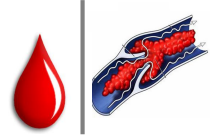




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΓΙΣΕΩΝ

Διπλωματική Εργασία

«Μικροσωματίδια και Λεμφοϋπερπλαστικά Νοσήματα»

ΟΝΟΜΑ : ΓΕΩΡΓΙΑ ΛΕΒΕΤΑ

Αριθμός Μητρώου: 20181408

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ : ΣΕΡΕΝΑ ΒΑΛΣΑΜΗ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνηση της. Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Σερένα Βαλσάμη, για την ανάθεση του θέματος, την ουσιαστική υποστήριξη και τις εποικοδομητικές της υποδείξεις κατά τον σχεδιασμό και την ολοκλήρωση της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ την Καθηγήτρια κ. Μαριάννα Πολίτου και τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την συμβολή τους ως μελών της τριμελούς επιτροπής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροσωματίδια (MPs) είναι μικρά εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) που απελευθερώνονται από τα κύτταρα ως απάντηση στην ενεργοποίηση ή την απόπτωση. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία και στον αιμοστατικό μηχανισμό. Τα MPs αποτελούν ευαίσθητους βιοδείκτες σε διάφορες ασθένειες και νοσήματα λόγω της μεγάλης ποσότητας τους. Τα νεοπλασματικά νοσήματα του αίματος είναι μία ετερογενής ομάδα διαταραχών που περιλαμβάνει τα Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, τα Μυελουϋπερπλαστικά νοσήματα, τις Λευχαιμίες, και το Πολλαπλό μύελωμα. Τα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (LPD) είναι νεοπλάσματα των B, T και NK λεμφοκυττάρων και αποτελούν όγκους από ανώριμα και ώριμα B, T και NK λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται σε διάφορα στάδια της διαφοροποίησής τους. Ο ρόλος των EVs στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL) έχει αναδειχθεί από μελέτες, όπου αποδεικνύεται ότι τα λευχαιμικά κύτταρα μέσω της έκκρισης των EVs χρησιμοποιούν τα συστατικά του BM για να δημιουργήσουν μια "λευχαιμική φωλιά" με σκοπό να υποστηρίξουν και να προάγουν την εξέλιξη της νόσου. Έχει αποδειχθεί ότι τα προερχόμενα EVs από CLL κύτταρα είναι αφενός αυξημένα, έχουν υψηλή έκφραση των CD19+, CD37+, CD52+ και RTK+ δεικτών, μπορούν να καθορίσουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και να προάγουν την επιβίωση των CLL κυττάρων μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αναφορικά με τον ρόλο των EVs στο HL λέμφωμα, μέσω ανάλυσης μονοπατιών νοημοσύνης, εντοπίστηκαν φλεγμονώδεις οδοί, ως βασικοί παράγοντες που κατευθύνουν τις εξαρτώμενες από τα EVs αλλαγές φαινοτύπου στους ινοβλάστες. Στο NHL και ιδιαίτερα στο DLBCL που είναι ο συχνότερος τύπος NHL, αναδεικνύεται ότι τα EVs είναι σημαντικά στη διάγνωση, πρόγνωση και διαχείριση του DLBCL. Ο αριθμός των LCEVs και οι επιφανειακοί δείκτες που απομονώθηκαν από ασθενείς με NHL είναι εμπλουτισμένοι στα CD19 και CD20, ενώ στους ασθενείς με HL στο CD30. Αναδεικνύεται ο ρόλος των EVs στο ΠΜ, ενισχύοντας την έκφραση των CXCR4 και MMP9, αναστέλλοντας τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και τη δραστικότητα της κασπάσης-3,

υποστηρίζοντας την ωρίμανση των οστεοκλαστών, συμμετέχοντας στην αγγειογένεση και επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των μυελοειδών κατασταλτικών κυττάρων.

Σε εξέλιξη βρίσκονται περαιτέρω μελέτες για τους μοριακούς μηχανισμούς έκκρισης και διακίνησης των EVs, οι τυπικές μέθοδοι απομόνωσης και τέλος οι επιλεκτικές μέθοδοι για τον ειδικό προσδιορισμό της προέλευσης τους.

Τέλος, η ολοένα αυξανόμενη άποψη για τον τρόπο με τον οποίο τα EVs επηρεάζουν την συμπεριφορά των κυττάρων-στόχων συνεχίζει να αποκαλύπτει νέες ευκαιρίες για θεραπευτική παρέμβαση στον καρκίνο.

Λέξεις κλειδιά: μικροσωματίδια, εξωκυττάρια κυστίδια, εξωσώματα, αποπτωτικά σωματίδια, νεοπλασίες, αιματολογικές κακοήθειες

ABSTRACT

Microparticles (MPs) are small extracellular vesicles (EVs) released from cells in response to activation or apoptosis. They play an important role in intercellular communication and the hemostatic mechanism. MPs are sensitive biomarkers in various diseases and conditions due to their high abundance. Blood neoplastic diseases are a heterogeneous group of disorders that include Lymphoproliferative diseases, Myeloproliferative diseases, Leukaemias, and Multiple myeloma. Lymphoproliferative diseases (LPDs) are neoplastic diseases of B, T and NK lymphocytes and comprising tumors of immature and mature B, T and NK lymphocytes developed in different stages of their differentiation. The role of EVs in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) has been highlighted by studies, demonstrating that leukemic cells through the secretion of EVs use BM components to form a "leukemic nest" to support and promote disease progression. It is proven that CLL cell-derived EVs are increased, have high expression of CD19+, CD37+, CD52+ and RTK+ markers, can define the bone marrow

microenvironment and promote CLL cell survival through various mechanisms . As regards of EVs role in HL lymphoma, through pathway intelligence analysis, inflammatory pathways were identified as key factors directing EV-dependent phenotype changes in fibroblasts. In NHL and particularly in DLBCL, which is the most common type of NHL, shows that EVs are important in the diagnosis, prognosis and management of DLBCL. The number of LCEVs and surface markers isolated from NHL patients are enriched in CD19 and CD20 and in HL patients in CD30. Highlighting the role of EVs in PM by enhancing the expression of CXCR4 and MMP9, inhibiting apoptotic cell death and caspase-3 activity, supporting osteoclast maturation, participating in angiogenesis, and inducing the proliferation of myeloid suppressor cells.

Further studies on the molecular mechanisms of secretion and trafficking of EVs, standard isolation methods and finally selective methods for the specific identification of their origin are in progress.

Finally, the growing understanding of how EVs influence the behaviour of target cells continues to reveal new opportunities for therapeutic intervention in cancer.

Key words: Extracellular vesicle (EV), Exosome, Hematological malignancies, Leukemia, Lymphoma, Multiple myeloma

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	14
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ.....	17
1.1 Αιμόσταση.....	17
1.2 Ο μηχανισμός της αιμόστασης.....	18
1.2.1 Πρωτογενής αιμόσταση.....	18
1.2.2 Δευτερογενής αιμόσταση	21
1.2.3 Αναστολείς του μηχανισμού της πήξης.....	26
1.2.4 Ινωδόλυση	27
1.3 Αιμορραγική διάθεση	31
1.4 Θρόμβωση - Θρομβοφιλική Διάθεση.....	42
1.5 Παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση	42
1.6 Θρομβοφιλία.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΛΕΜΦΟΎΠΕΡΠΛΑΣΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	51
2.1 Νεοπλάσματα των Β-λεμφοκυττάρων και διαταραχές των Β- λεμφοκυττάρων.....	52

2.2 Λεμφώματα από T και NK λεμφοκύτταρα.....	54
2.3 Λέμφωμα Hodgkin's	55
2.4 Ειδικές κατηγορίες λεμφωμάτων.....	56
2.5 Νεοπλάσματα πλασματοκυττάρων.....	57
2.6 Παιδιατρικές λεμφικές νεοπλασίες.....	58
Κεφάλαιο 3.: ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ.....	61
3.1 Εισαγωγικά.....	61
3.2 Γενικά περί μικροσωματιδίων-εξωσωμάτων-αποπτωτικών σωματίων	62
3.3 Προέλευση, Σύσταση και Δράση των MPs.....	65
3.4 Σχηματισμός (βιογένεση) εξωσωμάτων και μικροσωματιδίων.....	74
3.4.1 Κάθαρση μικροσωματιδίων [MP clearance]	80
3.5 Σχηματισμός μικροσωματιδίων από ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα (EMP)	82
3.6 Επιδράσεις των MPs στην αγγειακή φυσιολογία και ο ρόλος τους.....	86
3.7 Οξειδωτικό στρες	98
3.8 Φλεγμονή.....	102
3.9 Αγγειογένεση.....	103
3.10 Απόπτωση.....	104
3.11 Κατασταλτική επίδραση των EVs στο ανοσοποιητικό σύστημα	104
3.12 Καρκίνος.....	105
3.12.1 Η σημασία των EVs στο μικροπεριβάλλον των αιματολογικών κακοηθειών.....	106
Κεφάλαιο 4.: ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	108
4.1 Ο ρόλος των EVs στις αιματολογικές κακοήθειες	108
4.2. Ο ρόλος των EVs στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML)	109
4.3. Ο ρόλος των EVs στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL)	110
4.4. Ο ρόλος των EVs στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML)	112
4.5. Ο ρόλος των EVs στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (CLL).....	113
4.6. Ο ρόλος των EVs στο λέμφωμα	115

4.6.1 Ο ρόλος των EVs στο HL λέμφωμα.....	121
4.6.2 Ο ρόλος των EVs στο Non HL λέμφωμα.....	121
4.7. Ο ρόλος των EVs στο πολλαπλό μυέλωμα (MM).....	123
Κεφάλαιο 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	126
Κεφάλαιο 6.: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	132
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	133

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

acid SphingoMyelinase	aSMase
Acute Myeloid Leukemia	AMS
Acute Lymphoblastic Leukemia	ALL
Amphiregulin	AREG
Bone marrow	BM
Bone morphogenetic protein	BMP
Chronic Lymphocytic Leukemia	CLL
Chronic Myeloid Leukemia	CML
Diglyceride Kinase	DGK
Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR
Extracellular Vesicles	EVs
GlycosylPhosphatidyInositol	GPI
Hairy Cell Leukaemia	HCL
Hematological Malignancies	HMs
Hematopoietic Stem Cells	HSCs
International Society of Extracellular Vesicles	ISEV
Immunoglobulin Variable Heavy Chain	IGVH
Leukemic Stem Cells	LSCs
Lymphoma Microenvironment	LME
Lymphoproliferative disorders	LPD
Major histocompatibility complex	MHC
Mesenchymal Stem/Stromal Cells	MSCs
microTubule Organizing Center	mTOC
Microvesicles	MVs
Mononuclear Phagocyte System	MPS
Multiple Myeloma	MM

Multi Vesicular Body	MVB
Myeloid-Derived Suppressor Cells	MDSCs
Non-Hodgkin's Lymphoma	NHL
PhosphatidylSerine	PS
Polymorphonuclear leukocytes or neutrophils	PMNs
Platelet-Derived Microvesicles	PMVs
Programmed Death-Ligand 1	PD-L1
Proton Pump Inhibitors	PPIs
Smooth Muscle Cells	SMCs
Zinc Finger Protein	ZFP

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά μεταξύ των αποπτωτικών σωματίων, των μικροσωματιδίων (MVs) και των εξωσωμάτων	69
Πίνακας 2. Δείκτες έκφρασης των μικροσωματιδίων που προσδιορίζουν την προέλευση τους	70
Πίνακας 3. Βιοενεργείς ουσίες (στοιχεία) των MVs διαφορετικής κυτταρικής προέλευσης και οι βιολογικές τους δράσεις στα κύτταρα στόχους	71
Πίνακας 4. Μέθοδοι χαρακτηρισμού και ποσοτικοποίησης των EVs	130

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Σχηματική παρουσίαση της απελευθέρωσης και της πρόσληψης εξωκυττάρων σωματιδίων	68
Σχήμα 2. Η σύσταση των μικροσωματιδίων και η δράση τους	73
Σχήμα 3. Τα τρία κύρια μονοπάτια (A, B, C) της βιολογικής δράσης των MVs και των ενεργών συστατικών τους	74
Σχήμα 4. Σχηματισμός εξωσωμάτων και μικροσωματιδίων και η διάκριση τους μέσω βιοδεικτών	81
Σχήμα 5. Μεταφορά βιολογικά ενεργού υλικού σε κύτταρα-δέκτες με τη μεσολάβηση εξωσωμάτων και μικροσωματιδίων	82
Σχήμα 6. Ερεθίσματα του σχηματισμού μικροσωματιδίων από αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκά αιμοσφαίρια	88
Σχήμα 7. Ο ρόλος των EVs στην παθολογία των διαφόρων καρκίνων	107
Σχήμα 8. Αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ λεμφωματικών κυττάρων και συστατικών LME που εμπλέκονται στην ανοσολογική διαφυγή του όγκου	108
Σχήμα 9. Ο ρόλος των EVs στην παθογένεση της AML	112
Σχήμα 10. Ο ρόλος των EVs στην παθογένεση της ALL	114
Σχήμα 11. Η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών και των CLL κυττάρων, μέσω των αποδεσμευμένων EVs	117
Σχήμα 12. Ο ρόλος των προερχόμενων MM EVs A) στην πρόκληση οστικών λυτικών αλλοιώσεων και B) στην εξέλιξη του όγκου και στην αγγειογένεση	127
Σχήμα 13. Ο μηχανισμός των MVs στην εξέλιξη της λευχαιμίας	132

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Η εσωτερική δομή των αιμοπεταλίων και τα κυτταρικά τους οργανίδια	21
Εικόνα 2. Ο μηχανισμός της πρωτογενούς αιμόστασης	22
Εικόνα 3. Η βιοσύνθεση του παράγοντα vWF.	23
Εικόνα 4. Ο μηχανισμός της πήξης ο οποίος περιλαμβάνει την ενδογενή, την εξωγενή και την κοινή οδό.	26
Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση του κυτταρικού μοντέλου της πήξης.	28
Εικόνα 6. Αναστολείς της πήξης και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες- στόχοι.	29
Εικόνα 7. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του πλασμινογόνου.	31
Εικόνα 8. Το ινωδολυτικό σύστημα και η δράση του αναστολέα του πλασμινογόνου.	33
Εικόνα 9. Αλγόριθμος εργαστηριακής διερεύνησης επί υποψίας επίκτητης αιμορραγικής διαταραχής	38
Εικόνα 10. Κατηγοριοποίηση των επίκτητων και κληρονομικών αιμορραγικών διαταραχών	42
Εικόνα 11. Επίπτωση της αιμορροφιλίας A σε παγκόσμιο επίπεδο	43
Εικόνα 12. Επίπτωση της αιμορροφιλίας B σε παγκόσμιο επίπεδο	43
Εικόνα 13. Ενδοκυττάρειες διαταραχές των αιμοπεταλίων κατά την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: σύνδρομο Hermansky-Pudlak (A) και σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου (B)	44
Εικόνα 14. Το τρίγωνο το Virchow	46
Εικόνα 15. Παράγοντες κινδύνου για φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση, καθώς και κοινοί παράγοντες κινδύνου	48
Εικόνα 16. Επιπολασμός της συγγενούς θρομβοφιλίας και των παραγόντων κινδύνου για θρόμβωση κατά τη διάρκεια της κύησης σε πληθυσμό των χωρών της Ευρώπης	51
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση για τη διαχείριση των ασθενών με επίκτητη και συγγενή θρομβοφιλία	52
Εικόνα 18. Κατηγοριοποίηση των αιματολογικών νεοπλασιών	53
Εικόνα 19. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων	54
Εικόνα 20. Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων	56
Εικόνα 21. T- λεμφοβλαστική λευχαιμία/ λέμφωμα	57
Εικόνα 22. Λέμφωμα Hodgkin's	58
Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών ορού, σε δείγμα ασθενούς με	60

πολλαπλούν μυέλωμα

Εικόνα 24. Κατανομή όλων των υποτύπων Β-οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας σε διάφορες ηλικιακές ομάδες, ανάλογα με το γενετικό τους αίτιο-υπόβαθρο	61
Εικόνα 25. Ιστολογικές εικόνες από διάφορους τύπους T και NK λεμφωμάτων σε παιδιά και ενήλικες	62
Εικόνα 26. Εξωκυττάρια κυστίδια	63
Εικόνα 27. Ο σχηματισμός των μικροσωματιδίων	65
Εικόνα 28. Ο διαχωρισμός των μικροσωματιδίων-εξωσωμάτων-αποπτωτικών σωματίων βάσει μεγέθους	66
Εικόνα 29. Σχηματικό διάγραμμα της δημιουργίας των EVs και οι υποπληθυσμοί τους	67
Εικόνα 30. Η σύσταση των μικροκυστιδίων.	72
Εικόνα 31. Σχηματισμός εξωσωμάτων	77
Εικόνα 32. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ενεργοποιεί διαδοχικά το μηχανισμό που οδηγεί στον σχηματισμό και απελευθέρωση των μικροσωματιδίων (MP)	78
Εικόνα 33. Βιογένεση των εξωκυττάριων κυστιδίων	79
Εικόνα 34. Δημιουργία των εξωκυττάριων κυστιδίων (EVs)	80
Εικόνα 35. Η λακταδερίνη προάγει την κάθαρση των MPs μέσω φαγοκυττάρωσης	83
Εικόνα 36. Η IgM προάγει την κάθαρση των MPs από τα μακροφάγα. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής και ανοσοφθορισμού	84
Εικόνα 37. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού που οδηγεί στον σχηματισμό MP	86
Εικόνα 38. Συναρμολόγηση συμπλόκων πήξης σε μεμβράνη φωσφολιπιδίων PS+	89
Εικόνα 39. Δείκτες επιφανείας των MPs που απελευθερώνονται από διάφορα κύτταρα	90
Εικόνα 40. Τα PS+ των MPs που προέρχονται από αιμοπετάλια ενισχύουν την αιμόσταση και τη θρόμβωση, σε σχέση με τα PS+ και TF+ των MPs που προέρχονται από τα μονοκύτταρα	90
Εικόνα 41. Ο ρόλος των TF+ των MPs στη θρόμβωση αγγείων μικρού μεγέθους και φλεβών	91
Εικόνα 42. Χαρακτηρισμός των EVs που εσωτερικεύθηκαν από ινοβλάστες in vitro	119
Εικόνα 43. Τα EVs προάγουν τη μετανάστευση των Hodgkin lymphoma κυττάρων (HL) και τα HL EVs μεταβάλλουν τον φαινότυπο των ινοβλαστικών κυττάρων	120
Εικόνα 44. Το Hodgkin lymphoma (HL) xenograft model	121
Εικόνα 45. Αλληλεπίδραση ινοβλαστών και κυττάρων λεμφώματος Hodgkin (HL) στο μικροπεριβάλλον του όγκου	122
Εικόνα 46. Η αξιολόγηση του κυκλοφορούντος DNA, του microRNA και των εξωσωμάτων που	124

προέρχονται από το περιφερικό αίμα ασθενών με NHL

Εικόνα 47. Η κλινική χρήση της υγρής βιοψίας στο non-Hodgkin's λέμφωμα 125

Εικόνα 48. Μοριακή βάση αιματολογικών νοσημάτων 131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Σχεδιάγραμμα 1. Σύνδεση μεταξύ των EVs και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων προέλευσης 101

Σχεδιάγραμμα 2. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων πηγών και επιδράσεων των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των αντιδραστικών ειδών αζώτου (RNS) 102

Σχεδιάγραμμα 3. Σχηματική αναπαράσταση της παθοφυσιολογίας των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες 103

Σχεδιάγραμμα 4. Μικροσωματίδια και φλεγμονή 104

Σχεδιάγραμμα 5. Οι επιπτώσεις των MPs στη φλεγμονή 105

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα (Lymphoproliferative disorders-LPD) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα αιματολογικών νεοπλασιών, που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτη παραγωγή λεμφοκυττάρων που προκαλούν μονοκλωνική λεμφοκυττάρωση, λεμφαδενοπάθεια και διήθηση του μυελού των οστών [1]. Τα νοσήματα αυτά εμφανίζονται συχνά σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Υπάρχουν δύο υποσύνολα λεμφοκυττάρων: Τα T και τα B κύτταρα που αναπαραγόμενα ανεξέλεγκτα οδηγούν σε ανοσοπολλαπλασιαστικές διαταραχές, οι οποίες είναι επιρρεπείς σε ανοσοανεπάρκεια, δυσλειτουργικό ανοσοποιητικό σύστημα και δυσλειτουργία των λεμφοκυττάρων. Διάφορες γονιδιακές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί ως αιτίες LPD που μπορεί να είναι ιατρογενείς ή επίκτητες [2].

Οι B-λεμφοϋπερπλαστικές παθήσεις ή τα συνδεδεμένα με τη B-κυτταρική προέλευση των λεμφοκυττάρων νοσήματα συμπεριλαμβάνουν: τα B-ΧΛΛ, non-Hodgkin's λέμφωμα (συμπεριλαμβανομένου του λεμφώματος από το κύτταρο του μανδύα- mantle cell lymphoma), προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, λευχαιμία από τριχωτά κύτταρα (Hairy Cell Leukaemia-HCL) και τα σπληνικά B-λεμφώματα [1].

Οι T-λεμφοϋπερπλαστικές παθήσεις περιλαμβάνουν την προλεμφοκυτταρική λευχαιμία, τη λευχαιμία-λέμφωμα των ώριμων T-κυττάρων, τη λευχαιμία των μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων και το σύνδρομο Sézary [1,3,4]. Τα T-κυτταρικά λεμφώματα αποτελούν μια ευρεία ποικιλία ασυνήθιστων ασθενειών που μπορεί να είναι ήπια ή επιθετικά και αποτελούν το 12% όλων των non-Hodgkin's λεμφωμάτων [NHL].

Δεδομένου ότι τα NK-κύτταρα είναι στενά συνδεδεμένα με τα T-κύτταρα, οι κακοήθειές τους περιλαμβάνονται επίσης στην ταξινόμηση. Ο ΠΟΥ (WHO) δημοσίευσε μια αναθεωρημένη ταξινόμηση των λεμφωμάτων το 2016, η οποία διαχωρίζει σε γενικές γραμμές τα T-κυτταρικά/NK-κυτταρικά λεμφώματα σε πρόδρομα και ώριμα T-κυτταρικά νεοπλάσματα. Η ώριμη υποομάδα διακρίνεται περαιτέρω σε λευχαιμικά, οζώδη, εξωοζώδη και δερματικά, [4].

Τα μικροσωματίδια (microvesicles) έχουν μέγεθος 100-1000nm και σχηματίζονται από εκβλαστήσεις της κυτταρικής μεμβράνης, απευθείας στην επιφάνεια του κυττάρου, από το οποίο αποκόπτονται προοδευτικά [5-7]. Ο προσδιορισμός της κυτταρικής προέλευσης των μικροσωματιδίων βασίζεται στην έκφραση ειδικών δεικτών που χαρακτηρίζουν το κύτταρο προέλευσης, [8,9]. Βασική πηγή προέλευσης των μικροσωματιδίων είναι τα αιμοπετάλια, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λευκά και τα ερυθρά αιμοσφαίρια [9,10]. Ο ρόλος των μικροσωματιδίων είναι η διακυτταρική επικοινωνία, και ο προπηκτικός-αιμοστατικός ρόλος [11-13]. Επίσης, στον καρκίνο συμβάλλοντας στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, στη φλεγμονή, πρωταγωνιστούν σε πολλά νοσήματα (αθηροσκλήρωση, σήψη, καρδιαγγειακή νόσο, μεταβολικό σύνδρομο, νεφρική ανεπάρκεια, αυτοάνοσα νοσήματα, όπως π.χ. ερυθματώδη λύκο, ρευματοειδή αρθρίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκας, ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα, θρομβοφιλία, καρκίνος, κλπ) [7,13].

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία αφορά βιβλιογραφική ανασκόπηση, με σκοπό την ανάδειξη του ρόλου των μικροσωματιδίων στα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Επιμέρους στόχοι είναι η περιγραφή των βιολογικών λειτουργιών των μικροσωματιδίων, καθώς και η περιγραφή των μηχανισμών μέσω των οποίων τα μικροσωματίδια συμβάλλουν στα διάφορα νοσήματα.

Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση δημοσιευμένων επιστημονικών άρθρων στις βάσεις δεδομένων Pubmed NCBI, EMBASE, Google scholar, με τις λέξεις κλειδιά: microparticles, microvesicles, classification of proliferative diseases-disorders, exosomes, platelet microparticles, inflammation, miRNA, active molecules, apoptosis, autophagy.

Αποτελείται συνολικά από 6 Κεφάλαια. Στο Κεφάλαιο 1 αναπτύσσεται η αιμόσταση και η θρόμβωση, στο Κεφάλαιο 2 τα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, στο Κεφάλαιο 3 τα μικροσωματίδια, στο Κεφάλαιο 4 η συμβολή των μικροσωματιδίων στα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, στο Κεφάλαιο 5 παραθέεται η Συζήτηση και στο Κεφάλαιο 6 τα Συμπεράσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΙΜΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΘΡΟΜΒΩΣΗ

1.1 Αιμόσταση

Με τον όρο αιμόσταση χαρακτηρίζουμε τον φυσιολογικό ομοιοστατικό μηχανισμό, ο οποίος περιλαμβάνει ένα σύνολο από βιοχημικές αντιδράσεις καθώς και από μηχανισμούς κυτταρικής αλληλεπίδρασης, τα οποία έχουν ως στόχο την αποκατάσταση του τραυματισμένου αγγείου, καθώς και την επίσχεση της αιμορραγίας και την ομαλή ροή του αίματος μέσα σε αυτό, ώστε να αποφευχθεί η θρόμβωση [14]. Στο μηχανισμό της αιμόστασης συμμετέχουν το ενδοθήλιο των αγγείων, τα αιμοπετάλια, οι παράγοντες πήξης, οι φυσικοί αναστολείς και το ινωδολυτικό σύστημα.

Το ενδοθήλιο αποτελείται από μονήρης στοιβάδα κυττάρων που επαλείφει το έσω τοίχωμα των αγγείων. Δεν αποτελεί απλά μια διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ του αίματος και του τοιχώματος των αγγείων, αλλά ένα εκτεταμένο εκκριτικό όργανο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος [15].

Βασική λειτουργία του ενδοθηλίου είναι η έκκριση αγγειοδιασταλτικών και αγγειοσυσταλτικών ουσιών, μέσω των οποίων ρυθμίζεται ο αγγειακός τόνος [16]. Επιπρόσθετα, μέσω των ουσιών που εκκρίνει, το ενδοθήλιο ρυθμίζει την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων, τον καταρράκτη του μηχανισμού της πήξης και τη λειτουργία του ινωδολυτικού συστήματος. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και στις φλεγμονώδεις διεργασίες, μέσω της παραγωγής προφλεγμονωδών και φλεγμονωδών κυτταροκινών και ουσιών που συμμετέχουν στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων [16].

Το φυσιολογικό άθικτο ενδοθήλιο αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων, συντηρεί τη λειτουργία της αγγειοδιαστολής και προλαμβάνει την αιμορραγία και τη θρόμβωση μέσω παραγωγής και έκκρισης ρυθμιστικών παραγόντων. Ο τραυματισμός του αγγείου προκαλεί την άμεση συστολή του μέσω διαβιβαστών, όπως είναι η σεροτονίνη, η επινεφρίνη και η νοραδρεναλίνη,

με στόχο τη μείωση της απώλειας αίματος και την ταχύτατη ενεργοποίηση της πρωτογενούς αιμόστασης [15].

1.2 Ο μηχανισμός της αιμόστασης

Ο μηχανισμός της αιμόστασης περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια:

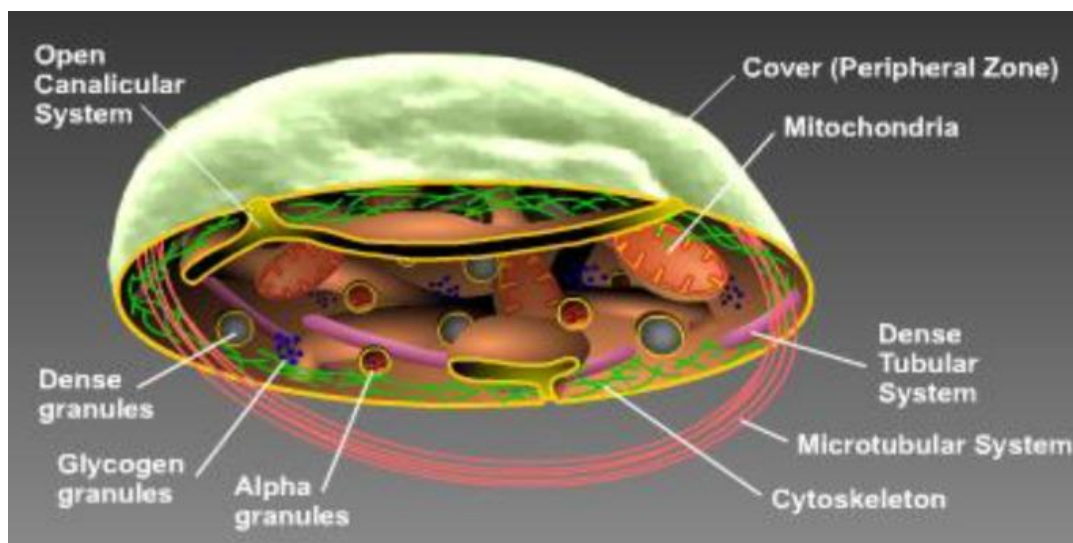
- την πρωτογενή αιμόσταση, που είναι το αρχικό στάδιο του μηχανισμού και το οποίο οδηγεί στον σχηματισμό του αιμοπεταλιακού θρόμβου στο σημείο του τραυματισμού του αγγείου, με αποτέλεσμα την παροδική επίσχεση της αιμορραγίας
- τη δευτερογενή αιμόσταση ή πήξη, που περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός πλέγματος ινώδους που σταθεροποιεί το θρόμβο, με την ενεργοποίηση παραγόντων πήξης, κυττάρων και ανασταλτών της πήξης
- την ινωδόλυση, που αποτρέπει την υπερβολική αύξηση του θρόμβου και επάγει τη διάλυσή του

1.2.1 Πρωτογενής αιμόσταση

Η πρωτογενής αιμόσταση είναι ο μηχανισμός που τίθεται σε λειτουργία μετά τον τραυματισμό του αγγείου και περιλαμβάνει άμεση συστολή του αγγείου μέσω της έκκρισης διαβιβαστών, όπως είναι η σεροτονίνη, η αδρεναλίνη και η νορεπινεφρίνη [17]. Μέσω της έκκρισης των διαβιβαστών το τραυματισμένο αγγείο συσπάται, με σκοπό να δημιουργηθεί μέσα σε λίγα λεπτά ο ασταθής πρωτογενής αιμοπεταλιακός θρόμβος ή λευκός θρόμβος. Ο αιμοπεταλιακός θρόμβος δημιουργείται με την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο υπενδοθήλιο (η προσκόλληση αποδίδεται με τον όρο *adhesion*), ακολουθούμενη από την αντίδραση απελευθέρωσης κοκκίων από τα αιμοπετάλια (*activation*) και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων για τη δημιουργία θρόμβου (*aggregation*).

Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο του τραυματισμένου αγγείου επιτυγχάνεται μέσω του παράγοντα von Willebrand (vWF), ο οποίος συνδέεται με το κολλαγόνο του υπενδοθηλίου και στη συνέχεια με τον υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης Ib (GPIb) που βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων [18,19]. Ο παράγοντας vWF συντίθενται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα [20,21].

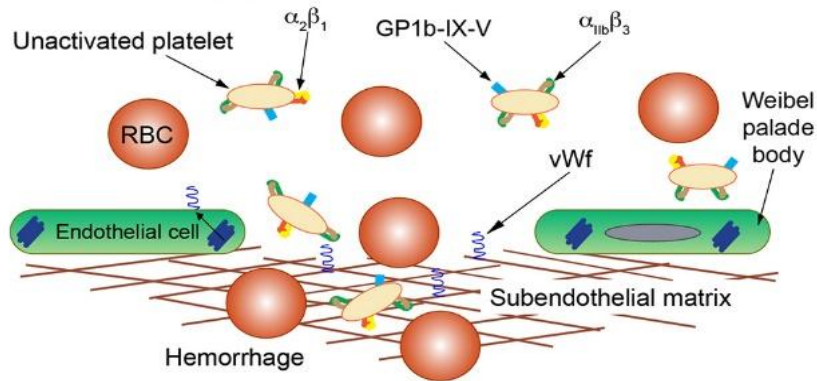
Εικόνα 1. Η εσωτερική δομή των αιμοπεταλίων και τα κυτταρικά τους οργανίδια. Πηγή: Int J Hematol Oncol Stem Cell Res, 2017, (Figure 1A). [19].



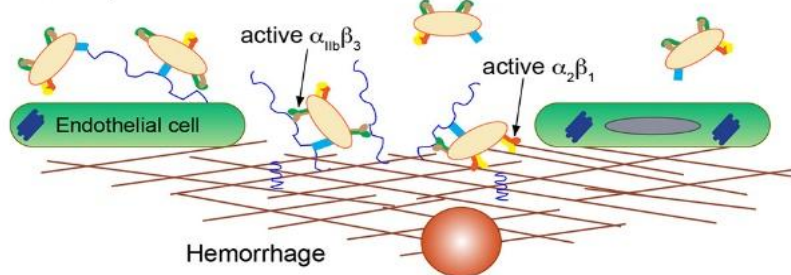
Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα, απύρρηνα κύτταρα με διάμετρο 2 ως 3 μm , τα οποία προέρχονται από θραύσματα μεγακαρυοκυττάρων και έχουν μέση διάρκεια ζωής 5 ως 9 ημέρες. Δεδομένου ότι είναι απύρρηνα κύτταρα στερούνται γονιδιωματικού DNA, ωστόσο το κυτταρόπλασμα τους περιέχει κοκκία, μιτοχόνδρια και μόρια mRNA. Με αυτόν τον τρόπο τα αιμοπετάλια μπορούν να συνθέσουν τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη λειτουργία τους.

Εικόνα2. Ο μηχανισμός της πρωτογενούς αιμόστασης. Πηγή: <https://eclinpath.com/hemostasis/physiology/primary-hemostasis/>

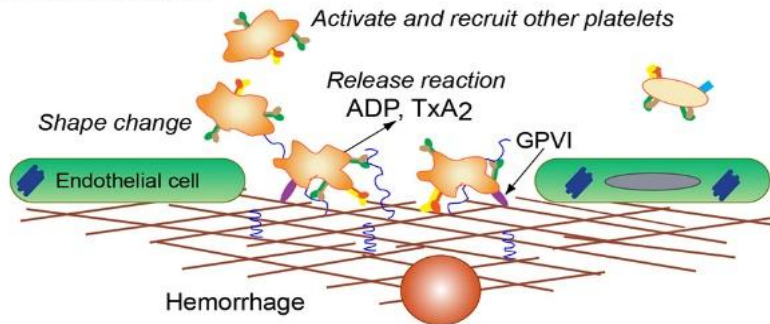
Endothelial cell injury



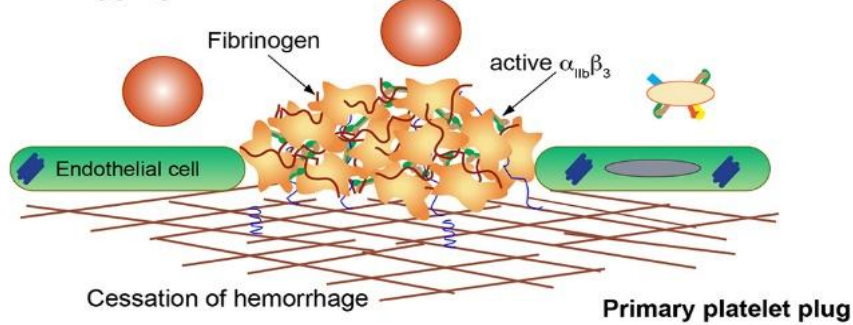
Platelet capture and adhesion



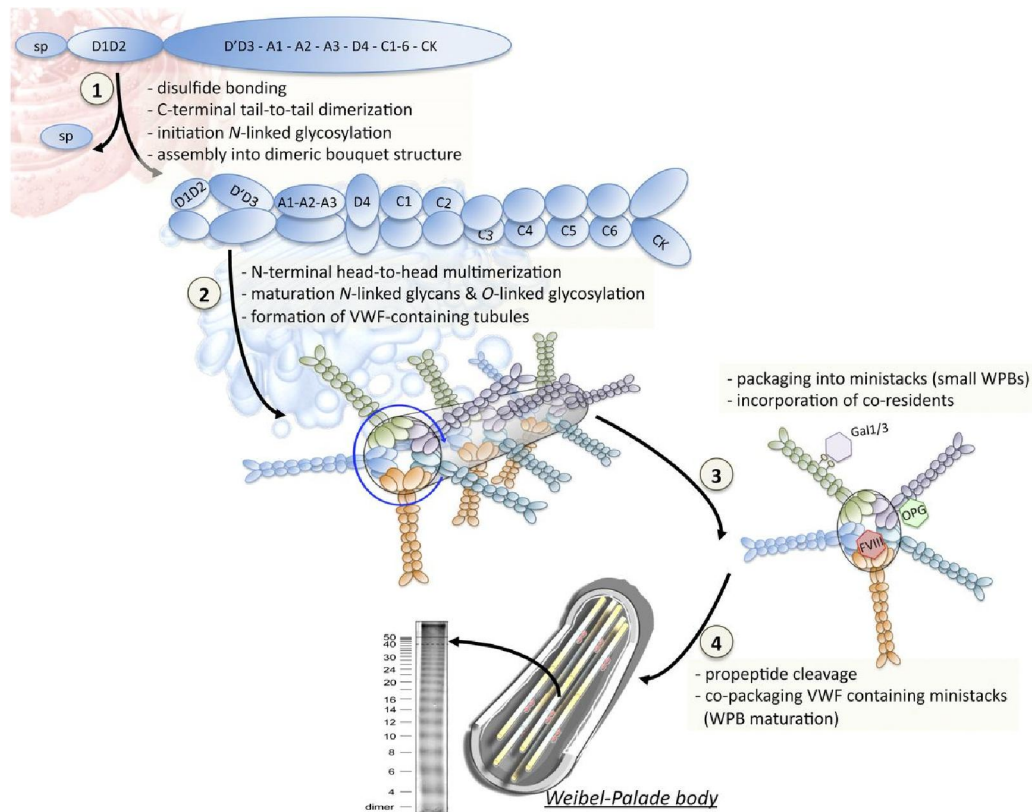
Platelet activation



Platelet aggregation



Εικόνα 3. Η βιοσύνθεση του παράγοντα vWF. Πηγή: Blood 2015, 125(13):2019-2028, (Figure 3). [20].



1.2.2 Δευτερογενής αιμόσταση

Η δευτερογενής αιμόσταση ή πήξη, είναι ένας μηχανισμός στον οποίο συμμετέχουν συνολικά περισσότερες από 30 πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται παράγοντες της πήξης. Η πήξη ορίζεται ως «το σύνολο της αλληλοδιάδοξης ενεργοποίησης πρωτεϊνών του πλάσματος που οδηγεί στην παραγωγή θρομβίνης και τελικά στο σχηματισμό ινικής, με σκοπό την ενίσχυση του αιμοπεταλιακού θρόμβου». Οι παράγοντες πήξης χαρακτηρίζονται από το όνομα τους και ένα λατινικό αριθμό [22]. Ο αριθμός του κάθε παράγοντα έχει σχέση με την σειρά ανακάλυψής του από τους ερευνητές και όχι με την σειρά με την οποία συμμετέχει στον μηχανισμό της πήξης. Όταν αναφέρεται η ενεργοποιημένη μορφή ενός παράγοντα, δίπλα στον αριθμό αναγράφεται το γράμμα

«α». Η ενεργοποίηση ενός παράγοντα γίνεται με περιορισμένη πρωτεόλυση και αποκάλυψη του ενεργού του κέντρου. Η διαδικασία δεν συμβαίνει ελεύθερα στο πλάσμα, αλλά σε επιφάνειες που αποτελούνται από φωσφολιπίδια, όπως είναι το ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια. Συνολικά, ο μηχανισμός της πήξης περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός πλέγματος ινώδους που σταθεροποιεί το θρόμβο με την ενεργοποίηση παραγόντων πήξης, κυττάρων και ανασταλτών. Όλες οι αντιδράσεις που προαναφέρθηκαν ρυθμίζονται με μηχανισμούς θετικής ή αρνητικής ανάδρασης.

Οι ονομασίες των παραγόντων πήξεως έχουν ως εξής:

- ✓ FI, ινωδογόνο
- ✓ FII, προθρομβίνη
- ✓ FIII, ιστικός παράγοντας (θρομβοπλασίνη)
- ✓ FIV, ασβέστιο (Ca^{2+})
- ✓ FV, προαξελερίνη
- ✓ FVII, προκονβερτίνη
- ✓ FVIII, αντ αιμοφιλικός παράγοντας A
- ✓ FIX, αντ αιμοφιλικός παράγοντας B ή παράγοντας Christmas
- ✓ FX, προβρομβινάση ή παράγοντας Stuart
- ✓ FXI, προγενέστερη θρομβοπλασίνη πλάσματος ή PTA
- ✓ FXII, παράγοντας επαφής ή παράγοντας Hageman
- ✓ FXIII, παράγοντας σταθεροποίησης του ινώδους ή FSF
- ✓ Προκαλλικρεΐνη
- ✓ HMWK, υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (High Molecular Weight Kininogen) ή παράγοντας Fitzgerald

Οι παράγοντες πήξης I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII και HMWK, συντίθενται στο ήπαρ, ενώ ο ιστικός παράγοντας ή παράγοντας III (TF tissue factor) συντίθεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα μεγακαρυοκύτταρα [20,21,23].

Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου και η έκφραση του ιστικού παράγοντα συνιστούν βασικές προϋποθέσεις έναρξης της πήξης του αίματος. Η αντίδραση αυτή επιταχύνεται από την παρουσία μιας φωσφολιπιδικής επιφάνειας και μιας ειδικής πρωτεΐνης η οποία δρα ως συμπαράγοντας. Όλες οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη διαδικασία της πήξης συνδέονται και αλληλοεξαρτώνται. Ο μηχανισμός της πήξης περιλαμβάνει δυο οδούς, την ενδογενή και την εξωγενή, οι οποίες συγκλίνουν σε μια κοινή οδό.

Η ενδογενής οδός αρχίζει με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII στο ενδοθήλιο και την υπενδοθηλιακή στιβάδα του αγγείου που έχει τραυματιστεί. Όλοι οι παράγοντες που συμμετέχουν στην οδό αυτή βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η διαδικασία απαιτεί χρόνο 4 ως 8 λεπτών για να ολοκληρωθεί και δρα ενισχύοντας τον σχηματισμό θρομβίνης από την εξωγενή οδό [24].

Η εξωγενής οδός ενεργοποιείται με την απελευθέρωση του ιστικού παράγοντα στην κυκλοφορία και συνιστά την κατεξοχήν οδό εκκίνησης του μηχανισμού της πήξης *in vivo*. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε διάστημα δευτερολέπτων και ονομάζεται εξωγενής επειδή ο παράγοντας που την ενεργοποιεί βρίσκεται εκτός της κυκλοφορίας. Ο ιστικός παράγοντας εκτίθεται στην κυκλοφορία και συνδέεται με τον παράγοντα VII στο σημείο τραυματισμού του αγγείου.

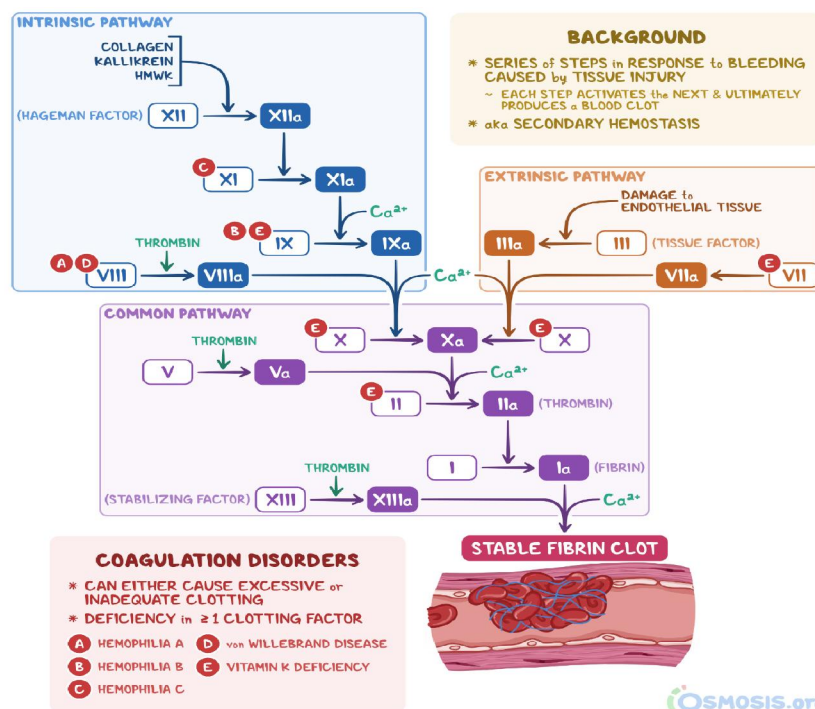
Μετά από την ενεργοποίηση των δυο οδών ακολουθεί κοινή οδός η οποία αποτελείται από τρεις φάσεις:

- φάση I: η προθρομβίνη μετατρέπεται σε θρομβίνη
- φάση II: το ινωδογόνο μετατρέπεται σε δίκτυο ινώδους
- φάση III: η θρομβοσθενίνη συντελεί στη συρρίκνωση του θρόμβου.

Ο μηχανισμός της πήξης ερμηνεύεται σύμφωνα με το μοντέλο του «καταρράκτη», το οποίο προτάθηκε κατά τη δεκαετία του 1960 από τις ερευνητικές ομάδες του Mac Farlane (δημοσίευση στο περιοδικό Nature το 1964) και των Davie και Ratnoff

(δημοσίευση στο περιοδικό Science το 1964). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό κάθε παράγοντας πήξης ενεργοποιεί τον επόμενο σε μια σειρά διαδοχικών αλυσιδωτών βημάτων, με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ερυθρού θρόμβου και τη μόνιμη επίσχεση της αιμορραγίας [25-27].

Εικόνα 4. Ο μηχανισμός της πήξης ο οποίος περιλαμβάνει την ενδογενή, την εξωγενή και την κοινή οδό. Πηγή <https://www.osmosis.org/answers/coagulation-cascade>



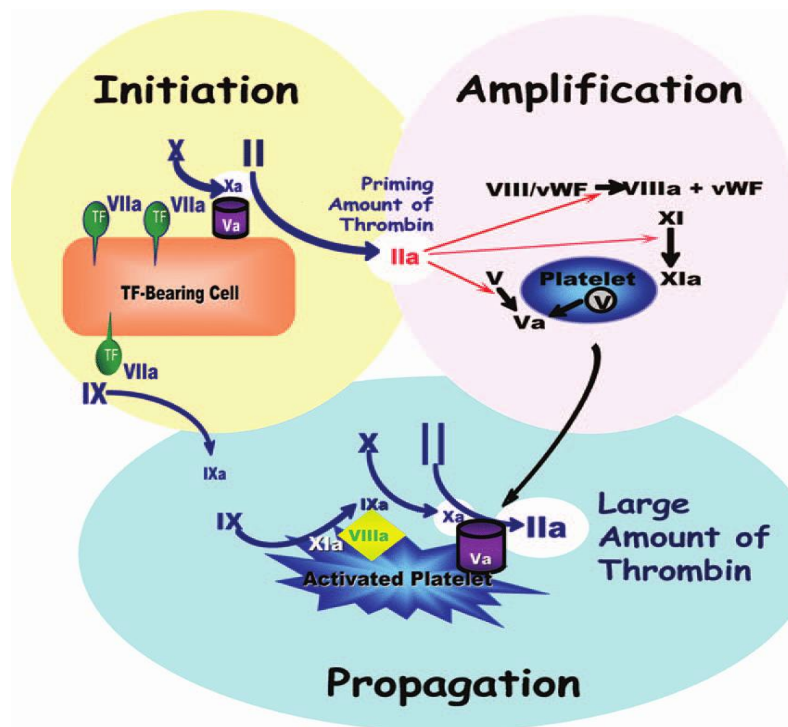
Τα τελευταία χρόνια συμπεραίνεται ότι το μοντέλο του καταρράκτη της πήξης δεν αντικατοπτρίζει επακριβώς αυτό που συμβαίνει στον ανθρώπινο οργανισμό. Για παράδειγμα, το μοντέλο δεν επαρκεί για να ερμηνεύσει γιατί η ανεπάρκεια των παραγόντων του συστήματος επαφής δεν προκαλεί αιμορραγία ή γιατί η έλλειψη των παραγόντων VIII και IX σχετίζονται με σοβαρές αιμορραγίες, παρά την ύπαρξη της εξωγενούς οδού. Το νέο μοντέλο που έχει προταθεί, ώστε να ερμηνεύονται και τα σημεία που προαναφέρθηκαν, είναι το κυτταρικό μοντέλο της πήξης, το οποίο προτάθηκε από τους ερευνητές Hoffman και Monroe. Σύμφωνα με αυτό η διαδικασία

της αιμόστασης *in vivo* συμβαίνει σε συγκεκριμένες κυτταρικές επιφάνειες, οι οποίες ανάλογα με τους υποδοχείς που φέρουν, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση του μηχανισμού [28].

Το κυτταρικό μοντέλο περιλαμβάνει τρεις φάσεις, την έναρξη, την ενίσχυση και την επέκταση. Ο μηχανισμός της πήξης ξεκινά στο σημείο τραυματισμού του αγγείου με την αποκάλυψη κυττάρων που φέρουν στην επιφάνειά τους ιστικό παράγοντα (φάση έναρξης), όπως είναι οι ινοβλάστες και τα μακροφάγα. Κατόπιν ο ιστικός παράγων σχηματίζει σύμπλεγμα με τον παράγοντα VII και ενεργοποιεί τους παράγοντες IX και X. Ο ενεργοποιημένος παράγοντας X παραμένει επί του κυττάρου και ενεργοποιεί τον παράγοντα V. Ο FXa μαζί με τον FVa παράγουν ίχνη θρομβίνης. Ακολουθεί η φάση της ενίσχυσης, όπου τα ίχνη θρομβίνης ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, καθώς και τους παράγοντες IX, VIII και V. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια θετική ανάδραση και ενισχύεται το αρχικό αποτέλεσμα. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων γίνεται με έκθεση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης τους και απελευθέρωση των κοκκίων τους.

Στη φάση της επέκτασης οι ενεργοποιημένοι παράγοντες VIIIa και IXa μαζί με τον παράγοντα X και ιόντα ασβεστίου σχηματίζουν το σύμπλοκο της ενδογενούς τενάσης, η οποία ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa. Οι παράγοντες Va μαζί με τον Xa και το ασβέστιο σχηματίζουν το σύμπλοκο της προθρομβινάσης, το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό επαρκούς θρόμβου ινικής. Κατά τη φάση της επέκτασης συμπλέγματα της προθρομβινάσης είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων τα οποία έχουν πλέον ενεργοποιηθεί πλήρως. Παρατηρούμε ότι και στο κυτταρικό μοντέλο της πήξης υιοθετείται η αλληλεπίδραση των διαδοχικών αλυσιδωτών αποτελεσμάτων [29].

Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση του κυτταρικού μοντέλου της πήξης. Πηγή: Hofman and Monroe, Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014, (Figure 3).



