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων

5.1.2 Η κυστιδιοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ως διαδικασία

5.1.3 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων in vivo

5.1.4 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων in vitro

5.2 Η κυστιδιοποίηση των αιμοπεταλίων

5.2.1 Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

5.3 Η κυστιδιοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων

5.4 Οι μηχανισμοί σχηματισμού ενδοθηλιακών μικροκυστιδίων

5.5 Ο σχηματισμός κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη (σχηματισμός μικρομορίων)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: Ανάλυση και μέτρηση των μικροκυστιδίων

6.1 Μέτρηση των επιπέδων των MPs με την χρήση λειτουργικών δοκιμασιών

6.2 Οι μέθοδοι για την ανάλυση MPs

6.2.1 Η ανάλυση FCM

6.2.2 Η τεχνική ELISA για τη δραστηριότητα των MPs

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

6.2.4 Ο προσδιορισμός MP με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: Οι λειτουργίες των μικροκυστιδίων σε διαφορετικές διαταραχές

7.1 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση

7.2 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στη εξέλιξη και τη διάγνωση του καρκίνου

7.3 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στις καρδιαγγειακές νόσους

7.4 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στην αθηρογένεση

7.5 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στις φλεγμονές

Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

Περίληψη

Ήδη από την αρχαιότητα, το αίμα κατέχει ξεχωριστή θέση, ιδίως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του. Με την αύξηση των γνώσεων για τη σύσταση και τις λειτουργίες του, αλλά και με την ανάπτυξη του ιατρικού εξοπλισμού, επιτεύχθηκαν σημαντικά ορόσημα για τη μετάγγιση αίματος και των παραγώγων του. Το πλάσμα του αίματος αποτελεί ένα μοναδικό στοιχείο, το οποίο έχει απασχολήσει τόσο για τις εφαρμογές του ως φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα, όσο και για τα μικροκυστίδια που περιέχει. Η παρούσα ανασκόπηση έχει σκοπό να αναδείξει την φύση και τους ρόλους των μικροκυστιδίων στην εξέλιξη και την πρόγνωση των ασθενειών, παρέχοντας ένα πλαίσιο διερεύνησης των δυνητικών εφαρμογών τους όπως προκύπτουν από τις αναφορές της παγκόσμιας έρευνας για το θέμα.

Abstract

Since ancient times, blood has had a special place, especially because of its healing properties. With the increase of knowledge about its composition and functions, but also with the development of medical equipment, important milestones were achieved for the transfusion of blood and its derivatives. Blood plasma is a unique element, which has been used both for its applications as fresh frozen plasma and for the microparticles it contains. The purpose of this review is to highlight the nature and roles of microparticles in the development and prognosis of diseases, providing a framework for exploring their potential applications as evidenced by reports from global research on the subject.

Γλωσσάρι

DNA: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ

TF: παράγοντας θρομβίνης (thrombin factor)

MPs: μικροκυτίδια

MVs: μικροκυτίδια

TEM: ηλεκτρονική μικροσκόπηση μεταφοράς

RBCs: ερυθρά αιμοσφαίρια

PLTs: αιμοπετάλια

FFP: φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

EMPs: ενδοθηλιακά μικροκυτίδια

pMVs: αιμοπεταλιακά μικροκυτίδια

Hb: αιμοσφαιρίνη

ATP: ενεργειακό νόμισμα κυττάρου

ΣΕ: συμπυκνωμένα ερυθρά

SPU: απλή μονάδα πλάσματος

DPU: διπλή μονάδα πλάσματος

WBCs: λευκά αιμοσφαίρια

FCM: κυτταρομετρία ροής

FSC: πρόσθια σκέδαση

FITC: Fleet Intelligence Training Center

ITP: ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα

DVT: εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση

WB: ολικό αίμα (whole blood)

PT: χρόνος προθρομβίνης

INR: ινοδογόνο

PRP: πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

TTP: θρομβοτική θρομβοπενική πορφύρα

PPP: πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: Εισαγωγικά στοιχεία

1.1 Η μετάγγιση αίματος στα πρώτα της βήματα

Ήδη από την αρχαιότητα, το αίμα είχε μια μυστικιστική υπόσταση για τους λαούς και κατείχε μια ξεχωριστή θέση στους πολιτισμούς τους. Οι χρήσεις του περιλάμβαναν ειδικές θεραπείες και τελετουργίες, ενώ είχαν αναπτυχθεί διάφορες αντιλήψεις σχετικά με την σχέση του με τις μαγεία και τον υπερφυσικό κόσμο. Μολονότι δεν ήταν γνωστά τα πραγματικά του στοιχεία, οι Ρωμαίοι και οι Έλληνες έδειχναν να γνωρίζουν ότι η απώλεια του οδηγούσε τα ζώα και τους ανθρώπους στην αδυναμία ή τον θάνατο, όπως αποδεικνύεται από καταγραφές αυτοκτονιών μέσω του κοψίματος των φλεβών. Αυτές οι παρατηρήσεις είχαν οδηγήσει σε πολλές προσπάθειες μεταγγίσεων αίματος, οι οποίες όμως κατά κύριο λόγο αποτύγχαναν [1,2,6]. Αρχικά, οι πρώτες απόπειρες θεραπείας με την χρήση αίματος στηρίχθηκαν στην πόση του για την αντιμετώπιση της αιμορραγίας, αλλά χρησιμοποιούνταν και για άλλους ιατρικούς λόγους. Οι Αιγύπτιοι ευγενείς συνήθιζαν να κάνουν μπάνιο με αίμα με σκοπό την αναζωογόνηση του δέρματος και την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Οι αρχαίοι Έλληνες και Ρωμαίοι συνήθιζαν να λούζονται με αυτό ή ακόμα και να το πίνουν για ενδυνάμωση. Σύμφωνα με τον Gaius Plinius Secundus, την εποχή των μονομαχιών, οι θεατές συνήθιζαν να πίνουν το αίμα από τους τραυματισμένους μαχητές ώστε να αποκτήσουν την δύναμη τους. Όπως αναφέρει ο ίδιος, το αίμα μπορούσε να ανακουφίσει από τον πόνο μέσω της επάλειψης, ενώ ο Γαληνός υποστήριξε ότι η πόση αίματος από νυφίτσα ή σκύλο μπορούσε να θεραπεύσει τους ανθρώπους από την λύσσα. Οι Νορβηγοί θεωρούσαν ότι η πόση αίματος από φώκια ή φάλαινα μπορούσε να θεραπεύσει την επιληψία. Αλλά και στην μυθολογία, οι θεραπείες με αίμα είχαν την τιμητική τους. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί μια μετάγγιση αίματος που πραγματοποίησε η Μήδεια στις *Μεταμορφώσεις* του Publius Ovidius Naso,

όταν αφαίρεσε όλο το αίμα από τον ηλικιωμένο πατέρα του Ιάσονα για γεμίσει τα αγγεία του με ένα φίλτρο αναζωογόνησης. Σύμφωνα με ένα αρχαίο εβραϊκό κείμενο, μια μετάγγιση αίματος πραγματοποιήθηκε και σε ένα βασιλιά της Συρίας για να τον θεραπεύσει από την λέπρα, χρησιμοποιώντας κανονικό αίμα ανθρώπου.

Όσο για τις ιστορικές μεταγγίσεις αίματος, η πρώτη καταγραφή ανήκει στον ιστορικό Pasquale Villari (1827-1917). Πραγματοποιήθηκε το 1492 για να θεραπεύσει τον Πάπα Innocent VIII, για τον οποίο πιθανολογείται ότι έπασχε από χρόνια νεφρική νόσο. Μετά από αρκετές προσπάθειες αναζωογόνησης του, ο γιατρός Abraham Menre δοκίμασε να μεταγγίσει σε αυτόν το αίμα τριών δεκάχρονων αγοριών. Τελικά, τα αγόρια πέθαναν λίγο μετά την μετάγγιση, ενώ ο Πάπας πέθανε λίγες μέρες αργότερα, υποκύπτοντας στην πάθηση του. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τον χρονικογράφο Stefano Infessura, αυτή η απόπειρα θεραπείας δεν αφορούσε σε μετάγγιση αλλά σε πόση του αίματος των αγοριών [5, 6].

Στα επόμενα χρόνια, υπήρξαν αρκετές αυτοαναφορές από επιστήμονες που υποστήριζαν ότι ήταν οι πρώτοι που πραγματοποίησαν μετάγγιση αίματος. Το 1615, ο χημικός Andreas Libavius, καθώς και το 1628, ο καθηγητής Giovanni Francisco Colle da Belluno, υποστήριζαν ότι η μετάγγιση αίματος μπορούσε να βελτιώσει την υγεία και να επιμηκύνει την ζωή των ασθενών. Παρόλα αυτά, κανένας από τους δύο δεν προέβη σε πειράματα ή έρευνες [1, 2, 6]. Το 1654, ο Francesco Folli περιέγραψε με λεπτομέρειες την συσκευή, την μέθοδο και τη διαδικασία της μετάγγισης αίματος χωρίς όμως να την έχει πραγματοποιήσει. Στην πραγματικότητα, μόνο ο Francis Potter φαίνεται να δοκίμασε την μετάγγιση αίματος το 1639, χρησιμοποιώντας κοτόπουλα. Όπως παραδέχτηκε, το πείραμα δεν είχε κανένα θεραπευτικό αποτέλεσμα [2].

Ο Sir Christopher Wren είναι ο επιστήμονας που θεωρείται ο πατέρας της ενδοφλέβιας χορήγησης φαρμάκων. Με την συμμετοχή του βοηθού του Timothy Clerk, πραγματοποίησε πειράματα με μικρότερη ή μεγαλύτερη επιτυχία [1, 2, 5, 6], τα οποία και περιγράφονται στο βιβλίο του γιατρού Robert Boyle που εκδόθηκε το 1663. Στην συνέχεια, ο ίδιος ο Boyle δοκίμασε να προχωρήσει με εγχύσεις μπύρας, κρασιού και οπίου στις φλέβες ζώων και εθελοντών καταδίκων. Αργότερα, ο γιατρός Richard Lower εμπνεύστηκε από αυτές τις εγχύσεις και δοκίμασε να αντικαταστήσει τα υγρά με αίμα. Το 1665 προχώρησε με την πρώτη επιτυχημένη μετάγγιση αίματος σε σκύλο, στον οποίο πραγματοποιήθηκε σχεδόν ολική αφαίμαξη. Κατόπιν, προχώρησε στην μετάγγιση του αίματος ενός μεγαλύτερου σκύλου μέσω της σύνδεσης της αρτηρίας του με την φλέβα του πρώτου. Δύο χρόνια αργότερα, ο Lower και ο Edmond King δοκίμασαν την μετάγγιση σε άνθρωπο. Ο ασθενής, Arthur Coga, έπασχε από ψυχικές διαταραχές και η μετάγγιση με αίμα προβάτου που επιχειρήθηκε θεωρήθηκε ως πιθανή θεραπεία [2, 6].

Την ίδια περίπου περίοδο, ένας γιατρός από την αυλή του Γάλλου βασιλιά Λουδοβίκου XIV, ο Jean Baptiste Denis, δοκίμασε επίσης την μετάγγιση σε άνθρωπο. Σκοπός ήταν να θεραπεύσει έναν 15χρονο που υπέφερε από πολύμηνο και υψηλό πυρετό. Μετά την μετάγγιση αίματος από την καρωτίδα προβάτου, σημειώθηκαν γρήγορα αποτελέσματα βελτίωσης, παρότι καταγράφηκε «έντονο αίσθημα θερμότητας στο χέρι κατά τη μετάγγιση», που αποτελεί ένδειξη ασύμβατα μετάγγισης. Μέχρι το 1668, ο Denis είχε προβεί σε περισσότερες φαινομενικά επιτυχημένες μεταγγίσεις, μέχρι την απόπειρα του να θεραπεύσει τον Antoine Mauroy από την ψυχική διαταραχή του. Ο ασθενής πέθανε σύντομα μετά την μετάγγιση με το αίμα προβάτου και ο Denis κατηγορήθηκε για φόνο. Αν και τελικά αποδείχθηκε πως ο θάνατος οφείλονταν στην δηλητηρίαση του ασθενούς από την σύζυγό του και παρά την απόφαση για την αθώωση του γιατρού, το περιστατικό οδήγησε στην απαγόρευση των

μεταγγίσεων στην Ευρώπη [1, 2, 5, 6]. Ύστερα από μια μεγάλη περίοδο απόχης από την ιδέα της μετάγγισης, ο φυσιολόγος και μαιευτήρας James Blundell συνειδητοποίησε τα προβλήματα συμβατότητας στα αίματα ανθρώπων και ζώων και έτσι κατέληξε στην πρώτη μετάγγιση ανθρώπινου αίματος σε άνθρωπο το 1818. Αυτή η ιδέα εμπνεύστηκε και από το έργο του φυσιολόγου John Henry Leacock, ο οποίος υποστήριξε πρώτος την ασυμβατότητα ανάμεσα σε αίματα διαφορετικών ειδών. Ο Blundell εστίασε σε μεταγγίσεις αίματος σε γυναίκες που αιμορραγούσαν μετά τον τοκετό. Επιπλέον, κατασκεύασε διάφορες συσκευές με στόχο την εμπόδιση της πήξης του αίματος. Χάρη στο σημαντικό έργο του, ο Blundell είναι γνωστός ως ο «πατέρας της σύγχρονης μετάγγισης αίματος» [1, 2, 5, 6]. Τα βασικά προβλήματα που απασχολούσαν τους επιστήμονες της εποχής του ήταν αυτά της συμβατότητας του αίματος μεταξύ δοτών και δεκτών, της θρόμβωσης του αίματος και το αν η μετάγγιση είναι κατάλληλη επιλογή θεραπείας για την εκάστοτε ασθένεια.

Το πρόβλημα της συμβατότητας απαντήθηκε από τον Karl Landsteiner το 1900, ο οποίος διαχώρισε το αίμα των ανθρώπων στις ομάδες A, B και 0 για να επιλέγονται δότες ανάλογα με αυτές τις κατηγορίες. Δύο χρόνια αργότερα, οι μαθητές του Landsteiner, οι De Castello και Sturli ανακάλυψαν την ομάδα AB. Ωστόσο, η ιδέα του ελέγχου συμβατότητας πριν τη μετάγγιση αίματος δεν είχε εφαρμοστεί μέχρι το 1907, από τους Αμερικανούς χειρουργούς Reuben Totenberg και Schultz. Το 1927, οι Landsteiner και Levin ανακάλυψαν τα Pp αντιγόνα του συστήματος ομάδας αίματος P [7], ενώ το ίδιο έτος πρότειναν ένα σύστημα που βασίστηκε στην ανακάλυψη δύο γονιδίων, των M και N. Το 1947, οι Sanger και Race επέκτειναν περισσότερο το σύστημα αυτό, αναγνωρίζοντας τα σχετιζόμενα γονίδια S και s. Τέλος, η ομάδα Rhesus (Rh) περιγράφηκε το 1940 από τον Landsteiner και τον Alexander Wiener [1, 2, 5, 6].

1.2 Η αιμοδοσία στην σύγχρονη εποχή

Μετά το 1940, τα θέματα αιμοδοσίας εξελίχθηκαν σημαντικά. Τα υλικά και οι συσκευές που χρησιμοποιούνταν άρχισαν να βελτιώνονται, ιδίως οι βελόνες και οι ασκοί, τα αντιπηκτικά φάρμακα και τα ψυγεία αποθήκευσης. Δόθηκε προτεραιότητα στην ασφάλεια και την ποιότητα των παράγωγων αίματος και έγινε καθορισμός για τον έλεγχο του αίματος και των νοσημάτων. Τα συστήματα υγείας διαφόρων χωρών προέβησαν στην εξασφάλιση της ασφάλειας και της αποθήκευσης επαρκών ποσοτήτων αίματος [7]. Τότε, η αιμοδοσία αποτελούσε μια καινούργια ιδέα για τις κοινωνίες και έτσι πολλά ζητήματα ασφαλείας απασχολούσε τους πιθανούς εθελοντές. Η χρησιμότητα των μεταγγίσεων αίματος καθιερώνονταν αργά στην συλλογική συνείδηση. Παρά τους τις διασώσεις ανθρωπίνων ζώων κατά τους παγκόσμιους πολέμους και τον ισπανικό εμφύλιο από τις μεταγγίσεις, πολλοί διατηρούσαν τις επιφυλάξεις τους για την αιμοδοσία και απαιτήθηκαν μεγάλες προσπάθειες και συγκυρίες για να αλλάξει αυτό [7,8]. Μια τέτοια συγκυρία έλαβε χώρα στην Ιαπωνία το 1930, όταν μία μετάγγιση αίματος έσωσε την ζωή του πρωθυπουργού Osachi Hamaguchi, συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση της εμπιστοσύνης του ιαπωνικού λαού στην αιμοδοσία [7]. Σήμερα, παρά την αναμφισβήτητη χρησιμότητα και ασφάλεια των μεταγγίσεων αίματος, το ποσοστό των εθελοντών-αιμοδοτών παραμένει μικρό [9].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: Παράγωγα αίματος - Παράγοντες πήξης

2.1 Τα παράγωγα του αίματος

Τα παράγωγα αίματος είναι οποιαδήποτε συστατικά του αίματος που συλλέγονται από ένα δότη και προορίζονται για θεραπευτικές χρήσεις. Διαιρούνται σε δύο κατηγορίες, τα ασταθή και τα σταθερά παράγωγα αίματος. Στα ασταθή (labile) περιλαμβάνονται το ολικό αίμα, τα συμπυκνωμένα ερυθρά και τα αιμοπετάλια, το πρόσφατα κατεψυγμένο πλάσμα το νωπό πλάσμα και τα προγονικά κύτταρα. Στα σταθερά περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, οι συμπυκνωμένοι παράγοντες πήξης, οι αντι-πρωτεάσεις, οι ανοσοσφαιρίνες (ενδομυϊκές και ενδοφλέβιες), το προθρομβωτικό σύμπλεγμα, το συμπύκνωμα αντιθρομβίνης III, οι αναστολείς πήξης και το συμπύκνωμα ινωδογόνου [4].

2.1.1 Επισκόπηση

Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι παραγώγων αίματος στις μεταγγίσεις: (1) τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα (EC), (2) τα συμπυκνωμένα αιμοπετάλια (PC) και το φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP). Κάθε τύπος συντηρείται ανάλογα με τα ιδιαίτερα συστατικά του, αν και μπορεί να τροποποιηθούν ή να διασπαστούν κατά την συντήρηση. Αυτές οι αλλοιώσεις των προϊόντων των παραγώγων αίματος ονομάζονται βλάβες συντήρησης [13]. Πολλές τέτοιες βιοχημικές τροποποιήσεις έχουν ταυτοποιηθεί με την πάροδο του χρόνου, ιδίως όσον αφορά στα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα. Κατά την συντήρηση των υπερκείμενων ερυθρών αιμοσφαιρίων, μπορεί να παρατηρηθούν αλλοιώσεις στην πρωτεϊνική τους δομή με την χρήση της πρωτεϊνικής ανάλυσης [13].

