

VETERINARSKA FAKULTETA
UNIVERZE V *LJUBLJANI*

MIKROVEZIKLI V TELESNIH TEKOČINAH ŽIVALI IN
ČLOVEKA

MICROVESICLES IN BODY FLUIDS OF ANIMALS
AND HUMAN

Rok Hrženjak
Roman Štukelj

Ljubljana, 2010

VETERINARSKA FAKULTETA
UNIVERZE V LJUBLJANI

UDK 57.08:577.352:537.533.35(043.2)

**MIKROVEZIKLI V TELESNIH TEKOČINAH ŽIVALI IN
ČLOVEKA**

**MICROVESICLES IN BODY FLUIDS OF ANIMALS
AND HUMAN**

Rok Hrženjak
Roman Štukelj

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom pod mentorstvom izr. prof. dr. Veronike Kralj-Iglič in somentorstvom prof. dr. Vojteha Cestnika, v Laboratoriju za klinično biofiziko Inštituta za biofiziko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, v okviru programa P2-0232 in projekta J3-2120.

Ljubljana, 2010

Kazalo

1	Povzetek	III
2	Summary	IV
3	Seznam objavljenih del	V
4	Razlaga kratic	VI
5	Uvod	1
5.1	Mikrovezikli in njihov klinični pomen	1
5.2	Določanje mikroveziklov	3
6	Namen in hipoteze	7
7	Material in metode	8
7.1	Preiskovanci	8
7.2	Kemikalije	9
7.3	Priprava plazme in izolacija mikroveziklov	9
7.3.1	Odvzem krvi	9
7.3.2	Odvzem ostalih telesnih tekočin	9
7.3.3	Ločitev krvnih celic od plazme	11
7.3.4	Izolacija mikroveziklov iz krvne plazme	11
7.3.5	Izolacija mikroveziklov iz ostalih telesnih tekočin živali in človeka	12
7.3.6	Merjenje števila mikroveziklov s pretočnim citometrom	13
7.4	Vrstična elektronska mikroskopija	14
7.4.1	Predpriprava vzorca za elektronsko mikroskopijo	14
7.4.2	Priprava vzorca za vrstično elektronsko mikroskopijo	15
7.4.3	Slikanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom	15
7.4.4	Merjenje povprečne velikosti populacije mikroveziklov	16
8	Rezultati	17
8.1	Morfološke značilnosti mikroveziklov, izoliranih iz telesnih tekočin živali in človeka	17
8.2	Vpliv temperature na število mikroveziklov v izolatih periferne krvi	28
9	Razprava	29
9.1	Morfološke značilnosti mikroveziklov, izoliranih iz telesnih tekočin živali in človeka	29

9.2	Vpliv zunanjih parametrov in dinamike izolacije na število mikroveziklov v izolatih periferne krvi	30
10	Zaključki	34
11	Zahvala	35
12	Popravek	36
13	Literatura	37
14	Dodatek	49

1 Povzetek

Ključne besede: mikrovezikli - kri; celična komunikacija; celična membrana - fiziologija; hemostaza; elektronska mikroskopija

Uvod: Mikrovezikulacija celičnih membran je pojav, pri katerem se brsti celične membrane odcepijo od materinske celice in ob prehodu v krvni in limfni obtok postanejo bolj ali manj prosto gibljivi po telesu. Ti fragmenti, ki jim pravimo mikrovezikli (dimenzije manj kot mikrometer), lahko interagirajo z oddaljenimi celicami in tako predstavljajo komunikacijski sistem, ki povezuje celoten organizem. Klinične študije kažejo, da mikrovezikli delujejo prokoagulantno in sodelujejo pri razširjanju metastaz in vnetja. Metoda določanja mikroveziklov pa še ni dovolj ponovljiva in zanesljiva, da bi bila uporabna v klinični praksi, predvsem zaradi velike občutljivosti metode na različne zunanje parametre, kot je na primer temperatura, in na dinamiko procesa izolacije.

Namen: Namen naloge je izboljšanje razumevanja mehanizmov mikrovezikulacije med procesom izolacije mikroveziklov. Ugotoviti smo želeli, kaj vsebujejo izolati različnih telesnih tekočin in kako temperatura med procesom izolacije vpliva na število mikroveziklov v izolatih iz periferne krvi.

Hipoteze: Mikrovezikli so prisotni v vseh telesnih tekočinah živali in človeka. Temperatura med postopkom izolacije pomembno vpliva na število mikroveziklov v izolatu iz periferne krvi; število mikroveziklov v izolatih iz periferne krvi je večje, če izolacija poteka pri nižjih temperaturah.

