

Received: 2014.09.10
Accepted: 2015.03.05
Published: 2015.08.18

Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego (EMP) rola w fizjologii i patologii

Endothelial microparticles (EMP) in physiology and pathology

Ewa Sierko^{1,2}, Monika Sokół¹, Marek Z. Wojtukiewicz^{1,2}

¹Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

²Białostockie Centrum Onkologii

Streszczenie

Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego (EMP) powstają w wyniku aktywacji i/lub apoptozy komórek śródbłonka naczyń (ECs). Na swojej powierzchni zawierają różne białka powierzchniowe, elementy cytoplazmatyczne oraz wykazują ekspresję wielu antygenów swoistych dla ECs. Stężenie fizjologiczne EMP we krwi obwodowej jest niewielkie. W stanach patologii wzrost zawartości EMP w osoczu krwi wpływa na proces krzepnięcia krwi, angiogenezę i reakcję zapalną. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego przyczyniają się do aktywacji procesu krzepnięcia krwi w sposób pośredni i bezpośredni. Aktywują kaskadę krzepnięcia krwi w sposób bezpośredni przez ekspresję na swojej powierzchni czynnika tkankowego (TF). Natomiast pośrednio również przyczyniają się do aktywacji procesu krzepnięcia przez obecność na ich powierzchni ujemnie naładowanych fosfolipidów, działających katalitycznie na kompleksy czynników krzepnięcia (TF/VII, kompleks protrombinazy i tenazy) i dostarczają miejsc wiążących czynnikiem krzepnięcia: IXa, VIII, Va, IIa. W warunkach *in vitro* EMP przenoszą TF na monocyty i aktywowane płytki krwi, wiążąc się z nimi przez cząsteczki adhezyjne. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego wykazują także ekspresję czynnika von Willebranda i w ten sposób mogą indukować agregację płytek krwi. Ponadto, wykazano, iż EMP odznaczają się wysoką ekspresją cząsteczek adhezyjnych, czynników wzrostu i metaloproteinaz (MMP-2 i MMP-9), wpływając tym samym na pobudzenie procesu angiogenezy. Co więcej, obecne na powierzchni EMP składowe dopełniacza C3 i C4 biorą udział w procesie zapalnym. W artykule przedstawiono dotychczasowy stan wiedzy na temat biologii i patofizjologii EMP oraz omówiono ich udział w patofizjologii różnych stanów chorobowych.

Słowa kluczowe:

mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego • EMP • krzepnięcie krwi • angiogeneza • proces zapalny

Summary

Endothelial microparticles (EMP) are released from endothelial cells (ECs) in the process of activation and/or apoptosis. They harbor adhesive molecules, enzymes, receptors and cytoplasmic structures and express a wide range of various constitutive antigens, typical for ECs, at their surface. Under physiological conditions the concentration of EMP in the blood is clinically insignificant. However, it was reported that under pathological conditions EMP concentration in the blood might slightly increase and contribute to blood coagulation, angiogenesis and inflammation. It has been shown that EMP directly and indirectly contribute to the activation of blood coagulation. Endothelial microparticles directly participate in blood coagulation through their surface tissue factor (TF) – a major initiator of blood coagulation. Furthermore, EMP exhibit procoagulant potential via expression of negatively charged phospholipids at their surface, which may promote assembly of coagulation enzymes (TF/VII, tenases and prothrombinase complexes), leading to

	<p>thrombus formation. In addition, they provide a binding surface for coagulation factors: IXa, VIII, Va and IIa. Moreover, it is possible that EMP transfer TF from TF-bearing EMP to activated platelets and monocytes by binding them through adhesion molecules. Also, EMP express von Willebrand factor, which may facilitate platelet aggregation. Apart from their procoagulant properties, it was demonstrated that EMP may express adhesive molecules and metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) at their surface and release growth factors, which may contribute to angiogenesis. Additionally, surface presence of C3 and C4 – components of the classical pathway – suggests pro-inflammatory properties of these structures.</p> <p>This article contains a summary of available data on the biology and pathophysiology of endothelial microparticles and their potential role in blood coagulation, angiogenesis and inflammation.</p>
Key words:	endothelial microparticles • EMP • blood coagulation • angiogenesis • inflammation
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1165195
Word count:	2883
Tables:	1
Figures:	–
References:	55

Adres autora: prof. Marek Wojtukiewicz, Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Ogrodowa 12, 15-027 Białystok; e-mail: onkologia@umb.edu.pl

WPROWADZENIE

Występowanie mikropęcherzyków pochodzenia śródbłonkowego (endothelial microparticles, EMP) we krwi obwodowej osób zdrowych po raz pierwszy udokumentowali Combes i wsp. [13] w 1999 r. Wykazali oni obecność tych struktur we krwi osób zdrowych po stymulacji TNF- α (tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworów). Obecność EMP (wielkość 0,1-1,5 μ m) we krwi obwodowej została ustalona pod mikroskopem elektronowym z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko swoistym antygenom obecnym na powierzchni EMP, tj. CD62E i CD31 w materiale uzyskanym przez odwirowanie pozostałych komponentów krwi obwodowej. Zasugerowany został również wpływ EMP na proces krzepnięcia krwi przez aktywację zależnej od czynnika tkankowego (TF, tissue factor) drogi krzepnięcia krwi. Zaobserwowano znacznie wyższe stężenie EMP we krwi chorych na zespół antyfosfolipidowy oraz u osób, u których występują zaburzenia krzepnięcia krwi [13].