1.2.3 Αναστολείς του μηχανισμού της πήξης

Όταν ενεργοποιείται ο μηχανισμός της πήξης, ο σχηματιζόμενος θρόμβος πρέπει να περιορίζεται στο σημείο του τραυματισμού του αγγείου, αλλά και να λύεται όταν πρέπει, ώστε να αποκαθίσταται η ομαλή ροή αίματος στο αγγείο. Αυτή η ρύθμιση καθίσταται εφικτή μέσω δυο μηχανισμών, οι οποίοι ελέγχουν την παραγωγή της θρομβίνης. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά σε ένα άμεσο σύστημα αναστολέων των πρωτεασών της σερίνης, που περιλαμβάνουν την αντιθρομβίνη (AT) και τον αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI). Η αντιθρομβίνη απενεργοποιεί τη θρομβίνη και τους παράγοντες IXa, Xa, XIa, μέσω του σχηματισμού συμπλεγμάτων, ενώ ο TFPI αναστέλλει τον ιστικό παράγοντα [30]. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά σε ένα έμμεσο σύστημα, του οποίου η λειτουργία εξαρτάται από την βιταμίνη K. Το σύστημα αυτό αποτελείται από την πρωτεΐνη C και τον συμπαράγοντά της, την πρωτεΐνη S. Η οδός της πρωτεΐνης C ενεργοποιείται από το σύμπλεγμα θρομβίνης/θρομβομοντουλίνης που βρίσκεται στο ενδοθήλιο. Η

ενεργοποιημένη πρωτεΐνης C με την παρουσία του συμπαράγοντά της, απενεργοποιεί με πρωτεόλυση τους παράγοντες Va και VIIIa και σταματά την παραγωγή του θρόμβου ινικής [31].

Εικόνα 6. Αναστολείς της πήξης και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες- στόχοι. Πηγή: Journal of Laboratory and Precision Medicine, 2018, (Table 1). [32].

Inhibitor	Target protein
Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	Tissue factor
Antithrombin	Factor II and X
Protein C-protein S	Factor V and VIII
Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)	Fibrin
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	Tissue plasminogen activator (t-PA)

1.2.4 Ινωδόλυση

Το τρίτο στάδιο του μηχανισμού της αιμόστασης είναι η ινωδόλυση, η οποία αφορά στη λύση του θρόμβου, την ομαλοποίηση του ενδοθηλίου και την αποκατάσταση της ομαλής ροής του αίματος. Πρόκειται για μια βραδεία διαδικασία ή οποία ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα μερικών ημερών. Ο μηχανισμός ενεργοποιείται με την έκλυση των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου από το ενδοθήλιο στην περιοχή του τραυματισμού του αγγείου, αφού πρώτα έχει ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του θρόμβου. Το πλασμινογόνο είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία παράγεται στο ήπαρ, η οποία έχει μοριακό βάρος 91 kDa και είναι ανενεργό προένζυμο. Κατά την διάρκεια της πήξης μεγάλες ποσότητες πλασμινογόνου ενσωματώνονται εντός του θρόμβου. Όταν δεχτεί την επίδραση των ενεργοποιητών του μετατρέπεται με υδρόλυση σε

πλασμίνη, η οποία αποτελεί το κεντρικό ένζυμο της ινωδολύσης και αποδομεί το διαλυτό ινώδες, την ινική και το ινωδογόνο, σε προϊόντα διάσπασης.

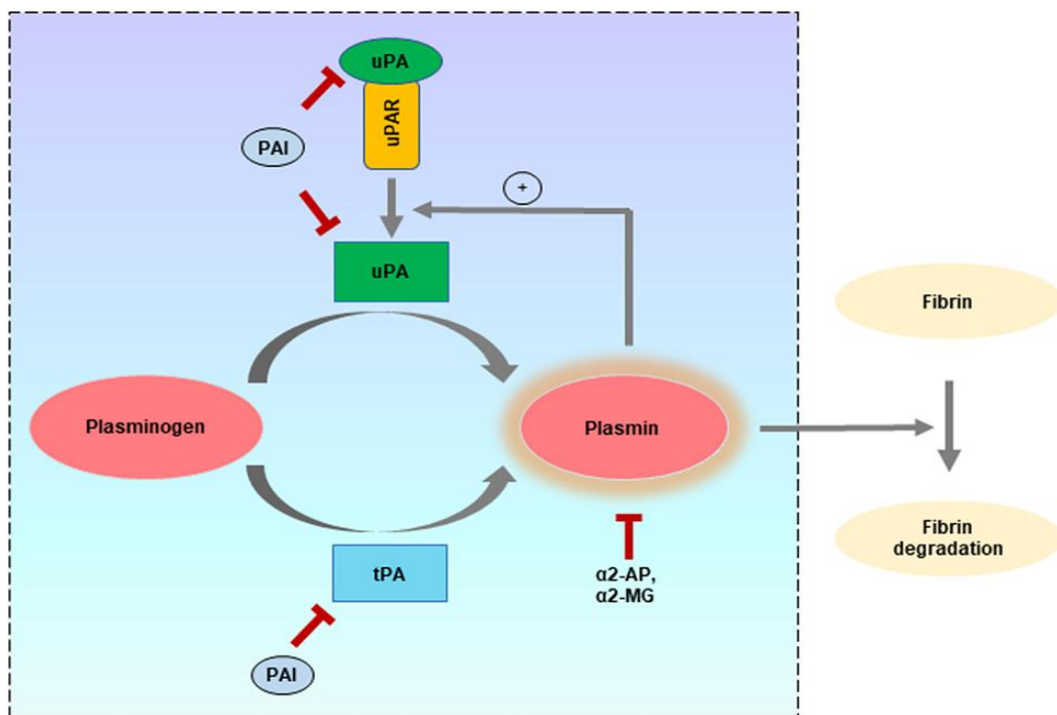
Οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου είναι ο ιστικός ενεργοποιητής (t-PA), η ουροκινάση, οι βακτηριακοί ενεργοποιητές και οι πλασματικοί ενεργοποιητές. Ο ιστικός ενεργοποιητής είναι ο πιο σημαντικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου. Παράγεται και αποθηκεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα όχι μόνο κατά τον τραυματισμό των αγγείων, αλλά και σε άλλες περιπτώσεις, όπως κατά τη σωματική άσκηση, την υποξεία και το στρες. Χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας του πλασμινογόνου μπορεί να οφείλονται σε ποσοτική έλλειψη ή ποιοτική διαταραχή του μορίου του, και αποτελούν παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση θρόμβωσης. Αύξηση των επιπέδων του πλασμινογόνου παρατηρείται σε στρες, σε εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, λοίμωξη, κακοήθεια, έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και στην κύηση. Αντίθετα, μείωση των επιπέδων του παρατηρείται σε κίρρωση, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, ινωδολύση, νόσο της υαλοειδούς μεμβράνης, επίκτητη υποϊνωδογοναιμία, ηπατική νόσο, νέφρωση και θρόμβωση [33].

Η ουροκινάση (uPA), παράγεται από διάφορα κύτταρα όπως ινοβλάστες, επιθηλιακά, κυψελιδικά, πλακουντιακά κύτταρα και κυρίως από τους νεφρούς, και σε συνδυασμό με τον t-PA δρα επί του συμπλόκου πλασμινογόνου – ινικής [34,35]. Επιπρόσθετα, έχει διερευνηθεί εκτενώς ο ρόλος της στην ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών σε διάφορες νεοπλασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση των κυττάρων, η αγγειογένεση η μετάσταση και η απόπτωση [34]. Η ενεργοποίηση του συστήματος επαφής και η πυροδότηση της ενδογενούς οδού της πήξης προκαλεί ταυτόχρονα κινητοποίηση και του ινωδολυτικού μηχανισμού. Το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο, ο FXII και η καλλικρεΐνη, μετατρέπουν την προουροκινάση σε ουροκινάση διπλής αλύσου, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί το πλασμινογόνο σε πλασμίνη. Επικρατεί η άποψη ότι ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου έχει τον κύριο ρόλο στην παρεμπόδιση της επέκτασης ενδαγγειακών θρόμβων, ενώ η ουροκινάση

σχετίζεται με άλλους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς όπως η αγγειογένεση, ο σχηματισμός αθηρωματικών πλακών και οι φλεγμονώδεις διεργασίες.

Πλασματικοί ενεργοποιητές είναι οι παράγοντες XI, XII, το υψηλού μοριακού βάρους κινινογόνο (HMWK) και η καλλικρεΐνη [36].

Εικόνα 7. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του πλασμινογόνου. Πηγή: Sec. Cancer Molecular Targets and Therapeutics, 2018, (Figure 1). [34].



Οι αναστολείς του ινωδολυτικού μηχανισμού διακρίνονται σε αναστολείς της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και τους αδρανοποιητές της ενεργοποιημένης μορφής της πλασμίνης. Στους αναστολείς της ενεργοποίησης του πλασμιγόνου περιλαμβάνονται η θρομβοσπονδίνη, ο αναστολέας-1 του πλασμινογόνου (PAI1), που παράγεται στο ενδοθήλιο των αγγείων και το ήπαρ και αδρανοποιεί τον tPA, καθώς και ο αναστολέας-2 του πλασμινογόνου (PAI-2), που παράγεται στον πλακούντα και

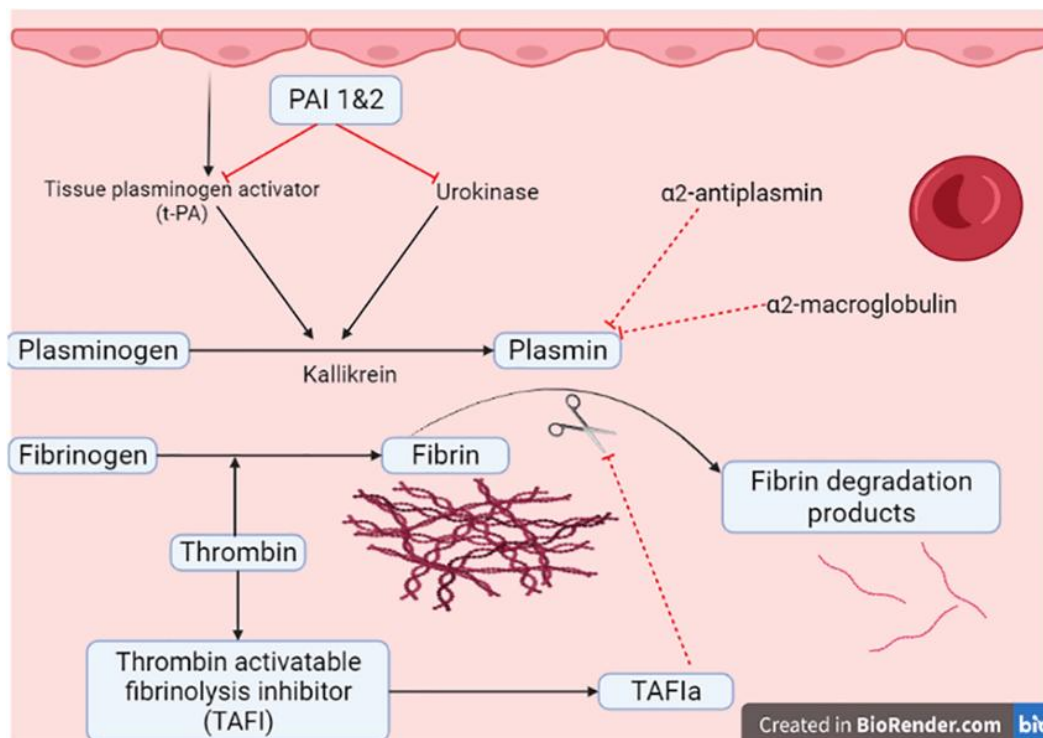
αδρανοποιεί κυρίως την ουροκινάση και δευτερευόντως τον tPA. Μεταξύ των αναστολέων της πλασμίνης ο σημαντικότερος είναι η A2 –αντιπλασμίνη [37, 38].

Ο έλεγχος για την αποτροπή της γενίκευσης της πήξης του αίματος είναι αναγκαίος έτσι ώστε ο θρόμβος να περιορίζεται σε τοπικό επίπεδο και να λύεται ικανοποιητικά όταν αυτό απαιτείται. Οι μηχανισμοί της αιμόστασης και της ινωδολύσης βρίσκονται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ τους, η οποία επιτυγχάνεται με:

- την απομάκρυνση των ενεργοποιημένων παραγόντων από την κυκλοφορία του αίματος και την αποδόμηση τους στο ήπαρ
- τη δράση ενζύμων
- τη δράση των φυσικών αναστολέων της πήξης
- την ενεργοποίηση του ινωδολυτικού συστήματος.
- μηχανισμούς αρνητικής ανάδρασης και αυτορρύθμισης

Οποιαδήποτε διαταραχή της ισορροπίας μπορεί να οδηγήσει είτε σε αιμορραγία είτε σε θρόμβωση.

Εικόνα 8. Το ινωδολυτικό σύστημα και η δράση του αναστολέα του πλασμινογόνου. Πηγή: Diabetol Metab Syndr, 2022, (Figure 1). [39].



1.3 Αιμορραγική διάθεση

Με τον όρο αιμορραγική διάθεση ορίζεται η αποτυχία των φυσιολογικών μηχανισμών της αιμόστασης να επιφέρουν έλεγχο και επίσχεση της αιμορραγίας. Οι υποκείμενες διαταραχές της αιμορραγικής διάθεσης διακρίνονται σε κληρονομικές και επίκτητες και μπορεί να αφορούν:

- τη δομή των αγγείων
- την παραγωγή ή τη λειτουργία ενός ή περισσότερων παραγόντων πήξεως
- την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι ενός ή περισσότερων παραγόντων πήξεως
- την παραγωγή ή τη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων

- την σταθερότητα και την ακεραιότητα του θρόμβου που σχηματίζεται κατά την αιμόσταση.

1.3.1 Επίκτητες αιμορραγικές διαταραχές

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι συχνότερα απαντώμενες επίκτητες υποκείμενες αιμορραγικές διαταραχές είναι [40-43]:

- ❖ επίκτητη έλλειψη παραγόντων πήξεως
- ❖ δυσλειτουργία των αιμοπεταλίων οφειλόμενη σε ηπατική νόσο, νεφρική νόσο, νεοπλασίες και μηχανικά αίτια. Επιπλέον, από τη χορήγηση φαρμάκων όπως η ασπιρίνη, τα β-λακταμικά αντιβιοτικά και ο αναστολέας του υποδοχέα P2Y₁₂, μπορεί να προκληθούν ποιοτικές διαταραχές των αιμοπεταλίων
- ❖ επίκτηση νόσος Von Willebrand (VWD) και συγκεκριμένα: η εξωσωματική μηχανική υποστήριξη του καρδιαγγειακού συστήματος εφαρμόζεται όλο και περισσότερο στην κλινική πράξη, ειδικά κατά τη διάρκεια της πρόσφατης πανδημίας COVID-19. Στις συσκευές κοιλιακής υποβοήθησης, τις μηχανές καρδιακής παράκαμψης και τα κυκλώματα οξυγόνωσης εξωσωματικής μεμβράνης, το αίμα αντλείται μέσω τεχνητών συσκευών. Δεδομένων των υψηλών ρυθμών ροής, εκτός από την απαιτούμενη χρήση αντιπηκτικών, τα κυκλώματα αυτά μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραχές της πρωτοπαθούς αιμόστασης. Η τυρβώδης ροή που δημιουργείται από τέτοιες συσκευές, μπορεί να οδηγήσει σε επίκτητη VWD από διάσπαση μεγάλων πολυμερών του παράγοντα μέσω ενζυματικής αποικοδόμησης, [44, 45]. Η επίκτητη νόσος του Willebrand μπορεί να προκύψει και ως αποτέλεσμα παθογενετικών μηχανισμών, κατά τους οποίους παράγονται αυτοαντισώματα έναντι του vWF, με αποτέλεσμα την ταχύτατη απομάκρυνση του από την κυκλοφορία και/ ή την απενεργοποίηση του. Άλλες κλινικές οντότητες που σχετίζονται με την επίκτητη νόσο VWD είναι οι διάφορες νεοπλασίες, η πρωτεόλυση του παράγοντα από χορηγούμενες φαρμακευτικές ουσίες, η επίκτητη

μειωμένη σύνθεση του παράγοντα, καθώς και η μειωμένη έκλυση του από τα σημεία αποθήκευσης του στον οργανισμό [42, 46, 47].

- ❖ η τυρβώδης ροή που δημιουργείται από τις συσκευές που προαναφέρθηκαν, μπορεί να οδηγήσει σε επίκτητη μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, σε συνθήκες μειωμένου ινωδογόνου, αυτά τα μηχανικά κυκλώματα δημιουργούν πολύπλοκα αιμοστατικά προφίλ. Για το λόγο αυτό, οι προσεγγίσεις στη θεραπεία είναι εξαιρετικά εξατομικευμένες και εξαρτώνται από την κλινική κατάσταση του ασθενούς. Πρόκειται για ένα επιστημονικό πεδίο σχετικά με την αιμόσταση, για το οποίο απαιτείται περαιτέρω έρευνα, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί και να τυποποιηθεί η διαχείριση των ασθενών, καθώς και διεπιστημονικές συνεργασίες για την αντιμετώπιση του.
- ❖ έλλειψη της βιταμίνης Κ: οι πιο συχνές αιτίες έλλειψης της βιταμίνης Κ είναι η ανεπαρκής διατροφική πρόσληψη, η ανεπαρκής απορρόφηση, η μειωμένη αποθήκευση της βιταμίνης Κ εξαιτίας ηπατικής νόσου, καθώς και η μειωμένη παραγωγή της από το έντερο.
- ❖ ανάπτυξη επίκτητων αναστολέων των παραγόντων πήξης. Πρόκειται για αυτοαντισώματα έναντι διαφόρων παραγόντων πήξης που ανταγωνίζονται τη δράση τους και τα οποία αναπτύσσονται αυτόματα σε μη αιμορροφιλικούς ασθενείς με ή χωρίς συνοδά νοσήματα.
- ❖ αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο
- ❖ διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη: Η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (ΔΕΠ) χαρακτηρίζεται από συστηματική ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης με αποτέλεσμα την παραγωγή ινώδους και την δημιουργία θρόμβων σε διάφορα όργανα, με τελική κατάληξη την πολυοργανική ανεπάρκεια. Παρατηρείται στο 1% των νοσηλευόμενων ασθενών και δεν αποτελεί νόσο, αλλά συνιστά επιπλοκή διαφόρων άλλων νοσημάτων [48].
- ❖ θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα: κατατάσσεται σε μια ομάδα συνδρόμων, με το όνομα θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, η οποία προκαλείται από εκτεταμένη

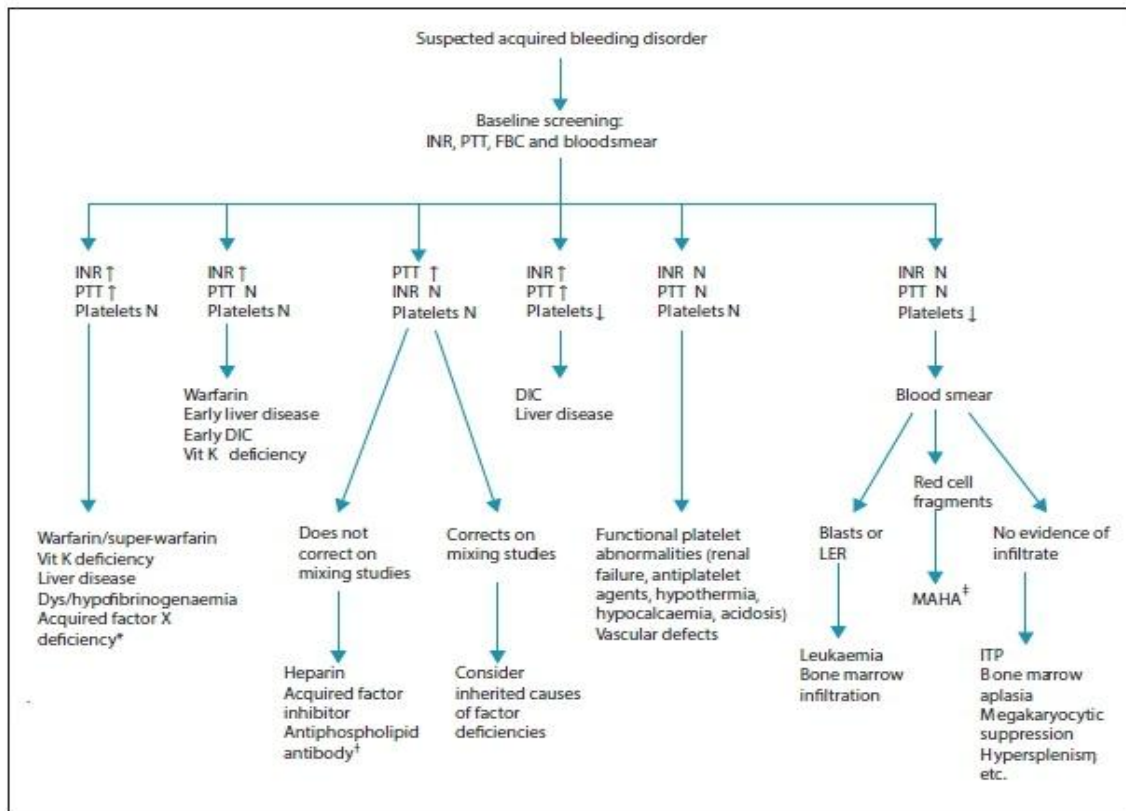
θρόμβωση και ενδοθηλιακή βλάβη μικρών αγγείων (μικροαγγειοπάθεια) που οδηγεί σε μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, θρομβοπενία εκ καταπόνησης, και ισχαιμική βλάβη οργάνων. Απαντάται τόσο σε κληρονομική, όσο και σε επίκτητη μορφή, οι οποίες σχετίζονται με έλλειψη του μορίου ADAMTS13, μια πρωτεάση που διασπά πολυμερή του παράγοντα von Willebrand. Η επίκτητη μορφή της οφείλεται σε αντι-ADAMTS13 ανασταλτικά αυτοαντισώματα, τα οποία προκύπτουν είτε από ιδιοπαθή κατάσταση, είτε δευτεροπαθώς, επί εδάφους συστηματικού ερυθματώδους λύκου [49].

- ❖ **επίκτητη αιμορροφιλία:** πρόκειται για αυτοάνοσο νόσημα, το οποίο έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε άτομα με ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών και ασθενείς με διάφορα νοσήματα. Επιπρόσθετα μπορεί να προκύψει ως επιπλοκή από χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών ή από περιγεννητικές επιπλοκές. Σχετίζεται με την ανάπτυξη αυτοαντισωμάτων έναντι κάποιου από τους αντισταθμιστικούς παράγοντες, συνήθως του FVIII. Η διάγνωση της είναι ιδιαίτερα δύσκολη, λόγω της σπανιότητας και την πολυπλοκότητας των εργαστηριακών ευρημάτων. Προδιαθεσικοί παράγοντες για την εμφάνιση επίκτητης αιμορροφιλίας Α είναι οι ανοσολογικές διαταραχές σε ποσοστό 18% (όπως συστηματικός ερυθματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σύνδρομο Sjogren, αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, πολλαπλή σκλήρυνση και άλλες), μαιευτικές διαταραχές σε ποσοστό 8,4% (οποιοδήποτε αιμορραγικό επεισόδιο ιδιαίτερα μετά τον τοκετό και μέχρι χρονικό διάστημα 12 μηνών, πρέπει να τύχει λεπτομερούς διερεύνησης), αιματολογικές και ογκολογικές οντότητες (όπως συμπαγείς όγκοι των οργάνων, αιματολογικές κακοήθειες, χρόνια λεκφοκυτταρική λευχαιμία, πολλαπλούν μυέλωμα, λεμφοϋερπλαστικά σύνδρομα), δερματολογικές ασθένειες (όπως ψωρίαση, πέμφιγγα και πομφολυγώδης επιδερμόλυση), χορήγηση φαρμάκων (όπως β- λακταμικά αντιβιοτικά, πενικιλίνη, ιντερφερόνη, αμιοδαρόνη, φαινυτοΐνη, χλωραμφαινικόλη και μεθυλντόπα), λοιμώδη νοσήματα (όπως ηπατίτιδα Β και C), διαταραχές που σχετίζονται με τις μεταμοσχεύσεις και τις

μεταγγίσεις, καθώς και διαταραχές του πεπτικού και του αναπνευστικού συστήματος [42, 50, 51].

- ❖ αρτηριοφλεβικές δυσπλασίες, που μπορεί να δημιουργηθούν στον εγκέφαλο ή σε άλλα μέρη του σώματος και να οδηγήσουν σε αιμορραγία πριν από τη γέννηση ή σε μελλοντικό χρόνο στη ζωή του ατόμου. Αυτές οι περιπτώσεις είναι πολύ σπάνιες [52].
- ❖ Επίκτητες αιμορραγικές διαταραχές οφειλόμενες σε διαταραχές των αγγείων, όπως γεροντική πορφύρα, πορφύρα σχετιζόμενη με λοιμώξεις, σκορβούτο, πορφύρα σχετιζόμενη με την λήψη κορτικοειδών και πορφύρα Henoch-Schönlein.

Εικόνα 9. Αλγόριθμος εργαστηριακής διερεύνησης επί υποψίας επίκτητης αιμορραγικής διαταραχής. Πηγή: South African Medical Journal, 2018, (Figure 1). [40].



*Fig. 1. Laboratory approach to a suspected acquired bleeding disorder. (LER = leuko-erythroblastic blood reaction (signifying possible bone marrow infiltration); INR = international normalised ratio; PTT = partial prothrombin time; N = normal; FBC = full blood count; DIC = disseminated intravascular coagulation; vit = vitamin; MAHA = microangiopathic haemolytic anaemia; ITP = immune thrombocytopenia.) (*Associated with amyloidosis; †Antiphospholipid antibodies usually cause thrombosis, not bleeding; however, rare instances of prothrombin deficiency can be associated with bleeding; ‡Except for DIC.)*

1.3.2 Κληρονομικές αιμορραγικές διαταραχές

Οι κληρονομικές αιμορραγικές διαταραχές διακρίνονται σε κληρονομικές διαταραχές της πρωτογενούς αιμόστασης, κληρονομικές διαταραχές του μηχανισμού της πήξης και σε κληρονομικές διαταραχές οι οποίες σχετίζονται με τα αιμοπετάλια [53-56].

Κληρονομικές διαταραχές πρωτογενούς αιμόστασης

- ❖ Νόσος von Willebrand (vWD) Είναι η πιο συχνή κληρονομική αιμορραγική διαταραχή με επίπτωση στο γενικό πληθυσμό περίπου 1% και οφείλεται σε

ποσοτική ή ποιοτική ανεπάρκεια του FvW. Ποσοστό περίπου 0,02-0,1% από τους πάσχοντες παρουσιάζει σοβαρές αιμορραγικές διαταραχές. Η νόσος κληρονομείται με τον αυτοσωματικό επικρατή χαρακτήρα. Στην κλινικο - εργαστηριακή έκφραση της νόσου συμμετέχουν διαταραχές της πρωτογενούς και της δευτερογενούς αιμόστασης

❖ Θρομβασθένειες, οι οποίες είναι σπάνιες κληρονομικές ποιοτικές διαταραχές των αιμοπεταλίων. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται:

- ✓ Το σύνδρομο Bernard-Soulier, το οποίο είναι κληρονομική διαταραχή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων και σε μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν τη γλυκοπρωτεΐνη Ib, η οποία αποτελεί αιμοπεταλιακό υποδοχέα του vWF. Η διαταραχή της γλυκοπρωτεΐνης Ib, δεν επιτρέπει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και εκδηλώνεται με αιμορραγικές εκδηλώσεις από τους βλεννογόνους και το δέρμα καθώς και αιμορραγικές επιπλοκές μετά από μικρά ή μεγάλα χειρουργεία. Στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος παρατηρούνται γιγάντια αιμοπετάλια (μέγεθος ερυθρού), τα οποία ωστόσο είναι φυσιολογικά σε αριθμό
- ✓ Θρομβασθένεια Glanzmann, η οποία είναι κληρονομική διαταραχή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων και οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις γλυκοπρωτεΐνες – υποδοχείς του ινωδογόνου IIb/IIIa. Η έλλειψη ή δυσλειτουργία αυτών των πρωτεϊνών δεν επιτρέπει την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο τραυματισμένο υπενδοθήλιο, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η πρωτογενής αιμόσταση. Η κλινική εικόνα και τα ευρήματα από το επίχρισμα του περιφερικού αίματος είναι ίδια με αυτά του συνδρόμου Bernard-Soulier.
Η διάγνωση των κληρονομικών διαταραχών των αιμοπεταλίων γίνεται σε εξειδικευμένα κέντρα, ενώ η αντιμετώπισή τους είναι κοινή και περιλαμβάνει: αντιϊνωδολυτικούς παράγοντες, ανασυνδυασμένο

παράγοντα VIIa, δεσμοπρεσσίνη, ορμονική θεραπεία και μετάγγιση αιμοπεταλίων. Υπάρχει ισχυρή σύσταση προς τους πάσχοντες να αποφεύγουν τη χρήση ασπιρίνης και άλλων φαρμακευτικών ουσιών που μπορούν να επιβαρύνουν περαιτέρω τη λειτουργία των αιμοπεταλίων.

- ✓ Κληρονομική έλλειψη του υποδοχέα των αιμοπεταλίων GPVI. Η γενετική βάση της πάθησης δεν είναι απόλυτα γνωστή, αλλά γνωρίζουμε ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας συμμετέχει στην αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο και συμμετέχει στην απελευθέρωση των κοκκίων από τα αιμοπετάλια και στη συσσώρευση τους για τη δημιουργία θρόμβου, κατά την πρωτογενή αιμόσταση.

Κληρονομικές διαταραχές του πηκτικού μηχανισμού

- ❖ Αιμορροφιλία A: είναι η συχνότερη μορφή και οφείλεται σε ανεπάρκεια της ενδογενούς οδού πήξης λόγω απουσίας ή δυσλειτουργίας του FVIII.
- ❖ Αιμορροφιλία B: οφείλεται σε ανεπάρκεια της ενδογενούς οδού πήξης λόγω απουσίας ή δυσλειτουργίας του FIX. Είναι σπανιότερη από την B μορφή
- ❖ Αιμορροφιλία C: είναι μια πολύ σπάνια νόσος, η οποία οφείλεται σε ανεπάρκεια της ενδογενούς οδού πήξης λόγω απουσίας ή δυσλειτουργίας του FXI. Σε όλες τις μορφές αιμορροφιλίας η πρωτογενής αιμόσταση είναι φυσιολογική

Αιμορραγική διάθεση οφειλόμενη σε κληρονομικές διαταραχές των αγγείων

- ❖ Κληρονομική αιμορραγική τηλαγγειεκτασία (Νόσος Rendu-Osler). Αποτελεί κληρονομική διαταραχή ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου, η οποία χαρακτηρίζεται από την απουσία τριχοειδικού δικτύου στη περιοχή των βλαβών, με συνέπεια την άμεση σύνδεση μεταξύ αρτηρίας και φλέβας. Η νόσος κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα. Στην παθογένεσή της εμπλέκονται μεταλλάξεις σε τουλάχιστον πέντε γονίδια, ωστόσο το 85% των περιπτώσεων προέρχεται από μεταλλάξεις δύο γονιδίων, των ENG-endoglin και ACVRL1/ALK1 [57]

- ❖ Κληρονομικές διαταραχές του συνδετικού ιστού, σύνδρομο Ehlers-Danlos. Το σύνδρομο Ehlers-Danlos (EDS) αποτελεί ομάδα ετερογενών κληρονομικών νοσημάτων του συνδετικού ιστού, τα οποία χαρακτηρίζονται ιστολογικά από διαταραχές στη σύνθεση του κολλαγόνου και κλινικά α) από υπερελαστικότητα και ευθραυστότητα του δέρματος, β) υπερευλυγισία και υπερεκτασιμότητα των αρθρώσεων και γ) ευθραυστότητα των αιμοφόρων αγγείων με αιμορραγική διάθεση. Ο αγγειακός τύπος του συνδρόμου σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο COL3A1 [58].

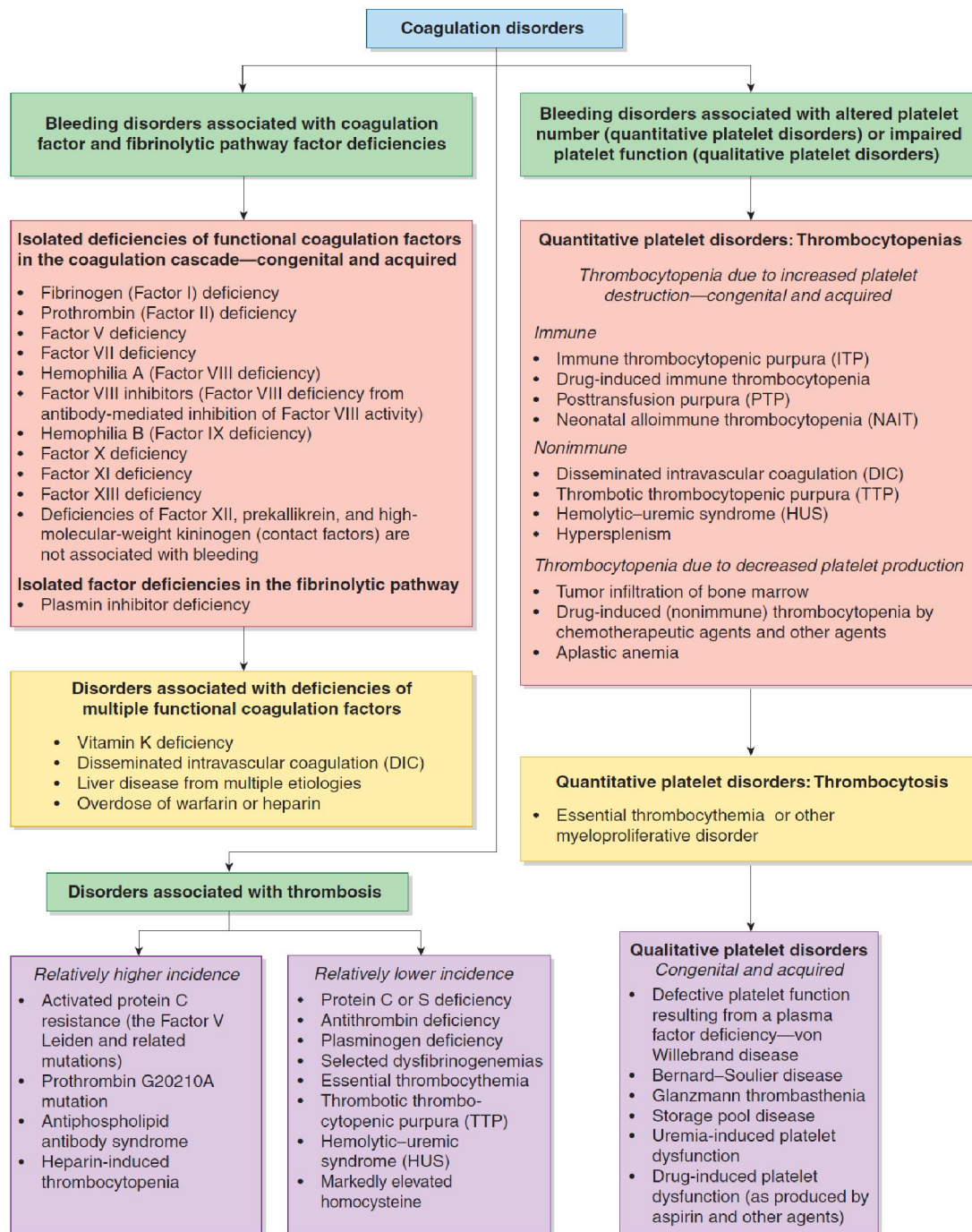
Κληρονομικές ενδοκυττάρειες διαταραχές των αιμοπεταλίων (Storage Pool Disease)

Οι διαταραχές αυτές σχετίζονται με την έλλειψη βιοχημικά ενεργών ουσιών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων κατά την πρωτογενή αιμόσταση, και βρίσκονται αποθηκευμένες σε ενδοκυτταρικά οργανίδια. Πρόκειται για σπάνιες διαταραχές με εξειδικευμένη εργαστηριακή διερεύνηση και εξατομικευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση [59-61]. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι παρακάτω διαταραχές:

- ❖ Ιδιοπαθής έλλειψη πυκνών σωματίων ή δεξαμενών αποθήκευσης. Τα πυκνά σωματίδια περιέχουν ασβέστιο, σεροτονίνη, διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)
- ❖ Σύνδρομο Hermansky-Pudlak: αφορά στα πυκνά κοκκία και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα
- ❖ Σύνδρομο Chediak-Higashi: αφορά στα πυκνά κοκκία και κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα
- ❖ Έλλειψη α-κοκκίων ή σύνδρομο φαιού αιμοπεταλίου. Τα α-κοκκία περιέχουν β-θρομβογλοβουλίνη, PF4, P-σελεκτίνη, ινωδογόνο και FV
- ❖ Διαταραχές στην κινητοποίηση του Ca^{++}

- ❖ Διαταραχή Quebec: αφορά στα α-κοκκία και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα.

Εικόνα 10. Κατηγοριοποίηση των επίκτητων και κληρονομικών αιμορραγικών διαταραχών. Πηγή: <https://basicmedicalkey.com/bleeding-and-thrombotic-disorders/>



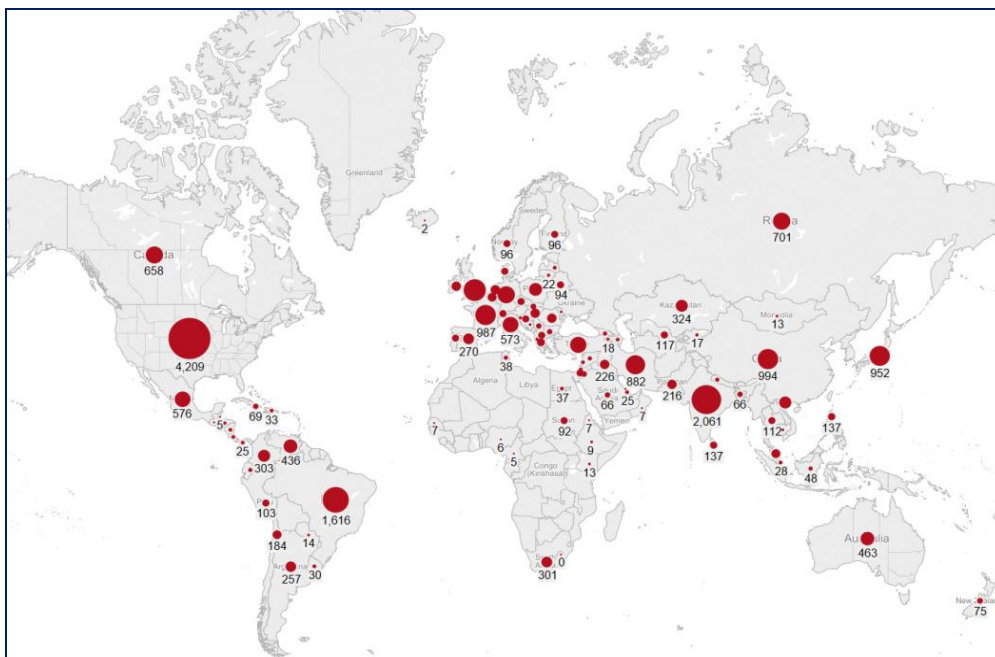
A classification of coagulation disorders.

Source : Laboratory Medicine Diagnosis of Disease in Clinical Laboratory 2E

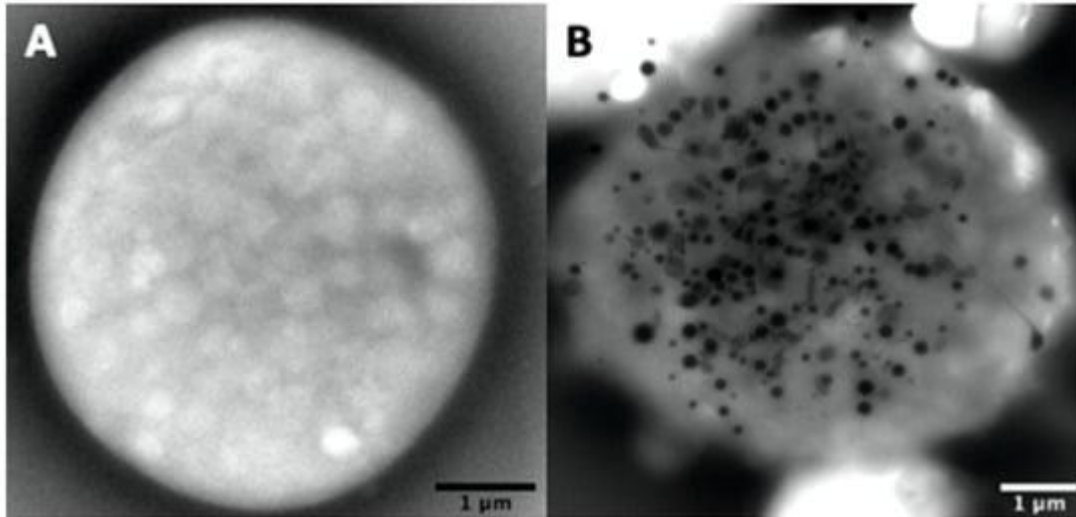
Εικόνα 11. Επίπτωση της αιμορροφιλίας Α σε παγκόσμιο επίπεδο. Πηγή:
<http://www.hemohelper.com/incidence-of-hemophilia-a/>



Εικόνα 12. Επίπτωση της αιμορροφιλίας Β σε παγκόσμιο επίπεδο. Πηγή:
<http://www.hemohelper.com/incidence-of-hemophilia-a/>



Εικόνα 13. Ενδοκυττάρειες διαταραχές των αιμοπεταλίων κατά την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: σύνδρομο Hermansky–Pudlak (A) και σύνδρομο φαίου αιμοπεταλίου (B). Πηγή: J. Clin. Med, 2020, (Figure 5). [59].



1.4 Θρόμβωση - Θρομβοφιλική Διάθεση

Με τον όρο θρόμβωση ορίζεται η δημιουργία ενός σταθερού θρόμβου ινικής και/ ή αιμοπεταλίων, που έρχεται σε άμεση σχέση με το αγγειακό τοίχωμα και αποφράσσει μερικά ή ολικά μία φλέβα ή αρτηρία, λόγω διαταραχής του αιμοστατικού μηχανισμού και φθοράς του ενδοθηλίου. Η θρόμβωση εκδηλώνεται ως εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ή έμφραγμα του μυοκαρδίου [62]. Η θρόμβωση απαντάται συχνότερα σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και είναι ένα από τα συχνότερα αίτια νοσηρότητας και θνησιμότητας. Από τα επιδημιολογικά στοιχεία που αφορούν στις ΗΠΑ, παρατηρούνται περίπου 100 νέα επεισόδια ανά 100.000 του πληθυσμού ανά έτος, με σαφείς διαφορές ανάλογα με την ηλικία [63,64].

1.5 Παράγοντες κινδύνου για θρόμβωση

Ο παράγοντας κινδύνου για θρόμβωση δεν είναι πάντα εύκολο να ταυτοποιηθεί. Σε πολλά άτομα δεν εκδηλώνεται θρόμβωση, αν και έχουν πολλαπλούς παράγοντες

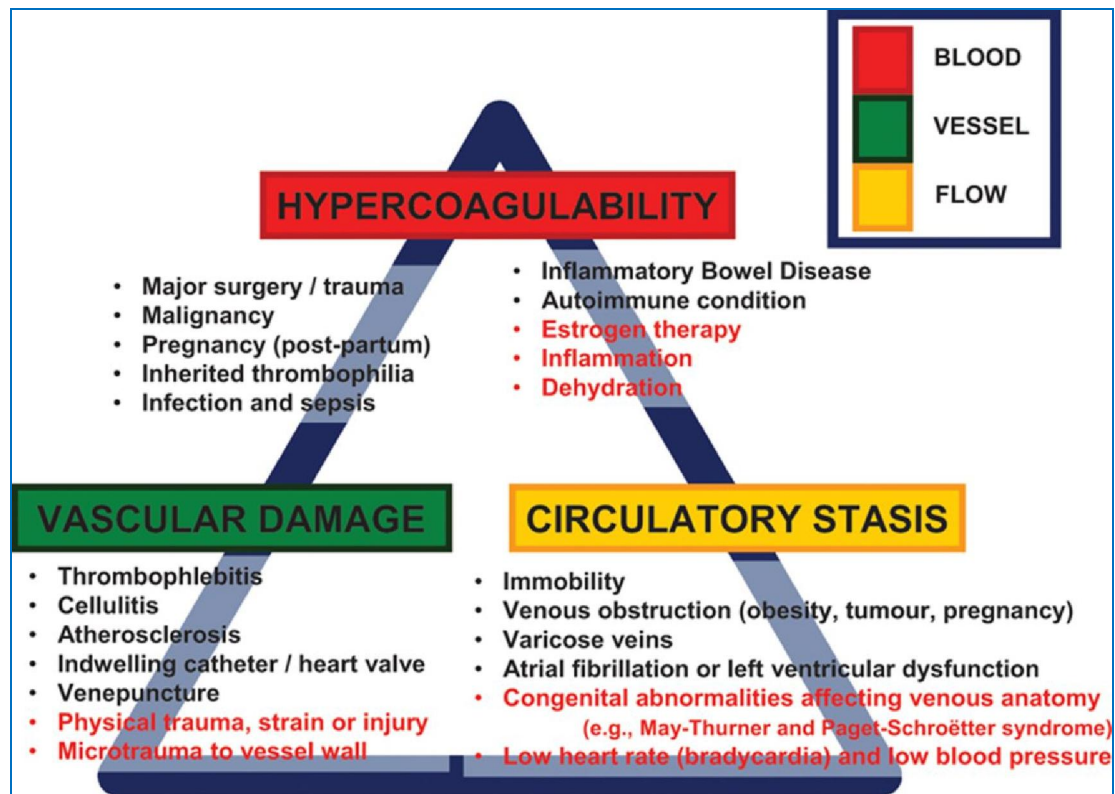
κινδύνου, ενώ άλλα άτομα εκδηλώνουν θρόμβωση χωρίς εμφανές αίτιο. Περίπου στο 25% των περιπτώσεων η θρόμβωση χαρακτηρίζεται ιδιοπαθής. Πολλές θρομβώσεις συνδέονται με χειρουργικές επεμβάσεις και μπορεί να εμφανιστούν είτε διεγχειρητικά, είτε μετεγχειρητικά [62].

Σύμφωνα με τον Virchow, στη δημιουργία θρόμβωσης συμβάλουν τρεις βασικοί παθοφυσιολογικοί παράγοντες [65]:

- η φλεβική στάση: στις περιοχές φλεβικής στάσης οι θύλακες των φλεβικών βαλβίδων χρησιμεύουν ως προέλευση των φλεβικών θρόμβων. Η φλεβική στάση μπορεί να οφείλεται σε παρατεταμένη ακινησία, απόφραξη, παχυσαρκία, κύηση, κακοήθεια, συγγενείς ανωμαλίες που επηρεάζουν την ανατομία των φλεβών (όπως για παράδειγμα σύνδρομο May – Turner) και άλλα.
- η ενδοθηλιακή βλάβη: οι περιοχές βλάβης του ενδοθηλίου χρησιμεύουν ως προέλευση των φλεβικών θρόμβων. Η ενδοθηλιακή βλάβη μπορεί να οφείλεται σε διάφορα αίτια, όπως κυτταρίτιδα, θρομβοφλεβίτιδα, αθηροσκλήρωση, τραυματισμό και άλλα.
- η υπερπηκτικότητα: η υπερπηκτικότητα μπορεί να προκύψει ως συνέπεια κακοήθειας, λοίμωξης και σήψης, θρομβοφιλίας, χειρουργικής επέμβασης, αυτοάνοσου νοσήματος, φλεγμονώδους νοσήματος του εντέρου και άλλα.

Εικόνα 14. Το τρίγωνο το Virchow.

Πηγή: <https://www.rcemlearning.co.uk/reference/deep-vein-thrombosis/>



Η εμφάνιση θρόμβωσης επηρεάζεται σημαντικά από επίκτητους και γενετικούς παράγοντες. Οι επίκτητοι παράγοντες μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με την συσχέτιση τους με την εμφάνιση θρόμβωσης, ως εξής [66-68]:

- ισχυρή συσχέτιση: κατάγματα του ισχίου ή ποδιού, αρθροπλαστική ισχίου ή γόνατος, μεγάλη γενική χειρουργική επέμβαση, σοβαρός τραυματισμός, βλάβη στη σπονδυλική στήλη. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με δέκα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης.
- μέτρια συσχέτιση: αρθροσκόπηση του γόνατος, κεντρικές φλεβικές γραμμές, χημειοθεραπεία, συμφορητική καρδιακή νόσος, αναπνευστική ανεπάρκεια, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, νεοπλασίες, χορήγηση αντισυλληπτικών ουσιών, παραλυτικό εγκεφαλικό επεισόδιο, θρομβοφιλία. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με σημαντική πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης.

- ασθενής συσχέτιση: ηλικία μεγαλύτερη των 40 ετών, λαπαροσκοπική χειρουργική επέμβαση, παχυσαρκία, κύηση και γαλουχία, κατάκλιση για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 3 ημέρες, παρατεταμένη ακινησία (όπως τα αεροπορικά ταξίδια με διάρκεια μεγαλύτερη από 8 ώρες), κίρσοι. Οι παράγοντες αυτοί σχετίζονται με διπλάσια πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης.

Η ίδια κατηγοριοποίηση ισχύει και για τους γενετικούς παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση θρόμβωσης και συγκεκριμένα [69,70]:

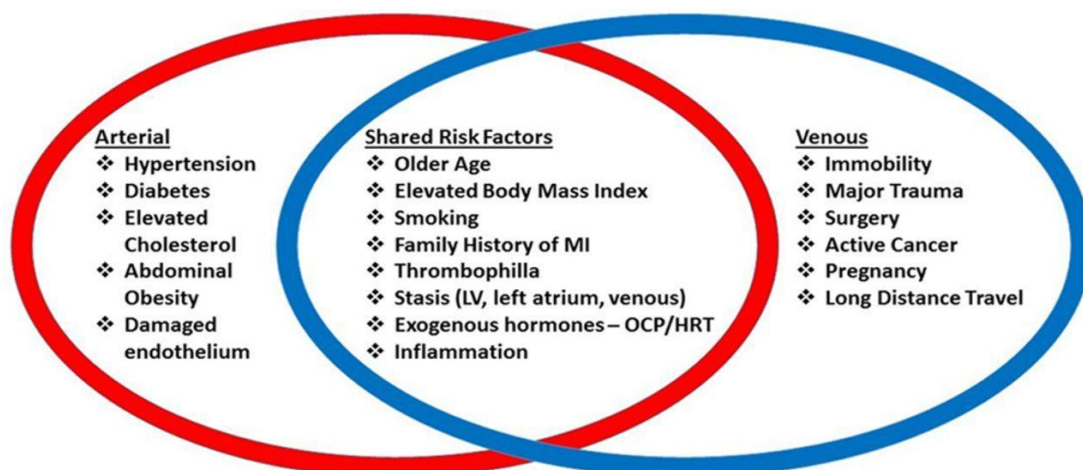
- ισχυρή συσχέτιση:
 - ✓ ανεπάρκεια φυσικών αναστολέων της πήξης (όπως είναι η αντιθρομβίνη, η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S, ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα, η θρομβομοντουλίνη και ο υποδοχέας ενδοθηλιακών πρωτεϊνών)
 - ✓ αυξημένα επίπεδα του παράγοντα VIII
- μέτρια συσχέτιση: σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι παρακάτω μεταλλάξεις
 - ✓ μετάλλαξη στο γονίδιο του FV Leiden η οποία σχετίζεται με αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
 - ✓ μετάλλαξη στο γονίδιο του FII η οποία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης,
 - ✓ ομάδα αίματος (εκτός της ομάδας O)
 - ✓ σημειακή μετάλλαξη στη γ-αλυσίδα του ινωδογόνου με αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη
- ασθενής συσχέτιση:
 - ✓ ομοζυγωτικά αλληλόμορφα 34Val του FXIII
 - ✓ σημειακή μετάλλαξη με αντικατάσταση της κυτοσίνης από θυμίνη στη θέση 677 της αναγωγής του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού οξέος (MTFR), η οποία σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης.

