

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Urška PIŠEK

**IZVOR MIKROVEZIKLOV PRI S HEPARINOM  
POVZROČENI TROMBOCITOPENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Urška PIŠEK

**IZVOR MIKROVEZIKLOV PRI Z HEPARINOM POVZROČENI  
TROMBOCITOPENIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PHENOTYPISATION OF MICROPARTICLES IN HEPARIN-  
INDUCED THROMBOCYTOPENIA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za citometrijo Inštituta za mikrobiologijo in imunobiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana, dr. med., za somentorico doc. dr. Andrejo Natašo Kopitar, univ. dipl. biol. in za recenzenta prof. dr. Roka Kostanjška, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: doc. dr. Andreja Nataša KOPITAR  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Urška PIŠEK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 616.1:579(043.2)=163.6
- KG mikrovezikli/HIT/pretočna citometrija/
- AV PIŠEK Urška
- SA IHAN Alojz (mentor)/KOPITAR Andreja Nataša (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2014
- IN IZVOR MIKROVEZIKLOV PRI S HEPARINOM POVZROČENI  
TROMBOCITOPENIJI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 58 str., 18 slik, 89 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Proučevali smo razlike v izražanju antigenov na mikroveziklih, ki nastanejo pri bolnikih s heparinsko povzročeno trombocitopenijo oziroma HIT in zdravih posameznikih. Mikrovezikli, ki nastanejo kot stranski produkt aktivacije trombocitov s heparinom, naj bi imeli po mnenju nekaterih pomembno vlogo pri razvoju venskih in arterijskih tromboz, ki se pojavijo pri kar 20-40 % obolelih s HIT. Prav tako nam bi mikrovezikli lahko v prihodnosti služili kot morebitno orodje za hitrejše in natančnejše odkrivanje HIT. Mikrovezikle smo izolirali iz krvi s HIT obolelih posameznikov in zdravih posameznikov, jih označili z izbranimi protitelesi in opazovali prisotnost protiteles na mikroveziklih s pomočjo protitočnega citometra. Ugotovili smo, da v primerjavi z zdravimi posamezniki mikrovezikli, ki nastajajo pri HIT bolnikih, izražajo antigene za protitelesa CD31/CD42a, s čimer smo potrdili, da so ti mikrovezikli trombocitnega izvora, izražanje CD41a/CD62P pa nam pove, da ti mikrovezikli nastanejo iz aktiviranih trombocitov. Izražajo tudi CD142, kar pomeni, da je prokoagulantna sposobnost mikroveziklov pri bolnikih s HIT povečana. Prisotnost CD42a in CD42b pozitivnih mikroveziklov nam kaže, da vezava mikroveziklov na epitelij žil poteče preko receptorja GPIIb-IX-V na mikroveziklu ter preko von Willebrandovega faktorja na celicah epitelija. Opazovali smo tudi izražanje CD41a/CD61 na mikroveziklih, pri teh smo opazili statistične razlike le pri CD41a pozitivnih mikroveziklih, medtem ko delež CD61 in CD41a/CD61 pri HIT bolnikih v primerjavi z zdravimi posamezniki ni povečan.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 616.1:579(043.2)=163.6  
CX microvesicles/HIT/flow cytometry/  
AU PIŠEK Urška  
AA IHAN Alojz (supervisor)/KOPITAR Andreja Nataša (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology  
PY 2014  
TI PHENOTYPISATION OF MICROPARTICLES IN HEPARIN- INDUCED THROMBOCYTOPENIA  
DT Graduation thesis (university studies)  
NO IX, 58 p., 18 fig, 89 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the present study we observed differences in microvesicles and their expression of surface antigens in patients with heparin-induced thrombocytopenia, shorter HIT, and healthy individuals. Microvesicles are byproduct of platelet activation with heparin which according to some scientists play important role in development of venous and arterial thrombosis. In the future microvesicles could serve as tool for faster and more accurate detection of HIT. We isolated microvesicles from blood of HIT patients and healthy individuals, labeled them with selected antibodies and observed with flow cytometer. Our findings were that microvesicles of HIT patients in comparison with microvesicles from healthy individuals express CD31/CD42 antigens which are found only on platelets. Expression of CD41a/CD62P tells us that these microvesicles came from activated platelets. HIT microvesicles also express tissue factor (CD142) which means that microvesicles in HIT patients have higher procoagulant activity. The presence of CD42a and CD42b microvesicles shows that binding of microvesicles to epithelium of blood vessels takes place via GPIIb-IX-V complex on microvesicles and von Willenbrand factor on epithelial cells. We also observed expression of CD41a/CD61 but the only statistical differences we obtained were in case of CD41a labeling, while in case of CD61 and CD41a/CD61 labeling of microvesicles there were not any statistical differences in comparison with microvesicles from healthy individuals.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	4
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>5</b>
2.1 S HEPARINOM POVZROČENA TROMBOCITOPENIJA .....	5
<b>2.1.1 Patofiziologija s heparinom povzročene trombocitopenije.....</b>	<b>5</b>
2.1.1.1 Trombocitni faktor 4 (PF4).....	7
2.1.1.2 Aktivacija trombocitov .....	7
2.1.1.3 Aktivacija endotelijskih celic .....	8
2.1.1.4 Aktivacija monocit .....	8
<b>2.1.2 Epidemiologija s heparinom povzročene trombocitopenije .....</b>	<b>8</b>
2.1.2.1. Vpliv heparina na imunologijo s heparinom povzročene trombocitopenije.....	8
2.1.2.2 Sestava populacije bolnikov .....	9
2.1.2.3 Doza.....	9
2.1.2.4 Spol.....	9
2.1.2.5 Obseg poškodbe.....	10
<b>2.1.3 Diagnosticiranje s heparinom povzročene trombocitopenije .....</b>	<b>10</b>
2.1.3.1 Simptomi s heparinom povzročene trombocitopenije .....	10
2.1.3.2. Klinično ovrednotenje s heparinom povzročene trombocitopenije.....	11
2.1.3.3 Laboratorijsko diagnosticiranje protiteles, ki nastanejo pri s heparinom povzročeni trombocitopeniji .....	11
2.1.3.3.1. Serološki testi .....	11
2.1.3.3.2. Funkcionalni testi .....	12
2.2 MIKROPARTIKLI = MP .....	12
<b>2.2.1 Apoptotična telesa .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.2 Eksosomi.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.3 Mikrovezikli (tudi ekotosomi, mikropartikli).....</b>	<b>13</b>
2.2.3.1 Značilnosti mikroveziklov .....	13
2.2.3.2 Nastanek mikroveziklov .....	14
2.2.3.3. Zgradba mikroveziklov.....	14
2.2.3.3.1 Lipidi .....	15
2.2.3.3.2 Proteini .....	16
2.2.3.4. Pomen in funkcija mikroveziklov .....	16
2.2.3.4.1 Mikrovezikularni prenos signalov .....	18
2.2.3.5 Metode za preučevanje mikroveziklov.....	19
2.2.3.5.1 Metoda proučevanja mikroveziklov z encimsko-immunskim testom s trdno fazo ang. »solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)«.....	19

2.2.3.5.2 Metoda proučevanja s pretočnim citometrom .....	19
2.2.3.6 Mikrovezikli glede na celico izvora .....	19
2.2.3.6.1 Mikrovezikli trombocitnega izvora (PMP).....	20
2.2.3.6.2 Mikrovezikli endotelnega izvora (EMP) .....	20
2.2.3.6.3 Mikrovezikli levkocitnega izvora .....	21
2.2.3.6.4 Mikrovezikli eritrocitnega izvora .....	21
2.3 ANTIGENI, KI SMO JIH PROUČEVALI .....	21
<b>2.3.1 Antigen CD31 oz. PECAM 1 .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.2. Antigen CD42a (GPIX) in CD42b (GPIb) ki tvorijo kompleks GPIb-IX-V .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.3 Antigen CD62P oz. selektin P .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.4 Antigen CD41 in CD61 oz. receptor GPIIb/GPIIIa .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.5 Antigen CD142 oz. tkivni faktor .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.6 Aneksin V .....</b>	<b>25</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>26</b>
3.1 ODVZEM KRVI.....	26
3.2 IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV .....	26
3.3 OZNAČEVANJE MIKROVEZIKLOV .....	26
<b>3.3.1 Priprava vzorca za proučevanje števila in koncentracije mikroveziklov.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.2 Priprava vzorca in označevanje mikroveziklov z Aneksinom- V (APC).....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.3 Priprava vzorca in označevanje mikroveziklov z monoklonskimi protitelesi.....</b>	<b>27</b>
3.4 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM .....	28
<b>3.4.1 Princip delovanja pretočnega citometra.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.2 Analiza vzorcev .....</b>	<b>30</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>34</b>
4.1 ŠTEVILO IN KONCENTRACIJA MIKROVEZIKLOV .....	35
4.2 IZRAŽANJE CD 31/ CD 42A // ANN-V.....	37
4.3 IZRAŽANJE CD 42B // ANN-V .....	38
4.4 IZRAŽANJE CD 41A/ CD 61 //ANN-V .....	39
4.5 IZRAŽANJE CD41A / CD 62P // ANN-V .....	40
4.6 IZRAŽANJE CD142 // ANN-V .....	41
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>42</b>
5.1 RAZPRAVA.....	42
<b>5.1.1 Izolacija mikroveziklov .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.2 Površinski označevalci trombocitnih mikroveziklov.....</b>	<b>43</b>
5.1.2.1 Mikrovezikli, označeni s CD 31/ CD 42a // Ann-V .....	43
5.1.2.2 Mikrovezikli, označeni z CD42b/ Ann-V .....	45
5.1.2.3 Mikrovezikli, označeni s CD 41a/ CD 61// Ann-V .....	45
5.1.2.4 Mikrovezikli, označeni s CD142 //Ann-V.....	46
5.1.2.5 Mikrovezikli, označeni s CD41a/ CD62P// Ann-V .....	48
5.2 SKLEPI.....	49
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>50</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>52</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema klasične ekstrinzične in intrinzične poti koagulacije.....	2
Slika 2: Shema celičnega mikrovezikla.....	15
Slika 3: Primer molekulskega tovora trombocitnega mikrovezikla .....	17
Slika 4: Nabor različnih sestavin in poti, ki jih mikrovezikli uporabljajo pri medceličnem prenosu informacij in signalov .....	18
Slika 5: Struktura in funkcija PECAM-1 molekule.....	22
Slika 6: Shema trombocitnega receptorja GPIIb/IIIa .....	24
Slika 7: Primer točkovnega diagrama populacije mikroveziklov (P1).....	30
Slika 8: Za določitev meje med Annexin V pozitivnimi in negativnimi MV smo uporabljali negativno kontrolo, kjer smo MV označili z Annexinom V v odsotnosti Ca <sup>2+</sup> ionov.....	31
Slika 9: Diagram razčlenbe populacije mikroveziklov na Annexin-V pozitivne. ....	31
Slika 10: Diagram populacije Ann-V pozitivnih mikroveziklov (P3).....	31
Slika 11: Diagram populacije P3 (Ann-V pozitivni mikrovezikli) glede na njihovo izražanje CD42a in CD31 .....	32
Slika 12: Število mikroveziklov .....	35
Slika 13: Koncentracija mikroveziklov .....	36
Slika 14: Povprečna vrednost izražanja Ann-V, CD31, CD42a in CD31/CD42a.....	37
Slika 15: Povprečna vrednost izražanja Ann-V in CD42b .....	38
Slika 16: Povprečna vrednost izražanja Ann-V, CD41a, CD61 in CD41a/CD61.....	39
Slika 17: Povprečna vrednost izražanja Ann-V, CD41a in CD62P .....	40
Slika 18: Povprečna vrednost izražanja CD142 .....	41



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- ADP - adenzin difosfat  
Ann-V - Anneksin-V  
CD 31 - PECAM-1 (ang. *platelet endothelial cell adhesion molecule* )  
CD142 - tkivni faktor  
CD32 - trombocitni receptor FcγIIa  
CD41a - glikoprotein IIb (tudi GPIIb, α<sub>IIb</sub>)  
CD42a - glikoprotein IX (tudi GPIX)  
CD42b - glikoprotein Ib (tudi GPIb)  
CD61- glikoprotein IIIa (tudi GPIIIa, β<sub>3</sub>)  
CD62E - selektin E  
CD62P - selektin P  
CS -hondrotin sulfata  
ELISA - encimski imunski test (ang. »*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*«)  
EMP - mikrovezikli eritrocitnega izvora  
FITC - ang. fluorescein isothiocyanate  
FSC - fotodetektor, ki se nahaja v neposredni liniji laserskega žarka (ang. »*right angle side scatter*«)  
GAG - glikozaminoglikan  
HIT - s heparinom povzročena trombocitopenija (ang. »*Heparin-induced thrombocytopenia*«)  
HIT protitelesa - anti-PF4/heparin protitelesa  
HEPES - bipolarni ionski pufer  
IgG - imunoglobulin skupine G  
IgM - imunoglobulin skupine M  
ITIM - imunoreceptorni tirozinski inhibitorni motiv  
LAMP-1 - lizosomski membranski protein (ang. »*Lysosomal-associated membrane protein 1*« )  
LMWH - nizkomolekularni heparin (ang. »*low molecular weight heparin*«)  
MHC - molekule histokompatibilnega kompleksa  
MP - mikropartikel  
MV - mikrovezikli  
NO - dušikov oksid  
PBS - fosfatni pufer  
PE - fikoeritrin ( ang. »*Phycoerythrin*«)  
PF4 - trombocitni faktor 4 (ang.« *platelet factor 4*«)  
PFP - trombocitov in eritrocitov prosta plazma (ang. » *platelet free plasma*«)  
PMP - mikrovezikli trombocitnega izvora  
PPP- plazma, osiromašena s trombocitit (ang. »*platelet poor plasma*« )  
PS - fosfatidil serin  
PSGL-1- ang. »*P-selectin glycoprotein ligand-1*«

ROCK 1- ang. »*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*«

SE - standardna napaka (ang. »*standard error*« )

SSC - detektor, ki se nahaja pravokotno na smer vpadne svetlobe (ang. »*forward angle light scatter*«)

TAFI - inhibitor poti tkivnega faktorja

TF - tkivni faktor (tudi CD142, ang. »*tissue factor*«)

TNF $\alpha$  - tumor nekrotični faktor  $\alpha$

tPA - tkivnega plazminogenskega aktivatorja

UHF - nefrakcionirani heparin (ang. »*unfractionated heparin*«)

vWF- von Willebrand faktor

## 1 UVOD

Hemostaza je fiziološki proces, ki omogoča fluidnost krvi in preprečuje izgubo krvi ob poškodbah tako, da ustvari strdek. Vanjo so vpleteni številni sistemi kot npr. žilni sistem z endotelnimi celicami in trombociti, koagulacijski sistem s strjevalnimi faktorji in fibrinolitični sistem s plazminom. Za vzdrževanje normalne hemostaze je potrebna natančna regulacija vseh sistemov in procesov, ki potekajo v njej, saj v nasprotnem primeru lahko pride do tromboze ali krvavitev (Ogedegbe, 2002).

Endotelij ima pomembno vlogo pri promociji koagulacije, ima t.i. prokoagulantsko vlogo, saj ima ob aktivaciji sposobnost izražanja tkivnega faktorja (TF - CD142), prokoagulantskih lipidov, sproščanja mikroveziklov s prokoagulantskimi značilnostmi ter sproščanju von Willebrand faktorja (vWF). Poleg tega tudi negativno regulira nastajanje zaviralca koagulacije trombomodulina. Poleg prokoagulantske funkcije pa ima endotelij tudi pomembno antikoagulantsko funkcijo, saj v normalnih, zdravih okoliščinah na svoji površini izraža heparan sulfat in trombomodulin, ki inhibirata trombinsko aktivnost, njegove celice izločajo dušikov oksid (NO) in prostaciklin (Kottke-Marchant, 2010), s katerim preprečujejo agregacijo trombocitov ter inhibitor poti tkivnega faktorja (TAFI) (Lefkowitz, 2008). S sproščanjem tkivnega plazminogeneskega aktivatorja (tPA) sodeluje tudi pri fibrinolizi (Kottke-Marchant, 2010).

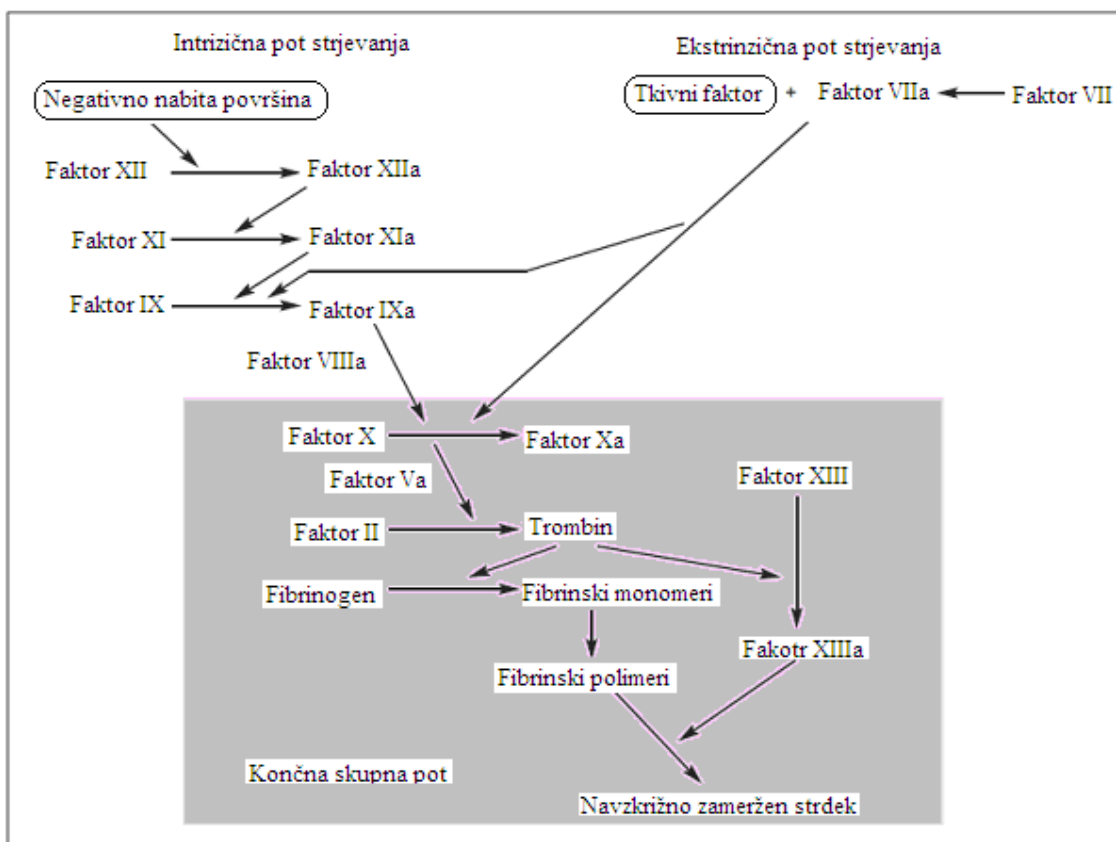
Trombociti imajo tako kot endotelijske celice dvojno vlogo v koagulaciji, delujejo lahko prokoagulantsko ali antikoagulantsko. Ob aktivaciji pride do izločanja vsebine granul, tako granul  $\alpha$  kot gostih granul ter nastanka/sekrecije mikroveziklov. Iz granul  $\alpha$  se sprostijo fibrinogen, vWF in faktor V, ki delujejo prokoagulantsko (Kottke-Marchant, 2010), iz gostih granul pa se sprostita adenozin difosfat (ADP), ki vpliva na agregacijo trombocitov in serotonin (Ogedegbe, 2002).

Normalno hemostazo v grobem delimo na primarno in sekundarno. Primarna hemostaza je odziv krvožilja in trombocitov na poškodbe manjših žil. Rezultat teh odzivov je nastanek prehodne in nestabilne oblike čepa, katerega sekundarna hemostaza v procesu koagulacije ojača in stabilizira, pri čemer nastane t.i. strdek, ki se v procesu fibrinolize v zadnji fazi zdravljenja razgradi.

Do sproženja primarne hemostaze pride ob poškodbi žile; krvožilni sistem se na poškodbo odzove s krčenjem mišičnega sloja v žili in z mobilizacijo trombocitov, krčenje žile zmanjša pretok krvi na mesto poškodbe in tako omeji morebitno izgubo krvi, hkrati s tem pride do vezave trombocitov na površino poškodbe. Pri tej vezavi glavno vlogo igra vWF, ki je prisoten na subendotelnem matriksu in receptor GPIIb/IX/V (CD42) na trombocitih,

kar pritrđi in aktivira trombocite (Ogedegbe, 2002; Lasne in sod., 2006). Z aktivacijo v trombocitu potečejo številni procesi. Pride do spremembe oblike trombocitov kar omogoči razširitev trombocitov po poškodbi, pride do izločanja vsebine  $\alpha$  in gostih granul, kar je signal za privabljanje (atrakcijo) novih trombocitov in ne nazadnje pride do brstenja mikroveziklov, ki imajo velik pomen v sekundarni hemostazi. Z rekrutacijo svežih aktiviranih trombocitov na mesto poškodbe pride do agregacije trombocitov na že obstoječ monosloj preko preceptorja GPIIb/IIIa in fibrinogena, ki tako tvorijo čep, hkrati pa poteče tudi trombocitna aktivacija koagulacije (Pierce in sod., 1999).

Koagulacija je kompleksen proces sekundarne hemostaze, v katerem se čep spremeni v stabilen fibrinski strdek. Pri tem sodelujejo številni koagulacijski faktorji katerih glavna vloga je tvorba trombina, ki nato cepi fibrinogen na monomere, ki se povežejo v fibrin, ta pa ojača in stabilizira strdek. Glede na mesto nahajanja reagentov in odvijanja dogodkov ločimo dve poti poteka koagulacije, intrinzično (notranjo) pot koagulacije, ki se sproži ob kontaktni aktivaciji in pri kateri vse komponente najdemo prosto v krvi ter ekstrinzično (zunanjo) pot koagulacije oz. od tkivnega faktorja odvisno pot, komponente katere so navadno izolirane od krvi in se izpostavijo šele ob aktivaciji (Pierce in sod., 1999).



Slika 1: Shema klasične ekstrinzične in intrinzične poti koagulacije.

Zaradi preglednosti so iz sheme izpuščeni  $Ca^{2+}$  ioni in fosfolipidi, dva ključna kofaktorja pri koagulaciji (slika povzeta iz Lefkowitz, 2008 ).

Procesu sekundarne hemostaze sledi fibrinoliza, fiziološki proces, v katerem se netopen strdek razgradi s hidrolizo na manjše fragmente, te pa v končni fazi fagocitni sistem spravi iz obtoka. Fibrinoliza poteka postopno in hkrati z zdravljenjem poškodbe.