Metode: Mikrovezikle smo izolirali s centrifugiranjem in izpiranjem. Temperaturo med izolacijo smo regulirali s toplotno kopeljo. Mikrovezikle v izolatih smo šteli s pretočnim citometrom. Izolate in sedimente vzorcev, v katerih so bile celice, smo slikali z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

Rezultati: Slike, dobljene z vrstičnim elektronskim mikroskopom, potrjujejo, da so v izolatih prisotni mikrovezikli. Potrdili smo tudi hipotezo, da je število mikroveziklov v izolatih iz periferne krvi večje, če postopek poteka pri nižjih temperaturah. Rezultati kažejo, da večina mikroveziklov, izoliranih iz periferne krvi, nastane po odvzemu krvi.

Zaključki: Mikrovezikli so prisotni v vseh obravnavanih telesnih tekočinah. Pri krvi dobimo večje število mikroveziklov v izolatih, če postopek izolacije poteka pri nižjih temperaturah. V okviru obstoječih možnosti predlagamo izboljšavo protokola za izolacijo mikroveziklov iz krvi glede na temperaturo, ki naj bo 37 °C namesto sobne temperature.

2 Summary

Key words: cell - derived microparticles - blood; cell communication; cell membrane - physiology; hemostasis; microscopy, electron

Introduction: In microvesiculation of cellular membranes, the membrane buds are pinched off the mother cell and with circulation become more or less mobile within the body. These membrane-enclosed fragments of cell interior, called microvesicles (less than a micrometer in size), can interact with distant cells and represent a communication system which connects the entire organism. Clinical studies, however, indicate that microvesicles also act as procoagulants, promoters of metastases and inflammation mediators. The method used for detecting microvesicles is neither repeatable enough, nor is it sufficiently reliable to be used in clinical practice as it is sensitive to different external parameters (such as temperature) and dynamics of the isolation process.

Aim: The aim of our work was to improve the understanding of microvesiculation mechanisms and improve the method for the determination of microvesicles. It was our wish to investigate the contents of isolates from different body fluids and to determine the impact of temperature during isolation on the population of microvesicles in peripheral blood isolates.

Hypotheses: Microvesicles are present in all (animal and human) body fluids. The temperature during the isolation procedure has an important impact on the microvesicle population in peripheral blood isolates. The number of microvesicles in peripheral blood isolates is higher if the isolation takes place at lower temperatures.

Methods: Microvesicles were isolated by centrifugation and washing of samples. The temperature during isolation was controlled with the use of a thermal bath. Microvesicles in isolates were counted with a flow cytometer. Pictures of isolates and of sediments of samples containing cells were taken with a scanning electron microscope.

Results: Pictures taken with the scanning electron microscope confirm that microvesicles were present in all the investigated isolates. We confirmed our hypothesis that the population of microvesicles in peripheral blood isolates is higher when the procedure is performed at lower temperatures. It is indicated that the majority of microvesicles, isolated from peripheral blood is generated after taking of blood samples.

Conclusions: Microvesicles are present in all body fluids considered. Isolates from blood contain larger number of microvesicles if the isolation procedure is performed at lower temperatures. Within the existing possibilities we suggest an improvement of the protocol for isolation of microvesicles from blood regarding the temperature which should be 37 °C instead of room temperature.

3 Seznam objavljenih del

Članek

1. Mrvar-Brečko A, Šuštar V, Janša V, **Štukelj R**, Janša R, Mujagić E, Kruljc P, Hägerstrand H, Iglič A, Kralj-Iglič V. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 44: 307-12.