Η θρόμβωση συνήθως είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ επίκτητων και γενετικών παραγόντων κινδύνου. Η εμφάνιση θρομβώσεων σε άτομα μικρής ηλικίας, η υποτροπιάζουσα θρόμβωση ανεξάρτητα από την ηλικία του ατόμου, καθώς και η θρόμβωση σε σημεία που σώματος στα οποία απαντάται σπάνια (όπως τα μεσεντέρια, τα νεφρικά και τα ηπατικά αγγεία, οι εγκεφαλικές και οι οφθαλμικές φλέβες), ακριβώς λόγω της χαμηλής συχνότητας εμφάνισης απαιτούν πλήρη εργαστηριακή διερεύνηση.

Η σύγχρονη έρευνα εστιάζει στους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς της θρόμβωσης. Οι μηχανισμοί που διερευνώνται είναι:

- ❖ νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί μονής αλυσού
- ❖ ιδιότητες των ερυθρών αιμοσφαιρίων
- ❖ πρωτεΐνες ή ένζυμα ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων
- ❖ πρωτεΐνες ή ένζυμα ενεργοποιημένων μονοκυττάρων

Εικόνα 15. Παράγοντες κινδύνου για φλεβική και αρτηριακή θρόμβωση, καθώς και κοινοί παράγοντες κινδύνου. Πηγή: Circulation, 2017, (Figure 1). (HRT: hormone replacement therapy; LV: left ventricle; MI: myocardial infarction; OCP: oral contraceptive pills). [66].



1.6 Θρομβοφιλία

Ο όρος θρομβοφιλία περιγράφει την τάση εκδήλωσης θρόμβωσης και αναφέρεται σε άτομα τα οποία δεν έχουν εμφανίσει ακόμη επεισόδιο θρόμβωσης, αλλά ενδέχεται να το εκδηλώσουν. Τα άτομα αυτά συνήθως είναι επιβαρυνμένα με ένα ή περισσότερους παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι μπορεί να είναι κληρονομικοί, επίκτητοι ή συνδυασμός αυτών. Η θρομβοφιλία συνιστά προδιάθεση και όχι εγκατεστημένη νόσο. Στο πλαίσιο αυτό, πρέπει να συνεκτιμώνται οι παράγοντες κινδύνου του ατόμου και να εξατομικεύεται η αντιμετώπιση [71-74].

1.6.1 Επίκτητη θρομβοφιλία

Η επίκτητη θρομβοφιλία είναι αποτέλεσμα νεοπλασιών και παρουσιάζει διαρκώς αυξανόμενη επίπτωση. Εκτιμάται ότι ποσοστό 4% έως 20% των ασθενών με νεοπλασίες θα εκδηλώσουν θρόμβωση πριν ή μετά τη διάγνωσή της, ενώ η χορήγηση χημειοθεραπείας αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης στους ασθενείς με συμπαγείς κακοήθειες κατά 7% έως 11%. Η επίπτωση κυμαίνεται ανάλογα με τη θέση και το στάδιο του όγκου, τους ατομικούς παράγοντες θρόμβωσης του ασθενούς, τυχόν άλλα υποκείμενα νοσήματα και τη χορηγούμενη αγωγή. Οι ασθενείς με νεοπλάσματα του εγκεφάλου ή αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, ωοθηκών, παγκρέατος, παχέος εντέρου, στομάχου, προστάτη και νεφρού διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης θρόμβωσης, η οποία συχνότερα αφορά φλεβικό αγγειακό σκέλος. Η θρόμβωση και οι επιπλοκές της αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου στους ασθενείς με νεοπλασίες [75,76].

Η επίκτητη θρομβοφιλία παρουσιάζει θετική συσχέτιση και με τις αιματολογικές κακοήθειες. Τα νοσήματα που παρατίθενται παρακάτω, σχετίζονται με θρομβοφιλική διάθεση, η οποία έχει ιδιαίτερα κλινικά και παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά.

- μυελούπερπλαστικά νεοπλάσματα
- αληθής πολυκυτταραιμία
- ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση

- πολλαπλούν μυέλωμα
- νυχτερινή παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία

1.6.2 Συγγενής Θρομβοφιλία

Η εκτίμηση της γενετικής βάσης της θρομβοφιλίας χρονολογείται από το 1965, όταν ο Νορβηγός φυσικός Egeberg περιέγραψε μια περίπτωση οικογενούς θρόμβωσης, οφειλόμενης σε έλλειψη αντιθρομβίνης. Από τη γενετική διερεύνηση που διενεργήθηκε μετά από αυτό το γεγονός, περιγράφηκαν αρκετές μεταλλάξεις των φυσικών αναστολέων της πήξης, όπως η αντιθρομβίνη, πρωτεΐνη C και πρωτεΐνη S. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί εργαστηριακά διάφορες γενετικές διαταραχές σχετικά με τη μοριακή βάση της θρομβοφιλίας [77,78].

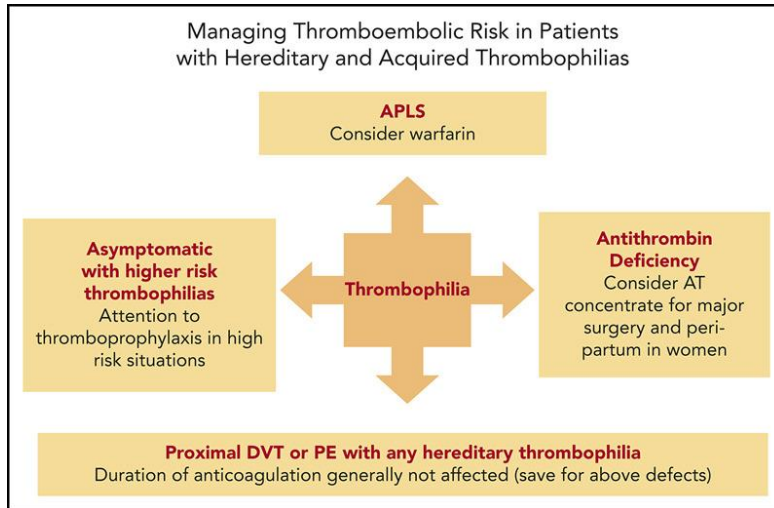
Τα αίτια της συγγενούς θρομβοφιλίας, με σειρά μειούμενης συσχέτισης είναι :

- ✓ ανεπάρκεια αντιθρομβίνης III
- ✓ ανεπάρκεια πρωτεΐνης C
- ✓ ανεπάρκεια πρωτεΐνης S
- ✓ αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C
- ✓ παράγοντας V Leiden
- ✓ μετάλλαξη προθρομβίνη G20210A
- ✓ ομοκυστινουρία
- ✓ αυξημένα επίπεδα παραγόντων πήξεως II, VIII, IX, XI
- ✓ αυξημένα επίπεδα παραγόντων πήξεως I, V, VII, von Willebrand
- ✓ μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης Z και Z-εξαρτώμενου αναστολέα πρωτεασών
- ✓ ανεπάρκεια του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
- ✓ αύξηση του αναστολέα 1 (PAI-1) του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
- ✓ μειωμένα επίπεδα του TFPI
- ✓ υποπλασμινογοναιμία
- ✓ δυσπλασμινογοναιμία
- ✓ υποϊνωδόλυση.

Εικόνα 16. Επιπολασμός της συγγενούς θρομβοφιλίας και των παραγόντων κινδύνου για θρόμβωση κατά τη διάρκεια της κύησης σε πληθυσμό των χωρών της Ευρώπης. Πηγή: ESC Guidelines for the management of cardiovascular diseases during pregnancy, 2018, (Table 18).

Risk factor	Prevalence (%)	Odds ratio (confidence interval)
Factor V Leiden mutation		
Heterozygous	2.0–7.0	8.32 (5.44, 12.70)
Homozygous	0.2–0.5	34.40 (9.86, 120.05)
Prothrombin G20210A mutation		
Heterozygous	2.0	6.80 (2.46, 18.77)
Homozygous	Rare	26.36 (1.24, 559.29)
Antithrombin deficiency (<80% activity)	<0.1–0.6	4.76 (2.15, 10.57)
Protein C deficiency (<75% activity)	0.2–0.3	4.76 (2.15, 10.57)
Protein S deficiency (<65% activity)	<0.1–0.1	2.19 (1.48, 6.00)

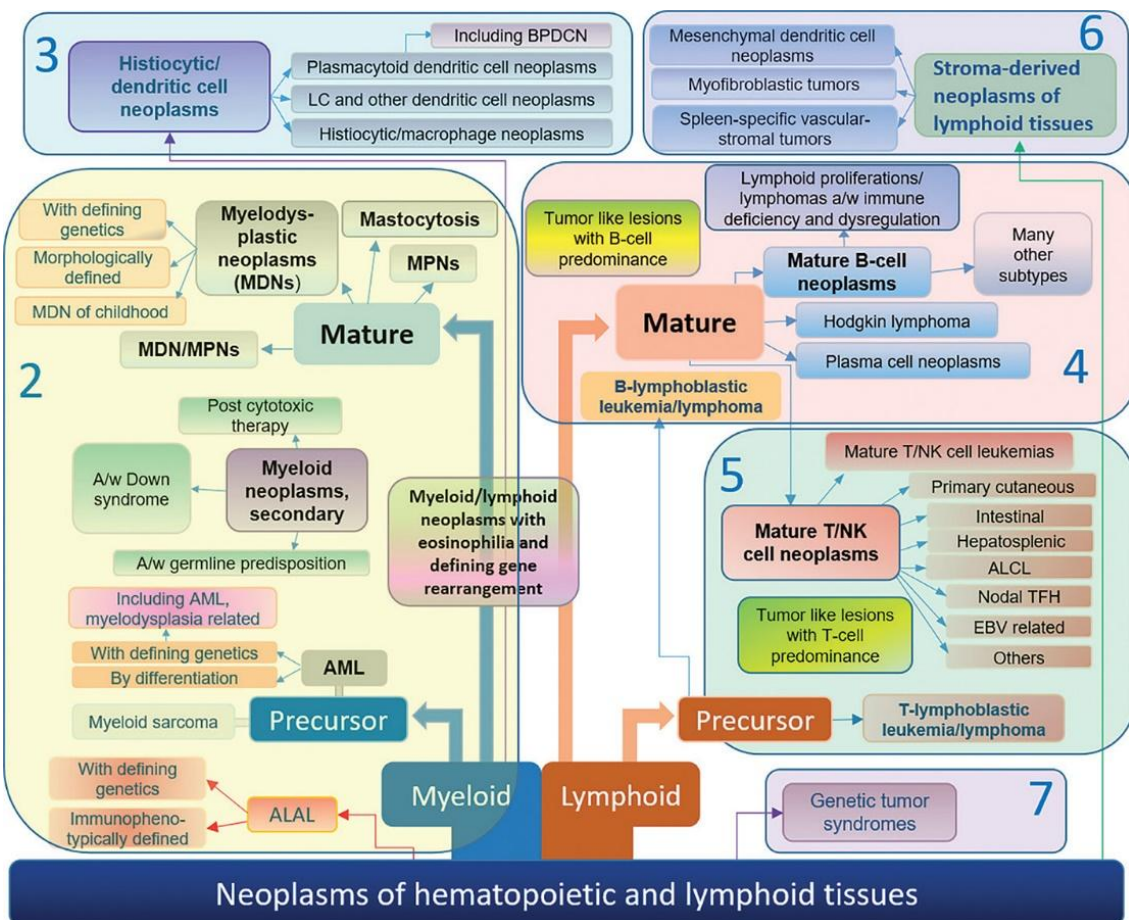
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση για τη διαχείριση των ασθενών με επίκτητη και συγγενή θρομβοφιλία. Πηγή: Blood, 2020, (Figure 1). [79].



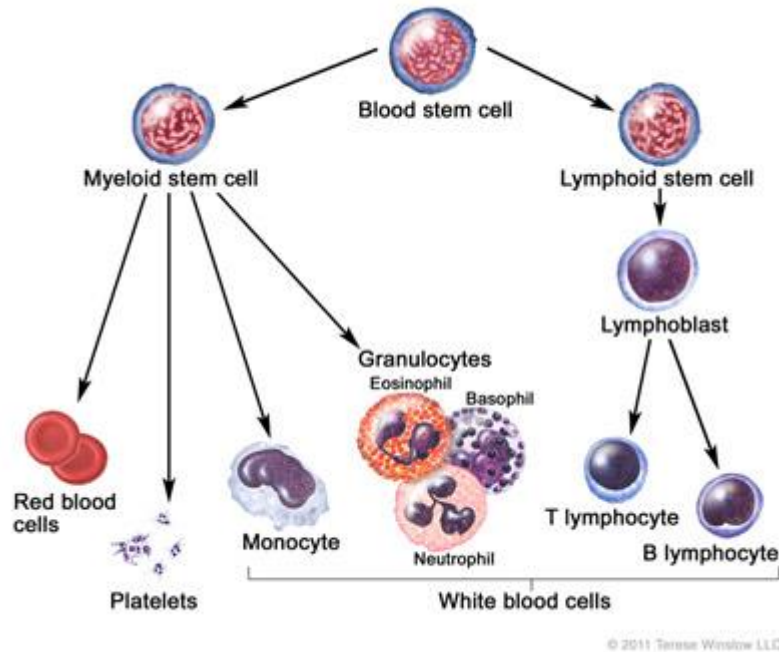
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΛΕΜΦΟΎΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Τα νεοπλάσματα των Β, Τ και ΝΚ λεμφοκυττάρων είναι όγκοι από ανώριμα και ώριμα Β,Τ και ΝΚ λεμφοκύτταρα που αναπτύσσονται σε διάφορα στάδια της διαφοροποίησης τους. Στην ταξινόμηση τους από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα διακρίνονται σε ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τη μορφολογία, τα ανοσοφαινοτυπικά ευρήματα, τα κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα, τα κλινικά χαρακτηριστικά και τον αντίστοιχο φυσιολογικό πληθυσμό λεμφοκυττάρων, όπου αυτός είναι προσδιορίσιμος [80].

Εικόνα 18. Κατηγοριοποίηση των αιματολογικών νεοπλασιών. Πηγή: Li, 2022, (Figure 1). [81].



Εικόνα 19. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων.
Πηγή: <https://curesearch.org/Hodgkin-Lymphoma-in-Children>



2.1 Νεοπλάσματα των Β-λεμφοκυττάρων και διαταραχές των Β- λεμφοκυττάρων

Τα νεοπλάσματα των Β-λεμφοκυττάρων αντιστοιχούν σε διάφορα στάδια της ωρίμανσής τους. Τα πρόδρομα Β-κύτταρα που ωριμάζουν στο μυελό των οστών μπορεί να υποστούν απόπτωση ή να αναπτυχθούν σε ώριμα παρθένα (naïve) Β-κύτταρα, τα οποία μετά από έκθεση σε αντιγόνο και βλαστική μεταμόρφωση, μπορεί να διαφοροποιηθούν σε βραχύβια πλασματοκύτταρα ή να εισέλθουν στο βλαστικό κέντρο, όπου θα συμβεί σωματική υπερμετάλλαξη και αλλαγή της τάξης της βαριάς αλυσίδας. Τα μεταμορφωμένα κύτταρα του βλαστικού κέντρου ονομάζονται κεντροβλάστες και μπορεί είτε να υποστούν απόπτωση, είτε να διαφοροποιηθούν σε κεντροκύτταρα. Τα λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα των ώριμων Β λεμφοκυττάρων αντιστοιχούν στα ώριμα Β λεμφοκύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί σε naïve Β λεμφοκύτταρα ή σε απογόνους τους. Η κατηγοριοποίηση τους σύμφωνα με τον ΠΟΥ είναι η εξής [80,82]:

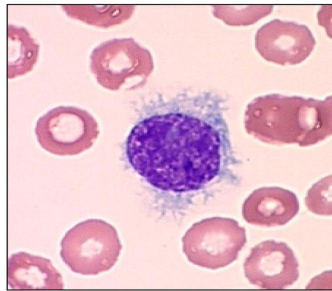
- Β λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα: οι λευχαιμίες είναι νεοπλασίες του λεμφικού ιστού που χαρακτηρίζονται ή συνοδεύονται από την παρουσία

νεοπλασματικών κυττάρων στο μυελό και το αίμα. Τα λεμφώματα είναι νεοπλασίες του λεμφικού ιστού στις οποίες το νεοπλασματικό κύτταρο διηθεί τα λεμφικά και άλλα όργανα χωρίς να κυκλοφορεί στο αίμα. Η διάκριση μεταξύ τους δεν είναι πάντοτε σαφής.

- διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα (DLBCL): χαρακτηρίζεται από κλινική και βιολογική ετερογένεια. Η εικοσαετής χρήση του rituximab βελτίωσε την έκβαση της νόσου ωστόσο η υποτροπή παραμένει η βασική αιτία θανάτου. Ειδικότερα η υποτροπή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα χαρακτηρίζεται από πολύ πτωχή πρόγνωση με διάμεση επιβίωση μόλις 2 ως 5 μήνες.
- λέμφωμα Burkitt's: είναι μία ταχύτατα αναπτυσσόμενη λεμφοϋπερπλαστική νόσος, η οποία προσβάλλει κυρίως παιδιά και νεαρούς ενήλικες, με τη συμμετοχή λεμφαδένων αλλά κυρίως εξωλεμφαδενικών θέσεων, όπως η γνάθος, το γαστρεντερικό σύστημα, οι νεφροί, το ΚΝΣ και ο μυελός των οστών [83]
- λεμφώματα με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα μεταξύ λεμφώματος Burkitt's και DLBCL (Double hit B lymphomas)
- σπάνια επιθετικά Β- λέμφώματα, όπως ενδαγγειακά, πλασμαβλαστικά, ALK+ και ALK- λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα και άλλα
- λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (Mantle Cell Lymphoma): ο συχνότερες θέσεις εντόπισης αφορούν στους λεμφαδένες, στο σπλήνα και στο μυελό των οστών, ενώ σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών παρατηρείται διήθηση και του γαστρεντερικού σωλήνα. Στην πλειοψηφία των ασθενών χαρακτηρίζεται από επιθετική συμπεριφορά, συχνές υποτροπές και βραχεία επιβίωση
- οζώδες λέμφωμα: πρόκειται για ένα πολύ βραδέως αναπτυσσόμενο νόσημα με συνήθεις θέσεις εντοπισμού τους λεμφαδένες, το σπλήνα και το μυελό των οστών. Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει συσχέτιση της νόσου με έκθεση στο βενζόλιο, σε φυτοφάρμακα και το κάπνισμα
- άλλα μη επιθετικά Β λεμφώματα, όπως μακροσφαιριναιμία Waldenström και λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα

- λέμφωμα οριακής ζώνης: αποτελεί σπάνιο υπότυπο που αφορά ποσοστό μικρότερο από 2% του συνόλου των λεμφωμάτων και κατατάσσεται στα λεμφώματα χαμηλής κακοήθειας. Εμφανίζεται συνήθως σε άτομα μέσης προς μεγάλης ηλικίας. Τα λεμφώματα οριακής ζώνης διακρίνονται σε σπληνικά, λεμφαδενικά και εξωλεμφαδενικά [84]
- μονοκλωνική Β λεμφοκυττάρωση
- χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία/ λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα
- λεμφώματα τύπου MALT

Εικόνα 20. Λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων. Πηγή : <https://www.lymphoma.org.au/>



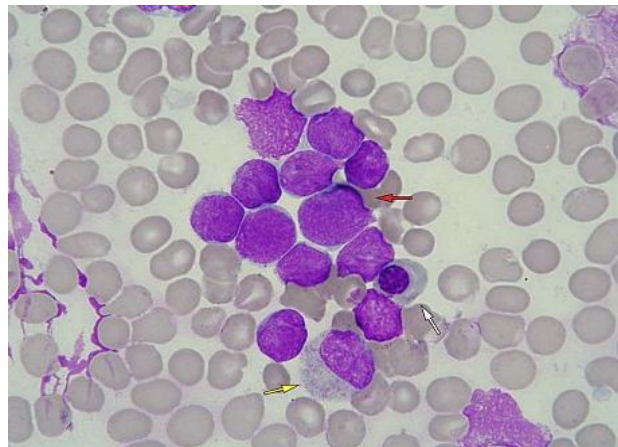
2.2 Λεμφώματα από T και NK λεμφοκύτταρα

Οι T και NK λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες αποτελούν σπάνια κλωνικά νεοπλάσματα που προέρχονται από τα T λεμφοκύτταρα και από τα κύτταρα φυσικοί-φονείς NK (Natural Killer) σε διάφορα στάδια της διαφοροποίησής τους. Τα διαθέσιμα σύγχρονα εφόδια για τη θεραπευτική αντιμετώπισή τους είναι πτωχά σε σχέση με τα αντίστοιχα των επιθετικών Β λεμφωμάτων και τα περισσότερα T λεμφώματα έχουν πτωχή πρόγνωση. Η πιο συχνή T λεμφοϋπερπλαστική εξεργασία είναι το T περιφερικό λέμφωμα, μη περαιτέρω ταξινομούμενο (NOS) και στη συνέχεια ακολουθούν το αγγειοανοσοβλαστικό λέμφωμα και το T αναπλαστικό λέμφωμα [85].

Οι T και NK λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες ταξινομούνται σε:

- T - λεμφοβλαστική λευχαιμία/λέμφωμα
- κοινά T λεμφώματα
- σπάνια T και NK λεμφώματα, όπως ηπατοσπληνικό T-λέμφωμα, εξωλεμφαδενικό λέμφωμα T/NK ρινικού τύπου και T-λέμφωμα σχετιζόμενο με εντεροπάθεια

Εικόνα 21. T-λεμφοβλαστική λευχαιμία/ λέμφωμα. Πηγή: <https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--precursor-lymphoid-neoplasms--t-lymphoblastic-leukaemia-lymphoma--nos#1>



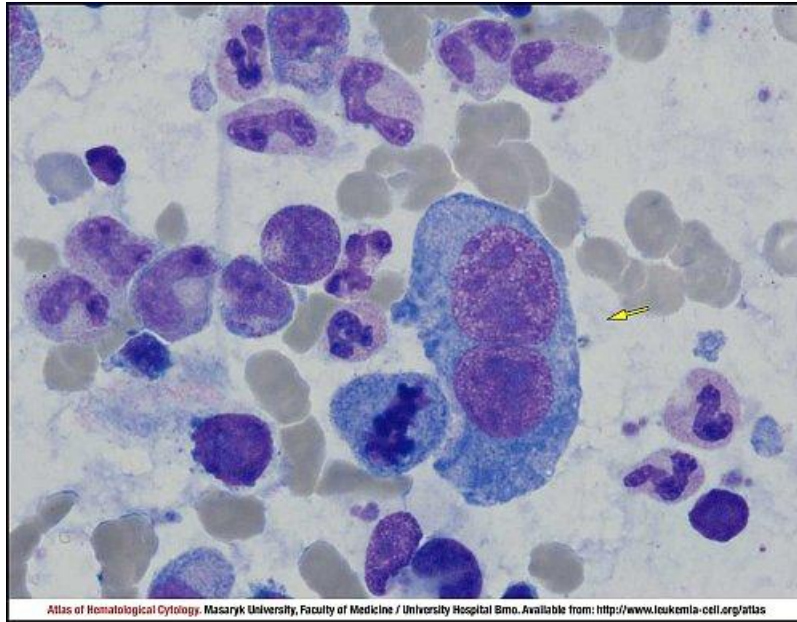
2.3 Λέμφωμα Hodgkin's

Οι διάφοροι τύποι του λεμφώματος Hodgkin (HL) εμφανίζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά: α) συνήθως προσβάλλουν λεμφαδένες και ιδιαίτερα τους τραχηλικούς, β) αφορούν στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σε νέους ενήλικες, γ) ιστολογικά παρατηρείται μικρός αριθμός διάσπαρτων ευμεγέθων νεοπλασματικών κυττάρων Hodgkin και Reed-Sternberg (RS) εν μέσω αφθόνων μη νεοπλασματικών κυττάρων και δ) τα νεοπλασματικά κύτταρα συχνά περιβάλλονται από T λεμφοκύτταρα [86]. Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι:

- Κλασικό λέμφωμα HL
- Οζώδης λεμφοεπικρατών τύπος HL.

Εικόνα 22. Λέμφωμα Hodgkin's: στο παρακεύασμα διακρίνονται στα κύτταρα Reed-Sternberg (κίτρινο βέλος).

Πηγή: <https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--hodgkin-lymphoma--classic--nos#1>



2.4 Ειδικές κατηγορίες λεμφωμάτων

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται λεμφώματα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με HIV και αυτοάνοσα νοσήματα, δερματικά λεμφώματα, το πρωτοπαθές λέμφωμα του ΚΝΣ, τα λεμφώματα από ιστιοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα, καθώς και η νόσος Castleman.

Η νόσος Castleman είναι μια σπάνια, σοβαρή νόσος των λεμφαδένων και των συναφών ιστών, η οποία απαντάται σε δυο μορφές:

- τη μονοκεντρική (μονοεστιακή) μορφή, η οποία προσβάλλει μία περιοχή ή ομάδα λεμφαδένων
- την πολυκεντρική (πολυεστιακή), η οποία προσβάλλει δύο ή και περισσότερες ομάδες λεμφαδένων. Η πολυκεντρική μορφή ταξινομείται περαιτέρω σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν ο ασθενής είναι θετικός ως προς τον ερπητοϊό HHV-8 ή όχι (ιδιοπαθής πολυκεντρική Νόσος Castleman).

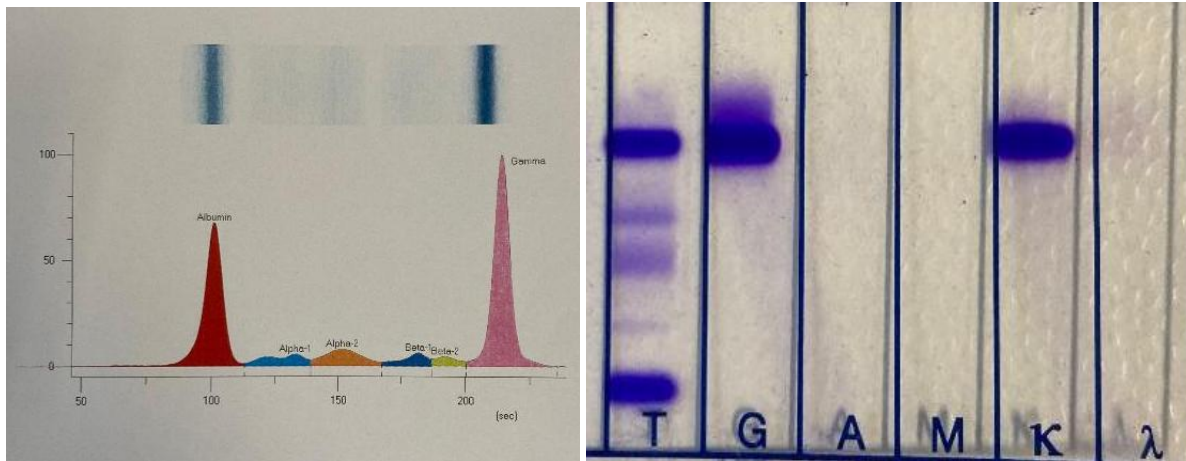
Η Νόσος Castleman είναι σπάνια, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί ο αριθμός των ασθενών παγκοσμίως. Εκτιμάται ότι είναι μικρότερος από 1 ανά 100.000 πληθυσμού, γεγονός που την κατατάσσει στα σπάνια νοσήματα. Η διάγνωση της είναι δύσκολη, καθώς τα συμπτώματα της νόσου είναι πολύ συχνά παρόμοια με άλλες νόσους και διαταραχές [87].

2.5 Νεοπλάσματα πλασματοκυττάρων

Τα πλασματοκυτταρικά νεοπλάσματα συνιστούν ομάδα κακοήθων νόσων που προκύπτουν από την ανάπτυξη ενός κλώνου πλασματοκυττάρων. Χαρακτηρίζονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων από την παραγωγή και έκκριση μιας ηλεκτροφορητικά και ανοσοϊστοχημικά ομοιογενούς (μονοκλωνικής) ανοσοσφαιρίνης ή τμήματος ανοσοσφαιρίνης στον ορό ή και στα ούρα που είναι γνωστή ως Μ-πρωτεΐνη ή παραπρωτεΐνη [88]. Διακρίνονται σε :

- μονοκλωνική γαμμαπάθεια μη καθορισμένης σημασίας (MGUS)
- μονήρες πλασματοκύτωμα
- πολλαπλούν μυέλωμα
- νοσήματα από εναπόθεση ανοσοσφαιρινών, όπως η αμυλοείδωση, η νόσος των βαρέων αλυσίδων και η νόσος των ελαφρών αλυσίδων.

Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση και ανοσοκαθήλωση πρωτεϊνών ορού, σε δείγμα ασθενούς με πολλαπλούν μυέλωμα, με παθολογική κορυφή στην περιοχή των γ-σφαιρινών, που αντιστοιχεί σε παραπρωτεΐνη IgG-K. Πηγή: ίδια επεξεργασία.

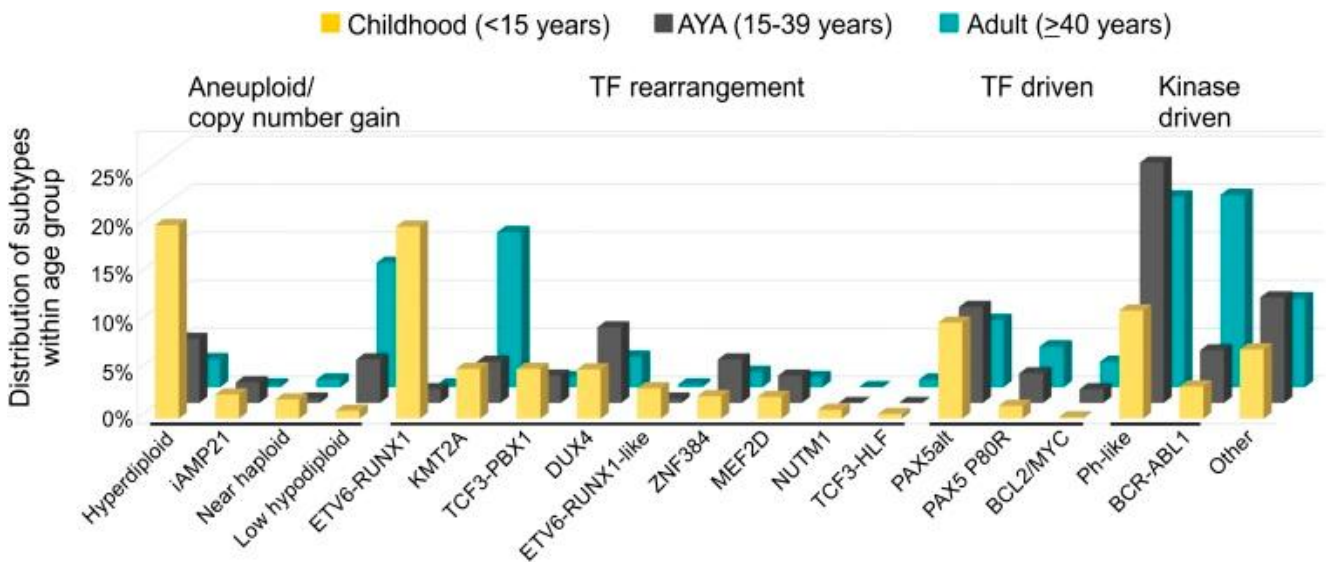


2.6 Παιδιατρικές λεμφικές νεοπλασίες

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (B ή T) και τα παιδιατρικά λεμφώματα.

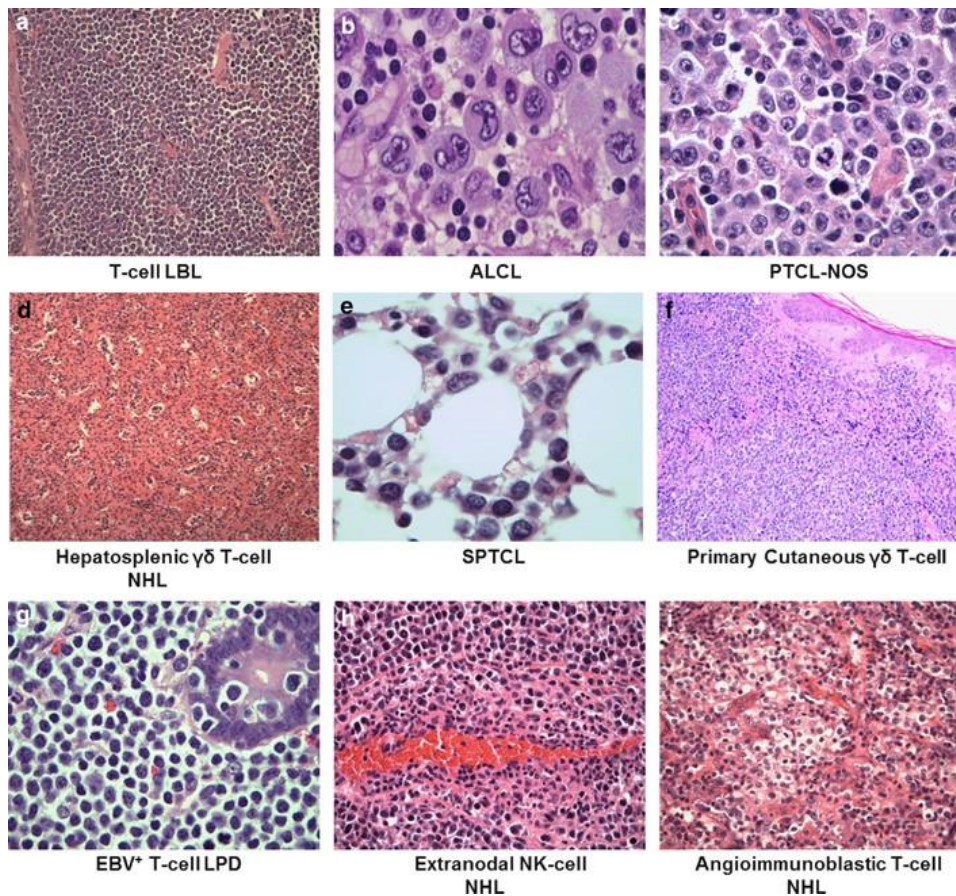
Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια της παιδικής ηλικίας και αποτελεί το 75-80% του συνολικού αριθμού των λευχαιμιών, καθώς και το 25-30% των νεοπλασιών που παρατηρούνται στα παιδιά και τους εφήβους. Στην Ελλάδα καταγράφονται περίπου 100 νέες περιπτώσεις ετησίως, με μέγιστη επίπτωση σε παιδιά ηλικίας 2 ως 6 ετών και μεγαλύτερη συχνότητα στα άρρενα. Η νόσος παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστά τα αίτια για αυτό το φαινόμενο. Οι παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της περιλαμβάνουν συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αυξημένο βάρος γέννησης, έκθεση σε ακτινοβολία, φάρμακα, χημικές ουσίες και λοιμογόνους παράγοντες, καθώς και παρουσία συγκεκριμένου αντιγόνου ιστοσυμβατότητας (HLA-DRB4*01) και της μετάλλαξης του γονιδίου HFE [89,90].

Εικόνα 24. Κατανομή όλων των υποτύπων Β-οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας σε διάφορες ηλικιακές ομάδες, ανάλογα με το γενετικό τους αίτιο-υπόβαθρο. Πηγή: Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2018, (Figure 1). [89].



Παιδιατρικά λεμφώματα αποτελούν την τρίτη κατά σειρά νεοπλασία της παιδικής ηλικίας μετά την ΟΛΛ και τις νεοπλασίες του ΚΝΣ. Διακρίνονται σε δυο κύριους κλινικοπαθολογοανατομικούς τύπους, τα Hodgkin και τα non Hodgkin λεμφώματα. Επιπρόσθετα, παρατηρούνται και κάποιες μορφές σπανίων λεμφωμάτων στα παιδιά, όπως για παράδειγμα το λεμφοζιδιακό λέμφωμα παιδιατρικού τύπου, με πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης [81, 91].

Εικόνα 25. Ιστολογικές εικόνες από διάφορους τύπους T και NK λεμφωμάτων σε παιδιά και ενήλικες. Πηγή: Blood Cancer Journal, 2012, (Figure 1). [91].



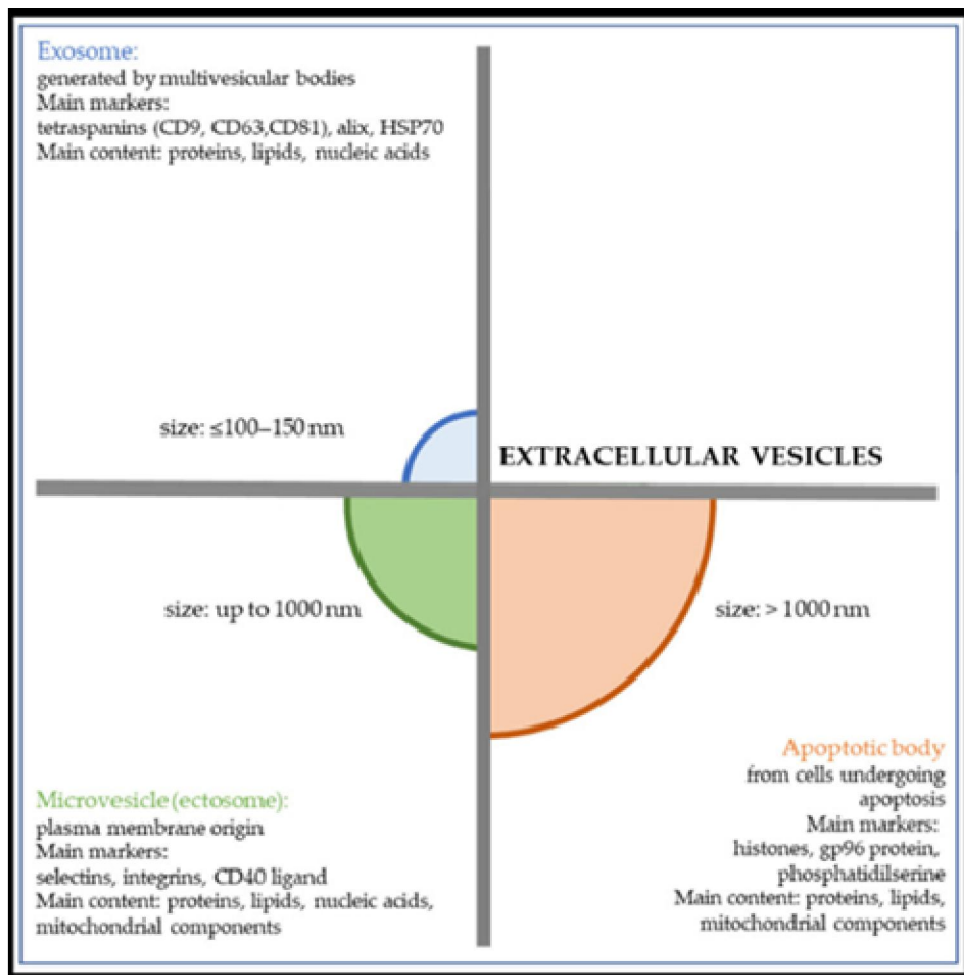
Συνοψίζοντας, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων, με ιδιαίτερες βιολογικές, διαγνωστικές και κλινικές προκλήσεις. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση των παθογενετικών τους μηχανισμών, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων προγνωστικών δεικτών και την εισαγωγή νέων θεραπειών που στοχεύουν σε κρίσιμες διεργασίες των νεοπλασματικών κυττάρων.

Κεφάλαιο 3.: ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

3.1 Εισαγωγικά

Το ενδιαφέρον για τα εξωκυττάρια κυστίδια (Extracellular Vesicles-EVs) και για τις φυσιολογικές και παθολογικές τους επιπτώσεις βαίνει ολοένα αυξανόμενο, όπως αποτυπώνεται από πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων, εικόνα 26, [92].

Εικόνα 26. Εξωκυττάρια κυστίδια: Τα κύρια χαρακτηριστικά των τριών κύριων υποπληθυσμών των εξωκυττάρων κυστιδίων. Πηγή: Life Sciences, 2021, (Figure 1). [93].



Τα μικροσωματίδια, συνιστούν μικρά εξωκυτταρικά κυστίδια που απελευθερώνονται από τα κύτταρα ως απάντηση στην ενεργοποίηση ή την απόπτωση. Μεταξύ των διαφόρων μικροσωματιδίων που κυκλοφορούν στο αίμα των υγιών ατόμων, τα

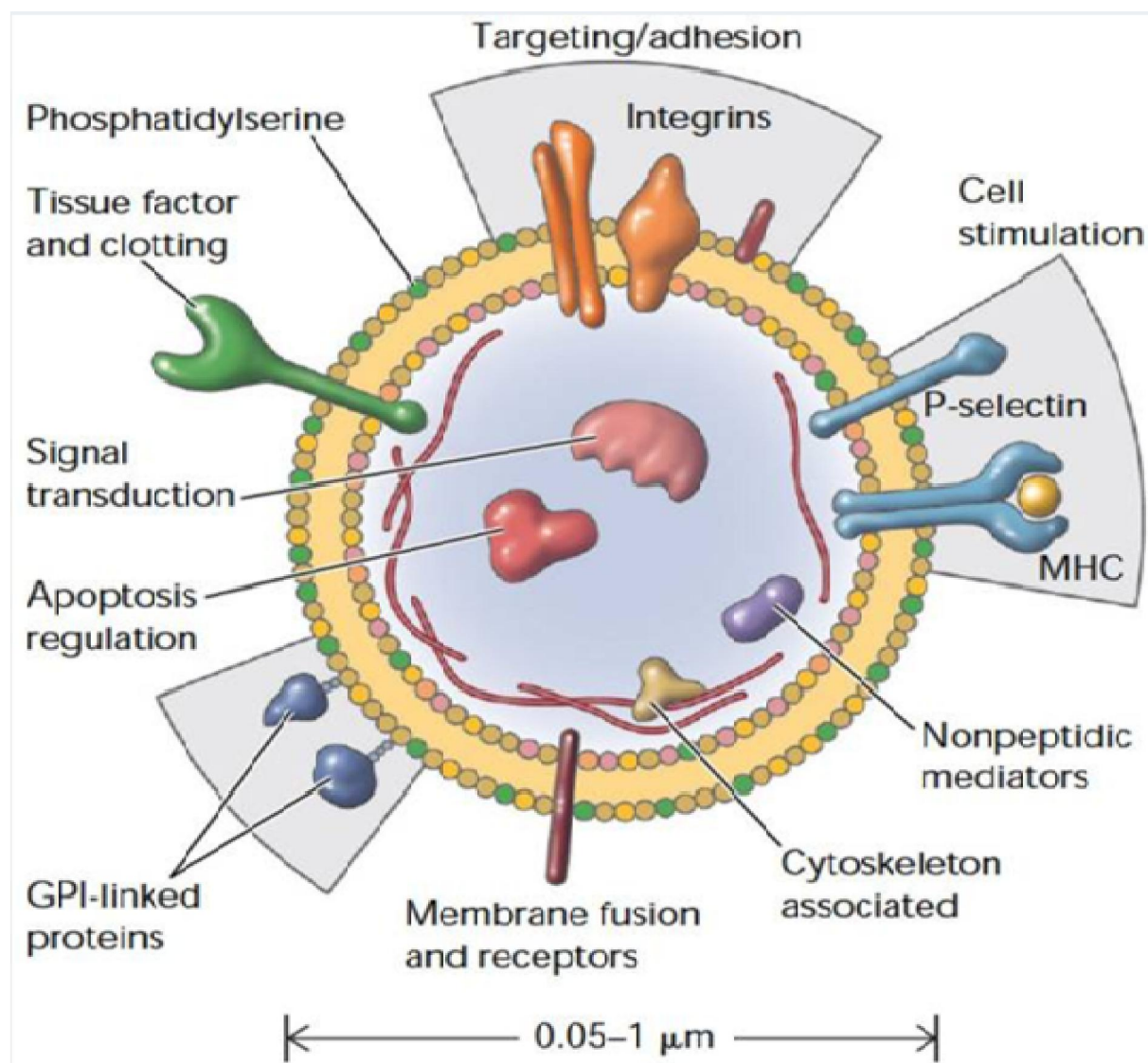
προερχόμενα από τα αιμοπετάλια μικροσωματίδια (PMVs) είναι τα πιο άφθονα. Ο χαρακτηρισμός των μικροσωματιδίων ανέδειξε ένα ετερογενές φορτίο που περιλαμβάνει ένα σύνολο μορίων προσκόλλησης. Όπως και τα αιμοπετάλια, τα PMVs εμπλέκονται επίσης στη θρόμβωση, μέσω της υποστήριξης του καταρράκτη της πήξης. Τα επίπεδα των κυκλοφορούντων PMVs (Platelet Microvesicles) μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια εμφάνισης διαφόρων ασθενειών, όπως π.χ. διαταραχές της πήξης, ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, καρκίνοι, καρδιαγγειακά νοσήματα και λοιμώξεις, γεγονός που υποδεικνύει τη δυνητική συμβολή τους στη νόσο και την ανάπτυξή τους ως βιοδείκτη [7].

Αρχικά αναφέρθηκαν ως «αιμοπεταλιακή σκόνη» ("platelet dust") από τον Peter Wolf το 1967, ενώ πλέον ονομάζονται αιμοπεταλιακά μικροσωματίδια (PMVs) που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία και στον αιμοστατικό μηχανισμό. Τα PMVs ασκούν φυσιολογικές επιδράσεις σε όλους σχεδόν τους τύπους αιματολογικών και αγγειακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων, των T-κυττάρων, των κυττάρων του ενδοθηλίου και των λείων μυϊκών κυττάρων (SMCs). Τα PMV μπορούν να ασκήσουν αυτές τις επιδράσεις με πολλαπλές μεθόδους: εξωκυτταρική σηματοδότηση μέσω υποδοχέων, μεταφορά επιφανειακών μορίων και παράδοση ενδοκυτταρικού περιεχομένου, συμπεριλαμβανομένου του miRNA. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ένα πολύπλοκο περιβάλλον στο οποίο τα κυτταρικά περιεχόμενα μοιράζονται με πολλαπλές κατευθύνσεις μεταξύ πολλαπλών κυτταρικών τύπων [94].

3.2 Γενικά περί μικροσωματιδίων-εξωσωμάτων-αποπτωτικών σωματίων

Η δημιουργία (γένεση) των μικροσωματιδιακών μεμβρανοεκβλαστήσεων (microparticles- MPs) από ενεργοποιημένα/ ή αποπτωτικά κύτταρα αναφέρθηκε πριν περίπου 40 χρόνια [95]. Τα MPs έχουν μέγεθος 0.1–1.0 μm και κατηγοριοποιούνται βάσει των μεμβρανικών πρωτεϊνών και των συστατικών του κυτταροπλάσματος του κυττάρου προέλευσης τους, εικόνα 27 [96].

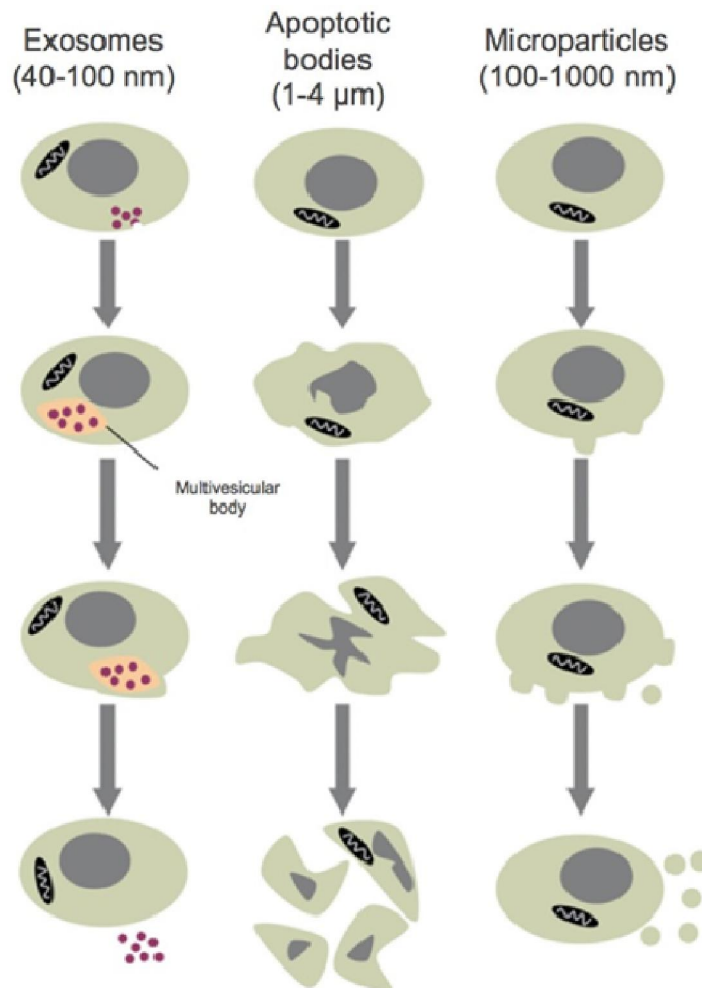
Εικόνα 27. Ο σχηματισμός των μικροσωματιδίων. Πηγή: Thromb. Vasc. Biol, 2011, (Figure1). [Adapted with permission from Hugel et al. 2005]. [96].



Τα MPs διαχωρίζονται από τα εξωσώματα και τα αποπτωτικά σωματίδια με βάση το μέγεθος, την σύσταση και τον μηχανισμό δημιουργίας (σχηματισμού) τους, εικόνα 28 [97]. Τα εξωσώματα, γενικότερα είναι εξωκυττάρια κυστίδια μικρότερου μεγέθους (40–100 nm) και σχηματίζονται μετά από μία πολυσταδιακή διαδικασία στην οποία συμμετέχουν η ενδοκυττάρια δημιουργία, η μετατροπή σε πολυκυστιδιακά σωματίδια (MultiVesicular Bodies-MVB) και τελικά η αποδέσμευσή τους, ενώ τα αποπτωτικά σωματίδια είναι μεμβρανώδη κυστίδια πολύ μεγαλύτερα (1–5 μm) και δημιουργούνται

κατά το τελευταίο στάδιο του κυτταρικού θανάτου (αποπτωτική φάση) αποκοπόμενα από τα κύτταρα, και μπορεί να περιέχουν DNA ή και άλλα οργανίδια [97, 98].