2.1.2 Συμπυκνωμένα ερυθρά

Η βασική επιδίωξη της μετάγγισης ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η διατήρηση της ικανότητας μεταφοράς και διανομής του O₂ στους ιστούς. Μετά την λήψη του ολικού αίματος από τον δότη, ξεκινά η διαδικασία απομόνωσης των συμπυκνωμένων ερυθρών. Αναλυτικά, ο διαχωρισμός των διαφορετικών παράγωγων αίματος πραγματοποιείται μέσω της φυγοκέντρωσης, η οποία απομακρύνει τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια και επιτρέπει την προσθήκη «συντηρητικού διαλύματος». Τα απομονωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να συντηρηθούν ή να μεταγγιστούν σε ασθενείς. Τα παράγωγα που συντηρούνται μπορούν να επηρεαστούν από παράγοντες όπως ο τύπος των αντιπηκτικών, το pH, την θερμοκρασία κ.ά., επομένως διεξάγονται έλεγχοι για την διασφάλιση της βιωσιμότητας τους [15-16]. Όπως αναφέρεται στις ευρωπαϊκές οδηγίες για την μετάγγιση αίματος, τουλάχιστον το 75% των ερυθροκυττάρων πρέπει να επιβιώνει *in vivo* μέσα σε 24 ώρες μετά την μετάγγιση αίματος [14]. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη περιορισμοί όπως η ελάχιστη ποσότητα αιμοσφαιρίνης ανά μονάδα αίματος και ο μέγιστος αριθμός αιμόλυσης. Αν και οι γνώσεις για τον μεταβολισμό των κυττάρων έχουν αυξηθεί, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για κάθε παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες τους. Τέλος, αξίζει να γίνει αναφορά και στον χρόνο συντήρησης των EC, ο οποίος ενδέχεται να αυξάνει τον κίνδυνο για επιπλοκές μετά την μετάγγιση [15-16].

2.1.3 Συμπυκνωμένα αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι σημαντικά στην αιμόσταση, καθώς είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό θρόμβου σε περιπτώσεις αγγειακών βλαβών ύστερα από αλληλεπίδραση τους με την υπο-ενδοθηλιακή ουσία και με άλλα αιμοπετάλια. Η μετάγγιση τους αφορά σε ασθενείς με θρομβοπενία και άτομα των οποίων τα αιμοπετάλια υπολειτουργούν. Η συνηθέστερη διαδικασία συλλογής των PC είναι η αφαίρεση. Οι συνθήκες συντήρησης τους είναι σημαντικές, καθώς τα PC έχουν διάρκεια ζωής πέντε ημερών και παρουσιάζουν ευαισθησία στις περιβαλλοντικές συνθήκες [13].

Η θερμοκρασία συντήρησης είναι μεταξύ 20oC - 24oC, ενώ απαιτείται η συνεχής ανακίνηση τους. Η συντήρηση πρέπει να γίνεται κάτω από αυτές τις ειδικές συνθήκες ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη βακτηρίων και να εξασφαλιστεί η ασφάλεια της μετάγγισης. Ωστόσο ανάπτυξης βακτηρίων, πράγμα το οποίο πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι εφικτή η συντήρηση τους στους 4oC, διότι αυτή η θερμοκρασία επιτρέπει την τροποποίηση της αιμοπεταλιακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την άμεση φαγοκυττάρωση των PC από τα ηπατικά μακροφάγα [13].

2.1.4 Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

Η μετάγγιση του FFP στοχεύει στην διατήρηση των παραμέτρων του μηχανισμού πήξης σε ασθενείς με αιμορραγία. Παρόλα αυτά, η λειτουργία και η χορήγηση FFP συνεχίζει να απασχολεί την ιατρική κοινότητα. Η λήψη του πραγματοποιείται είτε μέσω της φυγοκέντρωσης του ολικού αίματος είτε μέσω της πλασμαφαίρεσης. Η αποθήκευση του είναι σχετικά πιο εύκολη, διότι δεν περιέχει κύτταρα. Αυτό επιτρέπει την συντήρηση του για μεγάλα διαστήματα [13].

2.1.5 Ασταθή παράγωγα

Στα ασταθή παράγωγα περιλαμβάνονται το νωπό πλάσμα και τα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα.

2.1.6 Σταθερά παράγωγα

Τα σταθερά παράγωγα είναι βιομηχανοποιημένα προϊόντα αίματος και περιλαμβάνουν τη λευκωματίνη, τους συμπυκνωμένους παράγοντες πήξης και τις αντι-πρωτεάσεις, καθώς και τις ανοσοσφαιρίνες (ενδομυϊκές και ενδοφλέβιες), το προθρομβινικό σύμπλεγμα, το συμπύκνωμα αντιθρομβίνης III, τους αναστολείς πήξης και το συμπύκνωμα ινωδογόνου.

2.2 Οι παράγοντες πήξης του αίματος

Ο όρος «πήξη του αίματος» περιλαμβάνει το σύνολο της διαδοχικής ενεργοποίησης των παραγόντων της πήξης του πλάσματος, που σχηματίζουν ενζυμικά ενεργοποιημένα συμπλέγματα και καταλήγουν να παράγουν θρομβίνη και να σχηματίζουν ινώδες. Αυτό το ινώδες είναι απαραίτητο για την μετατροπή του εύθυπτου αιμοπεταλιακού θρόμβου σε σταθερό θρόμβο, με αποτέλεσμα την επίσχεση της αιμορραγίας [4]. Η πήξη του αίματος συμμετέχει στην άμυνα του οργανισμού, εξασφαλίζοντας την προστασία του από κινδύνους που σχετίζονται με την απώλεια αίματος και την είσοδο βακτηρίων. Πρόκειται για μια ενζυμική, αυτοελεγχόμενη διαδικασία, καθώς οι ανασταλτές και η αυτοκαταλυτική δράση της θρομβίνης σταματούν την γενίκευση της ενεργοποίησης

του πηκτικού μηχανισμού. Η θρομβίνη αποτελεί μια πρωτεάση που παράγεται κατά την έναρξη της πήξης, η οποία διασπά το ινωδογόνο του πλάσματος. Συμβάλλει στον σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου, που είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων που επιτελούνται διαδοχικά, με την συμμετοχή των παραγόντων πήξης και την δράση επιταχυντικών και ανασταλτικών παραγόντων, εξασφαλίζοντας έτσι την αιμοστατική ισορροπία [4]. Υπάρχουν 12 πλασματικοί παράγοντες (ένζυμα) και άλλες βασικές ουσίες στο αίμα και τους ιστούς οι οποίοι συμμετέχουν στην διαδικασία της πήξης, όπως για παράδειγμα οι φυσιολογικοί ανασταλτές, το κινινογόνο μεγάλου μοριακού βάρους (HMWK) και το σύστημα της καλλικρεΐνης. Μερικές από αυτές αποτελούν τους επιταχυντές της πήξης, ενώ άλλες ανασταλτές ή αντιπηκτικοί παράγοντες. Επιπλέον, στην όλη διαδικασία συμμετέχουν και φωσφολιπίδια και τα αιμοπετάλια [4]. Οι πλασματικοί παράγοντες πήξης αποτελούν πρωτεΐνες του πλάσματος (εξαιρέση αποτελεί το FIV, που είναι ιόντα ασβεστίου) και ονομάζονται παράγοντες της πήξης. Οι παράγοντες πήξης κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος με εξαιρέση τον ιστικό παράγοντα, ο οποίος απελευθερώνεται μόνο σε περιπτώσεις ιστικών βλαβών. Η μορφή τους είναι ανενεργός και αποτελούν μικρές ποσότητες προενζύμων, εκτός από το ινωδογόνο [4]. Η δομή (αλληλουχία αμινοξέων), το μοριακό βάρος και η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων τους έχει μελετηθεί. Η γνώση και η κατανόηση των σχετικών ανεπαρκειών απαιτεί γνώσεις για την φυσιολογική τους συγκέντρωση, τον χρόνο ημιζωής τους, το χρωμόσωμα στο οποίο εντοπίζονται τα γονίδια που ευθύνονται για την σύνθεση τους, την απαραίτητη ποσότητα τους για την λειτουργία τους, τις ιδιότητες τους και τους ρόλους τους στην πήξη. Από το 1962 και μετά, οι παράγοντες της πήξης διαχωρίζονται με λατινικούς αριθμούς, ξεκινώντας από το I και φτάνοντας μέχρι το XIII από το I μέχρι το XIII [3]. Αυτό το σύστημα αποτελεί ένα είδος χρονολόγησης της ανακάλυψής τους από τη Διεθνή Επιτροπή Ονοματολογίας Παραγόντων Πήξης. Ο παράγοντας συμβολίζεται με το γράμμα «F» (αγγ. Factor), ενώ ο

ενεργοποιημένος παράγοντας με το γράμμα «a» (αγγ. activated) δίπλα στον λατινικό αριθμό. Η ενεργοποίηση ενός παράγοντα συνίσταται στην μετατροπή του από αδρανή πρωτεΐνη (προένζυμο) σε ενεργό πρωτεΐνη (ένζυμο), λόγω της δράσης ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, που επιταχύνεται παρουσία της φωσφολιπιδικής επιφάνειας και ειδικής πρωτεΐνης.

Αυτοί οι επιταχυντές της δράσης ενός ενζύμου ονομάζονται συμπαράγοντες (αγγ. co-factor) και περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, τους FV, FVIII, TM (Thrombomoduline), Pr-C (Protein-C), Pr-S (Protein-S), Hco FII (Hepatin co-factor II). Ζυμογόνο ονομάζεται το πρόδρομο μη ενεργό ένζυμο, το οποίο γίνεται ενεργό μέσω της δράσης ενός άλλου ενζύμου. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν η προκαλλικρεΐνη και οι παράγοντες II, VII, IX, XII και XIII. Οι παράγοντες που συμμετέχουν στην διαδικασία της πήξης είναι καταλυτικοί, εκτός από τον παράγοντα I (ινωδογόνο), που λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα συστήματα πήξης και ινωδόλυσης, και των συμπαραγόντων V και VIII. Τα ηπατικά κύτταρα συνθέτουν τους πλασματικούς παράγοντες πήξης με εξαίρεση τους FVIII, FV, XI και XII (για τους οποίους θεωρείται ότι συνθέτονται στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα) και τον III ή TF (παράγεται κατά κύριο λόγο στα ενδοθηλιακά κύτταρα) [4].

Όπως θα αναλυθεί στην συνέχεια, οι παράγοντες της πήξης διαίρονται σε τέσσερις κατηγορίες, αυτούς που εξαρτώνται από την βιταμίνη K, τους παράγοντες επαφής, τους ευαίσθητους στην θρομβίνη και στα φωσφολιπίδια και ιόντα ασβεστίου [3].

2.3 Παράγοντες που εξαρτώνται από την βιταμίνη K

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τους παράγοντες II, VII, IX και X, που ονομάζονται προθρομβινικοί παράγοντες και παράγονται στο ήπαρ. Η παρουσία της βιταμίνης K είναι απαραίτητη για την βιολογική δραστηριότητα τους, καθώς από αυτήν εξαρτάται η μετατροπή τους στην μορφή που απαιτείται για την συμμετοχή τους στην πήξη [4].

Παράγοντας II ή Προθρομβίνη

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη (α₂-σφαιρίνη) με μοριακό βάρος 72.000 Daltons. Είναι ευδιάλυτη στο νερό και καταστρέφεται σε θερμοκρασία 60C^ο. Συντίθεται στα ηπατικά κύτταρα παρουσία της βιταμίνης K και λειτουργεί ως ζυμογόνο στην πήξη, αποτελώντας την ανενεργό μορφή της θρομβίνης (προθρομβίνη). Μετατρέπεται σε θρομβίνη, δηλαδή την ενεργό μορφή του ενζύμου. Η συγκέντρωση του παράγοντα αυτού στο πλάσμα ανέρχεται στα 10-14 mg/dL, ενώ ο χρόνος ημιζωής του στο πλάσμα στις 65 ώρες [3].

Παράγοντας VII ή Προκομβερτίνη

Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 48.000 Daltons, που παράγεται αποκλειστικά στο ήπαρ. Σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια παρουσιάζεται μείωση του, διότι όπως και ο παράγοντας II, απαιτεί την παρουσία της βιταμίνης K. Ο χρόνος ημιζωής του στο πλάσμα είναι πέντε ώρες και η συγκέντρωση του είναι <1 μg/mL [3].

Παράγοντας IX ή παράγοντας Christmas

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 57.000 Daltons, η οποία συνίσταται σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα από 415 αμινοξέα. Συντίθεται στα ηπατικά κύτταρα παρουσία της βιταμίνης K και έχει ημιζωή 25 ωρών, με συγκέντρωση 5 $\mu\text{g/dL}$ [3].

Παράγοντας X ή παράγοντας Stuart

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 55.000 Daltons, η οποία συντίθεται στα ηπατικά κύτταρα παρουσία της βιταμίνης K. Απαντάται στο πλάσμα αλλά και τον ορό του αίματος, καθώς δεν καταναλώνεται πλήρως κατά την πήξη. Η ημιζωή του ανέρχεται σε 32-48 ώρες και η συγκέντρωσή του σε 12 $\mu\text{g/mL}$ [3].

2.4 Παράγοντες επαφής

Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι παράγοντες και XII, η προκαλλικρεΐνη και το κινινογόνο υψηλού μοριακού βάρους. Έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούνται και να προσκολλώνται κατόπιν επαφής με υδρόφιλες αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες και ουσίες, όπως σε περιπτώσεις τραυματισμένων αγγείων και ξένες επιφάνειες όπως το γυαλί, το βαμβάκι κλπ [3].

Παράγοντας XI ή παράγοντας Rosenthal

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 160.000 Daltons, για την οποία πιθανολογείται ότι συντίθεται στο ΔΕΣ. Απαντάται στο πλάσμα αλλά και

τον ορό του αίματος, καθώς δεν καταναλώνεται πλήρως κατά την πήξη. Αποτελεί σταθερό παράγοντα και δεν καταστρέφεται κατά την συντήρηση του αίματος. Έχει ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση του πλασμιγόνου. Ο χρόνος ημιζωής του ανέρχεται σε 40-48 ώρες ενώ η συγκέντρωση του σε 5μg/mL. Η ανεπάρκεια του παράγοντα αυτού προκαλεί αιμορροφιλία C, η οποία συναντάται τόσο σε άντρες όσο και σε γυναίκες [3].

Παράγοντας XII ή παράγοντας Hageman

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 85.000 Daltons, για την οποία πιθανολογείται ότι συντίθεται στο ΔΕΣ. Ονομάστηκε «Hageman» από τον πρώτο ασθενή στον οποίο μελετήθηκε. Απαντάται τόσο στο πλάσμα όσο και στον ορό, επειδή διότι δεν καταναλίσκεται εντελώς κατά την πήξη του αίματος. Από τον παράγοντα αυτόν ξεκινά η διαδοχική ενεργοποίηση των άλλων στο ενδογενές σύστημα της πήξης για τον σχηματισμό θρομβοπλαστίνης. Ακόμα, δύναται να ενεργοποιήσει τον παράγοντα VII στο εξωγενές σύστημα της πήξης. Τέλος, έχει έμμεση συμμετοχή στην ενεργοποίηση του πλασμιγόνου για την μετατροπή του σε πλασμίνη. Η ημιζωή του διαρκεί 48-52 ώρες, ενώ η συγκέντρωση του ανέρχεται σε 40 μg/mL. Αν και η ανεπάρκεια του δεν οδηγεί σε αιμορραγικές εκδηλώσεις, μπορεί να συνοδεύεται από θρομβοφιλική διάθεση εξαιτίας της μειωμένης ινωδολυτικής δραστηριότητας [3].

2.5 Παράγοντες ευαίσθητοι στη θρομβίνη

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τους παράγοντες I, V, VIII και XIII, που χαρακτηρίζονται ως «αναλώσιμοι» και που αποτελούν το υπόστρωμα για να

δράσει η θρομβίνη. Κυκλοφορούν μόνο στο πλάσμα και καταναλώνονται στην διάρκεια της πήξης [4].

Παράγοντας I ή Ινωδογόνο

Πρόκειται για μια θερμοευαίσθητη σφαιρίνη του πλάσματος με μοριακό βάρος 340.000 Daltons, η οποία συντίθεται στα ηπατικά κύτταρα και συναντάται στο πλάσμα και τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Είναι ο παράγοντας που εμφανίζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση στο πλάσμα (200-400 mg/dL), ενώ ο χρόνος ημιζωής του είναι 90 ώρες. Το ποσοστό της συγκέντρωσης του στο πλάσμα μπορεί να αυξηθεί σε κάποιες συγκεκριμένες καταστάσεις, όπως την κύηση, την φλεγμονή, τον τραυματισμό και την χειρουργική επέμβαση. Η μείωση της συγκέντρωσης του είναι γνωστή ως «ινωδοπενία» (πλήρης ή μερική).

Παράγοντας V ή προαξελερίνη

Πρόκειται για μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 330.000 Daltons. Είναι μια σφαιρίνη η οποία καταστρέφεται σε θερμοκρασία 56C^o στην διάρκεια της σύντομης του πλάσματος, κι έτσι χαρακτηρίζεται ως ασταθής παράγοντας.

Παράγεται στο ήπαρ χωρίς να απαιτεί την παρουσία της βιταμίνης K.

Απαντάται στο πλάσμα και τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, από τα οποία έλκεται κατά την ενεργοποίησή τους [4]. Οι λειτουργίες του περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Επιτάχυνση της μετατροπής της προθρομβίνης σε θρομβίνη, με την παρουσία των φωσφολιπιδίων και των ιόντων ασβεστίου
- Δράση ως συμπαράγοντας του ενεργοποιημένου FX, επιταχύνοντας την καταλυτική δράση του FXa κατά την μετατροπή της προθρομβίνης.

- Διευκόλυνση της συσσώρευσης του FX στην μεμβράνη των αιμοπεταλίων.

Ο χρόνος ημιζωής του στο πλάσμα ανέρχεται στις 15-24 ώρες, ενώ η συγκέντρωση του στα 10 µg/mL. Η ανεπάρκεια του μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη, ενώ η δεύτερη περίπτωση απαντάται σε διαταραχές του ήπατος και λοιμώξεις [4]

2.6 Φωσφολιπίδια και ιόντα ασβεστίου

Τα φωσφολιπίδια αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, παρέχονται από τους ιστούς και τα αιμοπετάλια. Όταν τραυματίζεται ένα αγγείο, τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια στο σημείο της βλάβης. Πρόκειται για τον τόπο της ενεργοποίησης των παραγόντων πήξης του αίματος, καθώς αυτοί, ως ένζυμα πια, προσκολλώνται στην επιφάνεια των φωσφολιπιδίων ξεκινώντας έτσι την ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης [4].