Objavljeni prispevki na znanstvenih srečanjih

1. Janša V, Bedina-Zavec A, Janša R, Šuštar V, **Štukelj R**, Štabuc B, Kralj-Iglič V. Number of microvesicles in patients with gastrointestinal stromal tumours treated by imatinib. In: 6th Conference on Experimental and Translational Oncology: book of abstracts. Kranjska Gora: 2010: 106.
2. Sušanj P, Bedina-Zavec A, Frank M, Šuštar V, **Štukelj R**, Tomšič N, Rozman B, Kralj-Iglič V. The temperature effect on number of microvesicles from peripheral blood. In: 6th Conference on Experimental and Translational Oncology: book of abstracts. Kranjska Gora: 2010: 131.
3. Janša R, Janša V, P. Sušanj P, Bedina-Zavec, **Štukelj R**, Frank F, Ukmar S, Štabuc B, Iglič A, Kralj-Iglič V. Following the number of microvesicles in peripheral blood of patients with gastrointestinal stromal tumors treated by imatinib. In: 7th International Congress on Autoimmunity: book of abstracts. Ljubljana: 2010.
4. Šuštar V, **Štukelj R**, Brečko A, Junkar I, Frank M, Zaninović V, Rozman B, Veranič P, Hägerstrand H, Kralj-Iglič V. Microvesicles from body fluids as imaged by different microscopy techniques. In: 7th International Congress on Autoimmunity: book of abstracts. Ljubljana: 2010.
5. Mrvar - Brečko A, Šuštar V, Frank M, **Štukelj R**, Veranič P, Hägerstrand H, Rozman B, Kralj-Iglič V. Nanoparticles from body fluids as revealed by the scanning electron microscopy. In: SLONANO: book of abstracts. Ljubljana: Kemijski inštitut, 2009: 87.

4 Razlaga kratic

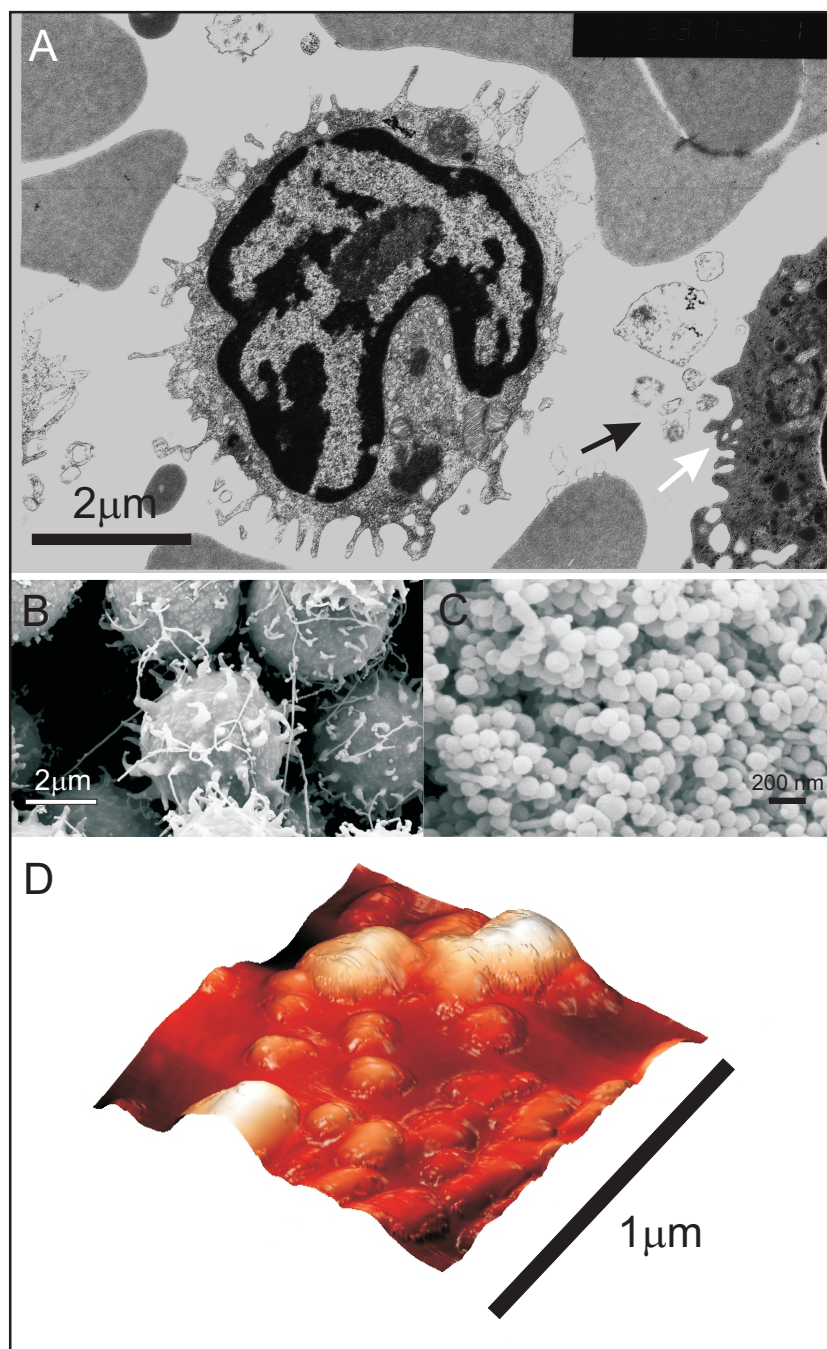
<i>kratica</i>	<i>pomen</i>
GA	glutaraldehyd
KO	klinični oddelek
MV	mikrovezikli
PBS	fosfatni pufer s soljo (z NaCl)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
UKC	Univerzitetni klinični center
UL	Univerza v Ljubljani