Wiele czynników może wpływać na pobudzenie uwalniania mikropęcherzyków ze śródbłonka naczyń. Combes i wsp. stymulowali uwalnianie mikropęcherzyków (MP) ze śródbłonka naczyń cytokiną – TNF- α [13]. Powstały MP zawierających na swojej powierzchni cząstki adhezyjne oraz struktury powierzchniowe mające właściwości prokoagulacyjne [13]. We krwi osób zdrowych stężenia rozpuszczalnych postaci EMP osiągają wartości 1-70x10³/ml, stanowiąc 10-15% całkowitej populacji MP we krwi żyłnej [7]. Udokumentowano, że stężenie EMP we krwi zależy od płci (wyższe stężenie stwierdza się u kobiet niż u

mężczyzn), zmienia się w cyklu menstruacyjnym (wzrost zawartości EMP w fazie lutealnej), a także znacznie wzrasta w stanach patologii. Wyższe stężenie EMP wykazano we krwi w chorobach układu sercowo-naczyniowego, zaburzeniach hematologicznych, stanach związanych z uszkodzeniem śródbłonka naczyń, chorobach związanych z ostrym lub przewlekłym stanem zapalnym oraz w chorobach nowotworowych [4,18,38,50].

Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego mają na swojej powierzchni różne białka powierzchniowe oraz elementy cytoplazmatyczne, jak również wykazują ekspresję wielu antygenów swoistych dla komórek śródbłonka (ECs) [47]. Odmierna ekspresja fosfolipidów oraz specyficznych białek na powierzchni mikropęcherzyków charakterystycznych dla komórek, z których pochodzą, pozwoliły na ich identyfikację i podział [7,50]. Wyróżniono kilka rodzajów mikropęcherzyków, a ich nazewnictwo pochodzi od rodzaju komórki, z której powstają. We krwi obwodowej zidentyfikowano MP powstałe m.in. z płytek krwi, leukocytów, monocytów, ECs i erytrocytów. Różnią się między sobą wielkością, wywołanym skutkiem biologicznym oraz składem biochemicznym [26]. Przyjmuje się, że wielkość EMP nie przekracza 1 μ m [7]. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego zawierają na swojej powierzchni wiele antygenów charakterystycznych dla ECs: CD54 (ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, cząsteczka adhezji międzykomórkowej typu-1), CD62E (E-selectin, selektyna E), CD31 (PECAM: platelet endothelial cell adhesion molecule, cząsteczka adhezji komórkowej płytek krwi i komórek śródbłonka typu-1), CD105 (endoglin, a proliferation – associated protein, endoglina),

CD144 (vascular endothelial cadherin, VE-kadheryna), CD146 (S endo 1, and endothelial junctional protein, MAKAM-1), aneksyna V. Różnorodność ekspresji antygenów powierzchniowych była oceniana w warunkach *in vivo* i *ex vivo*. Dla EMP, które powstały w wyniku apoptozy ECs, najbardziej charakterystyczna jest ekspresja antygeny CD31, podczas gdy EMP powstałe w wyniku aktywacji ECs cechuje zwiększona ekspresja antygeny CD62E. Jimenez i wsp. wykazali, iż odłączane od śródbłonka mikropęcherzyki różnią się między sobą nie tylko jakościowo, ale i ilościowo [26]. EMP powstałe w wyniku aktywacji ECs mają wyższą ekspresję E-selektyny, natomiast EMP uwolnione ze śródbłonka naczyń w procesie apoptozy charakteryzują się wyższą ekspresją CD31, CD105 i aneksyny V [1,2,41,50].

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA POWSTANIE EMP

Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego są strukturami uformowanymi z błony komórkowej wskutek aktywacji ECs lub powstają w wyniku ich uszkodzenia. Uwalnianie EMP z EC naczyń jest ściśle związane ze stymulacją tych struktur różnymi czynnikami, do których należą: cytokiny (TNF- α , interleukina 1 β), lipopolisacharydy bakteryjne, reaktywne formy tlenu, inhibitory aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1), aktywowane białko C (APC, activated protein C), trombina, endotoksyny, autoprzeciwiactwa, składowe dopełniacza C5a oraz leki (np. statyna, cisplatyna, kamptotecyna). Ponadto, EMP powstają w wyniku niedotlenienia komórek [11,25,50].