Παράγοντας IV ή ιόντα ασβεστίου

Τα ιόντα ασβεστίου είναι σημαντικά για την πήξη του αίματος χάρη στην ιδιότητα τους να προάγουν κάθε αντίδραση του μηχανισμού της, εξαιρώντας τα πρώτα δύο στάδια της ενδογενούς οδού. Τα φυσιολογικά επίπεδα του ασβεστίου ανέρχονται σε 9-11 mg/dL. Το ασβέστιο δεν καταναλώνεται με την πήξη του αίματος [4].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: Φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα

Ως φρέσκο κατεψυγμένο πλάσμα (FFP) ορίζεται το πλάσμα που, οχτώ ώρες μετά την αιμοληψία, καταψύχεται σε θερμοκρασία -18C° ή μικρότερη. Έχει διάρκεια ζωής ενός έτους [4]. Για την παρασκευή του πλάσματος που θα χρησιμοποιηθεί σε μετάγγιση, αρχικά απαιτείται η φυγοκέντρωση του ολικού αίματος από μονό δότη, και στην συνέχεια η αποθήκευση του σε θερμοκρασία -30C° ή μικρότερη. Ακόμα, η παρασκευή πλάσματος απαιτεί την χρήση διπλού ασκού ως ελάχιστη προϋπόθεση για την αιμοληψία, την άμεση τοποθέτηση στο ψυγείο (4C°) και την φυγοκέντρωση του ολικού αίματος μέσα σε έξι ώρες. Για την φυγοκέντρωση απαιτείται μία ψυκτική φυγόκεντρος -4C° και η άμεση μεταφορά του πλάσματος που θα προκύψει στο συνοδό ασκό του κλειστού συστήματος. Η κατάψυξη του πρέπει να είναι άμεση, ενώ μεγάλοι όγκοι αίματος μπορούν να συλλεχθούν και με αυτοματοποιημένη αφαίρεση [20]. Όταν λαμβάνεται από ολικό αίμα, ο όγκος μίας πρότυπης μονάδας πλάσματος είναι 200-250mL, ενώ όταν λαμβάνεται από αφαίρεση (FFPA) είναι 400-600mL. Το FFP περιέχει φυσιολογική ποσότητα παραγόντων πήξης, ενώ δεν περιέχει καθόλου ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια, ούτε αιμοπετάλια. Δεν αποτελεί, ωστόσο, συμπύκνωμα παραγόντων πήξης. Οι μονάδες FFP πρέπει να είναι συμβατές με τα ερυθρά αιμοσφαίρια των ληπτών σύμφωνα με το σύστημα ABO. Η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης του στοχεύει στην προστασία των αιμοστατικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ασταθών V και VIII [21,22]. Για την απόψυξη του, χρησιμοποιείται εμβύθιση σε υδατόλουτρο (37C°) και υπάρχει δυνατότητα περαιτέρω συντήρησης στους -6C° για το επόμενο 24ωρο. Το FFP χρησιμοποιείται σε ασθενείς με έλλειψη πολλαπλών παραγόντων πήξης ή σπάνιες μεμονωμένες έλλειψης τους, καθώς μπορεί να αυξήσει την δραστηριότητα ενός παράγοντα πήξης κατά 20%. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθεί στην διάρκεια του ενός

έτους μπορεί να χορηγηθεί ως κοινό πλάσμα μέσα στα επόμενα πέντε χρόνια. Το κοινό πλάσμα δεν διαθέτει παράγοντες πήξης [25].

3.1.1 Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια είναι μια αυτόλογη ουσία που μπορεί να χορηγηθεί στους ασθενείς σε διάφορα είδη επεμβάσεων και από ποικίλες ειδικότητες. Συνήθως χρησιμοποιείται για την επούλωση μαλακών πληγών, καθώς εμπεριέχει υψηλές ποσότητες αυξητικών παραγόντων, π.χ. αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (PDGF), ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα (IGF), αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) κ.ά. Όπως μαρτυρά το όνομα του, περιέχει μεγάλη ποσότητα αιμοπεταλίων σε μικρή ποσότητα πλάσματος. Αναλυτικά, ο φυσιολογικός αριθμός αιμοπεταλίων κυμαίνεται από 150.000 / μL έως 300.000 / μL (κατά μέσο όρο 200.000 / μL), ενώ το PRP περιέχει περίπου 1.000.000 / μL [25,26].

3.1.2 Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια

Το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Platelet Poor Plasma) απαιτεί διαφορετική προετοιμασία και αποθήκευση. Έως μία ώρα μετά την λήψη των κλασμάτων από κάθε δότη αίματος και αιμοπεταλιακών προϊόντων, το πλάσμα λαμβάνεται χρησιμοποιώντας φυγοκέντρηση δύο σταδίων [27].

3.2 Μετάγγιση φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος

Οι ενδείξεις για την μετάγγιση φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος είναι περιορισμένες καθώς η χορήγηση του έχει συνδεθεί με αλλεργικές αντιδράσεις, αναφυλαξία, οξεία πνευμονική βλάβη και αιμόλυση. Ο κίνδυνος μετάδοσης λοιμώξεων είναι παρόμοιος με αυτόν που ενέχεται στην χορήγηση των

υπολοίπων παράγωγων αίματος. Εάν κρίνεται αναγκαίο να χορηγηθεί σε ασθενή με αιμορραγία, τότε πρέπει να προηγηθεί έλεγχος πηκτικότητας (PT, INR, aPTT), ενώ όταν οι τιμές PT, INR, aPTT είναι φυσιολογικές, η μετάγγιση FFP αντενδείκνυται [26].

3.2.1 Ενδείξεις

- Σε περίπτωση που το PT είναι 1,5 φορά μεγαλύτερο από το φυσιολογικό ή το INR ή το aPTT είναι 2 φορές μεγαλύτερο από το φυσιολογικό, τότε ενδείκνυται μετάγγιση FFP για την διόρθωση εκσεσημασμένης μικροαγγειακής αιμορραγίας.
- Σε μεταγγίσεις με μεγαλύτερο όγκο αίματος (70mL/kg) και εφόσον δεν μπορούν να μετρηθούν έγκαιρα οι PT, INR και aPTT, τότε ενδείκνυται μετάγγιση FFP για την διόρθωση εκσεσημασμένης μικροαγγειακής αιμορραγίας δευτερογενούς αιτιολογίας (ανεπάρκεια πολλαπλών παραγόντων πήξης).
- Η μετάγγιση FFP ενδείκνυται για την διόρθωση γνωστής ανεπάρκειας μεμονωμένου παράγοντα πήξης όταν δεν διατίθεται ειδικό παράγωγο της.
- Το FFP μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λύση ανάγκης σε σοβαρή αιμορραγία, δηλαδή για επείγουσα αναστροφή της θεραπείας με βαρφαρίνη σε περιπτώσεις που δεν διατίθεται άλλη μέθοδος αντιμετώπισης. Η βιταμίνη K ενδείκνυται για ταχεία διόρθωση, ενώ για επείγουσα αντιμετώπιση σοβαρής αιμορραγίας το σύμπλεγμα προθρομβίνης, που εμπεριέχει παράγοντες II, VII, IX και X σε δόση 50mL/kg.
- Το FFP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντικατάσταση της ηπαρίνης σε ασθενείς με ανεπάρκεια αντιθρομβίνης III.
- Το FFP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (TTP). Μόλις εμφανιστεί, πρέπει

να αρχίσει καθημερινή αντικατάσταση πλάσματος, ιδανικά μέσα στο πρώτο 24ωρο. Η θεραπεία με φρέσκο πλάσμα συνεχίζεται για τουλάχιστον δύο μέρες αφότου σημειωθεί ύφεση των συμπτωμάτων.

- Το FFP έχει προταθεί για την πρόληψη αιμορραγίας σε ασθενείς με ηπατική ασθένεια και παρατεταμένο χρόνο προθρομβίνης. Ωστόσο, η ανταπόκριση σε αυτό δεν είναι πάντα ικανοποιητική και έτσι η αποκατάσταση της αιμοστατικής διαταραχής δεν είναι εγγυημένη. Για αυτό, σε περίπτωση χορήγησης του, επιβάλλεται η επανάληψη του αιμορραγικού ελέγχου ώστε να καθοριστούν τα επόμενα βήματα αντιμετώπισης [27]. Η πρακτική αυτή δεν είναι τεκμηριωμένη.

3.2.2 Χορήγηση

Οι δόσεις του FFP πρέπει να υπολογίζονται για την χορήγηση του, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τουλάχιστον το 20-30% της συγκέντρωσης των παραγόντων πήξης του πλάσματος (10-15mL/kg). Σε περίπτωση χρήσης του για επείγουσα αναστροφή της διαταραχής πήκτικότητας από θεραπεία με βαρφαρίνη, τα 5-8 mL/kg συνήθως αρκούν. Αξίζει να αναφερθεί ότι τέσσερα με πέντε συμπληρώματα αιμοπεταλίων, μία μονάδα από αφαιρεμένα αιμοπετάλια μονού δότη ή μία μονάδα ολικού αίματος περιέχει ανάλογη συγκέντρωση παραγόντων πήξης με αυτή από μία μονάδα FFP [28].

Όταν υπάρχει αιμορραγική διάθεση, συστήνεται να γίνει μέτρηση του αριθμού των αιμοπεταλίων πριν από τη χορήγηση FFP. Απουσία αιμορραγίας, δεν υπάρχει ένδειξη για FFP για την διόρθωση του INR. Ακόμα, το FFP δεν ενδείκνυται για την θεραπεία της διάχυτης ενδαγγειακής πήξης (D.I.C) απουσία σημείων αιμορραγίας. Δεν υπάρχουν τεκμήρια για την προληπτική ή προφυλακτική χρήση, όπως αυτή για την πρόληψη αιμορραγίας σε ασθενείς με ηπατική ασθένεια και παρατεταμένο χρόνο προθρομβίνης που αναφέρθηκε

[29]. Μπορεί να γίνει χορήγηση FFP για την αντιμετώπιση μαζικής απώλειας αίματος, αλλά μόνο αφότου διενεργηθεί εργαστηριακός έλεγχος.

3.2.3 Μαζική μετάγγιση

Βάσει των παλαιότερων οδηγιών, η έγκαιρη και αποτελεσματική αντιμετώπιση της καταπληξίας ήταν ζωτικής σημασίας για την πρόληψη των διαταραχών πήκτικότητας, παρότι οι προφυλακτικές θεραπείες και οι θεραπείες υποκατάστασης δεν είναι επαρκείς στην πρόληψη ή την μείωση των αναγκών για μετάγγιση. Από την άλλη, τα νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έλλειψη παραγόντων πήξης είναι μάλλον ασυνήθιστη στη μαζική αιμορραγία όταν δεν συνυπάρχει διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, δηλαδή όταν θεωρείται ως αποτέλεσμα της καθυστερημένης αναζωογόνησης. Γενικά, υπάρχουν κάποιες επιφυλάξεις σχετικά με το κατά πόσο αποτελεσματική θα ήταν η χορήγηση FFP σε μια τέτοια κατάσταση, ακόμα και όταν οι χρόνοι πήξης δεν είναι φυσιολογικοί. Έχουν γίνει μερικές προτάσεις για χορήγηση του FFP σε περίπτωση που η αιμορραγία δεν παύει παρά την χρήση κρυσταλλοειδών διαλυμάτων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων, εφόσον προηγηθεί εργαστηριακός έλεγχος πήκτικότητας [30].

3.2.4 Αντιμετώπιση της εκσεσημασμένης αιμορραγίας

Η δεσμοπρεσσίνη ή τοπικά αιμοστατικά όπως είναι η βέλη θρομβίνης προτείνονται σε περιπτώσεις μεγάλης αιμορραγίας. Εφόσον έχουν εξαντληθεί οι καθιερωμένες λύσεις για την αντιμετώπιση της μεγάλης μικροαγγειακής αιμορραγίας, ενδείκνυται η χορήγηση ανασυντεθειμένου ενεργοποιημένου παράγοντα VII [30].

3.3 Αρχές φυγοκέντρωσης

Υπάρχουν τέσσερις παράμετροι για την σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος: (1) η δύναμη G, (2) η επιτάχυνση, (3) ο χρόνος και (4) η επιβράδυνση. Η σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος καθορίζεται από τέσσερις παραμέτρους, την δύναμη G, την επιτάχυνση, τον χρόνο και την επιβράδυνση. Η συμπεριφορά καθίζησης των κυττάρων του αίματος εξαρτάται από το μέγεθος, την διαφορά τους όσον αφορά την πυκνότητα τους, την ίδια την πυκνότητα τους και την πυκνότητα του περιβάλλοντος υγρού, καθώς και από το ιξώδες του μέσου και την πλαστικότητα που έχει το σχήμα των κυττάρων σε συνάρτηση με την θερμοκρασία ($\geq 20\text{C}^{\circ}$). Ως διαδικασία, η φυγοκέντρωση αποτελείται από τρεις φάσεις. Η πρώτη αφορά στην παραγωγή του περιβάλλοντος υγρού, που αποτελεί ένα μείγμα πλάσματος και αντιπηκτικού, καθώς ο μεγάλος όγκος των λευκών και ερυθρών αιμοσφαιρίων οδηγούν σε ταχύτερη καθίζηση τους σε σύγκριση με αυτή των αιμοπεταλίων. Στην μετέπειτα φάση, τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια έχουν "καθίσει" στο χαμηλότερο τμήμα του ασκού, ενώ τα αιμοπετάλια παραμένουν συγκεντρωμένα στο ανώτερο τμήμα. Τέλος, στη φάση παράτασης της φυγοκέντρωσης, επέρχεται και η καθίζηση των αιμοπεταλίων, με τα περισσότερα λευκά αιμοσφαίρια να βρίσκονται κάτω από τα αιμοπετάλια και τα ερυθρά στον πυθμένα του ασκού. Αξίζει να γίνει αναφορά και στην ταχεία φυγοκέντρωση, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πλάσματος χωρίς κύτταρα (PPP) [30].

3.4 Αρχές διαχωρισμού

Ο διαχωρισμός διακρίνεται σε δύο τύπους, τον διαχωρισμό μετά την αρχική φυγοκέντρωση και τον διαχωρισμό μετά από αρχική διήθηση με φίλτρο. Στην διάρκεια του διαχωρισμού, το σύστημα του ασκού αφαιρείται από τη φυγόκεντρο για να τοποθετηθεί σε σύστημα αφαίρεσης. Τα προϊόντα που

προκύπτουν μεταφέρονται σε δορυφόρους ασκούς. Για την τεχνική παρασκευής προϊόντων διατίθενται τέσσερις επιλογές ύστερα από την αρχική διήθηση με φίλτρο. Τέλος, υπάρχουν και μερικές ακόμα αρχές διαχωρισμού, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω:

- Φυγοκέντρωση ζώνης
- Έκλυση (φυγοκέντρωση αντίθετου ρεύματος)
- Διήθηση διασταυρούμενης ροής
- Λευκαφαίρεση (διήθηση βάθους και επιφάνειας, που απαιτεί τέσσερις μηχανισμούς παγίδευσης σε φίλτρο).
- Πλύση κυτταρικών στοιχείων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: Τα μικροκυστίδια

4.1 Είδη και χαρακτηριστικά

Εξωσώματα

- Οι πρώτοι που περιέγραψαν τα εξωσώματα ήταν οι Trams et al. [31], που αναφέρθηκαν σε αυτά ως κυστίδια με αποπτωτική δραστηριότητα. Στη συνέχεια, οι Harding και Stahl[32] περιέγραψαν την διαδικασία απελευθέρωσης των μικρών κυστιδίων και κοκκίων από κύτταρα ποντικών. Με την βοήθεια ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, κατάφεραν να περιγράψουν την εξωκύτωση από σωματίδια μεγέθους 50 nm [33].
- Πρόκειται για κυστίδια που περιβάλλονται από μια φωσφολιπιδική διπλό στιβάδα με διάμετρο 50-100 nm. Το εύρος τους δεν είναι παρά ελάχιστα μεγαλύτερο από εκείνο των ιών [34].
- Τα εξωσώματα είναι χαρακτηριστικά για τα κύτταρα στο ανοσοποιητικό σύστημα και τους όγκους.

Τα εξωσώματα μπορεί να ασκούν τις βιολογικές λειτουργίες τους μέσω διαφόρων μηχανισμών, οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω:

- Άμεση επαφή μεταξύ των μορίων στην επιφάνεια των κυστιδίων και των κυττάρων, ενδοκύτωση των κυστιδίων και ένωση της μεμβράνης των κυστιδίων και των κυττάρων.
- Τα εξωσώματα έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς mRNA και miRNA. Έχει διαπιστωθεί η οριζόντια μεταφορά οικογενειακού υποδοχέα [35], καθώς και η μεταφορά κυστιδίων του HIV [36].

- Η αντιγονοπαρουσίαση, οι ανοσοδιεγερτικές και οι ανοσοκατασταλτικές δραστηριότητες είναι βασικές λειτουργίες των εξωσωμάτων [34-37].
- Στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης των εξωσωμάτων υπάρχει φωσφατιδυλοσερίνη, καθώς και μάρτυρες όπως οι CD63, CD81, CD9, LAMP1 και TSG101 [38].
- Η απομόνωση και οι μέθοδοι ανάλυσης των εξωσωμάτων περιλαμβάνουν φυγοκέντρηση και υπερφυγοκέντρηση με χρήση διαφορετικών επιπέδων συγκρότησης, καθώς και ηλεκτρονική μικροσκοπική μεταφορά (TEM) και φασματοσκοπία μάζας.

Μικροκυστίδια (MVs)

- Το 1946, οι Chargaff και West [36] ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τα μικροκυστίδια ως ιζηματικό παράγοντα του πλάσματος ελεύθερου από αιμοπετάλια που έχει την ικανότητα δημιουργίας θρομβίνης. Το 1967, ο Peter Wolf τα χαρακτήρισε ως «σκόνη αιμοπεταλίων», περιγράφοντας τα ως ένα κλάσμα το οποίο περιέχει κατά κύριο λόγο κυστίδια πλούσια σε λιπίδια, τα οποία παράγονται από υπερφυγοκέντρηση φρέσκου πλάσματος [39].
- Τα μικροκυστίδια περιβάλλονται από φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Η διάμετρος τους είναι 100-1000 nm [2] ή 100-400 nm στο πλάσμα [41]. Δεν έχει καθοριστεί ακόμα η χαμηλότερη τιμή [42]. Το εύρος τους είναι μεγαλύτερο από αυτό των βακτηρίων και των αδιάλυτων ανοσολογικών συμπλεγμάτων.
- Ο σχηματισμός τους προκύπτει από τη ρυθμική απελευθέρωση κοκκίων από την πλασματική μεμβράνη.
- Αυτός ο ρυθμός είναι σχετικά χαμηλός, με εξαίρεση τους όγκους [43] [44]

- Η ρυθμιζόμενη απελευθέρωση των κυστιδίων συμβαίνει λόγω της ενεργοποίησης των υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας ενώ η απόπτωση τους από την επακόλουθη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου [45,46]
- Έχουν περιγραφεί ως προϊόντα αιμοπεταλίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Μερικές από τις βασικές λειτουργίες των μικροκυστιδίων είναι η προπηκτική ικανότητα, η συνεισφορά στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και η διακυτταρική επικοινωνία.
- Αν και διαθέτουν φωσφατιδυλοσερίνη, έχει προταθεί ότι υπάρχουν και μικροκυστίδια χωρίς εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερίνη.
- Στις μεθόδους απομόνωσης και ανάλυσης περιλαμβάνονται η κυτταρομετρία ροής, η φυγοκέντρωση και οι διαδικασίες που βασίζονται στη δέσμευση ουσιών [93].

4.2 Η δημιουργία των μικροκυστιδίων από τα κύτταρα

- Το 1972, ο Kerr έκανε την πρώτη αναφορά στον όρο «αποπτωτικό σωματίδιο» [44], ένα καθοριστικό στοιχείο της έρευνας για την απόπτωση που μελετήθηκε από τους Robert Horvitz et al. για την δημιουργία κυτταρικής γραμμής στη νηματώδη *Caenorhabditis elegans* [45-46].
- Η διάμετρος των αποπτωτικών σωματιδίων είναι περίπου 1-5 μm [47].
- Χαρακτηριστική είναι η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης στην επιφάνεια τους, ενώ μπορεί να περιέχουν διασπασμένο DNA [48].
- Μερικές λειτουργίες των αποπτωτικών σωματιδίων είναι η οριζόντια μεταφορά των ογκογονιδίων [49] και του DNA, η παρουσίαση των επιτόπων των T-κυττάρων με μίμηση από τα φαγοκύτταρα, καθώς και η επαναπαρουσίαση των αυτο-αντιγόνων από τα B-κύτταρα [50]. Έχει

βρεθεί ότι η μίμηση από τα αποπτωτικά σωματίδια συμβάλλει στην ανοσοκαταστολή.