5 Uvod

5.1 Mikrovezikli in njihov klinični pomen

Mikrovezikle (MV), izolirane iz krvi, so sprva opisali kot trombocitni prah (1). Kasneje so opazili, da se MV odcepljajo od membrane eritrocitov shranjene krvi (2-7) ali *in vitro* po dodatku različnih učinkovin v suspenzijo eritrocitov (8-13). Mikrovezikulacijo so opazili pri trombocitih (14, 15), belih krvnih celicah (16, 17), endotelnih celicah (18-21) in rakastih celicah (22-32), kjer so jo povezali s prokoagulantno aktivnostjo (33-36).

V zadnjem času se je izoblikoval pogled na MV (6, 27, 37-43) kot na biološko aktivne, z membrano obdane delce, manjše od mikrometra, ki se odcepijo od membrane celice v zadnji fazi brstenja (Slika 1) in postanejo prosto gibljivi v okolni raztopini. Ker potujejo z limfo in krvjo, lahko dosežejo oddaljene celice in interagirajo z njimi. Molekule, ki sestavljajo MV, tako vstopijo v celico in tam postanejo funkcionalne. Mikrovezikli lahko prenašajo na membrano vezane ligande in receptorje (42-47), pri-
onske proteine (48-50), genetski material (43, 51-53) in infektivne delce (54-56) in s tem prispevajo k raščirjanju tumorjev, vnetja in okužbe (46, 51, 52, 57-59). Analiza števila in sestave MV je lahko uporabna pri diagnostiki in načrtovanju zdravljenja (7, 60-63), kar je še posebej pomembno pri boleznih, kjer so zdaj potrebne invazivne preiskave (64, 65). Razen v krvi so MV našli tudi v ostalih telesnih tekočinah, npr. v sinovialni tekočini vnetih sklepov (66), plevralni tekočini (67, 68), ascitesu (69, 68) in urinu (70).



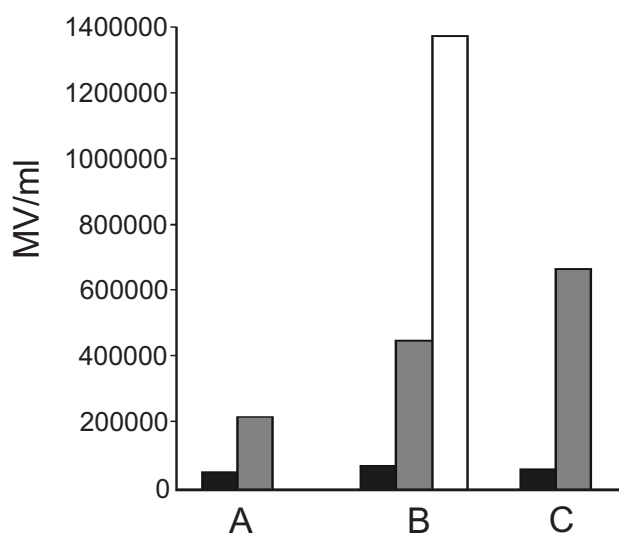
Slika 1: (A) Brstenje levkocitov, slikano s presevnim elektronskim mikroskopom. Vidni so številni brsti (bela puščica) in MV (črna puščica); V. Šuštar, R. Štukelj, P. Veranič, V. Kralj-Iglič, neobjavljeno; z dovoljenjem avtorjev. (B) Brstenje eritrocitov, izzvano z dodajanjem detergenta suspenziji eritrocitov in (C) izolirani MV, ki so nastali kot končni produkt tega procesa, slikani z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM); H. Hägerstrand, V. Šuštar, V. Kralj-Iglič, neobjavljeno; z dovoljenjem avtorjev. (D) MV, izolirani iz periferne krvi, slikani z mikroskopom na atomsko silo; I. Junkar, V. Šuštar, M. Frank, M. Mozetič, V. Kralj-Iglič, neobjavljeno; z dovoljenjem avtorjev.