Motnje v delovanju hemostatskega procesa so lahko življenjsko nevarne, saj zaradi njih prihaja do motenj v strjevanju krvi ali pa do nenadzorovanega strjevanja. Znanе so številne motnje: motnje v delovanju trombocitov, motnje v sintezi strjevalnih faktorjev, motnje, do katerih pride kot posledica bolezni oz. zdravljenja bolezni in nenazadnje motnje zaradi deformacij, ki nastanejo ob starostnih spremembah. Ločimo motnje v primarni hemostazi in motnje sekundarne hemostaze. Pri motnjah primarne hemostaze so najpogostejše nepravilnosti v delovanju trombocitov, pri čemer je najpogostejša trombocitopenija – upad števila trombocitov in motnje v delovanju vWF, zaradi česar pride do nastanka von Willebrandove bolezni. Poznamo še številne manj pogoste bolezni, do katerih pride zaradi nepravilnosti v membranskih receptorjih trombocitov (npr. okvara receptorja GPIb (CD42b), ki vodi do Bernard-Soulierjevega sindroma ali okvara receptorja GPIIb/IIIa, ki povzroči Glanzmanov sindrom).

V sekundarni hemostazi so najpogostejše motnje v strjevanju, do katerih pride zaradi napak v strjevalnih faktorjih oziroma fibrinogenu in trombotskih zapletih, ki nastanejo zaradi motenj v inhibiciji koagulacije (Pierce in sod., 1999).

Ena od motenj hemostaze, ki se pojavi kot posledica zdravljenja, je s heparinom povzročena trombocitopenija oz. HIT. Gre za kompleksno imunsko motnjo pri kateri se poleg trombocitopenije v določenih primerih pojavi tudi imunsko povzročena arterijska ali venska tromboza. Mehanizmi nastanka teh še niso znani a sklepajo, da pri njihovem razvoju ključno vlogo igrajo mikrovezikli (Warkentin in sod., 1994). Ti imajo številne prokoagulantne značilnosti, na svoji površini izražajo negativno nabite fosfolipide, predvsem fosfatidil serin (PS), na katere se vežejo aktivirani koagulacijski faktorji, pod določenimi pogoji lahko izražajo tkivni faktor (CD142), nosijo antigene, ki spodbudijo izražanje tkivnega faktorja na drugih celicah, npr. selektin P (CD62P) na monocitih (Van Wijk in sod., 2003) ali pa sodelujejo pri rekrutaciji celic na mesto nastanka tromba (Kottke-Marchant, 2010).

## 1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bilo analizirati plazemske mikrovezikle pri bolnikih s heparinom povzročeno trombocitopenijo. S pomočjo kvantifikacije in identifikacije izvora mikroveziklov v plazmi bolnikov smo želeli ugotoviti uporabnost identifikacije

mikroveziklov za diagnostiko HIT. V raziskavi smo analizirali razlike v celični aktivaciji oz. apoptozi krvnožilnega sistema bolnikov s HIT in zdravih osebkov.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Populacija plazemskih mikroveziklov pri bolnikih s HIT se od zdravih oseb razlikuje tako po izvoru kot po količini mikroveziklov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 S HEPARINOM POVZROČENA TROMBOCITOPENIJA

S heparinom povzročena trombocitopenija ali HIT je imunska motnja, ki se pojavi kot stranski učinek zdravljenja s heparinom. Prvič je bila opisana l. 1973, ko so Rhodes, Dixon in Silver dokazali, da protitelesa IgG v serumu pacientov z HIT povzročijo *in vitro* agregacijo trombocitov v prisotnosti terapevtskih koncentracij heparina (Warkentin, 2011).

Ločimo dva tipa HIT:

HIT tipa 1, ki je prehodne oblike, zanj je značilen manjši upad trombocitov (trombocitopenija) v 1. oziroma 2. dnevu zdravljenja s heparinom. Tovrstna trombocitopenija je prehodne oblike in izgine sama, kljub nadaljevanju zdravljenja s heparinom. Pojavi se pri 10-20 % bolnikov zdravljenih s heparinom (Brieger in sod., 1998).

HIT tipa 2 je imunskega izvora in pogosto lahko predstavlja resen zaplet zdravljenja s heparinom, ki se pojavi pri 3-5 % bolnikov, zdravljenih z nefracioniranim heparinom (UHF) (Warkentin in Heddle, 2003). Zanj je značilen močan upad števila trombocitov – za 50 % in več, ki se pojavi med 5. in 14. dnevom zdravljenja s heparinom (Greinacher in Warkentin, 2006).

#### 2.1.1 Patofiziologija s heparinom povzročene trombocitopenije

Do nastanka protiteles HIT pride, ko se trombocitni faktor 4 (PF4) veže s prostim heparinom v kompleks PF4/heparin. Pri tem pride do konformacijske spremembe v strukturi PF4, zaradi česar se odkrijejo vezavna mesta za protitelesa skupine imunoglobulinov G (IgG) (Sandset, 2012). Ta se preko Fab regije vežejo na kompleks heparina in PF4 in tvorijo t.i. anti-PF4/heparin protitelesa oz protitelesa HIT. Preko Fc regije protiteles se kompleks PF4/heparin/protitelesa veže na trombocitni receptor FcγIIa (CD32) (Arepally in Cines, 2002; Vitale in sod., 2001; Greinacher in sod., 2010). Ko se več PF4 molekul z vezanimi IgG protitelesi poravnava, se tvori velik imunski kompleks, ki navzkrižno veže receptorje FcγIIa na trombocitih. Vezava na receptor FcγIIa trombocitov povzroči aktivacijo trombocitov, njihovo pospešeno odstranjevanje, ki poteka večinoma v vranici s strani makrofagov in posledično nastanek trombocitopenije. Pri tem procesu nastajajo večje količine plazmatskih mikroveziklov trombocitnega izvora in prispevajo pri aktivaciji strjevalne kaskade (Maličev in sod. 2011). Hkrati se HIT protitelesa vežejo na endotelne celice, kar povzroči prokoagulantne spremembe na endoteliju mikrovaskularja.

Vendar pa HIT protitelesa niso specifična za kompleks heparin/PF4, pač pa se lahko vežejo na komplekse, kjer je faktor PF4 vezan na druge polisulfatne polisaharide. Tako so poleg aktivacije trombocitov sposobna tudi aktivacije monocitov in nevtrofilcev (Warkentin in Sheppard, 2006; Kowalska in sod., 2010). Ob aktivaciji monocitov in nevtrofilcev začno monociti izražati tkivni faktor in tvorijo se monocit-nevtrofilni agregati, ki prispevajo k protrombotski naravi HIT (Greinacher in sod., 2010).

Raziskave so pokazale, da IgG protitelesa t.i. HIT-IgG nastajajo pri številnih pacientih (od 10 do 20 %, v nekaterih primerih tudi do 70 %), ki so zdravljeni z heparinom, vendar pa jih le majhen odstotek (1-5 %) zboli za HIT (Greinacher in Warkentin, 2006). Ena od domnev je, da se trombociti pri posameznikih razlikujejo po vsebnosti PF4. Zato pri tistih pacientih z normalno ali manjšo koncentracijo PF4 v granulah  $\alpha$  opazimo šibko aktivacijo trombocitov in manjši izpust PF4 (Rauova in sod., 2009).

Na podlagi časovnega zaporedja dogodkov ločimo tri značilne profile HIT:

1. Tipični profil HIT je najpogostejši (pojavi se v kar 70 % primerov). Zanj je značilen upad trombocitov med 5. in 10. dnevom heparinske terapije. Ta zamuda sovpada s kratkim intervalom, ki ga heparin potrebuje za vzpodbuditev humoralnega imunskega odziva. Študije so pokazale, da je z nastankom protiteles antiPF4/heparin in razvojem HIT povezan značilen časovni potek imunskega odziva:

dan 0: pričetek zdravljenja s heparinom

dan 1-3: nastajanje protiteles HIT

dan 4: dosežena mediana (srednja) vrednost količin nastalih protiteles HIT. Njihov nastanek je hiter, pri tem ne nastaja skupina protiteles IgM → kar kaže na atipično, sekundarno imunsko reakcijo

dan 6: pričetek upada števila trombocitov

dan 8: upad trombocitov za 50 %

dan 50-80: ni več prisotnih HIT protiteles (Warkentin in Kelton, 2001)

2. Hitri profil HIT: se pojavi pri 20-30 % pacientov, zanj je značilen hiter upad števila trombocitov v roku 24 ur po prejetju heparina. Povezan je s predhodno občutljivostjo na heparin, ki je največkrat posledica predhodnega (v roku nekaj tednov) prejemanja heparina (Greinacher in sod., 2010).

3. Zakasneli HIT: pojavi se redko, nekaj dni po prenehanju zdravljenja s heparinom in je pogosto resen zaplet. Zanj je značilno visoka koncentracija trombocit aktivirajočih HIT protiteles, ki za svoje delovanje ne potrebujejo heparina (Warkentin, 2005).



#### 2.1.1.1 Trombocitni faktor 4 (PF4)

Trombocitni faktor 4 je bil prvič opisan leta 1955 kot trombocitni protein z anti-heparinsko aktivnostjo. Danes vemo, da je to ne-ELR-CXC kemokin, imenovan tudi CXCL4, velik 7,8 kDa, ki ga sestavlja 70 aminokislin. Sintetizira se v megakariocitih, kjer se veže na hondroitin sulfat (eden od glikozaminoglikanov - GAG) in shrani v trombocitne granule  $\alpha$ . Ob aktivaciji trombocitov pride do njihovega sproščanja v obliki 32 kDa velikih tetramerov, vezanih na dve molekuli hondroitin sulfat proteoglikana. Ker je molekula PF4 bogata z lizinom in argininom, se v tetramerni obliki tvori obroč s pozitivnim nabojem na površini. Zaradi tega se PF4 lahko veže na različne receptorje, na primer kemokinske receptore na endotelu, limfocitih T ali pa na linerarne negativno nabite molekule kot so glukozaminglikani (heparin in endotelijski glukozaminglikani) (Sandset, 2012). Koncentracije PF4 v plazmi so 2-10 ng/ml, v trombocitih pa 20  $\mu\text{g}/10^9$  trombocitov (Sandset, 2012). Ob povečani koncentraciji heparina se iz površine endoteliskih celic sprosti PF4 in koncentracije v plazmi se povečajo za 15-30-krat (Warkentin, 2003). Po aktivaciji trombocitov pa koncentracija PF4 v serumu naraste tudi za 1000-krat in znaša 0,4-2  $\mu\text{M}$  (Kowalska in sod., 2010).

V normalni hematostazi PF4 vpliva predvsem na antitrombin, pri čemer zmanjšuje njegov vpliv, sodeluje pri celjenju ran ter zmanjšuje vnetne reakcije na endoteliju (Maličev in sod., 2012). Pri nastanku protiteles HIT in razvoju HIT pa najpomembnejšo vlogo odigra prav afiniteta, s katero se molekula PF4 veže na različne glukozaminglikane. Tako se na hondroitin sulfat (CS), ki prevladuje na zunanji strani trombocitov, veže z najmanjšo afiniteto, kar je tudi razlog za nastanek kompleksov PF4/heparin. Po drugi strani pa imajo monocite in endotelne celice poleg CS na svoji površini prisotne tudi bolj kompleksne glukozaminglikane (npr. heparan sulfat in dermatan sulfat) na katere se PF4 veže z višjo afiniteto in zaradi česar so tako monociti kot epitelne celice pomemben kofaktor pri razvoju HIT (Kowalska in sod., 2010; Rauova in sod., 2009).

#### 2.1.1.2 Aktivacija trombocitov

Aktivacija trombocitov je proces, v katerem se neaktivni trombociti pod vplivom agonista (kolagen, trombin) ali fizičnega stimula spremeni v »lepljiv«, zvezdast delec, ki sprošča in izraža biološko aktivne substance ter ima sposobnost vezave plazemskega fibrinogena. Po aktivaciji se v trombocitu zgodijo številne spremembe. Pride do spremembe oblike, do dislokacije membranskih proteinov, eksocitoze vsebine granul (granul  $\alpha$  in gostih granul) ter formacije mikroveziklov (Heijnen in sod., 1999).

Iz granul  $\alpha$  se ob aktivaciji sprosti dodatni PF4, ki vstopa v nadaljnje reakcije z heparinom. Sprostijo se tudi številni proteini, ki aktivirajo koagulacijsko kaskado in sintezo trombina (Fabris in sod., 2000).

#### 2.1.1.3 Aktivacija endotelijskih celic

Presežek PF4 se veže na glikozaminoglikan endotelnih celic, natančneje na heparinu podoben heparan sulfat, kjer tvorijo nov imunski kompleks. Nanj se vežejo protitelesa iz skupin IgG in IgM, ta se hkrati vežejo preko Fab regij tudi na epiteljske celice, kjer povzročijo poškodbe le-tega. Na mestu poškodbe epitela pride do sinteze in ekspresije tkivnih faktorjev, ki še dodatno sprožijo agregacijo trombocitov, zaradi česar pride do nastanka strdkov, ki povzročijo trombozo (Warkentin, 2003).

#### 2.1.1.4 Aktivacija monocit

Tako kot endotelijske celice so tudi monocite sposobne sinteze tkivnega faktorja. Vezava monocite na PF4/heparin protitelesa sproži vnetni odziv, katerega spremlja sinteza in izpostavitve tkivnega faktorja na zunanjo membrano monocite. Sam pomen aktivacije monocit v poteku HIT še ni pojasnjen (Arepally in Mayer, 2001; Warkentin, 2003).

### 2.1.2 Epidemiologija s heparinom povzročene trombocitopenije

Pogostost pojavljanja HIT med različnimi študijami zelo variira. Razlogi za to so različni, v prvi vrsti je najpomembnejši način detekcije HIT, saj se specifičnost testov med seboj razlikuje.

Frekvenca nastajanja Heparin/PF4 protiteles in s tem obolevnost za HIT variira med različnimi načini zdravljenja. Dejavnike tveganja lahko razvrstimo v grobem v dve skupini: dejavnike tveganja, povezane s heparinom in od heparina neodvisne dejavnike. Med prve uvrščamo tip uporabljenega heparina, dozo heparina in trajanje zdravljenja. Od heparina neodvisni dejavniki tveganja pa so spol bolnika, sestava populacije bolnikov oz. tip poškodbe, obseg poškodbe in čas vnosa profilakse (pred ali po operaciji).

#### 2.1.2.1. Vpliv heparina na imunologijo s heparinom povzročene trombocitopenije

Raziskave so pokazale, da je pogostost pojavljanja HIT pri pacientih, zdravljenih z nefrakcioniranim heparinom, pripravljenim iz goveda oziroma svinj, večja kot pri pacientih, zdravljenih z nizko-molekularnim heparinom (Martel in sod., 2005). Nefrakcioniran heparin je heterogena mešanica razvejanih glukozaminglikanov, ki z vezavo na antitrombin neposredno vplivajo na inhibicijo (zaviranje) trombina in Xa faktor. Vendar pa ima le tretjina vsega nefrakcioniranega heparina antikoagulantsko aktivnost, saj

le manjši delež molekul vsebuje pentasaharid, ki ima protikoagulanstske sposobnosti. Nizko-molekularni heparin nastane s kemično ali encimatsko depolimerizacijo nefrakcioniranega heparina. Je polisulfatni glukozaminglikan, ki je za tretjino manjši od nefrakcioniranih heparinov, to vpliva tudi na njegovo zmanjšano aktivnost, saj v tako mali obliki ne more hkrati vezati antitrombina in trombina pa tudi pentasaharidne sekvence, odgovorne za aktivacijo antitrombina je manj. Kljub temu pa je nizko-molekularni heparin še vedno sposoben inaktivirati faktor Xa in preko njegove inhibicije delovati antikoagulantno. V primerjavi z nefrakcioniranim heparinom ima nizko-molekularni heparin znižano tudi sposobnost vezave makrofagov in endotelijskih celic, kar se kaže v skrajšani življenjski dobi, za kar 50 %. Prav tako ima znižano tudi sposobnost vezave na trombocite in PF4, kar bi lahko pojasnilo manjše število pojavljanja HIT pri bolnikih zdravljenih z nizko-molekularnim heparinom (Hirsh in Raschke, 2004).

#### 2.1.2.2 Sestava populacije bolnikov

Raziskave so pokazale, da je pogostost pojavljanja HIT protiteles največja pri bolnikih, zdravljenih z nefrakcioniranim heparinom. Pri ortopedskih bolnikih po operacijah, zdravljenih z nefrakcioniranim heparinom, je pojavnost HIT 3 %, pri ortopedskih bolnikih po operaciji, zdravljenih z nizko-molekularnim heparinom in medicinskih bolnikih, zdravljenih z nefrakcioniranim heparinom, je možnost za razvoj HIT manjša od 1 % in pri nosečnicah ter medicinskih bolnikih, zdravljenih z nizko-molekularnim heparinom, praktično ničelna. Prav tako so pri zdravljenju z nefrakcioniranim heparinom pri bolnikih po ortopedskih operacijah in bolnikih operiranih na srcu opazili, da kljub visokim razlikam koncentracije protiteles v prid srčnim bolnikom za HIT pogosteje zbole vajo ortopedski bolniki. Razlog za to bi se lahko skrival v raznolikih protivnetnih dejavnikih, ki nastajajo ob operaciji in ki bi lahko vplivali na nastanek patogenih protiteles pri tej populaciji bolnikov (Warkentin in sod., 2000).

#### 2.1.2.3 Doza

Pri zdravljenju ortopedskih bolnikov po operaciji in bolnikov, operiranih na srcu, obojih zdravljenimi z nefrakcioniranim heparinom, so opazili, da je koncentracija protiteles mnogo večja pri srčnih operirancih. Pojavnost protiteles je pri srčnih bolnikih od 40-70 % in 20 % pri ortopedskih bolnikih. Razlog za to razliko je, da so operiranci na srcu že pred in med samo operacijo prejeli visoke doze heparina, prav tako pa je bilo samo zdravljenje navadno kratkotrajnejše (Warkentin in sod., 2000).

#### 2.1.2.4 Spol

Tri različne študije so pokazale, da je pri ženskah možnost za razvoj HIT večja kot pri moških. Povišana frekvenca pojavljanja HIT pri ženskah je bila najbolj očitna pri bolnicah,

zdravljenih z nefrakcioniranim heparinom, medtem ko pri bolnicah, zdravljenih z nizko-molekularnim heparinom v primerjavi z moškimi ta razlika ni opazna. Razlogi za te razlike so lahko od spola odvisne razlike v imunskih odzivih, do katerih pride ob nastanku velikih multimolekularnih kompleksov nefrakcioniranega heparina in PF4, ali pa od spola odvisne razlike v patogenosti kompleksov (npr. sposobnosti aktivacije trombocitov). Vendar pa podatkov o od spola odvisni vezavi PF4 na trombocite ni, zato bodo potrebne dodatne študije za osvetlitev vpliva spola na tveganje za razvoj HIT (Warkentin in sod., 2006).

#### 2.1.2.5 Obseg poškodbe

Raziskava je pokazala, da imajo neodvisno od tipa uporabljenega heparina pacienti po večji operaciji večjo možnost za razvoj imunskega odziva na heparin/PF4 komplekse kot pacienti, ki so prestali manjšo operacijo. Vendar pa še ni znano ali je to posledica poškodbe in vnetja ali kakih drugih neposrednih povezav. Razlog za to so lahko povečane koncentracije imunskih kompleksov, ki nastanejo ob takih operacijah ali pa pride do sprememb v imunskem sistemu, ki povzročijo nastanek limfocitov B specifičnih za PF4 komplekse (Lubenow in sod., 2010).

### 2.1.3 Diagnosticiranje s heparinom povzročene trombocitopenije

Čeprav je hitro in zanesljivo diagnosticiranje HIT pomembno pri zdravljenju pacientov s tem obolenjem, je to pogosto težko, saj pride do trombocitopenije zaradi različnih vzrokov/obolenj. Pa tudi sama prisotnost HIT protiteles še ne pomeni razvoja HIT, saj kar 70 % pacientov, zdravljenih s heparinom, razvije protitelesa, le 5 % pa jih dejansko tudi zboli (Warkentin in Sheppard, 2006). Zato je pomembno, da HIT obravnavamo kot klinično-patološki sindrom, katerega simptomi so nespecifični. S tem omogočimo, da diagnostika temelji na pojavu enega ali več kliničnih znakov obolenja s HIT in detekciji patogenih protiteles, ki so sposobni aktivacije trombocitov, t.i. anti PF4/heparin IgG protiteles, v plazmi ali serumu pacientov (Warkentin, 1999; Denys, 2008).

#### 2.1.3.1 Simptomi s heparinom povzročene trombocitopenije

Najpogostejši in najočitnejši znak obolelosti s HIT je trombocitopenija. Pojavi se pri kar 90-95 % pacientov, obolelih z HIT, vendar pa je navadno zmerna. A je zaradi njene nespecifične narave, pojavi se kot posledica jemanja heparina, ki preprečuje strjevanje krvi, nespecifičen simptom. Za trombocitopenijo, ki se pojavi pri HIT, je značilen upad števila trombocitov za 50 % ali več v točno določenem časovnem obdobju. Vendar pa ta upad ni absoluten, temveč se nanaša primerjalno na začetno število trombocitov. Zato nam trombocitopenija lahko služi kot simptom le v povezavi z časom njenega pojava (5-10 dni po pričetku zdravljenja z heparinom) (Warkentin in Heddle, 2003).

Od drugih simptomov se pojavijo še kožne nekroze (pri kar 10-20 % pacientov) na mestu subkutanega injiciranja heparina, tromboze pri 20-40 % bolnikov (lahko je venska ali arterijska), pljučne embolije, venske gangrene in akutne arterijske zapore s prizadetostjo udov. Pri zdravljenju z nizko-molekularnim heparinom pa lahko pride do akutne sistemske reakcije, ki se pojavi 5 do 30 minut po njegovem vnosu in vključuje povišanje telesne temperature z mrzlico, povečan tlak, prsno bolečino in celo zastoj srca ter nevrološke težave (Warkentin, 2005; Warkentin in Heddle, 2003).

#### 2.1.3.2. Klinično ovrednotenje s heparinom povzročene trombocitopenije

Pri kliničnem ovrednotenju si pomagamo z Warkentinovim sistemom točkovanja oz 4T testom. Na podlagi tega testa lahko že iz klinične slike pacienta opredelimo ali sodi v skupino z nizkim, srednjim ali visokim tveganjem. Tako lahko ocenimo verjetnost za HIT še pred samim laboratorijskim testiranjem (Denys, 2008).

Pri 4T testu odgovorimo na 4 vprašanja, ki opišejo HIT:

- 1 Ali ima pacient trombocitopenijo?
- 2 Ali se čas upada trombocitov ujema z imunizacijo, sproženo s heparinom?
- 3 Ali ima pacient kakšno trombozo oz. posledico HIT ?
- 4 Ali obstaja kak drug očitni razlog za trombocitopenijo?

Odgovore na posamezno vprašanje ovrednotimo z 0, 1 ali 2 točkama in seštejemo točke, pri čemer imamo določen točkovnik, kjer nam izkupiček točk določi visoko, srednjo ali nizko možnost za razvoj HIT (Warkentin in Heddle, 2003).