Wiadomo, że w stanie spoczynku fosfolipidy błony komórkowej są utrzymywane w zewnętrznej bądź wewnętrznej warstwie dwuwarstwowej błony lipidowej dzięki trzem klasom transporterów wewnątrzłonowych: flipazy, flopazy i skramblazy. Błona komórkowa w spoczynku charakteryzuje się obecnością różnych fosfolipidów, w tym fosfatydylocholino i sfingomieliny, umiejscowionych po jej zewnętrznej stronie oraz fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydyloseryny (PS) - na jej wewnętrznej stronie. Aktywacja lub apoptoza komórek powoduje nagłe uwolnienie jonów wapnia z siateczki wewnątrzplazmatycznej znajdującej się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Gwałtowny wzrost stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki powoduje przejście błony komórkowej ze stanu spoczynku w stan aktywny. Dochodzi do utraty asymetrycznego rozmieszczenia lipidów w błonie komórkowej, co prowadzi do zmian w jej właściwościach fizycznych. W wyniku przypadkowych zmian położenia lipidów zaburzeniem może ulegać między innymi aktywność enzymatycznych białek cytoplazmatycznych. Przykładem takiego białka jest jeden z najlepiej scharakteryzowanych enzymów zależnych od fosfolipidów - kinaza białkowa C. Wiąże się z elementami cytoplazmatycznej powierzchni błony komórkowej. Enzym ten wymaga do pełnej aktywacji dwóch kofaktorów lipidowych: diacyloglicerolu i PS. Utrata asymetrii lipidowej obniża stężenia tych lipidów w warstwie wewnętrznej błony komórkowej i redukuje ich interakcje z kinazą białkową C i innymi białkami, które wiążą się przez PS z błoną komórkową. Przemieszczanie się PS, tj.

eksternalizacja, aktywuje w ten sposób enzymy znajdujące się w cytoplazmie, w tym kalpainę, prowadząc do rozpadu filamentów cytoszkieletu. Procesy te powodują tworzenie się nieregularnych wybrzuszeń błony komórkowej, które w końcowym etapie odrywają się od niej, tworząc mikropęcherzyki [25,39,42,51].

MECHANIZMY MOLEKULARNE PROWADZĄCE DO POWSTANIA EMPs

Wielu badaczy podjęło próbę zbadania molekularnych mechanizmów prowadzących do powstawania EMP. Wykazano, iż w procesie uwalniania MP ze śródbłonka naczyń po aktywacji trombiną zaangażowane są kinazy Rho/ROCKII (Rho-associated protein kinase) aktywowane przez kaspazę 2. Mechanizm uwalniania MP ze śródbłonka naczyń opiera się na aktywacji szlaku NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, czynnik jądrowy kappa beta) i składa się z dwóch etapów [14,44]. W pierwszym etapie dochodzi do łączenia się trombiny z receptorem PAR-1 (protease-activated receptor-1, receptor aktywowany przez proteazę typu 1), natomiast w drugim - bierze udział TRAIL/Apo2L (Apo2 ligand lub TNF-related apoptosis-inducing ligand), który należy do cytokin z superrodziny TNF- α [48]. W wyniku stymulacji trombiną dochodzi do uwolnienia TRAILS z ECs. Na powierzchni ECs znajdują się receptory TRAIL-R2, które przez wiązanie TRAILS inicjują rekrutację TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein, domenę śmierci związaną z receptorem TNF typu 1), a następnie TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), RIP (receptor interacting protein 1, białko reagujące z receptorem TNFR) i NF- κ B. Ten ostatni bierze udział w uwalnianiu EMP [12,32,44,48].

Curtis i wsp. wykazali, iż EMP powstałe w wyniku aktywacji śródbłonka naczyń przez czynniki zapalne, np. TNF- α , zwiększają uwalnianie rozpuszczalnego ICAM-1 z ECs, tym samym wzmagając powstawanie EMP z ECs [14]. Dochodzi zatem do powstania dodatniego sprzężenia zwrotnego. Wykazano również, że w ten proces jest zaangażowane białko p38, które aktywuje kaskadę kaspaz szlaku MAPK (mitogen-activated protein kinase, kinazy białkowe aktywowane mitogenami), który wpływa na uwalnianie EMP. Curtis i wsp. udokumentowali ponadto wpływ inhibitorów p38 na ograniczenie uwalniania EMP powstałych w wyniku stymulacji czynnikiem TNF- α , a także hamowanie aktywacji szlaku MAPK [14,44,48]. Jednak należy podkreślić, że wewnątrzkomórkowy mechanizm prowadzący do powstania EMP nadal pozostaje niewyjaśniony.

UDZIAŁ EMPs W KRZEPNIĘCIU KRWI

Istniejąca w warunkach fizjologii równowaga między elementami morfotycznymi krwi biorącymi udział w krzepnięciu krwi, a składowymi układu fibrynolizy jest utrzymywana dzięki właściwościom śródbłonka naczyń. W spoczynku śródbłonek naczyń stanowi naturalną barierę fizyczną uniemożliwiającą aktywację czynnika tkankowego przez składniki krwi krążącej. Dopiero w odpowiedzi na różne bodźce, np. cytokiny lub uszkodzenie komórek