Mikrovezikli vsebujejo sestavine, ki katalizirajo nastanek krvnih strdkov (71-77), pri tem pa je razmerje med površino in prostornino MV precej večje kot pri trombocitih, tako da mikrovezikulacija znatno poveča katalitsko površino za nastajanje krvnih strdkov in jo obravnavamo kot prokoagulantni mehanizem. Mikrovezikli posredujejo interakcije med trombociti, endotelnimi celicami in tumorskimi celicami, ki se lahko izrazijo v sekundarnih tromboemboličnih dogodkih (npr. pri raku (78-81) in avtoimunih boleznih (82-87)) ter razširjanju tumorjev (28, 29, 88). V veterinarski medicini je poznan pomen MV pri odkrivanju prenosljive spongiformne encefalopatije (89), ki je bila že ugotovljena pri različnih vrstah živali (domače govedo, divja goveda v živalskih vrtovih, ovce, koze, domače mačke, divje mačke v živalskih vrtovih, nekatere vrste prostoživečih in gojenih jelenov ter nerci v ujetništvu).

5.2 Določanje mikroveziklov

Odkar so odkrili biološko vlogo MV in njihovo potencialno diagnostično in terapevtsko vrednost, so poskušali tudi izdelati metode za njihovo izolacijo iz periferne krvi in njihovo karakterizacijo (82, 90-95). Izolirane MV lahko slikamo ali štejemo s pretočnim citometrom. Izmerjeno število MV odraža zalogo membran, ki je na voljo za brstenje in vezikulacijo, učinkovitost mehanizmov čiščenja, lastnosti membrane in lastnosti okolne raztopine. Povečano število MV so našli v izolatih iz periferne krvi bolnikov s srčno-žilnimi boleznimi (37, 96-98), rakom (30, 63, 99) in avtoimunimi boleznimi (61, 90, 98, 100). Študije izvora MV, ki so jih izolirali iz krvi, so pokazale, da največ MV izvira iz trombocitov (okrog 80 %), kot vir sledijo eritrociti (okrog 10 %) in druge celice (monociti, T-limfociti, B-limfociti, granulociti in endotelijske celice) (90). Brstijo tudi rakaste celice, vendar pa je število MV v izolatih iz krvi bolnikov z rakom predvsem posledica brstenja trombocitov, ki jih aktivirajo MV iz rakastih celic (59).

V literaturi najdemo različne protokole za izolacijo MV (82, 90-96). Ti protokoli so običajno sestavljeni iz centrifugiranja in izpiranja vzorca. Mikrovezikle v izolatih potem štejemo s pretočnim citometrom. Pri tem lahko uporabimo tudi fluorescenčno označevanje s protitelesi, ki kažejo na izvor MV (90, 101). S prikazom izolatov iz krvi in drugih telesnih tekočin pridobimo informacije o izvoru MV kot tudi o procesu izolacije.



Slika 2: Število MV pri treh prostovoljcih brez ugotovljene bolezni (A: ženska, 60 let, B: ženska, 50 let, C: moški, 46 let). Kri je bila odvzeta na Kliničnem oddelku (KO) za revmatologijo (črni stolpec), na KO za gastroenterologijo (sivi stolpec) in na Nevrološki kliniki (beli stolpec) Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana. Iz (102).

Zaradi svojih majhnih dimenzij in zaradi značilne oblike membranske sestavine pri brstenju membrane lokalno povzročijo njeno veliko ukrivljenost. Zato so dimenzije izrastkov velikostnega reda 10 - 100 nanometrov. Odcepljeni MV so tako majhni, da jih ne moremo direktno opazovati pod optičnim mikroskopom. Za prikaz MV so primerne druge tehnike mikroskopije, kot so mikroskopija na atomsko silo ter vrstična in presečna elektronska mikroskopija (66).

Pri določanju MV se pojavljajo problemi, ki še niso zadovoljivo razrešeni. V literaturi nismo zasledili sistematične analize parametrov postopka izolacije. Da metoda določanja MV še ni standardizirana, niti vpeljana v klinično prakso, kaže na to, da še ni dovolj ponovljiva in zanesljiva. To je v skladu tudi z dosedanjimi izkušnjami Laboratorija za klinično biofiziko UL.