#### 2.1.3.3 Laboratorijsko diagnosticiranje protiteles, ki nastanejo pri s heparinom povzročeni trombocitopeniji

Laboratorijska diagnostika je potrebna za nesporno potrditev ali zavrnitev diagnoze HIT. Poznani so številni laboratorijski testi, ki pa so različno zanesljivi in natančni. Zato za zanesljivo diagnosticiranje HIT najpogosteje uporabljamo kombinacijo več različnih testov. Do sedaj se je za najučinkovitejšo izkazala kombinacija serološkega in funkcionalnega testa.

##### 2.1.3.3.1. Serološki testi

Z njimi potrdimo prisotnost HIT protiteles, vendar so visoko občutljivi in nizko specifični (poleg aktivirajočih IgG protiteles zaznajo tudi neaktivirajoča IgG protitelesa in IgM ter IgA), zato te teste navadno izvajajo na začetku, ko obstaja srednje do visoka možnost HIT, saj so komercialno dostopni. Poznamo:

- ENCIMSKI IMUNSKI TEST S TRDNO ali TEKOČO FAZO (Solid/fluid phase ELISA)

## - AGLUTINACIJSKI TEST Z MIKRODELICI V GELU (Particle-gel immunassay)

### 2.1.3.3.2. Funkcionalni testi

Z njimi določamo sposobnost protiteles bolnika, da po vezavi na kompleks PF4/heparin aktivirajo in kasneje tudi agregirajo testne trombocite. Te preiskave so zahtevnejše, dolgotrajnejše in za svojo izvedbo potrebujejo sveže testne trombocite zdravih posameznikov. Rezultati, ki jih za njimi dobimo, pa so bolj specifični in jih zato navadno izvajamo v drugi fazi preiskav, oziroma, ko je prisotnost protiteles že potrjena. Poznamo:

- TEST SPROŠČANJA SERATONINA (Serotonin release Assay oz SRA)
- AGREGACIJSKI TEST HIPA (Heparin induced platelet aggregation oz HIPA)
- DOLOČANJE AKTIVACIJE TROMBOCITOV S PRETOČNO CITOMETRIJO (Maličev in sod., 2012)

## 2.2 MIKROPARTIKLI = MP

So heterogena skupina, s celično membrano obdanih fragmentov celic. Glede na nastanek ločimo tri različne tipe mikropartiklov. Apoptotična telesa, ki nastanejo z razpadom umirajočih celic, eksosomi, ki nastanejo z endosomalnim procesiranjem in odcepljanjem iz plazemske membrane, mikrovezikli (MV), ki nastanejo z vezikuliranjem/brstenjem plazmaleme. Vsak izmed tipov mikropartiklov ima svojo strukturo in funkcijo (Lee in sod., 2011).

### 2.2.1 Apoptotična telesa

Apoptotična telesa nastajajo v procesu programirane celične smrti oz. apoptoze. Za ta proces je značilno, da v zgodnjih fazah nastajajo mikrovezikli, na koncu pa celica razpade v apoptotska telesa.

Značilnost apoptotičnih teles:

- so relativno velika – 4  $\mu\text{m}$  v premeru
- vsebujejo genomsko DNA in intaktne organele
- njihov nastanek je časovno povezan, lahko pa tudi biološko sprožen
- vloga apoptotičnih teles je navadno povezana s ščitenjem okolice pred potencialno nevarnimi molekulami, cilj takih mikropartiklov so pogosto tkivni fagociti ali pa sosednje celice (Lee in sod., 2011).

### 2.2.2 Eksosomi

Eksosomi so homogena skupina specializiranih mikropartiklov endocitotskega izvora. Njihovo izvorno mesto so znotrajcelična multivezikularna telesa različnih celic. Izločajo se

preko eksocitoze, ko multivezikularno telo zapusti lizosomsko pot in se spoji z membrano (Pap in sod., 2009).

So 30-100nm veliki delci, bogati s holesterolom. Zanje je značilno izražanje tetraspaninskih molekul (predvsem CD63), ne vežejo Aneksina V (Ann-V), protrombina in faktorja X.

Predvidevajo, da imajo zelo specializirane funkcije, ki se razlikujejo glede na tip celice, iz katere izvirajo. Pripisujejo jim vse, od predstavljanja antigenov do sodelovanja pri prenosu informacije po aktivaciji trombocitov (Heijnen in sod., 1999). Lahko so tudi nosilci molekul histokompatibilnega kompleksa in s tem neposredno vpleteni v stimulacijo T celic in promocijo imunskega antitumornega odziva (Hugel in sod., 2005).

### **2.2.3 Mikrovezikli (tudi ekotosomi, mikropartikli)**

#### **2.2.3.1 Značilnosti mikroveziklov**

Plazemski mikrovezikli so bili prvič opisani leta 1967, ko je Wolf poročal o membranskih fragmentih trombocitov, ki se pojavijo v krvi ljudi. To je poimenoval trombocitni prah. Ta je vseboval vezikle v velikosti premera od 0,1 do 1  $\mu\text{m}$ , ki so spodbujali koagulacijo (Van Wijk in sod., 2003; Mause in Weber, 2010; Aatonen in sod., 2012).

Danes mikrovezikli veljajo za heterogeno skupino submikronskih celičnih mikropartiklov, ki se med seboj razlikujejo po celičnem izvoru, številu, velikosti, antigeni sestavi in funkcionalnih značilnostih. Sintetizirajo jih domala vse evkariotske celice (Mause in Weber, 2010), tudi celice žilja (Aatonen in sod., 2012) in rakaste celice (Lee in sod., 2011). Najdemo jih v vseh zunajceličnih tekočinah, tudi slini (Aatonen in sod., 2012) in pri vseh osebkih, tudi zdravih (Mause in Weber, 2010). So namreč normalna sestavina krvne plazme (5-50  $\mu\text{g/ml}$  plazme), pri čemer je v normalnih pogojih približno 80 % vseh mikroveziklov trombocitnega izvora, 10 % je endotelnega in 10 % je levkocitnega izvora (Ratajczak in sod., 2006). Vendar pa novejša raziskava kažejo, da mikrovezikli v periferni krvi zdravih ljudi ne nastajajo z aktivacijo trombocitov, kot pri bolnih osebkih, temveč prihajajo iz megakarionskih celic (Flaumenhaft, 2009). V primeru poškodb, vnetij, tromboz, celičnih aktivacij in rakastih obolenj se število mikroveziklov poveča, spremeni pa se tudi njihova sestava (Ratajczak in sod., 2006).

Veliki so od 100 do 1000 nm v premeru in imajo relativno kratko življenjsko dobo. Zanje je značilno, da nastanejo z zorenjem iz plazemske membrane v procesu vezikulacije, pri čemer na svoji zunanji strani membrane izražajo fosfatidilserin. Opazili so da nastajajo predvsem v tistih delih plazmaleme, kjer so koncentracije holesterola povišane, prav tako

pa je povišana koncentracija signalnih kompleksov, imenovanih lipidni rafti (Lee in sod., 2011).

#### 2.2.3.2 Nastanek mikroveziklov

Mikrovezikli nastajajo med številnimi biološkimi procesi. Njihov nastanek opazimo pri celični aktivaciji z različnimi stimulansi, pri fizični stimulaciji (ang. »high shear stress«), pri celični diferenciaciji, med staranjem (senescenco) celic, apoptozo (Mause in Weber, 2010; Lee in sod., 2011; Aatonen in sod., 2012; Ratajczak in sod., 2006) ter pri onkogenih transformacijah (Lee in sod., 2011).

Mikrovezikli nastajo z zorenjem iz citoplazme. Ta proces je bil najboljše raziskan pri trombocitih, vendar med različnimi tipi celic prihaja do variacij v poteku zorenja. Vsem so enake tri osnovne faze: I. aktivacija celice, II. povečanje koncentracije znotrajceličnega  $Ca^{2+}$  in III. reorganizacija citoskeleta.

Do aktivacije celice pride, ko se agonist veže na specifično receptorsko mesto. Teh agonistov in njihovih receptorskih mest ima vsaka celica več, npr. pri trombocitih so to trombin, kolagen, kalcijev ionofor, monociti in endotelne celice pa aktivirajo bakterijski lipopolisaharidi, citokini, ... (Van Wijk in sod., 2003).

Aktivaciji sledi vdor in povišanje koncentracije  $Ca^{2+}$  na mestu, kjer bo potekalo brstenje. Povišana koncentracija  $Ca^{2+}$  povzroči inhibicijo flipaze (ne vrača več fosfatidil serina v notranji sloj membrane) in stimulacijo flopaz in skramblaz, kar privede do porušnja neenakomerne simetrije dvosloja (Hugel in sod., 2005). Ob tem se na zunanji strani membrane izpostavi PS in na tem delu se začnejo koncentrirati fosfolipidni rafti in velike količine holesterola (Lee in sod., 2011).

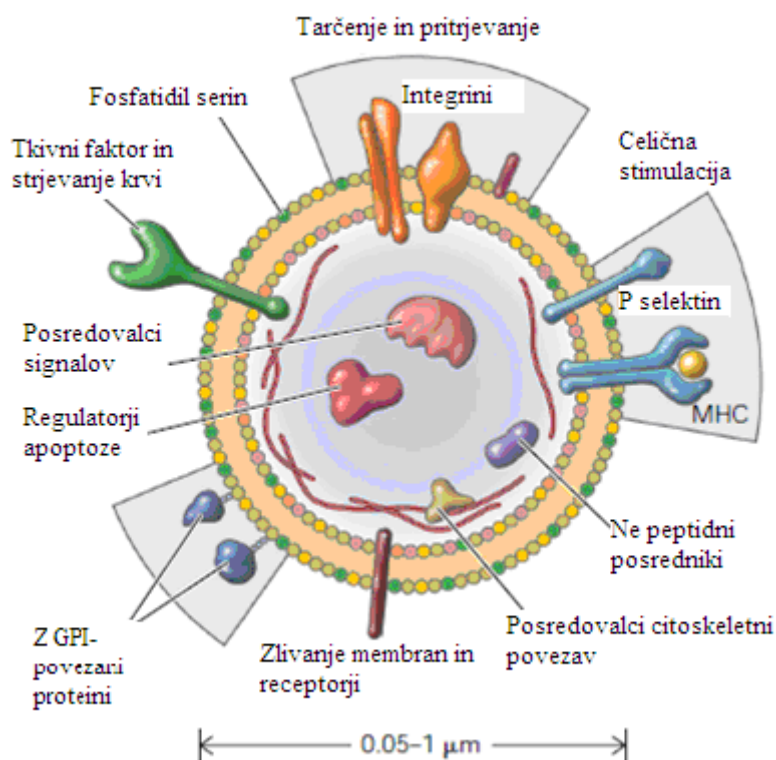
V zadnji fazi pride do reorganizacije citoskeleta. Tudi tu igra pomembno vlogo povišana koncentracija  $Ca^{2+}$ . Ta namreč poskrbi za aktivacijo citosolnih proteaz kot npr. trombocitna kalpain, ki razgradi talinsko povezavo med citoskeletom in membrano in tako omogoči nastanek vezikla. V zadnji fazi se veže fibrinogen in aktiviran glikoprotein IIB-IIIa kompleks, kar omogoči sprostitvev mikroveziklov (Van Wijk in sod., 2003).

#### 2.2.3.3. Zgradba mikroveziklov

Mikrovezikli so fragmenti starševskih celic in vsebujejo del starševske citoplazme, ki ga omejuje fosfolipidni dvosloj. Ker so vsi deli mikrovezikla izvorno iz starševske celice, imajo tako na svoji površini kot v svoji notranjosti številne starševske lastnosti. Na njihovi



površini najdemo številne bioaktivne substance, transmembranske proteine, membranske receptorje in adhezijske molekule, ki omogočajo komunikacijo in specifično interakcijo z različnimi tarčnimi celicami (Morel in sod., 2011; Pap in sod., 2009). V citoplazmi so našli prisotne številne citokine, kemokine, encime, rastne dejavnike in signalne proteine ter pri nekaterih tipih mikroveziklov tudi funkcionalno mRNA in mikro RNA (Mause in Weber, 2010). Nekatere raziskave so pokazale, da lahko nosijo tudi infektivne delce – HIV, prione ter celo organele (npr. mitohondrije) (Ratajczak in sod., 2006). Vendar pa mikrovezikli niso le pomanjšana verzija starševski celic. V primerjavi s starševsko celico so lahko, odvisno od agonista in celice izvora, obogateni s specifičnimi komponentami, kar kasneje vpliva na njihovo povečano aktivnost. Tako so npr. trombocitni mikrovezikli 50-100-krat bolj prokoagulantsko aktivni kot aktivirani trombociti (Mause in Weber, 2010).



Slika 2: Shema celičnega mikrovezikla.

Celični mikrovezikel nastaja z vezikuliranjem plazemske membrane stimuliranih celic. Vsebuje membrano in nosi citoplazmatske proteine ter bioaktivne lipide, ki sodelujejo pri številnih procesih. Prav tako vsebujejo številne komponente celične membrane, npr. komponente poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC), glikozil-fosfatidil-inozitol (GPI) (slika iz Hugel in sod., 2005).

### 2.2.3.3.1 Lipidi

Mikrovezikli so, tako kot celice, obdani z fosfolipidnim dvoslojem. Vendar pa se sestava in orientacija lipidov v dvosloju mikroveziklov razlikuje od celične. Ob nastajanju mikroveziklov je asimetričnost fosfolipidnega dvosloja celične membrane porušena. To se

odraža v izpostavitvi negativno nabitih fosfolipidov (PS in fosfatidil etanolamina) na zunanjo stran dvosloja mikroveziklov (Van Wijk in sod., 2003; Morel in sod., 2011; Pap in sod., 2009).

O razliki med lipidnima sestavama mikroveziklov zdravih in bolnih osebkov zaenkrat še ni znanega veliko, poročajo pa, da je lipidna sestava prvih sledeča: fosfatidilholin (približno 60 %), fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ter sfingomielin (Van Wijk in sod., 2003).

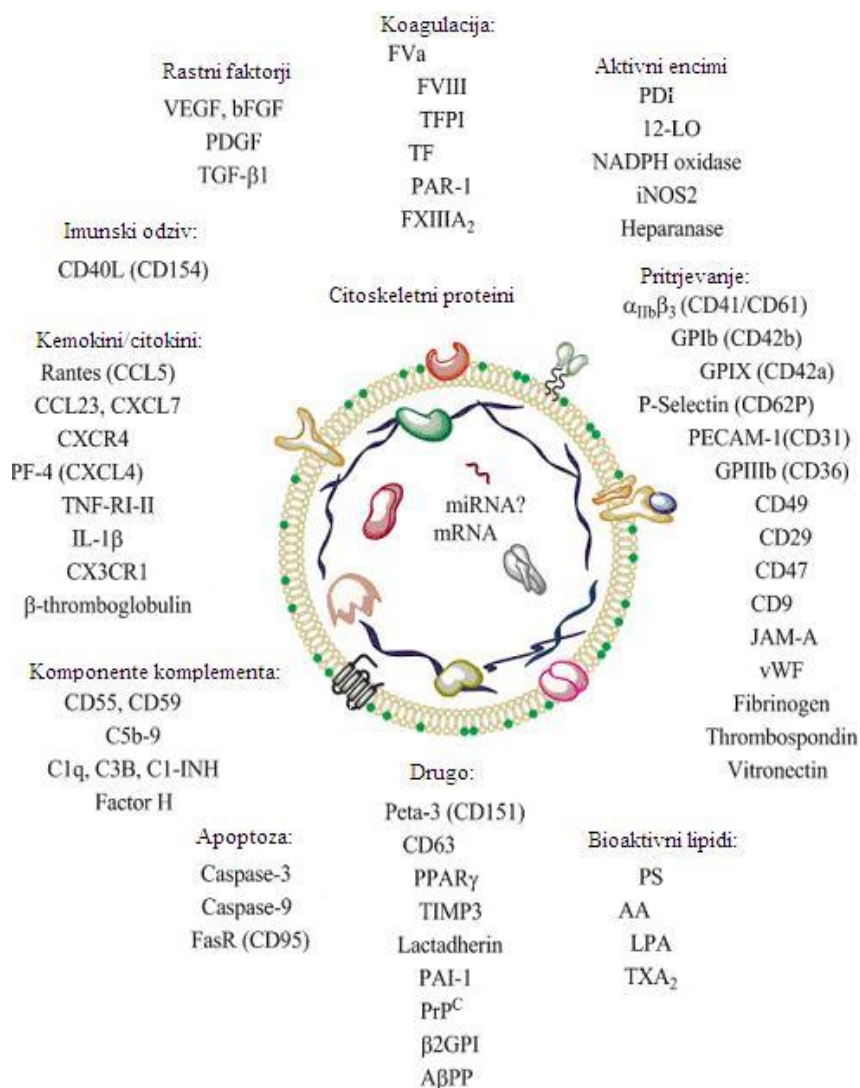
#### 2.2.3.3.2 Proteini

Mikrovezikli, ne glede na pot, po kateri nastajajo, nosijo enake membranske antigene kot celice, iz katerih izhajajo. Tako mikrovezikli, ki izvirajo iz endotelnih celic na svoji površini izražajo selektin E, mikrovezikli trombocitnega izvora pa selektin P in glikoprotein 53 (oba iz intracelularnih membranskih granul) (Van Wijk in sod., 2003), mikrovezikli iz B limfocitov in dendritskih celic izražajo molekule histokompatibilnega kompleksa MHC-I in II. Pogosti so tudi raznovrstni transmembranski proteini, ki so po predvidevanjih vpleteni v številne funkcije mikroveziklov (Pap in sod., 2009).

#### 2.2.3.4. Pomen in funkcija mikroveziklov

Čeprav so sprva veljali za inertne celične delce, je danes znano, da mikrovezikli sodelujejo pri medcelični komunikaciji neposredno s prenosom signalov in informacij med celicami v neposredni bližini ter med različnimi tkivi. V njej lahko sodelujejo na različne načine:

1. Lahko stimulirajo, aktivirajo ali zavirajo celice preko površinskih membranskih molekul, pri čemer delujejo kot signalni kompleks
2. prenašajo membranske receptorje iz ene na drugo celico
3. dostavljajo proteine, mRNA, bioaktivne lipide v tarčne celice
4. služijo za prenos infektivnih delcev (HIV, prioni)
5. prenašajo celične organele (mitohondrije) (Ratajczak in sod., 2006)



Slika 3: Primer molekulskega tovora trombocitnega mikrovezikla.

Molekule, ki so prisotne v membrani, so grobo razdeljene glede na funkcije, ki jih imajo v različnih fizioloških in patoloških vlogah v trombocitnem mikroveziklu. Vendar pa imajo lahko, v primeru drugačnih tarč ali okolju delovanja, navedene molekule v posamezni kategoriji tudi druge funkcije (slika iz Aatonen in sod., 2012).

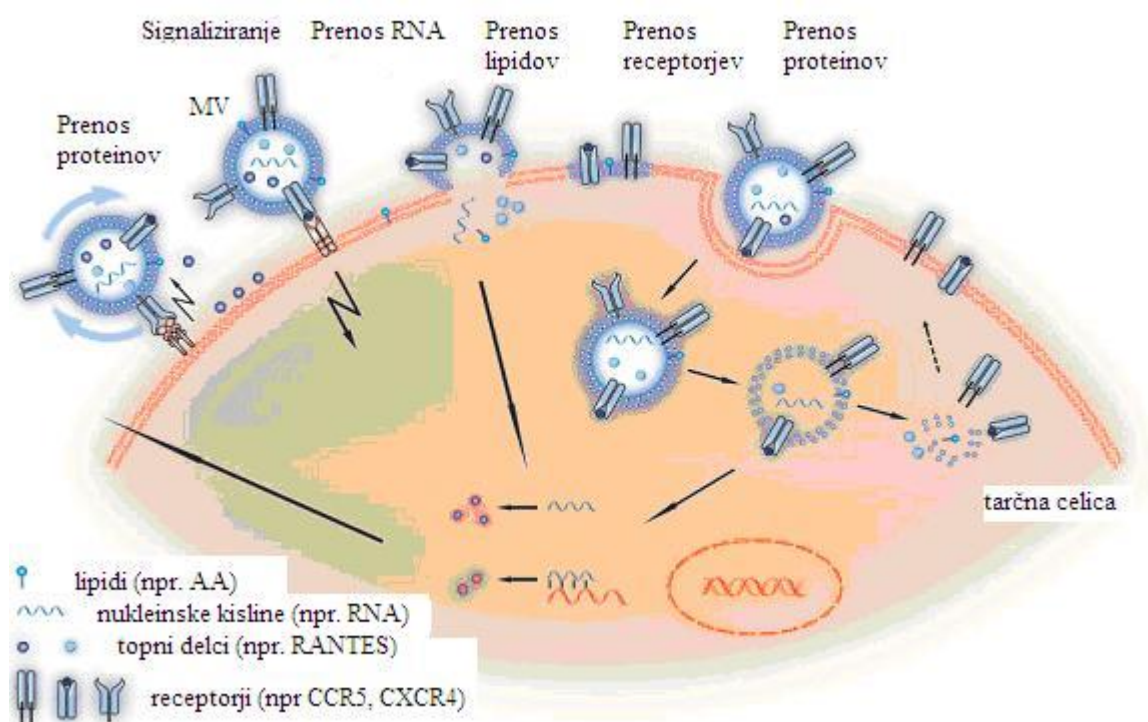
Mikrovezikli igrajo pomembno vlogo pri homeostazi in koagulaciji (Van Wijk in sod., 2003; Pap in sod., 2009), vnetjih in infekcijah (Owens in Mackman, 2011; Van Wijk in sod., 2003; Pap in sod., 2009), angiogenezi (fiziološki proces rasti novih krvnih žil iz že obstoječih žil), krvožilnih obolenjih (tromboza) (Owens in Mackman, 2011), avtoimunskih boleznih in še mnogih drugih procesih in boleznih (Pap in sod., 2009).

Nam pa lahko služijo kot diagnostično orodje pri prepoznavanju bolezni (vnetja, malignost tumorjev, trombocitotski zapleti) ter kot morebitno tarčno orodje pri zdravljenju teh

bolezni, bodisi s preprečevanjem njihovega delovanja na zdrave celice, bodisi z blokado njihovega nastanka, bodisi kot način dostavljanja zdravil tarčno v obolele celice (Ratajczak in sod., 2006).

#### 2.2.3.4.1 Mikrovezikularni prenos signalov

V osnovi ločimo dva mehanizma, s katerimi mikrovezikel prenaša signale. Pri prvem mikrovezikel vpliva na celične značilnosti in njene odzive z aktivacijo receptorjev na tarčni celici preko lastnih membranskih bioaktivnih molekul. V drugem primeru pa mikrovezikel vpliva na komunikacijo z neposrednim prenosom dela svoje vsebine oz. komponent (lipidi, proteini ali RNA) v tarčno celico, kar se lahko kaže v celični aktivaciji, fenotipskih modifikacijah ali reprogramaciji celičnih funkcij (Mause in Weber, 2010).



Slika 4: Nabor različnih sestavin in poti, ki jih mikrovezikli uporabljajo pri medceličnem prenosu informacij in signalov.