śródbłonka, dochodzi do aktywacji TF. Substancje wydzielane przez ECs, tj. tlenek azotu (NO) i prostaglandyna I₂ (PGI₂), silnie hamują aktywność płytek krwi oraz aktywację neutrofilów i makrofagów. Działanie antykoagulacyjne ma również wytwarzana przez ECs antytrombina (AT), zwłaszcza w hamowaniu aktywacji krzepnięcia krwi. Antytrombina inaktywuje trombinę, a także czynniki IXa, Xa, XIa, XIIa oraz plazminę i kalikreinę. Komórki śródbłonka wytwarzają także kofaktor II heparyny inaktywujący trombinę, czynnik Xa, białko C (PC) i białko S oraz neksyny proteazowe typu 1 i 2 (neksyna 1 hamuje aktywność trombiny, plazminy i urokinazy). Na powierzchni ECs znajduje się także inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI - tissue factor pathway inhibitor), który wyhamowuje aktywację krzepnięcia krwi zależną od kompleksu TF/czynnik VIIa. Natomiast trombomodulina (TM), białko związane z powierzchnią EC stanowi kofaktor w procesie aktywacji PC, katalizowanej z udziałem trombiny. Aktywowane PC w obecności swojego kofaktora – białka S hamuje bezpośrednią aktywację protrombiny przez czynnik Va i Xa. Zaburzenie równowagi między czynnikami pro- i antykoagulacyjnymi obniża stężenia TFPI i TM, wpływając na pobudzenie krzepnięcia krwi [37,38]. Potencjał profibrynolityczny powierzchni wewnętrznej naczyń zapewnia powstawanie tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA, tissue-type plasminogen activator) oraz urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PA, urokinase-type plasminogen activator). W obecności fibryny proteazy serynowe nasilają proces przekształcania plazminogenu w plazminę. Aktywacja plazminogenu może następować również bez obecności fibryny jako kofaktora - w wyniku wiązania t-PA i plazminogenu z występującą na powierzchni śródbłonka naczyń aneksyną II, będącą koreceptorem aktywującym [1,24,52].

Stwierdzono, że EMP przyczyniają się do aktywacji procesu krzepnięcia krwi w sposób pośredni i bezpośredni. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego aktywują bowiem kaskadę krzepnięcia krwi w sposób bezpośredni przez ekspresję na swojej powierzchni TF. Furie i wsp. stwierdzili, że TF na powierzchni MP jest nieaktywny, a jego aktywacja następuje w wyniku zetknięcia się ze ścianą uszkodzonego naczynia [15,22]. Znajdująca się na powierzchni EMP fosfatydyloseryna ma zdolność wiązania i aktywacji czynników krzepnięcia krwi. Zdolność EMP do pośredniczenia w tworzeniu trombiny została po raz pierwszy zaobserwowana w hodowlach ECs, w których wykazano krótszy czas krzepnięcia osocza krwi i zwiększone stężenie EMP uwolnionych *in vivo* w porównaniu do kontrolnego osocza krwi [18,19]. Ponadto, w warunkach *in vitro* EMP, zawierające na powierzchni TF, cechują się obecnością cząsteczek adhezyjnych, które pozwalają na ich wiązanie się z innymi komórkami. Wykazano, iż EMP uczestniczą w przenoszeniu TF na monocyty i aktywowane płytki krwi, przyczyniając się do zwiększenia przewagi czynników prokoagulacyjnych nad antykoagulacyjnymi [33,38].

Właściwości prokoagulacyjne EMP są dodatkowo wzmocnione przez obecność na ich powierzchni ujemnie naładowanych fosfolipidów, działających katalitycznie na

kompleksy koagulacyjne (TF/VII, kompleks protrombiny i tenazy), przyczyniając się pośrednio do aktywacji krzepnięcia krwi [30,31]. Powstały włóknik w warunkach fizjologii jest odpowiedzią na uszkodzenie naczynia, natomiast w patologii przyczynia się do tworzenia zakrzepów i uszkodzenia narządów. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego dostarczają także miejsc wiążących dla czynników: IXa, VIIIa, Va, IIa, a wzrost ich stężenia we krwi dodatkowo koreluje z czasem krzepnięcia krwi. EMP wykazują ekspresję czynnika von Willebranda i w ten sposób mogą prawdopodobnie indukować agregację płytek krwi. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego wpływają także na obniżenie stężeń TFPI oraz TM działających antykoagulacyjnie i tworzenie zakrzepu przez wiązanie płytek krwi za pośrednictwem P-selektyny (znajdującej się na powierzchni EMP). Wszystkie powyższe czynniki predysponują do wytworzenia stanu prokoagulacyjnego [9,13,17].

Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) jest inhibitorem uPa i tPA, zaangażowanym w regulowanie procesu fibrynolizy oraz głównym czynnikiem wpływającym na powstawanie EMP. Stężenie PAI-1 wzrasta we krwi u pacjentów w chorobach przebiegających z uszkodzeniem śródbłonka naczyń i ekspresją uPAR. Brodsky i wsp. wykazali, iż leczenie pacjentów za pomocą PAI-1 prowadzi do zwiększonej ekspresji fosfatydyloseryny na zewnętrznej błonie EMP [8]. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego, przez aktywację czynnika VIIa z udziałem TF, wpływają na aktywację kaskady krzepnięcia krwi i tworzenie trombiny. Należy jednak pamiętać, że trombina stymuluje syntezę PAI-1. W ten sposób tworzy się zamknięty krąg, który może potencjalnie stanowić brakujące ogniwo między znacznie podwyższonym stężeniem PAI-1 we krwi i stanem prokoagulacyjnym, obserwowanym w wielu chorobach przebiegających z uszkodzeniem śródbłonka naczyń. Powyższe obserwacje wskazują, że wzrost stężenia EMP we krwi aktywuje i/lub wspomaga proces krzepnięcia krwi [18,29,40].