4.3 Ο ρόλος των μικροκυστιδίων

Τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια στο περιβάλλον τους. Παρομοίως, τα βακτήρια απελευθερώνουν κυστίδια από την εξωτερική τους μεμβράνη, με βασική λειτουργία την μεταφορά για διάφορους σκοπούς. Αναλυτικά, τα κυστίδια αυτά περιέχουν μόρια σηματοδότησης προς άλλα βακτήρια, ενώ μοιράζουν τοξίνες και ανταλλάσσουν DNA με γονίδια για την κωδικοποίηση παθογενειών μεταξύ των βακτηρίων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα μικροκυστίδια επίσης συντελούν στην μεταφορά μορίων σηματοδότησης, αλλά και κυτταρικών απόβλητα και λειτουργικές γενετικές πληροφορίες. Όλο και περισσότερο, η γνώση για τους πολύπλοκους ρόλους των μικροκυστιδίων και των εξωσωμάτων στην εξέλιξη των νόσων αυξάνεται, ενώ το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας αφορά στην εξέλιξη του καρκίνου. Έτσι, έχουν προσδιοριστεί οι κλινικές εφαρμογές τους σε σχέση με τον καρκίνο, όπως στη διάγνωση, την πρόληψη και την θεραπεία. Αναλυτικότερα, τα μικροκυστίδια και τα εξωσώματα είναι τα καλά μελετημένα σε σχέση με άλλα κυστίδια που απελευθερώνονται από ευκαρυωτικά. Βλασταίνουν από την κυτταρική μεμβράνη και έχουν διάμετρο 100 nm με 1 μm και 30-100 nm αντίστοιχα. Πολλά διαφορετικά υγρά, όπως οι όροι, τα ρυθμισμένα μέσα από καλλιέργειες κυττάρων *in vitro*, το αίμα και τα ούρα περιέχουν σημαντικές ποσότητες κυστιδίων από κύτταρα. Η παρουσία μικροσωματιδίων και εξωσωμάτων από διάφορα κύτταρα υπάρχει στα σωματικά υγρά σε φυσιολογικές και μη καταστάσεις. Ωστόσο, στοιχεία όπως η συγκέντρωση, η προέλευση, η σύνθεση και η λειτουργία τους είναι καθοριστικά για την κατάσταση μιας νόσου, εξού και οι προσπάθειες διερεύνησης τους. Παρόλα

αυτά, το μικρό τους μέγεθος και η ετερογένεια που τα χαρακτηρίζει συχνά οδηγούν σε δυσκολία εντοπισμού και χαρακτηρισμού τους, κάτι που δεν συμβάλλει στην εξαγωγή σαφών αποτελεσμάτων. Τα τελευταία χρόνια, τα ερευνητικά εργαστήρια προσπαθούν να μάθουν περισσότερα για τις πραγματικές συγκεντρώσεις, την κατανομή μεγέθους, την προέλευση και την σύνθεση τους μέσω της κυτταρομετρίας ροής, της μικροσκόπησης ατομικής δύναμης, της δυναμικής σκέδασης φωτός σε συνδυασμό με φθορισμό. Παλαιότερα, η μελέτη των λειτουργιών των μικροκυστιδίων βασίζονταν αποκλειστικά στη χρήση καθορισμένων παρασκευασμάτων για την ικανότητα ενεργοποίησης της πήξης, την αγγειογένεση. Μολονότι έχει επιτευχθεί η απόδοση μιας πιθανής βιολογικής σημασίας για την κυτταρική προέλευση των κυστιδίων, αντίστοιχες μελέτες δεν έχουν καταφέρει να απαντήσουν στο ερώτημα για τον πραγματικό ρόλο τους. Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί ο λόγος που τα κύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια στο περιβάλλον τους.

4.4 Βιοχημική σύνθεση

Στην κυτταρική μεμβράνη του κάθε τύπου ευκαρυωτικού κυττάρου, τα φωσφολιπίδια έχουν ειδική σύνθεση και κατανομή, εξού και οι δυσκολίες στην μελέτη τους. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πλειονότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων χαρακτηρίζονται από μια ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων. Τα σχολικά φωσφολιπίδια βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ τα αμυνοφωσφολιπίδια και τα PS στην εσωτερική. Αυτή η ασυμμετρία ρυθμίζεται μέσω των διαμεμβρανικών ενζύμων, που διατηρούν μια πολύπλοκη αλλά σημαντική ισορροπία. Σύμφωνα με την καθιερωμένη σχετική θεωρία, η εγκάρσια μετανάστευση ανιονικών φωσφολιπιδίων οδηγεί σε διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυστιδίων. Η εν λόγω διεργασία μπορεί να προκύψει

από την απόπτωση, τη νέκρωση και την ενεργοποίηση των κυττάρων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να διεγερθεί από διάφορα κυτταρικά γεγονότα όπως η απόπτωση, η νέκρωση και η κυτταρική ενεργοποίηση. Στα αιμοπετάλια, η μεταφορά του PS από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης προάγει την διαδικασία εκκαθάρισης από αποπτωτικά κύτταρα και θραύσματα κυττάρων μέσω της δράσης των μακροφάγων. Ακόμα, η εισροή από ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) προερχόμενα από εξωκυτταρικές πηγές και από ιόντα ασβεστίου τα οποία απελευθερώνονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) ενεργοποιεί την καλπαΐνη. Πρόκειται για μία κυστεϊνική πρωτεΐνωση που έχει πολλές λειτουργίες στην διάρκεια παραγωγής των μικροκυστιδίων. Μεταξύ άλλων, η καλπαΐνη διασπά τα κυτταροσκελετικά νημάτια ακτίνης, εκτελώντας έτσι μια σημαντική λειτουργία για την ανασυγκρότηση του κυτταροσκελετού και, κατά συνέπεια, τη διευκόλυνση της απελευθέρωσης των μικροκυστιδίων. Επιπλέον, η καλπαΐνη ενεργοποιεί την απόπτωση μέσω της προκασπάσης 3 και του BclxL. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρόλος της καλπαΐνης στην απελευθέρωση των μικροκυστιδίων είναι αποδεδειγμένος, καθώς ο αναστολέας της, η καλεπτίνη αναστέλλει την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από αιμοπετάλια. Παράλληλα, η παρουσία της ενεργούς καλπαΐνης στο πλάσμα ασθενών με θρομβωτική θρομβοκυτταροπενική αναιμία έχει άμεση σχέση με την απελευθέρωση μικροκυστιδίων από τα αιμοπετάλια.

Ακόμα, πέρα από τη μεταβίβαση του ιού του HIV με τους ειδικούς υποδοχείς (co-receptors), έχει προταθεί και ένας άλλος μηχανισμός, ο οποίος σχετίζεται με τα μικροκυστίδια. Ονομάζεται μηχανισμός του «Δούρειου Ίππου» (αγγ. Trojan Horse Mechanism) και αντικαθιστά την απευθείας μετάδοση. Ένας αντίστοιχος μηχανισμός έχει προταθεί και για τη μόλυνση των κυττάρων από σωματίδια prions, ο οποίος βασίζεται στον εντοπισμό αυτών των σωματιδίων σε μικροκυστίδια που προέρχονται από αιμοπετάλια. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες έρευνες για την κατανόηση της συμμετοχής των μικροκυστιδίων

και των εξωσωμάτων στα λοιμώδη νοσήματα [54]. Σε μια μελέτη δημιουργήθηκε μια συγκαλλιέργεια από ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος και A549p0 κύτταρα και με μια κυτταρική γραμμή με μεταλλαγμένο και εξασθενημένο μιτοχονδριακό DNA -για να καταστεί αδύνατη η ανάπτυξη των κυττάρων και αερόβια αναπνοής τους- βρέθηκε ότι και τα A549p0 κύτταρα απέκτησαν μιτοχονδριακές λειτουργίες, πέρα από τους ινοβλάστες του δέρματος. Συγκεκριμένα, απέκτησαν την ικανότητα να διαδίδονται με μεγάλη ταχύτητα, όπως συμβαίνει και με τη γονική κυτταρική γραμμή με λειτουργικά μιτοχόνδρια. Ενδεχομένως, η συμμετοχή μικροκυστιδίων ή και εξωσωμάτων περιλαμβάνεται, μεταξύ άλλων, στην μεταφορά των λειτουργικών μιτοχονδρίων μεταξύ των κυττάρων [54].

4.5 Μηχανισμός απελευθέρωσης

Προς το παρόν, δεν έχει αποσαφηνιστεί με ακρίβεια ο μηχανισμός πίσω από την μεμβρανική κυστιδιοποίηση, αν και έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, στους οποίους εμπλέκονται φυσιολογικοί ή και παθολογικοί παράγοντες. Αντίθετα από όσα προϋπέθεταν παλαιότερες απόψεις, τα μικροκυστίδια δεν αποτελούν προϊόντα μιας τυχαίας διαδικασίας, όπως είναι η αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης κατά τη νέκρωση των κυττάρων. Αντ' αυτού, η κυστιδιοποίηση συνιστά μια ρυθμισμένη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται διαφορετικά κύτταρα και η διέγερση τους [54]. Αυτή η διέγερση μπορεί να προκληθεί από ποικίλα εξωγενή ερεθίσματα, όπως η επινεφρίνη, το κολλαγόνο και το ιονοφόρο ασβέστιο. Η απελευθέρωση μικροκυστιδίων μπορεί ακόμα να προκληθεί από το σύμπλεγμα του συμπληρώματος C5b-9 και το στρες. Σε μια μελέτη του 2002, είχε βρεθεί ότι η διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων του ομφάλιου λώρου (HUVECs) με παράγοντα τη θρομβίνη, την οξική φορβόλη ή τον ενεργοποιητή πλασμιγόνου των ιστών δεν οδηγούσε σε σημαντική

απελευθέρωση PS μικροκυστιδίων, αν και σημειώθηκαν μορφολογικές μεταβολές μετά την ενεργοποίηση [55]. Εντούτοις, σε μια πρόσφατη μελέτη βρέθηκε πως μόνο το λυτικό συμπλέγματα του συμπληρώματος C5b-9 επέφερε διέγερση των HUVECs και απελευθέρωση των PS, κάτι που συνιστά φυσιολογική διαδικασία. Μετέπειτα, δημοσιεύτηκαν αναφορές άλλων ερευνητικών ομάδων που υποστήριξαν την απελευθέρωση PS από HUVECs μετά από διέγερση με ιονοφόρο ασβέστιο [54].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: Η παραγωγή των μικροκυστιδίων αναλυτικά

5.1 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων

Τα ερυθροκύτταρα ανέκαθεν αποτελούσαν αντικείμενο έρευνας για την σχέση ανάμεσα στη δομή και την λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης και τον σχηματισμό κυστιδίων. Η κυστιδιοποίηση έχει απασχολήσει πολλούς σύγχρονους ερευνητές, λόγω της αναγνώρισης της σημασίας της για κάθε στάδιο της ζωής των κυττάρων [56]. Η διαδικασία της ερυθροποίησης συνίσταται στην μεταφορά του σιδήρου στο εσωτερικό των ερυθροβλαστών για τη σύνθεση της Hb, στην οποία διαμεσολαβούν οι υποδοχείς, η ενδοκυττάρωση κυστιδίων τα οποία περιέχουν συμπλέγματα υποδοχέων τρανσφερίνης, τρανσφερίνη και σίδηρο. Επιπλέον, στην τελική ερυθροειδική διαφοροποίηση, η κυστιδιοποίηση είναι βασική για την αναδιαμόρφωση της μεμβράνης του δικτυοερυθροκυττάρου, όταν ο υποδοχέας τρανσφερίνης και άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αφαιρούνται από την επιφάνεια μέσω της εξωκυττάρωσης. Ακόμα, συμμετέχει στην παθολογία των διαταραχών των αιμοσφαιρινών και των κυτταρικών μεμβρανών. Επιπλέον, η κυστιδιοποίηση της πλασματικής μεμβράνης στα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν αποτελεί απλώς ένα διαμεμβρανικό τμήμα της φυσιολογικής γήρανσης, αλλά και μια βλάβη για την αποθήκευση των ερυθροκυττάρων στις αιμοδοσίες [56]. Συγκεκριμένα, όταν τα ερυθροκύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια, αρχίζουν να χάνουν μεμβράνη. Αυτό μπορεί να γίνει κάτω από ορισμένες συνθήκες *in vivo*, *in vitro* και *ex vivo* όταν αποθηκεύεται το αίμα. Εκτιμάται πως το αίμα ενός υγιούς ενήλικου ατόμου περιέχει 169 κυστίδια προερχόμενα από ερυθροκύτταρα ανά μικρόλοτρο πλάσματος (μL). Τα μικροκυστίδια αποτελούν θραύσματα που έχουν απορριφθεί από την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων κατά την διέγερση ή απόπτωση τους. Συνδέονται με ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες, όπως την διακυτταρική επικοινωνία, την ομοιόσταση και την ανοσία. Σε γενικές

γραμμές, υποστηρίζεται ότι η κυστιδοποίηση αποτελεί ή συμμετέχει σε έναν μηχανισμό που προάγει την εξάλειψη των προϊόντων των κυτταρικών αποβλήτων [56] [57] [58] [59]. Οι βασικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της έκτασης της κυστιδοποίησης είναι ο προσδιορισμός της ακετυλινεστεράσης και της μέτρησης της απελευθέρωσης φωσφολιπιδίων [56].

5.1.2 Η κυστιδοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ως διαδικασία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ερυθροκύτταρα απελευθερώνουν κυστίδια ως φυσιολογική λειτουργία στην διάρκεια της ζωής τους, σε περιπτώσεις νόσου και κατά την αποθήκευση του αίματος στο πλαίσιο της αιμοδοσίας. Το βασικό γνώρισμα όλων των κυστιδίων είναι η φαινομενική απουσία της σπεκτρίνης και της αγκυρίνης, που αποτελούν τα βασικά συστατικά του ερυθροκυτταρικού σκελετού, καθώς και ενός ακέραιου κυτταροσκελετικού δικτύου σπεκτρίνης και ακτίνης. Έχει παρατηρηθεί οι μεμβράνες των κυστιδίων είναι πλούσιες σε μια ευρεία γκάμα πρωτεϊνών, συγκριτικά με την άθικτη ερυθροκυτταρική μεμβράνη. Αυτό δείχνει την ύπαρξη μιας σχέσης ανάμεσα στην πρωτεϊνική τους σύνθεση και την κυστιδοποίηση. Σε γενικές γραμμές, η κυστιδοποίηση της μεμβράνης συμβαίνει λόγω ασυμμετριών στη σύνθεση της επιφάνειας της μεμβράνης, οι οποίες ευνοούν την κύρτωση της, ή από την παραγωγή δυνάμεων από τον κυτταροσκελετό ή άλλα μέρη. Αν και η λιπιδική σύνθεση της πλασματικής μεμβράνης είναι πάντα ασύμμετρη, η φλιπάση και άλλες πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση αυτής της ασυμμετρίας και των στερεοχημικών ροπών εντός της διπλοστιβάδας, με αποτέλεσμα την πυροδότηση του σχηματισμού κυστιδίων. Ενδέχεται ότι ο κυτταροσκελετός διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην κυστιδοποίηση. Μέσω του διαχωρισμού της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης σε μέρη, ο κυτταροσκελετός έχει επίδραση στον ρυθμό διάχυσης των συστατικών της μεμβράνης, καθώς και στην φυσική

έκταση των ελεύθερων μερών της μεμβράνης. Τα νημάτια σπεκτρίνης απωθούν στερεοχημικά τις μεμβρανικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να διαχωρίσουν μερικές από αυτές και να τις απομακρύνουν από τα ίδια. Παράλληλα, ελκύουν άλλα συστατικά των μεμβρανών, τα οποία καταλήγουν να συσσωρεύονται κοντά τους. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει ένα μοτίβο από διάφορα συστατικά των μεμβρανών, που αποτελεί ένα είδος αντανάκλασης της γεωμετρίας του κυτταροσκελετικού δικτύου και της χημικής συγγένειας των συστατικών αυτών. Η προφανέστερη διαδικασία σχηματισμού κυστιδίων είναι η συσσώρευση από συγκεκριμένα είδη μεμβρανικών πρωτεϊνών, που είναι συγγενικές όσον αφορά το σχηματισμό των μεμβρανικών περιοχών. Οι μεμβρανικές περιοχές που είναι αρκετά μεγάλες σε μέγεθος προκαλούν εξογκώματα στην επιφάνεια τους, τα οποία και θα αποσπαστούν με την μορφή των κυστιδίων. Σε μεμβρανικές και κυστίδια με πολύ μικρό μέγεθος, σε σύγκριση με αυτό των μονάδων του κυτταροσκελετού, η διαδικασία κυστιδοποίησης που οδηγείται από την συσσώρευση μπορεί να συνεχιστεί ανεξάρτητα από τον κυτταροσκελετό. Για περιοχές και κυστίδια πολύ μικρού μεγέθους, συγκριτικά με το τυπικό μέγεθος των μονάδων του κυτταροσκελετού, η οδηγούμενη από τη συσσώρευση διαδικασία κυστιδιοποίησης μπορεί να προχωρήσει χωρίς απαραίτητα να επηρεάζεται από τον κυτταροσκελετό. Η εν λόγω διαδικασία μπορεί να δημιουργήσει νανοκυστίδια με διάμετρο 25 nm [85]. Όταν συμβαίνει αυτό, αναμένεται πως οι μεμβρανικές περιοχές και τα νανοκυστίδια θα έχουν διαφορετική σύνθεση, αναλόγως με το μέγεθος τους. Αυτή η σύνθεση είναι αντίστοιχη με την κύρτωση κάθε συστατικού της μεμβράνης το οποίο έχει συμμετοχή στον σχηματισμό περιοχών, από όπου θα προκύψει κυστιδοποίηση. Αυτό θα εξηγούσε τον λόγο για τον οποίο τα κυστίδια διαφορετικών μεγεθών έχουν και διαφορετικές συστάσεις μεμβρανών. Ο κυτταροσκελετός μπορεί να έχει διαφορετικές επιδράσεις στη διπλοστιβάδα, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους:

α) τη χημική σύνδεση των νηματίων της σπεκτρίνης στα διαμεμβρανικά

συστατικά και β) τη δύναμη της συμπίεσης που ασκείται από τον κυτταροσκελετό στη διπλοστιβάδα. Κάθε κυστίδιο περιέχει πρωτεΐνη-ζώνη 3, ωστόσο, μπορεί να υπάρχουν συνθήκες που δεν της επιτρέπουν να λειτουργήσει ως θέση σύνδεσης του κυτταροσκελετού [60]. Επομένως, ένα βασικό γεγονός για τον σχηματισμό των κυστιδίων είναι η διάσπαση του συνδέσμου ανάμεσα στην πρωτεΐνη-ζώνη 3 και του δικτύου της σπεκτρίνης, που ονομάζεται «κάθετη σύνδεση» αντί για τις οριζόντιες αλληλεπιδράσεις του τριμερούς συμπλέγματος μεταξύ σπεκτρίνης, ακτίνης και πρωτεΐνης. Υπάρχουν διάφοροι λόγοι πίσω από αυτή την διάσπαση. Εφόσον ο κυτταροπλασματικός τομέας της πρωτεΐνης-ζώνη 3 θέσει για σύνδεση με υψηλό βαθμό χημικής συγγένειας τόσο για την αγκυρίνη όσο και για τη μετουσιωμένη Hb και τα κύρια ένζυμα της γλυκόλυσης, τότε και οξειδωση και το ενεργειακό περιεχόμενο του ερυθροκυττάρου δύνανται να επηρεάσουν τη σύνδεση της αγκυρίνης στην πρωτεΐνη-ζώνη 3. Η ρύθμιση της σύνδεσης και της δράσης των γλυκολυτικών ενζύμων οφείλεται στις φωσφατάσες και τις κινάσες, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μεταγωγή σήματος από τις πυροδοτήσεις του κυττάρου μπορεί να έχει επίδραση στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στην λιπιδική διπλοστιβάδα και τον κυτταροσκελετό. Ανεξάρτητα από την αιτία της ύφεσης στην αλληλεπίδραση, έχει υποστηριχθεί πως η αποδόμηση των συνδεδεμένων συμπλεγμάτων πρωτεΐνης-ζώνης 3-αγκυρίνης αυξάνει τη συμπίεση και τη δυσκαμψία του κυτταροσκελετού, με αποτέλεσμα την κύρτωση της διπλοστιβάδας και, τελικά, τον σχηματισμό κυστιδίων. Τα κυστίδια που προκύπτουν θα βλαστήσουν από τα ελεύθερα μέρη της μεμβράνης, τα οποία περιορίζονται από το δίκτυο του κυτταροσκελετού. Ως εκ τούτου, θα έχουν περισσότερο ετερογενή σύνθεση σε σχέση με τα νανοκυστίδια που συνίσταται σε μια «ξεκάθαρη» διαδικασία συσσώρευσης. Επιπλέον, η άμεση αλληλεπίδραση ανάμεσα στα νημάτια της σπεκτρίνης και των συστατικών της μεμβράνης περιορίζεται από το «άνοιγμα» του δεσμού σπεκτρίνης και διπλοστιβάδας, κάτι που συμβάλλει στην ευκινησία τους και, συνεπώς, διευκολύνει την συσσώρευση τους [60].