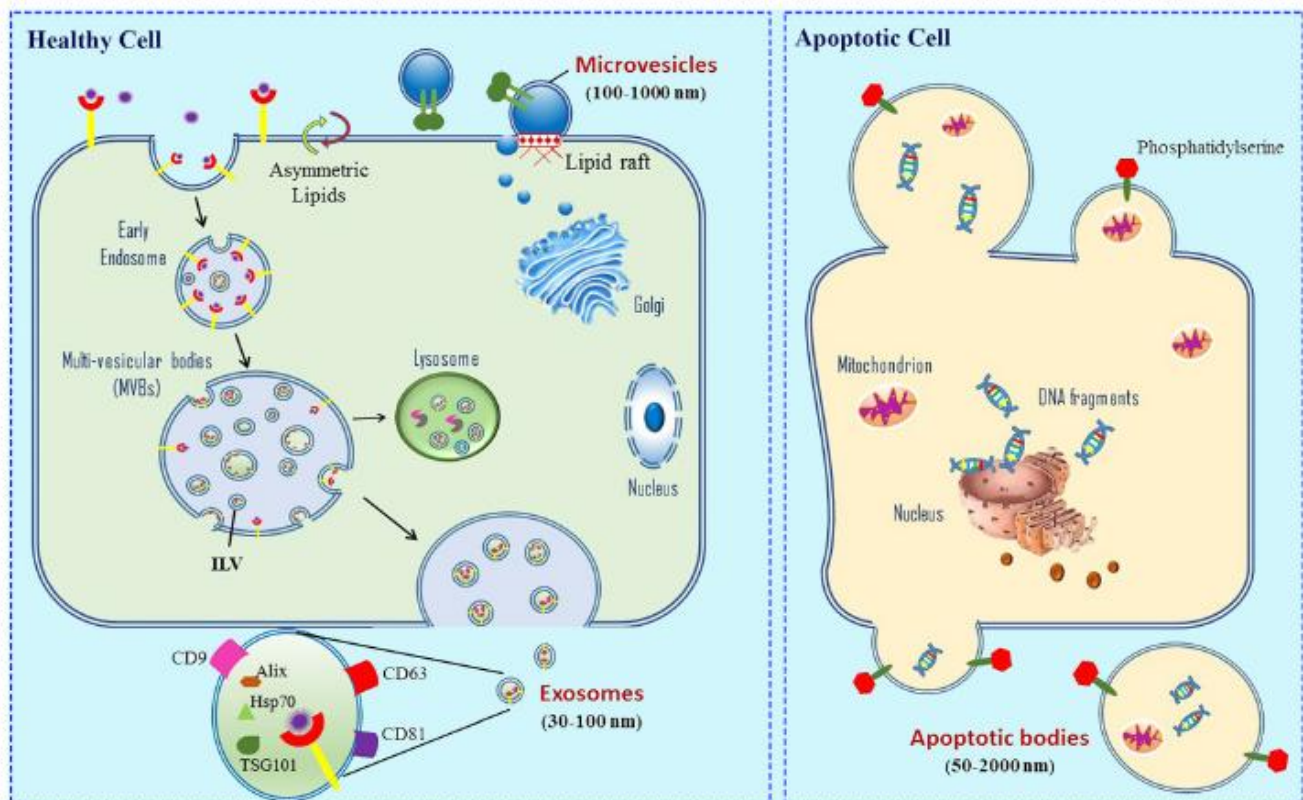
Εικόνα 28. Ο διαχωρισμός των μικρσωματιδίων-εξωσωμάτων-αποπτωτικών σωματίων βάσει μεγέθους. Πηγή: *Thromb. Vasc. Biol*, 2011, (Figure2). [96]. [Adapted with permission from Burger D. et al. (2013)]. [97].



3.3 Προέλευση, Σύσταση και Δράση των MPs

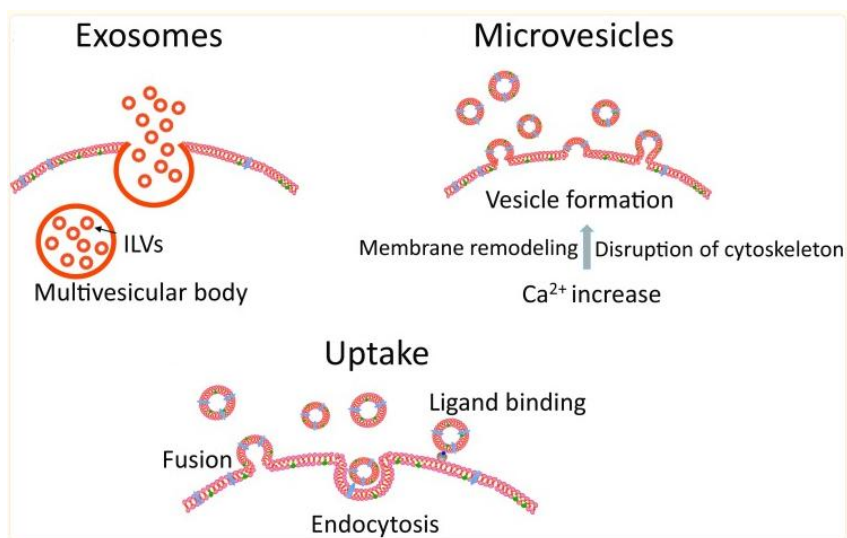
Τα κυτταρικής προέλευσης μικροσωμάτια είναι μεμβρανικά σωμάτια που παράγονται από τις εξωτερικές εκβλαστήσεις (εξοκυττάρια κυστίδια) της πλασματικής μεμβράνης και απελευθερώνονται από όλους τους τύπους κυττάρων, εικόνα 29 [93].

Εικόνα 29. Σχηματικό διάγραμμα της δημιουργίας των EVs και οι υποπληθυσμοί τους (αποπτωτικά σωμάτια, μικροσωμάτια και εξωσώματα). Πηγή: Life Sciences, 2021, 271:119177 (p.3, Figure 2). [93].



Τα εξοκυττάριας προέλευσης κυστίδια (EVs) κατατάσσονται σε διαφορετικούς τύπους μικροσωματιδίων, αναλόγως του τρόπου δημιουργίας και του μεγέθους τους, σχήμα 1 και πίνακας 1 [99].

Σχήμα 1. Σχηματική παρουσίαση της απελευθέρωσης και της πρόσληψης εξωκυττάρων σωματιδίων. Πηγή: Ståhl et al., 2019, *Pediatr Nephrol*, (Figure1). [99].



Πίνακας 1. Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά μεταξύ των αποπτωτικών σωματίων, των μικροσωματιδίων (MVs) και των εξωσωμάτων. Πηγή: Life Sciences, 2021, 271:119177 (p.2, Table 1). [93].

	Apoptotic bodies	Microvesicles	Exosomes
Size	50–2000 nm	100–1000 nm	30–100 nm
Sedimentation	1200 g–100,000 g	20,000 g	100,000 g
Main protein markers	Histones	Integrins, Selectins, CD40L	Alix, Tsg101, Tetraspanins
Origin	Apoptotic cells	Plasma membrane	Internal compartments (endosomes)
Lipid composition	Unclear	phosphatidylserine	Cholesterol, Sphingomyelin, Ceramide
Shape	Heterogeneous	Irregular	Cup shaped

Τα μικροσωματίδια προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων και φέρουν ενεργά συστατικά (στοιχεία) παρόμοια με τα μητρικής προέλευσης τους κύτταρα, πίνακας 2 [100, 101]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα MVs που προέρχονται από αποπτωτικά κύτταρα φέρουν CD31/annexin V, ενώ τα MVs παραχθέντα από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα φέρουν CD105 ή CD62E [102]. Επιπλέον, η έκφραση των συστατικών (στοιχείων) των MVs με ενδοθηλιακή προέλευση δεν είναι η ίδια στα διαφορετικά νοσήματα, [103-106]. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί ότι τα MVs φέρουν διαφορετικά ενεργή μόρια τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό βιολογικό ρόλο στα κύτταρα στόχους, πίνακας 3 [107].

Πίνακας 2. Δείκτες έκφρασης των μικροσωματιδίων που προσδιορίζουν την προέλευση τους.
 Πηγή: Br. J. Haematol, 2011, (Table 2). [108].

Cellular origin of MPs	Antigen	Alternative name
Red blood cell	CD235a	Glycophorin A
Leucocyte	CD45	Leucocyte
Monocyte	CD14	common antigen
Granulocyte	CD66b	
T helper lymphocyte	CD4	
T killer lymphocyte	CD8	
B lymphocyte	CD20	
Platelet	CD41	GPIIb
	CD41a	GPIIb/IIIa
	CD42a	GPIX
	CD42b	GPIb α
	CD61	GPIIIa
	CD62P	P-selectin
Endothelial	CD31	PECAM-1
	CD34	Gp105-120
	CD62E	E-selectin
	CD51	α v integrin
	CD105	Endoglin
	CD144	VE-cadherin (most specific for EMPs)
	CD146	S-Endo/Muc 18

Πίνακας 3. Βιοενεργείς ουσίες (στοιχεία) των MVs διαφορετικής κυτταρικής προέλευσης και οι βιολογικές τους δράσεις στα κύτταρα στόχους. Πηγή: J Cell Mol Med, 2019, (Table1). [107].

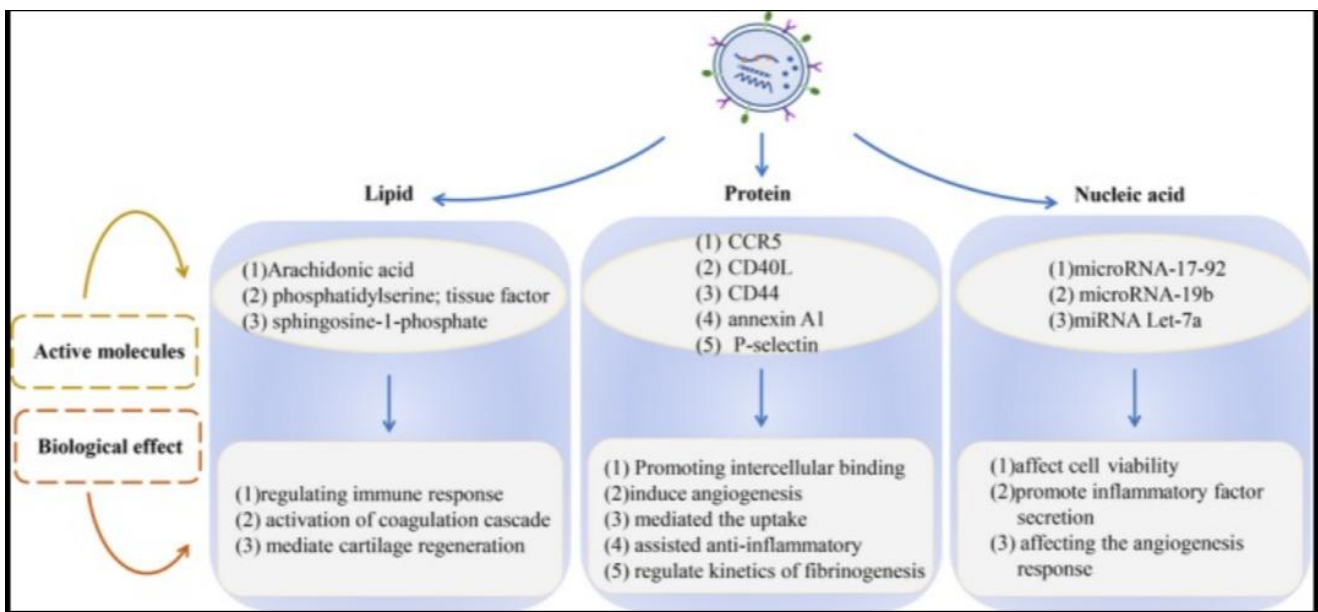
Cell-derived microvesicles	Active molecule	Biological effect
Leucocyte	CD62L, PF4, TF, CD45, CD66b, CD11b, CD62p, CD31	Participates in thrombosis, regulates inflammatory response and vascular function
Endotheliocyte	VCAM-1, CD31, CD105, CD309, MadCAM1, CD51, CD146, CD62E, CD142, TF, miRNA-19b24, PSGL-1, CD144	Participates in endothelial dysfunction, angiogenesis, tumour growth, oxidative stress and so on
Platelet	CD41, CD42A, TF, CD62P, CD40L, miRNA-24, miRNA-142-3p, CD41b, CD61, CD63, CD11b, RANTES, NF-KB, GPIbα, GPIIb/IIIa	Participates in promoting coagulation, promoting thrombosis and promoting apoptosis
Erythrocyte	CD44, CD47, CD55, TF, PS, CD235a	Mediated coagulation reaction
Neutrophils	Ly6G, CD41, Ter119, CD31, CD142, CD45, CD66b, IL-1β	Mediates inflammation and subsequent vascular damage

Τα κυτταρικής προέλευσης MVs φέρουν τρία είδη ενεργών ουσιών: πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, στη βάση των οποίων οφείλεται η διαφορετική δράση τους στα κύτταρα στόχους, εικόνα 30.

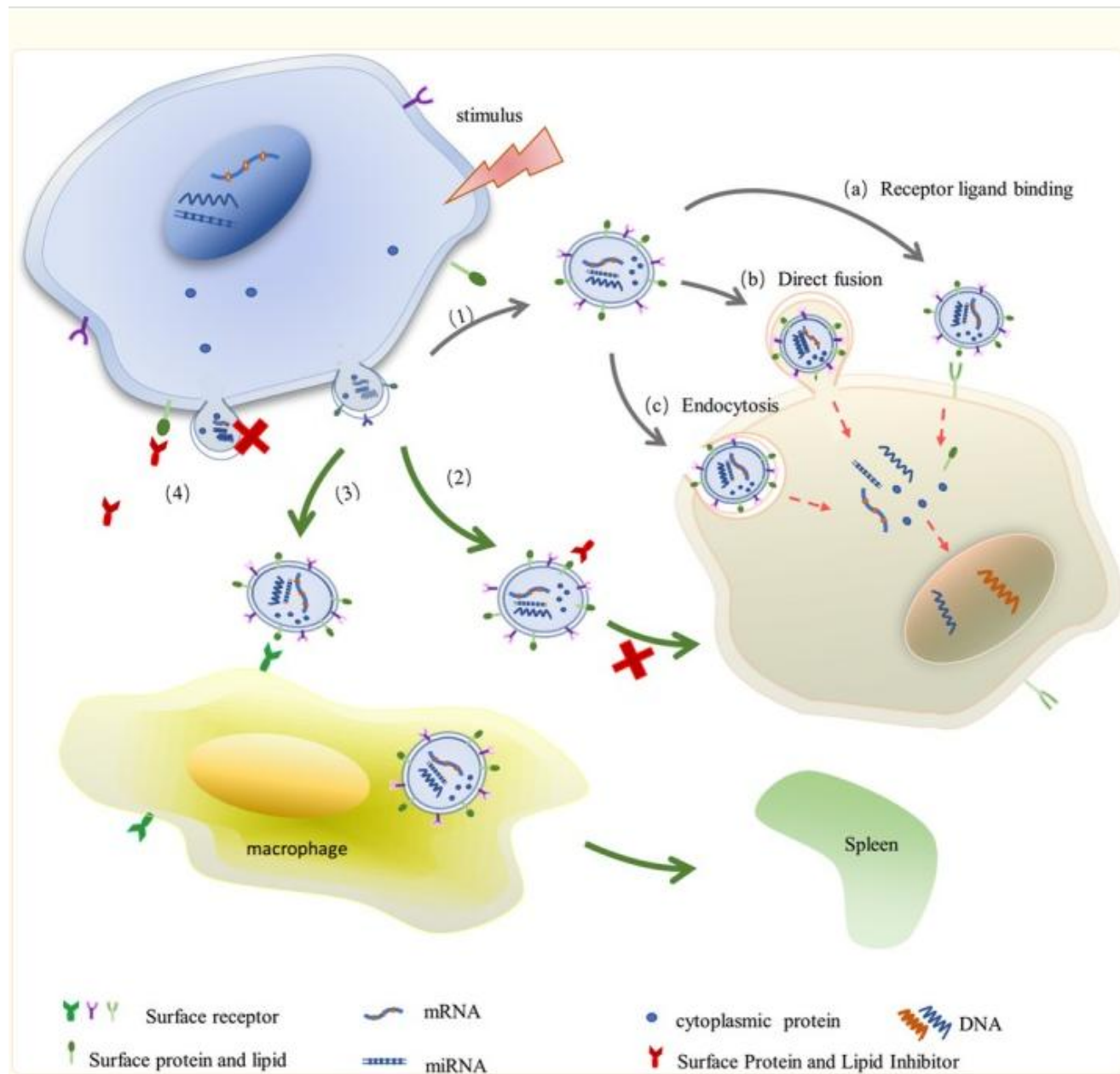
Τα λιπίδια προέρχονται από τα συστατικά της γονικής κυτταρικής μεμβράνης, τα οποία αποτελούν κυρίως τον σκελετό του MV και τα εξωκυτταρικά νουκλεοτιδικά σήματα. Οι πρωτεΐνες προέρχονται κυρίως από τις γονικές κυτταρικές μεμβράνες και το κυτταρόπλασμα. Έχει αποδειχθεί ότι οι κυτταροτοξικές πρωτεΐνες των NK κυττάρων συσχετίζονται κυρίως με τις κυτταροτοξικές πρωτεΐνες που περιέχονται σε αυτά. Τα μικροσωματίδια που προέρχονται από τα NK κύτταρα λειτουργούν ως φορείς επικοινωνίας σε μεγάλες αποστάσεις [107]. Επιπλέον, τα MVs έχουν θεωρηθεί ως ο κύριος φορέας λειτουργικής οριζόντιας μετακίνησης mRNA μεταξύ των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου μεγάλου αριθμού mRNAs των γονικών κυττάρων [109]. Ο κύριος λόγος είναι ότι τα MVs ενσωματώνουν μέρος του κυτταροπλάσματος κατά τον

σχηματισμό τους, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη και το mRNA από τα γονικά κύτταρα. Οι διάφοροι τύποι ενεργών μορίων που εκφράζονται στα MVs προέρχονται από διαφορετικά μέρη των κυττάρων, τα οποία περιλαμβάνουν διάφορες περιοχές, όπως η πλασματική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα και ο πυρήνας. Πρόκειται για σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη διακυτταρική μεταγωγή σήματος, σχήμα 2.

Εικόνα 30. Η σύσταση των μικροκυστιδίων. Πηγή: J Cell Mol Med, 2019, (Figure 1). [107].



Σχήμα 2. Η σύσταση των μικροσωματιδίων και η δράση τους. Πηγή: J Cell Mol Med, 2019, (Figure 3). [107].

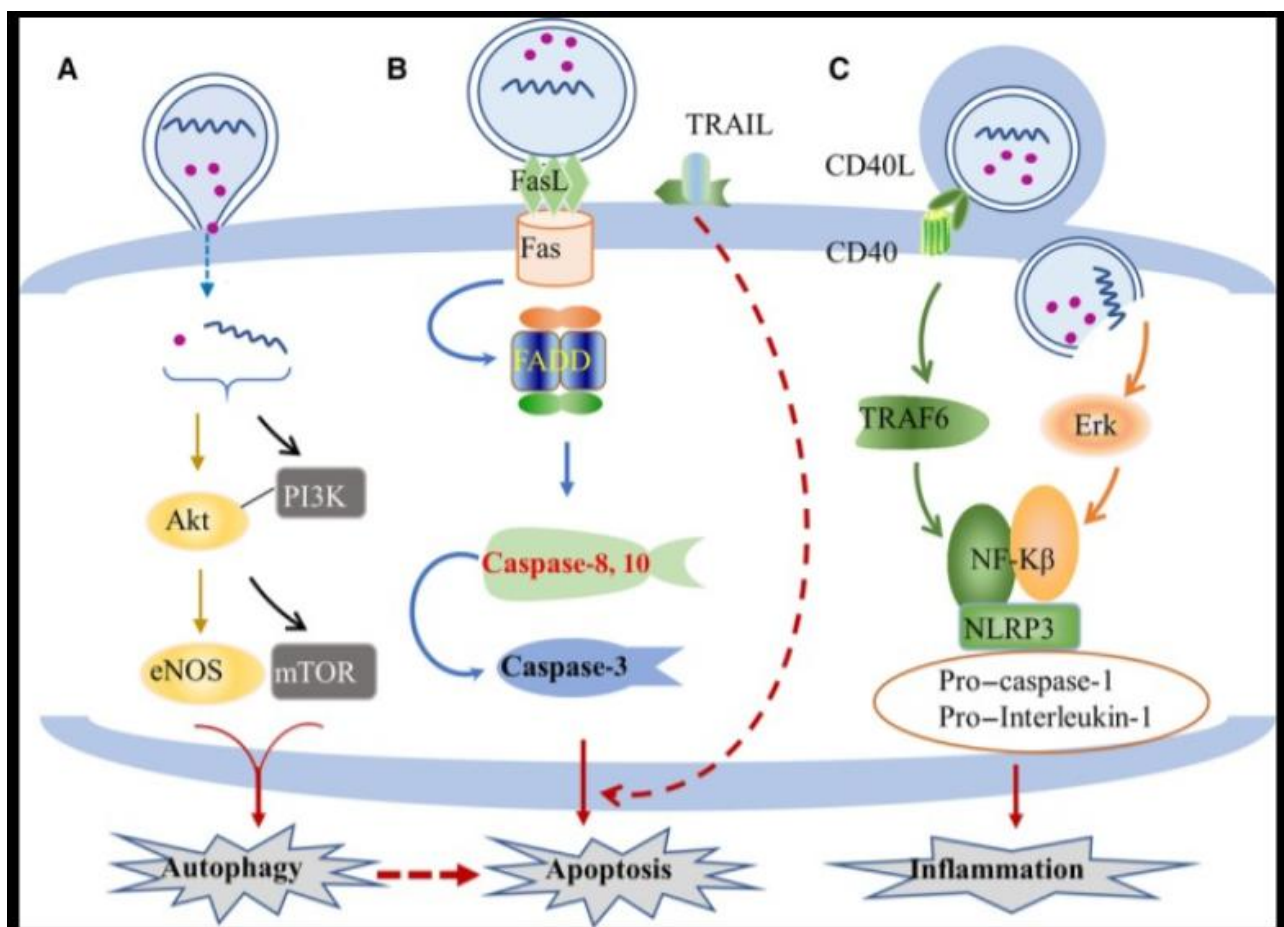


Σε κατάσταση stress, τα κύτταρα απελευθερώνουν σφαιρικά MVs που περιέχουν μητρικής προέλευσης ενεργά συστατικά (στοιχεία-ουσίες). (1) Τα ενεργή συστατικά (στοιχεία) μεταφέρονται στα κύτταρα στόχους μέσω (a) του υποδοχέα πρόσδεσης [receptor ligand binding], (b) άμεσης συγχώνευσης, και (c) ενδοκυττάρωση, ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων και την πρωτεϊνοσύνθεση στα κύτταρα-στόχους.

Οι αποτελεσματικοί τρόποι (μονοπάτια) για τη μείωση της περιεκτικότητας των MVs στο σωματικό υγρό είναι οι εξής: (2) αναστέλλοντας την επικοινωνία μεταξύ των MVs και των κυττάρων στόχων, μπλοκάροντας τη μεταγωγή σήματος, (3) μεσολαβώντας στην κάθαρση των μικροσωματιδίων [MV clearance], και (4) αναστέλλοντας την αποδέσμευση (απελευθέρωση) των MVs [107].

Υπάρχουν τρία κύρια μονοπάτια της βιολογικής δράσης (μηχανισμός δράσης) των MVs και των ενεργών συστατικών τους επί των κυττάρων στόχων: (A) ρυθμίζουν την αυτοφαγία μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt; (B) ρυθμίζουν την απόπτωση μέσω του μονοπατιού Fas/FasL; και (C) ρυθμίζουν τη φλεγμονή μέσω του μονοπατιού NF-κB, σχήμα 3.

Σχήμα 3. Τα τρία κύρια μονοπάτια (A, B, C) της βιολογικής δράσης των MVs και των ενεργών συστατικών τους. Πηγή: Lv et al., 2019, J Cell Mol Med, (Figure 2). [107].



Είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες ότι η διακυτταρική επικοινωνία μέσω των MPs λειτουργεί είτε μέσω άμεσης επαφής μεταξύ των κυττάρων, είτε μέσω κυκλοφορούντων μορίων, όπως οι κυτταροκίνες, οι αυξητικοί παράγοντες ή οι λιπιδικοί μεσολαβητές [110]. Κατά την τελευταία δεκαετία, η μελέτη και η έρευνα έχουν αρχίσει να εστιάζονται στην αυξανόμενη σημασία της διακυτταρικής επικοινωνίας με τη μεσολάβηση εξωκυτταρικών κυστιδίων που απελευθερώνονται από ζώντα κύτταρα, είτε από την αποβολή της πλασματικής μεμβράνης (μικροσωματίδια- microvesicles, που ονομάζονται επίσης μικροσωμάτια- microparticles), είτε από ένα ενδοκυτταρικό τμήμα (εξωσώματα) [111].

Τα εξωσώματα και τα μικροσωματίδια κυκλοφορούν σε όλα τα βιολογικά υγρά και μπορούν να προκαλέσουν βιολογικές αποκρίσεις από απόσταση. Οι επιδράσεις τους περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών διεργασιών, όπως η ανοσολογική επιτήρηση, η τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου ή η ρύθμιση της φλεγμονής. Τα εξωκυττάρια κυστίδια μπορούν να μεταφέρουν μια μεγάλη σειρά ενεργών μορίων, συμπεριλαμβανομένων λιπιδικών μεσολαβητών, όπως εικοσανοειδή, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, ικανών να τροποποιήσουν τον φαινότυπο των κυττάρων που τα δέχονται [111].

Αναλυτικότερα, τα MPs λειτουργούν ως οχήματα για την διακυτταρική επικοινωνία και ανταλλαγή βιολογικών συστατικών και πληροφορίας, με δύο κύριους μηχανισμούς να έχουν προταθεί: 1) Τα MPs διαδραματίζουν ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, ενεργοποιώντας υποδοχείς στα κύτταρα στόχους, παρουσιάζοντας σε αυτούς συσχετιζόμενα με τη μεμβράνη βιοενεργά μόρια (membrane-associated bioactive molecules [112], 2) άμεση μεταφορά του περιεχομένου τους, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, λιπιδίων ή RNA, στα κύτταρα δέκτες, προωθώντας τη φαινοτυπική διαφοροποίηση και τον επαναπρογραμματισμό των κυτταρικών λειτουργιών [110], δρώντας ως μια μορφή σηματοδότησης εξ αποστάσεως [113].

Τα μικροσωματίδια συμμετέχουν στο μηχανισμό της διακυτταρικής επικοινωνίας, επειδή μεταφέρουν ενεργά μόρια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα.

Επιπλέον, τα μικροσωμάτια υπάρχουν στα κυκλοφορούντα υγρά, όπως το αίμα και τα ούρα, και συσχετίζονται στενά με την εξέλιξη των παθοφυσιολογικών καταστάσεων σε πολλές ασθένειες, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, αυτοάνοσα, νεφρολογικές ασθένειες. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα μικροκυστίδια έχουν διττή δράση, δηλαδή βλάβη και προστασία των κυττάρων-υποδοχέων επηρεάζοντας τις οδούς αυτοφαγίας, απόπτωσης και φλεγμονής [107].

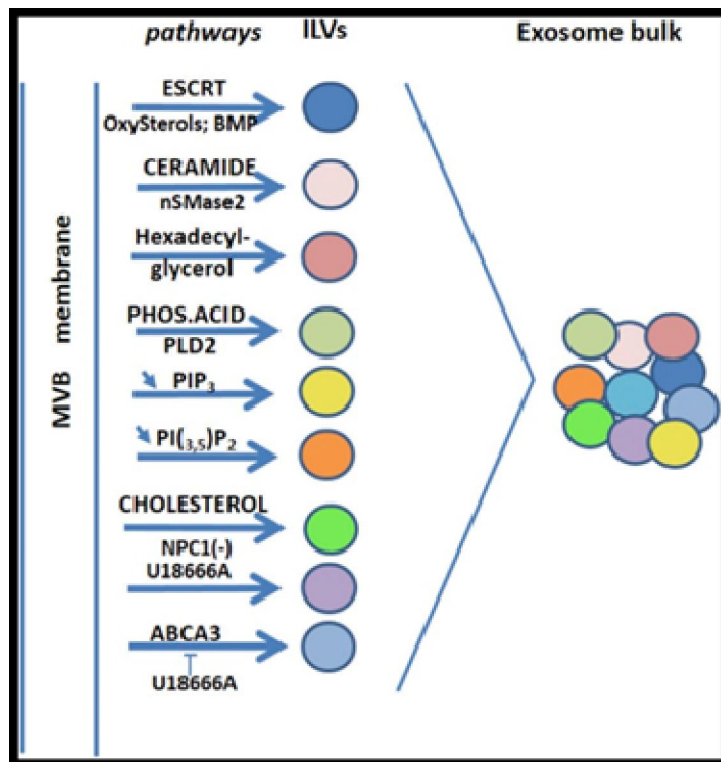
Τα MPs αποτελούν βιοδείκτες σε διάφορες ασθένειες και νοσήματα. Ο σχηματισμός των MP ενισχύεται από το στρες και τον τραυματισμό και κατά συνέπεια, τα MPs έχουν θεωρηθεί ως πιθανοί βιοδείκτες για την έναρξη και την εξέλιξη της νόσου. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να παρακολουθείται η ισορροπία μεταξύ εμφάνισης των κυκλοφορούντων MPs και της κάθαρσής τους. Ειδικότερα, τα επίπεδα των σχετιζόμενων MPs με: αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γνωστό ότι αυξάνουν τις πιθανότητες για αγγειακές βλάβες, προθρομβωτικές και προφλεγμονώδεις καταστάσεις, που διαταράσσουν την κατάσταση υγείας και οδηγούν μεταξύ άλλων σε διαβήτη [114], πνευμονική υπέρταση [115], χρόνια νεφρική νόσο [116], προεκλαμψία [103], αθηροσκλήρωση [117], καρδιαγγειακά νοσήματα [118], κακοήθειες, αυτοάνοσα νοσήματα, κλπ.

3.4 Σχηματισμός (βιογένεση) εξωσωμάτων και μικροσωματιδίων

Τα εξωσώματα και τα μικροσωματίδια (που ονομάζονται επίσης εκτοσώματα και μικροσώματα) ανακτώνται με υπερφυγοκέντρηση από ζώντα κύτταρα. Τα μικροσωματίδια καθιζάνουν στο ίζημα των 10.000 g και το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 100 και 1.000 nm. Το υπερκείμενο υγρό των 10.000 g χρησιμοποιείται στην συνέχεια για την ανάκτηση των εξωσωμάτων με φυγοκέντρηση 100.000 g [119]. Το μέγεθος των εξωσωμάτων κυμαίνεται από 30 έως 150 nm, με μέσο όρο γύρω στα 100 nm [111]. Υπάρχουν κάποιοι βιοδείκτες που διαχωρίζουν τα εξωσώματα από τα μικροσωμάτια, όπως ο MVB και ο mTOC [119- 121].

Η πρώτη αναφορά στον μηχανισμό σχηματισμού εξωσωμάτων έγινε από τους [122]. Η ενισχυμένη παραγωγή εξωσωμάτων περιλαμβάνει μεταφορείς λιπιδίων, όπως ο ABCA3 [123] και απαιτείται η δράση του PLD2 [124], της διγλυκερικής κινάσης (DGK) [125], της σφιγγομυελινάσης [126], η αναστολή δράσης της PI3 κινάσης [127,128] και του PIKfyve [129], εικόνα 31.

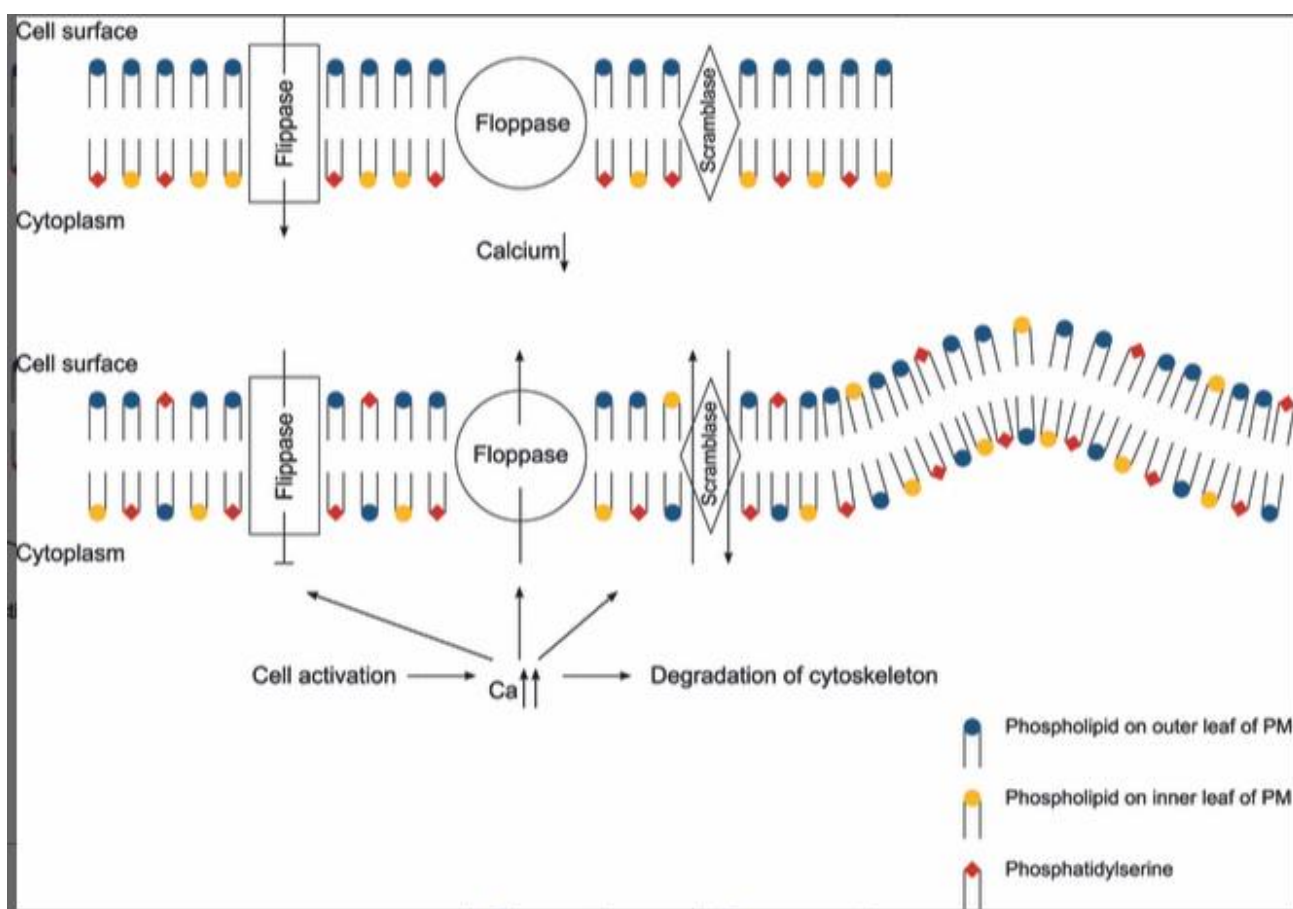
Εικόνα 31. Σχηματισμός εξωσωμάτων. Πηγή: J Lipid Res, 2018, (Figure 2). [111].



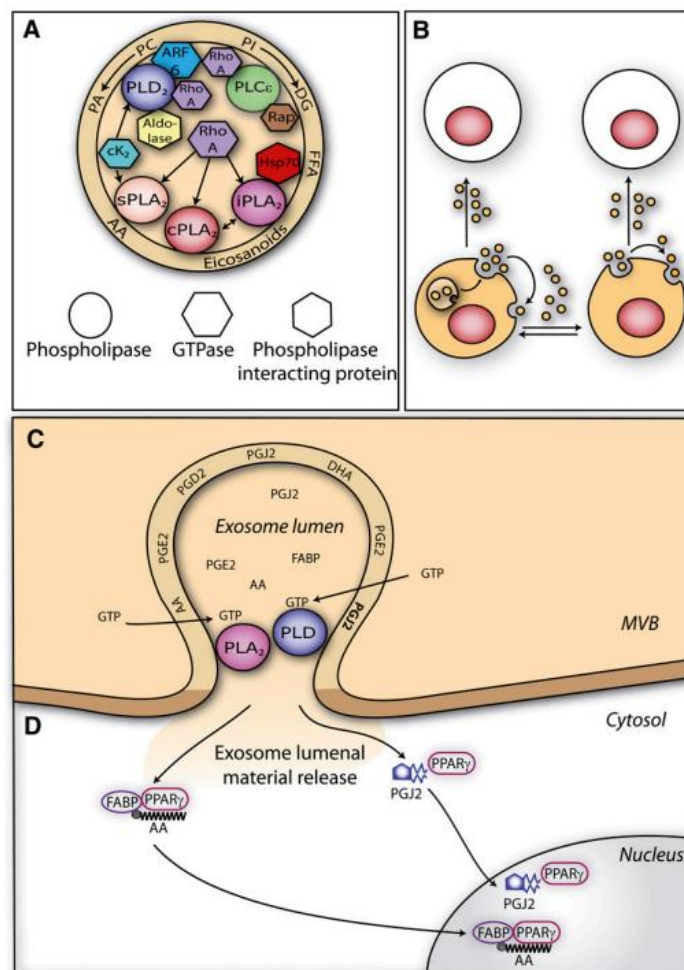
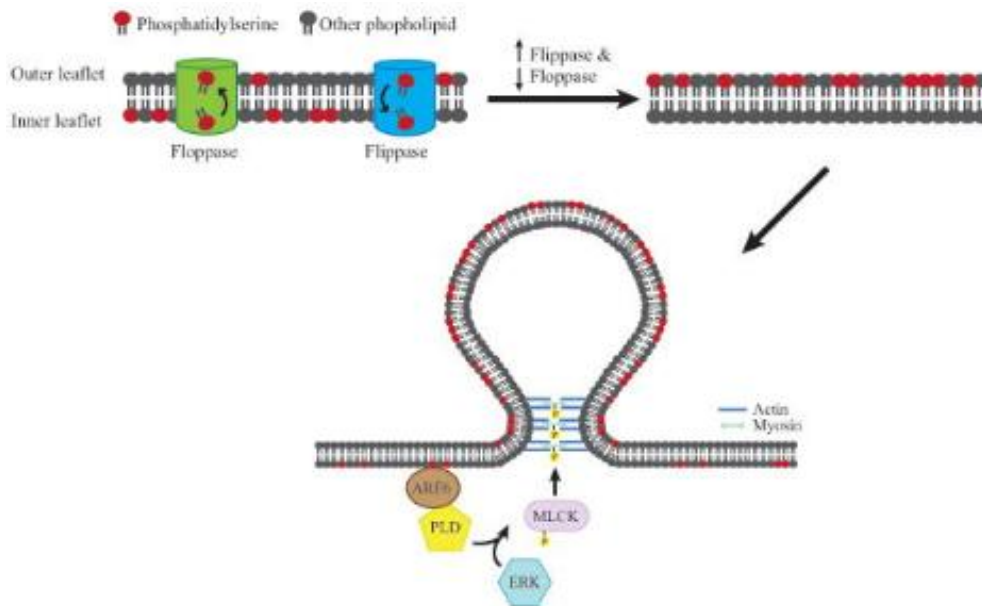
Η μετατόπιση της όξινης σφιγγομυελινάσης (aSMase) στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης των πλασματοκυττάρων προάγει την εκβλάστηση των μικροσωματιδίων [130]. Στη διαδικασία εκβλάστησης περιλαμβάνονται επίσης οι μικρές G πρωτεΐνες, όπως οι Arf6 και RhoA [131], οι οποίες είναι ενεργοποιητές των PLD1 και PLD2. Τα μικροσωμάτια μπορούν επίσης να παραχθούν με τροποποίηση της ασυμμετρίας της μεμβράνης των πλασματοκυττάρων από τις αμινοφωσφολιπιδικές τρανσλοκάσες [132], ή με τροποποίηση της πλευρικής πίεσης των φωσφολιπιδίων μέσω της πρωτεΐνης δέσμευσης φωσφατιδυλοσερίνης PS (phosphatidylserine-PS) στην εσωτερική στιβάδα

[133], ή με τη δεσμευτική πρωτεΐνη σφιγγομυελίνη/χοληστερόλη της εξωτερικής στιβάδας [134]. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου μπορεί επίσης να οδηγήσει στον σχηματισμό και την απελευθέρωση μικροσωματιδίων, εικόνες 32-34 [7,135] ή εξωσωμάτων [136].

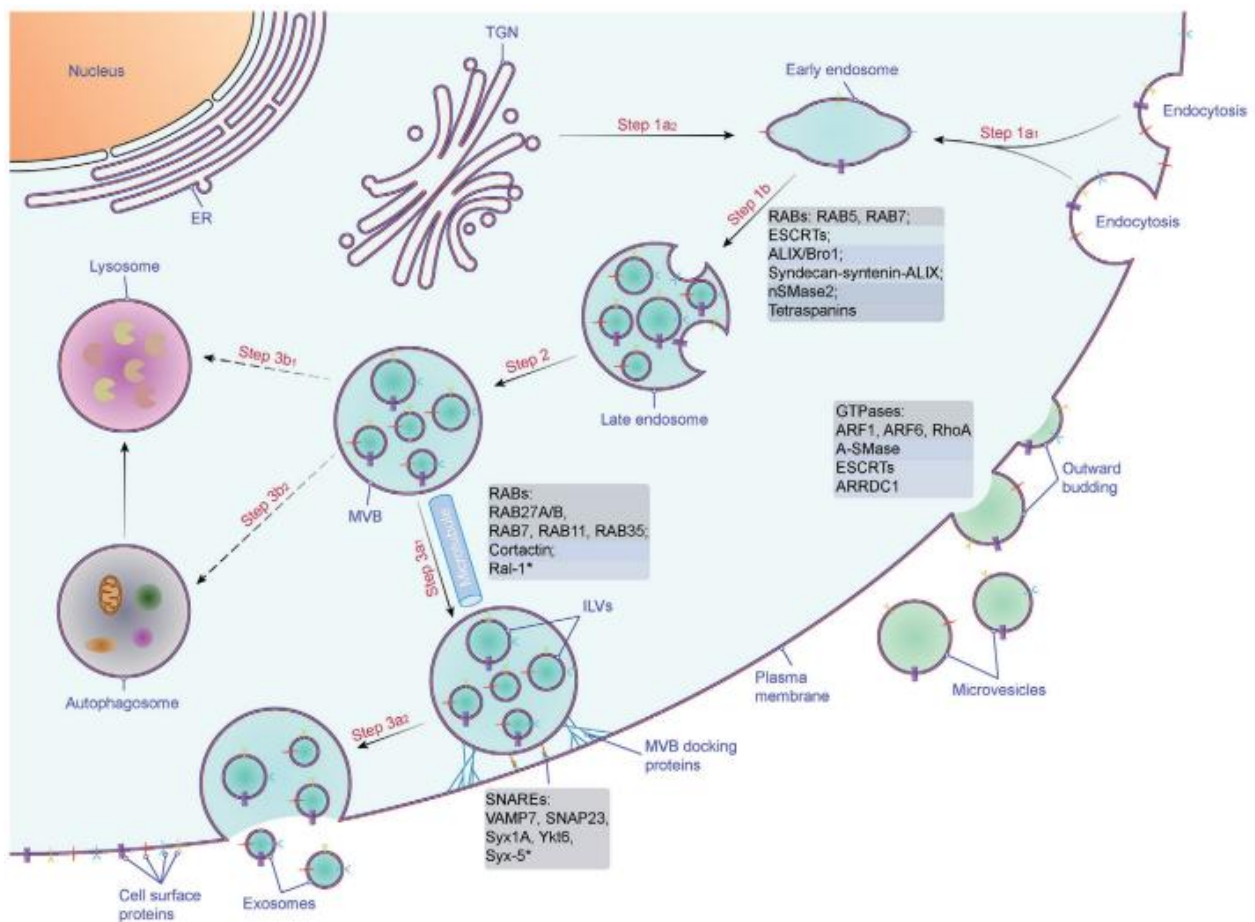
Εικόνα 32. Η αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου ενεργοποιεί διαδοχικά το μηχανισμό που οδηγεί στον σχηματισμό και απελευθέρωση των μικροσωματιδίων (MP). Πηγή: Br. J. Haematol, 2011, (Figure 1). [108].



Εικόνα 33. Επάνω: Βιογένεση των εξωκυττάρων κυστιδίων (extracellular vesicles -EV) Πηγή: Akers et al., 2013. Journal of Neuro-oncology. Κάτω: Τα εξωσώματα ως διακυτταρικοί σηματοδότες που μεταφέρουν GTP-ενεργοποιημένες φωσφολιπάσες και προσταγλανδίνες. Πηγή: Journal of Lipid Research, 2010, (Figure 6, p.2117). [136]



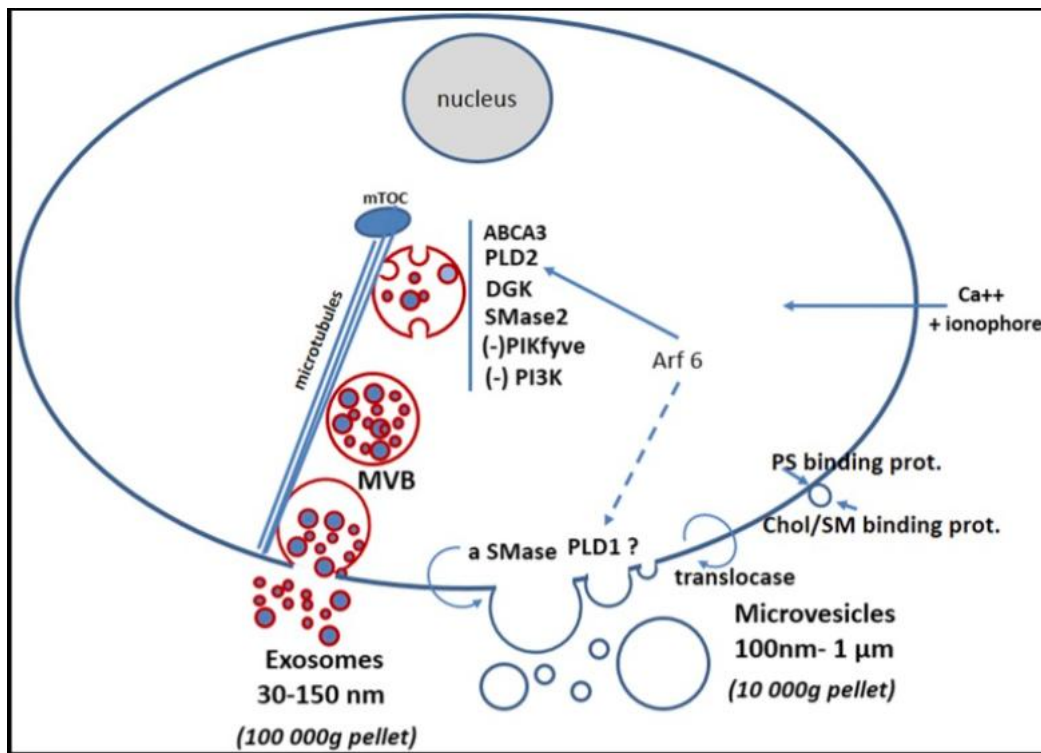
Εικόνα 34. Δημιουργία των εξωκυττάρων κυστιδίων (EVs): exosomes, microvesicles, apoptotic bodies. Πηγή: Adv. Sci, 2021, (Figure 1, p2). [137].



Στο σχήμα 4 τα πολυκυστιδιακά σωμάτια (MultiVesicularBodies-MVB) και τα εξωσώματα είναι κυκλωμένα με κόκκινο χρώμα, για να αναπαραστήσουν την περιεκτικότητα της μεμβράνης τους σε BMP- Bone Morphogenetic Proteins, η οποία σίγουρα διακρίνει τα εξωσώματα από τα μικροσωματίδια, δεδομένου ότι ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των BMP περιορίζεται αυστηρά στα ώριμα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα, [138-140]. Οι μορφογενετικές πρωτεΐνες οστού (bone morphogenetic proteins, BMP), μέλη της υπερ-οικογένειας των μετασχηματιστικών αυξητικών παραγόντων-β (TGF-β), παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία δράσεων, οι οποίες επιτελούνται κυρίως ενδοκυττάρια, μετά τη σύνδεση τους με τους υποδοχείς που φέρουν τα κύτταρα-στόχοι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ενδοκυττάρια, οι μεσολαβητές που

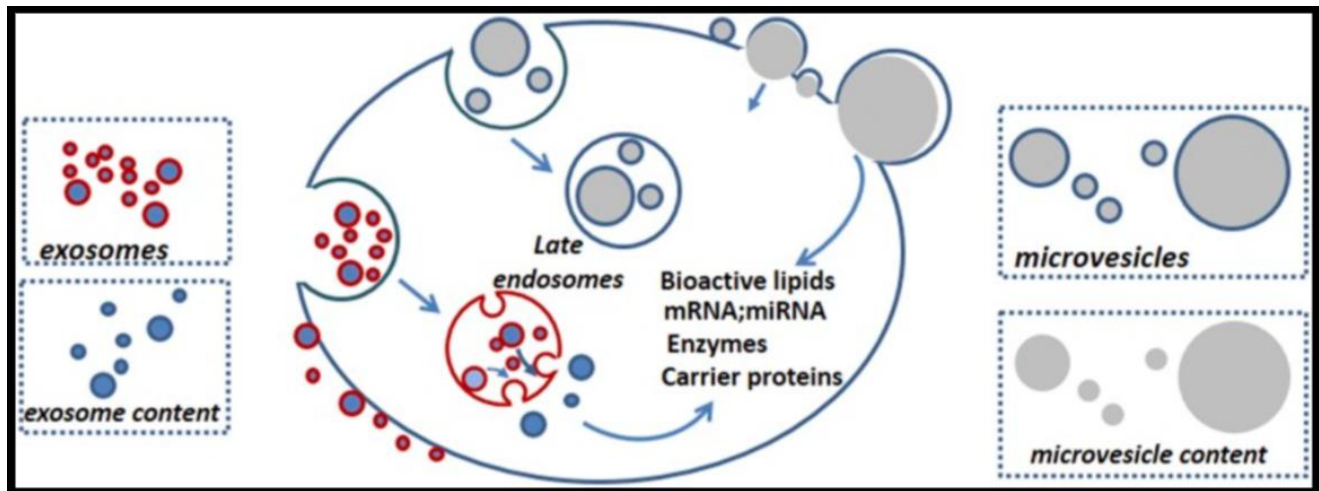
μεταδίδουν το μήνυμα στον πυρήνα είναι οι πρωτεΐνες Smad, όπως ισχύει για τους περισσότερους TGF [141].

Σχήμα 4. Σχηματισμός εξωσωμάτων και μικροσωματιδίων και η διάκριση τους μέσω βιοδεικτών. Πηγή: J Lipid Res, 2018, (Figure 1). [111].



Ο συνδυασμός των διαφόρων μονοπατιών σχηματισμού των εξωσωμάτων και των μικροσωματιδίων μπορεί να εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και τις συνθήκες ενεργοποίησης ή την κινητοποίηση διαφορετικών πληθυσμών ώριμων ενδοσωμάτων, και πιθανόν να ενεργοποιούνται ταυτόχρονα πολλά μονοπάτια, σχήμα 5 [111].

Σχήμα 5. Μεταφορά βιολογικά ενεργού υλικού σε κύτταρα-δέκτες με τη μεσολάβηση εξωσωμάτων και μικροσωματιδίων. Πηγή: J Lipid Res, 2018, (Figure 3). [111].