Wykazano, że u około 20% chorych na nowotwory złośliwe występują epizody zakrzepowe, które są najczęstszym powikłaniem i drugą przyczyną ich śmierci. Dowiedziono, że stężenie EMP znacznie wzrasta w chorobach nowotworowych, przyczyniając się do powstawania zakrzepów i zwiększania śmiertelności pacjentów. W chorobie nowotworowej MP stanowią główne źródło aktywnego TF [15,22]. U chorych na raka piersi lub trzustki stwierdzono dwukrotny wzrost stężenia EMP w osoczu krwi w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Ponadto wykazano u nich obecność D-dimerów (produktów rozpadu fibryny) oraz wzrost stężenia rozpuszczalnej P-selektyny, pochodzącej z EMP [10]. Wyniki badań nad EMP u chorych na nowotwory sugerują, że EMP pełnią ważną rolę w patogenie stanu prozakrzepowego, który nie zależy od stopnia złośliwości nowotworu, typu nowotworu i jego stadium zaawansowania klinicznego. Brak jest, jak dotąd, danych dotyczących możliwości ewentualnego zastosowania EMP jako biomarkera w ocenie ryzyka zakrzepicy [16,23,27,36].

UDZIAŁ EMPs W ANGIOGENEZIE

Angiogeneza (neowaskularyzacja) jest procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących. W okresie pozapłodowym w warunkach fizjologicznych rzadko tworzą się nowe naczynia. Natomiast w stanach patologii często dochodzi do proliferacji ECs i tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Powstawanie naczyń można zaobserwować w wielu chorobach, np. w miażdżycy czy w stanach zapalnych (łuszczyca, choroby autoimmunologiczne, retinopatia cukrzycowa). Jednak angiogeneza ma szczególne znaczenie w procesach nowotworowych. Neowaskularyzacja jest kontrolowana dzięki równowadze między aktywnością cząsteczek nasilających tworzenie nowych naczyń i tych, które hamują ich powstawanie. Proces angiogenezy jest wieloetapowy i rozpoczyna się od pobudzenia ECs, degradacji błony podstawnej oraz struktur macierzy zewnątrzkomórkowej, a następnie do proliferacji ECs z utworzeniem nowego naczynia, które z czasem zostaje otoczone błoną podstawną, mięśniówką i przydanką. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych zależy od wielu czynników, wśród których szczególnie istotne są m.in. VEGF (vascular endothelial growth factor, czynnik wzrostu śródbłonka naczyń), bFGF (basic fibroblast growth factor, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów), MMP (matrix metalloproteinase, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej) i integryny [53,54].

W początkowej fazie rozwoju guz nowotworowy nie wymaga obecności naczyń krwionośnych. Jednak okazuje się, że większość nowotworów nie może wzrastać powyżej 2-3 mm³ bez wytworzenia sieci drobnych naczyń krwionośnych, które są niezbędne do dostarczania tlenu i substancji odżywczych komórkom nowotworowym. Powstanie nowych naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym umożliwia jego progresję miejscową i tworzenie się przerzutów odległych [53].

Leroyer i wsp. wykazali, że EMP powstałe *in vivo* z niedotlenionej tkanki mięśniowej indukują proliferację ECs i mogą pobudzać tworzenie nowych naczyń krwionośnych [32]. W licznych badaniach wykazano, że EMP, a także MP powstałe z komórek nowotworowych są uwalniane m.in. w wyniku chemioterapii [30]. Wykazują wysoką ekspresję cząsteczek adhezyjnych, czynników wzrostu i metaloproteinaz. EMP zawierają proenzymy metaloproteinaz (pro-MMP-2, pro-MMP-9) oraz ich aktywne postaci, tj. MMP-2 i MMP-9. Obie są akumulowane w cytoplazmie ECs, potwierdzając tym samym istnienie wewnątrzkomórkowego magazynu i mechanizmu aktywującego proces angiogenezy [3,49]. Cząsteczki te stymulują tworzenie się naczyń krwionośnych, przyczyniając się do wzrostu guza nowotworowego. Ponadto, uwolnione komórki nowotworowe charakteryzujące się wysoką ekspresją TF oraz ligandu Fas indukują uszkodzenie ECs, powodując uwalnianie m.in. EMP [32,43,45]. Wyniki badań *in vitro* przeprowadzonych przez Mezentseva i wsp. wskazują na zmniejszenie tempa proliferacji ECs wraz ze zwiększeniem stężenia EMP we krwi w porównaniu do grupy

kontrolnej [34]. Natomiast wyniki otrzymane przez Taraboletti i wsp. świadczą, iż wpływ EMP na angiogenezę zależy od liczby struktur morfotycznych we krwi. Przy małych stężeniach EMP obserwuje się pobudzenie powstawania nowych naczyń krwionośnych, podczas gdy przy wyższych - hamowanie angiogenezy. W związku ze sprzecznymi doniesieniami dotyczącymi udziału EMP w

Tabela 1. Udział poszczególnych cząsteczek obecnych na powierzchni mikropęcherzyków pochodzenia śródbłonkowego (EMP) w procesach adhezji, krzepnięcia krwi, fibrynolizy i angiogenezy