5.1.3 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων in vivo

Στην διάρκεια της ζωής τους in vivo, τα ώριμα ερυθροκύτταρα χάνουν σταδιακά τον όγκο και την περιεκτικότητα τους σε Hb. Επιπλέον, η επιφάνεια τους και περιεκτικότητα τους σε λιπίδια ελαττώνονται, εξαιτίας της απελευθέρωσης κυστιδίων που εμπεριέχουν Hb. Η εν λόγω διαδικασία εμφανίζεται κάποια στιγμή στην διάρκεια της ζωής των κυττάρων, αλλά επιταχύνεται στο δεύτερο ήμισυ της, εφόσον υπάρχει λειτουργικός σπλήνας. Τα κυστίδια απομακρύνονται ταχέως από το μονοπυρηνικό σύστημα των φαγοκυττάρων, ιδιαίτερα από τα κύτταρα Kupffer στο ήπαρ. Αυτή η άμεση απομάκρυνση οφείλεται στους υποδοχείς εκκαθάρισης που συνδέονται με τα PS, καθώς και από αυτο-αντισώματα, που πυροδοτούν την αναγνώριση και την απομάκρυνση των γερασμένων ερυθροκυττάρων από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος [56] [58] [59]. Με τον σχηματισμό των κυστιδίων υποστηρίζεται η διαδικασία εκκαθάρισης από τα περισσότερα άχρηστα μέρη της μεμβράνης. Κατά αυτόν τον τρόπο, τα ερυθρά αιμοσφαίρια αποβάλλουν τις δυσλειτουργικές πρωτεΐνες και τα δυνητικά επιβλαβή αυτο-αντιγόνα, ενόσω προστατεύονται από τον πρόωρο θάνατο τους. Η πρωτεΐνη-ζώνη 3 είναι η προέλευση των ειδικών κυτταρικών αυτο-αντιγόνων γήρανσης (αγγ. Senescent Cell-specific autoantigens, SCA). Έχει προταθεί ότι η παραγωγή τους ενεργοποιείται λόγω της σύνδεσης της μετοθιωμένης Hb στην κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης-ζώνη 3, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ή και την αποδόμηση της. Με την σειρά τους, τόσο η συσσώρευση όσο και η αποδόμηση μπορεί να σχηματίσουν νεο-αντιγόνα γήρανσης [56] [58]. Τα κυστίδια ερυθροκυττάρων από την πρόσφατη λήψη πλάσματος υγιών δοτών έχουν ποικιλία μεγεθών (200-800 nm) και όλα τα συστατικά της Hb στο ίδιο μοτίβο με αυτό που είχαν τα γηραιά ερυθροκύτταρα. Σε γενικές γραμμές, οι αναλύσεις δείχνουν ότι τα κυστίδια εμπεριέχουν παλαιές

κυτταροπλασματική Hb και μεμβρανική πρωτεΐνη-ζώνη 3. Τα σήματα για εκκαθάριση, όπως για τα γερασμένα κυτταρικά αντιγόνα και PS, θα μπορούσαν να είναι υπαίτια για την ραγδαία απομάκρυνση των κυστιδίων [56] [61].

5.1.4 Η κυστιδιοποίηση των ερυθροκυττάρων in vitro

Η απόπτωση των ερυθροκυττάρων μπορεί να σημειωθεί και in vitro, όταν προκαλείται σχηματική μετάβαση από δισκοκύτταρα σε εχινοκύτταρα.

Μερικές συνθήκες που την επιτρέπουν είναι η εξάντληση του ATP και η υπερφόρτωση Ca^{2+} , κατά τις οποίες η απόπτωση εμφανίζεται στο άκρο των μεμβρανικών θραυσμάτων. Επιπλέον, η οργάνωση των λιπιδίων της μεμβράνης μπορεί να διαταραχθεί από μεμβρανοδραστικές ενώσεις, καθώς και παράγοντες που επιδρούν στην μεταφορά των ιόντων μέσω της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κυστιδίων [56] [59]. Όπως αναφέρθηκε, όταν συγκεντρώνονται μεγάλες ποσότητες Ca^{2+} στο εσωτερικό των ερυθροκυττάρων, το σχήμα του παραμορφώνεται. Αυτό συνιστά την μετάβαση από τα δισκοκύτταρα στα εχινοκύτταρα. Ακόμα, τα μικροκυστίδια απορρίπτονται από τις μικρολαχνωειδείς εκβολές των εχινοκυττάρων. Τα κυστίδια που προέρχονται από υπερφόρτωση με Ca^{2+} δεν έχουν φωσφατιδυλοχολίνη (αγγ. Phosphatidylcholine, PC), ακτίνη, γλυκοφορίνη, σπρεκτίνη, αλλά περιέχουν πρωτεΐνη-ζώνη 3 και ακετυλοχολινεστεράση [56]. Η περιεκτικότητα των ερυθροκυττάρων σε ATP σχετίζεται αρνητικά με την ποσότητα των κυστιδίων. Η εξάντληση του ATP αλλάζει το σχήμα των ερυθροκυττάρων όπως συμβαίνει στην υπερφόρτωση με Ca^{2+} , αν και οι πρωτεϊνικές συνθέσεις των κυστιδίων Η εξάντληση του ATP προκαλεί τις ίδιες μορφολογικές αλλαγές με την αύξηση Ca^{2+} , όμως οι πρωτεϊνικές συνθέσεις των κυστιδίων που προκαλούνται στην πρώτη περίπτωση είναι διαφορετικές. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές στη σύσταση των πρωτεϊνών και των φωσφολιπιδίων, στο μέγεθος και

το σχήμα των κυστιδίων από διάφορες μεμβρανοδραστικές ενώσεις, τότε εξάγεται το συμπέρασμα ότι σύνθεση των κυστιδίων εξαρτάται από τον τρόπο παραγωγής τους. Τέλος, έχει προταθεί το ενδεχόμενο συμμετοχής των πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης στον μηχανισμό παραγωγής των κυστιδίων [56].

5.2 Η κυστιδιοποίηση των αιμοπεταλίων

Στην πλειονότητα τους, τα MVs που κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος προέρχονται από αιμοπετάλια τα οποία βρίσκονται σε φάση ενεργοποίησης ή, σύμφωνα με μια πρόσφατη αναφορά, από μεγακαρυοκύτταρα [62]. Σε κατάσταση *in vitro*, το κολλαγόνο, η θρομβίνη ή το ADP διεγείρουν τα αιμοπετάλια με αποτέλεσμα να σχηματίζονται pMV_s, ενώ το ίδιο μπορεί να συμβεί κάτω από στρες και άλλες έντονα συναισθηματικές συνθήκες. Η ανίχνευση των pMV_s είναι εύκολη και γίνεται από FC με χρήση CD41, CD42, CD61 και CD62. Όπως συμβαίνει με τα eMV_s για την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση, τα pMV_s αποτελούν δείκτες για την αιμοπεταλιακή. Ως εκ τούτου, πολλές νόσοι παρουσιάζονται με αυξημένα επίπεδα pMV_s, συμπεριλαμβανομένων των αυτοάνοσων [63], του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και των καρδιοπαθειών. Ακόμα, τα pMV_s έχουν την δυνατότητα να εκθέσουν φωσφατιδυλισερίνη και ιστικό παράγοντα και μπορούν να συμβάλλουν στις αγγειοπάθειες εξαιτίας του υψηλού θρομβογονικού δυναμικού που έχουν. Αξίζει να σημειωθεί πως τόσο το αίμα του πλάσματος όσο και το αρθρικό υγρό των RA ασθενών έχουν αυξημένα επίπεδα pMV_s [64] τα οποία και ενεργοποιούν αρθρικούς ινοβλάστες λόγω του ότι περιέχουν IL-1. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από πολλές αναφορές για αυξημένες συγκεντρώσεις pMV_s στο πλάσμα ασθενών με ρευματοπάθειες [63]. Η επιφάνεια των pMV_s είναι ευνοϊκή για την προσκόλληση καθώς μπορεί να

δεσμευτεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα λευκοκύτταρα [65]. Επίσης, μέσω της προσκόλλησης των MVs μπορεί να γίνει μεταφορά GPIIb/IIIa σε ουδετερόφιλα και άλλα κύτταρα [66], με αποτέλεσμα την κυτταρική ενεργοποίηση. Κοντολογοίς, είναι πιθανό ότι τα pMVs συμμετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής και της αυτοανοσίας.

5.2.1 Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, πραγματοποιούνται διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η αλλαγή του σχήματος, η μετατόπιση των γλυκοπρωτεϊνών της μεμβράνης, η εξωκυττάρωση των κοκκίων και ο σχηματισμός μικροκυστιδίων. Αυτός ο σχεδιασμός μπορεί να μελετηθεί σε συνθήκες *in vitro* με την χρήση κυτταρομετρίας ροής, έπειτα από τη διέγερση με ιονοφόρο ασβέστιο A23187, θρομβίνη, κολλαγόνο και τον υποδοχέα θρομβίνης, το πεπτίδιο αγωνιστή SFLLRN [1] [2]. Δεν αποκλείεται και ο σχηματισμός μικροκυστιδίων *in vivo*, σε ασθενείς με σοβαρή αιμορραγία και άλλες κλινικές συνθήκες που συνδέονται με την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση, όπως η ιδιοπαθής θρομβοπενική πορφύρα [6] και η καρδιοαναπνευστική παράκαμψη (αγγ. *bypass*) [7]. Παρόλο που ο φυσιολογικός ρόλος των μικροκυστιδίων προερχόμενων από αιμοπετάλια παραμένει ακαθάριστος, τους έχουν αποδοθεί προπηκτικές [8] [9] και αντιπηκτικές [10] δραστηριότητες. Ο σχηματισμός τους έχει στενή σχέση με την έκθεση φωσφατιδυλισερίνης στο εξωτερικό της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Όπως αναφέρθηκε, η εν λόγω έκθεση έχει συμβολή στην απελευθέρωση των μικροκυστιδίων [11] [12], αλλά παρέχει και μια ανιονική επιφάνεια για την δέσμευση των παραγόντων πήξης VIII, Va και Xa [13] [14] [15]. Επομένως, τα μικροκυστίδια μπορεί να έχουν μια λειτουργία πρόληψης σε μια μεγάλη απόσταση από την θέση ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Το περιεχόμενο των μικροκυστιδίων αιμοπεταλιακής προέλευσης περιλαμβάνει διάφορες γλυκοπρωτεΐνες (GP) (π.χ.

GPIb), αλυσίδες αII της ιντερκίνης, β1 και β3 [5] [7] [16] και P-σελεκτίνη, που μετακινούνται από το εσωτερικό των κυττάρων στην επιφάνεια τους ύστερα από την ενεργοποίηση. Η εμφάνιση αυτών των γλυκοπρωτεϊνών κατά την απελευθέρωση των μικροκυστιδίων θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ τους ή με άλλα κύτταρα του ινώδους [17] [18].

5.3 Η κυστιδιοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων

Ο φυσιολογικός ρόλος των λευκοκυττάρων στη φλεγμονή, το ανοσοποιητικό και τη θρόμβωση είναι ξεχωριστός. Ύστερα από έκθεση σε λιποσακχαρίδια, τα μονοκύτταρα απελευθερώνουν μικροκυστίδια. Ο υποδοχέας λιποσακχαρίτη CD14 εκφράζεται έντονα στην επιφάνεια τους, αντίθετα από ότι στα κοκκιοκύτταρα. Ως αποτέλεσμα, τα κυστίδια προερχόμενα από μονοκύτταρα αναγνωρίζονται από την επιφανειακή έκφραση του CD 14. Τα μικροκυστίδια από ουδετερόφιλα ανιχνεύονται στο αίμα υγιών ατόμων, αλλά και ασθενών με μηνιγγιτιδοκοκκική σήψη. Συνήθως, τα μικροκυστίδια από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα αναγνωρίζονται από την έκφραση ειδικών δεικτών για λευκοκύτταρα, όπως είναι η λακτοφερίνη ή το Cd66b. Τα μικροκυστίδια από λεμφοκύτταρα αναγνωρίζονται επίσης με δείκτες που είναι ειδικοί για λεμφοκύτταρα, και συγκεκριμένα τους CD4 και CD8 [82].

5.4 Οι μηχανισμοί σχηματισμού ενδοθηλιακών μικροκυστιδίων

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν εξωσώματα, ενδοθηλιακά MVs (αναφέρονται συχνά ως EMPs) και αποπτωτικά σωματίδια. Τα EMPs σχηματίζονται σε συνθήκες *in vitro*, ύστερα από διέγερση με λιποσακχαρίδη, ενεργό οξυγόνο και κυτοκίνες. Μπορούν να ανιχνευτούν στο πλάσμα του

αίματος με FC μέσω ειδικών δεικτών, όπως CD54, CD62E, CD62P, CD31, CD106, CD105, CD144 και CD146 [83]. Αν και υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στο FC, τα EMPs λογίζονται ως δείκτες φλεγμονής, ενδοθηλιακού τραυματισμού και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας [84] [85]. Λόγω του ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία θεωρείται ως προγνωστικός παράγοντας για διάφορες μελλοντικές καρδιοαγγειακές παθήσεις, τα EMPs μπορεί να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες. Τα πλάσμα από το αίμα που λαμβάνεται απο ασθενείς με νεφρική ανεπάρξεθα τελικού σταδίου [85] οξύ στεφανιαίο σύνδρομο [86], σοβαρή υπέρταση [87] και πνευμονική αρτηριακή υπέρταση [88] [89] έχει αυξημένες συγκεντρώσεις EMPs. Ωστόσο, ο ρόλος τους στην παθολογία των αγγειοπαθειών δεν έχει εξακριβωθεί [90]. Έχει προταθεί η πιθανή συμβολή τους στο αγγειακό τραύμα, καθώς και η ικανότητα τους στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, που θεωρείται ότι οδηγεί στην αγγειακή σκλήρυνση [91]. Επιπρόσθετα, η φωσφατιλδυλοσερίνη ή και ο ιστικός παράγοντας που είναι θετικά σε EMPs σχετίζονται με την προαγωγή της πήξης και της θρόμβωσης. Παρόλα αυτά, αξίζει να αναφερθεί ότι επάγουν αγγειογένεση και προάγουν την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε μερικές περιπτώσεις [92]. Οι γνώσεις για τους μηχανισμούς της ενδοθηλιακής κυστιδιοποίησης έχουν στηριχθεί κυρίως σε πειράματα με μεμονωμένα ενδοθηλιακά κύτταρα ή καλλιέργειες τους, τα οποία αποδεικνύουν την ικανότητα τους στην παραγωγή μικροκυστιδίων μετά από διέγερση με ποικίλα ερεθίσματα. Σύμφωνα με τους Combes et al., τα ανθρώπινα EMPs παράγονται από κύτταρα ομφάλιας φλέβας ύστερα από διέγερση με TNP-α. Πέραν αυτού, υπάρχουν κι άλλοι ενεργοποιητές της παραγωγής EMPs σε συνθήκες in vitro, όπως διάφορες φλεγμονώδεις κυτοκίνες, βακτηριακοί λιποσακχαρίτες, αντιδραστικά είδη οξυγόνου, αναστολείς του ενεργοποιητή πλασμινογόνου, θρομβίνη, καμπτοθεκίνη, C αντιδρώσα πρωτεΐνη και ουραιμικές τοξίνες. Στην περίπτωση της διέγερσης με C αντιδρώσα πρωτεΐνη, τα EMPs απελευθερώνονται μέσω ενός μηχανισμού του ενδογενούς νιτρικού

οξειδίου, που περιλαμβάνει τετραϋδροβιοπτερίνη. Δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί απελευθέρωσης των EMPs σε συνθήκες *in vivo*, αν και έχει παρατηρηθεί ένα είδος αντίστροφης σχέσης ανάμεσα στην αρτηριακή πίεση και τη διάτμηση των επιπέδων EMPs σε νεφροπαθείς, η οποία και υποδεικνύει ότι τα χαμηλά επίπεδα στρες ενισχύουν την απελευθέρωση EMPs [93].

Τα EMPs απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο υγρό ως αποτέλεσμα της εκκολλαπτόμενης πλασματικής μεμβράνης σε περίπτωση διαταραχής της ασυμμετρίας των δύο στιβάδων φωσφολιπιδίων και της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού. Γενικά, είναι παραδεκτό πως η αναδιαμόρφωση των φωσφολιπιδίων χαρακτηρίζει τα κύτταρα που υπόκεινται σε απόπτωση ή ενεργοποίηση, ενώ οδηγεί σε έκθεση PS στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης ως αποτέλεσμα της φτωχής ασβεστιο-εξαρτώμενης ρύθμισης της σκραμπλάσης, φλιπάσης/ABC1 και τρανσλοκάσης/φλιπάσης δραστηριοτήτων [93]. Δεν υπάρχει παρά ένας μικρός αριθμός ερευνών που έχει εστιάσει στην ανάλυση των μοριακών μηχανισμών πίσω από τον έλεγχο της απελευθέρωσης EMPs. Σε μια έρευνα που βασίστηκε στην ανάλυση των χαρακτηριστικών γονιδίων αναγνωρίστηκε ένα νέο ‘μονοπάτι’ που οφείλεται στη δράση της θρομβίνης, της Rho-κινάσης ROCK-II κατά την διέγερση με κασπάση 2, σε απουσία νεκρωτικών κυττάρων. Ο εν λόγω μηχανισμός διακρίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη αφορά το διάστημα λίγο μετά την πρόσδεση της θρομβίνης στον υποδοχέα της πρωτεάσης - ενεργοποιημένου υποδοχέα 2 (PAR-1). Η δεύτερη εξαρτάται από τα μεταγραφικά γεγονότα που προκαλούνται από την θρομβίνη και την εμπλοκή μιας κυτοκίνης της TNP-α οικογένειας, της TRAIL/Apo2L. Βρέθηκε ο παράγοντας-κΒ, ήταν αναγκαίος για την παραγωγή των EMPs στην διέγερση με θρομβίνη. Ακόμα, η ιντερλευκίνη-1 και η ιντερλευκίνη -I Ra, οι οποίες αποτελούν πρωτεΐνες προσαρμογέα, βρέθηκαν να επιστρατεύουν και TRAF6 IRAQ1 και να ενεργοποιούν ένα μονοπάτι σηματοδότησης, ενισχύοντας έτσι την απελευθέρωση των EMPs [93].