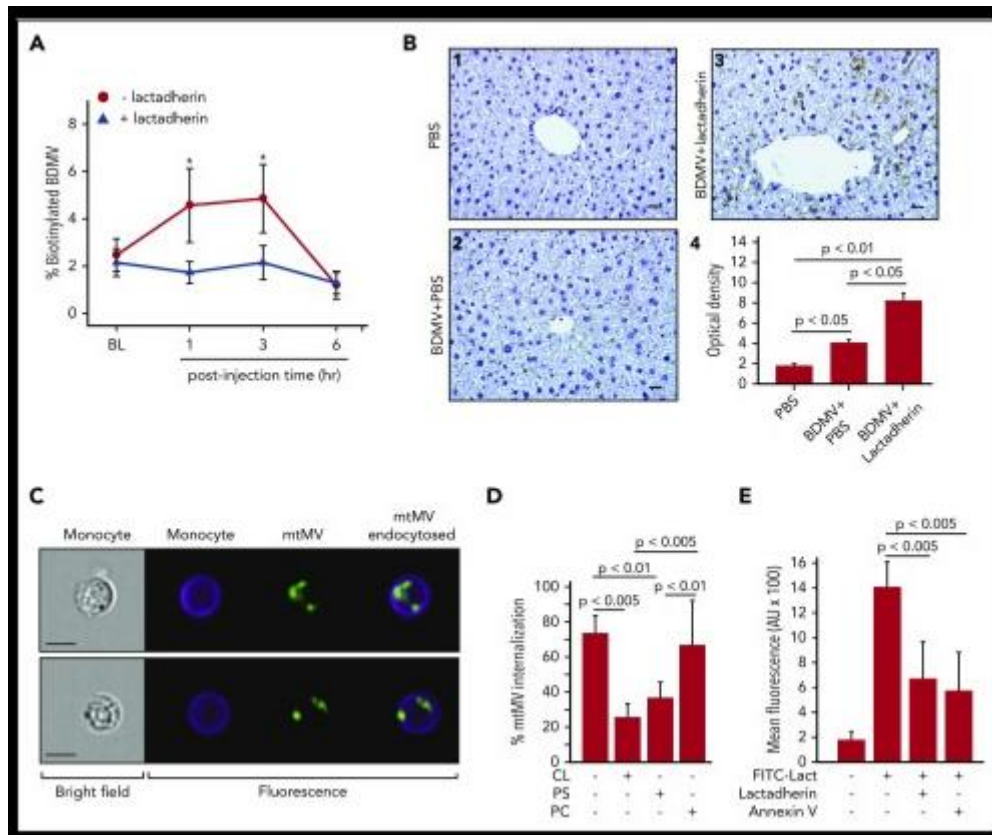


3.4.1 Κάθαρση μικροσωματιδίων [MP clearance]

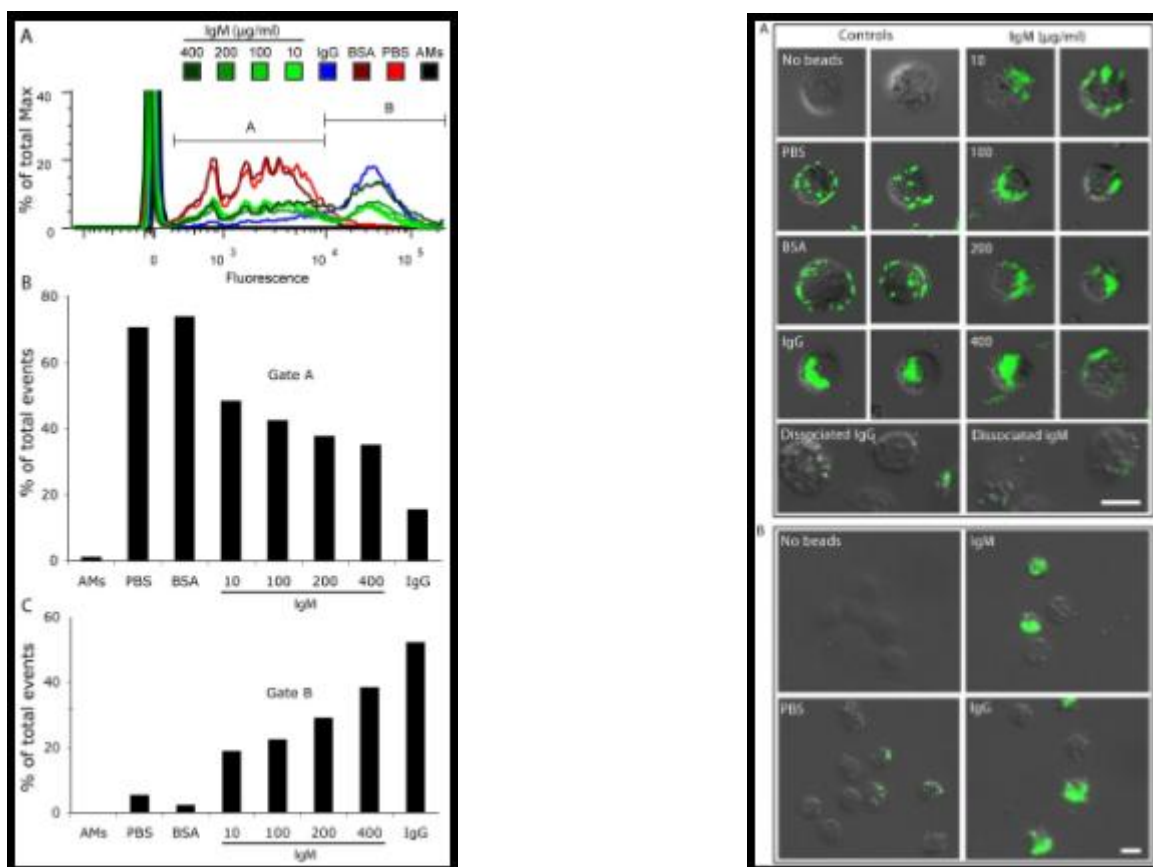
Η κάθαρση των MPs μέσω του συστήματος των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (Mononuclear Phagocyte System-MPS) συνεπεία της δράσης της λακταδερίνης φαίνεται να ρυθμίζει τη διαθεσιμότητα των κυκλοφορούντων MPs, ωστόσο, για τη διαδικασία αυτή είναι λιγότερα γνωστά από ό,τι για τον σχηματισμό των MPs, εικόνα 35 [7, 97, 142]. Τα μακροφάγα προσλαμβάνουν τα MPs, ενώ το PS θεωρείται ότι ενεργοποιεί τους υποδοχείς scavenger, προάγοντας την ενδοκυττάρωση των MPs [7, 143]. Η επιφανειακή IgM των MPs έχει επίσης αποδειχθεί ότι προάγει την κάθαρση των MPs από τα μακροφάγα, εικόνα 36 [7, 144].

Τα μικροσωματίδια που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία έχουν χρόνο ημίσειας ζωής που κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως λίγες ώρες, [145]. Η κάθαρση των MPs εξαρτάται από τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται και ειδικότερα τα εξ αιμοπεταλίων προερχόμενα έχουν ταχύτερη κάθαρση έναντι των εξ ερυθρών προερχόμενα αντίστοιχα [146].

Εικόνα 35. Η λακταδερίνη προάγει την κάθαρση των MPs μέσω φαγοκυττάρωσης. Πηγή: Zhou et al., 2018. Blood, (Figure 4). [142].



Εικόνα 36. Η IgM προάγει την κάθαρση των MPs από τα μακροφάγα. Αποτελέσματα κυτταρομετρίας ροής (αριστερά) και ανοσοφθορισμού (δεξιά). Πηγή: Litvack et al., 2011. PLoS One (Figures 4 & 6). [144].



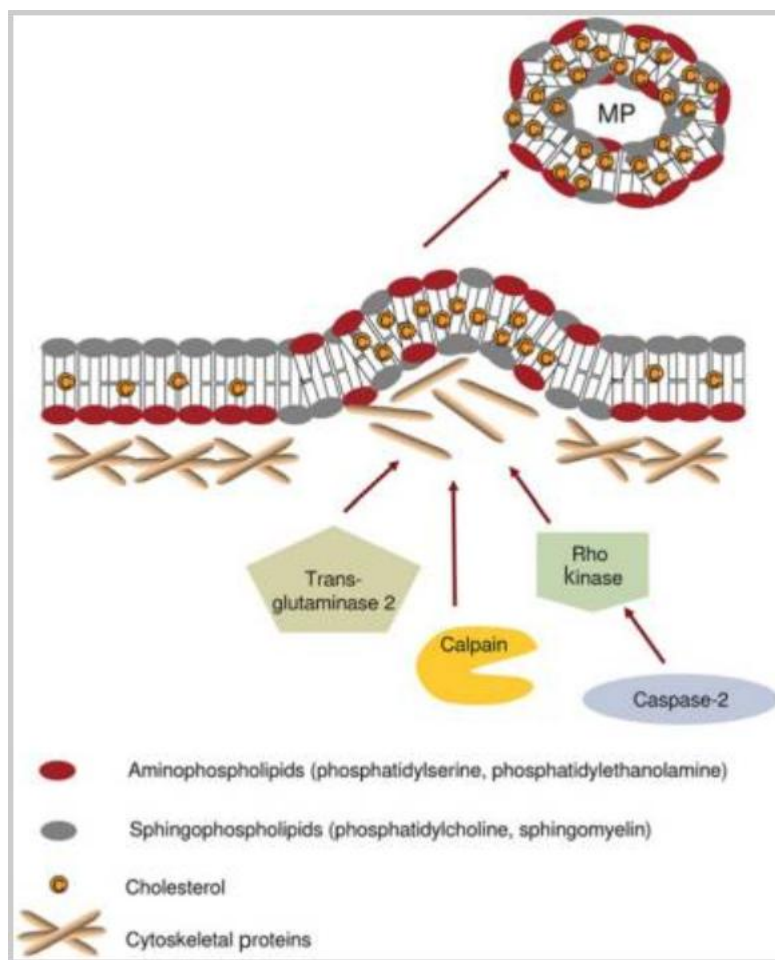
3.5 Σχηματισμός μικροσωματιδίων από ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα (EMP)

Τα MPs προέρχονται και σχηματίζονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων (ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα) [147], ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια [148], νεφρικά ποδοκύτταρα [97], καρκινικά κύτταρα [108] και πληθυσμοί προγονικών κυττάρων [149].

Τα MPs σχηματίζονται μέσω εξωτερικής αναδιαμόρφωσης και αποκόλλησης της πλασματικής μεμβράνης [150]. Αυτή η ελάχιστα κατανοητή διαδικασία φαίνεται να

περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια: (1) μία αρχική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού [151], που περιλαμβάνει αναδιάταξη των ινιδίων ακτίνης και η οποία φαίνεται να ξεκινά από την ενεργοποίηση της καλπαΐνης [152], της Rho κινάσης [153], και της τρανσγλουταμινάσης, εικόνα 37 [154] και (2) την εξωτερίκευση της φωσφατιδυλσερίνης (phosphatidylserine-PS), ενός αρνητικά φορτισμένου αμινοφωσfolιπιδίου που βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στην εσωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, σε υγιή κύτταρα [155]. Στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η "πλευρικότητα" του PS ελέγχεται από ένα σύστημα που εξαρτάται από το σύμπλοκο ATP/ασβέστιο και περιλαμβάνει τρία διαφορετικά ένζυμα: φλιπάση (flippase), φλοπάση (floppase) και σκραμλάση (scramblase) [156].

Εικόνα 37. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού που οδηγεί στον σχηματισμό MP. Πηγή: Adapted with permission from Burger et al., 2013. (Fig 3). [97].



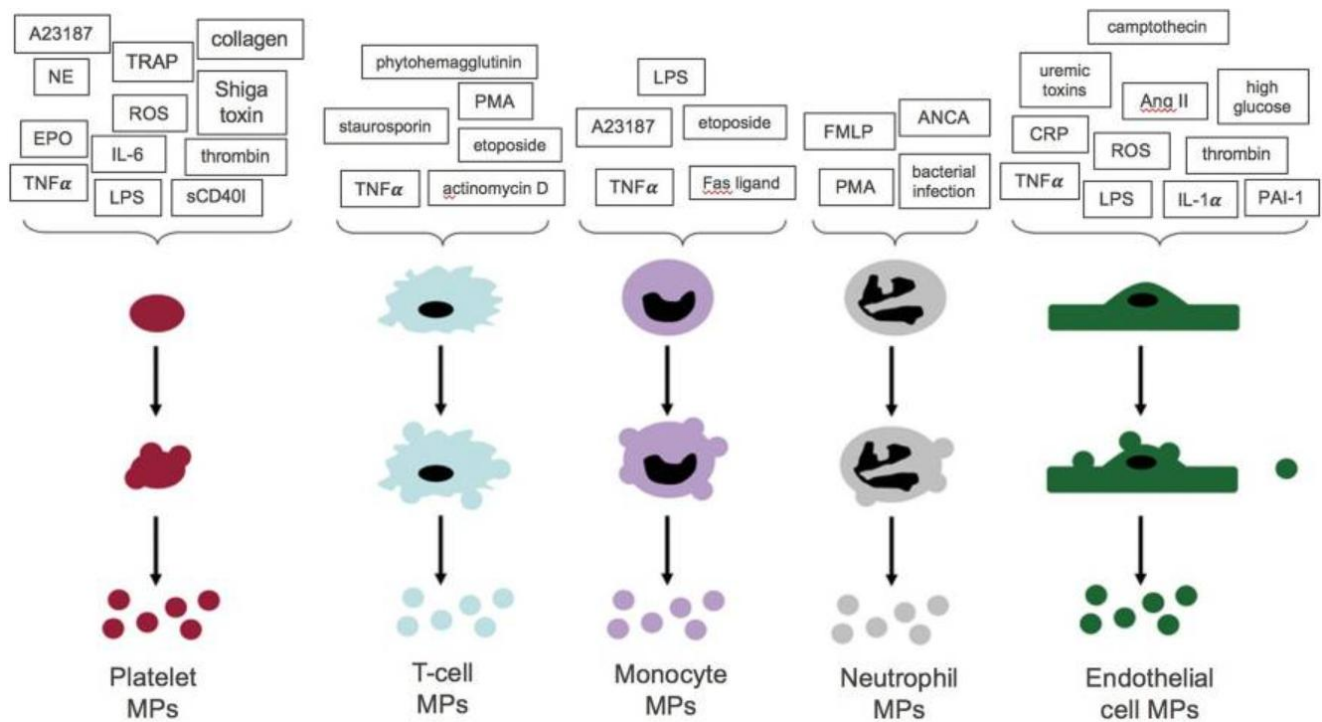
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα αμινοφωσfolιπίδια (φωσφατιδυλ-σερίνη και φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη) βρίσκονται αποκλειστικά στην εσωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού MP, η ασυμμετρία της μεμβράνης χάνεται καθώς τα αμινοφωσfolιπίδια ανακατανέμονται στην εξωτερική στιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού έχει ως αποτέλεσμα την προς τα έξω μετακίνηση (μετατόπιση) της πλασματικής μεμβράνης και μπορεί να εξαρτάται από τον πολυμερισμό της ακτίνης, την κασπάση 2/Rho, την καλπαΐνη και/ή την τρανσγλουταμινάση-2. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Ο σχηματισμός MP φαίνεται να λαμβάνει

χώρα επιλεκτικά σε μικροτομείς (microdomains) πλούσιους σε λιπίδια (λιπιδικές σχεδίες/κυψελίδες) εντός της πλασματικής μεμβράνης.

Μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων έχουν εντοπίσει διάφορα ερεθίσματα για τον σχηματισμό ΜΡ, όπως: διάφορες ορμόνες, λιπαρά οξέα, δραστικές μορφές οξυγόνου (π.χ. υπεροξείδιο του υδρογόνου), καθώς και αυξημένο ενδοκυτταρικό ασβέστιο [157].

Η ενεργοποίηση διαφόρων επιφανειακών υποδοχέων έχει επίσης αποδειχθεί ότι οδηγεί στην παραγωγή ΜΡ, όπως από τον παράγοντα (TNF)-α στα μονοκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα [158], καθώς και από τον προφλεγμονώδη λιποπολυσακχαρίτη [159], τοξίνη shiga [159] και κυτταροκίνες [160] και προ-πηκτικών συνδέσμων [143], κολλαγόνο [161] και νορεπινεφρίνη στα αιμοπετάλια [162] και τον υποδοχέα Toll-like receptor 4 στα δενδριτικά κύτταρα, σχήμα 6 [163].

Σχήμα 6. Ερεθίσματα του σχηματισμού μικροσωματιδίων από αιμοπετάλια, ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκά αιμοσφαίρια (NE, Norepinephrine; EPO, erythropoietin; sCD40I, soluble CD40 ligand). Πηγή: With permission from Burger et al., 2013. (Figure 4). [97].



3.6 Επιδράσεις των MPs στην αγγειακή φυσιολογία και ο ρόλος τους

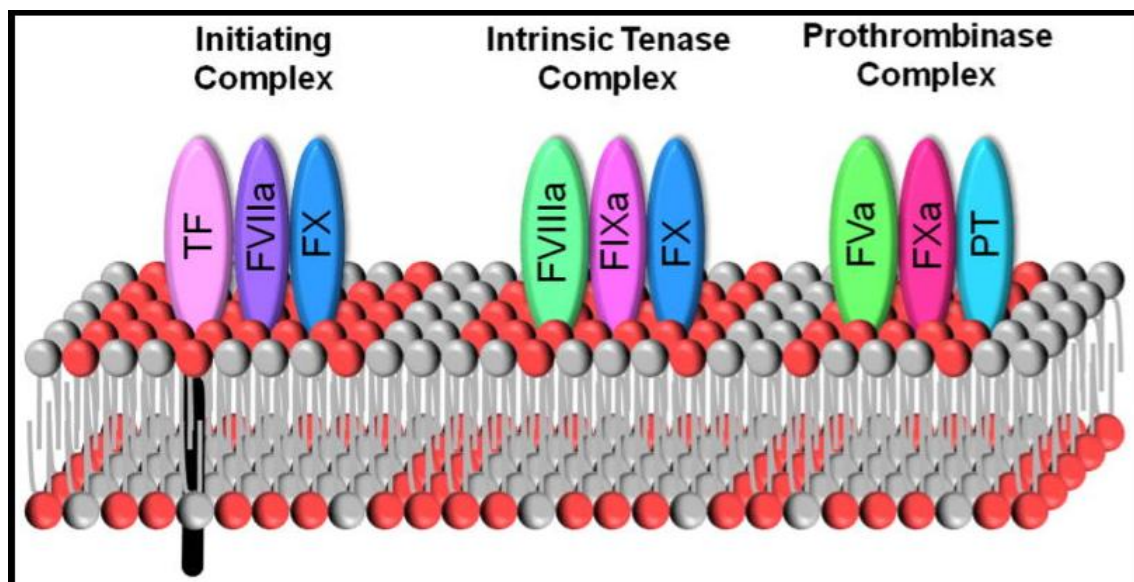
Αν και η δημιουργία των MPs μπορεί να ενισχυθεί από το στρες, η εξωκυττάρωση είναι μια δεδομένη διαδικασία για την πλειονότητα των κυτταρικών σειρών του αίματος και των αγγείων [164]. Ωστόσο, ανάλογα με το ερέθισμα, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο (τόσο του "κυτταροπλάσματος", όσο και της μεμβράνης) για τα MP που προέρχονται από την ίδια κυτταρική σειρά μπορεί να ποικίλλει [165]. Επιπλέον, τα ένζυμα που διέπουν την αποβολή των MPs μπορεί να είναι επιλεκτικά, ανάλογα με τον ενεργοποιητικό παράγοντα και/ή το μικροπεριβάλλον του μητρικού/αρχέγονου κυττάρου. Μια τέτοια στενή ρύθμιση της παραγωγής MPs υποδηλώνει ότι τα MPs μπορούν να διευκολύνουν τον διάυλο επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο από το περιβάλλον. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα MPs εισέρχονται στο εσωτερικό τμήμα μιας πλειάδας κυττάρων (μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα, μεταξύ άλλων) με αναλογική

σχέση προσαύξεσης, επιτρέποντας τη μεταφορά "φορτίου MPs" μεταξύ των κυττάρων με τρόπο που επηρεάζει τη λειτουργία και τον φαινότυπο των κυττάρων-στόχων [166].

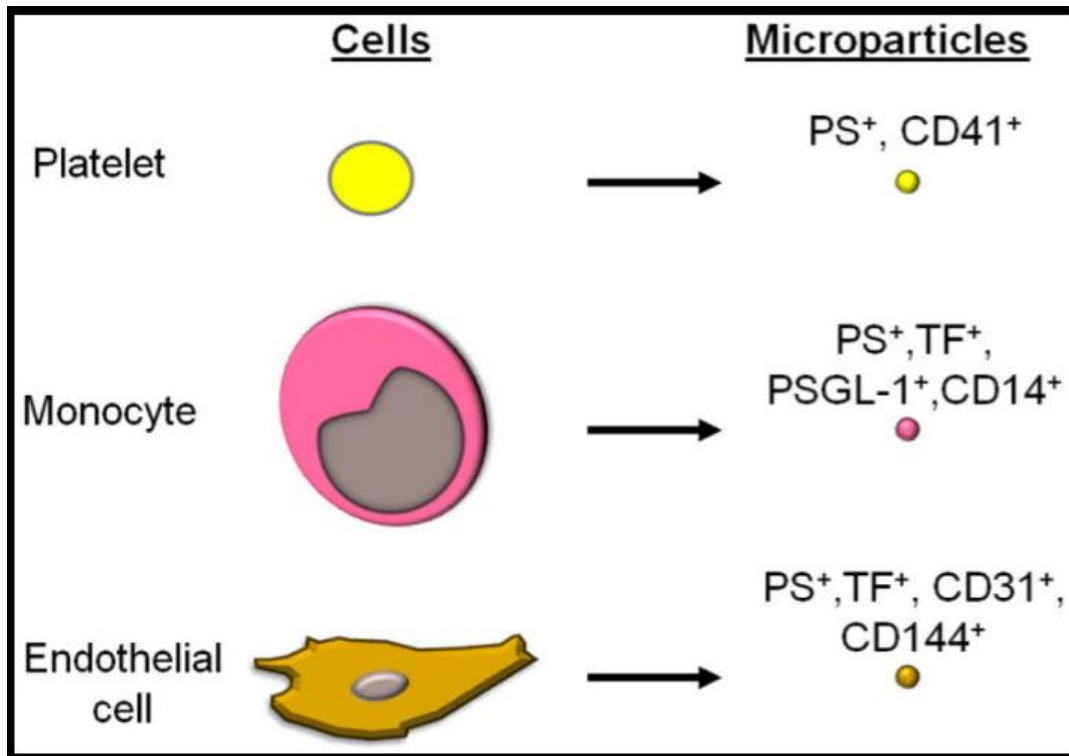
3.7 Στη θρόμβωση

Τα προερχόμενα από αιμοπετάλια MPs παρουσιάζουν παρόμοια δράση με αυτήν των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στο αρχικό στάδιο της δημιουργίας θρομβίνης και της εξέλιξης του θρόμβου, παρά το γεγονός ότι έχουν τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους διαφορά στην επιφάνεια, (50-100 φορές υψηλότερη αιμοστατική ικανότητα των PMPs έναντι της αντίστοιχης των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων) [167]. Επιπλέον, τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια που βρίσκονται στην επιφάνεια τους, κυρίως τα PS, δημιουργούν συνθήκες σύνδεσης των παραγόντων πήξης και της ενεργοποίησης των συμπλόκων της τενάσης και προθρομβινάσης που ευθύνονται για τον σχηματισμό της θρομβίνης, εικόνες 38-41 [168].

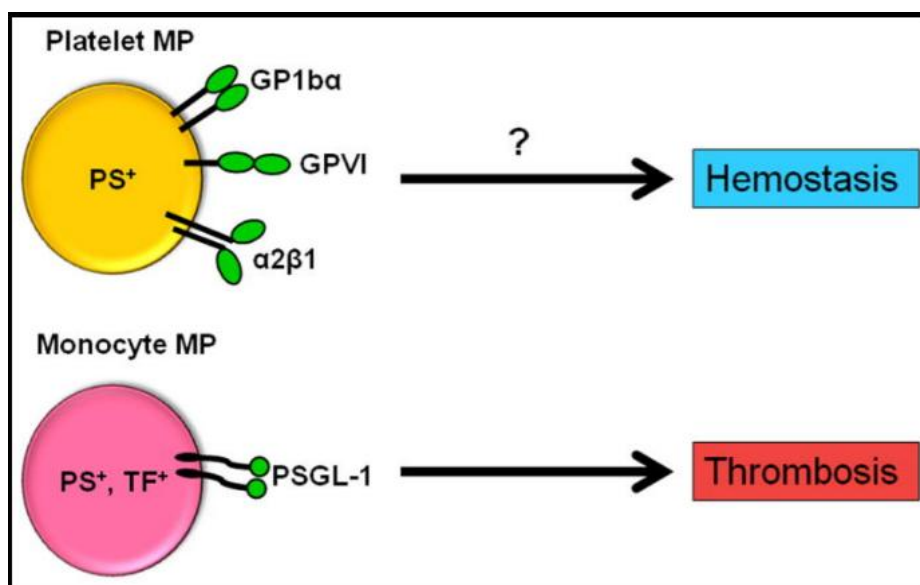
Εικόνα 38. Συναρμολόγηση συμπλόκων πήξης σε μεμβράνη φωσφολιπιδίων PS+. Πηγή: Owens and Mackman, 2011. *Circ Res*, (Figure 1). [168].



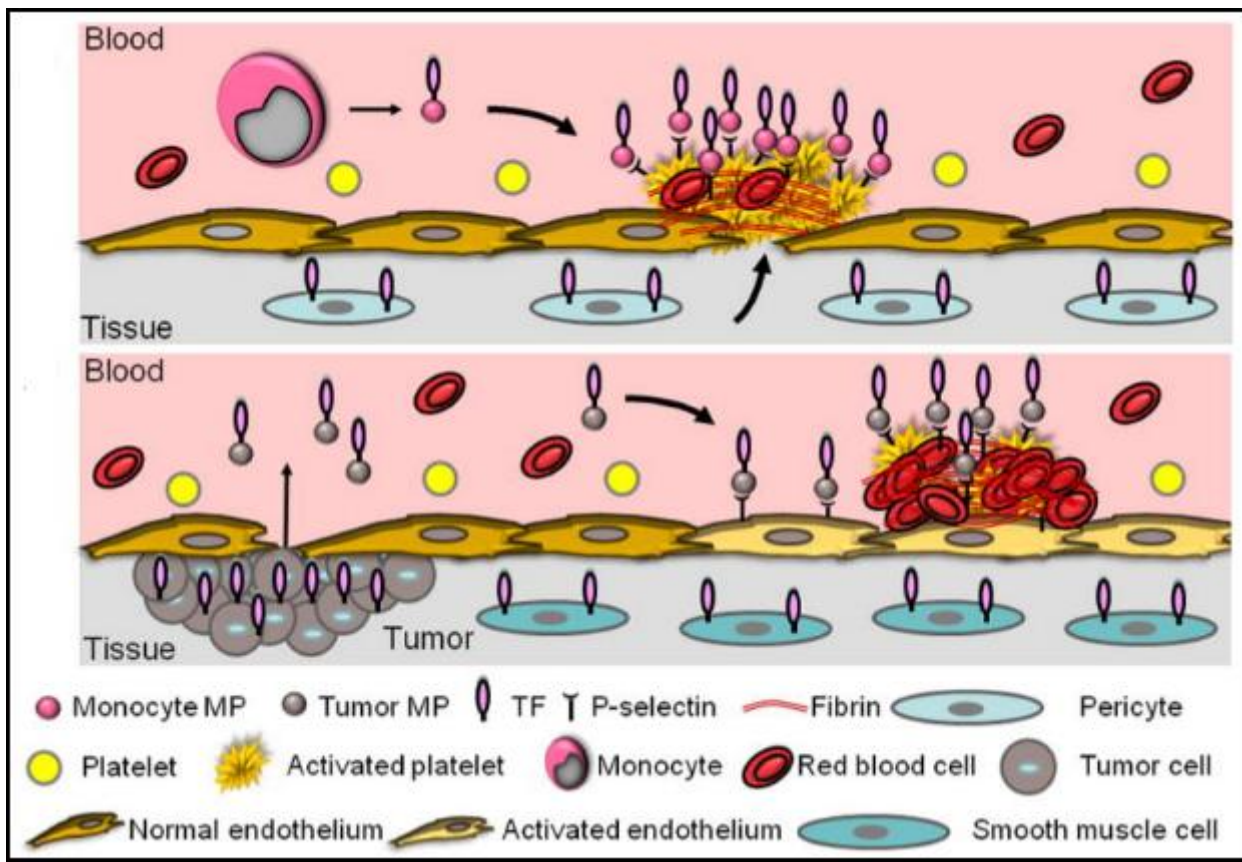
Εικόνα 39. Δείκτες επιφανείας των MPs που απελευθερώνονται από διάφορα κύτταρα. Πηγή: Owens and Mackman, 2011. Circ Res, (Figure 2). [168].



Εικόνα 40. Τα PS^+ των MPs που προέρχονται από αιμοπετάλια ενισχύουν την αιμόσταση και τη θρόμβωση, σε σχέση με τα PS^+ και TF^+ των MPs που προέρχονται από τα μονοκύτταρα. Πηγή: Owens and Mackman, 2011. Circ Res, (Figure 3). [168].



Εικόνα 41. Ο ρόλος των TF+ των MPs στη θρόμβωση αγγείων μικρού μεγέθους και φλεβών. Πηγή: Owens and Mackman, 2011. *Circ Res*, (Figure 4). [168].



3.8 Θρομβοφιλία

Έχει αναφερθεί σε ερευνητικές μελέτες ότι πολλά άτομα που φέρουν κληρονομικές θρομβοφιλικές ανωμαλίες δεν θα εμφανίσουν ποτέ φλεβική θρομβοεμβολή (VTE), ενώ άλλα άτομα εμφανίζουν υποτροπιάζουσα VTE χωρίς γνωστούς πρόσθετους παράγοντες κινδύνου [169]. Τα υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων (MPs) έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο VTE σε ασθενείς με παράγοντα V Leiden και μετάλλαξη της προθρομβίνης G20210A, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή συμβολή των MPs στην υπερπηκτικότητα της ήπιας γενετικής θρομβοφιλίας [169]. Ο ρόλος των MPs ως πρόσθετου παράγοντα κινδύνου για VTE σε φορείς ελαττωμάτων φυσικών αναστολέων της πήξης (σοβαρή θρομβοφιλία) δεν είχε αξιολογηθεί ποτέ, οπότε για τον σκοπό αυτό οι Campello et al. (2016) μέτρησαν τα επίπεδα στο πλάσμα

της annexin V-MP, των MPs που παράγονται από το ενδοθήλιο (EMP), των MPs που παράγονται από τα αιμοπετάλια (PMP), των MPs που φέρουν τον ιστικό παράγοντα (TF+), καθώς και την προπηκτική δραστηριότητα των MPs (PPL) σε: a) 132 φορείς ανεπαρκειών φυσικών αντιπηκτικών παραγόντων (25 ανεπάρκεια αντιθρομβίνης, 63 ανεπάρκεια πρωτεΐνης C και 64 ανεπάρκεια πρωτεΐνης S) και b) σε 132 υγιείς μάρτυρες διαφορετικής ηλικίας και φύλου. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι οι φορείς φυσικών αντιπηκτικών ανεπαρκειών, συνολικά και ξεχωριστά εξεταζόμενοι, παρουσίασαν υψηλότερα διάμεσα επίπεδα δραστηριότητας annexin V-MP, EMP, PMP, TF+MP και PPL από τους υγιείς μάρτυρες ($p < 0,001$, $< 0,001$, $< 0,01$, $0,025$ και $0,03$, αντίστοιχα). Οι συμπτωματικοί φορείς, με προηγούμενο επεισόδιο VTE, είχαν σημαντικά υψηλότερα διάμεσα επίπεδα annexin-V MP από εκείνους χωρίς VTE ($p=0,027$). Οι φορείς με υψηλά επίπεδα annexin V-MP, EMP και PMP είχαν προσαρμοσμένο OR για VTE 3,36 (95% CI, 1,59 έως 7,11), 9,26 (95% CI, 3,55 έως 24,1) και 2,72 (95%CI, 1,16 έως 6,38), αντίστοιχα. Τα αυξημένα επίπεδα των κυκλοφορούντων MPs μπορεί να παίζουν ρόλο σε φορείς ήπιας και σοβαρής κληρονομικής θρομβοφιλίας, ενώ οι κλινικές επιπτώσεις αυτής της συσχέτισης μένει να καθοριστούν [169].

Κατά τις τελευταίες δεκαετίες σημειώθηκαν μεγάλες πρόοδοι στην κατανόηση της παθογένειας της φλεβικής θρομβοεμβολής (VTE) σε ασθενείς με κληρονομική και επίκτητη θρομβοφιλία [κυρίως σύνδρομο αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων (APS)]. Ωστόσο, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Οι προγνωστικοί δείκτες που θα μπορούσαν να εκτιμήσουν τον ατομικό κίνδυνο για VTE θα ήταν σημαντικά χρήσιμοι. Τα μικροσωματίδια (MPs) είναι κυστίδια της μεμβράνης υπομικρών διαστάσεων που απελευθερώνονται σταθερά από την επιφάνεια των κυττάρων μετά από την κυτταρική ενεργοποίηση και την απόπτωση. Οι επιδράσεις των MPs στη θρομβογένεση περιλαμβάνουν την έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης και την έκφραση του ιστικού παράγοντα. Τα MPs περιγράφονται σε κλινικές μελέτες, ως πιθανοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες για την VTE [170]. Τα δημοσιευμένα δεδομένα δείχνουν ότι

τα κυκλοφορούντα MPs μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη VTE σε θρομβοφιλικούς φορείς, τόσο σε ήπιες όσο και σε σοβαρές καταστάσεις. Επιπλέον, η παρουσία ενδοθηλιακών MPs και αιμοπεταλιακών MPs έχει περιγραφεί στο αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και φαίνεται να συνδέεται άμεσα με τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, αλλά όχι με άλλες υποκείμενες αυτοάνοσες διαταραχές, ή με το ίδιο το θρομβωτικό συμβάν [170]. Τα κυκλοφορούντα MPs εικάζεται ότι μπορεί να αποτελούν επιφανόμενο της θρομβοφιλίας και θα μπορούσαν να ρυθμίζονται σε οξείες ιδιαίτερες καταστάσεις, προωθώντας μια συνολική προθρομβωτική κατάσταση μέχρι το όριο του κλινικά σχετικού θρομβωτικού συμβάντος [170].

3.9 von Willebrand

Οι επιδράσεις της δεσμοπρεσσίνης (DDAVP) στις διαταραχές των αιμοπεταλίων και στην πρωτογενή αιμόσταση δεν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στην αύξηση του FVIII/VWF (παράγοντας von Willebrand), καθώς τα συμπυκνώματα VWF/FVIII δεν έχουν καμία επίδραση σε αυτές τις περιπτώσεις [171]. Τα μικροσωματίδια (MPs) μπορούν να υποστηρίξουν την αιμόσταση μέσω της έκφρασης φωσφολιπιδίων, ιστικού παράγοντα και VWF στην επιφάνειά τους. Η μελέτη των Trummer et al. (2013) απέδειξε ότι σημαντικές ποσότητες του VWF δεσμεύονται στα MPs μετά τη χορήγηση του DDAVP και κατά συνέπεια, η εξάντληση των MPs μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα VWF:Ag και VWF:RCo στο πλάσμα. Στη μελέτη τους οι Trummer et al. (2013) πήραν πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια είτε από υγιείς μάρτυρες, είτε πριν και μετά τη χορήγηση DDAVP από ασθενείς με νόσο von Willebrand (τύπου 1 ή πιθανού τύπου 1) ή από ασθενείς με άλλες αιμορραγικές διαταραχές ως μάρτυρες. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των παραμέτρων MPs και VWF πριν και μετά την εξάντληση των MPs με διαφορετικές μεθόδους (επιλογή μαγνητικών σφαιριδίων, μικροδιήθηση πλάσματος, υπερφυγοκέντρωση). Τα MPs των αιμοπεταλίων και τα MPs που φέρουν VWF αυξήθηκαν σημαντικά μετά την DDAVP. Η εξάντληση του MPs με επιλογή μαγνητικών σφαιριδίων οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων VWF:Ag

(-18,0%) και VWF:RCo (-27,7%) στο πλάσμα χωρίς αλλαγές στη σύνθεση των πολυμερών του VWF. Καθώς τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια για τα άτομα ελέγχου με DDAVP, η ποσότητα του VWF που δεσμεύεται στα κυκλοφορούντα μικροσωματίδια ήταν σημαντικά υψηλότερη μετά τη χορήγηση DDAVP σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (μείωση -11,7%). Η DDAVP οδηγεί σε απελευθέρωση μικροσωματιδίων και αυξάνει την ποσότητα του VWF που δεσμεύεται στα μικροσωματίδια, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει την κλινική αποτελεσματικότητα της DDAVP στις διαταραχές των αιμοπεταλίων [171].

Οι Reininger et al. (2006) περιέγραψαν τον μηχανισμό προσκόλλησης των αιμοπεταλίων στον ακινητοποιημένο παράγοντα von Willebrand (VWF) και τον επακόλουθο σχηματισμό μικροσωματιδίων προερχόμενων από αιμοπετάλια με τη μεσολάβηση της γλυκοπρωτεΐνης Iba (GPIba) υπό υψηλή διατμητική τάση [172]. Όπως απεικονίστηκε σε ολικό αίμα που ενέθηκε σε θάλαμο ροής, η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στον VWF αφορούσε μία ή λίγες περιοχές μεμβράνης 0,05 έως 0,1 μm^2 που σχημάτιζαν διακριτά σημεία προσκόλλησης (DAPs) ικανά να αντιστέκονται σε δύναμη άνω των 160 pN. Υπό την επίδραση της υδροδυναμικής αντίστασης, αναπτύχθηκαν μεμβρανικοί δεσμοί μεταξύ του κινούμενου σώματος των αιμοπεταλίων και των DAPs που προσκολλώνται σταθερά στον ακινητοποιημένο VWF. Η συνεχής τάνυση προκάλεσε τελικά τον διαχωρισμό πολλών τέτοιων δεσμών, αφήνοντας στην επιφάνεια σωληνοειδή ή σφαιρικά μικροσωματίδια με διάμετρο μόλις 50 έως 100 nm. Στην επιφάνεια αυτών των μικροσωματιδίων, τα οποία ήταν προπηκτικά, εκφράζονταν υποδοχείς προσκόλλησης (GPIba, $\alpha\text{IIb}\beta_3$) και φωσφατιδυλσερίνη. Η διάτμηση πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια με ρυθμό 10 000 s^{-1} σε ιξωδόμετρο κώνου και πλάκας αύξησε τον αριθμό των μικροσωματιδίων έως και 55 φορές πάνω από την αρχική τιμή. Ο αποκλεισμός της αλληλεπίδρασης GPIb-VWF κατάργησε τη δημιουργία μικροσωματιδίων και στις δύο πειραματικές συνθήκες. Έτσι, μια εμβιομηχανική διαδικασία που διαμεσολαβείται από τους δεσμούς GPIba-VWF στο ταχέως ρέον αίμα μπορεί όχι μόνο να ξεκινήσει την σύλληψη των αιμοπεταλίων σε

αντιδραστικές αγγειακές επιφάνειες, αλλά και να δημιουργήσει προπηκτικά μικροσωματίδια που ενισχύουν περαιτέρω τον σχηματισμό θρόμβου [172].

Οι Artoni et al. (2008) σε μελέτη τους υποστήριξαν την υπόθεση ότι τα υπερμεγέθη πολυμερή του VWF που απελευθερώνονται από το ενδοθήλιο αλληλεπιδρούν με τα αιμοπετάλια και πυροδοτούν τη δημιουργία MPs, τόσο in vivo όσο και in vitro, [173]. Στη μελέτη τους ήταν η μέτρηση των επιπέδων των MP που προέρχονται από αιμοπετάλια (PMP) και των MP που εκφράζουν ιστικό παράγοντα (TFMP) σε σχέση με τα επίπεδα και την πολυμερή σύνθεση του VWF, καθώς και με τη διατμητική τάση, χρησιμοποιώντας φυσικά μοντέλα ex vivo και in vitro. Τα PMP και TFMP αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής και ορίστηκαν ως θετικά γεγονότα Annexin V και GrIIb/IIIa ή ιστικού παράγοντα που εμπίπτουν σε πύλη που ορίζεται από σφαιρίδια 1 μm . Τα MP καταμετρήθηκαν προσθέτοντας γνωστό αριθμό σφαιριδίων 7 μm σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων, τα επίπεδα των PMP και TFMP μετρήθηκαν πριν και μετά τη χορήγηση DDAVP σε 9 ασθενείς με ήπια αιμορροφιλία A. Τα FVIII:C, VWF:Ag, PMP και TFMP μετρήθηκαν στο πλάσμα κατά την έναρξη και 30 λεπτά, 1, 2, 4, 8 και 24 ώρες μετά την υποδόρια χορήγηση DDAVP 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων των PMP και TFMP ($p < 0,05$ σε όλες τις χρονικές στιγμές σε σχέση με την αρχική τιμή) μετά την DDAVP- τα μέγιστα επίπεδα επιτεύχθηκαν μετά από 2-8 h. Βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των επιπέδων VWF:Ag και FVIII:C και των μέγιστων επιπέδων των MP ($r = 0,62$ και $r = 0,7$, αντίστοιχα). Στη συνέχεια μελετήσαμε 27 ασθενείς με διαφορετικούς τύπους νόσου von Willebrand (VWD) και 15 φυσιολογικούς μάρτυρες: το κιτρικό πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια εκτέθηκε σε αυξανόμενη διατμητική τάση (από 0 έως 90 dyne) για 45 δευτερόλεπτα σε ιξωδόμετρο κώνου και πλάκας και τα παραγόμενα PMP καταμετρήθηκαν στη συνέχεια με κυτταρομετρία ροής. Στους φυσιολογικούς ελέγχους ο αριθμός των MP σε 25 dyne ήταν σημαντικά υψηλότερος από τον αριθμό σε 0 dyne ($p < 0,05$). Σε ασθενείς με VWD τύπου 1 και τύπου 2B ο αριθμός των PMPs αυξήθηκε σημαντικά, όπως και στην ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$ σε 25 dyne), ενώ στους ασθενείς

τύπου 3 δεν παρατηρήθηκε αύξηση των PMPs (p n.s. μέχρι 90). Είναι ενδιαφέρον ότι στους ασθενείς τύπου 2M ο αριθμός των PMPs άρχισε να αυξάνεται σημαντικά στα 50 dyne (p<0,05), ενώ οι ασθενείς τύπου 2A είχαν την ίδια συμπεριφορά με τους ασθενείς τύπου 3 [173].

Οι Martins et al. (2019) μελέτησαν τη διερεύνηση των μικροσωματιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια (PMP), των μικροσωματιδίων που προέρχονται από ενδοθηλιακά κύτταρα (EMP) και του παράγοντα von Willebrand (VWF) ανάλογα με τη νεφρική λειτουργία και το χρόνο μετά τη μεταμόσχευση, δεδομένου ότι οι PMP, EMP and VWF ως ασυνήθιστοι βιοδείκτες φαίνεται να αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την αξιολόγηση της χρόνιας νεφρικής νόσου και την παρακολούθηση μετά τη μεταμόσχευση [174]. Στη μελέτη του συμπεριέλαβαν ενενήντα ένας λήπτες νεφρικού μοσχεύματος (RTx) που κατανεμήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με τα επίπεδα κρεατινίνης πλάσματος (C1 < 1,4 και C2 ≥ 1,4 mg/dL), τους εκτιμώμενους ρυθμούς σπειραματικής διήθησης (R1 < 60 και R2 ≥ 60 ml/min ανά 1,73 m²) και το χρόνο μετά τη μεταμόσχευση (T1: 3-24, T2: 25-60, T3: 61-120 και T4 > 120 μήνες). Τα επίπεδα EMP και PMP αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής και τα επίπεδα VWF αξιολογήθηκαν με ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι τα επίπεδα μικροσωματιδίων που προέρχονται από αιμοπετάλια ήταν υψηλότερα στην ομάδα C1 σε σύγκριση με την ομάδα C2 (P = 0,00). Σύμφωνα με τη διάμετρο, τα μικρά PMP και EMP (≤0,7 μm) ήταν επίσης υψηλότερα στην ομάδα C1, όλες οι τιμές P μικρότερες από 0,05. Οι ομάδες T1 και T2 παρουσίασαν υψηλά επίπεδα EMP και επικράτηση των μεγάλων μικροσωματιδίων (>0,7 μm) σε σύγκριση με την ομάδα T4, όλες οι τιμές P μικρότερες από 0,05. Υψηλότερα επίπεδα VWF παρατηρήθηκαν μεταξύ των RTx με κρεατινίνη ≥1,4 mg/dL σε σύγκριση με τις άλλες RTx, P = 0,01 [174].

3.10 Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα

Η απόπτωση του ενδοθηλίου αποτελεί πρωταρχική βλάβη στην παθογένεια της θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (TTP) [175]. Οι Jimenez et al. (2003) έλεγξαν την ως άνω υπόθεση εξετάζοντας τις φαινοτυπικές υπογραφές των ενδοθηλιακών μικροσωματιδίων (EMPs) σε ασθενείς με TTP [175]. Επιπλέον, στη μελέτη τους οριοθετήθηκε η επίδραση του πλάσματος της TTP στα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (MVEC) σε καλλιέργεια. Τα EMPs που απελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (EK) εκφράζουν δείκτες των μητρικών EK- τα EMP που απελευθερώνονται κατά την ενεργοποίηση φέρουν κυρίως CD54 και CD62E, ενώ εκείνα κατά την απόπτωση CD31 και CD105. Διερευνήθηκε η απελευθέρωση EMP in vitro και σε ασθενείς με TTP. Μετά από επώαση των MVEC με πλάσμα TTP, τα EMP και τα EK αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την έκφραση των CD31, CD51, CD54, CD62E, CD105, CD106 και του αντιγόνου του παράγοντα von Willebrand (VWF). Τα EMP αναλύθηκαν επίσης σε 12 ασθενείς με TTP. Τόσο στα EK όσο και στα EMP, η έκφραση του CD62E και του CD54 αυξήθηκε 3- έως 10 φορές και 8- έως 10 φορές αντίστοιχα. Ωστόσο, τα CD31 και CD105 μειώθηκαν κατά 40-60% στα EK, αλλά αυξήθηκαν κατά δύο φορές στα EMP. Η έκφραση του VWF βρέθηκε στο 55 +/- 15% των CD62E+ EMP. Οι δείκτες απόπτωσης ήταν αρνητικοί. Σε ασθενείς με TTP, τα CD62E+ και CD31+/CD42b- EMP ήταν σημαντικά αυξημένα και προηγούνταν και συσχετιζόνταν καλά με αύξηση του αριθμού των αιμοπεταλίων και πτώση της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Τα CD62E+ EMP (60 +/- 20%) συν-εκφράζουν VWF και CD62E. Η αναλογία των CD31+/42b- προς τα CD62E+ EMP παρουσίασε ένα πρότυπο (pattern) που συνάδει με την ενεργοποίηση. Το συμπέρασμα της ως άνω μελέτης αποδεικνύει την ενδοθηλιακή ενεργοποίηση στην TTP. Τα EMP που συν-εκφράζουν VWF και CD62E θα μπορούσαν να διαδραματίσουν ρόλο στην παθογένεια της TTP [175].

Οι Ali et al. (2018) μελέτησαν τα MPs σε διαφορετικές φάσεις της Θρομβωτικής θρομβοπενικής πορφύρας (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-TTP) και της

δράσης της πλασμαφαίρεσης (Exchange Plasmapheresis-EPP) στο προφίλ τους [176]. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι τα MPs που προέρχονται από τα κύτταρα αντικατοπτρίζουν τη δραστηριότητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Υπήρξε γραμμική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PMPs και του αριθμού των αιμοπεταλίων. Τα χαμηλά PMPs στην οξεία φάση αντανακλούν την αρχική θρομβοπενία που χαρακτηρίζει την TTP. Όταν ξεκίνησε η EPP, η νόσος βελτιώθηκε και υπήρξε αύξηση των PMPs που αντανακλούσε την αύξηση των αιμοπεταλίων. Η αύξηση αυτή διατηρήθηκε στη φάση της ύφεσης. Αντίθετα, η EMP62E και η RMP αυξάνονται στην οξεία φάση της TTP λόγω της ενεργοποίησης του ενδοθηλίου, της εναπόθεσης μικροθρόμβων και του κατακερματισμού των ερυθροκυττάρων. Μετά την EPP η νόσος βρίσκεται σε ηρεμία, εξ ου και η προοδευτική μείωση των EMP62E και RMP. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν μία υποσχόμενη χρησιμότητα του προφίλ των MPs που προέρχονται από κύτταρα ως κλινικό εργαλείο για την παρακολούθηση των ασθενών με χρόνια TTP και την πρόβλεψη της υποτροπής της νόσου σε πρώιμο στάδιο. Μετά την έναρξη της EPP, η μεταβολή του προφίλ των MPs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και τον προσδιορισμό του κατάλληλου χρόνου για την απομάκρυνση από την EPP [176].

Μεταξύ των διαφόρων ειδών MPs, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα RMP (MPs ερυθροκυττάρων), τα PMP (MPs αιμοπεταλίων), τα LMP (λευκοκύτταρα), τα EMP (ενδοθηλιακά κύτταρα). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση, τις θρομβώσεις και τη φλεγμονή [177]. Τα MPs αντανακλούν τον πρώιμο τραυματισμό των γονικών κυττάρων και αποτελούν ευαίσθητους πρώιμους βιοδείκτες των υποκείμενων διαταραχών [176].

Οι McCauley et al. (2018) έδειξαν στη μελέτη τους ότι τα PMPs ήταν πολύ υψηλότερα στην ενεργό ITP από ό,τι στην TTP, αντανακλώντας πιθανώς τον διαμεσολαβούμενο από αντισώματα κατακερματισμό των αιμοπεταλίων που είναι εγγενής στην ITP. Αυτό επιβεβαιώνεται περαιτέρω από την υψηλότερη LMP. Είναι ενδιαφέρον ότι τα PMPs στην ITP σε ύφεση ήταν υψηλότερα από ό,τι στην ενεργό ITP, αν και ο λόγος

PMP/αιμοπετάλια παρέμεινε σταθερός. Αντίθετα, ο λόγος PMP/αιμοπετάλια στην TTP μειώθηκε από την ενεργό φάση στην φάση ύφεσης, παρά την αύξηση της PMP. Αυτό υποδηλώνει ότι το ανοσολογικό περιβάλλον στην ITP ευνοεί την σταθερή παραγωγή PMPs σε όλες τις διαφορετικές φάσεις της νόσου. Τα EMPs και τα RMPs ήταν πολύ υψηλότερα στην ενεργό TTP από ό,τι στην ITP, αντανακλώντας την ενδοθηλιακή βλάβη και τον κατακερματισμό των ερυθροκυττάρων με αιμόλυση που υπάρχει στην TTP. Επιπλέον, τα αυξημένα RMPs στην ενεργό TTP μπορούν να συμβάλλουν στον σχηματισμό μικροθρόμβων λόγω της εγγενούς προπηκτικής τους δραστηριότητας. Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει ότι τα προφίλ C-MP μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τις ανοσοδιαμεσολαβούμενες διαταραχές, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε βελτιώσεις στη διάγνωση και τη διαχείρισή τους [176].