Topne molekule (npr. RANTES) so lahko dostavljene v tarčno celico preko prehodnih ali močnih stikov, membransko vezane molekule pa lahko sprožijo specifičen odziv v tarčni celici. Prenos membranskih komponent (npr. lipid arahidonska kislina (AA)), kemokinskih receptorjev (npr. CXCR4 in CCR5) ter citosolnih in nukleinskih kislin (npr. mRNA in miRNA) se zgodi ali s spajanjem membrane mikrovezikla s tarčno celico ali z endocitozo mikrovezikla v tarčno celico. Pri tem lahko nekatere komponente zajetih mikroveziklov povzročijo reprogramiranje tarčne celice (npr. PPAR $\gamma$  ali miR-126), medtem ko so membranske komponente mikroveziklov delno reciklirane in nato izražene na površini tarčnih celic. (Povzeto po Mause in Weber, 2010)

### 2.2.3.5 Metode za preučevanje mikroveziklov

Z analizo mikroveziklov so se mnogi raziskovalci spopadli na različne načine, vendar sta se uveljavili predvsem dve metodi, testiranje s pretočno citometrijo in imunskoencimski testi, predvsem v obliki »solid -phase« testa, pri čemer je najpogosteje uporabljena metoda prav pretočni citometer.

#### 2.2.3.5.1 Metoda proučevanja mikroveziklov z encimsko-imunskim testom s trdno fazo ang. »solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)«

Encimsko-imunski test ima v primerjavi s pretočno citometrijo določene prednosti predvsem, ko je velikost mikroveziklov v mejnih vrednostih ali celo pod sposobnostjo zaznave citometra ter v primerih, ko je antigen zelo šibko izražen. V takih primerih imajo ELISA testi večjo specifičnost kot pretočna citometrija.

Pri tem testu imamo na nosilcu (plastični mikrotiterski plošči) vezana monoklonska protitelesa proti antigenu (npr. anti-CD31 za endotelijske mikrovezikle, anti-GPIb za trombocitne mikrovezikle, Ann-V za prokoagulantske mikrovezikle). V vdolbinice vnesemo vzorec, ki smo mu predhodno odstranili vse krvne celice (PPP - platelet poor plasma) in inkubiramo. V tem času se mikrovezikli vežejo na protitelesa v steni nosilca. Inkubaciji sledi spiranje nosilca, odstranjevanje nevezanih mikroveziklov in merjenje števila vezanih mikroveziklov (Zwicker in sod., 2012). Količino vezanih mikroveziklov lahko posredno merimo s protrombinaznim testom (Zwicker in sod., 2012; Hugel in sod., 2006; Aupeix in sod., 1997), peroksidaznim testom (Nomura in sod., 2006) ali z uporabo europijevega kelata (Michelsen in sod., 2006).

#### 2.2.3.5.2 Metoda proučevanja s pretočnim citometrom

Ta metoda omogoča analiziranje velikega števila mikroveziklov in hkrati omogoča tudi raziskovanje drugih informacij o mikroveziklih. S pomočjo stranskega detektorja sipanja (ang. »Side scatter« oz. SSC) in prednjega detektorja (ang. »Forward scatter« oz. FSC) lahko sklepamo na velikost in obliko mikroveziklov. Z uporabo fluorescentno označenih monoklonskih protiteles pa lahko sklepamo na njihove funkcionalne značilnosti. Če pri tem uporabimo še polietilenska zrnca z znano koncentracijo, lahko izračunamo tudi številčnost mikroveziklov (Gelderman in Simak, 2008).

### 2.2.3.6 Mikrovezikli glede na celico izvora

Če si pri proučevanju mikroveziklov pomagamo z monoklonskimi protitelesi, lahko mikrovezikle ločimo glede na njihovo izvorno celico. Tako so do zdaj opazovali in raziskovali:

#### 2.2.3.6.1 Mikrovezikli trombocitnega izvora (PMP)

So bili najprej odkriti in so do danes najbolj raziskana skupina mikroveziklov. Njihovo prisotnost so dokazali pri številnih trombocitskih zapletih in vnetnih reakcijah, npr. pri idiopatski trombocitopenični purpuri (ITP), trombotični trombocitopenični purpuri (TTP), HIT, multipli sklerozi (MS), lupusu antikoagulant (Jy in sod., 2005). Natančna vloga, ki jo imajo pri razvoju bolezni, še ni znana. Do danes so dokazali, da sodelujejo pri prokoagulaciji, pri kateri služijo kot površina za vezavo in sestavo strjevalnih dejavnikov (Ratajczak in sod., 2006; Mause in Weber, 2010), antikoagulaciji (Heijnen in sod., 1999), aktivaciji endotelijskih celic, monocit in levkocit, spodbudijo izločanje citokinov in tkivnega faktorja, spodbujajo kemotakso ter zavirajo apoptozo. Pomembni pa naj bi bili tudi pri tumorski rasti in metastaziraju (Ratajczak in sod., 2006).

Nastanejo ob aktivaciji trombocitov z različnimi agonisti (npr. Ca ionofori A23187, trombinom, kolagenom, SFLLRN-om) ali pa brez agonista v primeru fizičnega dražljaja. Ob aktivaciji se v trombocitih zgodijo številne spremembe. Pride do spremembe oblike celice, translokaciji transmembranskih glikoproteinov, eksocitoze vsebine granul, formacije mikroveziklov (Heijnen in sod., 1999).

Kot vsi mikrovezikli imajo tudi vezikli trombocitnega izvora na svoji zunanji strani plazmeleme izpostavljen fosfatidil serin. Na njih so našli tudi številne trombocitne glikoproteine - GPIb, integrinske verige  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in  $\beta$ 1, ter selektin P. Vsebujejo tudi bioaktivne lipide (sfingozin1-fosfat (s1P)) ter arahidonsko kislino (AA) (Ratajczak in sod., 2006).

Na podlagi teh značilnosti za njihovo identifikacijo najpogosteje uporabljamo sledeče označevalce: glikoprotein  $\alpha$ II $\beta$  (CD41a), glikoprotein IX (CD42a), glikoprotein Ib (CD42b), selektin P (CD62P), lahko pa tudi druge markerje npr. trombospondin Paf ali posamezne komponente komplemента (Jy in sod., 2005).

#### 2.2.3.6.2 Mikrovezikli endotelnega izvora (EMP)

Njihovo raziskovanje se je razmahnilo šele v zadnjih letih, zato enotne metodologije glede njihovega raziskovanja in dokazovanja še ni. Nastanejo ob aktivaciji endotelijskih celic ali ob poškodbah endotelija, pri čemer naj bi odražali endotelijsko aktivnost in sprožili spremembe v funkciji endotelija.

Spremljajo številna patološka stanja, za katera so značilne disfunkcije endotelija, opazili so jih pri arteriosklerozi, sepsi, diabetes mellitusu (Lynch in Ludlam, 2007), lupusu anticoagulant, multipli sklerozi in akutnem koronarnem sindromu (Jy in sod., 2005). Za njihovo določevanje uporabljamo različne markerje, značilne za endotelijske celice,

najpogosteje so to PECAM 1 (CD31) - pri čemer ne sme hkrati izražati tudi trombocitnega antigena CD42, Integrin  $\alpha$ V (CD51), selektin E (CD62E), endoglim (CD105), VE-catherin (CD 144) in MUC18 (CD146) (Shet, 2008, Gelderman in Simak, 2008).

#### 2.2.3.6.3 Mikrovezikli levkocitnega izvora

So najmanj raziskani mikrovezikli, saj šele danes ugotavljajo njihov pomen pri zaznavanju bolezenske aktivnosti. Predvidevajo, da imajo, tako kot levkociti, pomembno vlogo pri vnetjih, regulaciji imunskih odzivov in trombozi. Do sedaj so jih odkrili pri preeklampsiji, sepsi, antifosfolipidnem sindromu, bolezni srpastih celic, venski trombozi in travmi (Jy in sod., 2005). Za njihovo identifikacijo lahko uporabljamo splošni antigen, prisoten na levkocitih, CD45, ali pa različna protitelesa, specifična za določeno podskupino levkocitov. Za monocitne mikrovezikle najpogosteje uporabljamo CD14, za nevtrofilne mikrovezikle karcinoembrioničen antigen - soroden celični adhezijski molekuli 8 oz. CEACAM 8 (CD66b) in za limfocitne mikrovezikle CD4 in CD8 (Shet, 2008, Gelderman in Simak, 2008).

#### 2.2.3.6.4 Mikrovezikli eritrocitnega izvora

Obstoj mikroveziklov eritrocitnega izvora so dokazali že sredi 70. let (Horstman in Ahn, 1999). Danes vemo, da so prisotni pri hemolizi in anemiji srpastih celic, dokazujemo jih s protitelesom za glikoforin A (CD235a), ki je izražen zgolj na membrani eritrocitov (Shet , 2008, Gelderman in Simak, 2008).

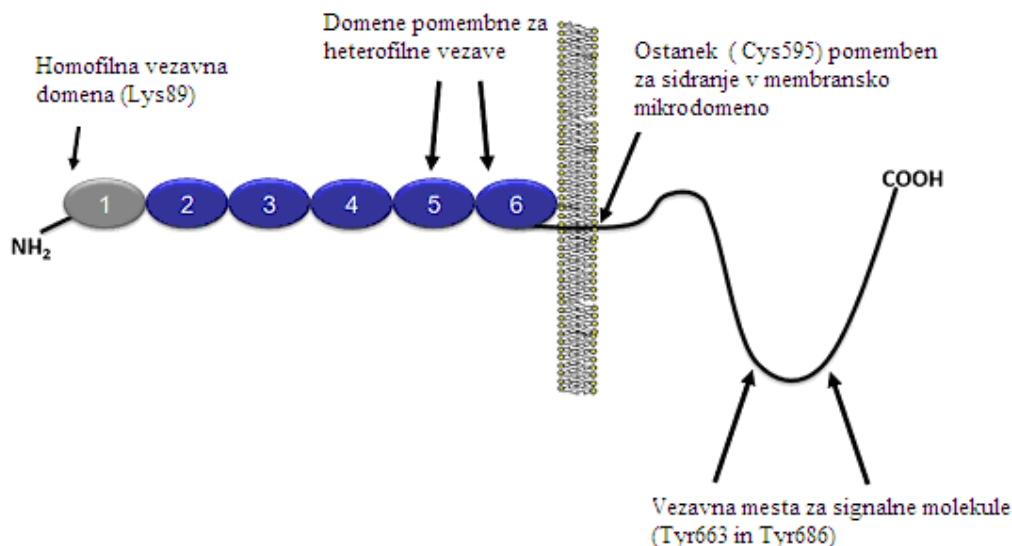
### 2.3 ANTIGENI, KI SMO JIH PROUČEVALI

#### 2.3.1 Antigen CD31 oz. PECAM 1

Je adhezijska molekula, ki jo najdemo na trombocitih, monocitih, nevtrofilcih in endotelijskih celicah krvožilja. Gre za 130 kDa velik transmembranski protein, ki sodeluje pri levkocit-eritrocitni interakciji, transendotelijskih migracijah levkocitov, celičnem pritrjevanju, angiogenezi, celjenju ran in celo pri vnetjih, kjer ima lahko pro- ali antivnetno vlogo (Falati in sod., 2006). Vpleten je v levkocitno migracijo, regulacijo integrinov, modulacijo T- in B-limfocitnega signaliziranja, B-limfocitni razvoj, apoptozo in celo v zaščito pri endotoksinskem šoku (Newman in Newman, 2003).

Sestavljen je iz zunajcelične regije, ki jo tvori šest IgG podobnih homolognih domen, transmembranske domene, ki jo tvori 19 aminokislinskih ostankov in citoplazemski rep iz 118 aminokislinskih ostankov (Newman in Newman, 2003). Citoplazemski rep vsebuje imunoreceptorni trizozinski inhibitorni motiv (ITIM), ki je odgovoren za značilnosti molekule. Zaradi ITIM motiva sodi med inhibitorne receptorje.

Molekula PECAM-1 ima v svoji strukturi več vezavnih mest, ki določajo ali bo vezava homofilna ali heterofilna. Pri homologni vezavi naprimer interakcije PECAM-1/PECAM-1 poteče vezava preko prve IgG domene, pri heterofilnih vezavah pa preko pete ali šeste IgG domene. (Cicmil in sod., 2002, Privratsky in sod., 2010).



Slika 5: Struktura in funkcija PECAM-1 molekule (povzeto po Privratsky in sod., 2010).

### 2.3.2. Antigen CD42a (GPIX) in CD42b (GPIb) ki tvorijo kompleks GPIb-IX-V

Kompleks GPIb-IX-V sestavljajo štiri v membrano segajoče polipeptidne verige. Polipeptida GPIb $\alpha$  in GPIb $\beta$  se z disulfidno vezjo povežeta v GPIb (CD42b) podenoto, na katero se nato z nekovalentno vezavo, v stehiometričnem razmerju 2:2:1, povežeta še GPIX (CD42a) in GPV. Na plazemski membrani najdemo povprečno 25.000 kopij GPIb/IX kompleksa (Vanhoorelbeke in sod., 2007). Glavna funkcija kompleksa je vezava na vWF na epitelu. Za to vezavo je značilno, da je šibka in služi zgolj kot upočasnitev trombocita v pogojih visokih strižnih sil, s čimer omogoči nastanek močnejših vezav (npr. vezavo GP-V na vezavo na kolagen) (Plow in Kelly, 2010).

Antigen CD42a oz. glikoprotein IX

Je 25 kDa velika proteinska molekula (Plow in Kelly, 2010), ki jo najdemo na površini trombocitov in megakariocit. Skupaj z glikoproteinom Ib in glikoproteinom V tvori kompleks, ki služi kot receptor za vWF, pri čemer je skupaj z GPIb $\beta$  podenoto odgovorna za sidranje in vezavo kompleksa na trombocitno membrano (Hickey in sod., 1989).



#### Antigen CD42b oz. glikoprotein Ib

Je površinski membranski glikoprotein, ki ga sestavljata z disulfidno vezjo povezani  $\alpha$  in  $\beta$  podenoti. 135 kDa velika GPIb $\alpha$  podenota je odgovorna za vezavo VWF in trombina, medtem ko je GPIb $\beta$  podenota skupaj z GPIX potrebna za vezavo in sidranje kompleksa na trombocitno površino (Plow in Kelly, 2010; Rivera in sod., 2001). Ob poškodbi epitelijskega tkiva se vWF veže na trombocit in s tem sproži pritrjevanje trombocitov na žilni subepitelij, hkrati pa tudi signalizira povečano aktivacijo trombocitov, trombozo in homeostazo (Hickey in sod., 1989).

#### 2.3.3 Antigen CD62P oz. selektin P

Je adhezivna molekula, ki jo najdemo na aktiviranih trombocitih in endotelijskih celicah, gre za 140 kDa velik glikoprotein, ki se v mirujočem stanju endotelijskih celic in trombocitov nahaja v granulah  $\alpha$  trombocitov in Weibel-Palade telesih endotelijskih celic in se izpostavi ob njihovi aktivaciji (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6403>). Njegova vloga je predvsem posredovanje levkocitno-trombocitnega stika in rekrutacije levkocitov pri razvoju trombov (Massaguer in sod., 2003).

#### 2.3.4 Antigen CD41 in CD61 oz. receptor GPIIb/GPIIIa

Receptor GPIIb/IIIa je heterodimerna integrinska molekula, ki jo najdemo na aktiviranih trombocitih. Pomembno vlogo igra v homeostazi, kjer sodeluje pri pritrjevanju in agregaciji trombocitov (Lefkovits in sod., 1995).

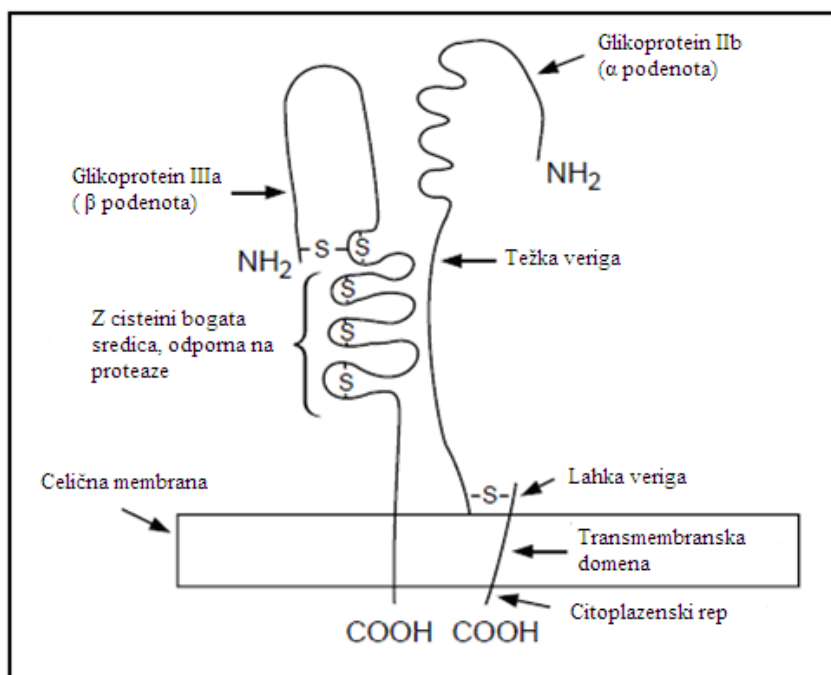
Je eden izmed najštevilčnejših membranskih receptorjev na trombocitu, saj je na enem povprečno med 40.000 in 80.000 kopij. Gre za receptor, na katerega se lahko vežejo fibrinogen in vWF ter fibronektin in vitronektin. Zaradi svojih vezavnih sposobnosti velja za enega najpomembnejših regulatorjev trombocitne agregacije (Quinn, 2005; Lefkovits in sod., 1995). Sestavljata ga  $\alpha_{Ib}$  podenota oz. CD41 in  $\beta_3$  podenota oz. CD61, ki sta med seboj nekovalentno povezani, za njuno vezavo pa je pomemben  $Ca^{2+}$  (Lefkovits in sod., 1995).

#### CD41 oz. $\alpha_{Ib}$ podenota

Skupaj s CD61 tvori integrinsko molekulo GPIIb/IIIa. Je 136kD velik, od  $Ca^{2+}$  odvisen, nekovalentni heterodimer, ki ga sestavljata težka in lahka veriga, med seboj povezani z disulfidno vezjo (Kahng in sod., 2008; Quinn, 2005). Lahko verigo sestavlja kratek citoplazmatski rep, transmembranska regija in kratka zunajcelična domena. Težka veriga pa je izključno zunajcelična. Med vsemi poznanimi  $\beta$  integrinskimi podenotami se  $\alpha_{Ib}$  podenota povezuje izključno z  $\beta_3$  integrinom (Lefkovits in sod., 1995).

CD61 oz.  $\beta_3$  podenota

$\beta$  podenota glikoproteina GPIIb/IIIa je 92 kD velik enojni polipeptid (Lefkovits in sod., 1995). Ločimo citoplazmatsko, transmembransko in veliko, zunajcelično domeno, za katero je značilno veliko število disulfidnih vezi, kar 28. Te so pomembne za vzdrževanje terciarne strukture GPIIb/IIIa integrina in s tem neposredno vplivajo na aktivacijo receptorja in agregacijo trombocitov (Quinn, 2005).



Slika 6: Shema trombotičnega receptorja GPIIb/IIIa.

NH<sub>2</sub> je aminska skupina, COOH karboksilna in S slufidna skupina. (slika iz Lefkovits in sod., 1995)

### 2.3.5 Antigen CD142 oz. tkivni faktor

Je 47 kDa velik transmembranski protein, ki ga najdemo na celicah epitela, makrofagih in monocitih ter nekaterih tumorskih celicah (Panes in sod., 2007; Butenas in sod., 2005). Sestavljen je iz treh glavnih podenot: zunajcelične amino domene, kamor se veže faktor VII, membranske in citoplazmatske domene, ki naj bi sodelovala pri prenosu signalov (Butenas in sod., 2005). Imenujemo ga tudi koagulacijski faktor III, saj sodeluje pri koagulaciji kot receptor za koagulacijski faktor VII/VIIa (Chu, 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2152>).

Najpomembnejši vir tkivnega faktorja so monociti. Vendar pa pri normalnih homeostatskih pogojih ni izpostavljen krvnemu pretoku in do njegovega izražanja na površini celic pride šele pod vplivom vnetnih citokinov ali bakterijskih toksinov. V ekspresijo tkivnega faktorja na monocitih so vpleteni trombociti. Ob aktivaciji trombocitov pride do ekspresije

selektina P na površini trombocita, ta nato posreduje interakcijo med trombocitom in monocitom, s tem povzroči aktivacijo monocita ali pa v njih sproži *de novo* sintezo tkivnega faktorja (Lösche in sod., 2004).

### 2.3.6 Aneksin V

Aneksin V (Ann-V) je 35,7 kDa velik protein, ki se pod vplivom  $\text{Ca}^{2+}$  veže na negativno nabite fosfolipide, kar s pridom izkoriščamo za dokazovanje mikroveziklov, ki vsebujejo fosfatidilserin. Ima značilno aneksinsko terciarno strukturo, ki jo sestavljajo štiri v krogu razporejene domene (van Genderen in sod., 2008).

Najdemo ga intracelularno, v citosolu celic ter jedru (Tzima in Walker, 2000) in zunajcelično, vezanega na membrane ali prosto v krvi. V kri se izloči iz celic žilne stene (tako epitelnih celic kot celic gladkih mišic) ali sekretornih celic vranice in jeter, ko pa je enkrat v plazmi se veže na krvne celice (trombocite, eritrocite) ali na endotelijske celice.

Funkcija Ann-V še ni natančno raziskana. Pri poskusih *in vivo* so opazili sposobnost inhibicije protrombinaze in Tensa-kompleksa, preko katerih neposredno vpliva na pritrjevanje strdkov in zmanjšuje obseg agregacije. Značilna je tudi njegova močna antikoagulantska aktivnost, saj z vezavo na fosfatidil serin deluje kot antitrombotski ščit in preprečuje vezavo koagulantov faktorjev. To njegovo značilnost s pridom uporabljamo pri proučevanju celične aktivacije in apoptoze, pri katerih pride do izpostavitve fosfatidil serina na zunanji strani membrane (Shojaie in sod., 2009).

### 3 MATERIALI IN METODE

Raziskavo smo izvajali na sveži krvi bolnikov s HIT. Zbiranje vzorcev je koordiniral vodja Kliničnega oddelka za žilne bolezni, prof. dr. Aleš Blinc, dr. med. Vsak bolnik je ob darovanju krvi podpisal soglasje za darovanje krvi v znanstvene namene. Vsa dokumentacija je shranjena v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, na Kliničnem oddelku za žilne bolezni, Interna klinika.

#### 3.1 ODVZEM KRVI

Vsakemu bolniku smo odvzeli tri epruvete krvi. Kri je bila odvzeta v plastične epruvete s Citratom (9NC 0,129 M ali 0,105 M). Prvo epruveto smo zavrgli in uporabili le kri iz druge in tretje epruvete.

#### 3.2 IZOLACIJA MIKROVEZIKLOV

Mikrovezikle smo izolirali v roku dveh ur, vendar po vsaj 30 minutah od odvzema krvi. Celoten postopek izolacije mikroveziklov je potekal pri sobni temperaturi.

V prvem koraku smo kri centrifugirali 15 min pri 2.500 g. Po tem smo previdno odpipetirali plazmo v svežo mikrocentrifugirko.