Συνεπώς, οι μεσολαβητές της φλεγμονής οι οποίοι ρυθμίζονται από την θρομβίνη τελικά ενισχύουν την κυστιδοποίηση των ενδοθηλιακών κύτταρων. Δεν έχει γίνει γνωστό αν οι ενδοκυττάριοι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την απελευθέρωση των EMPs έχουν σχέση με τη γενικευμένη φλεγμονώδη αντίδραση. Παρόλα αυτά, μια έρευνα αναγνώρισε την p38 μιτογόνο ενεργοποιημένη κινάση πρωτεΐνης ως μια σημαντική οδό στην παραγωγή του των EMPs που απελευθερώνονται πριν την εμφάνιση της γενικής φλεγμονής. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα EMPs απελευθερώνονται μετά την ενεργοποίηση από το TNF- α , που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ICAM-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενισχύοντας έτσι την απόκριση των ενδοθηλιακών κύτταρων στη φλεγμονή [93].

5.5 Ο σχηματισμός κυστιδίων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη (σχηματισμός μικρομορίων)

Όπως έχει αναφερθεί, η κυτταροπλασματική μεμβράνη συνίσταται σε μια διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων. Τα είδη φωσφολιπιδίων είναι διαφορετικά για κάθε στιβάδα. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, υπάρχουν δύο κύρια είδη αμινοφωσφολιπιδίων στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE). Αντίστοιχα, στην εξωτερική πλευρά υπάρχουν κυρίως η φωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη. Τα αμινοφωσφολιπίδια είναι αρνητικά φορτισμένα, εν αντιθέσει με τα φωσφολιπίδια της εξωτερικής μεμβράνης που είναι ουδέτερα. Αυτή η ασυμμετρία στα είδη των φωσφολιπιδίων που χαρακτηρίζει την κυτταροπλασματική μεμβράνη στηρίζεται σε τρία βασικά ένζυμα: την φλιπάση, την φλοπάση και την σκραμπλάση. Η φλιπάση αποτελεί έναν ATP-εξαρτώμενο αμινοφωσφολιπιδικό μεταφορέα που μετακινεί τα PS και PE από την εξωτερική

πλευρά στην εσωτερική, δηλαδή αντίθετα προς την ηλεκτρική κλίση. Η φλοπάση είναι επίσης ένας μεταφορέας φωσφολιπιδίων που εξαρτάται από τα ATP, αν και δεν είναι τόσο γρήγορος όσο η φλιπάση. Διευκολύνει την μεταφορά των φωσφολιπιδίων από την εξωτερική στην εσωτερική στιβάδα. Η σκραμπλάση είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται τόσο από ATP όσο και από Ca^{2+} , το οποίο αφήνει τα μη ειδικά φωσφολιπίδια να μετακινούνται από τη μία στιβάδα στην άλλη [94].

Αυτή η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων διακόπτεται όταν σημειώνεται απόπτωση ή ενεργοποίηση των κυττάρων. Κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} στο εσωτερικό των κυττάρων, η σκραμπλάση και η φλοπάση διεγείρονται και παρεμποδίζουν έτσι τη λειτουργία της φλιπάσης. Κατά συνέπεια, τα PS και PE των κυττάρων αναγκάζονται να παραμείνουν στην εξωτερική στιβάδα της κυταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασή τους με το εξωτερικό περιβάλλον. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει σημασία για την πήξη του αίματος και την απόπτωση των κυττάρων [95] [96]. Αυτές οι μεταβολές στην παρουσία των φωσφολιπιδίων οδηγεί στην εκκόλαψη της κυταροπλασματικής μεμβράνης και, τελικά, την απελευθέρωση των MPs, με αποτέλεσμα τη μεταβολή στο σχήμα του κυττάρου και τη διαταραχή της μηχανικής σταθερότητας της κυταροπλάσματικής μεμβράνης. Επιπλέον, η απελευθέρωση των MPs μπορεί να συμβεί και σε άλλες καταστάσεις, όπως λόγω της απόπτωσης και της μηχανικής καταστροφής των κυττάρων. Καταβάλλονται ερευνητικές προσπάθειες για να αποσαφηνιστούν οι διαφορές ανάμεσα σε απελευθερωμένα MPs και των MPs που προκύπτουν από απόπτωση, παρότι φαίνεται ότι πρόκειται για παρόμοιους μηχανισμούς [95] [96].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: Ανάλυση και μέτρηση των μικροκυστιδίων

6.1 Μέτρηση των επιπέδων των MPs με την χρήση λειτουργικών δοκιμασιών

Η μέτρηση των MPs γίνεται με διάφορους τρόπους. Η κυτταρομετρία ροής εφαρμόζεται με σκοπό τον προσδιορισμό της κυτταρικής προέλευσης διαφόρων MPs, μολονότι υπάρχουν κάποιοι προβληματισμοί σε σχέση με το όριο ανίχνευσης [97]. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η μικροσκοπία ατομικής δύναμης και η δυναμική σκέδαση φωτός στοχεύουν στον προσδιορισμό του μεγέθους των MPs, χωρίς όμως να παρέχουν στοιχεία σε σχέση με τις βιολογικές τους ιδιότητες [98]. Όσον αφορά στη μέτρηση της συγκέντρωσης των αντιγόνων του TF στα MPs, υπάρχουν διάφορες προτάσεις [99] [100]. Οι λειτουργικές δοκιμασίες έχουν υψηλή ευαισθησία και είναι απλές στην εφαρμογή, ενώ και η χρήση των καλά καθορισμένων αντιδραστηρίων θεωρείται πλεονέκτημα. Μια πρόσφατη μελέτη βρήκε ότι τα επίπεδα δραστηριότητας του TF στα MPs ασθενών με παγκρεατικό καρκίνο ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά σε υγιή άτομα, ενώ δεν βρέθηκε καμία διαφορά από την δοκιμασία αντιγόνων του TF [101]. Παρόλα αυτά, οι λειτουργικές διαδικασίες έχουν το μειονέκτημα της μη παροχής πληροφοριών σε σχέση με την κυτταρική προέλευση και τις ιδιότητες των MPs. Όπως έχει αναφερθεί ήδη, η έκθεση των PS στην επιφάνεια των MPs αφήνει περιθώριο για την συσσώρευση διαφόρων συμπλεγμάτων από παράγοντες πήξης στα MPs. Η δοκιμασία δραστηριότητας του MP Zymurphen (Hyphen BioMed) έχει εφαρμοστεί για την ποσοτικοποίηση των PS στα MPs [102]. Τα PS+ MPs προσδέονται σε μια πλάκα της ELISA, η οποία έχει καλυφθεί με ανεξίνη V-στρεπταβιδίνη και έχει υποβληθεί σε επώαση με FC, FX και προθρομβίνη. επικαλυμμένη με ανεξίνη V- στρεπταβιδίνη και

επωασμένη με FV, FX και προθρομβίνη . Μετά την πρόσδεση, προστίθεται ένα στρώμα με δείκτη θρομβίνης για την αξιολόγηση των επιπέδων που θα φτάσει μετά την ενεργοποίηση της προθρομβίνης. Από την άλλη πλευρά, η δοκιμασία Proag PPL (Stago) έχει χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της πηκτικής δραστηριότητας των MPs μετά την προσθήκη τους στο πλάσμα χοίρων, από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα φωσφολιπίδια [33]. Για την διεξαγωγή της, γίνεται ανάμειξη από όσους όγκους πλάσματος εξέτασης και πλάσματος χοίρων χωρίς φωσφολιπίδια. Κατόπιν, προστίθεται ο FXa και ξεκινά η μέτρηση του χρόνου πήξης. Ο υπολογισμός των φωσφολιπιδίων στο δείγμα με την μορφή των MPs στηρίζεται στη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης με συνθετικά φωσφολιπίδια [103].

6.2 Οι μέθοδοι για την ανάλυση MPs

6.2.1 Η τεχνική ELISA για τη δραστηριότητα των MPs

Η προπηκτική δραστηριότητα των MPs στο πλάσμα έχει μετρηθεί μέσω της δοκιμής Zymurhen MP δραστηριότητας ELISA, η οποία βασίζεται στην χρήση προθρομβίνης και ενός αναγνώστη ELISA, με δείγματα σε μήκος κύματος των 405 nm. Τα δείγματα του πλάσματος αποψύχθηκαν στους 37oC για 15 λεπτά, ετοιμάστηκαν για ανάλυση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αναλύθηκαν στο διάστημα των τεσσάρων ωρών [104] [105]. Τα δείγματα και οι μάρτυρες δοκιμάστηκαν με αραιώση αναλογίας 1 προς 20. Κάθε 100 ml του αραιωμένου δείγματος, των αραιωμένων μαρτύρων και το δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για την ELISA. Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε : $\leq 0,05$ nmol, ο ενδο-αναλυτικός συντελεστής διακύμανσης (CV) βρέθηκε 3-8% και το δια-εκτελεστικό CV 5-10%. Στην αρχή της δοκιμασίας , μετρήθηκε το περιεχόμενο των MPs σε PS

ύστερα από την μετατροπή της προθρομβίνης στην θρομβίνη, ενώ ως μεταβλητή περιορισμού του ρυθμού της αντίδρασης τέθηκε η περιεκτικότητα σε PL. Στο αραιωμένο δείγμα πλάσματος, έχουν δοκιμαστεί η συμπλήρωση του με ασβέστιο, με FXa και με αναστολείς θρομβίνης. Κατόπιν, το αραιωμένο δείγμα εισάγονταν μέσα στην μικροπλάκα για να επικαλύφθει με στρεπταβιδίνη και βιοτινυλιωμένη ανασυνδυασμένη με αννεξίνη V. Ακολούθησαν επώαση, βήματα πλύσης και η εισαγωγή του μίγματος FXa-FVa με ασβέστιο. Μετά την δέσμευση τους με αννεξίνη V, τα MPs εκθέτουν την φωσφολιπιδική επιφάνεια τους. Ανάλογα με τη συγκέντρωση PL στο εκάστοτε δείγμα, ξεκινούσε η παραγωγή θρομβίνης, η οποία μετρήθηκε με φωτόμετρο CODA αναλυτή σε 405 nm, με την ειδική δραστικότητα της θρομβίνης επί του υποστρώματος θρομβίνης. Τα αποτελέσματα της μέτρησης παρουσιάστηκαν ως νανομοριακά ισοδύναμα PS με χρήση μιας καμπύλης, η οποία είχε σχεδιαστεί με λιποσώματα με γνωστή σύνθεση και συγκέντρωση από PLTS αποτελέσματα παρουσιάζονται ως νανομοριακά ισοδύναμα PS χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη που κατασκευάστηκε με λιποσώματα με γνωστή σύνθεση και η συγκέντρωση από PLTs [104] [105].

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

Η STA-προπηκτική-PPL δοκιμασία (Diagnostica Stago SAS, Asnieres sur Seine , Γαλλία) είναι μία προπηκτική δοκιμασία, που μετρά μια προπηκτική PL-εξαρτώμενη από το χρόνο πήξης (CT) και διευκρινίζει τις διαφορές μεταξύ του κανονικού πλάσματος και του πλάσματος που περιέχει μικροκυστίδια.

Προθρομβωτικά φωσφολιπίδια εκθέτοντας μικροκυστίδια συντομεύουν το ενεργοποιημένο PX, ενεργοποιημένου CT (XACT) 0.22 PL-IiAOI πλάσμα (Αντιδραστήριο 1), καθιστώντας τη δοκιμασία υπό την παρουσία ασβεστίου ευαίσθητη σε δείγματα που περιέχουν PL. Αντιδραστήριο 2 ενεργοποιεί τον

καταρράκτη της πήξης με θρομβίνη παραγωγής από πήξης FXa. Η παρασκευή των δειγμάτων πλάσματος και η διαδικασία δοκιμασίας εκτελέστηκε ακολουθώντας τις οδηγίες των κατασκευαστών για την STA-Procoag-PPL πήξης. Αφού αποψύχθηκαν όλα τα μη αραιωμένα δείγματα πλάσματος που πρόκειται να δοκιμαστούν φορτώθηκαν σε ένα πλήρως αυτοματοποιημένο τυχαίας προσπέλασης αναλυτή πήξης, για τις δοκιμασίες πήξης (STA-compact Dia gnost ica Stago, Richmond, VA)[10 6]. Τα δείγματα αίματος μετάγγισης των υγιών δοτών αίματος χρησιμοποιήθηκαν για να καθοριστεί το εύρος των τιμών για αυτή τη δοκιμασία πήξης σε φυσιολογικά-υγιή άτομα. Όσον αφορά τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, οι προ αναλυτικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται στη μελέτη πρέπει να καθοριστούν [104].

6.2.4. Ο προσδιορισμός MP με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση κυττάρων και τμημάτων αυτών, όπως είναι τα μικροκυστίδια. Έχει την ικανότητα να προσδιορίζει την προέλευση των μικροκυστιδίων ανάλογα με τις πρωτεΐνες που αυτά φέρουν στην επιφάνειά τους. Είναι μια πολυπαραμετρική μέθοδος, καθώς μέσω αυτής μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες τόσο για το μέγεθος των κυστιδίων που μας ενδιαφέρει, όσο και για την κοκκιοποίηση τους, αλλά και να πάρουμε πληροφορίες για τις πρωτεΐνες της επιφάνειάς τους. Το δείγμα εισάγεται στο μηχάνημα σε μορφή εναιωρήματος, αφού πρώτα έχουμε επώσει με κατάλληλα αντισώματα. Τα αντισώματα που επιλέγουμε εξαρτώνται από το είδος των μικροκυστιδίων που θέλουμε να μελετήσουμε κάθε φορά. Μετά την είσοδο του εναιωρήματος στο κυτταρόμετρο τα μικροκυστίδια περνούν από δίοδο φωτεινής πηγής και ανάλογα με το μέγεθος και τη μορφή τους γίνεται σκέδαση του φωτός. Τα αντισώματα που αναφέραμε προηγουμένως έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν όταν συνδεθούν με την πρωτεΐνη την οποία ψάχνουμε. Έπειτα με το απαραίτητο λογισμικό το φως

μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Τα αποτελέσματα τα παίρνουμε σε μορφή ιστογράμματος. Στα αρνητικά χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι ότι δεν έχει μεγάλη ευαισθησία σε πολύ μικρά μικροκυστίδια. [140], [141]

Να αναφέρουμε ότι μερικά απο τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται σε διάφορα πρωτόκολλα προσδιορισμού μικροκυστιδίων στο πλάσμα είναι: η Ανεξίνη V η οποία συνδέεται με την PS, τα CD41, CD42, CD61 και CD 62 χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση MP αιμοπεταλικής προέλευσης, τα CD235 για τα MP ερυθροκυτταρικής προέλευσης ενώ τα CD45 και CD144 για τα MP που προέρχονται απο λευκά αιμοσφαίρια και ενδοθηλιακά κύτταρα αντίστοιχα. [142], [143], [144], [145]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: Οι λειτουργίες των μικροκυστιδίων σε διαφορετικές διαταραχές

7.1 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στην αιμόσταση και τη θρόμβωση

Στα φυσιολογικά κύτταρα, τα φωσφολιπίδια κατανέμονται διαφορετικά στην κάθε στιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με τα ανιονικά φωσφολιπίδια (PS και PE) να βρίσκονται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα στην εσωτερική. Έτσι, κατά τον σχηματισμό των MPs, η ασυμμετρία της κατανομής της χάνεται και τα ιοντικά φωσφολιπίδια μετακινούνται στην εξωτερική στιβάδα του MP [19]. Πρακτικά, με την παρουσία των PS αυξάνεται η προπηκτική-προθρομβωτική δράση των MPs, διότι διεθκολύνεται η συσσώρευση των συστατικών του καταρράκτη πήξης. Αυτό προκύπτει από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ανάμεσα στις θετικά φορτισμένες περιοχές του γ-καρβοξυγλουταμινικού οξέος (GLA) των πρωτεϊνών της πήξης και των PS που έχουν μεταφερθεί στη μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες πήξης σε περιοχές GLA περιλαμβάνουν του παράγοντες VII, IX, X και την προθρομβίνη. Η παρουσία των PS στην επιφάνεια των MPs ανιχνεύεται μέσω της κυτταριμετρίας ροής. Μετά την ενεργοποίηση, τα αιμοπετάλια παράγουν PS+ MPs και PS- MPs [107].

7.2 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στη εξέλιξη και τη διάγνωση του καρκίνου

Τα κυστίδια μπορεί να έχουν σύνθετους ρόλους σε διάφορες ασθένειες, όμως αυτό έχει μελετηθεί κυρίως σε διάφορες μορφές καρκίνου. Όπως και σε

διάφορες διαταραχές, ο βασικός ρόλος των MPs με προέλευση από καρκινικά κύτταρα δείχνει να είναι καθοριστικός για την εξέλιξη των ασθενειών, σχεδόν σαν να αποτελούν τα βασικά της αιτία. Αναλυτικά, όταν εμφανίζεται καρκίνος, τα ογκογόνα μονοπάτια είναι αυτά που καθορίζουν την παραγωγή των MPs, ενώ οι ογκοπρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στο φορτίο των MPs. Επιπλέον, τα ογκογόνα μονοπάτια που φέρουν ιστικό παράγοντα μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή των MPs, συμβάλλοντας έτσι και σε διαταραχή της πήξης του αίματος που σχετίζεται με τον καρκίνο. Επίσης, οι υποδοχείς, τα αντιγόνα, τα βιοδραστικά μόρια και άλλα χαρακτηριστικά του φορτίου των MPs μπορούν να διεγείρουν την ανάπτυξη όγκων, την ανοσοανοχή, την αγγειογένεση και την μετάσταση του καρκίνου. Τα MPs μπορούν να έχουν ρόλους σε σχέση με την κατάσταση των ασθενών ακόμα και όταν δεν προέρχονται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, όπως συμβαίνει με τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά και τα φλεγμονώδη κύτταρα. Οι μοριακές πληροφορίες που περιέχονται στα MPs και που έχουν σχέση με τις διαδικασίες του καρκίνου μπορεί να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη, την πρόγνωση, και την παρακολούθηση του καρκίνου. Επομένως, τα MPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρατήρηση της γενετικής πορείας του όγκου, της αγγειογένεσης, της θρόμβωσης και της απόκρισης σε καθορισμένες θεραπείες [116]. Συνεπώς, δεν αποτελεί έκπληξη ότι έχουν αναγνωρισμένους ρόλους σε πολλές πτυχές του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της διαταραχής πήξης [117-121], της ενεργοποίησης της παραγωγής στρώματος κατά την ανάπτυξη του όγκου [122] [123], της εγκατάστασης των βλαστικών κυττάρων [124], της εισβολής, της αγγειογένεσης [125] [126] [128], της μετάστασης και της απόκρισης του ανοσοποιητικού [127] [130] [131] [133] [134]. Επιπρόσθετα, οι μοναδικές μοριακές ιδιότητες των MPs που κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά των καρκινοπαθών, υποδεικνύουν ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την άντληση πληροφοριών σε σχέση με την ασθένεια [131] [132] [133]. Αν και η ενδεχόμενη χρησιμότητα τους ως βιοδείκτες βρίσκεται ακόμα υπό

διερεύνηση, αξίζει να σημειωθεί ότι θα ήταν ωφέλιμο να υπάρχουν βιοδείκτες που θα μπορούσαν να ανταποκριθούν στις ανάγκες για εξατομικευμένη αντιμετώπιση του καρκίνου, καθώς και για διαγνωστική ακρίβεια και παρακολούθηση των αποτελεσμάτων των στοχευμένων θεραπειών.