3.11 Αιμορροφιλία

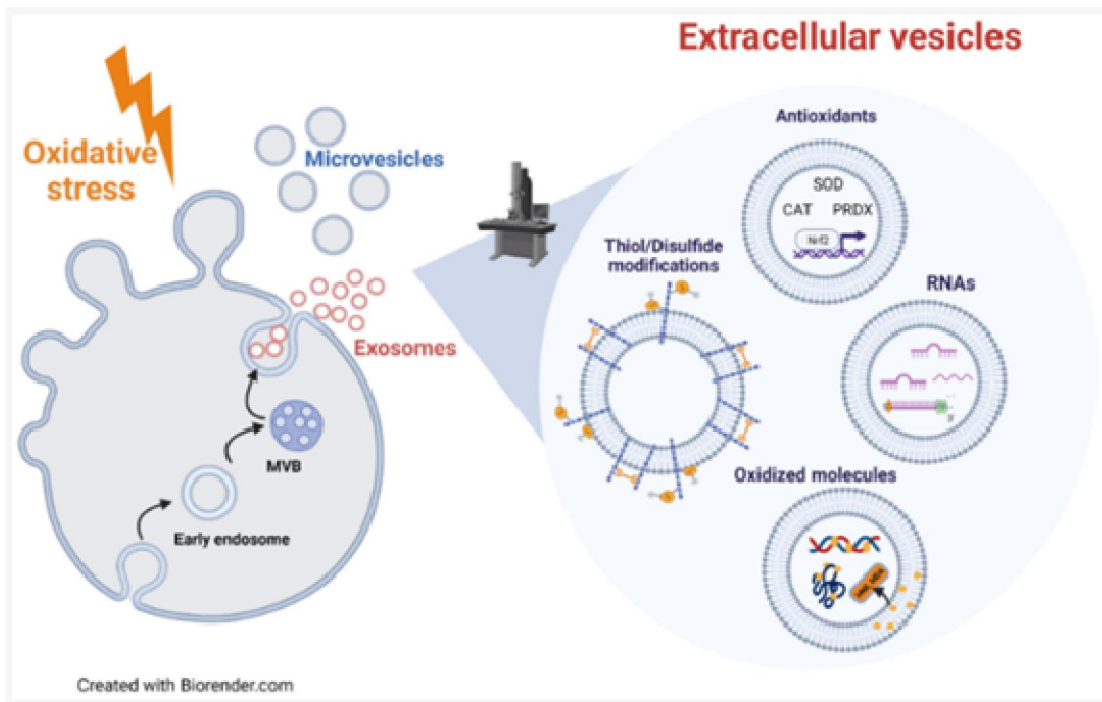
Ως μία από τις πιο γνωστές κληρονομικές αιμορραγικές διαταραχές, η αιμορροφιλία A (HA) προκαλείται από την ανεπάρκεια ή τη δυσλειτουργία του παράγοντα πήξης VIII (FVIII). Οι ασθενείς με HA (PWHΑ) υποφέρουν από μη φυσιολογική αιμορραγία μετά από τραυματισμούς ή χειρουργικές επεμβάσεις, ή ακόμη και αυθόρμητη αιμορραγία σε σοβαρές περιπτώσεις, ιδίως στις αρθρώσεις και τους μυς. Η κύρια θεραπεία για την PWHΑ είναι η θεραπεία αντικατάστασης του FVIII. Οι ασθενείς με το ίδιο υπολειμματικό επίπεδα FVIII μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους αιμορραγίας, επομένως εξατομικευμένη προσαρμογή της θεραπείας είναι απαραίτητη. Επιπλέον, οι κίνδυνοι καρδιαγγειακής νόσου (CVD) είναι αυξημένοι στους μεσήλικες ή ηλικιωμένους ασθενείς. Η διαχείριση της καρδιαγγειακής νόσου σε PWHΑ έχει καταστεί μια νέα κλινική πρόκληση. Τα MPs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση και θρόμβωση και αναφέρεται ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Ωστόσο, ο ρόλος των MPs στην αιμόσταση της HA καθώς και στην ανάπτυξη της CVD στην PWHΑ παραμένει ασαφής [178]. Μελέτη των Zong et al. (2020) βασιζόμενη στην άποψη ότι τα κυκλοφορούντα μικροσωματίδια (MPs) είναι προπηκτικά λόγω της επιφάνειας που περιέχει φωσφατιδυλοσερίνη (PS), η οποία

διευκολύνει την πήξη, οδήγησε στη διερεύνηση της υπόθεσης αν τα MPs βελτιώνουν την αιμόσταση σε μοντέλα πλάσματος αιμορροφιλίας Α (HA). Έτσι, τα MPs που απομονώθηκαν από συμπυκνωμένο φυσιολογικό ανθρώπινο πλάσμα προστέθηκαν σε μοντέλα πλάσματος σοβαρής, μέτριας και ήπιας HA (0%, 2,5%, 20% FVIII). Η επίδραση των MPs στην αιμόσταση αξιολογήθηκε με βαθμονομημένο αυτοματοποιημένο θρομβόγραμμα (CAT) και δοκιμασίες συνολικής δυνατότητας αιμόστασης (OHP), ενώ η δομή της ινικής απεικονίστηκε με τυπική συνοπτική μικροσκοπία, μικροσκοπία εξάντλησης διεγερμένης εκπομπής (STED) και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Τα MPs αποκατέστησαν εν μέρει την παραγωγή θρομβίνης και τον σχηματισμό ινώδους σε όλα τα μοντέλα πλάσματος HA. Η προπηκτική δράση των MPs απαιτεί έκθεση σε PS, σε μικρότερο βαθμό ενεργοποίησης της οδού επαφής, αλλά όχι έκθεση σε ιστικό παράγοντα ή in vitro διέγερση των MPs. Τα MPs ομαλοποίησαν εν μέρει τη δομή της ινικής και με τη χρήση STED υπερ-ανάλυσης, τα MPs που προσκολλήθηκαν στην ινική διαχωρίστηκαν με σαφήνεια. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνοπτικά καταδεικνύουν ότι τα PS θετικά MPs θα μπορούσαν να βελτιώσουν την αιμόσταση σε μοντέλα πλάσματος HA [178]. Εξ άλλου είναι ήδη από παλαιότερα γνωστό ότι οι θεραπευτικές επιλογές για τους ασθενείς με αιμορροφιλία με αναστολείς δεν είναι οι βέλτιστες. Τα μικροσωματίδια που φέρουν τον ιστικό παράγοντα εγκαθίστανται στους θρόμβους με τρόπο που εξαρτάται από μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Η πιθανή χρησιμότητά τους ως προπηκτικό παράγοντα, καθώς και οι προκλήσεις της αξιολόγησης αυτής της προσέγγισης σε μοντέλα αιμορροφιλίας σε ποντίκια, έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα [179].

3.12 Οξειδωτικό στρες

Έχει αποδειχθεί ότι τα MPs οξειδωτικού στρες διαφορετικών προελεύσεων, που παράγονται μετά την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων, επηρεάζουν τα ενζυμικά συστήματα που ελέγχουν την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, σχεδιάγραμμα 1.

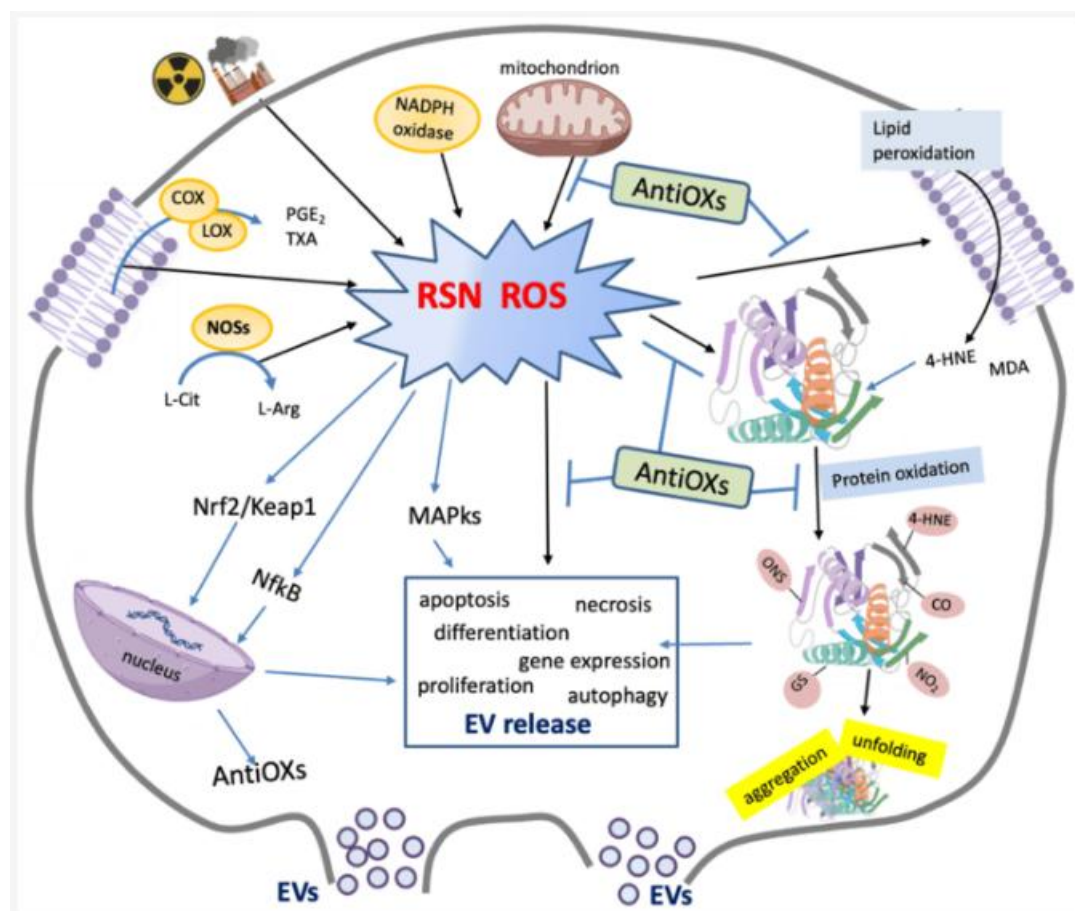
Σχεδιάγραμμα 1. Σύνδεση μεταξύ των EVs και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων προέλευσης. Πηγή: Cells 2021, 10, 1763 (Figure 2, p9).



Τόσο τα MPs που προέρχονται από το ενδοθήλιο, όσο και αυτά που προέρχονται από τα μονοκύτταρα είναι γνωστό ότι αυξάνουν την παραγωγή υπεροξειδίου [180] και υπεροξειδίου του υδρογόνου [181], καθώς και ότι αποσυνδέουν την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) [182]. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι τα ενεργοποιημένα MPs που σχετίζονται με τα T-κύτταρα αποσβένουν την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου και αυξάνουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), σχεδιάγραμμα 2 [183]. Οι συνθήκες οξειδωτικού στρες επηρεάζουν την απελευθέρωση και το μοριακό φορτίο των EVs, τόσο των εξωσωμάτων όσο και των μικροσωματιδίων, τα οποία μπορούν να διαμορφώσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων-στόχων. Τα EVs που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες μπορεί να μεταφέρουν συστατικά του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (SOD, CAT, PRDX και Nrf2), οξειδωμένα μόρια, ειδικά RNAs που εμπλέκονται στην απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες και τροποποιημένη περιεκτικότητα σε πρωτεϊνικές ομάδες θειόλης/διθειούχων. Η παράδοση

αυτών των μορίων μέσω EVs θα μπορούσε να είναι ένας τρόπος που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα που υφίστανται οξειδωτικό στρες για την εξάλειψη των κατεστραμμένων/τοξικών μορίων. Επιπλέον, το σχετιζόμενο με το οξειδωτικό στρες μοριακό φορτίο των EVs μπορεί να μεταφερθεί σε κύτταρα-στόχους, διαμορφώνοντας έτσι την απόκρισή τους στο οξειδωτικό στρες.

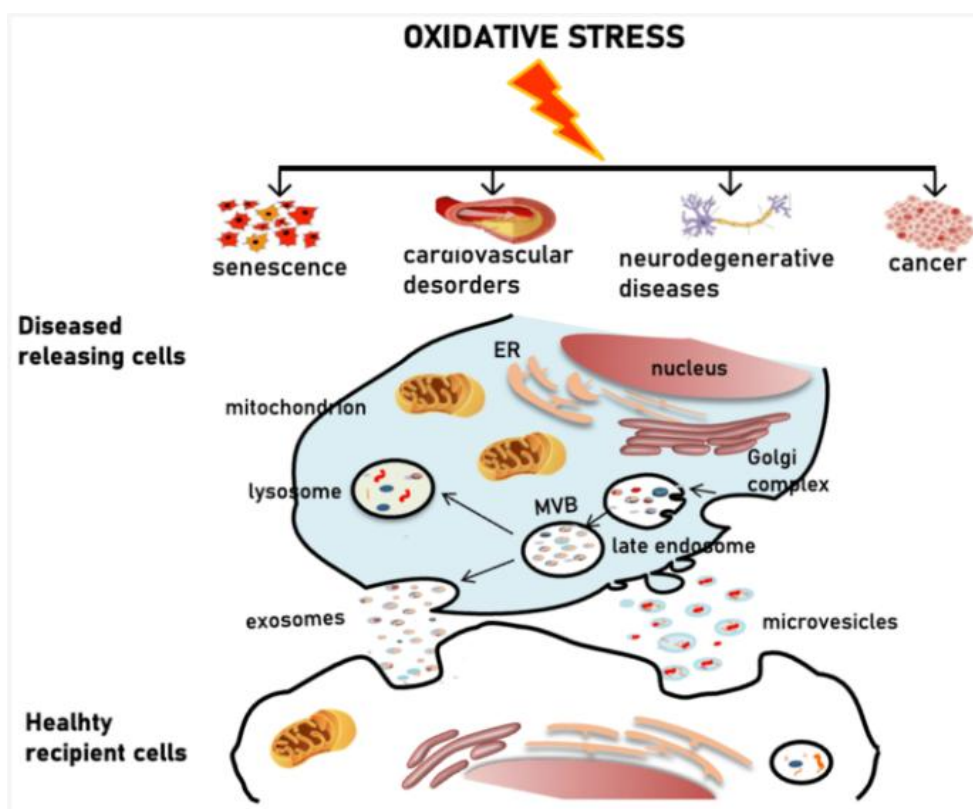
Σχεδιάγραμμα 2. Σχηματική αναπαράσταση των κύριων πηγών και επιδράσεων των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και των αντιδραστικών ειδών αζώτου (RNS). Πηγή: Cells 2021, 10, 1763 (Figure 1, p5).



Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι σχετίζεται με διάφορες παθολογίες. Η γήρανση και οι ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία, όπως οι καρδιαγγειακές επιπλοκές, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και ο καρκίνος, χαρακτηρίζονται από συνθήκες

οξειδωτικού στρες που προκύπτουν από τη συσσώρευση ελεύθερων ριζών, λόγω μεταβολικών μεταβολών, μειωμένης κάθαρσης κατεστραμμένων πρωτεϊνών και οργανιδίων, προοδευτικής μείωσης της αποτελεσματικότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η γήρανση και οι ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία συνδέονται επίσης συνήθως με τη φλεγμονή. Έχει αναφερθεί ότι οι προ-οξειδωτικές και προ-φλεγμονώδεις συνθήκες επάγουν την απελευθέρωση EVs και σύμφωνα με αυτό, η γήρανση, καθώς και ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, συνδέονται με αυξημένη παραγωγή EVs που χαρακτηρίζονται από μεταβαλλόμενη βιοχημική σύνθεση, σχεδιάγραμμα 3. Τα EVs, ιδίως τα εξωσώματα, εμπλέκονται έντονα στην παθοφυσιολογία ασθενειών που σχετίζονται με συνθήκες οξειδωτικού στρες. Οι ROS και τα οξειδωμένα μόρια μπορούν να ταξινομηθούν σε EVs και να παραδοθούν σε γειτονικά κύτταρα εξαπλώνοντας βλάβες στον ιστό και πυροδοτώντας φλεγμονή.

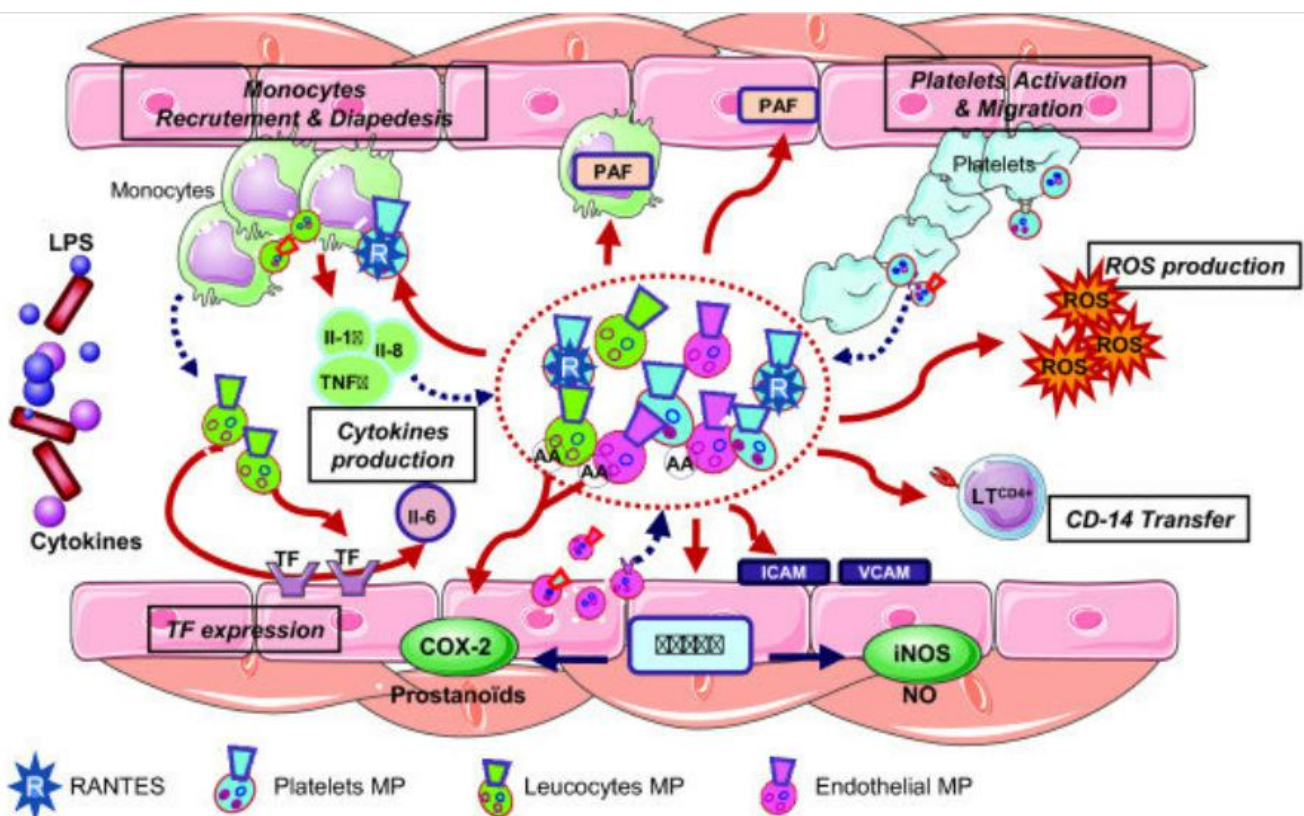
Σχεδιάγραμμα 3. Σχηματική αναπαράσταση της παθοφυσιολογίας των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Πηγή: Cells 2021, 10, 1763 (Figure 3, p13).



3.13 Φλεγμονή

Η προφλεγμονώδης αντίδραση προκαλεί γενικά την αποβολή MPs. Τα MPs μπορούν να συμβάλουν άμεσα στη φλεγμονώδη απόκριση μέσω του ενισχυτικού τους ρόλου στην πυροδότηση του μηχανισμού φλεγμονώδους απόκρισης (π.χ. τα MPs που προέρχονται από τα PMN προάγουν την απελευθέρωση της ενδοθηλιακής IL-6 και της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων), σχεδιάγραμμα 4 [184].

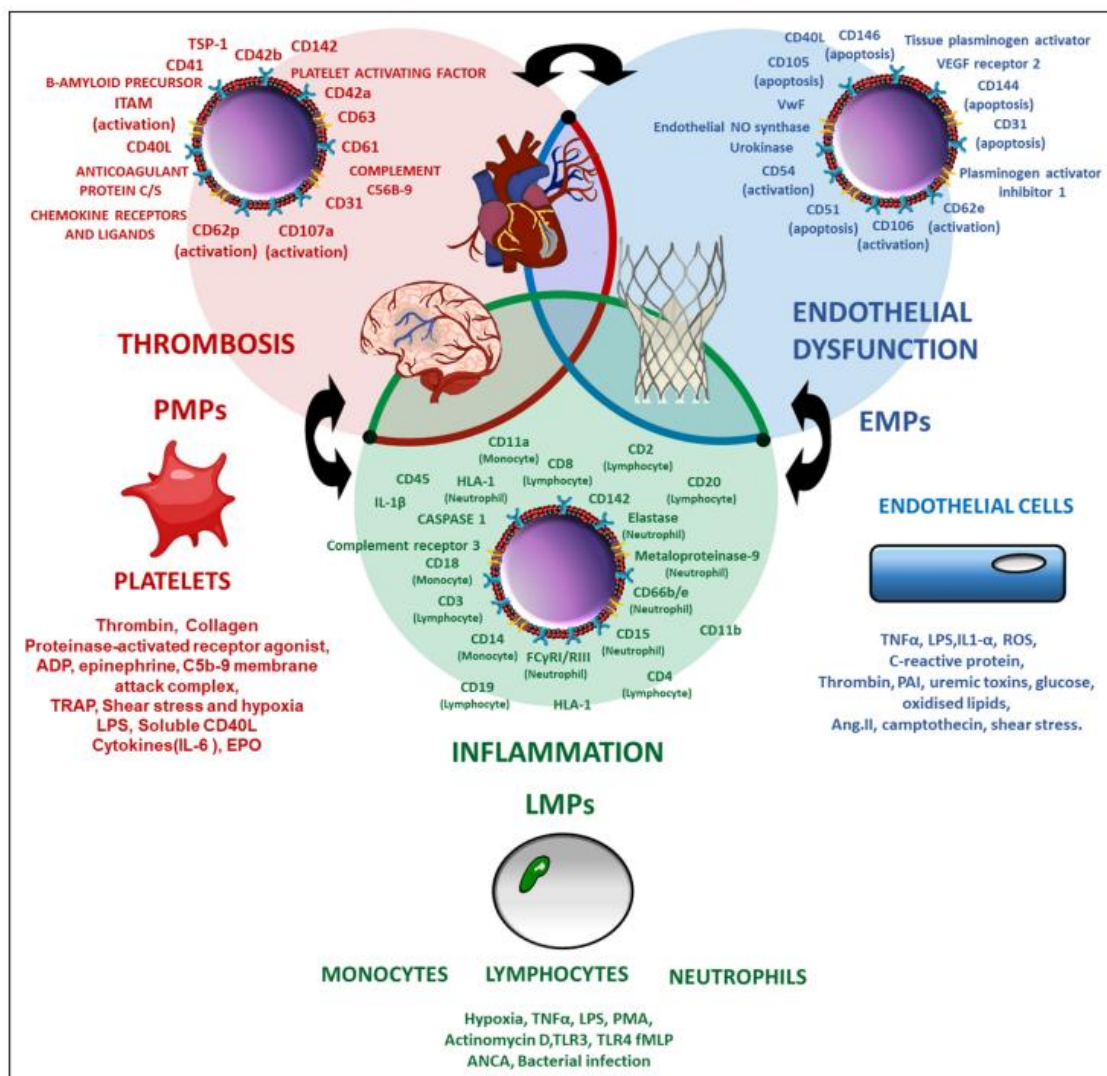
Σχεδιάγραμμα 4. Μικροσωματίδια και φλεγμονή. Πηγή: Critical Care, 14(5):236, (Figure 3, p6).



Τα MPs πιστεύεται επίσης ότι προάγουν τη διακυτταρική αλληλεπίδραση και προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων, σχεδιάγραμμα 5. Συγκεκριμένα, τα MPs που προέρχονται από το ενδοθήλιο αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης και διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις μονοκυττάρων-ενδοθηλιακών κυττάρων [185],

εκτός από την σύνδεση με τα μονοκύτταρα και την προώθηση της δια-ενδοθηλιακής μετανάστευσης [186].

Σχεδιάγραμμα 5. Οι επιπτώσεις των MPs στη φλεγμονή. Πηγή: Hypertension, 2021, 77(6):1825–1844, (Figure 2, p 1829).



3.14 Αγγειογένεση

Τα MPs που προέρχονται από τα αιμοπετάλια έχουν εμπλακεί στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Σε αρουραίους μετά από ισχαιμία του μυοκαρδίου, τα MPs των αιμοπεταλίων αυξάνουν την πυκνότητα των τριχοειδών μετά την ισχαιμία και τον

πολλαπλασιασμό [187] και αναφέρεται ότι προάγουν τον σχηματισμό σωληναρίων από ενδοθηλιακά κύτταρα της ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας [188]. Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς είναι γνωστό ότι τα αιμοπετάλια περιέχουν τουλάχιστον 20 παράγοντες που ρυθμίζουν την αγγειογένεση. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα διεγερμένα MPs που σχετίζονται με T-κύτταρα αναστέλλουν την αγγειογένεση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [189].

3.15 Απόπτωση

Τα MPs που προέρχονται από ενδοθηλιακά κύτταρα και μονοκύτταρα περιγράφεται ότι προάγουν την κυτταρική γήρανση και την απόπτωση στα κυκλοφορούντα αγγειογενετικά και ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα αντίστοιχα [190, 191]. Η διαδικασία αυτή φαίνεται να συνδέεται με τη φαγοκυττάρωση των MPs που περιέχουν υψηλές ποσότητες μεμβρανικού αραχιδονικού οξέος, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της κασπάσης και την επακόλουθη έναρξη της απόπτωσης [192].

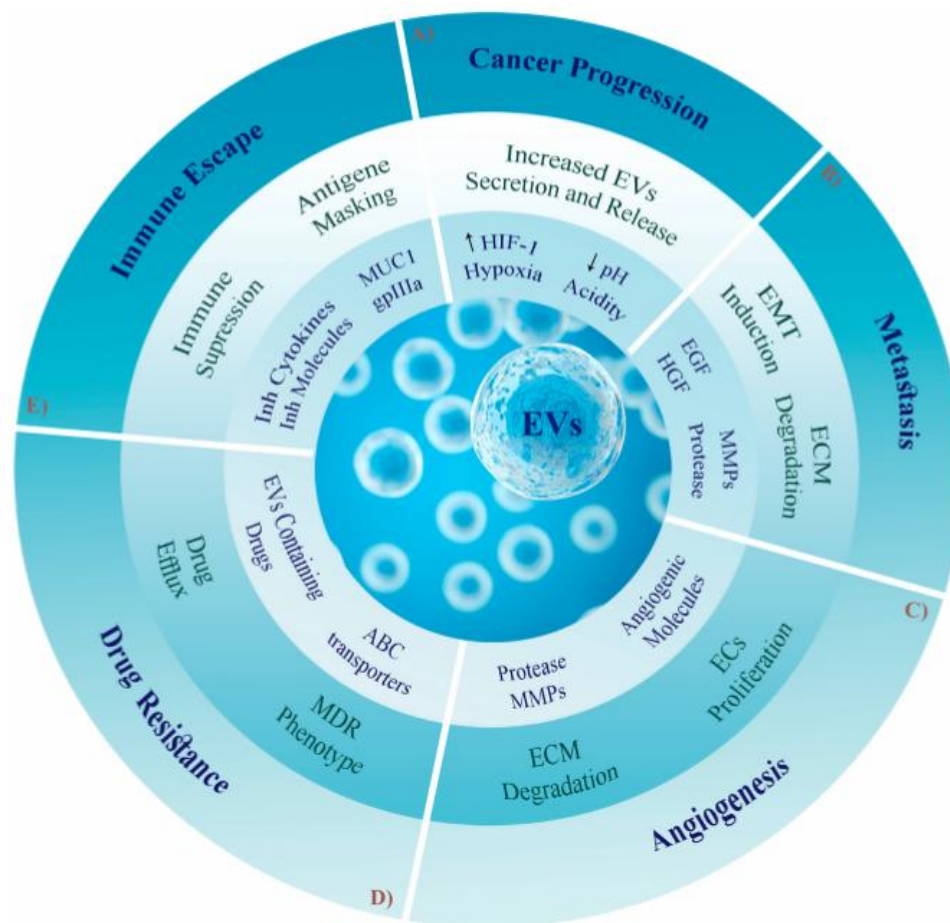
3.16 Κατασταλτική επίδραση των EVs στο ανοσοποιητικό σύστημα

Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, η αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση είναι κατασταλμένη λόγω της παραγωγής των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών, όπως οι TGF- β και IL-10. Τα καρκινικά αντιγόνα ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση προκειμένου να σταματήσει η ανάπτυξη του όγκου κατά τα πρώτα στάδια της νόσου [193]. Όμως, όσο η νόσος εξελίσσεται, για άγνωστους λόγους, ο μηχανισμός αυτός αρχίζει να αποτυγχάνει. Πρόσφατες μελέτες προτείνουν την «Επαγόμενη από τα EVs καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος» που συγκεντρώνει πλέον το ερευνητικό ενδιαφέρον στον τομέα της ανοσο-ογκολογίας [194]. Οι Ricklefs et al. έδειξαν ότι τα προερχόμενα από γλοιοβλάστωμα EVs φέρουν τον PD-L1 και έτσι μπλοκάρουν τον T cell receptor (TCR), που μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των T κυττάρων [195].

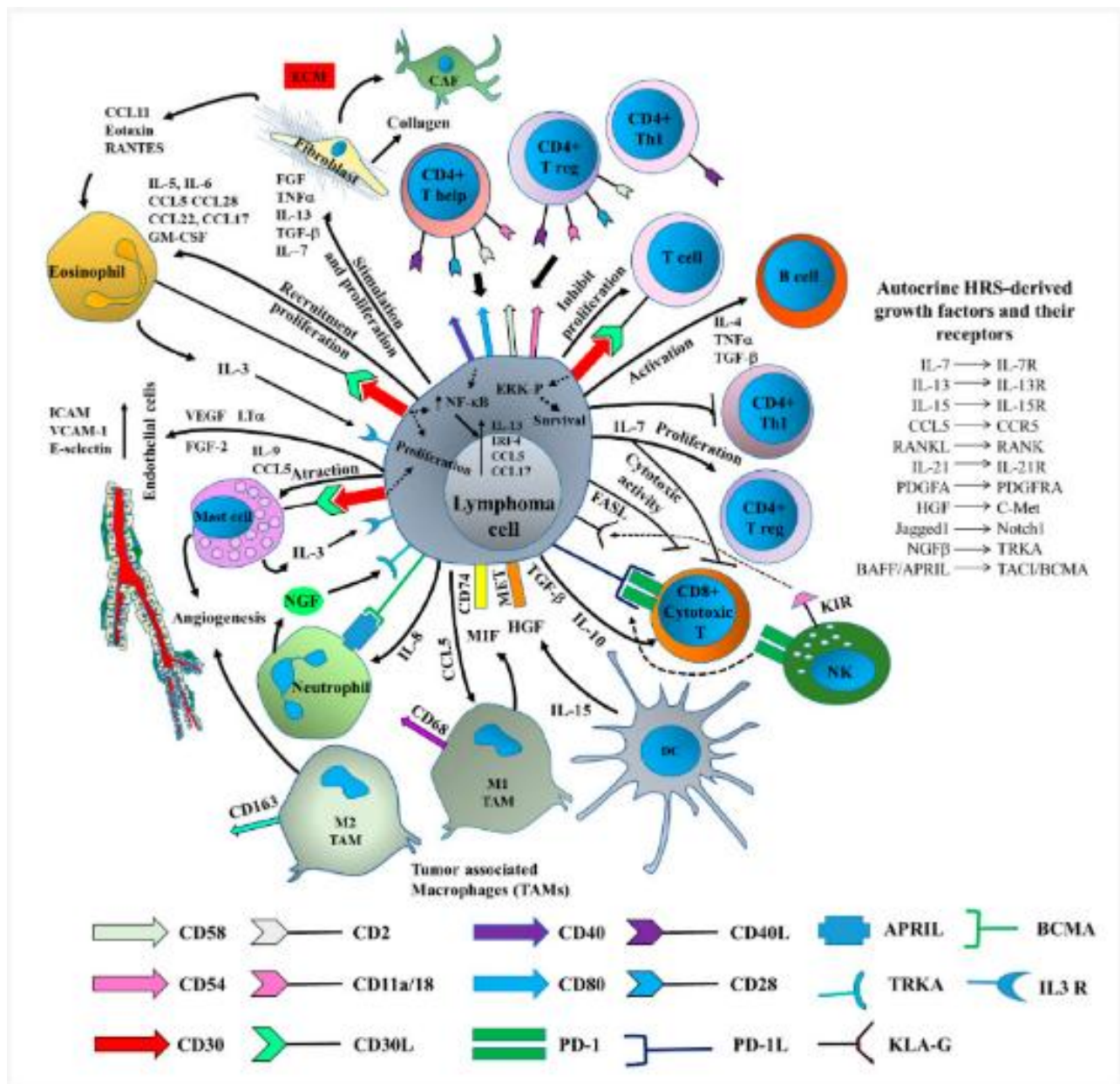
3.17 Καρκίνος

Η αυξημένη ποσότητα των μικροσωματιδίων παρατηρείται σε παθολογικές καταστάσεις. Τα EVs συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου μεταφέροντας στα κύτταρα στόχους: RNA [196], ιστικούς παράγοντες [112], υποδοχείς κυτταροκινών [197] όπως τον υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης (EGFR-epidermal growth factor receptor) [198]. Τα EVs εμπλέκονται κυρίως στα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των αιματολογικών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των συνεχών πολλαπλασιαστικών σημάτων, της διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα, της αθανатоποίησης, της διείσδυσης, της αγγειογένεσης και τέλος, της αντίστασης στον κυτταρικό θάνατο, σχήματα 7 και 8 [93,199].

Σχήμα 7. Ο ρόλος των EVs στην παθολογία των διαφόρων καρκίνων. Πηγή: Dibavar et al., 2021. Life Sci, 271:119177 (Figure 3, p.5). [93].



Σχήμα 8. Αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ λεμφωματικών κυττάρων και συστατικών LME που εμπλέκονται στην ανοσολογική διαφυγή του όγκου. Πηγή: Navarro-Tableros et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(1):41. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(1):41, (Figure.3 p. 7). [199].



3.17.1 Η σημασία των EVs στο μικροπεριβάλλον των αιματολογικών κακοηθειών

Υπάρχει πληθώρα μελετών που αναφέρουν τον πιθανό ρόλο των EVs στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των αιματολογικών κακοηθειών. Τα EVs που προέρχονται από τη ΧΛΛ μεταφέρουν μη κωδικοποιούμενο Y RNA hY4 στα γειτονικά μονοκύτταρα για

να τα αναγκάσουν να απελευθερώσουν κυτταροκίνες, όπως η χημειοκίνη C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), CCL4 και IL-6. Επίσης, το Y RNA hY4 επάγει την έκφραση του PD-L1, ο οποίος με την σειρά του προκαλεί ανοσολογική διαφυγή στο μικροπεριβάλλον του όγκου [200]. Άλλες μελέτες έδειξαν επίσης ότι τα EVs που προέρχονται από το πλάσμα των ασθενών με AML μείωσαν την κυτταροτοξική δραστηριότητα των NK κυττάρων, ως σημαντικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου, μεταφέροντας CD33, CD34, CD117, MICA/MICB και TGF- β για την υποβάθμιση του υποδοχέα NKG2D στα NK κύτταρα [201, 202].

Αν και η σημασία του όξινου pH και των επιπέδων των EVs έχει τεκμηριωθεί στις λευχαιμίες, τα λεμφώματα και το πολλαπλούν μυέλωμα, η άμεση συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο παραγόντων δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως, μέχρι στιγμής. Συνολικά, φαίνεται ότι η αύξηση του εξωκυττάριου pH με αναστολείς της αντλίας πρωτονίων (proton pump inhibitors -PPIs) και ρυθμιστικούς παράγοντες για τη μείωση της έκκρισης των EVs, μπορεί να είναι μια πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία των αιματολογικών κακοηθειών και την πρόληψη της ανάπτυξής τους [203, 204].

Κεφάλαιο 4.: ΜΙΚΡΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΛΕΜΦΟΪΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

4.1 Ο ρόλος των EVs στις αιματολογικές κακοήθειες

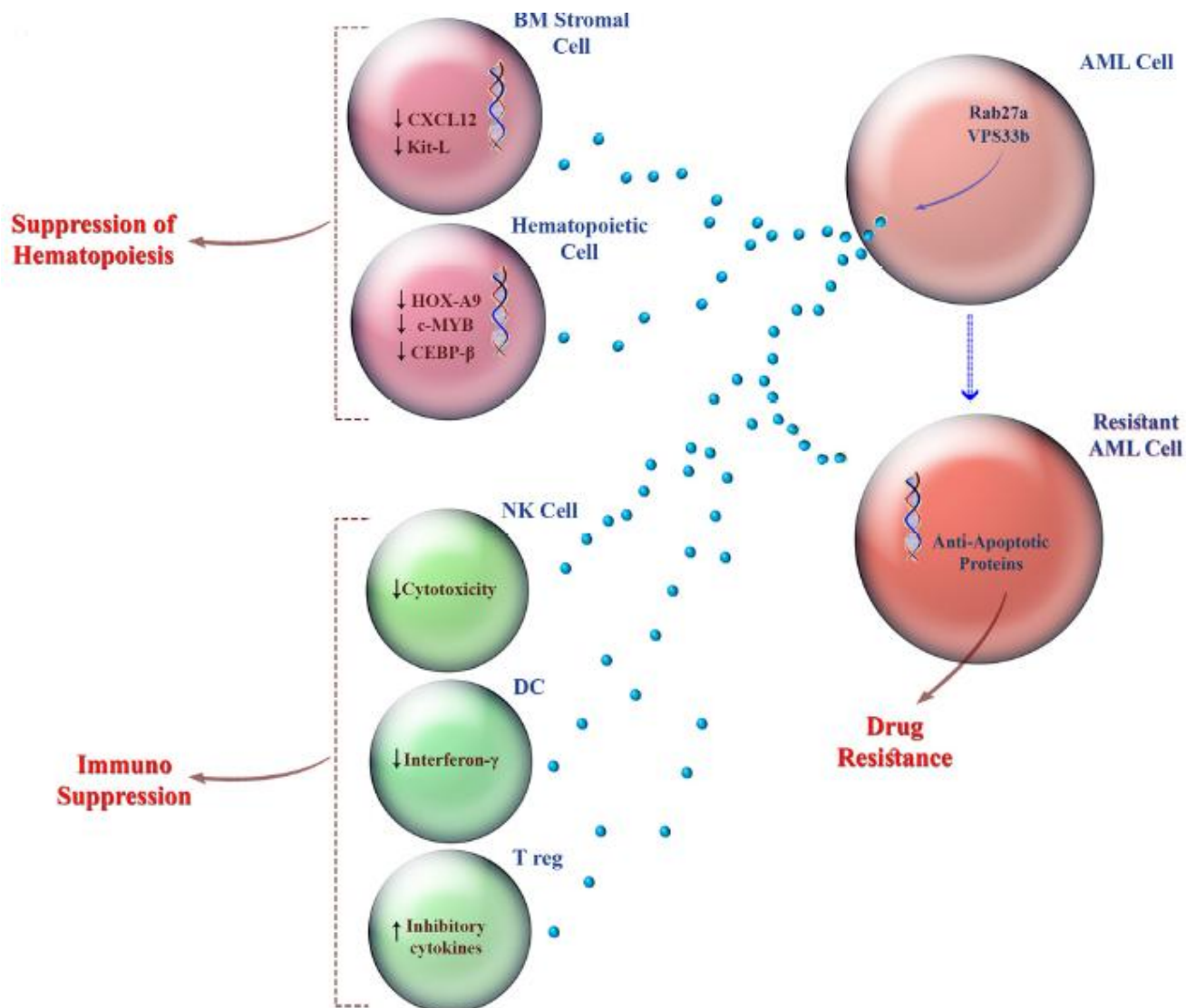
Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών (BM) αποτελείται κυρίως από αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) και προγονικά κύτταρα, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) και λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα (LSCs) μαζί με τους κακοήθεις απογόνους τους [93]. Η επικοινωνία μεταξύ κυττάρων είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία ενός μικροπεριβάλλοντος κατά ή υπέρ των νεοπλασματικών κυττάρων και τα EVs είναι σημαντικά συστατικά που διευκολύνουν τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι τα EVs μεσολαβούν στην σηματοδότηση μέσω αυτοκρινών, παρακρινών και συστηματικών μηχανισμών μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού των οστών [93]. Για παράδειγμα, τα EVs από νεοπλασματικά κύτταρα τροποποιούν το περιβάλλον του BM και χρησιμοποιούν φυσιολογικά HSCs και MSCs για να προωθήσουν την εξέλιξη του όγκου, την εισχώρηση (διείσδυση), τη μετάσταση και την αγγειογένεση [205].

Συνολικά, οι παράγοντες που συμβάλλουν, όπως τα EVs, οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των λευχαιμιών (λευχαιμογένεση) και οι αλληλοεπικοινωνίες (cross-talks) μεταξύ όλων των κυτταρικών πληθυσμών του BM μέσω κάθε ενός από τα αναφερόμενα συστατικά προάγουν τον σχηματισμό διαφορετικών τύπων αιματολογικών κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένης της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (ΟΜΛ), της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ), της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ΧΛΛ), της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ), του λεμφώματος και του πολλαπλού μυελώματος (ΠΜ).

4.2. Ο ρόλος των EVs στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML)

Η AML χαρακτηρίζεται από ταχεία ανάπτυξη άτυπων βλαστικών κυττάρων που συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και εξουδετερώνουν τη φυσιολογική αιμοποίηση [206]. Ο αυξημένος αριθμός EVs σε ασθενείς με AML σχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου και την υποτροπή της, γεγονός που τεκμηριώνει την άποψη ότι τα μικροσωματίδια συμμετέχουν με πολλούς τρόπους στη παθογένεση της AML. Οι Huan et al. απέδειξαν ότι τα προερχόμενα EVs από κύτταρα της AML περιέχουν mRNA του IGF-IR (insulin-like growth factor-I receptor) αυξάνοντας την έκφραση του VEGF συμβάλλοντας στη διασπορά της κακοήθειας [207]. Η ανάλυση των EVs από HL-60 λευχαιμικών κυτταρικών σειρών με χρώση PKH26 έδειξε ότι τα στρωματικά κύτταρα του BM απορροφούν αυτά τα EVs [208]. Οι Boyiadzis & Whiteside έδειξαν ότι τα AML EVs όχι μόνο καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων CXCL12, KITL, IL-7, και IGF1 που υποστηρίζουν την φυσιολογική αιμοποιητική διαδικασία, αλλά και υποβαθμίζοντας (down-regulate) τα γονίδια της οστεογένεσης OCN, Col1A1, και IGF1 των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών [209]. Τα προερχόμενα από AML EVs αποτελούν πλούσια πηγή miRNAs, ειδικότερα δε των miR-125b, miR-155, miR-375, miR-223, miR-191, miR-99b, let-7a, miR-9, και miR-150. Αυτά τα miRNAs σχετίζονται με την καταστολή της αιμοποίησης, την εξέλιξη της κακοήθειας, την υποτροπή, και την έκβαση της νόσου [207]. Μεγάλος αριθμός αντιγόνων σχετιζόμενων με τη λευχαιμία, όπως τα CD123, CCL-1, CD96, και CD44, καθώς και βλαστικοί δείκτες του μυελού των οστών, όπως CD34, CD117, και CD33 βρέθηκαν σε AML προερχόμενα EVs. Επίσης, στα EVs από AML προερχόμενα βρέθηκε ότι έχουν αυξημένη έκφραση των ανοσοκατασταλτικών μορίων όπως TGF-β1, FasL, PD-1/PDL-1, MICA/MICB, και CD39/CD73, γεγονός που τους παρέχει τον παθογενετικό τους χαρακτηριστικό [210]. Επιπλέον, τα EVs από AML προερχόμενα περιέχουν TGF-β1 και NKG2D ligands που καταστέλλουν την ανοσολογική δράση της επιτήρησης των NK κυττάρων και μειώνουν την παραγωγή της IFNγ, σχήμα 9 [201].

Σχήμα 9. Ο ρόλος των EVs στην παθογένεση της AML. Πηγή: Dibavar et al. 2021. Life Sciences, 271:119177, 2021 (Figure 4A). [93].

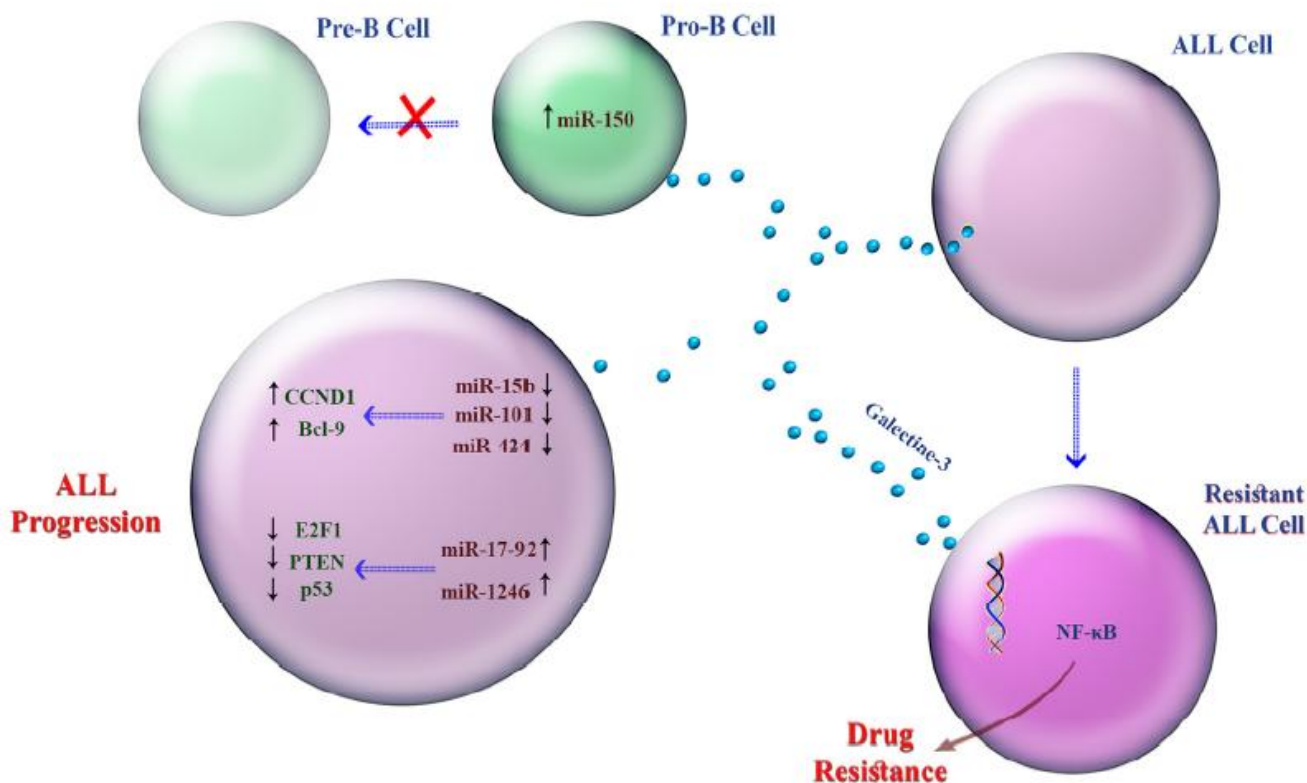


4.3. Ο ρόλος των EVs στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL)

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού ανώριμων λεμφοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται εκτεταμένα στο μυελό των οστών, στους λεμφικούς ιστούς και σε άλλα όργανα. Τα λευχαιμικά κύτταρα μέσω της έκκρισης των EVs χρησιμοποιούν τα συστατικά του BM για να δημιουργήσουν μια "λευχαιμική φωλεά" με σκοπό να υποστηρίξουν και να προάγουν την εξέλιξη της νόσου. Έχει δειχθεί ότι τα προερχόμενα από ALL EVs μέσω διαδικασίας μεταφοράς πολλαπλασιαστικών,

προ-επιβιωτικών και αντι-αποπτωτικών παραγόντων, ενισχύουν την εξάπλωση και επιβίωση των λευχαιμικών Β κυττάρων in vitro, σχήμα 10 [211]. Οι Lu et al. (2015) έδειξαν ότι η ποσότητα των δυσρυθμισμένων miRNAs στα EVs που απελευθερώνονται από ασθενείς τόσο με B-ALL όσο και με T-ALL ήταν αξιοσημείωτα μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, [212]. Επίσης, τα miRNAs των ALL EVs, όπως miR-20b, -23a, και -23b ρυθμίζουν τα γονίδια του ZFP που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες για την αύξηση, την ανάπτυξη, την ενεργοποίηση και την απόπτωση, [212]. Οι Ying Li et al. (2014) ανέδειξαν ότι τα υπερ-ρυθμιζόμενα (up-regulated) miR-150 ALL EVs μπλόκαραν την διαφοροποίηση των Β κυττάρων από το pro-B στο pre-B στάδιο, που είχε ως αποτέλεσμα μια δυσμενή διακοπή της ωρίμανσης που ακολουθήθηκε από την ανάπτυξη της B-ALL, καθώς και ότι τα επίπεδα έκφρασης των miR-15b, miR-424, και miR-101 ήταν μειωμένα στα ALL EVs παρέχοντας δυνατότητα υπερέκφρασης πολλών ογκογόνων γονιδίων, όπως του cyclin D1 (CCND1) και του B cell CLL/lymphoma 9 (BCL9), [213, 214]. Σε ασθενείς με ALL έχει επίσης αναφερθεί η υπερ-ρύθμιση των miR-17-92 cluster (miR-18a, miR-18b, miR-92a, miR-92b) και miR-1246 [214, 215].

Σχήμα 10. Ο ρόλος των EVs στην παθογένεση της ALL. Πηγή: Dibavar et al 2021. Life Sciences, 271:119177, 2021 (Figure 4B). [93].