V drugem koraku smo plazmo centrifugirali 2 minuti pri 16.000 g in dobili plazmo brez trombocitov (PFP). Supernatant smo previdno odpipetirali v svežo mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirke smo nato zamrznili na -80 °C in tako shranili PFP, bogato z mikrovezikli.

#### 3.3 OZNAČEVANJE MIKROVEZIKLOV

Vzorci smo odtajali pri sobni temperaturi in pred nadaljno uporabo premešali za 5 sekund na vibracijskem stresalniku.

##### 3.3.1 Priprava vzorca za proučevanje števila in koncentracije mikroveziklov

250 µL PFP vzorca smo dodali 225 µL PBS citrata, premešali na vibracijskem stresalniku in centrifugirali 30 minut pri 16.000 g. Previdno smo odstranili 225 µL supernatanta - mikrovezikli se nahajajo v usedlini. V vzorec smo dodali 50 µL PBS citrata in premešali na vibracijskem stresalniku.

V epruveto za analizo s pretočnim citometrom smo odmerili 40  $\mu\text{L}$  vzorca, ki smo mu primešali 40  $\mu\text{L}$  polietilenskih kroglic za štetje (Flow-Count Fluorospheres beads) in 120  $\mu\text{L}$  PBS citrata. Tako pripravljen vzorec je bil primeren za obelavo na pretočnem citometru.

### **3.3.2 Priprava vzorca in označevanje mikroveziklov z Aneksinom- V (APC)**

250  $\mu\text{L}$  PFP vzorca smo dodali 225  $\mu\text{L}$  PBS citrata, premešali na vibracijskem stresalniku in centrifugirali 30 minut pri 16.000 g na sobni temperaturi. Previdno smo odstranili 225  $\mu\text{L}$  supernatanta - mikrovezikli se nahajajo v usedlini. Vzorcju mikroveziklov v usedlini smo nato dodali 50  $\mu\text{L}$  HEPES+CaCl pufra, premešali na vibracijskem stresalniku ter inkubirali 15 minut na sobni temperaturi.

V svežo epruveto smo prenesli 40  $\mu\text{L}$  vzorca in 5  $\mu\text{L}$  Ann-V, premešali in inkubirali 15 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo dodali še 110  $\mu\text{L}$  HEPES pufra, premešali in centrifugirali 30 minut pri 16.000 g. Po končanem centrifugiranju smo odstranili 110  $\mu\text{L}$  supernatanta in vzorcju dodali 40  $\mu\text{L}$  polietilenskih kroglic za štetje (Flow-Count Fluorospheres beads) in 120  $\mu\text{L}$  HEPES pufra. Vsebino smo prestavili v epruveto za merjenje s pretočnim citometrom in sledilo je merjenje vzorca s pretočnim citometrom.

### **3.3.3 Priprava vzorca in označevanje mikroveziklov z monoklonskimi protitelesi**

V mikrocenrifugirke smo pipetirali 700  $\mu\text{L}$  vzorca in ga centrifugirali 30 minut pri 16.000 g na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo previdno odstranili 600  $\mu\text{L}$  supernatanta. Preostalemu vzorcju smo dodali 100  $\mu\text{L}$  PBS citrata in ga premešali 30 sekund na vibracijskem stresalniku.

Po 30  $\mu\text{L}$  vzorca z mikrovezikli smo razdelili v 5 mikrotiterskih epruvet. V vsako mikrotitersko epruveto smo nato dodali še 100  $\mu\text{L}$  HEPES+CaCl z mišjim serumom, premešali in inkubirali 15 min na sobni temperaturi.

V vsako mikrotitersko epruveto smo dodali po 10  $\mu\text{L}$  monoklonskih protiteles in 5  $\mu\text{L}$  Ann-V:

- v prvo smo dodali monoklonska protitelesa CD41a, konjugirana s fikoeritrinom (PE) proizvajalca (BD Pharmingen), CD61 s fluorescin izotiocianatom (FITC) (BD Pharmingen) in Ann-V z alufikocianinom (APC) (BD Pharmingen)

- v drugo CD31 FITC (BD Pharmingen), CD42a PE (BD Pharmingen), Ann-V APC (BD Pharmingen)

- v tretjo CD41a PE (BD Pharmingen), CD62P FITC (BD Pharmingen), Ann-V APC (BD Pharmingen)
- v četrto CD42b PE (BD Pharmingen), Ann-V APC (BD Pharmingen)
- v peto CD142 PE (BD Pharmingen), Ann-V APC (BD Pharmingen)

Posamezne mikrotiterske epruvete smo premešali na vibracijskem stresalniku in inkubirali 15 minut v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo sprali nevezan Ann-V in protitelesa tako, da smo v vsako mikrotitersko epruveto dodali 110  $\mu$ L HEPES pufru in centrifugirali 30 min pri sobni temperaturi na 16.000 g. Po centrifugiranju smo odstranili 200 $\mu$ L supernatanta in vzorce resuspendirali v 100  $\mu$ L HEPES pufru. Tako pripravljen vzorec smo izmerili na pretočnem citometru.

### 3.4 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM

#### 3.4.1 Princip delovanja pretočnega citometra

Pretočni citometer je naprava, ki meri in analizira fizične karakteristike delcev (celic ali mikroveziklov), ki tečejo v tankem curku skozi žarek svetlobe. Pri prehodu delca skozi svetlobo se ta od njega odbije, lomi ali absorbira na fluorokromih in nato v obliki fluorescence odda. S pomočjo teh podatkov, kako in koliko svetlobe se odbije, lomi in katere so valovne dolžine oddane svetlobe v obliki fluorescence, lahko merimo velikost delca, njegovo zrnatost oz. notranjo kompleksnost ter njegove fenotipske lastnosti.

Pretočni citometer sestavljajo trije ključni deli: pretočni sistem, optični sistem in elektronski sistem.

Pretočni sistem ima nalogo prenosa delcev v tankem curku do laserja. Pri tem je pomembno, da so curek in delci v njem neposredno osvetljeni z laserjem ter da se delci preko laserskega žarka pretakajo ločeno. To dosežemo s hidrodinamičnim fokusiranjem, postopkom, pri katerem vzorec vbrizgavamo skozi tekočo izotonično tekočino, ki naš vzorec razredči, delce v njem pospeši in hkrati tudi umeri natančno skozi laserski žarek.

Optični sistem sestavljajo vir svetlobe oziroma laser, ki delce osvetli ter optični filtri, ki usmerijo svetlobne signale na za njih ustrezne detektorje.

Elektronski sistem pa sestavljajo različni detektorji, ki zaznavajo in prevajajo svetlobne signale v različne napetosti ter računalnik z ustreznim programom, ki nam te podatke obdela in grafično prikaže.

Pri proučevanju standardnega vzorca opazimo vsaj dve obliki razpršene svetlobe. Jakost prepuščane svetlobe, ki jo zazna FSC fotodetektor, ki se nahaja v neposredni liniji laserskega žarka, je obratnosorazmerna velikosti delca. Del svetlobe, ki jo delec zaradi svoje zrnatosti oz. površinske zgradbe razprši, pa zazna SSC detektor, ki se nahaja pravokotno na smer vpadne svetlobe. Bolj ko so delci zrnati, več svetlobe sipajo, zato je signal, ki ga zaznamo, močnejši (Kotnik in sod., 2010). Porazdelitev posameznih mikroveziklov v suspenziji, razporejenih glede na velikost in zrnatost, je prikazana s točkovnim diagramom (slika 7).

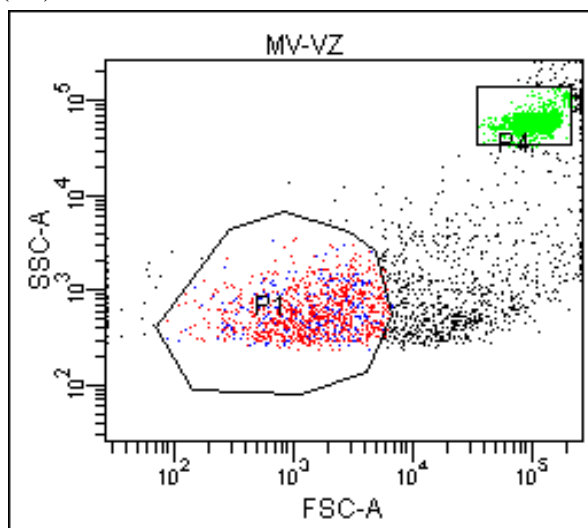
Če smo vzorec predhodno označili z monoklonskimi protitelesi, konjugiranimi s fluorescentnim barvilom, se pri prehodu vzorca skozi laserski žarek del svetlobe absorbira in oddano svetlobo lahko merimo še z detektorji, opremljenimi z barvnimi filtri. Fluorescenčna barvila ob obsevanju s svetlobo določene valovne dolžine del njene energije absorbirajo in preidejo v vzbujeno stanje. Po kratkem času se delec - elektron v snovi vrne nazaj v osnovno energetska raven in pri tem odda absorbirano energijo v obliki svetlobe, ki jo imenujemo fluorescenca. Če torej uporabimo s fluorescentno označena protitelesa in se ta vežejo na določeno molekulo preiskovanega delca, bodo ob prehodu skozi laser oddajala fluorescenco, ki jo zazna ustrezen detektor.

Pri preiskovanju delcev s pretočnim citometrom je pomembno, da poznamo njegove omejitve. Najpomembnejša omejitev je velikost delcev, ki jih lahko proučujemo, ta se giblje med 0,05 in 150  $\mu\text{m}$ . Glede na vrsto laserja oz. valovne dolžine svetlobe, ki jo oddaja, je pomembna tudi izbira fluorokromov, ki jih uporabimo. Navadno imajo pretočni citometri argonske ionske laserje, ki oddajajo svetlobo valovne dolžine 488nm. Ta valovna dolžina ima sposobnost vzdraženja večih fluorokromov. Vendar moramo pri uporabi večjega števila s fluorescentno označenih protiteles biti pozorni na njihovo izbiro. Pomembno je torej, da je njihovo ekscitacijsko območje v valovni dolžini svetlobe, ki jo oddaja laser in pa, da se vrhovi oddane svetlobe-fluorescence ne prekrivajo oz. si niso preblizu. Tako najpogosteje uporabljamo FITC in PE označena monoklonska protitelesa. FITC oz. fluorescein isotiocianat ima absorpcijski maksimum blizu 488 nm, emisijski maksimum pa pri 530 nm, PE oz. fikoeritrin ima sicer absorpcijski maksimum pri drugih valovnih dolžinah, je pa 488 nm ustrezna valovna dolžina, da sproži vsaj nekaj fluorescence, ki ima svoj maksimum oddane svetlobe pri 570 nm. (Introduction to flow cytometry, 2000). Uporabili pa smo tudi HeNe laser, ki oddaja svetlobo valovne dolžine 635 nm. Ta nam služi za spodbujanje APC, ki je označeval Ann-V. APC ima emisijski maksimum pri 660 nm.

### 3.4.2 Analiza vzorcev

Imeli smo dve testni skupini. Prvo so predstavljali bolniki oboleli s HIT, drugo pa zdravi osebki. V vsakem vzorcu smo določili število MV s pomočjo kroglic za štetje - Flow-Count Fluorospheres (Becman Culter), velikost kroglic je 10  $\mu\text{m}$ . Poleg tega smo določili tudi število MV, ki so Ann-V pozitivni, ter deleže MV, ki so bili pozitivni na CD31 FITC, CD42a PE, CD41a PE, CD61 FITC, CD42b PE, CD62P PE in CD142 PE (BD Biosciences).

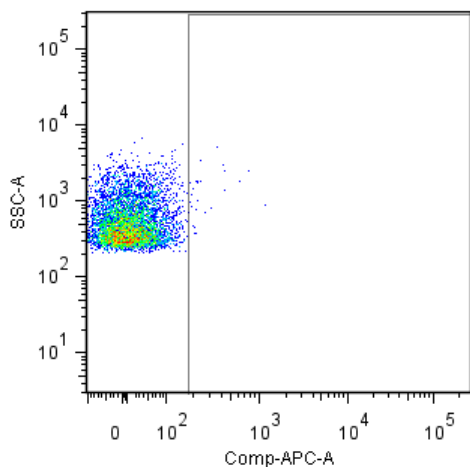
V prvi fazi smo proučevali število mikroveziklov. Pri tem smo na Y-osi imeli izraženo zrnatost celice (SSC-A, ki je odraz lastnosti membranske strukture celic), na X-osi pa velikost celice. Diagram (slika 7), ki nam ga je pri tem izrisal računalnik, je imel izraženi dve populaciji - in sicer bolj ali manj homogeno populacijo mikroveziklov (P1) in populacijo polietilenskih kroglic (P4).



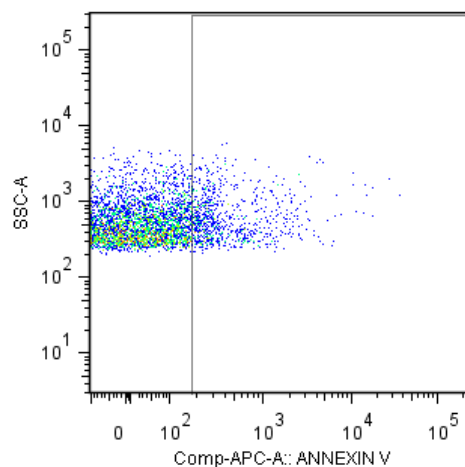
Slika 7: Primer točkovnega diagrama populacije mikroveziklov (P1)

V primeru aneksinskega štetja s kombinacijo kroglic za štetje smo dobili diagram, kjer smo prav tako opazili dve populaciji – mikrovezikle in polietilenske kroglice. V naslednjem koraku smo ločili populacijo mikroveziklov na Ann-V pozitivne in Ann-V negativne mikrovezikle (slika 9).



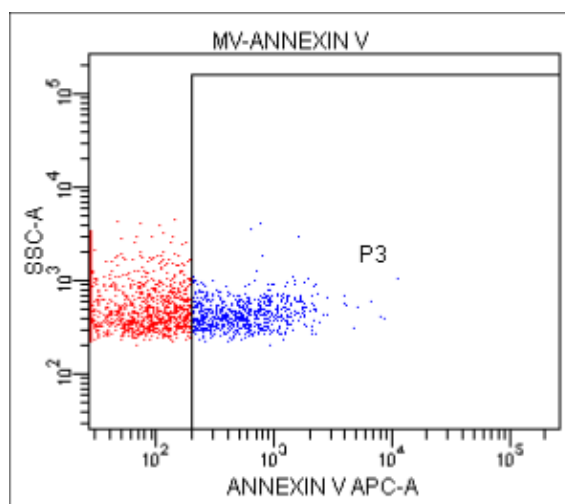


Slika 8: Za določitev meje med Ann-V pozitivnimi in negativnimi MV smo uporabljali negativno kontrolo, kjer smo MV označili z Ann-V v odsotnosti Ca<sup>2+</sup> ionov.

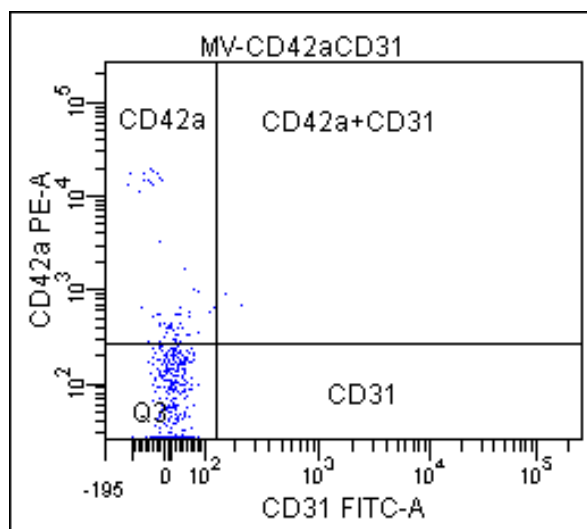


Slika 9: Diagram razčlenbe populacije mikroveziklov na Ann-V pozitivne .

Ko smo opazovali antigenske lastnosti mikroveziklov, smo najprej dobili klasičen diagram populacije mikroveziklov (slika 7), v katerem smo nato omejili Ann-V pozitivne MV (slika 10) in jih s pomočjo monoklonskih protiteles, označenih z fluorokromi, ločili glede na izražanje določenih markerjev (slika 11).



Slika 10: Diagram populacije Ann-V pozitivnih mikroveziklov (P3)



Slika 11: Diagram populacije P3 (Ann-V pozitivni mikrovezikli) glede na njihovo izražanje CD42a in CD31.

Podatke, ki smo jih dobili s pomočjo pretočnega citometra, smo vnesli v tabelo, izračunali povprečne vrednosti za posamezni parameter ( % in svetilnost), pri štetju mikroveziklov pa tudi njihovo koncentracijo.

Za izračun koncentracije smo uporabili enačbo:

$$c(MV/plazma) = R \times (N(MV)/N(FS)) \times (V(FS)/V(MV)) \times c(FS) \quad \dots(1)$$

pri čemer je:

R faktor redčenja

$$R = V \text{ plazme izoliranih mikroveziklov} / \text{končni } V \text{ resuspendiranih mikroveziklov} \quad \dots(2)$$

N(MV) število mikroveziklov, ki jih izmeri pretočni citometer,

N(FS) število fluorosfer, ki jih izmeri pretočni citometer, V(MV) prostornina vzorca resuspendiranih mikroveziklov, ki smo jih uporabili za analizo na pretočnem citometru,

V(FS) prostornina dodanih fluorosfer za merjenje na pretočnem citometru,

c(FS) originalna koncentracija fluorosfer.

S pomočjo student-t testa smo poiskali statistično značilne razlike v izražanju CD 31/CD42a, CD41a/CD61, CD42b, CD142 in CD62-P med proučevanima skupinama (zdravi in bolniki s HIT). Pri tem smo uporabili neodvisni Studentov t-test, s katerim smo izračunali vrednost p, ki predstavlja stopnjo tveganja. Za mejno stopnjo tveganja smo vzeli vrednost 0,05, kar pomeni da je razlika med zdravimi in bolnimi za posamezni parameter značilna, če je vrednost p manjša od 0,05.

S pomočjo programa Statistična analiza IBM SPSS Statistics 20. verzija smo izvedli še analizo parametrov, ki so statistično različni ( $p < 0,05$ ).

Za konec smo s pomočjo programa Excel izrisali še grafe dobljenih rezultatov, ki so predstavljeni v poglavju Rezultati.

#### 4 REZULTATI

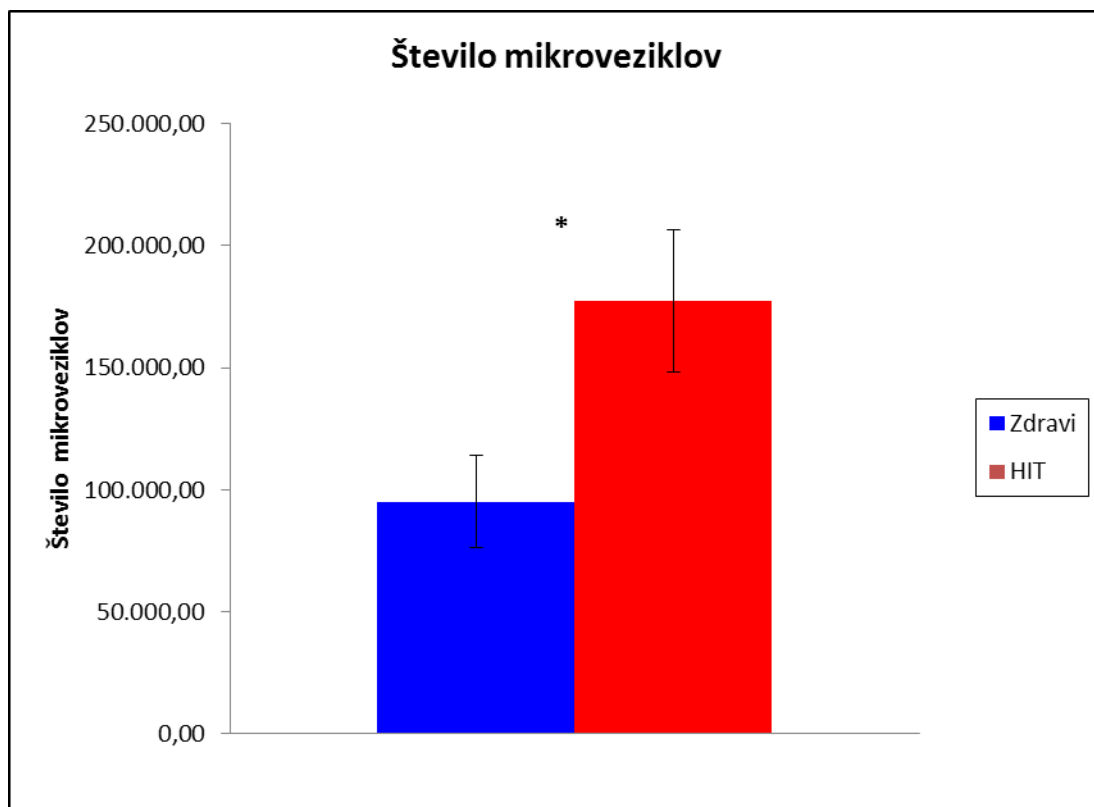
V diplomski nalogi sem s pretočnim citometrom analizirala plazemske mikrovezikle, izolirane iz krvi bolnikov s heparinom povzročeno trombocitopenijo (HIT) in njihove koncentracije ter svetilnost primerjala s kontrolno skupino zdravih oseb (zdravi).

Pri preučevanju mikroveziklov smo poleg velikosti (100 do 1.000 nm) za identifikacijo mikroveziklov uporabili še vezavo Ann-V, ki je značilno prisoten na mikroveziklih.

Za proučevanje izvora mikroveziklov smo suspenziji dveh skupin mikroveziklov (HIT in zdravih) označili z Ann-V in različnimi monoklonskimi protitelesi (PECAM 1 - CD31, glikoprotein  $\alpha$ IIb - CD41a, glikoprotein IX - CD42a, glikoprotein Ib - CD42b, glikoprotein  $\beta$ 3 - CD 61, selektin P- CD62P in tkivni faktor - CD142) in nato na pretočnem citometru odčitali število izmerjenih mikroveziklov in odstotek mikroveziklov, na katera so se vezala monoklonska protitelesa, označena s fluorokromi. Odstotek vezanih protiteles je sorazmeren z odstotkom mikroveziklov, ki izražajo antigen, saj se protitelo veže le na en antigen. V primeru izražanja določenega antigena lahko z zanesljivostjo potrdimo izvorno celico mikrovezikla.