Ωστόσο, πριν την έναρξη της συστηματικής χρήσης των MPs ως βιοδείκτες, απαιτείται η βαθύτερη κατανόηση τους. Υπάρχουν κρίσιμα ζητήματα που πρέπει να απαντηθούν, όπως η βιογένεση τους, οι βιολογικοί τους ρόλοι και η λειτουργική εμπλοκή τους στην παθογένεση των νόσων και του καρκίνου ειδικότερα. Στους ανθρώπους, ως πολυκύτταρους οργανισμούς, υπάρχουν διάφορες ομάδες κυττάρων που εκτελούν βιολογικές λειτουργίες. Απαιτείται συντονισμός των δράσεων τους, η οποία και επιτυγχάνεται μέσω της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας. Βάσει αυτού, έχει προταθεί ότι ειδικά μόρια ανταλλάσσουν σήματα με τους αντίστοιχους υποδοχείς (συγγενείς υποδοχείς). Πρόκειται για μια ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ των δύο πλευρών, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με την άμεση επαφή τους είτε μέσω της απελευθέρωσης μεσολαβητών, που κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά. Η δράση αυτών των μεσολαβητών μπορεί να είναι τοπική ή συστηματική. Οι πληροφορίες αυτών των μηνυμάτων μπορούν να ενεργοποιήσουν τα ενδοκυττάρια δίκτυα σηματοδότησης [135], σε μία ή δύο κατευθύνσεις [136], με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η συμπεριφορά των κυττάρων. Τέλος, κατά τις διαδικασίες αυτές, παρατηρείται άμεση πρόσληψη παραγόντων, ενζύμων και σωματιδίων, που μπορούν να προκαλέσουν αναδιατάξεις του ενδοκυτταρίου μηχανισμού [137] [138].

7.3 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στις καρδιαγγειακές νόσους

Σε πολλές μελέτες επικρατεί η άποψη ότι τα MPs είναι επιβλαβή και ότι συμβάλουν στην αύξηση του κινδύνου και στην εξέλιξη των καρδιαγγειακών νόσων [139]. Όμως, παρά τη δυνητικά επιβλαβή παρουσία τους, τα MPs μπορεί αν έχουν προστατευτική δράση απέναντι στις βλάβες των κυττάρων και των αγγείων. Επομένως, τόσο τα υψηλότερα όσο και τα χαμηλότερα επίπεδα μικροκυστιδίων που κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά μπορεί να σχετίζονται με τις καρδιαγγειακές νόσους και τους παράγοντες κινδύνου [2].

Παραδείγματος χάριν, το κάπνισμα αποτελεί έναν αναγνωρισμένο παράγοντα κινδύνου για τις καρδιαγγειακές νόσους και μπορεί να προκαλέσει αιμοστατικές, αιμοπεταλιακές και ενδοθηλιακές διαταραχές. Έτσι σε μία μελέτη που διερεύνησε αυτή την σχέση, βρέθηκε ότι παρόλο που τα επίπεδα αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων είναι χαμηλότερα σε νέους άνδρες (καπνιστές και μη) συγκριτικά με αυτά σε μη καπνιστές, ο αριθμός των κυκλοφορούντων EMPs ήταν μεγαλύτερος σε δείγματα αίματος από παθητικούς καπνιστές, ενώ η έκθεση σε καπνό αύξανε την απελευθέρωση των μικροκυστιδίων με κυτταρική ενεργοποίηση από TF. Αυτά τα ευρήματα καθιστούν σαφές ότι το κάπνισμα συμβάλλει στην απελευθέρωση μικροκυστιδίων, αν και αυτό μπορεί να εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων τη συγκέντρωση και τη διάρκεια έκθεσης [139].

Αξίζει να αναφερθεί ότι υψηλά επίπεδα αιμοπεταλιακών μικροκυστιδίων έχουν βρεθεί και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη 1 και 2, υπερλιπιδαιμία, παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο και υπέρταση. Σε μια έρευνα βρέθηκε ότι τα δείγματα πλάσματος από ασθενείς με χρόνια σοβαρή υπέρταση περιέχουν περισσότερα μικροκυστίδια από αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα σε σχέση με ασθενείς με ήπια ή καθόλου υπέρταση. Το υψηλό ποσοστό μικροκυστιδίων στο πλάσμα των ασθενών με υπέρταση μπορεί να αντανακλά το στρες των αιμοπεταλίων και των ενδοθηλιακών κύτταρων. Επίσης, βρέθηκαν περισσότερα μικροκυστίδια στο πλάσμα των υπερτασικών με λευκωματουρία,

μετανάστευση των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων και αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου από ενδοθηλιακά κύτταρα, γήρανση των κυττάρων και απόπτωση των μικροκυστιδίων συγκριτικά με αυτά που βρέθηκαν στο πλάσμα ασθενών με υπέρταση και νορμολευκωματινουρία. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν πως η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων έχει συμβολή στην εξελισσόμενη βλάβη του ενδοθηλίου, η οποία μπορεί να δημιουργήσει περισσότερες επιπλοκές που σχετίζονται με την υπέρταση. Οι υψηλές συγκεντρώσεις μικροκυστιδίων από διάφορα κύτταρα έχουν συσχετιστεί με την υποκλινική αθηροσκλήρωση, η οποία μετράται με το πάχος της έσω και μέσω καρωτίδας καθώς και τις αποτιτανώσεις στην στεφανιαία αρτηρία, με χρήση αξονικού τομογράφου. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι τα μικροκυστίδια που κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά συνδέονται άμεσα με την αναδιαμόρφωση της καρωτιδικής αρτηρίας, καθώς η υψηλή τους συγκέντρωση προλαμβάνει την αντισταθμιστική αναδιαμόρφωση με αυξημένο πάχος του έσω και μέσου χιτώνα της καρωτίδας. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα ποσοστά ενδοθηλιακών μικροκυστιδίων που εκθέτουν υποδοχείς T-cadherin είναι υψηλότερα σε ασθενείς με υποκλινική αθηροσκλήρωση σε σχέση με αυτά υγιών ατόμων και ασθενών με εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο, κάτι που υποδηλώνει πως η απόπτωση των T-cadherin-θετικών μικροκυστιδίων είναι ένας μηχανισμός προστασίας ο οποίος εξισορροπεί την κυτταρική αντίδραση στο στρες που επέρχεται από τα συστήματα σηματοδότησης, με τις φάσεις απόπτωσης και βλαβών να ακολουθούν. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η απελευθέρωση των μικροκυστιδίων μειώνει την ισχύ της αναδιαμόρφωσης της έξω αρτηρίας στην υποκλινική αθηροσκλήρωση. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την οριστική απόδειξη του αιτιολογικού ρόλου των μικροκυστιδίων στην αναδιαμόρφωση των αρτηριών [139].

Τα μικροκυστίδια θα μπορούσαν να αποτελούν δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου και να χρησιμοποιηθούν ως παράγοντες για την πρόγνωση των

καρδιαγγειακών νόσων, σύμφωνα με αναφορές για αιμοπεταλιακά, λευκοκυτταρικά, ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα. Σε μία μελέτη με δείγμα 488 ασθενών με διάφορους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές νόσους προστέθηκαν ενδοθηλιακά μικροκυστίδια (CD144 +) ως παράγοντες του μοντέλου κινδύνου Framingham. Αποτέλεσμα ήταν η βελτίωση της κατάταξης του κινδύνου και η ανάδειξη των μικροκυστιδίων ως σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νόσων σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Αυτό υποδηλώνει ότι αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των μικροκυστιδίων στην πρόγνωση για καρδιαγγειακές νόσους, καθώς δεν υπάρχουν πολλές έρευνες για το θέμα. Οι λόγοι πίσω από αυτή την έλλειψη ίσως είναι η πολυπλοκότητα της μέτρησης των μικροκυστιδίων, αλλά και οι δυσκολίες στην ανίχνευση και την αναγνώριση του είδους των μικροκυστιδίων λόγω του μικροσκοπικού μεγέθους και της ποικιλότητας τους [3] [4] [5] [139].

7.4 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στην αθηρογένεση

Υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση μικροκυστιδίων στο πλάσμα ασθενών με στεφανιαία νόσο [85]. Παρόλο που ο σχηματισμός των μικροκυστιδίων παρουσιάζεται ως απόπτωση των μικροκυστιδίων της μεμβράνης δυσλειτουργικών ECs, μπορούν επίσης να αποτελούν ένα κλινικό μονοπάτι που σχετίζεται με την ενεργοποίηση πολλών επανορθωτικών διεργασιών.

Παραδείγματος χάριν, έχει βρεθεί ότι η μυϊκή ισχαιμία οδηγεί στην εντατική παραγωγή των αποπτωτικών annexin V+ μικροκυστιδίων από τα ECs [86]. Τα μικροκυστίδια από ισχαιμικούς μύες οδηγούν σε μια ισχυρότερη διαφοροποίηση του μυελού των οστών από μονοπυρηνικά κύτταρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι παρόμοια με μικροκυστίδια από μη ισχαιμικά άκρα [86]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα μικροκυστίδια που

δημιουργούνται από την απόπτωση των ECs και τα ECs που ενεργοποιούνται από φλεγμονώδη παράγοντα επιταχύνουν την διαφοροποίηση των μονοπύρηνων κυττάρων (στον μυελό των οστών) και ενισχύουν τις ικανότητες τους στην αγγειογένεση ή νίνο [86]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με μια άλλη μελέτη [12], η υψηλή συγκέντρωση μικροκυστιδίων αποτελεί δείκτη πρόγνωσης για στεφανιαία νόσο, που μάλιστα ξεπερνά την ακρίβεια άλλων καταξιωμένων παραγόντων κινδύνου. Αυτές οι διαφορές μεταξύ των ευρημάτων μπορούν να αποδοθούν στην αδυναμία της MP-μεσολαβούμενης αγγειογένεσης να εξισορροπήσει την προοδευτική ισχαιμία και στην ύπαρξη άλλων, αγνώστων μηχανισμών οι οποίοι συνδέουν την εκβλάστηση των ECS με την αθηρογένεση.

Σε κάθε περίπτωση, η συμμετοχή των μικροκυστιδίων στην προθρομβωτική κατάσταση που συνδέεται με την στεφανιαία νόσο παραμένει πιθανή. Τα απελευθερωμένα μικροκυστίδια με αιμοπεταλιακή προέλευση δεσμεύονται από το ενδοθήλιο και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με στεφανιαία αθηροσκλήρωση [87]. Επιπρόσθετα, οι βλάβες του ενδοθηλίου που συμβαίνουν κατά τις διαδερμικές παρεμβάσεις έχουν σχέση με προσωρινή ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και την άμεση αποβολή PMPs (εντός 15 λεπτών), ιδίως σε ασθενείς που για χειρουργούνται για στεφανιαίες νόσους [88]. Η ίδια διαδικασία συμβαίνει ακόμα και σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αντιαιμοπεταλιακή θεραπεία και παρά την έλλειψη των παραδοσιακών δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων [88]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, κατά τον σχηματισμό PMP σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργεία για στεφανιαίες νόσους, φαίνεται ότι υπάρχει κάποιου είδους διαμεσολάβησης από αιμοπεταλιακούς GPIIb / IIIa υποδοχείς. Η έγχυση με αναστολείς των υποδοχέων αυτών εμποδίζει την απελευθέρωση των PMPs. Διαταραχές που σχετίζονται με μικροκυστίδια έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενείς με διαφορετική θέση πλάκας. Έχει βρεθεί ότι οι ασθενείς με

καρωτιδική πλάκα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση μεγάλων PMPs σε σύγκριση με άτομα χωρίς καρωτιδική αθηροσκλήρωση, ακόμα και όταν λαμβάνονται υπόψη οι παραδοσιακοί παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές νόσους [89]. Η υψηλή συγκέντρωση σε CD11a + και CD105+ μικροκυστίδια έχουν συνδεθεί με εσωτερική καρωτιδική αναδιαμόρφωση ακόμα και πριν την ανίχνευση της αθηροσκλήρωσης [90]. Η συγκέντρωση P1_{hi}Ps έχει συσχετιστεί με την παρουσία ενδοκράνιας στένωσης, παρότι δεν συνδέεται με την πρόβλεψη για υποκλινική επιδείνωση σε ασυμπτωματικά άτομα [91] [92].

Ακόμα, η απόπτωση των PVPs είναι αυξημένη σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο όταν έχει προηγηθεί αιμοπεταλιακή υπερ-αντιδραστικότητα [85] [93]. Σε περιπτώσεις ασθενών με αρτηριακή αποφρακτική αρτηριοσκλήρωση, τα PMPs τείνουν να αυξάνονται περισσότερο από χειρουργική παρέμβαση στα αγγεία, όπως και οι προφλεγμοωδείς κυτοκίνες IL6) [94]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η παραγωγή μικροκυστιδίων στο εσωτερικό των αθηρωματικών πλακών, κυρίως από λευκοκύτταρα [95]. Το γεγονός ότι υπάρχουν ανοσοσφαιρίνες που παραμένουν έγκλειστες στις αθηρωματικές πλάκες οι οποίες περιέχουν μικροκυστίδια δείχνει ότι τα μικροκυστίδια αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην ανοσοτροποποίηση. Το 90% των μικροκυστιδίων που περιέχουν ανοσοσφαιρίνη G είναι CD14+, γεγονός που υποδηλώνει ότι προέρχονται από μονοκύτταρα /μακροφάγα [96]. Αν και δεν είναι γνωστοί οι ακριβείς ρόλοι της αθηρωματικής πλάκας από την οποία προέρχονται τα μικροκυστίδια, τα ίδια τα μικροκυστίδια θα μπορούσαν να λειτουργούν ως αγγελιοφόροι στον μηχανισμό του συντονισμού μεταξύ των ανοσοποιητικών αποκρίσεων σε μια πλάκα. Ακόμα, τα μικροκυστίδια από αθηρωματικές πλάκες εκφράζουν το CD40 συνδέτη για την ενεργοποίηση των ECs και σχετίζονται με την ενίσχυση της ενδο-πλάκα νεοαγγείωσης, την εξέλιξη της αθηρωματικής πλάκας και την επιδείνωση της [96]. Επιπρόσθετα, κάποια είδη κυστιδίων προάγουν την φλεγμονή των αγγείων και την έκφραση των φλεγμονωδών κυτοκινών από τα ECs [97]. Αξίζει να αναφερθεί ότι, κατά

την απόπτωση των κυττάρων (κυρίως μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων), παράγονται μικροκυστίδια με προπηκτικό δυναμικό που έχουν εντοπιστεί σε σταθερές αθηρωματικές πλάκες [98]. Παρότι δεν έχει αποκλειστεί το ενδεχόμενο να βοηθούν στην αθηρογένεση και την προθρόμβωση, η πλεονότητα των στοιχείων δείχνει ότι τα μικροκυστίδια έχουν άμεση σχέση με την δημιουργία παθοφυσιολογικών καταστάσεων.

7.5 Η λειτουργία των μικροκυστιδίων στις φλεγμονές

Όπως συμβαίνει και με την πήξη του αίματος, η φλεγμονώδης αντίδραση περιλαμβάνει διεργασίες οι οποίες προάγουν την παθογένεση της αγγειακής αθηροθρομβωτικής ασθένειας [26]. Οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης και άλλων δεικτών φλεγμονής στο πλάσμα διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για σακχαρώδη διαβήτη, μεταβολικό σύνδρομο, χρόνια συστηματική φλεγμονώδη νόσο, ρευματοειδή αρθρίτιδα κá [26] [27].

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων εμφανίζεται η εμπλοκή των μικροκυστιδίων στη φλεγμονή [3] [5]. Παραδείγματος χάριν, η έκφραση των προ-φλεγμονωδών γονιδίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα από μικροσωματίδια λευκοκυτταρικής προέλευσης, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών και λευκοκυτταρικών-ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης κυττάρου [28]. Παράλληλα, μικροσωματίδια σε πλάσμα ασθενών με αυξημένο κίνδυνο εκθέτουν C1q, C3 και C4, καθώς και αυξημένα μόρια ενεργοποιητών σε πλάσμα από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου [29] [30]. Ωστόσο, δεν αποκλείεται και η ευεργετική τους λειτουργία στην φλεγμονή. Τα μικροσωματίδια που προέρχονται από πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα έχουν αντιφλεγμονώδη πρωτεΐνη Annexin 1, η οποία περιέχεται και σε μικροκυστίδια τα οποία εμποδίζουν την

αλληλεπίδραση ανάμεσα στα λευκοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα in vitro [31]. Επομένως, τα μικροσωματίδια παίζουν ρόλο τόσο σε προφλεγμονώδεις όσο και σε αντιφλεγμονώδεις διεργασίες, με αποτέλεσμα την εξασφάλιση της κατάλληλης φλεγμονώδους απόκρισης [31].

Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, η αύξηση γνώσεων για το αίμα, η ανάπτυξη των μεθόδων μετάγγισης και η εξέλιξη του ιατρικού εξοπλισμού έχουν καθιερώσει την αιμοδοσία στην ιατρική. Παράλληλα, πλήθος επιστημονικών κλάδων έχει αποπειραθεί να μελετήσει τα παράγωγα του, ιδιαίτερα δε το πλάσμα και τις πραγματικές και δυνητικές εφαρμογές του. Πέρα από την παρασκευή, τη συντήρηση και τη χρήση του φρέσκου κατεψυγμένου πλάσματος, το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών έχει εστιάσει στα μικροκυστίδια. Η έρευνα έχει αναδείξει σημαντικές πληροφορίες για την προέλευση τους, τα διάφορα είδη τους και μερικούς σημαντικούς μηχανισμούς με τους οποίους εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών. Συγκεκριμένα, παρά το πλήθος αναφορών που συσχετίζουν την παραγωγή διαφόρων τύπων μικροκυστιδίων με επιβραβή αποτελέσματα για την υγεία, υπάρχουν αναφορές για την παρουσία και το ρόλο τους τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε υποκλινικές και παθολογικές καταστάσεις. Μερικές από αυτές περιλαμβάνουν την εμπλοκή της στην αιμόσταση και τη θρόμβωση, τον καρκίνο, τις καρδιαγγειακές νόσους, την αθηρογένεση και τις φλεγμονές. Ενώ πολλές φορές η παρουσία τους αιτιολογείται ως το αποτέλεσμα της κυτταρικής απόπτωσης, άλλες έρευνες συνδέουν τα μικροκυστίδια με ένα σύμπλεγμα μηχανισμών του οργανισμού, υποδηλώνοντας έτσι ότι θα μπορούσαν να συναποτελούν αιτιολογικούς ή εξισορροπητικούς παράγοντες για παθολογικές καταστάσεις. Επιπλέον, τα μικροκυστίδια έχουν συνδεθεί με την εξέλιξη των ασθενειών καθώς και με την πρόγνωση τους, δεδομένου ότι τα αυξημένα επίπεδα τους στο πλάσμα του αίματος θα μπορούσε να αποτελέσουν προγνωστικούς δείκτες για διάφορες ομάδες πληθυσμού. Παρά τα ενθαρρυντικά ευρήματα, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα, κυρίων λόγω των

δυσκολιών της ανίχνευσης και ταυτοποίησης τους, που δεν συμβάλλουν στην εξαγωγή ασφαλών και σαφών συμπερασμάτων. Επομένως, είναι εύλογο να καταβληθούν προσπάθειες για την βαθύτερη κατανόηση της ύπαρξης και των λειτουργιών τους, προκειμένου να αποτελέσουν ένα ασφαλές και χρήσιμο επιστημονικό εργαλείο .