Za izolacijo MV smo uporabljali protokol M. Diamant in sodelavcev (90), kot je opisano v poglavju Material in metode. Ob izvajanju kliničnih študij, ki so poleti leta 2009 hkrati potekale na treh KO UKC Ljubljana, so ugotovili, da obstajajo velike razlike v izmerjenem številu MV oseb brez ugotovljene bolezni, glede na to, na katerem oddelku so bili odvzeti vzorci krvi. Slika 2 prikazuje število MV, izoliranih iz krvi, odvzete trem osebam (A, B in C, brez ugotovljene bolezni) na KO za revma-

tologijo, KO za gastroenterologijo in na Nevrološki kliniki UKC Ljubljana. Vidimo, da se rezultati iz različnih oddelkov pri isti osebi razlikujejo za nekajkrat pri vseh treh osebah, iz česar so sklepali, da razlike v rezultatu pri isti osebi ne izvirajo iz lastnosti vzorca, temveč iz postopka izolacije. Med razlogi, zaradi katerih bi lahko prišlo do razlik, so upoštevali tehniko odvzema, lastnosti igle, s katero je bila odvzeta kri (debelina, material), čas, ki je pretekel od odvzema do začetka centrifugiranja (centrifuga se ne nahaja v isti stavbi kot mesto odvzema krvi) in razlike v delovanju centrifuge na KO za revmatologijo, kjer so analizirali vzorce, odvzete na KO za revmatologijo, in Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo, kjer so analizirali vzorce, odvzete na KO za gastroenterologijo in na Nevrološki kliniki. Da bi preverili vpliv tehnike odvzema, sta isti osebi (osebi B) istočasno odvzeli 2,7 ml krvi sestra s KO za gastroenterologijo in sestra z Nevrološke klinike. Isti sestri sta kri odvzeli tudi pri meritvi, prikazani na Sliki 2. Ob hkratnem odvzemu sta se rezultata razlikovala za manj kot 20 %, kar pomeni, da razlike, prikazane na Sliki 2, niso izvirale iz tehnike odvzema. Da bi preverili vpliv igle za odvzem krvi, je bilo isti osebi v časovnem intervalu nekaj minut odvzeto 2,7 ml krvi iz medialne kubitalne vene skozi iglo debeline 20 gauge, in enaka količina s kirurškim rezom blazinice prsta (brez igle). Tudi v tem primeru razlika med rezultatoma ni presegala 20 %. Iz tega smo sklepali, da izbira igle ne more razložiti razlik, prikazanih na Sliki 2. Pri enem od poskusov, pri katerem so kri odvzeli iz žile in z rezom, je prišlo pri izolaciji do hemolize, tako v vzorcu, odvzetem iz žile, kot v vzorcu, odvzetem z rezom. S preiskavo so bile pri darovalki izključene nepravilnosti krvnih celic. Preverjanje vseh korakov postopka pa je nakazalo kot možen vzrok tako hemolize kot tudi razlik v izmerjenem številu MV na Sliki 2 prenašanje vzorcev od mesta odvzema do centrifuge v ohlajeni posodi. Predpostavili smo, da je vpliv temperature med celotnim postopkom izolacije na število MV v izolatu lahko zelo pomemben in upoštevali, da ohladitev aktivira trombocite (103), kar lahko privede do odpuščanja MV. Zato smo želeli ugotoviti, ali je temperatura v procesu izolacije MV lahko vzrok nastanka velikega števila MV po odvzemu krvi.

Številne klinične študije kažejo na potencialno možnost uporabe določanja MV v diagnostiki in terapiji, vendar je za to potrebno metodo izolacije bolje razumeti in izboljšati. Da bi izboljšali metodo določanja MV, smo v okviru te naloge želeli ugotoviti, kaj se nahaja v izolatih in kaj v sedimentih celic telesnih tekočin živali in človeka, ter preveriti vpliv temperature med postopkom izolacije na število MV v izolatih iz periferne krvi.

6 Namen in hipoteze

Namen naloge je prispevati k izboljšanju metode za izolacijo MV iz telesnih tekočin živali in človeka. Želeli smo ugotoviti, kaj vsebujejo vzorci, dobljeni v postopku izolacije in kakšen je vpliv temperature pri izolaciji na število MV v izolatih iz krvi. Zastavili smo naslednje delovne hipoteze:

- mikrovezikli so prisotni v izolatih iz vzorcev telesnih tekočin živali in človeka;
- temperatura v postopku izolacije pomembno vpliva na število MV v izolatu iz periferne krvi; med potekom izolacije pri višjih temperaturah je v izolatih manj MV kot pri nižjih temperaturah.

7 Material in metode

Pri izolaciji MV iz krvi smo uporabili modificirano metodo M. Diamant in sodelavcev (90), slikanje vzorcev z vrstičnim in presevnim elektronskim mikroskopom je potekalo na Åbo Akademi University, Åbo, Finska, v sodelovanju s H. Hägerstrandom in sodelavci in FEI Company, Nanoport Eindhoven, Nizozemska, v sodelovanju s Kyrie Mam in sodelavci.