#### 4.1 ŠTEVILO IN KONCENTRACIJA MIKROVEZIKLOV

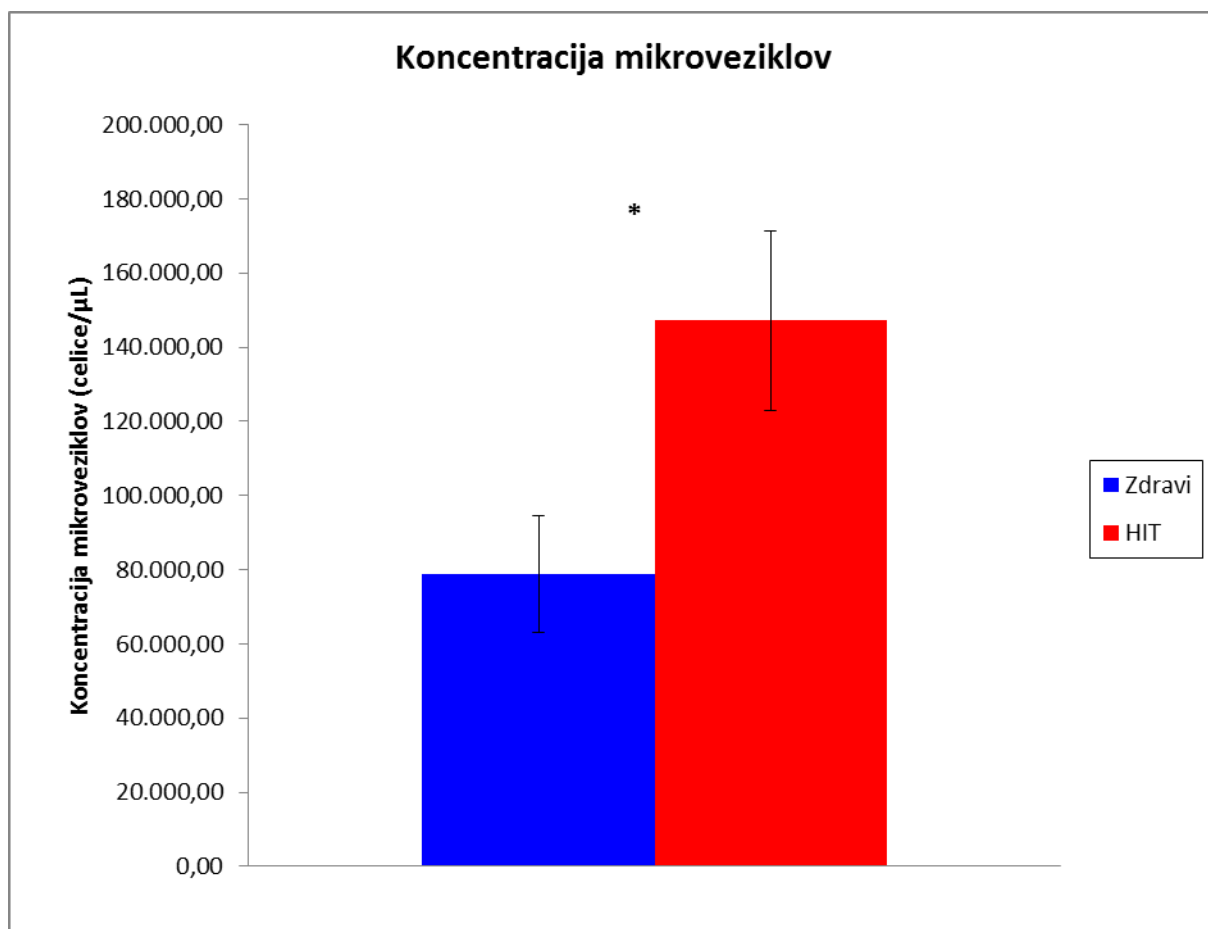
S pomočjo pretočnega citometra smo izmerili število mikroveziklov pri zdravih osebkih in HIT bolnikih. Iz rezultatov je razvidno, da je število mikroveziklov pri bolnikih s HIT povečano, povprečna vrednost znaša 117.370, v primerjavi z številom mikroveziklov pri zdravih osebkih, kjer je ta vrednost manjša in znaša le 95.176 mikroveziklov (glej slika 12). Na podlagi student-t testa se ta razlika izkaže kot statistično značilna razlika med populacijama mikroveziklov ( $p=0,02$ ).



Slika 12: Število mikroveziklov

Slika prikazuje število mikroveziklov pri kontrolni populaciji zdravih osebkov in HIT bolnikih. Prikazano je povprečno število mikroveziklov in standardna napaka (SE). Vzorec je pri tem obsegal kri 13 HIT bolnikov in 15 zdravih osebkov.

Iz števila mikroveziklov smo nato s pomočjo enačbe za koncentracijo (enačba 1) izračunali koncentracijo mikroveziklov. Ta je prav tako povečana pri HIT bolnikih v primerjavi z zdravimi posamezniki (slika 13). Razlika med koncentracijama mikroveziklov pri HIT bolnikih in zdravih osebkih, ki smo jo dobili, je statistično značilna za različne populacije mikroveziklov ( $p=0,02$ ).

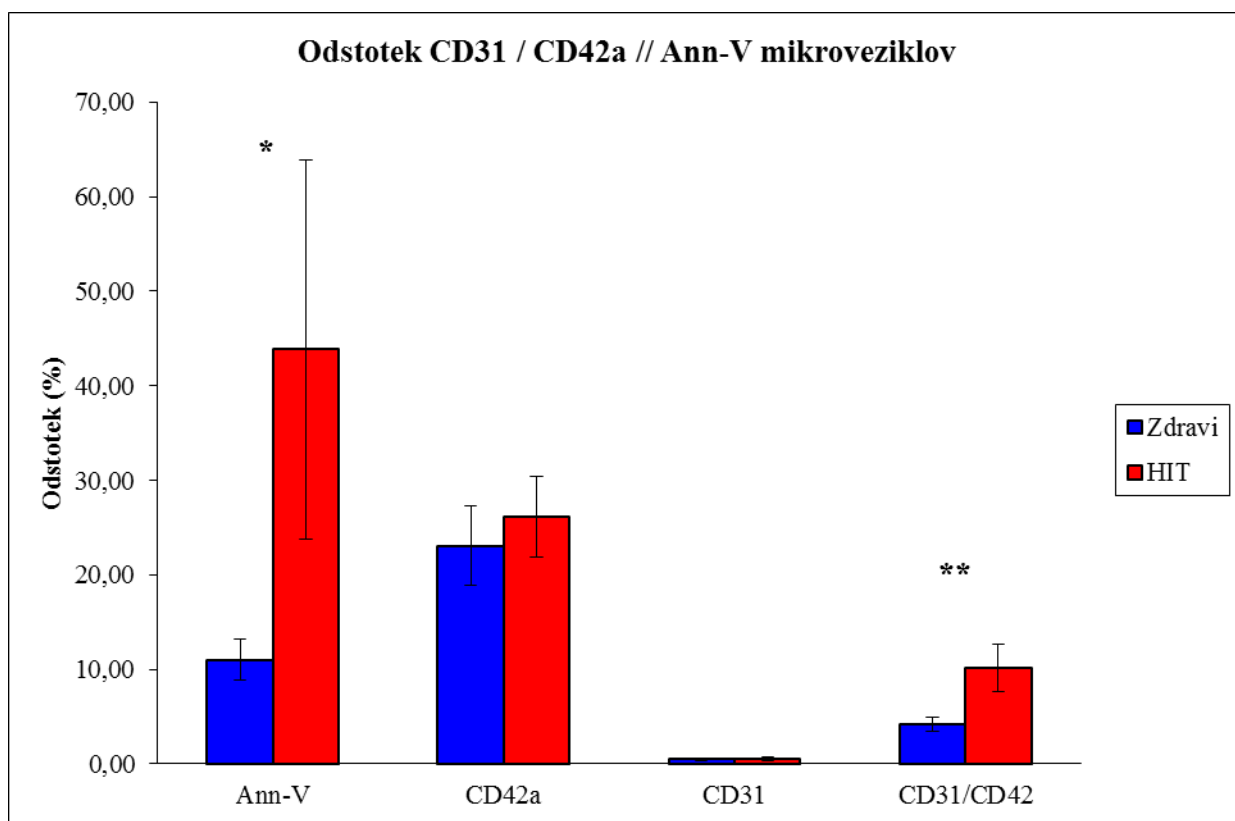


Slika 13: Koncentracija mikroveziklov

Prikazana je koncentracija mikroveziklov pri populaciji zdravih osebkov in bolnikih s HIT. Pri tem je podana povprečna koncentracija in standardna napaka (SE). Vzorec je pri tem obsegal kri 13 HIT bolnikov in 15 zdravih osebkov.

#### 4.2 IZRAŽANJE CD 31/ CD 42a // Ann-V

Slika 14 prikazuje povprečne vrednosti izražanja antigenov Ann-V, CD42a, CD31 in dvojno pozitivnih CD31/CD42a mikroveziklov. Statistično značilno razliko med populacijama mikroveziklov HIT in mikroveziklov zdravih osebkov pri proučevanju s CD31/CD42a//Ann-V površinskimi označevalci smo dobili pri populacijah Ann-V+ mikroveziklov ( $p=0,05$ ) in CD31+/CD42a+ mikroveziklih ( $p=0,01$ ). Odstotek Ann+ mikroveziklov pri HIT bolnikih je 43,84, pri zdravih osebkih pa 11,03 odstotke. Iz slike 14 je razvidno, da je odstotek CD31/CD42+ višji pri HIT bolnikih, znaša 10,11, pri zdravih osebah pa odstotek dvojno pozitivnih mikroveziklov znaša le 4,17. Pri mikroveziklih, označenih le s CD42a ali CD31 nismo dobili statistično značilnih razlik.

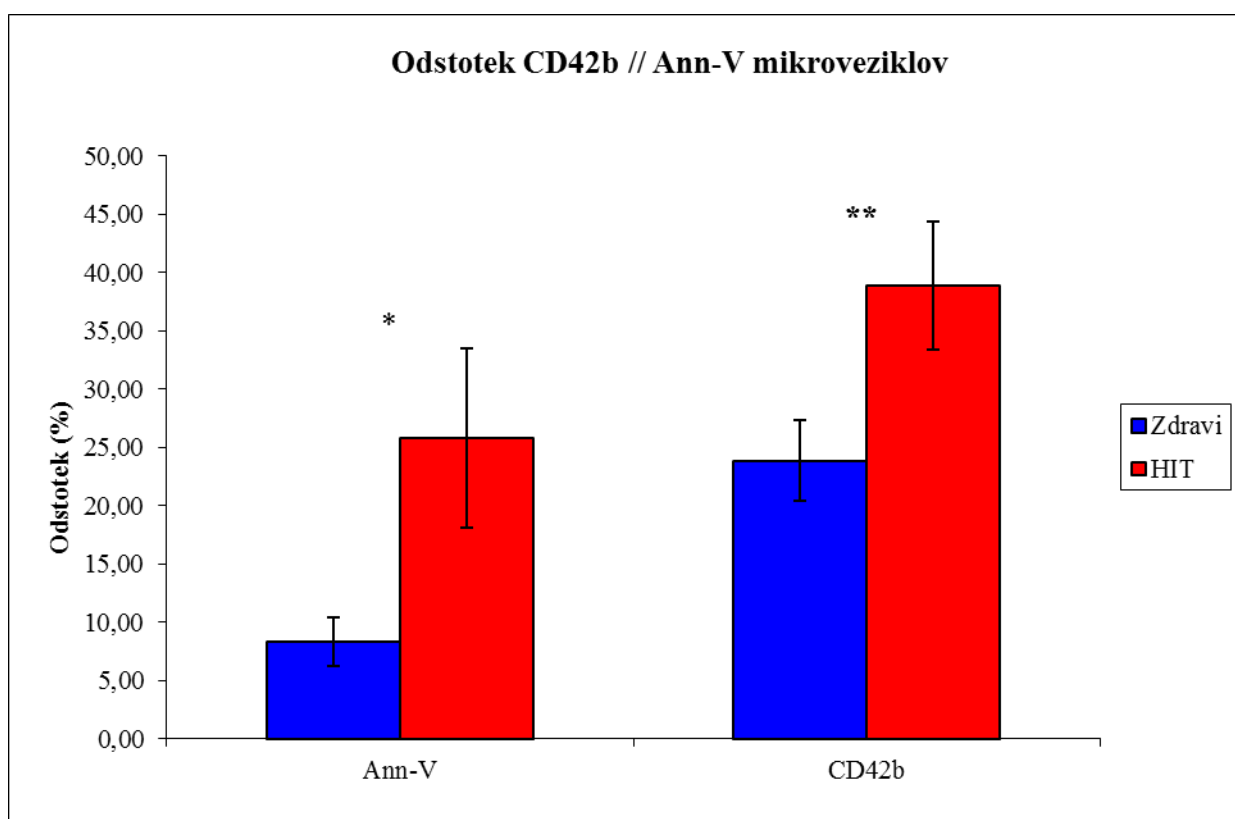


Slika 14: Povprečna vrednost izražanja Ann-V, CD31, CD42a in CD31/CD42a.

Slika prikazuje odstotek molekul izraženih antigenov (Ann-V, CD31 in CD42a ter CD31/42a) pri zdravi populaciji in HIT populaciji. Ob tem so podane tudi standardne napake (SE). Vzorec je obsegal kri 14 HIT bolnikov in 21 zdravih osebkov.

#### 4.3 IZRAŽANJE CD 42b // Ann-V

Pri proučevanju mikroveziklov, označenih z Ann-V in CD42b, smo opazili statistično značilno razliko med preiskovanima skupinama (HT bolniki in zdravi osebk) tako pri vezavi Ann-V ( $p=0,03$ ) kot pri vezavi CD42b ( $p=0,02$ ). Na sliki 15 lahko v prvih dveh stolpcih grafa vidimo, da je odstotek Ann-V+ mikroveziklov pri HIT bolnikih 25,81%, pri zdravih pa le 8,31%. Tudi odstotek CD42b+ mikroveziklov je pri HIT bolnikih povečan, njegova srednja vrednost znaša 38,86%, pri zdravih posameznikih pa je sednja vrednost CD42b+ mikroveziklov le 27,87%.



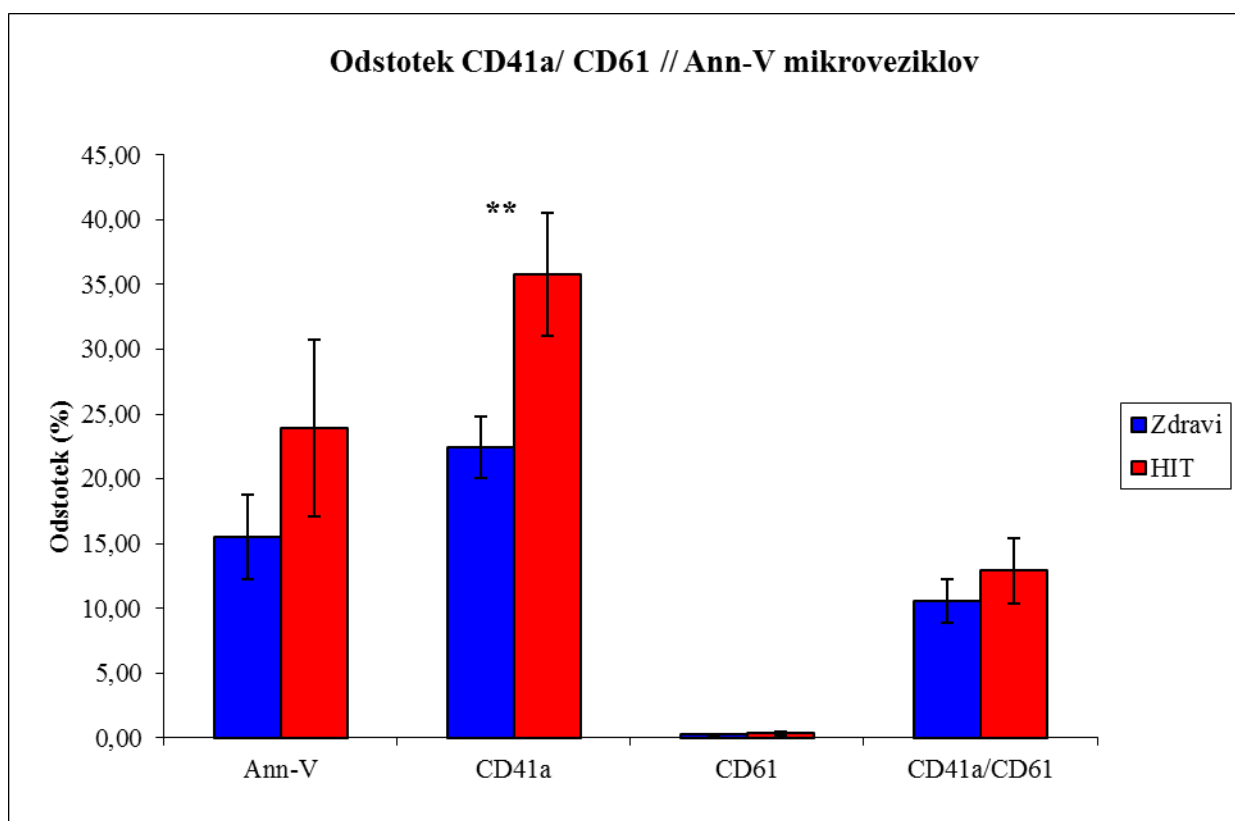
Slika 15: Povprečna vrednost izražanja Ann-V in CD42b.

Prikazan je povprečni odstotek vezanih molekul pri zdravi in HIT populaciji glede na sposobnost vezave Ann-V in CD42b. Podana je tudi standardna napaka (SE). Vzorec je obsegal 14 HIT bolnikov in 15 zdravih osebkov.



#### 4.4 IZRAŽANJE CD 41a/ CD 61 //Ann-V

Pri proučevanju mikroveziklov s protitelesi CD1a in CD61 smo dobili statistično značilno razliko le pri CD41a+ mikroveziklih ( $p=0,01$ ), kjer je bila srednja vrednost CD41a+ mikroveziklov pri HIT bolnikih 38,80 odstotkov, pri zdravih posameznikih pa 22,42 odstotkov (slika 16). Pri Ann-V+ mikroveziklih, CD61+ in dvojno pozitivnih CD41a+/CD61+ mikroveziklih statistično značilnih razlik nismo dobili. Razlika v odstotku Ann-V+ mikroveziklih med HIT in zdravimi osebkami je sicer precejšnja, saj je srednja vrednost pri HIT bolnikih 23,91 odstotka, pri zdravih pa 15 odstotkov, vendar pa je standardna napaka pri HIT bolnikih velika in zato ne moremo govoriti o različnih mikrovezikularnih populacijah. Količine CD61+ mikroveziklov so bile minimalne in so njihove srednje vrednosti znašale za HIT bolnike 0,32 odstotka in 0,22 odstotka za zdrave osebkke. Srednje vrednosti CD41a+/CD61+ mikroveziklov pa so bile za HIT bolnike 12,89 odstotka ter za zdrave osebe 10,56 odstotka.

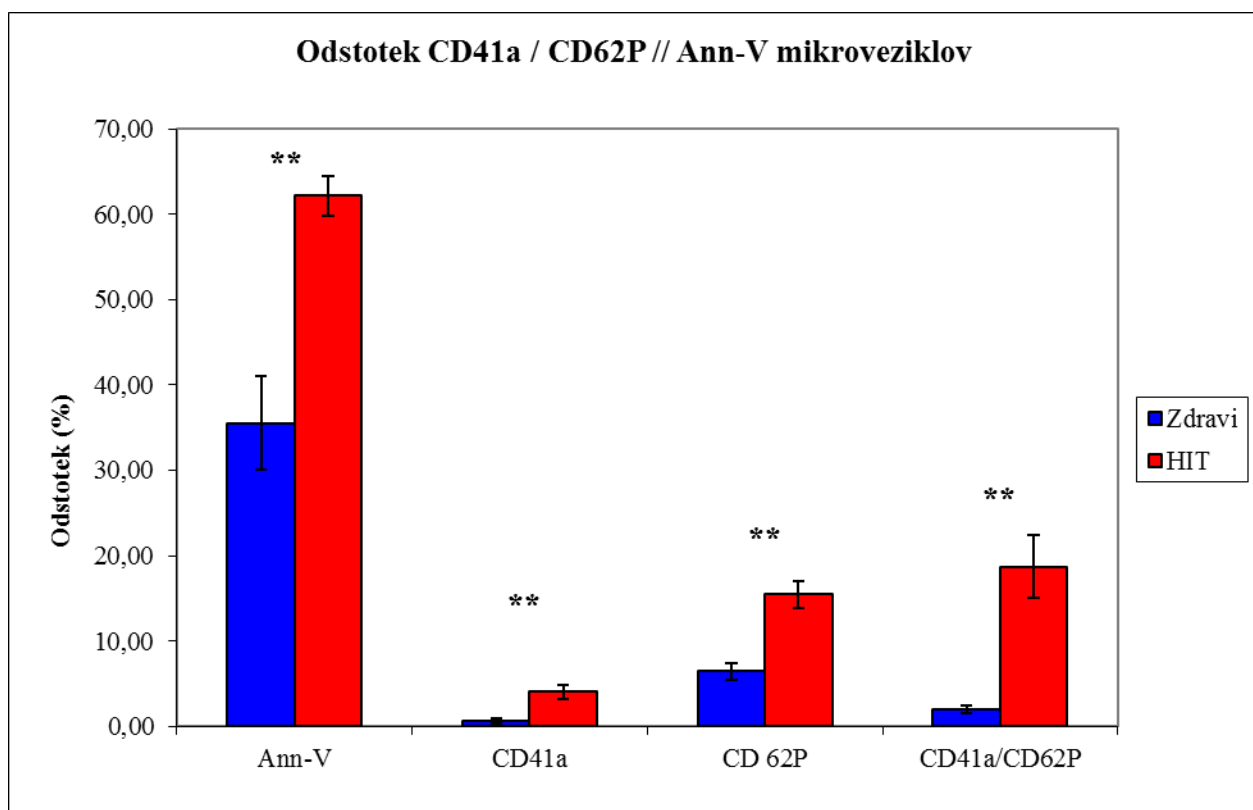


Slika 16: Povprečna vrednost izražanja Ann-V, CD41a, CD61 in CD41a/CD61.

Prikazana je povprečna vrednost odstotka izraženih antigenov pri zdravi kontrolni skupini in skupini HIT bolnikov glede na mikrovezikularno sposobnost izražanja vezavnih mest za Ann-V, CD61 in CD41. Velikost vzorca je bila pri tem 14 HIT bolnikov in 21 zdravih osebkov.

#### 4.5 IZRAŽANJE CD41a / CD 62P // Ann-V

Pri proučevanju mikroveziklov glede na sposobnost vezave monoklonskih protiteles za antigene CD41a in CD62P v povezavi z Ann-V smo ugotovili, da prav pri vseh skupinah proučevanih mikroveziklov dobimo statistično značilne različne populacije. Pri Ann-V+ mikroveziklih je odstotek pri HIT bolnikih 62,17, pri zdravih pa 35,52, kar pomeni, da imamo dve statistično značilni različni populaciji mikroveziklov ( $p=0,00$ ). Pri proučevanju CD41a+ mikroveziklov opazimo, da je odstotek teh mikroveziklov pri zdravih posameznikih zelo majhen, srednja vrednost znaša 0,62 odstotka, medtem ko je pri HIT bolnikih ta vrednost malce povišana in znaša 4,04 odstotka. Na podlagi teh rezultatov smo dobili statistično značilno razliko med populacijama ( $p=0,00$ ). Pri CD62P+ mikroveziklih imamo prav tako statistično značilne različne populacije mikroveziklov ( $p=0,00$ ), njihove srednje vrednosti pa znašajo 6,48 odstotka za zdrave in 15,49 odstotka za HIT bolnike. Pri dvojno pozitivnih CD41a+/CD62P+ mikroveziklih ( $p=0,00$ ) pa je srednja vrednost pri zdravih posameznikih 1,99 odstotka, pri HIT bolnikih pa 18,68 odstotka (glej sliko 17).