Βιβλιογραφία

1. Wood CS. A short history of blood transfusion. *Transfusion*. 1967 Jul-Aug;7(4):299-303.
2. Boskovic S. History of blood transfusion. *Med Arh*. 1974 May-Jun;28(3):347-52. Serbian.
3. Hosgood G. Blood transfusion: a historical review. *J Am Vet Med Assoc*. 1990 Oct 15;197(8):998-1000.
4. Garraud O, Lefrere JJ. Blood and blood-associated symbols beyond medicine and transfusion: far more complex than first appears. *Blood Transfus*. 2014 Jan;12(1):14-21.
5. Learoyd P. The history of blood transfusion prior to the 20th century-part 1. *Transfus Med*. 2012 Oct;22(5):308-14.
6. Giangrande PL. The history of blood transfusion. *Br J Haematol*. 2000 Sep;110(4):758-67.
7. Hadju SI. Blood transfusion from antiquity to the discovery of the Rh factor. *Ann Clin Lab Sci*. 2003 Fall;33(4):471-3.
8. Maltseva Iu. History of blood transfusion. *Sov Zdravookhr*. 1985;(4):71-3. Russian.
9. Braibe HG. The historical basis of transfusion and oncologic practice. *Semin Oncol Nurs*. 1990 May;6(2):91-8.
10. Izaguirre Avila R, de Micheli A. History of blood transfusion. *Rev Invest Clin*. 2002 Nov-Dec;65(6):663-8.
11. Bird GW. The history of blood transfusion. *Injury*. 1971 Jul;3(1):40-4.
12. Miura A.B. [History of blood transfusion-development and future of blood transfusion in Japan]. *Nihon Rinsho*. 1997 Sep;55(9):2189-94.
13. Farley A, Hendry C, McLafferty E. Blood components. *Nurs Stand*. 2012 Nov 28-Dec 4;27(13):35-42.

14. Shorthouse J, Wilson S. Use of blood components in clinical practice. *Nurs Stand.* 2019 Oct 24;34(11):76-82.
15. Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality Assessment of Established and Emerging Blood Components for Transfusion, *J Blood Transfus.* 2016;2016:4860284.
16. Offner PJ. Age of blood: does it make a difference?. *2004 Crit Care* 8, S24
17. Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, Lindhout T, Curvers J. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol.* 2006 Aug;134(3):307-13.
18. Kriebardis AG, Antonelos MH, Georgatzakou HT, Tozunakas VL, Stamoulis KE, Papassideri IS. Microparticles variability in fresh frozen plasma: preparation protocol and storage time effects. *Blood Transfus.* 2016 May;14(2):228-37.
19. Chan KS, Sparrow RL. Microparticle profile and procoagulant activity of fresh frozen plasma is affected by whole blood leukoresuction rather than 24-hour room temperature hold. *Transfusion.* 2014 Aug;54(8):1935-44.
20. Lamboo M, Poland DC, Eikenboom JC, Harvey MS, Groot E, Brand A, de Vries RR. Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage at different temperatures. *Transfus Med.* 2007 Jun;17(3):182-6.
21. Carson JL, Guyatt G, Heddle NM, Grossman BJ, Cohn CS, Funk MK, Gernsheimer T, Holcomb JB, Kaplan LJ, Katz LM, Peterson N, Ramsey G, Rao SV, Roback JD, Shander A, Tobian AA. Clinical Practice Guidelines From the AABB: Red Blood Cell Transfusion Thresholds and Storage. *JAMA.* 2016 Nov 15;316(19):2025-2035.
22. Naghadeh HT, Roydkenar MH. A study of the quantity of some stable and labile coagulation factors in fresh-frozen plasma produced from

- whole blood stored for 24 hours in Iran. *Blood Transfus.* 2009 Jan;7(1):39-42.
23. Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, Cookson P, Baumann-Baretti B, Cancelas JA, Devine D, Gulliksson H, Vassallo R, de Wildt-Eggen J. Coagulation factor content of plasma produced from whole blood stored for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. *Transfusion.* 2011 Jan;51 Suppl:50S-57S.
24. Noordin SS, Karim FA, Mohammad WMZBW, Hussein AR. Coagulation Factor Activities Changes Over 5 Days in Thawed Fresh Frozen Plasma Stored at Different Initial Storage Temperatures. *Indian J Hematol Blood transfus.* 2018 Jul;34(3):510-516.
25. Luimbruni G, Bennardello F, Lattanzio A, Piccoli P, Rossetti G; Italian Society of Transfusion Medicine and Immunoheamatology (SIMTI) Work Group. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets. *Blood transfus.* 2009 Apr;7(2):132-50.
26. US Food and Drug Administration. Guidance for industry. An acceptable circular of information for the use of human blood and blood components; 12 September 2003.
27. Raster J, Zimmermann K, Wesche J, Aurich K, Greinacher A, Selleng K. Effect of Methylene Blue Pathogen Inactivation on the Integrity of Immunoglobulin M and G. *Transfus Med Hemother.* 2021 May;48(3):148-153.
28. Van der Meer PF. Platelet additive solution: a future perspective. *Transfus Clin Biol.* 2007 Dec;14(6):522-5
29. Khawar H, Kelley W, Stevens JB, Guzman N. Fresh Frozen Plasma (FFP). 2020 Oct19. In: *StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.*

30. De Backer D, Vandekerckhove B, Stanworth S, Williamson L, Hermans C, Van der Linder P, Hubner R, Baele P, Jochmans K, Ferrant A, Lambermont M, Muylle L, Toungouz M. Guidelines for the use of fresh frozen plasma. *Acta Clin Belg*. 2008 Nov-Dec;63(6):381-90.
31. Salem N Jr, Lauter CJ, Trams EG. Selective chemical modification of plasma membrane ectoenzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Mar 6;641(2):366-76.
32. Blight GD, Morgan EH. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and ferritin by guinea-pig reticulocytes. Uptake by a common endocytic pathway. *Eur J Cell Biol*. 1987 Apr;43(2):260-5.
33. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985 Sep;101(3):942-8.
34. Potts KS, Farley A, Dawson CA, Rimes J, Biben C, de Graaf C, Potts MA, Stonehouse OJ, Carmagnac A, Gangatirkar P, Josefsson EC, Anttila C, Taoudi S. Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis. *J Exp Med*. 2020 Sep 7;217(9):e20191206.
35. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRcIII by microvesicles derived from tumor cells. *Nat Cell Biol*. 2008 May;20(5):619-24.
36. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Archer J, Hatch SC, Erkizia I, Blanco J, Borrow FE, Puertas MC, Connor JH, Fernandez-Figueras MT, Moore L, Clotet B, Gummuluru S, Martinez-Picado J. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2732-41.
37. Kleijmeer MJ, Morkowski S, Griffith JM, Rudensky AY, Geuse HJ. Major histocompatibility complex class II compartments in human and

- mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol.* 1997 Nov 3;139(3):639-49.
38. Konokhova AI, Chernova BN, Moskalensky AE, Strokotov DI, Yurkin MA, Chernyshev AV, Maltsev VP. Super-resolved calibration-free flow cytometric characterization of platelets and cell-derived microparticles in platelet-rich plasma. *Cytometry A.* 2016 Feb;89(2):159-68.
39. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Apr;19(4):213-228.
40. Chen CL, Lin TS, Tsai CH, Wu CC, Chung T, Chien KY, Wu M, Chang YS, Yu JS, Chen YT. Identification of potential bladder cancer markers in urine by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics. *J Proteomics.* 2013 Jun 24;85:28-43.
41. Baroni M, Pozzirani C, Pinotti M, Ferrari D, Adinolfi E, Calzavarini S, Caruso P, Bernardi F, Di Virgilio F. Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB J.* 2007 Jun;21(8):1926-33.
42. Kahner BN, Dorsam RT, Kanapuli SP. Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:433-9.
43. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus Am Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug;68(16):2667-88.
44. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
45. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode. *Caenorhabditis elegans.* *Dev Biol.* 1977 Mar;56(1):110-56.

46. Ficxsen W, Sternberg P, Ellis H, Horvitz R. Genes that affect cell fates during the development of *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1985;50:99-104.
47. 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 Nov;104(9):2761-6.
48. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol. 2010 Jan;6(1):21-9.
49. Bellone M, Lezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, Protti MP, Davoust J, Rugarli C, Manfredi AA. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. J Immunol. 1997 Dec 1;59(11):5391-9.
50. Cocca BA, Cline AM, Radic MZ. Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. J Immunol. 2002 Jun 1;169(1):159-66.
51. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. Br J Haematol. 1967 May;13(3):269-88.
52. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat Rev Immunol. 2009 Aug;9(8):581-93.
53. Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. Cell Microbiol. 2011 Jan;13(1):1-9.
54. Razoosky BS, Obermayer B, O'May JB, Tarakhovsky A. Viral Infection Identifies Micropeptides Differentially Regulated in smORF-Containing lncRNAs. Genes (Basel). 2017 Aug 21;8(8):206.
55. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. J Biol Chem. 1990 Mar 5;265(7):3809-14.

56. Barbalato L, Pillarisetty LS. Histology, Red Blood Cell. 2021 May 10. In: StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan.
57. Salzer U, Zhu R, Luten M, Osibe H, Pastushenko V, Perkmann T, Hinterdorfer P, Bosman GJ. Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion*. 2008 Mar;48(3):451-62.
58. Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotny VM, Bos H, De Grip WJ. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage on blood bank conditions. *Transfusion*. 2008 May;48(5):L827-35.
59. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, Ecomomou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. RBC-derived vesicles during storage: ultrastructure, protein composition, oxidation and signaling components. *Transfusion*. 2008 Sep;48(9):1943-53.
60. Wagner GM, Chiu DT, Qiu JH, Heath RH, Lubin BH. Spectrin oxidation correlates with membrane vesiculation in stored RBCs. *Blood*. 1987 Jun;69(6):1777-81.
61. Hess JR, Grazzini G. Blood proteomics and transfusion safety. *J Proteomics*. 2010 Jan 3;73(3):365-7.
62. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009 Jan 29;113(5):1112-21.
63. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Jan;6(1):21-9.
64. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarottu EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM. Platelets Amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010 Jan 29;327(5965):580-3.

65. Li X, Cong H. Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome. *Tex Heart Inst J*. 2009;36(2):134-9.
66. Salanova B, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC, Kettritz R. Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. *J Biol Chem*. 2007 AAep 21;282(38):27960-9.
67. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009 Mar;101(3):439-51.
68. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Dec;26(12):2594-604.
69. Sato Y, Bando H, Di Piazza M, Gowinf G, Herberts C, Jackman S, Leoni G, Libertini S, MacLachlan T, McBlane JW, Pereira Mouries L, Sharpe M, Shingleton W, Surmacz-Cordle B, Yamamoto K, Van der Laan JW. Tumorigenicity assessment of cell therapy products: The need for global consensus and points to consider. *Cytotherapy*. 2019 Nov;21(11):1095-1111.
70. Mackman N, Tiller RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug;27(8):1687-93.
71. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *An J Pathol*. 1989 May;134(5):1087-97.
72. Giesen Pl, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JTm Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue

- factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Mar 2;96(5):2311-5.
73. Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhamo-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2764-70.
74. Osterud B, Breimo ES, Olsen JO. Blood borne tissue factor revisited. *Thromb Res*. 2008;122(3):432-4.
75. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boin AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001 Apr;85(4):639-46.
76. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Gilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4545-53.
77. Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, Wang JG, Hyrien O, Hathcock J, Mackman N, Taubman MB. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost*. 2008 Nov;6(11):1983-5.
78. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linder IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis?. *J Thromb Haemost*. 2007 Mar;5(3):520-7.
79. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, Francis CW, Hruban RH, Hu YC, Hostetter G, Harvey J, Taubman MB. Tissue factor expression, angiogenesis and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 May 15;13(10):2870-5.
80. Johnson GJ, Leis LA, Bach RP. Tissue factor activity of blood mononuclear cells is increased after total knee arthroplasty. *Thromb Haemost*. 2009 Oct;102(4):728-34.

81. Chotanaphuti T, Ongnamthip P, Siplipat S, Foojareonyos T, Roschan S, Reumthantanh A. The prevalence of thrombophilia and venous thromboembolism in total knee arthroplasty. *J Med Assoc Thai*. 2007 Jul;90(7):1342-7.
82. Shet AS. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Manag*. 2008;4(4):769-74.
83. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jan;31(1):27-33.
84. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jan;26(1):112-6.
85. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddacrt J, London GM, Tedgui Am Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Nov;16(11):3381-8.
86. Mallat Z, Benamer H et al (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101(8):841-843.
87. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension*. 2003 Feb;41(2):211-7.
88. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *An J Respir Crit Care Med*. 2008 Jun 1;177(11):1268-75.

89. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan;335(1):143-51.
90. Valadu H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
91. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 2010 May 15;123(10):1603-11.
92. Boilard E, Duchez AC, Brisson A. The diversity of platelet microparticles. *Curr Opin Hematol.* 2015 Sep;22(5):437-44.
93. Stahl AL, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology and renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 2019 Jan;34(1):11-30.
94. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Aug 18;1439(3):317-30.
95. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005 Feb;20:22-7.
96. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev.* 2006 Jan;20(1):1-26.
97. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Nov;36(8):807-18.
98. Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res.* 2011 May 13;108(10):1284-97.

99. Key NS, Mackman N. Tissue factor and its measurement in whole blood plasma and microparticles. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Nov;36(8):865-75.
100. Morel O, Jesel L, Freyssiner JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):15-26.
101. Hisada Y, Mackman N. Tissue Factor and Extracellular Vesicles: Activation of Coagulation and Impact on Survival in Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Jul 30;13(15):3839.
102. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bioschoff P, Lill H, Pasqiali JL, Freyssinet JM. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1546-54.
103. Van Dreden P, Rousseau A, Savoure A, Lenormand B, Fontaine S, Vasse M. Plasma thrombomodulin activity, tissue factor activity and high levels of circulating procoagulant phospholipids as prognosis factors for acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009 Dec;20(8):635-41.
104. Strasser EF, Happ SM, Weiss DR, Pfeiffer A, Zimmermann R, Eckstein R. Microparticle detection in platelet products by three different methods. *Transfusion.* 2013 Jan;53(1):156-66.
105. Pigault C, Follenius-Wund A, Schmytz M, Freyssinet JM, Brisson A. Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *J Mol Biol.* 1994 Feb 11;236(1):199-208.
106. Van Dreden P, Rousseau A, Fontaine S, Woodhams BJ, Exner T. Clinical evaluation of a new functional test for detection of plasma procoagulant phospholipids. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2009 Oct;20(7):494-502.

107. Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS. Platelet microparticles are heterogenous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A*. 2007 Jan;71(1):38-45.
108. Del Turco S, De Caterina R. Biology and physiopathology of tissue factor and its relevance for cardiovascular diseases. *Ital Heart J Suppl*. 2003 Jul;4(7):559-68.
109. Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*. 1995 Jul;74(1):90-3.
110. Butenas S, Orfeo T, Mann JG. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Tromb Biol*. 2009 Dec;29(12):1989-96.
111. Krudysz-Amblo J, Jennings ME 2nd, Mann KG, Butenas S. Carbohydrates and activity of natural and recombinant tissue factor. *J Biol Chem*. 2010 Jan 29;285(5):3371-82.
112. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Mar;26(3):456-61.
113. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ryf W, Hogg PJ. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry*. 2006 Oct 3;45(39):12020-8.
114. Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Ding W, Wang F. Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. *Acta Histochem*. 2013 Sep;115(7):692-7.
115. Leiva O, Newcomb R, Connors JM, Al-Samkari H. Cancer and thrombosis: new insights to an old problem. *J Med Vasc*. 2020 Nov;45(6S):6S8-6S16.
116. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Nov;36(8):888-906.
117. Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Mar;22(1):61-9.

118. Lawrie AS, Harrison P, Cardigan RA, Mackie IJ. The characterization and impact of microparticles on haemostasis within fresh-frozen plasma. *Vox Sang.* 2008 Oct;95(3):197-204.
119. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Botzer AM, Carvalho AC. Tumor shedding and coagulation. *Science.* 1981 May 22;212(4497):923-4.
120. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005 Sep 1;106(5):1604-11.
121. Doeuvre L, Angles-Cano E. Cell-derived microparticles unveil their fibrinolytic and proteolytic function. *Med Sci (Paris).* 2009 Jan;25(1):37-44.
122. Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Lung cancer secreted microvesicles: underestimated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer.* 2009 Oct 1;125(7):1595-603.
123. Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS, Allison AC, Rak J. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Mar 10;106(10):3794-9.
124. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitilo V, Freyssinet JM, Kunzelmann C. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblast and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):785-93.
125. Angelucci, Adriano & D'Ascenzo, Sandra & Festuccia, Claudio & Gravina, Giovanni & Bologna, Mauro & Dolo, Vincenza & Pavan, Antonio. Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis.* 2012, 18:163-170.

126. Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, Zoller M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Res.* 2006 Jul 15;66(14):7083-94.
127. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Guisti I, Marchetti D, Borsotti P, Millimaggi D, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia.* 2006 Feb;8(2):96-103.
128. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtos L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005 Feb 20;113(5):752-60.
129. Hao S, Ye Z, Li F, Meng Q, Qureshi M, Yang J, Xiang J. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol.* 2006 Jun;28(2):126-31.
130. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006 Sep;20(9):1487-95.
131. Mukherjee J, DeSouza LV, Micallef J, Karim Z, Croul S, Siu KW, Guha A. Loss of collapsin response mediator Protein1, as detected by iTRAQ analysis, promotes invasion of human gliomas expressing mutant EGFRvIII. *Cancer Res.* 2009 Nov 15;69(22):8545-54.
132. Kimura Y, Simuyoshi M, Baba K. Antitumor activities of synthetic and natural stibenes through antiangiogenic action. *Cancer Sci.* 2008 Oct;99(10):2083-96.
133. Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote

- tumor growth and provide diagnostic markers. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1470-6.
134. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, They C, Masurics C, Flament C, Pouziex S, Faure F, Tursz T, Avgerin E, Amigorema S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001 Mar;7(3):297-303.
135. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jul;7(7):505-16.
136. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):355-65.
137. Pawson T. Protein module and signalling networks. *Nature.* 1995 Feb 16;373(6515):573-80.
138. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulier KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerated lung tumor growth. *Nea Med.* 2010 Feb;16(2):219-23.
139. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007 May;21(3):157-71.
140. Szatanek S., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Sieldar M., Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles characterization. *International Journal of Molecular Science.* 2017, 18, 1153.
141. Gomes J., Lucien F., Cooper T., Kim Y., Williams K., Liao XY., et al. Analytical considerations in Nanoscale flow cytometry of extracellular vesicles to achieve data linearity. *Thromb Haemost.* 2018 July.

142. Shah M., Bergeron A., Dong JF., Lopez J. Flow cytometric measurement of microparticles: Pitfalls and protocol modifications. *Platelets*, 2008;19:5, 365-372.
143. Dziechciowski M., Zapala B., Skotniczny K., Gawlink., Pawlina-Gosiawska D., Piwowar M., Balajewicz-Nowak M., Basta P., Solnica B., Pitynski K. Diagnostic and prognostic relevance of microparticles in peripheral and uterine blood of patients with endometrial cancer. *VIA MEDICA* 2018, VOL89;12, 682-687.
144. Boilard E., Ducher AC., Brisson A. The diversity of platelet microparticles. *Current opinion*. 2015.
145. Chandler WL., Yeung W., Tait JF. A new microparticle size calibration standards for use in measuring microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost* 2011;9;1216-24.