Procesy	Cząsteczki obecne na powierzchni EMP
Adhezja (cząsteczki adhezyjne)	PECAM-1 (CD31 - platelet endothelial cell adhesion molecule-1)
	ICAM-1 (CD54 - intercellular cell adhesion molecule-1)
	E-selektyna (CD62E - endothelial selectin)
	VE-kadheryna (CD144 - vascular endothelial cadherin)
	S-endo (CD146 - melanoma cell adhesion molecule)
Krzepnięcie krwi	endogлина (CD105 - endoglin)
	TF (tissue factor)
	TM (thrombomodulin)
	EPCR (endothelial protein C receptor)
	Fosfatydyloseryna (phosphatidyloseryne)
Fibrynoliza	APC (activated protein C)
	uPAR (urokinase plasminogen activator receptor)
	uPA (urokinase-type plasminogen activator)
Angiogeneza	MMP (matrix metalloproteases)
	VE-kadheryna (vascular endothelial cadherin)
	VEGF-R2 (vascular endothelial growth factor receptor type 2)
Nieznana rola	α v integrin (CD51 - α v integrin) T-kadheryna (CDH13 - T-cadherin)

tworzeniu i naprawie naczyń, wpływ EMP na angiogenezę jest niepewny i wymaga pogłębienia badań dotyczących tego zagadnienia [49].

UDZIAŁ EMPs W PROCESIE ZAPALNYM

Bezpośredni wpływ EMP *in vivo* na rozwój zapalenia nie został w pełni poznany. Jednak zaobserwowano podwyższone stężenie tych struktur we krwi osób z chorobami o podłożu zapalnym (zarówno infekcyjne, jak i autoimmunologiczne), co sugeruje istnienie związku między procesem zapalnym a stężeniem EMP w ich krwi. Warto podkreślić, iż EMP pojawiają się we krwi w wyniku uszkodzenia śródbłonna naczyń i trwającego procesu zapalnego [6,20]. W badaniu przeprowadzonym przez Piccina i wsp. wykazano, iż stężenia EMP w osoczu krwi korelują z zawartością IL-6, co sugeruje, że powstanie EMP ze śródbłonna naczyń i rozwijający się proces zapalny są ze sobą nierozzerwanie związane [41]. Wyniki tych badań wskazują, że prawdopodobnie EMP stymulują komórki do syntezy cytokin prozapalnych. TNF- α zwiększa uwalnianie EMP z ECs przez aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału oraz wpływa na pobudzenie syntezy innych cytokin prozapalnych i cząsteczek adhezyjnych. Nie jest wykluczone, że powyższe zależności mają charakter „samonapędzającego się koła” [6,41].

Nauta i wsp. wykazali, że mikropęcherzyki wyizolowane z ludzkiego osocza krwi charakteryzują się ekspresją C1q, C3 i C4 na swojej powierzchni, co wskazuje na ich bezpośredni udział w aktywacji układu dopełniacza [37]. Układ dopełniacza składa się prawie z 40 białek, które przez wspomaganie procesu fagocytozy nasilają toczącą się reakcję zapalną, uczestnicząc w obronie organizmu gospodarza przed różnorodnymi czynnikami, np. drobnoustrojami. W miejscu objętym zakażeniem zwiększa się przepływ krwi oraz wzrasta przepuszczalność naczyń włosowatych, co ułatwia przechodzenie mediatorów reakcji zapalnej przez śródbłonek naczyń krwionośnych [37].

Wyróżnia się trzy drogi aktywacji dopełniacza: klasyczna, alternatywną i lektynową. Klasyczna droga aktywacji kompleksu została opisana po raz pierwszy w 1890 r. Aktywacja układu dopełniacza rozpoczyna się w chwili połączenia kompleksu antygen-przeciwciała z obecną w surowicy cząsteczką C1q dopełniacza, co prowadzi do dysocjacji kompleksu C1 i powstania składowych C1q, C1r i C1s. Uwolnione składowe dopełniacza rozszczepiają kolejne składniki układu (C4, C4a, C4b, C2, C2a, C2b) w sposób kaskadowy. W końcowym etapie tego procesu powstały kompleks atakujący błonę - MAC (membrane attack complex) powoduje powstanie porów w obrębie błony komórkowej. Klasyczna droga aktywacji układu dopełniacza prowadzi do litycznej śmierci komórki docelowej [28]. Nauta i wsp. [37] wykazali, iż w warunkach *in vitro* C1q wiąże się z MP uwolnionymi z hodowli komórek Jurkat, co powoduje usunięcie składowych układu dopełniacza C3 i C4 z powierzchni MP. Usunięcie wczesnych składowych klasycznej drogi układu dopełniacza może wywołać powstanie typowego skutku prozapalnego [5,37]. Wyniki badań wskazują także na udział EMP w aktywacji procesu zapalnego. W związku z tym EMP przyczyniają się nie tylko do rozwoju procesu zapalnego, ale również są skutkiem tego procesu.

Obecnie badane są relacje między stężeniami we krwi EMP i APC (aktywowane białko C). Można domniemywać, iż oba te parametry mogą być wykorzystywane do monitorowania przebiegu choroby u pacjentów po operacjach chirurgicznych i osób z przewlekłymi chorobami zapalnymi, np. chorobami reumatycznymi [21].