7.1 Preiskovanci

Vse telesne tekočine so bile pridobljene s pisnim soglasjem prostovoljcev, bolnikov oziroma lastnikov živali (Slika 19, 20). Za študijo je bilo podano soglasje Republiške komisije za medicinsko etiko (št. 117/02/10, Slika 21). Za študijo vpliva temperature na število MV smo kri odvzeli 59 tešчим preiskovancem brez ugotovljene bolezni. Populacijo sestavljajo študenti prvega letnika Veterinarske fakultete v Ljubljani, oba avtorja naloge in mentorica. Študentom veterine je bila kri odvzeta ob odvzemu zaradi obveznega sistematskega pregleda v prvem letniku študija. 18 vzorcev, ki smo jih odvzeli študentom veterine, smo zavrgli, ker se je izkazalo, da je bil pufer, s katerim smo izpirali vzorce, kontaminiran z bakterijami. Od 41 preiskovancev, ki smo jih vključili v analizo, je bilo 29 žensk in 12 moških.

Za slikanje z elektronskim mikroskopom je kri darovala bolnica (67 let) z lokalno napredovano obliko karcinoma trebušne slinavke. Plevralno tekočino je darovala bolnica (64 let) z rakom na debelem črevesu, vzorec ascitesa smo dobili od bolnice (67 let) s predrtjem želodca in razširjenim vnetjem potrebušnice. Pooperativni potek zdravljenja se je pri tej bolnici zapletel zaradi večorganske odpovedi. Bolnica je tri dni po punkciji žal preminula. Cerebrospinalno tekočino je daroval bolnik (59 let) s subarahnoidalno krvavitvijo. Pooperativno drenažno tekočino smo dobili od bolnice (56 let) po zamenjavi vsadkov obeh dojk. Živalsko kri smo dobili od zdrave toplokrvne kobile (10 let, 550 kg), limfno tekočino smo odvzeli domači mački (samica, 15 let) s hilotoraksom, plevralno tekočino pa perzijski mački (samica, 11 let) z znaki hude dispneje. Kasneje so pri slednji s preiskavami ugotovili pljučni adenokarcinom in jo uspavali.

7.2 Kemikalije

Fiziološka raztopina s fosfatnim pufrom s soljo (PBS) je bila pripravljena iz 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 in vode do prostornine enega litra. Citrat je bil dodan PBS v razmerju 84 μl 0,123 M citrata na 10 ml fiziološke raztopine s fosfatnim pufrom.

Glutaraldehyd (GA), uporabljen za fiksacijo pred mikroskopiranjem z SEM, proizvaja SERVA Electrophoresis GmbH (Hiedelberg, Nemčija).