4.4. Ο ρόλος των EVs στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML)

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία είναι κλωνική μυελοϋπερπλαστική νεοπλασία που χαρακτηρίζεται από την παρουσία του χρωμοσώματος Philadelphia που προκύπτει από αντιμετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 και κωδικοποιεί την ογκοπρωτεΐνη BCR/ABL [216]. Τα προερχόμενα από CML EVs περιέχουν το γονίδιο BCR/ABL και μπορούν να το μεταφέρουν σε φυσιολογικά μονοπύρρηνα κύτταρα προκαλώντας κακοήγη μετασχηματισμό [216, 217]. Σε πολλές μελέτες έχει δειχθεί ότι τα CML EVs αλλάζουν το μικροπεριβάλλον του όγκου και διευκολύνουν την εξέλιξη της νόσου και τη μετάσταση [93]. Επίσης, οι Gao et al. (2019) αναφέρουν ότι τα CML EVs αναστέλλουν την οστεογένεση και έτσι διευκολύνεται η CML, μέσω της έκκρισης της IL8 από τα στρωματικά κύτταρα [218]. Η επικοινωνία μεταξύ των CML EVs και των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών πραγματοποιείται με την αλληλεπίδραση

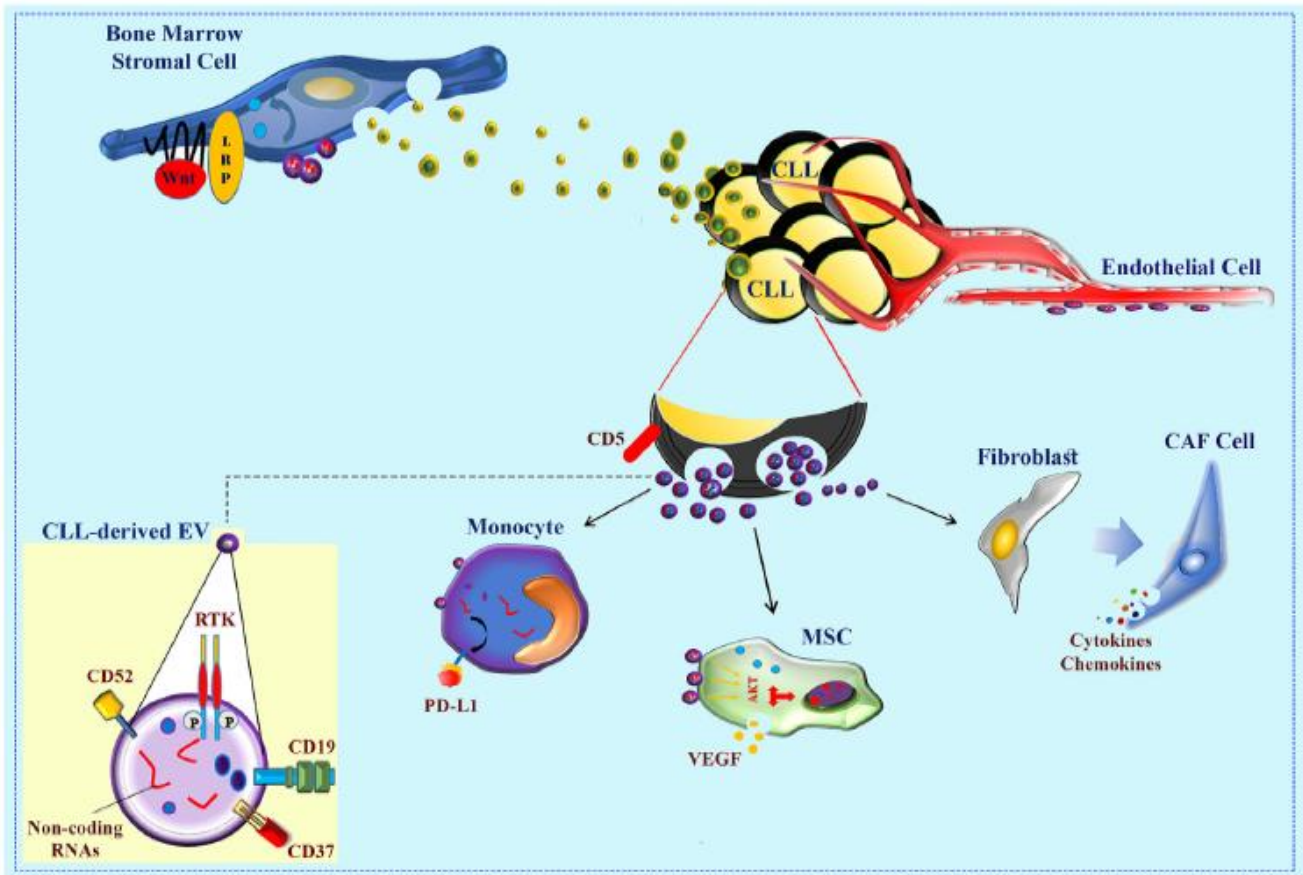
της αμφιρεγκουλίνης (AREG) και του EGFR. Τα CML EVs μπορούν επίσης να προάγουν τη νεοαγγειογένεση επάγοντας την έκφραση του ICAM-1/VCAM-1 και μειώνοντας την έκφραση της VE-cadherin/ β -catenin [219].

4.5. Ο ρόλος των EVs στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (CLL)

Η B χρόνια λεμφογενής λευχαιμία (B-CLL) είναι η πιο συχνά απαντώμενη μορφή λευχαιμίας, προσβάλλοντας ενήλικα άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών. Πρόκειται για μια κλωνική κακοήθεια των B κυττάρων, που διάφοροι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες οδηγούν στην αποφυγή της απόπτωσης, στην καταστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και στην ανώμαλη παράταση της διάρκειας ζωής των κακοήθων κυττάρων και χαρακτηρίζεται από την ανώμαλη έκφραση του CD5, που προκαλεί τη διάσωση των B κυττάρων από την απόπτωση [220]. Οι Crompot et al. (2017) έδειξαν ότι τα BM-MSK EVs προστατεύουν τα B-CLL κύτταρα από την αυθόρμητη απόπτωση και αυξάνουν την χημειοανθεκτικότητα τους ενισχύοντας τη μεταναστευτική τους ικανότητα μέσω επαγωγής της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων [221]. Σύμφωνα με τις υπεράριθμες μεταλλάξεις στα γονίδια της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης (IGVH), υπάρχουν δύο μεγάλες υποκατηγορίες B-CLL κυττάρων: στην πρώτη είναι τα naïve CD5+/CD27- B κύτταρα με χωρίς μεταλλαγμένη IGVH (UM-CLL) και στη δεύτερη είναι κυρίως τα CD5+/CD27+ κύτταρα με μεταλλαγμένη την IGVH (M-CLL). Σημειωτέον δε ότι η δεύτερη κατηγορία των μεταλλαγμένων κυττάρων είναι κλινικά λιγότερο επιθετική από την πρώτη με τα αμετάλλακτα κύτταρα [222]. Οι Boysen et al. έδειξαν ότι ο ρυθμός παραγωγής EVs από τα B κύτταρα με UM-IGVH είναι υψηλότερος σε σχέση με M-IGVH CLL κλώνους και ότι αυτά τα EVs είναι θετικά για CD19 και CD37, γεγονός που πιθανά να αποτελεί προγνωστικό δείκτη σε ασθενείς με CLL [223]. Επιπλέον μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα CD19+/CD37+ EVs είναι σημαντικά αυξημένα σε προχωρημένα στάδια της CLL νόσου [224]. Οι Boysen et al. επιπρόσθετα έδειξαν ότι ενόσω ο αριθμός των CD52+ EVs που απελευθερώνονται από τα B-CLL κύτταρα είναι σημαντικά αυξημένος, εν τούτοις η έκφραση αυτού του δείκτη ήταν υψηλότερη στα φυσιολογικά B κύτταρα σε σύγκριση με τα B-λευχαιμικά κύτταρα,

γεγονός που αποδίδεται στην αυξημένη αποκόλληση των CD52⁺ EVs από τα λευχαιμικά B κύτταρα [223]. Έχει δειχθεί ότι στη B-CLL τα προερχόμενα από CLL EVs έχουν αυξημένη έκφραση κυκλίνης D1 και c-Myc, γεγονός που ενισχύει τα BM-MSCs παρέχοντας βοήθεια στο μικροπεριβάλλον του όγκου και οδηγώντας στην εξέλιξη της νόσου, σχήμα 11 [225]. Τα προερχόμενα από CLL κύτταρα EVs προάγουν στην ανοσολογική διαφυγή μεταφέροντας μη κωδικοποιούμενα RNA hY4 στα μονοκύτταρα, αυξάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την έκφραση του PD-L1 [226]. Η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων του στρώματος στο μυελό των οστών και των απελευθερωμένων EVs δείχνει ότι τα προερχόμενα από CLL κύτταρα EVs είναι αφενός αυξημένα αριθμητικά, έχουν υψηλή έκφραση των CD19⁺, CD37⁺, CD52⁺ και RTK⁺ δεικτών, μπορούν να καθορίσουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και να προάγουν την επιβίωση των CLL κυττάρων μέσω διαφόρων μηχανισμών όπως π.χ. μέσω μεταφοράς ογκογόνων πρωτεϊνών, αλλά και DNAs και RNAs, σχήμα 11 [93].

Σχήμα 11. Η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών και των CLL κυττάρων, μέσω των αποδεσμευμένων EVs. Πηγή: Dibavar et al. 2021. LifeSciences, 271:119177, 2021 (Figure 5, p12). [93].



4.6. Ο ρόλος των EVs στο λέμφωμα

Η αλληλεπίδραση μεταξύ κακοήθων και φυσιολογικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του λεμφώματος είναι κρίσιμη στην ανάπτυξη της νόσου και τα EVs παρέχουν τα πιο σημαντικά συστατικά στην «φωλεά», και επιπλέον τα προερχόμενα από κύτταρα του λεμφώματος EVs παίζουν ρόλο στη διάγνωση, στη διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα, και την χημειοανθεκτικότητα [199].

Δείκτες επιφανείας των προερχόμενων από κύτταρα του λεμφώματος EVs είναι χρήσιμοι στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ Hodgkin lymphoma (HL) και non-HL (NHL). Ενώ τα EVs που απομονώθηκαν από ασθενείς με NHL έχουν υψηλή έκφραση σε CD19

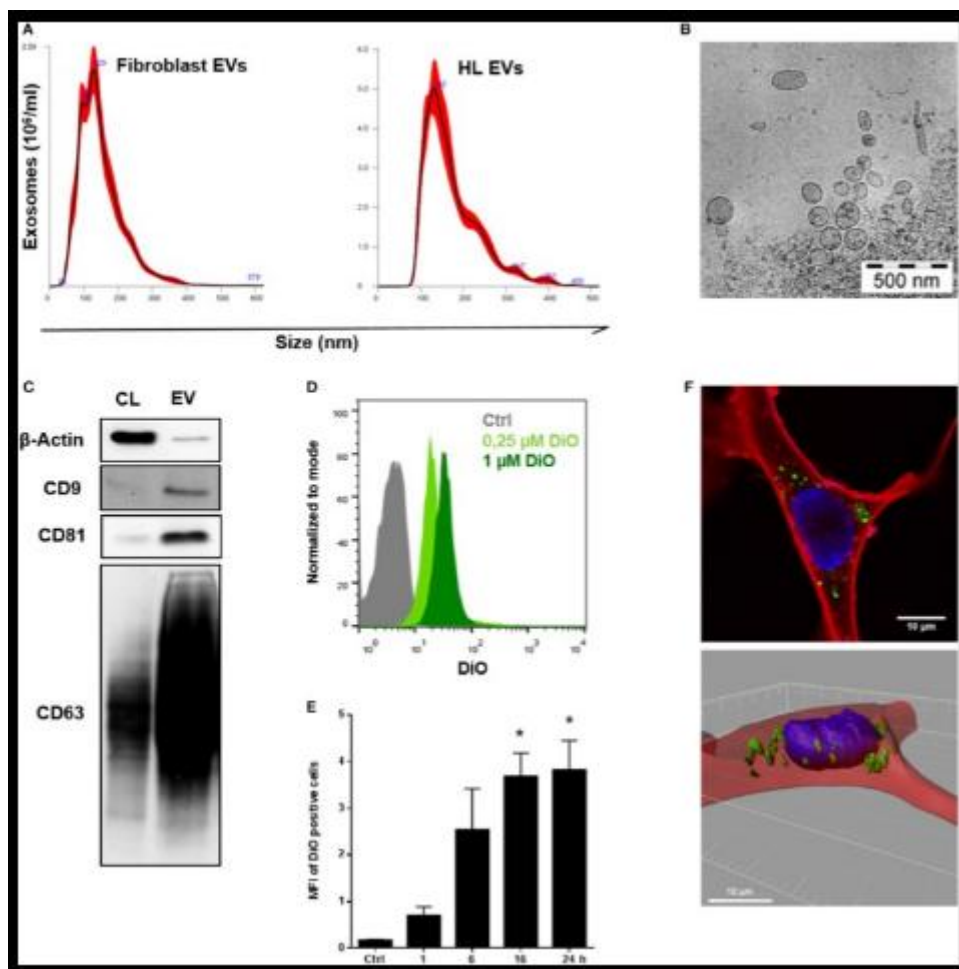
και CD20, τα EVs που απομονώθηκαν από ασθενείς με HLs, η έκφραση του CD30 είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό [217]. Τα προερχόμενα από κύτταρα του λεμφώματος EVs είναι πλούσια σε NKG2D-L και έτσι παρέχεται η δυνατότητα διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα των καρκινικών κυττάρων [199].

4.6.1 Ο ρόλος των EVs στο HL λέμφωμα

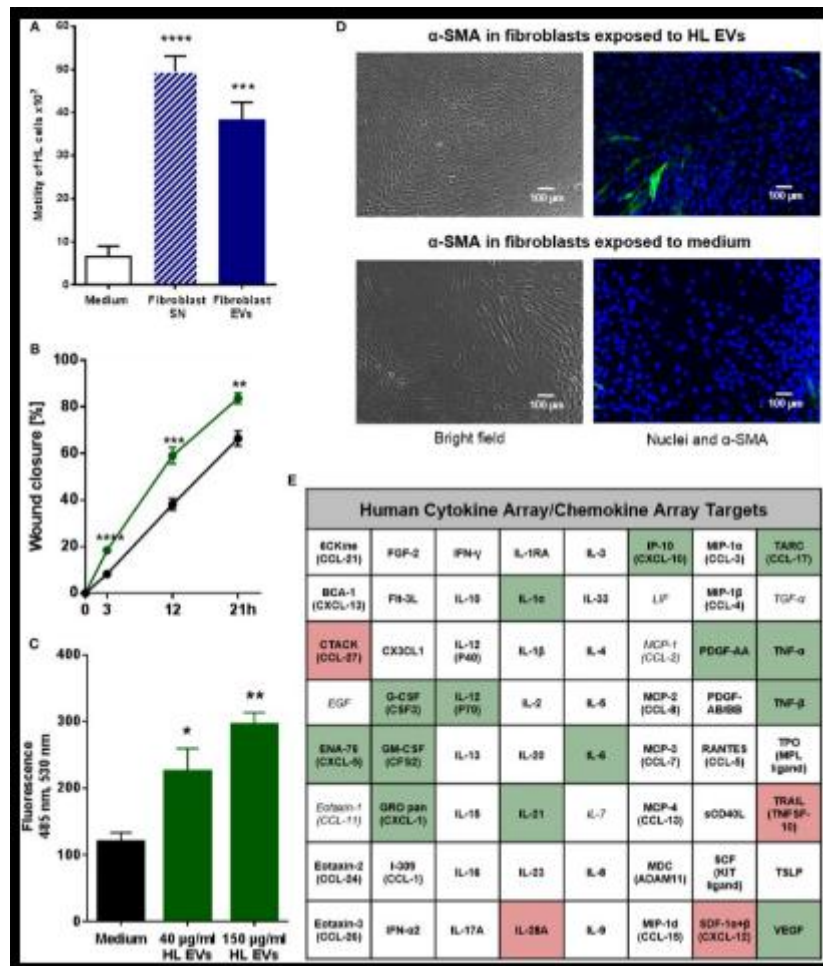
Η έκκριση εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) είναι ένας πανταχού παρών μηχανισμός διακυτταρικής επικοινωνίας, που βασίζεται στην ανταλλαγή ενεργών μορίων όπως αυξητικοί παράγοντες, κυτταροκίνες και νουκλεϊκά οξέα. Πρόσφατες μελέτες αναγνώρισαν τα EVs που προέρχονται από τον όγκο ως κεντρικούς παράγοντες στην εξέλιξη του όγκου και στη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (TME). Ωστόσο, οι μελέτες για τα EVs από το κλασικό λέμφωμα Hodgkin (cHL) είναι περιορισμένες [227]. Η ανάπτυξη των κακοήθων κυττάρων Hodgkin και Reed-Sternberg (HRS) κυττάρων εξαρτάται από το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME), το οποίο διαμορφώνεται ενεργά από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση των κυττάρων HRS και των στρωματικών κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [228]. Τα κύτταρα HRS εκκρίνουν κυτταροκίνες και αγγειογενετικούς παράγοντες, στρατολογώντας και επάγοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των γύρω κυττάρων, ώστε να αναπτυχθεί τελικά ένα ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον του όγκου. Έχει φανεί ότι τα EVs που συλλέχθηκαν από κύτταρα λεμφώματος Hodgkin (HL) εσωτερικεύθηκαν από ινοβλάστες και ενεργοποίησαν την ικανότητα μετανάστευσης τους, εικόνα 42. Χαρακτηρίστηκαν από φλεγμονώδη φαινότυπο και από ρύθμιση της alpha-smooth muscle actin (α -SMA), ενός δείκτη των ινοβλαστών που σχετίζονται με τον καρκίνο, εικόνα 43. Η ανάλυση του εκκρίματος των ινοβλαστών που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με EV αποκάλυψε αυξημένη απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL-1 α , IL-6 και TNF- α), αυξητικών παραγόντων (G-CSF και GM-CSF) και προ-αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF [227]. Αυτοί οι διαλυτοί παράγοντες είναι γνωστό ότι προάγουν την εξέλιξη του HL. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανάλυση μονοπατιών νοημοσύνης (ingenuity pathway analysis)

εντόπισε φλεγμονώδεις οδούς, συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης TNF- α /NF- κ B, ως βασικούς παράγοντες που κατευθύνουν τις εξαρτώμενες από το EV αλλαγές φαινοτύπου στους ινοβλάστες. Επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα *in vitro*, η μελέτη των Dörsam et al. (2018) έδειξε ότι τα EVs προάγουν την έκφραση α -SMA στους ινοβλάστες και την έκφραση των προαγγειογενετικών παραγόντων χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ξενομοσχεύματος HL (xenograft HL model), εικόνα 44. Αποδεικνύεται ως εκ τούτου ότι, τα EVs HL μεταβάλλουν το φαινότυπο των ινοβλαστών προκειμένου να υποστηριχθεί η ανάπτυξη του όγκου και έτσι ρίχνεται φως στο ρόλο των EVs για τη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (TME) που προάγει τον όγκο στο HL, εικόνα 45.

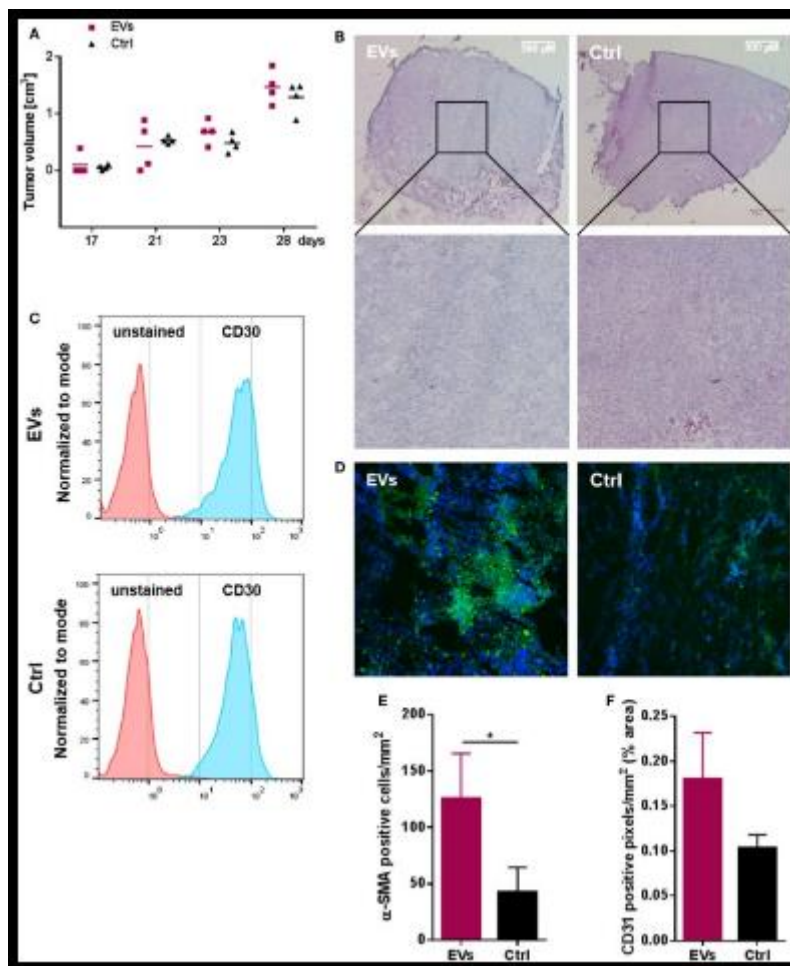
Εικόνα 42. Χαρακτηρισμός των EVs που εσωτερικεύθηκαν από ινοβλάστες *in vitro*. Πηγή: Front Immunol, 2018, 9:1358 (Figure. 1). [227].



Εικόνα 43. Τα EVs προάγουν τη μετανάστευση των Hodgkin Lymphoma κυττάρων (HL) και τα HL EVs μεταβάλλουν τον φαινότυπο των ινοβλαστικών κυττάρων. Πηγή: Front Immunol, 2018, 9:1358 (Figure. 2). [227].



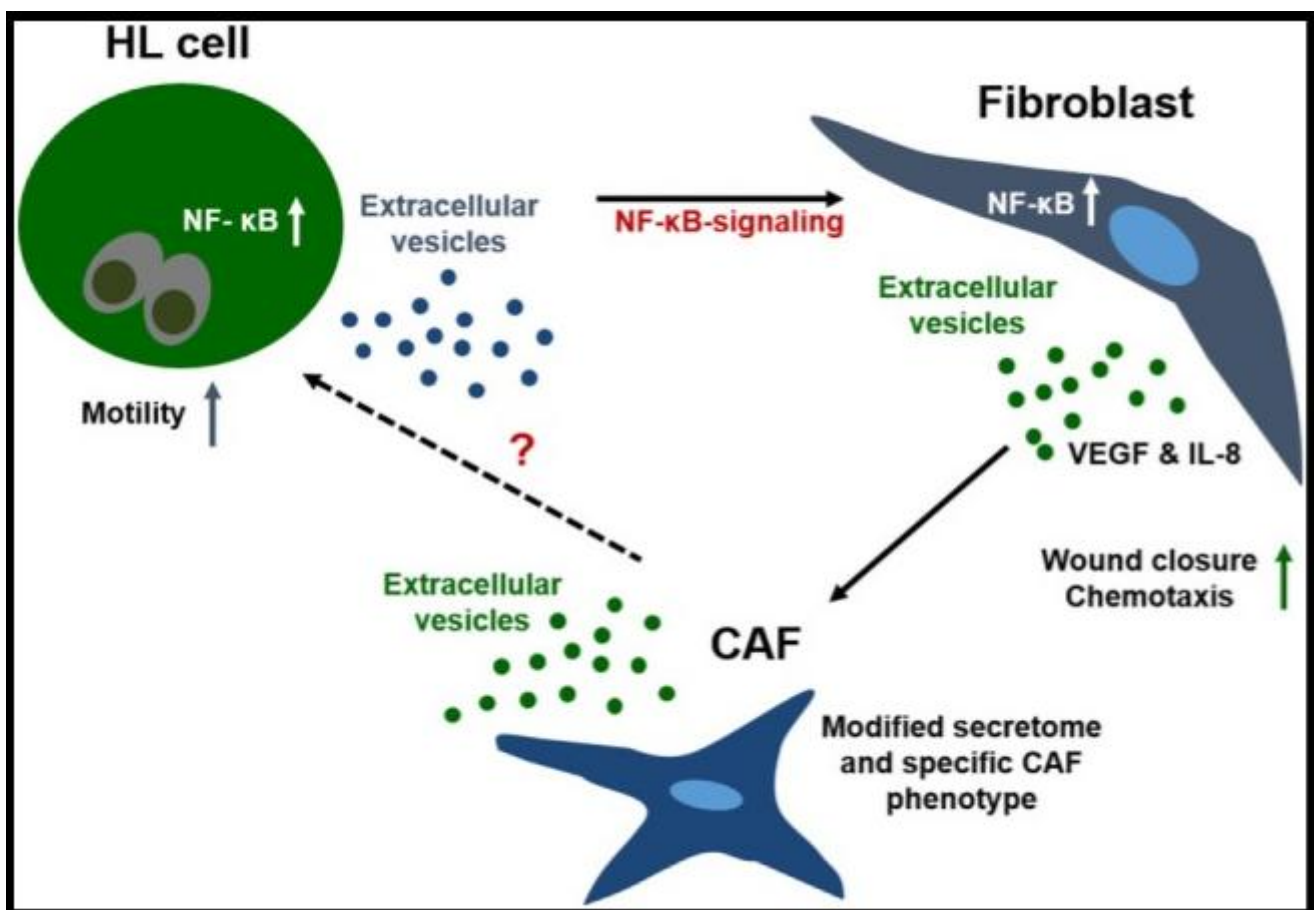
Εικόνα 44. Το Hodgkin lymphoma (HL) xenograft model. Πηγή: Front Immunol, 2018, 9:1358 (Figure 3). [227].



Τα κύτταρα στο HL και στο NHL εκφράζουν πάνω από 1000 μεμβρανικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων και 178 πρωτεϊνικών clusters. Κυτταρικές σειρές και ιστοί από από ασθενείς με HL εκφράζουν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση. Ο εμπλουτισμός των ενεργοποιημένων ALCAM (leukocyte cell adhesion molecule-ALCAM), της cathepsin S, τα CD26, CD44, ο υποδοχέας 2 της ιντερλευκίνης 1 (interleukin 1 receptor 2- IL1R2), ο παράγοντας macrophage migration inhibitory factor (MIF), καθώς και της ενεργοποιημένης TARC (regulated chemokine-TARC) στο πλάσμα ασθενών με HL σχετίζεται με την εξέλιξη του λεμφώματος [199]. Ο αριθμός

των ειδικών LCEVs (cell - derived extracellular vesicles - LCEVs) και των δεικτών επιφανείας τους έχουν σχέση με τον υπότυπο του λεμφώματος, έτσι EVs απομονωμένα από ασθενείς με HL είναι πλούσια σε CD30. Επίσης, ορός από ασθενείς με HL που περιέχει υψηλό αριθμό CD30+ LCEVs έχει συσχετισθεί με την εξέλιξη του ασθενούς. Επομένως, τα CD30+ LCEVs εκτός του ότι αποτελούν πολύτιμο διαγνωστικό δείκτη, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν ως παρακολούθηση της απάντησης στη θεραπεία [199].

Εικόνα 45. Αλληλεπίδραση ινοβλαστών και κυττάρων λεμφώματος Hodgkin (HL) στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Πηγή: Front Immunol, 2018, 9:1358 (Figure 4). [227].



4.6.2 Ο ρόλος των EVs στο Non HL λέμφωμα

Το Non-Hodgkin lymphoma (NHL) είναι ένας κοινός τύπος αιματολογικής κακοήθειας, ο οποίος αποτελείται από πολλαπλούς υποτύπους που προέρχονται από Β-λεμφοκύτταρα, Τ-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονιάδες (NK).

Το διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β-κυττάρων (DLBCL) είναι ο συχνότερος τύπος non-Hodgkin λεμφώματος και αποτελεί μία βιολογικά ετερογενή οντότητα.

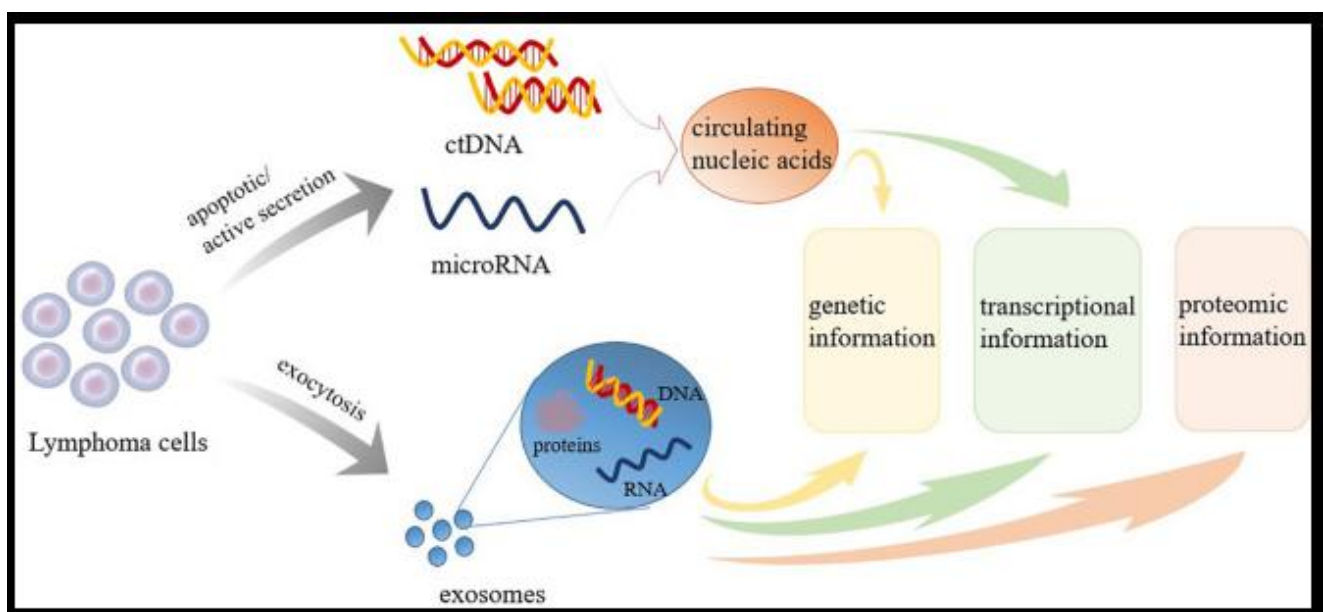
Τα εξωσώματα είναι μια κατηγορία εξωκυτταρικών κυστιδίων που προέρχονται από τα ενδοσώματα και κυμαίνονται σε μέγεθος από 30 έως 120 nm σε διάμετρο. Ο πρώιμος σχηματισμός των ενδοσωμάτων ξεκινά με την εσωτερική εκβλάστηση της πλασματικής μεμβράνης. Μόλις βρεθεί εντός του κυτταροπλάσματος, η ενδοσωμική μεμβράνη μπορεί να εισχωρήσει περαιτέρω στον εαυτό της, συλλαμβάνοντας κυτταροπλασματικό περιεχόμενο κατά τη διαδικασία και παράγοντας ενδοσωμικά κυστίδια. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τον μηχανισμό Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT), ο οποίος τελικά μετατρέπει το ενδοσωμάτιο σε πολυκυψελιδικό σώμα (multivesicular body-MVB). Το MVB μπορεί στη συνέχεια να συγχωνευθεί ξανά με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του εκτός του κυττάρου με τη μορφή εξωσωμάτων. Η συμμετοχή της ενδοκυτταρικής οδού διαφοροποιεί τα εξωσώματα από τα μικροκυψελίδια και τα αποπτωτικά σώματα-τα τελευταία είναι άλλοι τύποι εξωκυττάρων κυστιδίων που σχηματίζονται με την προς τα έξω εκβλάστηση της πλασματικής μεμβράνης από ζωντανά και αποπτωτικά κύτταρα αντίστοιχα. Το περιεχόμενο των εξωσωμάτων περιλαμβάνει πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και μεταβολίτες. Τα εξωσώματα βρίσκονται σε πολλαπλά σωματικά υγρά, όπως το αίμα, τα ούρα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το αμνιακό υγρό, το σάλιο, το μητρικό γάλα και το περιτοναϊκό υγρό. Συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία και μπορούν να αλλάξουν τον φαινότυπο των κυττάρων-δεκτών. Έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν πάρα πολλούς ρόλους στη φυσιολογία και στις ασθένειες, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης, της

ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων, της ενεργοποίησης και της ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης, της φαγοκυττάρωσης, κλπ.

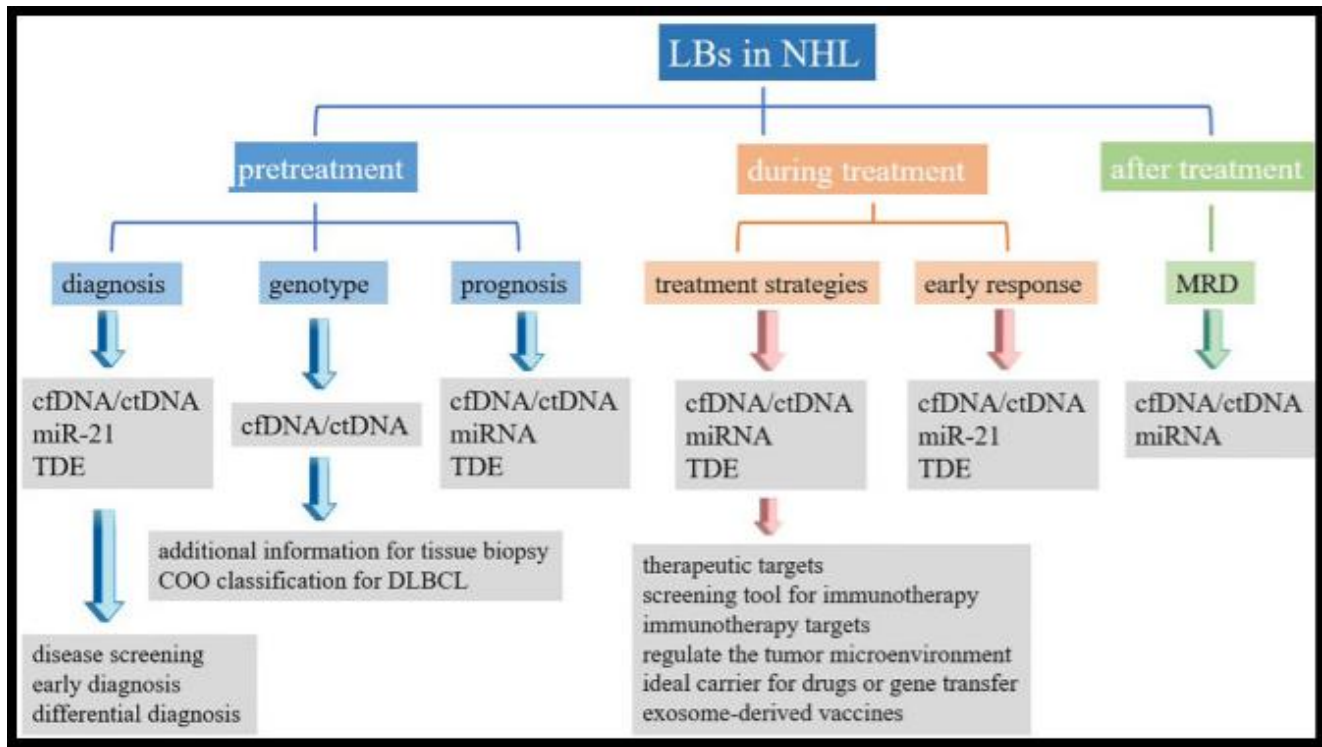
Τα εξωσωμάτια είναι σημαντικά στη διάγνωση, πρόγνωση και διαχείριση του DLBCL, βάσει της έκφρασης του εξωσωματιδιακού κυκλοφορούντος miR-99a-5p και miR-125b-5p (circulating exosomal expression) και της επίδρασης που ασκούν στο μικροπεριβάλλον του όγκου, εικόνες 46 και 47 [229- 231]. Ο αριθμός των LCEVs και οι επιφανειακοί δείκτες που απομονώθηκαν από ασθενείς με NHL είναι εμπλουτισμένοι στα CD19 και CD20, ενώ στους ασθενείς με HL στο CD30 [199].

Συγκεκριμένα, τα CD20+ LCEVs θεωρούνται οι καλύτεροι βιοδείκτες για την εξέλιξη της νόσου και την απάντηση των θεραπειών με μονοκλωνικά αντισώματα, αφού τα επίπεδά τους στην κυκλοφορία συσχετίζονται άμεσα με τα κυκλοφορούντα CD20+ κύτταρα στους ασθενείς. Επίσης, μια μεγάλη πολυκεντρική μελέτη έδειξε ότι είναι εφικτή η παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου μετρώντας B-cell lymphoma 6 (BCL-6) και C-MYC mRNA επίπεδα σε LCEVs που απομονώθηκαν σε ασθενείς με B-cell λέμφωμα [199].

Εικόνα 46. Η αξιολόγηση του κυκλοφορούντος DNA, του microRNA και των εξωσωμάτων που προέρχονται από το περιφερικό αίμα ασθενών με NHL. Πηγή: Front Oncol, 2021, 11:658234 (Figure 1). 235. [231].



Εικόνα 47. Η κλινική χρήση της υγρής βιοψίας στο non-Hodgkin's λέμφωμα. (LBs, liquid biopsies; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; cfDNA, cell-free DNA; ctDNA, circulating tumor DNA; miRNA, microRNA; TDE, tumor-derived exosomes; MRD, minimal residual disease).
 Πηγή: Front Oncol, 2021, 11:658234 (Figure 2). 235. [231].

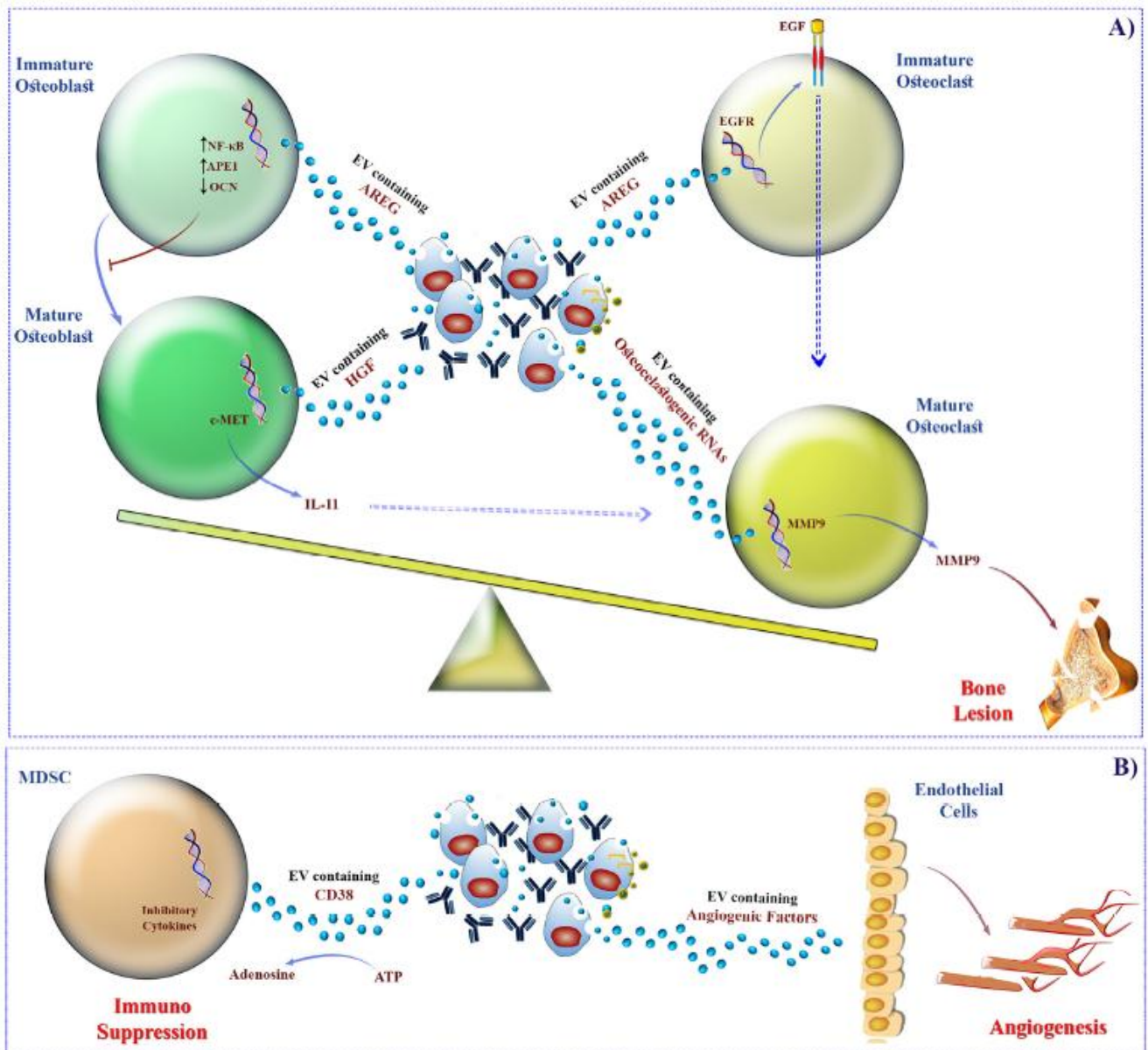


4.7. Ο ρόλος των EVs στο πολλαπλό μυέλωμα (MM)

Το πολλαπλό μυέλωμα είναι μία κακοήθεια των Β-λεμφοκυττάρων που χαρακτηρίζεται τόσο από μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό των πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών, όσο και από ανισόρροπη δραστηριότητα μεταξύ οστεοκλαστών και οστεοβλαστών. Ογκογονικά σήματα που μεταφέρονται από τη «μυελική φωλεά» παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και πολλαπλασιασμό των MM κυττάρων [232]. Τα προερχόμενα από MM EVs ενισχύουν την έκφραση των CXCR4 και MMP9, αναστέλλουν τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο αναστέλλοντας τη δραστηριότητα της κασπάσης-3 υποστηρίζοντας την ωρίμανση των οστεοκλαστών, διαδικασίες που οδηγούν σε πρόιμη οστεοπόρωση των ασθενών με MM, σχήμα 12 [233]. Μελέτη των Zahoor et al. (2017)

έδειξε ότι η υποξία μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή της φλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-32, η οποία μπορεί να μεταφερθεί στους οστεοκλάστες από τα MM EVs, γεγονός που συμβάλλει στην οστεοπόρωση και τελικά οδηγεί σε χαμηλή επιβίωση, [234]. Εκτός από την συμμετοχή τους στην οστεοκλαστογένεση (osteoclastogenesis), τα MM προερχόμενα EVs συμμετέχουν επίσης στην αγγειογένεση παρέχοντας διάφορους παράγοντες, όπως piRNA-823, CD147, angiogenin, VEGF, bFGF, PDGF, Serpin E1, και TIMP-1, σχήμα 12 A [235]. Επιπρόσθετα, τα MM προερχόμενα EVs έχουν ανοσοκατασταλτική δράση επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των μυελοειδών κατασταλτικών κυττάρων (MDSC), τα οποία αναστέλλουν διάφορους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, σχήμα 12 B [236].

Σχήμα 12. Ο ρόλος των προερχόμενων MM EVs A) στην πρόκληση οστικών λυτικών αλλοιώσεων και B) στην εξέλιξη του όγκου και στην αγγειογένεση. Πηγή: Life Sciences, 2021, 271:119177, (Figure 6A, 6B). [93].



Κεφάλαιο 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα μικροσωματίδια (MPs) προέρχονται από ποικίλους κυτταρικούς πληθυσμούς και σχηματίζονται ως απόκριση σε πλήθος ερεθισμάτων μέσω της αναδιοργάνωσης της κυτταρικής μεμβράνης, της αιμορραγίας και της αποκόλλησης.

Τα μικροσωματίδια (MPs) έχουν πλειοτροπικές επιδράσεις στην αγγειακή φυσιολογία και μπορούν να χρησιμεύσουν ως οχήματα για τη διακυτταρική επικοινωνία.

Τα RMPs σχηματίζονται αυθόρμητα κατά τη διάρκεια της ζωής των ερυθροκυττάρων, με περιεχόμενο και κυτταροσκελετική δομή που διαφέρουν από τα άθικτα ερυθροκύτταρα. Η παραγωγή RMPs επιταχύνεται κατά την αποθήκευση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) λόγω των σχετικών βιοχημικών αλλαγών: αυξημένο κυτταρικό ασβέστιο, εξάντληση ATP και αυξημένη διαρροή καλίου. Επιπλέον, η σύνθεση των RMPs επηρεάζεται από το έναυσμα για τον σχηματισμό τους και από τις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης [92].

Ο καρκίνος είναι μια πολύπλοκη ασθένεια στην οποία η αμφίδρομη συνεργασία μεταξύ των κακοήθων κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου δημιουργεί μια κατάλληλη πλατφόρμα που τελικά διευκολύνει την εξέλιξη της νόσου. Η ανακάλυψη των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) αποτέλεσε σημείο καμπής στην σύγχρονη εποχή της βιολογίας του καρκίνου, καθώς η σημασία τους στις ανθρώπινες κακοήθειες έθεσε τις βάσεις για τη διεύρυνση του ερευνητικού ενδιαφέροντος στον τομέα της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων. Η εμπλοκή τους στην αλληλεπίδραση μικρών και μεγάλων αποστάσεων μέσω της οριζόντιας μεταφοράς κυτταρικών συστατικών, από μη κωδικοποιημένα RNAs έως λειτουργικές πρωτεΐνες, καθώς και η διέγερση των υποδοχέων των κυττάρων-στόχων μέσω συνδέσμων που είναι αγκυστρωμένα στη μεμβράνη τους, προσδίδει σε αυτά τα αποκαλούμενα "*μικροσκοπικά κυστίδια με γιγαντιαίες επιπτώσεις*" απίστευτες δυνατότητες επανεκπαίδευσης των φυσιολογικών ιστών και συνεπώς αναδιαμόρφωσης της περιβάλλουσας θέσης [93].

Αναδύεται ένας σαφής ρόλος τόσο των μικρο- όσο και των νανο- σωματιδίων στις κακοήθειες. Βασικό σημείο είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός των EVs που απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα στο πλάσμα ή σε άλλα σωματικά υγρά των ασθενών με νεοπλασματικά νοσήματα. Ο ζωτικός ρόλος των EVs στη βιοϊατρική έρευνα από τη μία πλευρά και η έλλειψη κατάλληλων αναλυτικών εργαλείων από την άλλη έχουν υποκινήσει την επιστημονική κοινότητα να αναπτύξει νέες μεθόδους για τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των EVs. Απαιτούνται διάφορες εφαρμογές για τον χαρακτηρισμό των απομονωμένων EVs [237] και επί του παρόντος, οι ερευνητές προτείνουν διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων: της nanoparticle tracking analysis- NTA, της dynamic light scattering- DLS, της tunable resistive pulse sensing- TRPS, της atomic force microscopy- AFM, της transmission electron microscopy- TEM, της κυτταρομετρίας ροής, της ELISA και της Western Blotting, πίνακας 4. Δεδομένου δε ότι τα EVs κατηγοριοποιούνται σε διάφορους υποπληθυσμούς, είναι απαραίτητη η εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών, κατ'ελάχιστον δύο, όπως συνιστάται από τη Διεθνή Εταιρεία Εξωκυτταρικών Σωματιδίων (ISEV), τόσο για τον ποσοτικό προσδιορισμό, όσο και για τον κατάλληλο χαρακτηρισμό αυτών των σωματιδίων [93].

Πίνακας 4. Μέθοδοι χαρακτηρισμού και ποσοτικοποίησης των EVs. Πηγή: Life Sci, 271:119177, p4. [93].

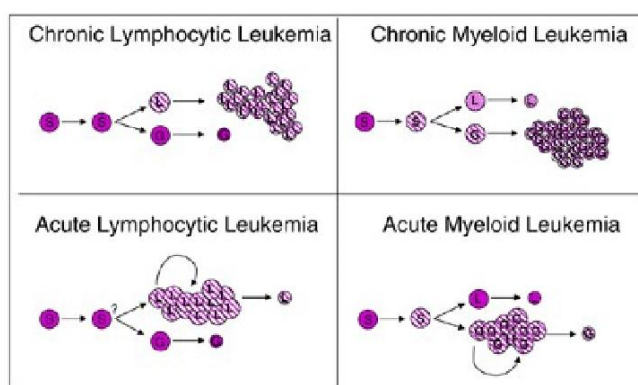
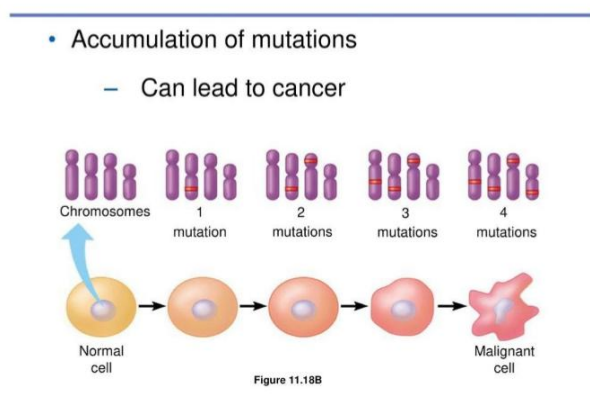
	Usage and information	Limitations
NTA	<ul style="list-style-type: none"> • Determines size, size distribution, and concentration of EVs. • Allows the tracking of the Brownian motion in a liquid suspension. • Sample preparation is very quick and easy. • After measurements, samples can be recovered in their original form. • Detects the presence of antigens on EVs by applying fluorescently labeled antibodies. 	<ul style="list-style-type: none"> • The main obstacle is to find the proper dilution of the samples for measurement, to bypass the effect of a larger vesicle masking a smaller one. • Although it is capable of fluorescence detection, the fluorescent signal needs to be very bright. • It does not address EVs phenotypic.
DLS	<ul style="list-style-type: none"> • An alternative technique for measuring the size of EVs. • It is simple to use, but it does not visualize the particles. • Provides the diameter range of analyzed vesicles. • This method use laser beam which passes through the samples. 	<ul style="list-style-type: none"> • It is less accurate in suspensions of particles varying in size. • In the presence of larger vesicles, the detection of smaller events becomes problematic.
TRPS	<ul style="list-style-type: none"> • Determines size and concentration of EVs on a particle-by-particle basis. • It is an impedance-based method. • It is used to characterize the surface charge of EVs. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detection of EVs with the same size-range is the limitation of TRPS.
AFM	<ul style="list-style-type: none"> • It is an optical electron microscopic technique. • Detects the properties of EVs surface. • Measure the structure, biomechanics, and biomolecular content of EVs. 	<ul style="list-style-type: none"> • In order to be successful, all vesicles must be attached to atomically flat surface such as mica.
TEM	<ul style="list-style-type: none"> • Characterizes the size, structure, and morphology. • Visualizes content of EVs by fluorescent dyes. • Specimens need to be fixed. 	<ul style="list-style-type: none"> • Electron beams may damage biological samples. • The morphology of the EVs may change during multistep preparations (fixation and dehydration).
Flowcytometry	<ul style="list-style-type: none"> • Characterizes surface proteins and antigen expression. • Detects the expression of EVs markers by fluorochrome-conjugated antibodies. • Widely used for EVs analysis of size and structure in suspension. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limited sensitivity and resolution. • Difficult to resolve particles below 500 nm. • Forward-scattered light (0.5–5°) is affected by the refractive index mismatches between sheath fluid and sample. • Side-scattered light (15–150°) leads to problems associated with EVs resolution above background noise. • Significant numbers of particles remain undetected due to the size detection limitation of flow cytometers. • the "swarming" effect may arise when high concentrations of EVs are being analyzed, which may result in the identification of multiple vesicles as a single event.

ELISA
WB

- They are immunological methods.
- Detect the expression of proteins and surface markers in EVs.

Τα νεοπλασματικά νοσήματα του αίματος είναι μία ετερογενής ομάδα διαταραχών που περιλαμβάνει τα Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, τα Μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, τις λευχαιμίες, και το πολλαπλό μυέλωμα. Μπορεί να προέρχονται από την κλωνική εξέλιξη των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων ή από τον μετασχηματισμό προγονικών κυττάρων με ανοσοποιητικό δυναμικό, εικόνα 48.