PODSUMOWANIE

Mimo iż minęło ponad 15 lat odkąd EMP zostały opisane po raz pierwszy, wiedza na temat mechanizmów ich powstawania i ich roli w warunkach patologii nie są do końca poznane. Wielu autorów udokumentowało udział EMP w procesie krzepnięcia krwi. Nadal prowadzone są badania nad wpływem EMP na procesy angiogenezy i zapalenia.

PIŚMIENICTWO

[1] Abid Hussein M.N., Böing A.N., Biró E., Hoek F.J., Vogel G.M., Meuleman D.G., Sturk A., Nieuwland R.: Phospholipid composition of *in vitro* endothelial microparticles and their *in vivo* thrombogenic properties. *Thromb. Res.*, 2008; 121: 865-871

[2] Abid Hussein M.N., Meesters E.W., Osmanovic N., Romijn F.P., Nieuwland R., Sturk A.: Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection *ex vivo*. *J. Thromb. Haemost.*, 2003; 1: 2434-2443

[3] Aharon A., Brenner B.: Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract. Res. Clin. Hematol.*, 2009; 22: 61-69

[4] Amabile N., Rautou P.E., Tedgui A., Boulanger C.M.: Microparticles: key protagonists in cardiovascular disorders. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010; 36: 907-916

[5] Angelot F., Seillès E., Biichlé S., Berda Y., Gaugler B., Plumas J., Chaperot L., Dignat-George F., Tiberghien P., Saas P., Garnache-Ot-

to F.: Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica*, 2009; 94: 1502-1512

[6] Ardoin S.P., Shanahan J.C., Pisetsky D.S.: The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand. J. Immunol.*, 2007; 66: 159-165

[7] Brodsky S.V.: Endothelial microparticles: mediators or markers of endothelial cell dysfunction? *Curr. Hypertens. Rev.*, 2008; 4: 78-85

[8] Brodsky S.V., Malinowski K., Golightly M., Jesty J., Goligorsky M.S.: Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*, 2002; 106: 2372-2378

[9] Brogan P.A., Dillon M.J.: Endothelial microparticles and the diagnosis of the vasculitides. *Intern. Med.*, 2004; 43: 1115-1119