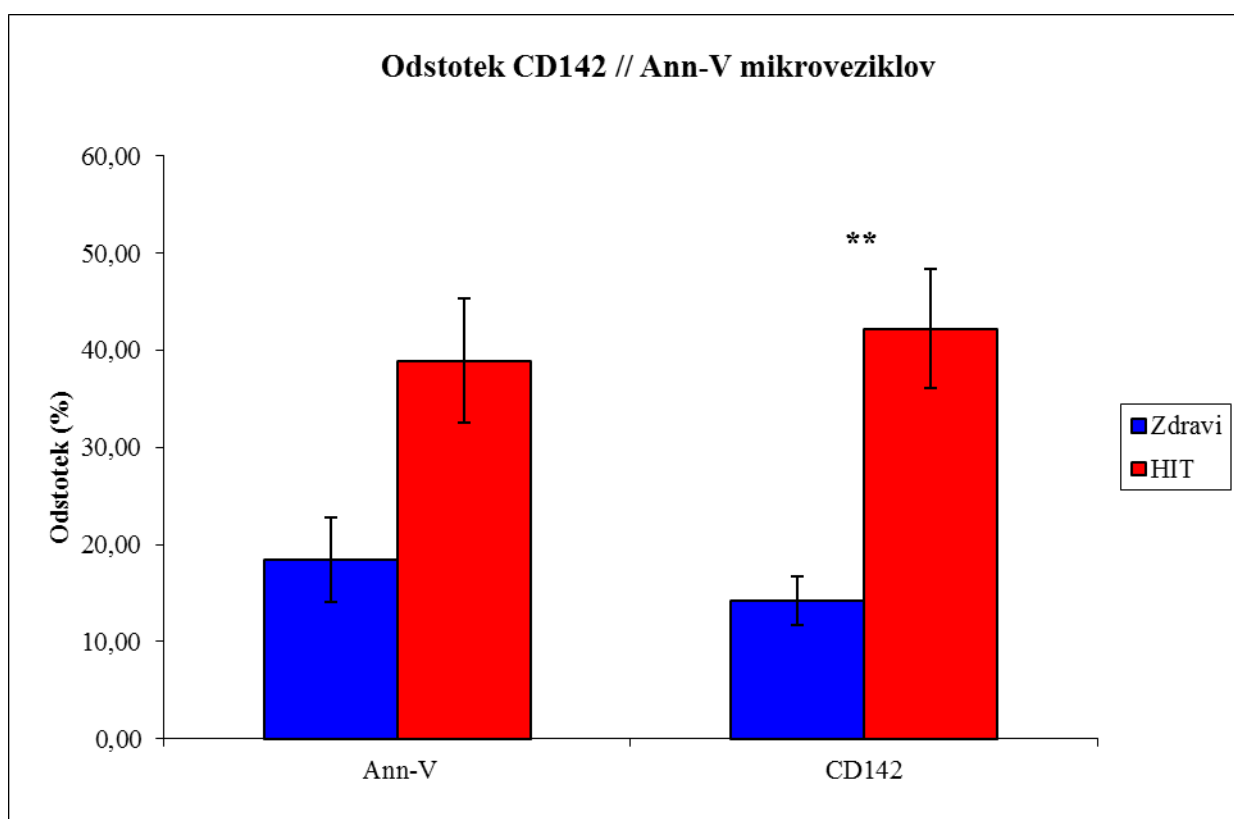


Slika 17: Povprečna vrednost izražanja Ann-V, CD41a in CD62P.

Slika prikazuje povprečne vrednosti izražanja antigenov Ann-V, CD41a in CD62P, izraženo v odstotkih, pri zdravih osebkih in bolnikih s HIT. Podana je tudi standardna napaka (SE). Velikost vzorca je 14 HIT bolnikov in 12 zdravih osebkov.

#### 4.6 IZRAŽANJE CD142 // Ann-V

Na sliki 18 so prikazani rezultati vezave monoklonskih protiteles na antigene CD142 in Ann-V na mikrovezikle HIT bolnikov in zdravih posameznikov. Pri tem smo opazili statistično značilne različne populacije mikroveziklov le pri CD142+ mikroveziklih ( $p=0,00$ ). Srednje vrednosti CD142+ za HIT bolnike so bile 42,18 odstotka in za zdrave posameznike 14,17 odstotka. Pri Ann-V mikroveziklih statistično značilne razlike med populacijama mikroveziklov nismo dobili ( $p= 0,40$ ).



Slika 18: Povprečna vrednost izražanja CD142.

Prikazani sta povprečni vrednosti izražanja CD142 antigena v odstotkih za zdravo populacijo in HIT pozitivno populacijo. Prikazana je tudi standardna napaka (SE). Vzorec je obsegal kri 14 HIT bolnikov in 21 zdravih osebkov.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Trombociti so celični fragmenti brez celičnega jedra, ki nastajajo v kostnem mozgu iz megakariocitov. Ko dozori, krožijo po krvnožilnem sistemu, kjer so eden glavnih akterjev hemostaze kljub temu, da sami niso sposobni aktivacije koagulacijske kaskade (Gibbins, 2004). Do aktivacije mikroveziklov pride v normalni hemostazi zaradi sprememb v žilnem epitelu. Pri tem pride na površini epitelnih celic do izpostavitve molekul, ki povzročijo adhezijo trombocitov na mestu poškodbe in nastanek strdka, s tem se poškodba zapre in prične se obnova poškodovaneg tkiva.

Pri s heparinom povzročeni trombocitopeniji se injiciran heparin veže na PF4 faktor, tega prepoznajo IgG protitelesa, se vežejo nanj in na trombocite ter sprožijo imunsko aktivacijo trombocitov, ob kateri pride do sprostitve vsebine granul in nastanka mikroveziklov.

Mikrovezikle v zadnjem desetletju vse pogosteje proučujejo in posledično pridobivajo v znanosti kakor tudi v patofiziologiji vse bolj pomembno vlogo. Številne študije jih predlagajo kot potencialni diagnostični marker za določeno bolezen ali pa jim prepisujejo določeno funkcijo v patofiziologiji bolezni. Vendar pa je težava v tem, da še ni enotnega postopka za izolacijo mikroveziklov. V literaturi lahko najdemo številne načine za izolacijo mikroveziklov in njihovo nadaljnjo proučevanje, bodisi s pretočnim citometrom, bodisi z tehnikami ELISA (Jy in sod., 2005). Poleg metod za izolacijo prihaja do razlik v raziskavah tudi zaradi uporabe različnih definicij mikroveziklov.

Warkentin je leta 1994 z *in vitro* testom na izoliranih trombocitih bolnikov, obolelih s HIT, ki jim je dodajal njihove IgG, dokazal, da pri tem nastanejo mikrovezikli s prokaagulantskimi značilnostmi. Prav ti mikrovezikli naj bi bili razlog za nastanek trombotskih zapletov pri HIT (Warkentin in sod., 1994). Iz tega razloga smo se pri preiskovanju nastanka mikroveziklov v diplomski nalogi osredotočili predvsem na mikrovezikle trombocitnega izvora.

#### 5.1.1 Izolacija mikroveziklov

Za definiranje mikroveziklov smo pri raziskavi uporabili najbolj strogo/togo definicijo in sicer, da gre za vezikularni material, ki smo ga dobili iz PFP plazme z ultracentrifugacijo. Veliki so 1  $\mu\text{m}$  ali manj in imajo na površini izražen fosfatidil serin, kar potrdimo z označevanjem z Ann-V. Jasno je, da imajo fosfatidil serin pozitivni mikrovezikli velik

pomen pri koagulaciji, saj na svoji površini izražajo številne molekule, ki ustvarjajo prokoagulantno okolje (Shet in sod., 2003).

### 5.1.2 Površinski označevalci trombocitnih mikroveziklov

Trombociti, kot vse ostale celice, na svoji površini izražajo številne molekule, ki delujejo kot signalne, receptorske ali adhezijske molekule. Aktivaciji trombocitov sledi nastanek mikroveziklov, za katere je značilno, da vsebujejo celično membrano izvorne celice, hkrati z njo pa tudi vse njene morebitne komponente (Falati in sod., 2003). Raziskave so pokazale, da je sestava mikroveziklov odvisna ne samo od tipa starševske celice, pač pa tudi od načina aktivacije (Perez-Pujol in sod., 2007). Tako so na primer ugotovili, da mikrovezikli endotelnega izvora, ki nastanejo ob apoptozi, izražajo večje število CD31 oz. PECAM označevalcev, tisti, ki nastanejo z aktivacijo endotelijskih celic s tumor nekrotičnim faktorjem  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), pa izražajo večje količine CD62E faktorja oz. selektina E (Jimenez in sod., 2003).

Pritrjevanje trombocitov na subendotelne strukture je kritični dogodek tako v hemostazi kot v trombozi, pri tem je najpomembnejši vWF, ki je glavni adhezivni glikoprotein. Trombociti imajo dva tipa receptorjev, ki so sposobni vezave na vWF po njegovi aktivaciji, to sta GPIb, v kompleksu GPIb-V-IX, in intergin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 oz. GPIIb/IIIa (Thai in sod., 2003). Iz literature je znano, da mikrovezikli, ki nastanejo pri aktivaciji trombocitov, izražajo GPIb in GPIIb/IIIa, zato nas je zanimalo, če tudi pri aktivaciji trombocitov s kompleksom PF4/heparin/IgG pride do izražanja teh molekul na mikroveziklih. Opazovali smo izražanje GPIX podenote oz. CD42a na prokoagulantnih mikroveziklih (Ann-V +) v povezavi z izražanjem PECAM-1 oz. CD31 molekule ter izražanje GPIb (CD42b) in integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (CD41a/CD61). Pa tudi izražanje selektina P (CD62P) v povezavi z  $\alpha$ IIb integrinsko podenoto (CD41a) ter izražanje tkivnega faktorja (CD142).

#### 5.1.2.1 Mikrovezikli, označeni s CD 31/ CD 42a // Ann-V

Pri označevanju mikrovezikov s CD31 in CD42a smo želeli pokazati, da je večina mikroveziklov v vzorcih krvi bolnikov trombocitnega izvora, z uporabo protitelesa CD42a pa smo to še dodatno definirali, saj se CD42a najde le na trombocitih in megakariocitnih celicah (Lynch in Ludlam, 2007).

CD31 oz. PECAM-1 je transmembranski glikoprotein, ki služi kot trombocitna adhezijska molekula. Najdemo ga na trombocitih, endotelnih celicah, monocitih, nevtrofilcih in nekaterih skupinah limfocitov (Cicmil in sod., 2002; Falati in sod., 2006). Sprva je veljal za adhezijsko molekulo, vendar pa je danes znano, da je njegova funkcija povezana s tipom celice (Falati in sod., 2006). Vloga trombocitne PECAM molekule v hemostazi še ni jasna,

*in vitro* raziskave pa so pokazale, da aktivacija PECAM-1 molekule pred spodbudo trombocita vodi v inhibicijo agregacije trombocitov ter inhibicijo aktivatornih signalnih mehanizmov. To pomeni, da je PECAM-1 vpletena v negativno regulacijo trombocitnih funkcij, kar podpira odkritje ITIM motivov oz. imunoreceptorni tirozinski inhibitorni motiv v citoplazemskem repu molekule. ITIM motiv je prisoten na številnih inhibitornih receptorjih. Zanj je značilno, da se pod določenimi pogoji fosforilirajo in rekrutirajo sekundarni signalni mehanizmi, to pa vodi v inhibiciji aktivacijskega signala (Falati in sod., 2006, Cicmil in sod., 2002). Vloga PECAM-1 molekule *in vivo* še ni znana, ena od teorij pa je, da je molekula, ki preprečuje aktivacijo trombocitov ob trku z endotelijskimi celicami in drugimi trombociti. Prav tako lahko s svojo negativno zanko predstavlja prag, potreben za aktivacijo trombocitov (Cicmil in sod., 2002). Skozi omejevanje aktivacije perifernih trombocitov v trombu naj bi tudi vplivala na omejevanje rasti tumorjev (Falati in sod., 2006).

Molekula CD42a oz. GPIX je sestavni in, skupaj z ostalimi podenotami, ključni del aktivnega kompleksa GPIb-IX-V. Njena vloga v samem kompleksu je, da deluje kot sidro in orientacijska molekula. Komplex GPIb-IX-V ima funkcijo adhezijskega receptorja v primeru poškodbe žilnega tkiva oz. kadar prihaja do nastanka visokih strižnih sil. Preko njega poteče vezava trombocita na vWF epitela, kar sproži agregacijo trombocitov (Luo in sod., 2007).

V primeru označevanja mikroveziklov s protitelesi CD31 in CD42a smo dobili statistično značilno razliko le pri CD42a+ mikroveziklih in pri CD31+CD42a+ mikroveziklih. Prisotnost dvojno pozitivnih CD31+/CD42a+ mikroveziklov pomeni, da imajo oboleli s HIT v primerjavi z zdravimi posamezniki povečano število trombocitnih mikroveziklov. Prisotnost teh mikroveziklov pri HIT bolnikih bi nam lahko služila kot diagnostično orodje pri ugotavljanju, ali se je pri pacientu pojavil HIT ali ne. Prisotnost CD42a+ mikroveziklov je bila pričakovana, saj je glikoprotein IX vsesplošno prisoten na in v trombocitih, tako v neaktivni kot v aktivni obliki (Luo in sod., 2007) in prav prisotnost CD42a+ mikroveziklov bi nam lahko pomagala pri razumevanju nastanka trombotskih zapletih pri HIT.

Število CD31+ endotelnih mikroveziklov (CD31+CD42-) je bilo pri zdravih in pri HIT bolnikih manjše, kar smo pričakovali. CD31+ endotelni mikrovezikli namreč veljajo za mikrovezikle, ki nastanejo ob akutnih obolenjih in apoptozi (Lynch in Ludlam, 2007), prav tako pa negativno vplivajo na nastanek trombov. Zanimivo bi bilo primerjati koncentracije CD31+ mikroveziklov pri posameznikih z visoko koncentracijo HIT protiteles, ki niso zboleli za HIT in posamezniki, ki so zboleli za HIT. Mogoče je prav povečan pojav CD31+ mikroveziklov pri posameznikih, ki kljub visokim koncentracijam HIT protiteles niso zboleli za HIT, razlog, zakaj nekateri zbolijo, drugi pa ne.

### 5.1.2.2 Mikrovezikli, označeni z CD42b/ Ann-V

CD42b oz. GPIb je komponenta GPIb-IX-V, sestavljena iz  $\alpha$  in  $\beta$  podenote. Na  $\beta$  podenoti je vezavno mesto za vWF in trombin. Vezava vWF na kompleks predstavlja primarni stik med poškodovanim endotelijem in trombocitom. Ko se trombocit veže na endotel, pride do aktivacije trombocita, sledi aktivacija GPIIb/IIIa kompleksa in nadaljnje mreženje trombocitov v trombozo in v končni fazi do reorganizacije skeleta trombocita, čemur sledi kontrakcija in stabilizacija tromba (Lefkovits in sod., 1995; Rathore in sod., 2003). Vloga CD42b + mikroveziklov v hemostazi in trombozi še ni pojasnjena, sklepamo pa lahko, da imajo podobno vlogo kot jo imajo CD42b+ trombociti.

Iz rezultatov je razvidno, da je število mikroveziklov z antigenom GPIb (CD42b) v krvi bolnikov s HIT v primerjavi z zdravimi osebki povečano. Skupaj z rezultati izražanja CD42a na mikroveziklih lahko to pomeni, da je na mikroveziklih, ki nastajajo pri HIT, prisoten kompleks GPIb-IX. V primeru prisotnosti aktivnega kompleksa GPIb-IX-V na mikroveziklih bi to lahko pomenilo, da so takšni mikrovezikli sposobni vezave na trombin, kar bi lahko pojasnilo nastanek strdkov v manjših arterijah, kjer so strižne sile velike in kjer prav vezava mikroveziklov preko receptorja GPIb-IX-V na vWF na steni arterij omogoči rekrutacijo in agregacijo trombocitov in s tem nastanek strdka.

### 5.1.2.3 Mikrovezikli, označeni s CD 41a/ CD 61// Ann-V

GPIIb/IIIa oz. integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  je molekula, ki jo sestavljajo nekovalentno povezane podenote  $\alpha_{IIb}$  oz. CD41a in  $\beta_3$  oz. CD61. Na »spečih« trombocitih jo najdemo v neaktivni obliki, do njene aktivacije pa pride ob vezavi agonista na trombocit. Ta vezava sproži konformacijske spremembe (»inside-out«) v receptorju, kar ga naredi dovzetnega za ligand. Ti so različni, najpogostejši je fibrinogen, ki posreduje agregacijo trombocitov, saj veže integrinske molekule na različnih trombocitih. Na GPIIb/IIIa se lahko vežejo še vWF, fibronektin, vitronektin in druge, ki pa imajo navadno adhezijsko vlogo in vežejo trombocit na epitel (Plow in Kelly, 2010; Lefkovits in sod., 1995). Vezava liganda je ob zadostnih koncentracijah le-tega hitra. Temu sledijo konformacijske spremembe kompleksa receptor/ligand in s tem prenos signala, ki sproži reorganizacijo citoskeleta tako, da pride do ojačenja in kontrakcije nastajajočega tromba (Lefkovits in sod., 1995).

Raziskave so pokazale, da so se mikrovezikli sposobni vezati na trombocite, endotelij in subendotelij. Vezava mikrovezikla na trombocite poteče preko GPIIb/IIIa molekul na mikroveziklu in trombocitu s fibrinogenom kot mostom med obema integrinoma. Vezava mikrovezika na endotelij in subendotelijske strukture pa poteče preko GPIIb/IIIa molekule na mikroveziklu in različnih molekul, ki jih izražata endotelij ali subendotelijski matriks.

Veže se lahko preko adhezivnih glikoproteinov, fibrinogena, fibronektina in kolagena 1 ter 2 (Merten in sod., 1999).

Od mikroveziklov, ki smo jih označevali s CD41a in CD61, smo le pri mikroveziklih, označenih s CD41a ( CD41a+) opazili statistično značilne različne populacije med zdravimi psamezniki in HIT bolniki, pri CD61+ in dvojno pozitivnih (CD61+/CD41a+) pa teh razlik nismo opazili.

To bi lahko pomenilo, da pri nastanku trombocitnih agregatov pri HIT ne posredujejo GPIIb/IIIa mikrovezikli, ali pa obstaja razlog za nevezavo protiteles na antigen  $\beta 3$  (CD61). Če bi torej HIT bolniki v primerjavi z ostalimi skupinami bolnikov še naprej izražali povečano aktivnost v  $\alpha_{IIb}$  (CD41a) podenoti, bi to lahko služilo kot diagnostični marker za HIT pozitivne bolnike.

Glede na rezultate dvojno pozitivne paralele CD41a+/CD61+//Ann-V+, kjer nismo opazili statističnih razlik med mikrovezikli zdravih in HIT bolnikov, lahko rečemo, da agregacija trombocitov pri HIT ne poteka preko fibrinsko posredovanega GPIIb/IIIa stika med trombociti in mikrovezikli. To pojasni Nomura, ki poroča, da obstajajo razlike v molekuli GPIIb/IIIa na trombocitih in mikroveziklih in prav ta razlika naj bi vplivala na različne vezavne lastnosti molekule. To spremembo v lastnosti razložijo z interakcijo med receptorjem in citoskeletom, ki je v trombocitih prisotna, medtem ko pri molekuli GPIIb/IIIa na mikroveziklih te povezave zaradi načina nastanka mikroveziklov ni. Zato se receptorji na mikroveziklih niso sposobni sestavljati, za razliko od trombocitnih receptorjev (Nomura in sod., 1992).

#### 5.1.2.4 Mikrovezikli, označeni s CD142 //Ann-V

Tkivni faktor (CD142) je transmembranski glikoprotein, ki deluje kot receptor in kofaktor za plazemski faktor VII/VIIa. Z aktivacijo faktorja VII sproži koagulacijsko kaskado, zato velja tudi za primarnega sprožilca koagulacije (Kasthuri in sod., 2012). Poleg njegove vloge v koagulaciji in hemostazi ima pomembno vlogo tudi v trombogenezi, njegove ne-koagulacijske značilnosti pa naj bi prispevale tudi k angiogenezi in celo metastaziranju tumorjev (Siddiqui in sod., 2002).

Do nedavnega je veljalo, da se tkivni faktor nahaja zgolj na celicah subepitelija in do svoje vloge receptorja in kofaktorja faktorju VII prihaja le ob poškodbah, ko pride do izpostavitve subepitela. Sčasoma se je izkazalo, da se tkivni faktor nahaja tudi prosto v plazmi, kjer je, kljub nasprotnim predvidevanjem, vpleten v koagulacijo. Najprej je bilo



odkrito, da je tkivni faktor vezan na monocite, kasneje pa, da je vezan tudi na mikrovezikle (Lechner in Weltermann, 2008).

TF+ mikrovezikli so še vedno predmet številnih razprav in nasprotujočih si mnenj. Sprva je veljalo, da so vsi TF+ mikrovezikli monocitnega izvora, saj so prav monociti sposobni sinteze tkivnega faktorja, njegovega izražanja na svoji površini in v končni fazi tudi luščenja TF+ mikroveziklov (Lechner in Weltermann, 2008). Kmalu se je izkazalo, da se TF+ monocitni mikrovezikli pritrjujejo na aktivirane trombocite, pri čemer mikrovezikel odda trombocitu vse svoje membranske proteine, tudi tkivni faktor (Del Conde in sod., 2005). Tako je nekaj časa veljalo, da sami trombociti sicer niso sposobni sinteze tkivnega faktorja, vendar pa so sposobni oddajati TF+ mikrovezikle preko spajanja z TF+ monocitnimi mikrovezikli (Del Conde in sod., 2005). Kmalu je bilo dokazano, da so tudi trombociti sami sposobni sinteze in translokacije funkcionalnega tkivnega faktorja na celično membrano (Panés in sod., 2007). Ugotovljeno je bilo tudi, da 90 % vseh TF+ mikroveziklov predstavljajo mikrovezikli monocitnega in trombocitnega izvora, pri čemer jih je kar 91 % monocitnega izvora in le 6 % trombocitnega. Ali bo endotelijska celica sproščala TF+ mikrovezikle, je odvisno od signala, ki ga prejme. Če pride do celične aktivacije, naj bi endotelijske celice sproščale TF+ mikrovezikle, ob njihovi apoptozi pa je število TF+mikroveziklov minimalno.

Nam je tkivni faktor služil kot marker, s katerim smo identificirali mikrovezikle, ki nastanejo z aktivacijo, saj do sproščanja TF+ mikroveziklov pride ob aktivaciji monocit in trombocitov.