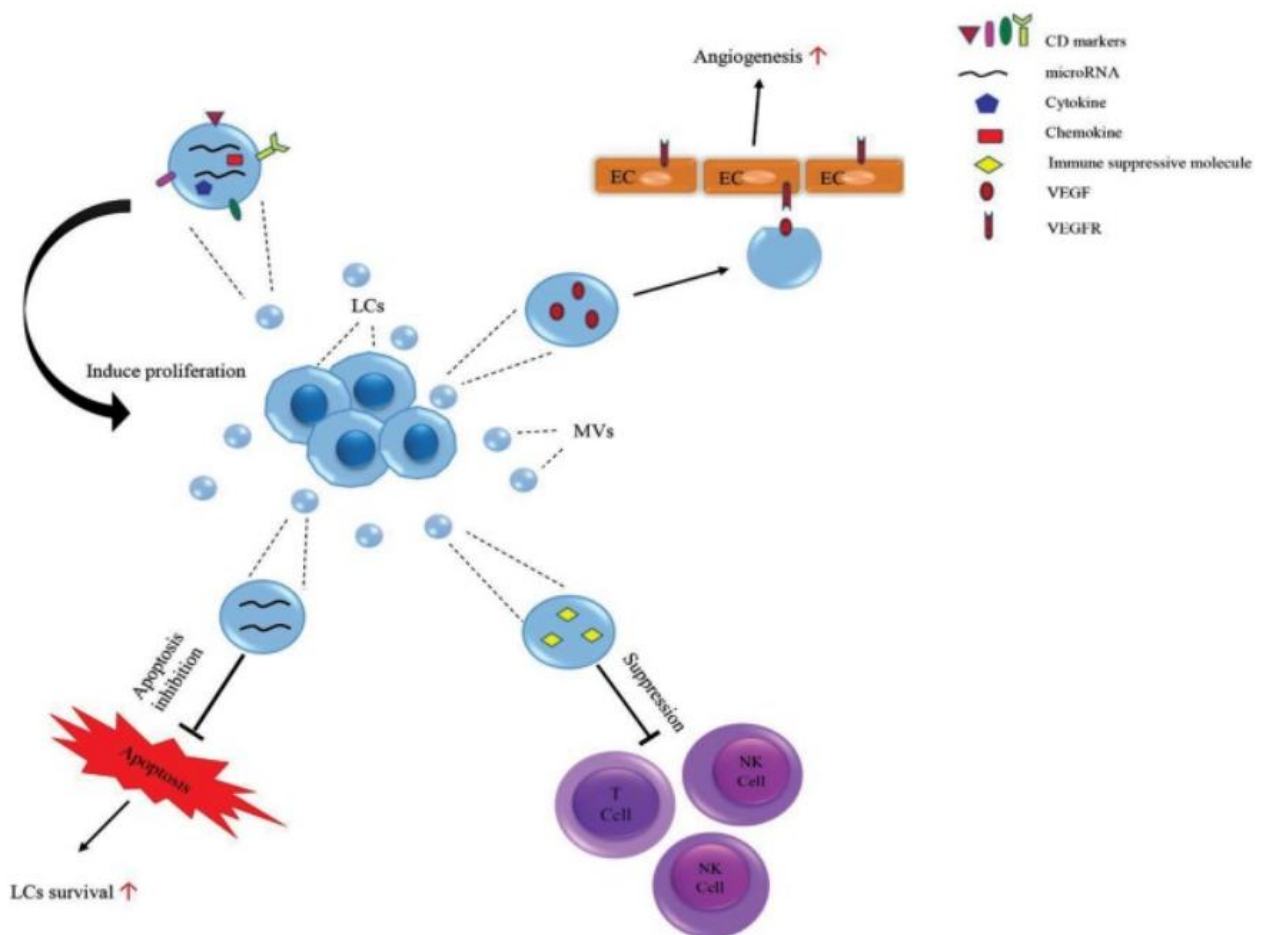
Εικόνα 48. Μοριακή βάση αιματολογικών νοσημάτων. Πηγή: Pearson Education, Inc. Publishing as Benjamin Cummings, 2005.



Τα εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) που προέρχονται από τον καρκίνο του αίματος τροποποιούν την ανάπτυξη και τη διατήρηση των καρκινικών κυττάρων. Οι καρκίνοι του αίματος εφαρμόζουν μία στρατηγική "κυψελιδικής νοημοσύνης" για τη διάδοση σημάτων στο μικροπεριβάλλον τους, προωθώντας την ανάπτυξη /ή και τη διατήρηση του κακοήθους κλώνου [238]. Τα επίπεδα των CD19(+) και CD20(+) των μικροσωματιδίων στο αίμα ασθενών με B χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και non-Hodgkin λέμφωμα που μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής βρέθηκαν αυξημένα έναντι της ομάδας υγιών μαρτύρων- ομάδα ελέγχου. Βρέθηκε επίσης ότι, ο αριθμός των

μικροσωματιδίων που προέρχονται από τα Β κύτταρα ήταν υπερπολλαπλασσιος στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το επίπεδο των CD20(+) μικροσωματιδίων σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των CD20(+) λεμφοκυττάρων στους ασθενείς με χρόνια λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα [239]. Τα εξωμυελικά κύτταρα των όγκων μπορούν να αποτελέσουν πηγή μικροσωματιδίων CD19(+), σχήμα 13 [240].

Σχήμα 13. Ο μηχανισμός των MVs στην εξέλιξη της λευχαιμίας. Πηγή: Cell J. 2019 Summer, 21(2):115–123, Figure 1.



Η παρουσία και ο φαινότυπος των κυκλοφορούντων EVs στις αιματολογικές κακοήθειες (HMs) παραμένουν πεδίο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Η μελέτη των Caivano et al., 2015 είχε ως σκοπό να χαρακτηριστούν τα EVs στο περιφερικό αίμα ασθενών με HM σε σύγκριση με υγιή άτομα-ομάδα ελέγχου (controls). Απομονώθηκαν EVs ορού από

ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), λέμφωμα μη Hodgkin (NHL), μακροσφαιριναιμία Waldenstrom (WM), λέμφωμα Hodgkin (HL), πολλαπλό μυέλωμα (MM), οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (MPN), μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (MDS) και ομάδα υγείων μαρτύρων (ομάδα ελέγχου). Τα EVs απομονώθηκαν από τον ορό του περιφερικού αίματος με βήματα υπερφυγοκέντρωσης και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό του αριθμού, του μεγέθους και του ανοσοφαινότυπου. Τα επίπεδα των MVs ήταν σημαντικά αυξημένα σε WM, HL, MM, AML και ορισμένα MPNs και, αν και σε μικρότερο βαθμό, σε CLL και NHL σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Το HL, το MM και τα MPNs δημιούργησαν έναν πληθυσμό MVs που χαρακτηριζόταν από χαμηλότερο μέγεθος (κάτω από 0,3 μm) σε σύγκριση με τα ομάδα ελέγχου. Τα MVs από ασθενείς εξέφραζαν ειδικά αντιγόνα σχετιζόμενα με τον όγκο, όπως το CD19 σε νεοπλάσματα Β-κυττάρων, το CD38 σε MM, το CD13 σε μυελοειδείς όγκους και το CD30 σε HL. Τόσο ο συνολικός, όσο και ο ειδικός για το αντιγόνο αριθμός των MVs βρέθηκε ότι είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά του ΗΜ, όπως το στάδιο Rai στην ΧΛΛ, το Διεθνές Σύστημα Προγνωστικής Βαθμολόγησης στο ΟΜ, το Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης στο MM και το κλινικό στάδιο στο HL. Τα MVs μπορεί να αντιπροσωπεύουν έναν νέο βιοδείκτη στα ΗΜs [217].

Κεφάλαιο 6.: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα EVs, ως σημαντικοί διαμεσολαβητές επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων στις αιματολογικές κακοήθειες, όχι μόνο διεγείρουν τα καρκινικά κύτταρα με αυτοκρινή τρόπο, αλλά και ενεργοποιούν τα στρωματικά κύτταρα ώστε να υποστηρίξουν την κακοήθεια, μέσω της οριζόντιας μεταφοράς των συστατικών τους είτε στα καρκινικά κύτταρα, είτε στο στρώμα του μυελού των οστών. Τα EVs επηρεάζουν επίσης τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, διευκολύνοντας την εξέλιξη του όγκου.

Ενώ οι παθολογικές επιδράσεις των μικροσωματιδίων έχουν τεκμηριωθεί τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, η συζήτηση σχετικά με το περιεχόμενο τους, το οποίο φαίνεται να είναι προσανατολισμένο στον τύπο της νόσου, παραμένει ανοικτή. Ειδικότερα δε, η ολοένα αυξανόμενη άποψη για τον τρόπο με τον οποίο τα EVs επηρεάζουν την συμπεριφορά των κυττάρων-στόχων συνεχίζει να αποκαλύπτει νέες ευκαιρίες για θεραπευτική παρέμβαση στον καρκίνο.

Όσο και αν αυτά τα μικροκυστίδια αποτελούν συναρπαστικά εργαλεία σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές, είναι επίσης ευαίσθητοι βιοδείκτες στα βιολογικά υγρά λόγω της μεγάλης ποσότητας τους σε αυτά.

Παρόλο που ήδη πολλές τεκμηριωμένες μελέτες ανέδειξαν τον συμμετοχικό ρόλο των μικροσωματιδίων στις αιματολογικές κακοήθειες, τώρα βρίσκονται σε εξέλιξη περαιτέρω μελέτες για να απαντηθούν με ακρίβεια πολυάριθμα εκκρεμή ερωτήματα, όπως οι μοριακοί μηχανισμοί έκκρισης και διακίνησης των EVs, οι τυπικές μέθοδοι απομόνωσης και τέλος οι επιλεκτικές μέθοδοι για τον ειδικό προσδιορισμό της προέλευσης τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vaillant A.A. J., Stang C.M. (2023). Lymphoproliferative Disorders. StatPearls Publishing LLC. PMID: 30725847.
2. Chen C., Gu Y.D., Geskin L.J. (2019). A Review of Primary Cutaneous CD30+ Lymphoproliferative Disorders. *Hematol Oncol Clin North Am.* 33(1):121-134.
3. Horwitz S.M., Ansell S., Ai W.Z., Barnes J., Barta S.K., Brammer J., et al. (2022). T-Cell Lymphomas, Version 2.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 20(3):285-308.
4. Varghese M.T., Alsubait S. (2023). T-Cell Lymphoma. StatPearls Publishing. PMID: 33232024.
5. Wolf P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Brit J Haemat,* 13:269.
6. Yamamoto S., Azuma E., Muramatsu M., Hamashima T., Ishii Y., Sasahara M. (2016). Significance of Extracellular Vesicles: Pathological Roles in Disease. *Cell Structure and Function,* 41:137-143.
7. Melki I., Tessandier N., Zufferey A., Eric Boilard E. (2017). Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets,* 28(3):214-221.
8. Zahra S., Anderson J.A., Stirling D., Ludlam C.A. (2011). Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol,* 152, 688–700.
9. Said A.S., Rogers S.C., Doctor A. (2017). Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions. *Front Physiol,* 8: 1120.
10. Doeuvre L., Plawinski L., Toti F., Anglés-Cano E. (2009). Cell-derived microparticles: A new challenge in neuroscience, *110(2):457-68.*
11. Mause S.F., Weber C. (2010). Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res,* 107:1047–1057.
12. Lovren F, Verma S. (2013). Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem,* 59(8):1166-74.
13. van Es N., Suzanne Bleker S., Sturk A., Nieuwland R. (2015). Clinical Significance of Tissue Factor-Exposing Microparticles in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost,* 41(7):718-27.
14. Key N., Makris M., et al. (2009). *Practical Hemostasis and Thrombosis.* WileyBlackwell.
15. Reines B., and Ninham B. (2019). Structure and function of the endothelial surface layer: Unraveling the nanoarchitecture of biological surfaces. *Quarterly Reviews of Biophysics,* 52, E13. doi:10.1017/S0033583519000118.

16. Kotlyarov S. (2022). Immune Function of Endothelial Cells: Evolutionary Aspects, Molecular Biology and Role in Atherogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 23:9770.
17. Noble M.I.M., Holland A.J.D. (2017). Preservation of Haemostasis with Anti-thrombotic Serotonin Antagonism. *J Hematol Clin Res*, 1: 019-025.
18. Brass L.F., and Diamond S.L. (2016). Transport physics and biorheology in the setting of hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost*, 14:906-17.
19. Periyah M.H., Halim A.S., Mat Saad A.Z. (2017). Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 11(4):319-327.
20. Lenting P., Christophe O., Denis C. (2015). von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, 125 (13): 2019–2028.
21. Ahmadi S.E., Shabannezhad A., Kahrizi A., et al. (2023). Tissue factor (coagulation factor III): a potential double-edge molecule to be targeted and re-targeted toward cancer. *Biomark Res*, 11, 60. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00504-6>.
22. Winter W.E., Flax S.D., Harris NS. (2017). Coagulation Testing in the Core Laboratory. *Lab Med*, 48(4):295-313.
23. Butenas S., Orfeo T., Mann K.G. (2009). Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(12):1989-96.
24. Grover S., Mackman N. (2019). Intrinsic Pathway of Coagulation and Thrombosis *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39 (3): 331-338.
25. MacFarlane R.G. (1994). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 202:98-9.
26. Smith S.A., Travers R.J., Morrissey J.H. (2015). How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50(4):326-36.
27. Pilli V. S. (2018). Understanding the Clotting Cascade, Regulators, and Clinical Modulators of Coagulation. InTech. doi: 10.5772/intechopen.75141.
28. Hoffman M., Monroe D.M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85(6):958-65.
29. Ho K.M., Pavey W. (2017). Applying the cell-based coagulation model in the management of critical bleeding. *Anaesth Intensive Care*, 5(2):166-176.
30. Maroney S.A., Mast AE. (2015). New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost*, 13 (1): S200–S7.
31. Padda I.S., Patel P., Citla Sridhar D. (2023). Protein C and S. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557814/>.
32. Lippi G., Favaloro E. (2018). Hemostasis practice: state-of-the-art. *Journal of Laboratory and Precision Medicine*. DOI:10.21037/JLPM.2018.07.07.

33. Jilani T.N., Siddiqui A.H. Tissue Plasminogen Activator. [Updated 2023 Feb 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507917/>.
34. Mahmood N., Mihalcioiu C., Rabbani SA. (2018). Multifaceted Role of the Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPA) and Its Receptor (uPAR): Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Oncol*, 12 (8):24.
35. Baart, V.M., Houvast, R.D., de Geus-Oei, L.F. et al. (2020). Molecular imaging of the urokinase plasminogen activator receptor: opportunities beyond cancer. *EJNMMI Res*, 10:87.
36. Schmaier AH. (2016). The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost*, 14:28–39.
37. Peng S., Xue G., Gong L. (2017). A long-acting PAI-1 inhibitor reduces thrombus formation. *Thromb Haemost*, 117(7):1338-1347.
38. Morrow G., Whyte C., Mutch N. (2020). Functional plasminogen activator inhibitor 1 is retained on the activated platelet membrane following platelet activation. *Haematologica*, 105(12):2824-2833.
39. Batiha G.ES., Al-kuraishy H.M., Al-Maiahy T.J., et al. (2022). Plasminogen activator inhibitor 1 and gestational diabetes: the causal relationship. *Diabetol Metab Syndr*, 14:127.
40. Alli N., Vaughan, J., Louw S., Moodly S., & Patel M. (2018). Acquired bleeding disorders. *SAMJ: South African Medical Journal*, 108(3):159-165.
41. Godby R.C., May J.E., Lima J.L.O., Singh N., Marques M.B. (2022). Congenital and acquired disorders of primary hemostasis, *Ann Blood*, 7:10.
42. Tiede A., Zieger B., Lisman T. (2022). Acquired bleeding disorders. *Haemophilia*, 28 (4): 68–76.
43. Bhandari J., Sedhai Y.R. Hemolytic Uremic Syndrome. [Updated 2022 Aug 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556038/>.
44. Wang M., Cyhaniuk A., Cooper D.L., Iyer N.N. (2017). Identification of people with acquired hemophilia in a large electronic health record database. *J Blood Med*, 8:89-97.
45. Dall'Ara G., Grotti S., Conficoni E., Poletti G., Valpiani D., Carletti R., et al. (2021). Early Resolution of Heyde's Syndrome following Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Semin Thromb Hemost*, 47(1):102-104.
46. Rauch A., Caron C., Vincent F., Jeanpierre E., Ternisien C., Boisseau P., et al. (2016). A novel ELISA-based diagnosis of acquired von Willebrand disease with increased VWF proteolysis. *Thromb Haemost*, 115(5):950-9.

47. Hegerova L., He F., Zantek N.D., Vercellotti G.M, Holtan S.G., Reding M.T. (2019). Reversal of acquired von Willebrand syndrome with allogeneic stem cell transplant for chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis*, 77:109-112.
48. Περδίου Α., Συμεωνίδης Δ., Σταθερού Κ., Κουσουλάκου Α. (2018). Διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη: παθοφυσιολογία, διάγνωση, αντιμετώπιση και η σχέση της με την κύηση και τον καρκίνο. *Επιστημονικά Χρονικά*, 23(1): 10-34.
49. Σακκάς Α., Γεωργίου Ε. (2015). Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα-μια όχι συχνή εκδήλωση των ρευματικών παθήσεων. *Mediterr J Rheumatol*, 26(2): 12-17.
50. Windyga J., Baran B., Odnoczko E., Buczma A., Drews K., Laudanski P., et al. (2019). Treatment guidelines for acquired hemophilia A. *Ginekol Pol*, 90(6):353-364.
51. Haider M.Z., Anwer F. Acquired Hemophilia. [Updated 2022 Dec 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560494/>.
52. Fesslova V., Colli A.M., Boito S., Fabietti I., Triulzi F., Persico N. (2021). Dural Sinus Arteriovenous Malformation in the Fetus. Case Report and Discussion of the Literature. *Diagnostics (Basel)*, 11(9):1651.
53. Palla R., Peyvandi F., Shapiro A. (2015). Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood*, 125 (13): 2052–2061.
54. Kenet G., Chen Y-C., Lowe G., Percy C., Tran H., von Drygalski A., et al. (2021). Real-World Rates of Bleeding, Factor VIII Use, and Quality of Life in Individuals with Severe Haemophilia A Receiving Prophylaxis in a Prospective, Noninterventional Study. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24):5959.
55. Doherty T.M., Kelley A. Bleeding Disorders. [Updated 2023 Apr 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541050/>.
56. Du P., Bergamasco A., Moride Y., Truong Berthoz F., Özen G., Tzivelekis S. (2023). Von Willebrand Disease Epidemiology, Burden of Illness and Management: A Systematic Review. *J Blood Med*, 2(14):189-208.
57. Sivapalaratnam S., Collins J., and Gomez K. (2017). Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. *Br J Haematol*, 179: 363-376.
58. Giunta C., Baumann M., Fauth C., Lindert U., Abdalla E.M., Brady A.F., et al. (2018). A cohort of 17 patients with kyphoscoliotic Ehlers–Danlos syndrome caused by biallelic mutations in FKBP14: expansion of the clinical and mutational spectrum and description of the natural history. *Genet Med*, 20:42–54. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.70>.
59. Dupuis A., Bordet J.C., Eckly A., Gachet C. (2020). Platelet δ-Storage Pool Disease: An Update. *J Clin Med*, 9(8):2508.

60. Pennamen P., Le L., Tingaud-Sequeira A., Fiore M., Bauters A., Van Duong Beatrice N., et al.(2020). BLOC1S5 pathogenic variants cause a new type of Hermansky-Pudlak syndrome. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet*, 2020:1–10.
61. Khakwani S., Winton C., Aslam N., Taylor S. (2021). Platelet storage pool disorder: multidisciplinary planning in pregnancy. *BMJ Case Reports CP*, 14: e239321.
62. Waheed S.M., Kudaravalli P., Hotwagner D.T. (2023). Deep Vein Thrombosis. [Updated 2023 Jan 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507708>.
63. Gupta A., Day J., Streiff M., Takemoto C., Jung K., Abro C., et al. (2020). Mortality and Associated Comorbidities Among Patients Hospitalized for Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism in the United States: Results from a Nationally Representative Database. *Blood*, 136 (1): 39–40.
64. Weller S., Porterfield L., Davis J., Wilkinson G., Chen L., Baillargeon L. (2021). MedRxiv 2021.06.13.21258854; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.13.21258854>.
65. Kushner A., West W. P., Khan, Suheb M.Z., Pillarisetty L.S. Virchow Triad. [Updated 2022 Dec 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539697/>.
66. Anand S. (2017). Smoking A Dual Pathogen for Arterial and Venous Thrombosis Circulation, 135(1):17-20.
67. Pastori D., Cormaci V.M., Marucci S., Franchino G., Del Sole F., Capozza, A., et al. (2023). A Comprehensive Review of Risk Factors for Venous Thromboembolism: From Epidemiology to Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4):3169.
68. McLendon K., Goyal A., Attia M. (2023). Deep Venous Thrombosis Risk Factors. [Updated 2023 Mar 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470215/>.
69. Zöller B., Svensson P.J., Dahlbäck B., Lind-Hallden C., Hallden C., Elf J. (2020). Genetic risk factors for venous thromboembolism. *Expert Rev Hematol*, 13(9):971-981.
70. Bawazir W.M. (2022). Systematic Review and Meta-Analysis of the Susceptibility of ABO Blood Groups to Venous Thromboembolism in Individuals with Factor V Leiden. *Diagnostics*, 12(8):1936. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12081936>.
71. Dautaj A., Krasi G., Bushati V., Precone V., Gheza M., Fioretti F., et al. (2019). Hereditary thrombophilia. *Acta Biomed*, 30;90(10-S):44-46.

72. Arachchillage D.J., Mackillop L., Chandratheva A., Motawani J., MacCallum P., Laffan M. (2022). Thrombophilia testing: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol*, 198:443– 458.
73. Khider L., Gendron N., Mauge L. (2022). Inherited Thrombophilia in the Era of Direct Oral Anticoagulants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3):1821.
74. Abdelmalik B.H.A., Leslom M.M.A., Gameraddin M., Alshammari Q.T., Hussien R., Alyami M.H., et al. (2023) Assessment of Lower Limb Deep Vein Thrombosis: Characterization and Associated Risk Factors Using Triplex Doppler Imaging. *Vasc Health Risk Manag*, 19:279-287.
75. Fernandes C., Morinaga L., Alves J., Castro M., Calderaro D., Jardim C., et al. (2019). Cancer-associated thrombosis: the when, how and why. *European Respiratory Review*, 28 (151):180119. DOI: 10.1183/16000617.0119-2018.
76. Carrier M., Abou-Nassar K., Mallick R., Tagalakis V., Shivakumar S., Schattner A., et al. (2019). Apixaban to prevent venous thromboembolism in patients with cancer. *N Engl J Med*, 380: 711–719.
77. Colucci G., Tsakiris D.A. (2020). Thrombophilia screening revisited: an issue of personalized medicine. *J Thromb Thrombolysis*, 49(4): 618–629.
78. Alameddine R., Nassabein R., Le Gal G., Sié P., Mullier F., Blais N. (2020). Diagnosis and management of congenital thrombophilia in the era of direct oral anticoagulants. *Thromb Res*.185:72–77.
79. Moran J., Bauer K. (2020). Managing thromboembolic risk in patients with hereditary and acquired thrombophilias, *Blood*, 135 (5): 344-350.
80. Alaggio R., Amador C., Anagnostopoulos I., Attygalle A.D., de Oliveira Araujo I.B., Berti E., et al. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36:1720–1748.
81. Li W. (2022). The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors. In: Li W, editor. *Leukemia* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Oct 16. Chapter 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586208/> doi: 10.36255/exon-publications-leukemia-who-5th-edition-hematolymphoid-tumors.
82. Παπανικολάου Α., Τασίδου Α. (2017). Παθολογοανατομική ταξινόμηση των επιθετικών Β λεμφωμάτων *Haema*, 8(1): 9-17.
83. Παπαδάκης Β., Δενδρινός Β., Στεφανάκη Κ. (2017). Λέμφωμα Burkitt *Haema*, 8(1): 54-63.

84. Καλπαδάκη Χ., Πάγκαλης Γ., Αγγελοπούλου Μ., Βασιλακόπουλος Θ. (2013). Μη-MALT λεμφώματα οριακής ζώνης: διαγνωστικές και θεραπευτικές προκλήσεις *Χριστίνα Haema*, 4(2): 151-160.
85. Λεβίδου Γ., Κορκολοπούλου Π., Πατσούρης Ε. (2010). Η ταξινόμηση των Τ λεμφωμάτων *Haema*, 1(1): 4-10.
86. Κορκολοπούλου Π., Λεβίδου Γ., Πατσούρης Ε. (2012). Ιστολογική εικόνα - Ταξινόμηση λεμφώματος Hodgkin *Haema*, 3(3): 185-189.
87. Ehsan N., Zahra F. Castleman Disease. [Updated 2023 Apr 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576394/>.
88. Soh K.T., Tario J.D. Jr, Wallace P.K. (2017). Diagnosis of Plasma Cell Dyscrasias and Monitoring of Minimal Residual Disease by Multiparametric Flow Cytometry. *Clin Lab Med*, 37(4):821-853.
89. Roberts K.G. (2018). Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2018(1):137-145.
90. Puckett Y., Chan O. (2023). Acute Lymphocytic Leukemia. [Updated 2023 Jun 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459149/>.
91. El-Mallawany N., Frazer J., Van Vlierberghe P., Ferrando A.A., Perkins S., Lim M., et al. (2012). Pediatric T- and NK-cell lymphomas: new biologic insights and treatment strategies. *Blood Cancer Journal* 2, e65. <https://doi.org/10.1038/bcj.2012.8>.
92. Said A.S., Rogers S.C., Doctor A. (2017). Physiologic Impact of Circulating RBC Microparticles upon Blood-Vascular Interactions. *Front Physiol*, 8: 1120.
93. Dibavar M.A., Pourbagheri-Sigaroodia A., Asemanib Y., Salaric S., Bashasha D. (2021). Extracellular vesicles (EVs): What we know of the mesmerizing roles of these tiny vesicles in hematological malignancies? *Life Sciences*, 271:119177.
94. Edelstein L.C. (2017). The role of platelet microvesicles in intercellular communication. *Platelets*, 28(3):222-227.
95. Boulanger C.M., Dignat-George F. (2011). Microparticles: an introduction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31:2–3.
96. Morel O., Jesel L., Freyssinet J. M., Toti F. (2011). Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 31:15–26.
97. Burger D., Schock S., Thompson C. S., Montezano A. C., Hakim A. M., Touyz R. M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci.* 124:423-441.
98. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495–516.

99. Ståhl A.L., Johansson K., Mossberg M., Kahn R., Diana Karpman D. (2019). Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol*, 34(1): 11–30.
100. Thom S., Bhopale V., Hu J., Yang M. (2017). Increased carbon dioxide levels stimulate neutrophils to produce microparticles and activate the nucleotide-binding domain-like receptor 3 inflammasome. *Free Radic Biol Med*, 106:406-416.
101. Campello E., Radu C., Duner E., Lombardi A.M., Spiezia L., Bendo R., et al. (2018). Activated platelet-derived and leukocyte-derived circulating microparticles and the risk of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia: a role for PF4-bearing microparticles? *Cytometry B Clin Cytom*, 94:334-341.
102. Berezin A., Kremzer A., Martovitskaya Y., Berezina T., Gromenko E. (2016). Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction. *EBioMedicine*, 4:86-94.
103. González-Quintero V. H., Jiménez J. J., Jy W., Mauro L. M., Hortman L., O'Sullivan M. J., et al. (2003). Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 189:589–593.
104. Amabile N., Guérin A., Leroyer A., Mallat Z., Nguyen C., Boddaert J., et al. (2005). Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 16:3381-3388.
105. Simak J., Gelderman M., Yu H., Wright V., Baird A. (2006). Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. *J Thromb Haemost*, 4:1296-1302.
106. Campello E., Spiezia L., Radu C., Bulato C., Castelli M., Gavasso S., et al. (2011). Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. *Thromb Res*, 127:473-477.
107. Lv YM., Tan J., Miao Y., Zhang Q. (2019). The role of microvesicles and its active molecules in regulating cellular biology. *J Cell Mol Med*, 23(12):7894-7904.
108. Zahra S., Anderson J.A., Stirling D., Ludlam C.A. (2011). Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br. J. Haematol*, 152, 688–700.
109. Hu S., Park J., Liu A., Lee J.H., Zhang X., Hao Q., et al. (2018). Mesenchymal stem cell microvesicles restore protein permeability across primary cultures of injured human lung microvascular endothelial cells. *Stem Cells Transl Med*, 7:615-624.
110. Whale T.A., Wilson H.L., Tikoo S.K., Babiuk L.A., Griebel P.J. (2006). Pivotal advance: passively acquired membrane proteins alter the functional capacity of bovine polymorphonuclear cells. *J. Leukoc. Biol*, 80:481–491.

111. Record M., Silvente-Poirot S., Poirot M., Wakelam M.J.O (2018). Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res*, 59(8):1316-1324.
112. Del Conde I., Shrimpton C. N., Thiagarajan P., López J. A. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 106:1604–1611.
113. Mause S.F., Weber C. (2010). Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ. Res*, 107:1047–1057.
114. Feng B., Chen Y., Luo Y., Chen M., Li X., Ni Y. (2010). Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 208:264–269.
115. Forest A., Pautas E., Ray P., Bonnet D., Verny M., Amabile N., et al. (2010). Circulating microparticles and procoagulant activity in elderly patients. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci*, 65:414–420.
116. Faure V., Dou L., Sabatier F., Cerini C., Sampol J., Berland Y., et al. (2006). Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J. Thromb. Haemost*, 4:566–573.
117. Bernal-Mizrachi L., Jy W., Jimenez J. J., Pastor J., Mauro L. M., Horstman L. L., et al. (2003). High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am. Heart J*, 145:962–970.
118. Amabile N., Guérin A. P., Tedgui A., Boulanger C. M., London G. M. (2012). Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol. Dial. Transplant*, 27:1873–1880.
119. Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell. Biol*, Chapter 3: Unit 3.22.
120. Record M., Carayon K., Poirot M., Silvente-Poirot S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1841: 108–120.
121. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., et al. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 113: E968–E977.
122. Colombo M., Moita C., van Niel G., Kowal J., Vigneron J., Benaroch P., et al. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and

secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24): 5553–5565.

123. Aung T., Chapuy B., Vogel D., Wenzel D., Oppermann M., Lahmann M., et al. (2011). Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: 15336–15341.

124. Ghossoub R., Lembo F., Rubio A., Gaillard C.B., Bouchet J., Vitale N., et al. (2014). Syntenin/ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat. Commun*, 5: 3477.

125. Alonso R., Mazzeo C., Rodriguez M.C., Marsh M., Fraile-Ramos A., Calvo V., et al. (2011). Diacylglycerol kinase alpha regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes. *Cell Death Differ*, 18:1161–1173.

126. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., et al. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319: 1244–1247.

127. Ju R., Zhuang Z.W., Zhang J., Lanahan A.A., Kyriakides T., Sessa W.C., Simons M. (2014). Angiopoietin-2 secretion by endothelial cell exosomes: regulation by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and syndecan-4/syntenin pathways. *J. Biol. Chem*, 289: 510–519.

128. Miranda A.M., Lasiecka Z.M., Xu Y., Neufeld J., Shahriar S., Simoes S., et al. (2018). Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat. Commun*, 9: 291.

129. Hessvik N.P., Overbye A., Brech A., Torgersen M.L., Jakobsen I.S., Sandvig K., Llorente A. (2016). PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell. Mol. Life Sci*, 73:4717–4737.

130. Bianco F., Perrotta C., Novellino L., Francolini M., Riganti L., Menna E., et al. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J*, 28: 1043–1054.

131. Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., et al. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol*, 19: 1875–1885.

132. Tricarico C., Clancy J., and D'Souza-Schorey C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8: 220–232.

133. Martin K.R., Kantari-Mimoun C., Yin M., Pederzoli-Ribeil M., Angelot-Delettre F., Ceroi A., et al. (2016). Proteinase 3 is a phosphatidylserine-binding protein that affects the production and function of microvesicles. *J. Biol. Chem*, 291: 10476–10489.

134. Skočaj M., Yu Y., Grundner M., Resnik N., Zavec AB., Leonardi A., et al. (2016). Characterisation of plasmalemmal shedding of vesicles induced by the cholesterol/sphingomyelin binding protein, ostreolysin A-mCherry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1858(11):2882-2893.
135. Lhermusier T., Chap H., and Payrastre B. (2011). Platelet membrane asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J. Thromb. Haemost*, 9: 1883–1891.
136. Subra C., Grand D., Laulagnier K., Stella A., Lambeau G., Paillasse M., et al. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res*, 51(8):2105-20.
137. Teng F., Fussenegger M. (2021). Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv. Sci.*, 8, 2003505.
138. Kobayashi T., Beuchat M.H., Lindsay M., Frias S., Palmiter R.D., Sakuraba H., et al. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol*, 1: 113–118.
139. Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R., Geuze H.J., Sixma J.J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94:3791–3799.
140. Kobayashi T., Beuchat M.H., Chevallier J., Makino A., Mayran N., Escola J.M., et al. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J. Biol. Chem*, 277: 32157–32164.
141. Katagiri T., and Watabe T. (2016). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(6): a021899.
142. Zhou Y., Cai W., Zhao Z., Hilton T., Wang M., Yeon J., et al. (2018). Lactadherin promotes microvesicle clearance to prevent coagulopathy and improves survival of severe TBI mice. *Blood*, 131(5):563-572.
143. Terrisse A. D., Puech N., Allart S., Gourdy P., Xuereb J. M., Payrastre B., et al. (2010). Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *J. Thromb. Haemost.* 8:2810–2819.
144. Litvack M.L., Post M., Palaniyar N. (2011). IgM promotes the clearance of small particles and apoptotic microparticles by macrophages. *PLoS One*, 6(3): e17223.
145. Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borrás F.E., Buzas E.I., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 4:27066.

146. Augustine D., Ayers L.V., Lima E., Newton L., Lewandowski A.J., Davis E.F., et al. (2014). Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress. *Circ Res*, 114:109–113.
147. Rautou P. E., Vion A. C., Amabile N., Chironi G., Simon A., Tedgui A., et al. (2011). Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ. Res.* 109:593–606.
148. Antoniak S., Boltzen U., Eisenreich A., Stellbaum C., Poller W., Schultheiss H. P., et al. (2009). Regulation of cardiomyocyte full-length tissue factor expression and microparticle release under inflammatory conditions in vitro. *J. Thromb. Haemost.* 7:871–878.
149. Chen F., Evans A., Pham J., Plosky B. (2010). Cellular stress responses: a balancing act. *Mol Cell*, 40(2):175.
150. Dignat-George F., Boulanger C.M. (2011). The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(1):27-33.
151. Cauwenberghs S., Feijge M.A., Harper A.G., Sage S.O., Curvers J., Heemskerk J.W. (2006). Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, 580(22):5313-20.
152. Nolan S., Dixon R., Norman K., Hellewell P., Ridger V. (2008). Nitric oxide regulates neutrophil migration through microparticle formation. *Am J Pathol*, 172(1):265-73.
153. Sapet C., Simoncini S., Loriod B., Puthier D., Sampol J., Nguyen C., et al. (2006). Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*, 108(6):1868-76.
154. van den Akker J., van Weert A., Afink G., Bakker E.N., van der Pol E., Böing A.N., et al. (2012). Transglutaminase 2 is secreted from smooth muscle cells by transamidation-dependent microparticle formation. *Amino Acids*, 42(2-3):961-73.
155. Bevers E.M., Comfurius P., Dekkers D.W., Zwaal R.F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1439(3):317-30.
156. Kostova E.B., Beuger B.M., Klei T.R.L., Halonen P., Liefstink C., Beijersbergen R., et al. (2015). Identification of signalling cascades involved in red blood cell shrinkage and vesiculation. *Biosci Rep*, 35(2): e00187.
157. Aoki T., Hagiwara H., Matsuzaki T., Suzuki T., Takata K. (2007). Internalization of caveolae and their relationship with endosomes in cultured human and mouse endothelial cells. *Anat Sci Int*, 82(2):82-97.

158. Eyre J., Burton J. O., Saleem M. A., Mathieson P. W., Topham P. S., Brunskill N. J. (2011). Monocyte- and endothelial-derived microparticles induce an inflammatory phenotype in human podocytes. *Nephron Exp. Nephrol*, 119: e58–e66.
159. Ståhl A. L., Sartz L., Karpman D. (2011). Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 117:5503–5513.
160. Nomura S., Nakamura T., Cone J., Tandon N. N., Kambayashi J. (2000). Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry*, 40:173–181.
161. Takano K., Asazuma N., Satoh K., Yatomi Y., Ozaki Y. (2004). Collagen-induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. *Platelets*, 15:223–229.
162. Tschuor C., Asmis L. M., Lenzlinger P. M., Tanner M., Härter L., Keel M., et al. (2008). In vitro norepinephrine significantly activates isolated platelets from healthy volunteers and critically ill patients following severe traumatic brain injury. *Crit. Care* 12:R80. 10.1186/cc6931.
163. Théry C., Ostrowski M., Segura E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol*, 9: 581–593.
164. Angelillo-Scherrer A. (2012). Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res*, 110(2):356-69.
165. Horstman L.L., Jy W., Jimenez J.J., Bidot C., Yeon S Ahn Y.S. (2004). New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med*, 53(4):210-30.
166. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., et al. (2012). Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res*, 93(4):633-44.
167. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Panteleev M.A., Krymskaya O.V., Fazoil I Ataulakhanov F.I. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*, 97(3):425-34.
168. Owens A.P., Mackman N. (2011). Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res*, 108(10):1284-97.
169. Campello E., Spiezia L., Radu CM., Bulato C., Gavasso S., Tormene D., et al. (2016). Circulating microparticles and the risk of thrombosis in inherited deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost*, 115(1):81-8.

170. Campello E., Radu C.M., Spiezia L., Simioni P. (2017). Modulating thrombotic diathesis in hereditary thrombophilia and antiphospholipid antibody syndrome: a role for circulating microparticles? *Clin Chem Lab Med*, 55(7): 934–943.
171. Trummer A., Haarmeijer B., Werwitzke S., Wermes C., Ganser A., Budde U, Tiede A. (2013). Increased amounts of von Willebrand factor are bound to microparticles after infusion of desmopressin. *Haemophilia*, 19(2):236-41.
172. Reininger A.J., Heijnen H.F.G., Schumann H., Specht H.M., Schramm W., Ruggeri ZM. (2006). Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*, 107 (9): 3537–3545.
173. Artoni A., Lecchi A., Mancuso M.E., Santagostino E., Federici A., Mannucci P.M. (2008). Von Willebrand Factor-Glycoprotein Ib-Alpha Interactions Play a Role in Generating Platelet Microparticles: Data from Ex Vivo and in Vitro Studies. *Blood*, 112 (11): 3920.
174. Martins S.R., Alves L.V., Cardoso C.N., Silva L.G., Nunes F.F.C., das M de Lucas Júnior F. (2019). Cell-derived microparticles and von Willebrand factor in Brazilian renal transplant recipients. *Nephrology*, 24(12):1304-1312.
175. Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M., Horstman L.L., Soderland C., Ahn YS. (2003). Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. *Br J Haematol*, 123(5):896-902.
176. Ali R.A., Paul Y., McCauley R.F., Yaniz M., Gonzalez M.Q., Horstman L.L., et al. (2018). Cell Derived Microparticles (MP) in Different Phases of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) and Effect of Exchange Plasmapheresis (EPP) on Their Profiles. *Blood*, 132 (1): 3736.
177. McCauley R.F., Ali R.A., Paul Y., Yaniz M., Gonzalez M.Q., Jy W., et al. (2018). Microparticle Profiles in Patients with TTP Vs. ITP. *Blood*, 132(1): 3749.
178. Zong Y., Pruner I., Antovic A., Taxiarchis A., Vila Z.P., Soutari N., et al. (2020). Phosphatidylserine positive microparticles improve hemostasis in in-vitro hemophilia A plasma models. *Scientific Reports*, 10, Article number:7871. Doi: 10.1038/s41598-020-64686-x.
179. Gross P.L., Vaezzadeh N. (2010). Tissue factor microparticles and haemophilia. *Thromb Res*, 125(1): S67-9.
180. Mastronardi M.L., Mostefai H.A., Soleti R., Agouni A., Martínez M.C., Andriantsitohaina R. (2011). Microparticles from apoptotic monocytes enhance nitrosative stress in human endothelial cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 25, 653–660.
181. Fabiani R., Sepporta M.V., Rosignoli P., De Bartolomeo A., Crescimanno M., Morozzi G. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on

different tumour cells: the role of extracellular production of hydrogen peroxide. *European Journal of Nutrition*, 51: 455–464.

182. Essayagh S., Xuereb J.M., Terrisse A.D., Tellier-Cirioni L., Pipy B., Sié P. (2007). Microparticles from apoptotic monocytes induce transient platelet recruitment and tissue factor expression by cultured human vascular endothelial cells via a redox-sensitive mechanism. *Thromb. Haemost*, 98, 831–837.

183. Agouni A., Mostefai H.A., Porro C., Carusio N., Favre J., Richard V., et al. (2007). Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* 21, 2735–2741.

184. Mesri M., Altieri D.C. (1999). Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 274(33):23111-8.

185. Burger D., Travis S. (2011). Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6):1827-1837.

186. Jy W., Horstman L.L., Jimenez J.J., Ahn Y.S., Biró E., Nieuwland R., et al. (2004). Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*, 2(10):1842-51.

187. Brill A., Dashevsky O., Rivo J., Gozal Y., Varon D. (2005). Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. *Cardiovasc Res*, 67(1):30-8.

188. Kim H.K., Song K.S., Chung J.H., Lee K.R., Lee S.N. (2004). Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*, 124(3):376-84.

189. Yang C., Xiong W., Qiu Q., Shao Z., Hamel D., Tahiri H., et al. (2012). Role of receptor-mediated endocytosis in the antiangiogenic effects of human T lymphoblastic cell-derived microparticles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302(8):R941-9.

190. Huang Q-R., Li Q., Chen Y-H., Li L., Liu L-L., Lei S-H., Chen H-P., et al. (2010). Involvement of anion exchanger-2 in apoptosis of endothelial cells induced by high glucose through an mPTP-ROS-Caspase-3 dependent pathway. *Apoptosis*, 15(6):693-704.

191. Distler J.H., Akhmetshina A., Dees C., Jüngel A., Stürzl M., Gay S., et al. (2011). Induction of apoptosis in circulating angiogenic cells by microparticles. *Arthritis Rheum*, 63(7):2067-77.

192. Huber L.C., Jüngel A., Distler J.H., Moritz F., Gay R.E., Michel B.A., et al. (2007). The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis*, 12(2):363-74.

193. Czernek L., Döchler M. (2017). Functions of cancer-derived extracellular vesicles in immunosuppression, *Arch. Immunol. Ther. Exp*, 65:311–32.

194. Zou W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance, *Nat. Rev. Cancer*, 5:263–274.
195. Ricklefs F.L., Alayo Q., Krenzlin H., Mahmoud A.B., Speranza M.C., Nakashima H., et al. (2018). Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles, *Sci. Adv*, 4.
196. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R., Lo Iacono M., C. Tetta C., Biancone L., et al. (2007). Endothelial progenitor cell - derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*, 110:2440–2448.
197. Mack M., Kleinschmidt A., Brühl H., Klier C., Nelson P.J., Cihak J. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane- derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection, *Nat. Med*, 6: 769–775.
198. Sanderson M.P., Keller S., Alonso A., Riedle S., Peter J. (2016). Generation of Novel, Secreted Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR/ErbB1) Isoforms Via Metalloprotease- Dependent Ectodomain Shedding and Exosome Secretion. *J Cell Biochem*, 103(6): 1783–1797.
199. Navarro-Tableros V., Gomez Y., Camussi G., Brizzi M.F. (2019). Extracellular Vesicles: New Players in Lymphomas. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(1):41.
200. Haderk F., Schulz R., Iskar M., Cid L.L., Worst T., Willmund K.V., et al. (2017). Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes, *Sci. Immunol*, 2:1–12.
201. Szczepanski M.J., Szajnik M., Welsh A., Whiteside T.L., Boyiadzis M. (2011). Blast- derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1. *Haematologica*, 96: 1302–1309.
202. Whiteside T.L. (2013). Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem. Soc. Trans*, 41: 245–251.
203. Canitano A., Iessi E., Spugnini E.P., Federici C., Fais S. (2016). Proton pump inhibitors induce a caspase-independent antitumor effect against human multiple myeloma. *Cancer Lett*, 376:278–283.
204. Logozzi M., Spugnini E., Mizzoni D., Di Raimo R., Fais S. (2019). Extracellular acidity and increased exosome release as key phenotypes of malignant tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 38:93–101.
205. Desrochers L.M., Antonyak M.A., Cerione R.A. (2016). Extracellular vesicles: satellites of information transfer in cancer and stem cell biology. *Dev. Cell*, 37:301–309.

206. Goldman S.L., Hassan C., Khunte M., Soldatenko A., Jong Y., Afshinnekoo E., et al. (2019). Epigenetic modifications in acute myeloid leukemia: prognosis, treatment, and heterogeneity, *Front. Genet*, 10:133. doi: 10.3389/fgene.2019.00133.
207. Huan J., Hornick N.I., Shurtleff M.J., Skinner A.M., Goloviznina N.A., Roberts C.T., et al. (2013). RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes, *Cancer Res*, 73:918–929.
208. Huan J., Hornick N.I., Goloviznina N.A., Kamimae-Lanning A.N., David L.L., Wilmarth P.A., et al. (2015). Coordinate regulation of residual bone marrow function by paracrine trafficking of AML exosomes. *Leukemia*, 29:2285–2295.
209. Boyiadzis M., Whiteside T.L. (2018). Exosomes in acute myeloid leukemia inhibit hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol*, 25:279–284.
210. Boyiadzis M., Whiteside T.L. (2017). The emerging roles of tumor-derived exosomes in hematological malignancies. *Leukemia*, 31:1259–1268.
211. Patel S.J., Darie C.C., Clarkson B.D. (2016). Exosome mediated growth effect on the non- growing pre-B acute lymphoblastic leukemia cells at low starting cell density, *Am. J. Transl. Res*, 8:3614–3629.
212. Lu L., Chen X.M., Tao H.M., Xiong W., Jie S.H., Li H.Y. (2015). Regulation of the expression of zinc finger protein genes by microRNAs enriched within acute lymphoblastic leukemia-derived microvesicles. *Genet. Mol. Res*, 14:11884–11895.
213. Ying Li W., Mei Chen X., Xiong W., Mei Guo D., Lu L., Yu Li H. (2014). Detection of microvesicle miRNA expression in ALL subtypes and analysis of their functional roles. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci*, 34:640–645.
214. Nagel S., Venturini L., Przybylski G.K., Grabarczyk P., Schmidt C.A., Meyer C., et al. (2009). Activation of miR-17-92 by NK-like homeodomain proteins suppresses apoptosis via reduction of E2F1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 50:101–108.
215. Molitoris J.K., McColl K.S., Distelhorst C.W. (2011). Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17-92 contributes to the induction of bim and initiation of apoptosis. *Mol. Endocrinol*, 25:409–420.
216. Cai J., Wu G., Tan X., Han Y., Chen C., Li C., et al. (2014). Transferred BCR/ABL DNA from K562 extracellular vesicles causes chronic myeloid leukemia in immunodeficient mice. *PLoS One*, 9:1–11.
217. Caivano A., Laurenzana I., De Luca L., La Rocca F., Simeon V., Trino S., et al. (2015). High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumour Biol*, 36(12):9739-52.

218. Gao X., Wan Z., Wei M., Dong Y., Zhao Y., Chen X., et al. (2019). Chronic myelogenous leukemia cells remodel the bone marrow niche via exosome-mediated transfer of miR-320. *Theranostics*, 9(19): 5642–5656.
219. Corrado C., Raimondo S., Saieva L., Flugy AM., De Leo G., Alessandro R. (2014). Exosome-mediated crosstalk between chronic myelogenous leukemia cells and human bone marrow stromal cells triggers an Interleukin 8-dependent survival of leukemia cells. *Cancer Lett*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.009>.
220. Rodrigues C.A., Gonçalves M.V., Ikoma M.R.V., Lorand-Metze I., Pereira A.D., de Farias D.L.C., et al. (2016). Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 38:346–357.
221. Crompton E., van Damme M., Pieters K., Vermeersch M., Perez-Morga D., Mineur P., et al. (2017). Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica*, 102:1594–1604.
222. Krysov S., Steele A.J., Coelho V., Linley A., Hidalgo M.S., Carter M., et al. (2014). Stimulation of surface IgM of chronic lymphocytic leukemia cells induces an unfolded protein response dependent on BTK and SYK, *Blood*, 124:3101–3109.
223. Boysen J., Nelson M., Magzoub G., Maiti G.P., Sinha S., Goswami M., et al. (2017). Lymphocytic Leukemia: Implication in Disease Progression 31:350–360.
224. De Luca L., D’Arena G., Simeon V., Trino S., Laurenzana I., Caivano A., et al. (2017). Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 58: 1424–1432.
225. Ghosh A.K., Secreto C.R., Knox T.R., Ding W., Mukhopadhyay D., Kay N.E. (2010). Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*, 115:1755–1764.
226. Pando A., Reagan J.L., Quesenberry P., Fast L.D. (2018). Extracellular vesicles in leukemia. *Leuk. Res*, 64:52–60.
227. Dörsam B., Bösl T., Reiners K.S., Barnert S., Schubert R., Shatnyeva O., et al. (2018). Hodgkin Lymphoma-Derived Extracellular Vesicles Change the Secretome of Fibroblasts Toward a CAF Phenotype. *Front Immunol*, 9:1358. doi: 10.3389/fimmu.2018.01358.
228. Hansen H.P., Paes Leme A.F, Hallek M. (2020). Role of ADAM10 as a CD30 Sheddase in Classical Hodgkin Lymphoma. *Front Immunol*, 11:398. doi: 10.3389/fimmu.2020.00398.

229. Fernandes C., Morinaga L., Alves J., Castro M., Calderaro D., Jardim C., et al. (2019). Cancer-associated thrombosis: the when, how and why. *European Respiratory Review*, 28 (151):180119. DOI: 10.1183/16000617.0119-2018.
230. Ofori K., Bhagat G., Alex J. Rai A.J. (2021). Exosomes and extracellular vesicles as liquid biopsy biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: Current state of the art and unmet clinical needs. *Br J Clin Pharmacol*, 87:284–294.
231. Lv L., Liu Y. (2021). Clinical Application of Liquid Biopsy in Non-Hodgkin Lymphoma. *Front Oncol*, 11:658234. doi: 10.3389/fonc.2021.658234.
232. Zhang L., Lei Q., Wang H., Xu C., Liu T., Kong F., et al. (2019). Tumor-derived extracellular vesicles inhibit osteogenesis and exacerbate myeloma bone disease, *Theranostics*, 9:196–209.
233. Raimondi L., De Luca A., Amodio N., Manno M., Raccosta S., Taverna S., et al. (2015). Involvement of multiple myeloma cell-derived exosomes in osteoclast differentiation. *Oncotarget*, 6:13772–13789.
234. Zahoor M., Westhrin M., Aass K.R., Moen S.H., Misund K., Psonka- Antonczyk K.M., et al. (2017). Hypoxia promotes IL-32 expression in myeloma cells, and high expression is associated with poor survival and bone loss. *Blood Adv*, 1:2656–2666.
235. Zarfati M., Avivi I., Brenner B., Katz T., Aharon A. (2019). Extracellular vesicles of multiple myeloma cells utilize the proteasome inhibitor mechanism to moderate endothelial angiogenesis. *Angiogenesis*, 22:185–196.
236. Wang J., De Veirman K., Faict S., Frassanito M.A., Ribatti D., Vacca A., et al. (2016). Multiple myeloma exosomes establish a favourable bone marrow microenvironment with enhanced angiogenesis and immunosuppression. *J. Pathol*, 239:162–173.
237. Gurunathan S., Kang M-H., Jeyaraj M., Qasim M., Kim J-H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8: 307.
238. Forte D., Barone M., Palandri F., Catani L. (2021). The "Vesicular Intelligence" Strategy of Blood Cancers. *Genes (Basel)*, 12(3):416.
239. Domnikova NP., Yu Dolgikh T., Sholenberg E.V., Vorontsova E.V., Goreva O.B., Mel'nikova E.V., et al. (2013). Blood microvesicles during chronic lymphoproliferative diseases. *Bull Exp Biol Med*, 156(1):94-7.
240. Ehsanpour A., Saki N., Bagheri M., Behzad M.M., Abroun S. (2019). The Expression of Microvesicles in Leukemia: Prognostic Approaches. *Cell J*, 21(2):115-123.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

<https://eclinpath.com/hemostasis/physiology/primary-hemostasis/>

<https://www.osmosis.org/answers/coagulation-cascade>

<https://basicmedicalkey.com/bleeding-and-thrombotic-disorders/>

<http://www.hemohelper.com/incidence-of-hemophilia-a/>

<https://www.rcemlearning.co.uk/reference/deep-vein-thrombosis/>

<https://curesearch.org/Hodgkin-Lymphoma-in-Children>

<https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--hodgkin-lymphoma--classic--nos#1>

<https://www.lymphoma.org.au/>

<https://www.leukemia-cell.org/atlas/index.php?pg=images--precursor-lymphoid-neoplasms--t-lymphoblastic-leukaemia-lymphoma--nos#1>