- [10] Celi A., Lorenzet R., Furie B.C., Furie B.: Microparticles and a P-selectin-mediated pathway of blood coagulation. *Dis. Markers*, 2004; 20: 347-352
- [11] Chironi G.N., Boulanger C.M., Simon A., Dignat-George F., Freyssinet J.M., Tedgui A.: Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.*, 2009; 335: 143-151
- [12] Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., Bosh M., Dewar A., Olson M.F.: Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 339-345
- [13] Combes V., Simon A.C., Grau G.E., Arnoux D., Camoin L., Sabatier F., Mutin M., Sanmarco M., Sampol J., Dignat-George F.: *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J. Clin. Invest.*, 1999; 104: 93-102
- [14] Curtis A.M., Wilkinson P.F., Gui M., Gales T.L., Hu E., Edelberg J.M.: p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, 2009; 7: 701-709
- [15] Davila M., Amirhosravi A., Coll E., Desai H., Robles L., Colon J., Baker C.H., Francis J.L.: Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J. Thromb. Haemost.*, 2008; 6: 1517-1524
- [16] Davizon P., López J.A.: Microparticles and thrombotic disease. *Curr. Opin. Hematol.*, 2009; 16: 334-341
- [17] Diamant M., Tushuizen M.E., Sturk A., Nieuwland R.: Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur. J. Clin. Invest.*, 2004; 34: 392-401
- [18] Dignat-George F.: Microparticles in vascular diseases. *Thromb. Res.*, 2008; 122 (Suppl. 1): S55-S59
- [19] Dignat-George F., Boulanger C.M.: The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011; 31: 27-33
- [20] Distler J.H., Huber L.C., Gay S., Distler O., Pisetsky D.S.: Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity*, 2006; 39: 683-690
- [21] Freyssinet J.M.: Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J. Thromb. Haemost.*, 2003; 1: 1655-1662
- [22] Furie B., Zwicker J., Zarocca T., Kos C., Bauer B., Furei B.C.: Tissue factor-bearing microparticles and cancer-associated thrombosis. *Hematol. Rep.*, 2005; 8: 5-8
- [23] Héloire F., Weill B., Weber S., Batteux F.: Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. *Thromb. Res.*, 2003; 110: 173-180
- [24] Hoffman M., Monroe D.M. 3rd: A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.*, 2001; 85: 958-965
- [25] Horstman L.L., Jy W., Jimenez J.J., Ahn Y.S.: Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front. Biosci.*, 2004; 9: 1118-1135
- [26] Jimenez J.J., Jy W., Mauro L.M., Soderland C., Horstman L.L., Ahn Y.S.: Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.*, 2003; 109: 175-180
- [27] Jy W., Jimenez J.J., Mauro L.M., Horstman L.L., Cheng P., Ahn E.R., Bidot C.J., Ahn Y.S.: Endothelial microparticles induce formation of platelets aggregates via a von Willebrand factor/ristocetin dependent pathway, rendering them resistant to dissociation. *J. Thromb. Haemost.*, 2005; 3: 1301-1308
- [28] Klaska I., Nowak J.Z.: Rola układu dopełniacza w fizjologii i patologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 167-177
- [29] Lacroix R., Sabatier F., Mialhe A., Basire A., Pannell R., Borghi H., Robert S., Lamy E., Plawinski L., Camoin-Jau L., Gurewich V., Angeles-Cano E., Dignat-George F.: Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood*, 2007; 110: 2432-2439
- [30] Lechner D., Kollars M., Gleiss A., Kyrle A., Weltermann A.: Chemotherapy-induced thrombin generation via procoagulant endothelial microparticles is independent of tissue factor activity. *J. Thromb. Haemost.*, 2007; 5: 2445-2452
- [31] Lechner D., Weltermann A.: Chemotherapy-induced thrombosis: a role for microparticles and tissue factor? *Semin. Thromb. Hemost.*, 2008; 34: 199-203
- [32] Leroyer A.S., Anfosso F., Lacroix R., Sabatier F., Simoncini S., Njock S.M., Jourde N., Brunet P., Camoin-Jau L., Sampol J., Dignat-George F.: Endothelial-derived microparticles. Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.*, 2010; 104: 456-463
- [33] Lynch S.F., Ludlam C.A.: Plasma microparticles and vascular disorders. *Br. J. Haematol.*, 2007; 137: 36-48
- [34] Mezentsev A., Merks R.M., O'Riordan E., Chen J., Mendelev N., Goligorsky M.S., Brodsky S.V.: Endothelial microparticles affect angiogenesis *in vitro*: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005; 289: H1106-H1114
- [35] Morel O., Jesel L., Freyssinet J.M., Toti F.: Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011; 31: 15-26
- [36] Morel O., Toti F., Morel N., Freyssinet J.M.: Microparticles in endothelial cell and vascular homeostasis: are they really noxious? *Haematologica*, 2009; 94: 313-317
- [37] Nauta A.J., Trouw L.A., Daha M.R., Tijmsa O., Nieuwland R., Schwaeble W.J., Gingras A.R., Mantovani A., Hack E.C., Roos A.: Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur. J. Immunol.*, 2002; 32: 1726-1736
- [38] Nomura S., Ozaki Y., Ikeda Y.: Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb. Res.*, 2008; 123: 8-23
- [39] Obońska K., Grąbczewska Z., Fisz J.: Ocena czynności śródbłonka naczyńowego – gdzie jesteśmy, dokąd zmierzamy? *Folia Cardiol. Excerpta*, 2010; 5: 292-297
- [40] Peterson D.B., Sander T., Kaul S., Wakim B.T., Halligan B., Twigger S., Pritchard K.A. Jr., Oldham K.T., Ou J.S.: Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics*, 2008; 8: 2430-2446
- [41] Piccin A., Murphy W.G., Smith O.P.: Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.*, 2007; 21: 157-171
- [42] Radziwon P., Kłoczko J., Kiss B.: Współczesna teoria aktywacji i kontroli krzepnięcia krwi. *Przew. Lek.*, 2004; 11: 50-56
- [43] Rak J.: Microparticles in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2010; 36: 888-906
- [44] Sapet C., Simoncini S., Loriod B., Puthier D., Sampol J., Nguyen C., Dignat-George F., Anfosso F.: Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*, 2006; 108: 1868-1876
- [45] Shai E., Varon D.: Development, cell differentiation, angiogenesis - microparticles and their roles in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011; 31: 10-14
- [46] Sierko E., Wojtukiewicz M.Z.: Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004; 30: 95-108
- [47] Simak J., Gelderman M.P.: Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus. Med. Rev.*, 2006; 20: 1-26
- [48] Simoncini S., Njock M., Robert S., Camoin-Jau L., Sampol J., Harlé J.R., Nguyen C., Dignat-George F., Anfosso F., TRAIL/Apo2L mediates

the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin *in vitro*: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res.*, 2009; 104: 943-951

[49] Taraboletti G., D'Ascenzo S., Borsotti P., Giavazzi R., Pavan A., Dolo V.: Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, 2002; 160: 673-680

[50] Tesse A., Martinez M.C., Meziani F., Hugel B., Panaro M.A., Mitolo V., Freyssinet J.M., Andriantsitohaina R.: Origin and biological significance of shed-membrane microparticles. *Endocr. Metab. Immune Drug Targets*, 2006; 6: 287-294

[51] Wnuczko K., Szczepański M.: Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol. Merk. Lek.*, 2007; 133, 60-66

[52] Wojtukiewicz M.Z.: Zakrzepy a nowotwory. W: Zakrzepy i zatory. Łopaciuk W. (red.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002; 105-124

[53] Wojtukiewicz M.Z., Sierko S.: Podstawy angiogenezy w nowotworach. *Nowotwory. J. Oncol.*, 2008; 58 (Suppl. 4): 13-16

[54] Wojtukiewicz M.Z., Sierko E., Rak J.: Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2004; 30: 5-20

[55] Zielonka T.: Angiogeneza. Mechanizmy powstawania naczyń krwionośnych. *Alerg. Astma Immunol.*, 2003; 8: 169-174

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.