Izkazalo se je, da imajo oboleli s HIT v primerjavi z zdravimi osebki večje število mikroveziklov, ki izražajo tkivni faktor.

Znane so številne nasprotujoče si študije o pomenu TF+ mikroveziklov pri razvoju bolezni. V eni izmed študij, prisotnosti TF+mikroveziklov pri nastanku hemostatskega čepa, niso uspeli dokazati (Hoffman in sod., 2006) oziroma poročajo o prenizkih koncentracijah prostih TF+ mikroveziklov v normalni plazmi, da bi ta lahko vplivala na koagulacijo (Butenas in sod., 2005), v drugi pa trdijo, da naj bi bili prav TF+ mikrovezikli pomembni za nastanek tromba. Pri tem naj bi bilo pomembno kopičenje TF+ mikroveziklov znotraj tromba in njihovo povezovanje preko receptorja PSGL-1 na selektin P na trombocitih (Falati in sod., 2003). Kaj povzročajo TF+ mikrovezikli oz. ali sodelujejo pri razvoju HIT, še ni znano.

#### 5.1.2.5 Mikrovezikli, označeni s CD41a/ CD62P// Ann-V

CD62P oz. selektin P je transmembranski glikoprotein, ki ga najdemo na aktiviranih trombocitih in endotelnih celicah. V primeru neaktivnih trombocitov, se selektin P nahaja v granulah  $\alpha$  in do njegove translokacije na površino pride ob aktivaciji trombocitov. V endotelnih celicah pa ga najdemo v t.i. Weibel-Palade telesih, od koder se prav tako izpostavi ob aktivaciji endotelnih celic. Poleg tega so endotelne celice pod vplivom TNF $\alpha$  (tkivni nekrotični faktor  $\alpha$ ) sposobne *de novo* sinteze selektina P (Vandendries in sod., 2004). V preteklosti je veljalo, da večino, kar 70-90 % mikroveziklov, v zdravih osebkih predstavljajo trombocitni mikrovezikli. Flaumenhaft je z raziskavami megakariocitov dokazal, da temu ni tako. Ugotovil je namreč, da mikrovezikli, ki nastanejo iz megakariocitnih celic, prav tako kot trombocitni mikrovezikli, izražajo CD41, vendar pa za razliko od trombocitnih mikroveziklov ne izražajo CD62P (so CD62P-). Prav tako ne izražajo LAMP-1 molekule (lizosomski membranski protein) in vsebujejo celotno dolžino filamina A. Hkrati so odkrili tudi, da le manjši delež CD41+ mikroveziklov zdravih osebkov izraža hkrati CD62P+, medtem ko mikrovezikli, ki nastanejo po aktivaciji trombocitov, močno izražajo CD62P+ (Flaumenhaft, 2009).

Funkcije selektina P so različne. Sodeloval naj bi tako pri vnetjih in infekcijah z rekrutacijo levkocitov na prizadeto mesto in imel pomembno vlogo v trombozi. S svojo kontrareceptorsko PSGL-1 molekulo so pomembni pri razvoju zgodnjega tromba, saj sodelujejo pri rekrutaciji TF+ mikroveziklov (Falati in sod., 2003).

Naša raziskava je pokazala, da je delež mikroveziklov pri HIT bolnikih, ki izražajo CD62P+, CD41a+ in CD41a+/CD62P+, mnogo večje kot pri zdravih preiskovancih. Iz tega lahko sklepamo, da je pri HIT+ bolnikih naraslo število trombotskih mikroveziklov.

Hkrati smo opazili, da pri HIT bolnikih mikrovezikli močno izražajo GPIb (CD41a). To izražanje CD41a smo opazili v paraleli HIT bolnikov, označenih s CD41a/CD61 in CD41a/CD62P. Odkritje, da HIT mikrovezikli močno izražajo GPIb (CD41a), nam lahko služi kot potencialno diagnostično orodje za odkrivanje HIT.

## 5.2 SKLEPI

- Izolirani mikrovezikli HIT bolnikov v primerjavi z zdravimi močno izražajo CD31/42a, kar kaže, da so mikrovezikli, ki nastajajo pri HIT, trombocitnega izvora.
- Mikrovezikli HIT bolnikov izražajo CD42b, kar kaže na morebitno prisotnost GPIb-IX-V kompleksa, ki sodeluje pri povezovanju na vWF na steni arterij, to pa lahko vodi v nastanek strdkov pri bolnikih.
- Pri izražanju CD41a/CD61 na mikroveziklih izoliranih iz krvi HIT bolnikov nismo zaznali razlik v primerjavi z zdravimi osebki. Iz tega lahko sklepamo, da integrinska molekula  $\alpha_{IIb}\beta_3$  oziroma GPIIb/IIIa ni vpletena v pritrjevanje in agregacijo trombocitov pri s heparinom povzročeni trombocitopeniji.
- Raziskava je pokazala, da je, v primerjavi z zdravimi osebki, v plazmi HIT bolnikov povečano število TF+ mikroveziklov, za katere je značilno, da nastanejo iz aktiviranih trombocitov.
- Izražanje CD41a/CD62P na mikroveziklih, izoliranih iz krvi HIT bolnikov, nam dodatno potrdi, da imajo pri razvoju HIT poglobljeno vlogo trombociti in mikrovezikli, ki nastanejo ob aktivaciji trombocitov.
- Močno izražanje CD41a na mikroveziklih HIT bolnikov nam lahko v prihodnosti služi kot diagnostični označevalec za prepoznavanje in diagnosticiranje HIT.

## 6 POVZETEK

S heparinom povzročena trombocitopenija je huda imunska motnja, ki nastane kot stranski učinek zdravljenja s heparinom. Pri njej pride do nastanka protiteles HIT, ki so odgovorna tako za aktivacijo trombocitov, epitelnih celic in monocit, kot tudi za nastanek strdkov z navzkrižnim povezovanjem trombocitov. Diagnosticiranje HIT je zelo težavno, saj so simptomni obolenja zelo nespecifični, testi za njegovo diagnostiko pa različno občutljivi. Nenazadnje tudi sama prisotnost protiteles HIT ne pomeni nujno, da bolnik HIT razvije.

V primeru, ko pride do pojava kombinacije določenih simptomov: trombocitopenije v določenem časovnem obdobju, nekroze na mestu injiciranja heparina in tromboze, za diagnostiko HIT najpogosteje uporabljamo kombinacijo testov. V prvi fazi z različnimi serološkimi testi (ELISA ali aglutinacijski test) potrjujemo prisotnost protiteles HIT. Ti testi so zelo občutljivi, a tudi nizko specifični. Raziskave so pokazale, da protitelesa IgG t.i. HIT-IgG nastajajo pri številnih pacientih (od 10 do 20 %, v nekaterih primerih tudi do 70 %, zdravljenih s heparinom), ki so zdravljeni z heparinom, vendar pa jih le majhen odstotek (1 – 5 %) zbolijo za HIT (Greinacher in Warkentin, 2006). Iz tega razloga za dokončno potrjevanje diagnoze uporabimo še funkcijske teste, s katerimi opazujemo sposobnost vezave HIT protiteles na trombocite. Te preiskave so zahtevnejše, dolgotrajnejše in za svojo izvedbo potrebujejo sveže testne trombocite zdravih posameznikov. Rezultati, ki jih z njimi dobimo, so bolj specifični, vendar v nekaterih primerih lahko dobimo lažno negativne rezultate, ker se trombociti pri posameznikih razlikujejo po vsebnosti faktorja PF4. Pri nekaterih trombocitih zdravih posameznikov z nižjo koncentracijo PF4 v granulah  $\alpha$  lahko opazimo šibko aktivacijo trombocitov in manjši izpust PF4, kar je Rauova navedla kot razlog, da ne pride pri vseh bolnikih, po operacijah zdravljenih s heparinom, do razvoja HIT bolezni (Rauova in sod., 2009).

Ti razlogi nas spodbujajo, da iščemo nove, lažje in bolj specifične načine diagnosticiranja HIT. Ena od možnosti, ki se je pokazala kot obetavna, je diagnostika na podlagi prisotnosti mikroveziklov. Mikrovezikli nastajajo kot stranski produkt aktivacije trombocitov s protitelesi HIT in na svoji površini izražajo fosfatidil serin in specifične antigene starševskih celic. Prav tako sta Mause in Weber ugotovila, da so trombocitni mikrovezikli kar 50-100-krat bolj prokoagulantsko aktivni kot aktivirani trombociti, zaradi česar bi lahko bili prav trombocitni mikrovezikli odgovorni za nadaljnji razvoj HIT (Mause in Weber, 2010).

Mikrovezikli so tako zaradi svojih značilnosti – prisotnost fosfatidil serina in antigenov starševskih celic (transmembranski proteini, adhezijske molekule in membranski receptorji) nezahteven objekt preiskovanja. Problem, ki se pojavi pri diagnostiki z mikrovezikli je omejenost s časom pri izolaciji mikroveziklov (ta naj ne bi bil krajši od pol

ure in daljši od dveh ur), transport mikroveziklov (sprememba temperature vpliva na hitrejši nastanek mikroveziklov) ter sam način odvzema krvi (širina igle, ali gre za prvo epruveto odvzete krvi, tip antikoagulanta). Za proučevanje mikroveziklov sta se razvila dva načina – proučevanje z ELISA testom ter proučevanje s pretočnim citometrom.

Namen diplomske naloge je bil analizirati mikrovezikle, ki nastanejo pri bolnikih s heparinom povzročeno trombocitopenijo. Naša hipoteza je bila, da se ti mikrovezikli razlikujejo od mikroveziklov, ki se nahajajo v krvi zdravih posameznikov tako po številu kot po izvoru. V diplomski nalogi smo iz krvi obolelih s HIT in iz krvi zdravih osebkov izolirali mikrovezikle in jih označevali z različnimi protitelesi, ki se vežejo na markerje, za katere smo pričakovali, da bodo prisotni tudi na aktiviranih trombocitih. S pomočjo pretočnega citometra smo nato opazovali prisotnost teh protiteles na mikroveziklih.

Izkazalo se je, da so mikrovezikli izolirani iz krvi HIT bolnikov za razliko od zdravih osebkov izražali CD42a, CD31/CD42a, CD42b, CD41a, CD142; CD41a, CD62P in CD41a/CD62P.

Prisotnost CD31/CD42a mikroveziklov nam pove, da so naša predvidevanja, da so mikrovezikli, ki nastajajo pri HIT, res trombocitnega izvora, pravilna.

Prav tako prisotnost CD142 oz TF+ mikroveziklov kaže, da imajo tako mikrovezikli kot trombociti prokaogulantsko sposobnost.

Izražanje CD41a/CD62P je ponovno ena od značilnosti aktiviranih trombocitov in s tem tudi mikroveziklov, ki nastanejo iz aktiviranih trombocitov.

Močno izražanje CD41a oz  $\alpha_{IIb}$  podenote GPIIb/IIIa in odsotnost CD61 oziroma  $\beta_3$  podenote tega glikoproteina lahko služi kot potrditev prisotnosti trombocitnih mikroveziklov.

Prisotnost tako CD42a, kot CD42b mikroveziklov v krvi bolnikov, nam pove, da je vezava tako mikroveziklov kot trombocitov na epitelij žil najverjetneje posredovana ravno preko kompleksa GPIb-IX-V ter preko vWF na celicah epitelija.

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili, lahko trdimo, da je za proučevanje mikroveziklov s pretočnim citometrom lahko zelo učinkovito orodje za pomoč pri diagnosticiranju HIT. Da pa bi v prihodnosti ta način diagnosticiranja bil edini, bi bilo potrebno te enake antigene uporabiti za proučevanje mikroveziklov, ki nastanejo pri ostalih vrstah imunske in neimunske pogojenih trombocitopenijah.

## 7 VIRI

- Aatonen M, Grönholm M, Siljander PR. 2012. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin Thromb Hemost* 38, 1: 102-113
- Arepally GM, Mayer IM. 2001. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood* 98, 4: 1252-1254
- Arepally G, Cines DB. 2002. Pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Autoimmun Rev* 1, 3: 125-132
- Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM. 1997. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 99, 7: 1546-1554
- Brieger DB, Mak KH, Kottke-Marchant K, Topol EJ. 1998. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Am Coll Cardiol* 31, 7: 1449-1459
- Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. 2005. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 105, 7: 2764-2770
- Chu AJ. 2011. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. *Int J Inflam* 2011: 367284
- Cicmil M, Thomas JM, Leduc M, Bon C, Gibbins JM. 2002. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. *Blood* 99, 1: 137-144
- Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. 2005. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 106, 5: 1604-1611
- Denys B, Stove V, Philippé J, Devreese K. 2008. A clinical-laboratory approach contributing to a rapid and reliable diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* 123, 1: 137-145
- Fabris F, Luzzatto G, Stefani PM, Girolami B, Cella G, Girolami A. 2000. Heparin-induced thrombocytopenia. *Haematologica* 85, 1: 72-81
- Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. 2003. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 197, 11: 1585-1598
- Falati S, Patil S, Gross PL, Stapleton M, Merrill-Skoloff G, Barrett NE, Pixton KL, Weiler H, Cooley B, Newman DK et al. 2006. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood* 107, 2: 535-541

- Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE. 2009. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113, 5: 1112-1121
- Gelderman MP, Simak J. 2008. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol* 484: 79-93
- Gibbins JM. 2004. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. *J Cell Sci* 117, 16: 3415-3425
- Greinacher A, Warkentin TE. 2006. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update. *Thromb Res* 118, 2: 165-176
- Greinacher A, Althaus K, Krauel K, Selleng S. 2010. Heparin-induced thrombocytopenia. *Hamostaseologie* 30, 1: 17-18, 20-28
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. 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, 11: 3791-3799
- Hickey MJ, Williams SA, Roth GJ. 1989. Human platelet glycoprotein IX: an adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 17: 6773-7
- Hirsh J, Raschke R. 2004. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126, 3: 188-203
- Hoffman M, Whinna HC, Monroe DM. 2006. Circulating tissue factor accumulates in thrombi, but not in hemostatic plugs. *J Thromb Haemost* 4, 9:2092-2093
- Horstman LL, Ahn YS. 1999. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 30, 2: 111-142
- Hugel B, Zobairi F, Freyssinet J-M. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2, 10: 1846-1847
- Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. 2005. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20: 22-7
- Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. 2003. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 109, 4: 175-80
- Jy W, Horstman WL, Jimenez JJ, Minagar A, Ahn YS. 2005. Circulating Cell-Derived Microparticles in Thrombotic and Inflammatory Disorders. V: Inflammatory Disorders of the Nervous System. Minagar A, Alexander JS. (ur.). Totowa, str: 91-102
- Kahng J, Park HH, Han K, Choi BY, Lee W. 2008. Quantitative comparisons of antibody-binding sites of platelet glycoprotein IIb/IIIa in aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Clin Lab Sci* 38, 1: 6-11

- Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, McEachron T, Pawlinski R, Arepally GM, Key NS, Mackman N. 2012. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRI. *Blood* 119, 22: 5285-5293
- Kotnik in sod., 2010. Imunološki priročnik. 1. izdaja. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunobiologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunobiologijo, str: 78-79
- Kottke-Marchant K. 2010. The Role of Coagulation in Arterial and Venous Thrombosis V: Antithrombotic Drug Therapy in Cardiovascular Disease. Askari AT in Lincoff AM. (ur.). Humana press, str: 19-38
- Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. 2010. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* 125, 4: 292-296
- Lasne D, Jude B, Susen S. 2006 From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth*; 53, 6: 2-11
- Lechner D, Weltermann A. 2008. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb Res* 122, 1: 47-54
- Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. 2011. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol* 33, 5: 455-467
- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. 1995. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332, 23: 1553-1559
- Lösche W, Scholz T, Temmler U, Oberle V, Claus RA. 2004. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets* 15, 2: 109-115
- Lubenow N, Hinz P, Thomaschewski S, Lietz T, Vogler M, Ladwig A, Jünger M, Nauck M, Schellong S, Wander K et al. 2010. The severity of trauma determines the immune response to PF4/heparin and the frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 115, 9: 1797-1803
- Luo SZ, Mo X, López JA, Li R. 2007. Role of the transmembrane domain of glycoprotein IX in assembly of the glycoprotein Ib-IX complex. *J Thromb Haemost* 5, 12: 2494-2502
- Lynch SF, Ludlam CA. 2007. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol* 137, 1: 36-48
- Maličev E., Dovč-Drnovšek T, Rožman P. 2012. Serološke in funkcijske preiskave pri diagnosticiranju trombocitopenije povzročene s heparinom (HIT). *Zdrav Vestn*, 81: 149-158
- Martel N, Lee J, Wells PS. 2005. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood* 106, 8: 2710-2715



- Massaguer A, Engel P, Tovar V, March S, Rigol M, Solanes N, Bosch J, Pizcueta P. 2003. Characterization of platelet and soluble-porcine P-selectin (CD62P). *Vet Immunol Immunopathol* 96, 3-4: 169-181
- Mause SF, Weber C. 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107, 9: 1047-1057
- Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR. 1999. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* 99, 19: 2577-2582
- Michelsen AE, Wergeland R, Stokke O, Brosstad F. 2006. Development of a time-resolved immunofluorometric assay for quantifying platelet-derived microparticles in human plasma. *Thromb Res* 117, 6: 705-711
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. 2011. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1: 15-26
- Newman PJ, Newman DK. 2003. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 6: 953-964
- Nomura S, Suzuki M, Kido H, Yamaguchi K, Fukuroi T, Yanabu M, Soga T, Nagata H, Kokawa T, Yasunaga K. 1992. Differences between platelet and microparticle glycoprotein IIb/IIIa. *Cytometry* 13, 6: 621-629
- Nomura S. 2004. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2, 10: 1847-1848
- Ogedegbe HO. 2002. An Overview of Hemostasis. *Lab Med* 12, 33: 948-953
- Owens AP, Mackman N. 2011. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 108, 10: 1284-1297
- Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. 2007. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 109, 12: 5242-5250
- Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A. 2009. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res* 58, 1: 1-8
- Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS. 2007. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A* 71, 1: 38-45
- Pierce TB, Razzuk MA, Razzuk, Hoover SJ. 1999. A comprehensive review of the physiology of hemostasis and antithrombotic agents. *BUMC Proceedings* 12: 39-49
- Plow EF, Kelly P. 2010. Platelets in Arterial Thrombosis. V: Antithrombotic Drug Therapy in Cardiovascular Disease. Askari AT, Lincoff AM. (ur.). str: 3-17
- Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ. 2010. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* 87, 3-4: 69-82
- Quinn M. 2005. Platelet Physiology. V: Platelet Function: Assessment, Diagnosis, and Treatment. Quinn M in Fitzgerald D. Humana press. Totowa, str 3-20

- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20, 9: 1487-1495
- Rathore V, Stapleton MA, Hillery CA, Montgomery RR, Nichols TC, Merricks EP, Newman DK, Newman PJ. 2003. PECAM-1 negatively regulates GPIb/V/IX signaling in murine platelets. *Blood* 102, 10: 3658-3664
- Rauova L, Arepally G, McKenzie SE, Konkle BA, Cines DB, Poncz M. 2009. Platelet and monocyte antigenic complexes in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *J Thromb Haemost* 7, 1: 249-252
- Rivera CE, Villagra J, Riordan M, Williams S, Lindstrom KJ, Rick ME. 2001. Identification of a new mutation in platelet glycoprotein IX (GPIX) in a patient with Bernard-Soulier syndrome. *Br J Haematol* 112, 1: 105-108
- Sandset PM. 2012. CXCL4-platelet factor 4, heparin-induced thrombocytopenia and cancer. *Thromb Res* 129, 1: 97-100
- Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP. 2003. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102, 7: 2678-2683
- Shet AS. 2008. Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag* 4, 4: 769-774
- Shojaie M, Sotoodah A, Roozmeh S, Kholoosi E, Dana S. 2009. Annexin V and anti-Annexin V antibodies: two interesting aspects in acute myocardial infarction. *Thromb J* 7:13
- Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. 2002. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 13, 4: 247-253
- Thai IM, Ashman LK, Harbour SN, Hogarth PM, Jackson DE. 2003. Physical proximity and functional interplay of PECAM-1 with the Fc receptor Fc gamma RIIa on the platelet plasma membrane. *Blood* 102, 10: 3637-3645
- Tzima E, Walker JH. 2000. Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets* 11, 5: 245-251
- Vandendries ER, Furie BC, Furie B. 2004. Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost* 92, 3: 459-466
- Vanhoorelbeke K, Ulrichs H, Van de Walle G, Fontayne A, Deckmyn H. 2007. Inhibition of platelet glycoprotein Ib and its antithrombotic potential. *Curr Pharm Des* 13, 26: 2684-2697
- Van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CP. 2008. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1783, 6: 953-963
- Van Wijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. 2003. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 59, 2: 277-287

- Vitale M, Tazzari P, Ricci F, Mazza MA, Zauli G, Martini G, Caimi L, Manzoli FA, Conte R. 2001. Comparison between different laboratory tests for the detection and prevention of heparin-induced thrombocytopenia. *Cytometry* 46, 5: 290-295
- Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, Kelton JG. 1994. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 84, 11: 3691-3699
- Warkentin TE. 1999. Heparin-induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. *Thromb Haemost* 82, 2: 439-447
- Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. 2000. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 96, 5: 1703-1708
- Warkentin TE, Kelton JG. 2001. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 344, 17: 1286-1292
- Warkentin TE. 2003. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol* 121, 4: 535-555
- Warkentin TE, Heddle NM. 2003. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep* 2, 2: 148-157
- Warkentin TE. 2005. New approaches to the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Chest* 127, 2: 35-45
- Warkentin TE, Sheppard JA. 2006. Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev* 20, 4: 259-272
- Warkentin TE, Sheppard JA, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A. 2006. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 108, 9: 2937-2941
- Warkentin TE. 2011. HIT paradigms and paradoxes. *J Thromb Haemost* 9, 1: 105-117
- Zwicker JJ, Lacroix R, Dignat-George F, Furie BC, Furie B. 2012. Measurement of Platelet Microparticles. V: Platelets and Megakaryocytes: Volume 3, Additional Protocols and Perspectives, *Methods in Molecular Biology*. Gibbins JM in Mahaut-Smith MP. (ur.). New York. Str 127-139

#### Elektronski viri

- Introduction to flow cytometry: A learning guide. April 2000. BD Biosciences, [http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med\\_80691.pdf](http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf) (6.dec.2013)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6403>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2152>

## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem somentorici doc. dr. Andreji Nataši Kopitar za potrpljenje in pomoč pri pisanju diplomske naloge ter številne drobne nasvete pri praktičnem delu diplome.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Alojzu Ihanu, ker mi je omogočil, da sem pod njegovim strokovnim vodstvom lahko opravljala diplomsko nalogo in spoznavala zanimivi svet mikroveziklov.

Zahvalila bi se tudi recenzentu prof. dr. Roku Kostanjšku za hiter pregled naloge in konstruktivno kritiko.

In nenazadnje hvala tudi predsednici komisije prof. dr. Kristini Sepčič za pregled diplomskega dela in udeležbo na zagovoru.

Zahvalila bi se tudi mojima staršema, ki sta bila zelo potrpežljiva in sta verjela vame ter Petru, Roku, Evi in Sari za spodbudne besede in pomoč pri pisanju.