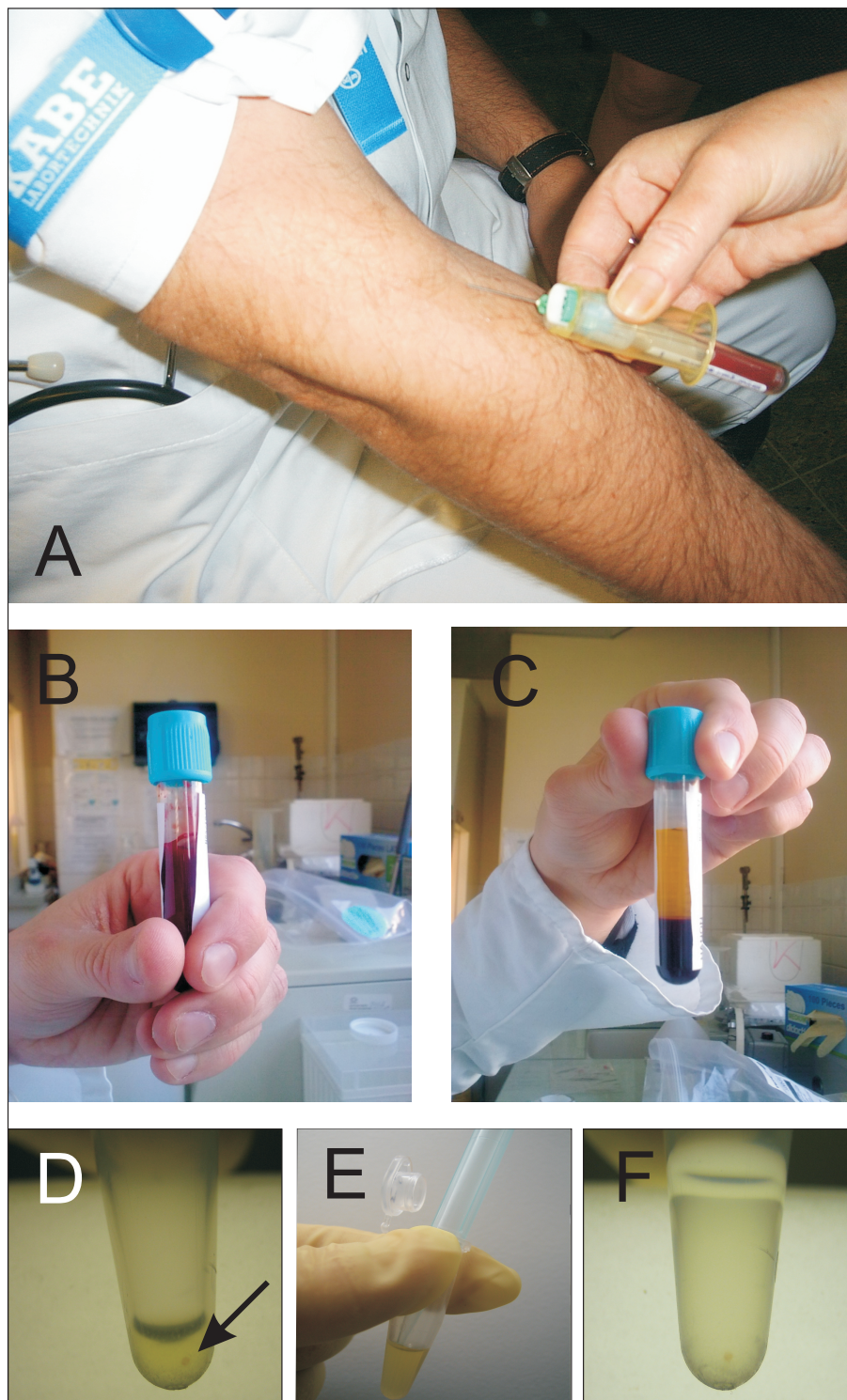
7.3 Priprava plazme in izolacija mikroveziklov

7.3.1 Odvzem krvi

Prostovoljcem, ki 15 ur pred odvzemom niso jedli, je bilo na KO za gastroenterologijo, UKC Ljubljana, iz medialne kubitalne vene odvzeto do 15 ml krvi v epruvete s podtlakom. Od tega: 3 ml krvi za hemogram (epruveta z antikoagulantom K_3EDTA), 4 ml za biokemijske preiskave (epruveta z antikoagulantom heparinom), 2,7 ml za izolacijo MV (epruveta z 0,109 M antikoagulantom trinatrijevim citratom) in 3 ml za sedimentacijo (epruveta z antikoagulantom K_3EDTA), po navedenem vrstnem redu. Epruvete (2,7 ml) za izolacijo MV smo v kopeli pred odvzemom vzdrževali pri izbrani temperaturi. Za izolacijo MV smo uporabili kri, odvzeto v epruvete s trinatrijevim citratom, ostala kri je bila uporabljena za sistematski pregled študentov. Kri je bila odvzeta z iglo debeline 21 gauge (MULTI Sample Needle, Nipro Corporation, Tokyo, Japonska). Kri kobile je bila odvzeta s punkcijo vene (jugularna vena) v 2,7 ml epruvete s podtlakom, ki vsebujejo 0,109 M trinatrijev citrat. Odvzem krvi je bil izveden ob upoštevanju Helsinške deklaracije o biomedicinskih raziskavah na človeku, določil Konvencije Sveta Evrope o varovanju človekovih pravic in dostojanstva človeškega bitja v zvezi z uporabo biologije in medicine (Oviedske konvencije) in načel slovenskega Kodeksa medicinske deontologije. Epruvete za izolacijo MV proizvaja Becton Dickinson, New Jersey, ZDA.

7.3.2 Odvzem ostalih telesnih tekočin

Vzorci človeških telesnih tekočin (ascitesa, plevralne in cerebrospinalne tekočine) so bili dobljeni z vstavitvijo enega konca 15 - 30 cm dolge drenažne cevke za odtekanje brez igle direktno v plevralno votlino, abdominalno votlino ali subarahnoidalne



Slika 3: Odvzem krvi iz medialne kubitalne vene (A), epruveta z odvzetim vzorcem krvi pred (B) in po (C) ločitvi celic od plazme, vzorec po cetrifugiranju pri 17570 *g* (D); rdeča pika v peletu (črna puščica) kaže na prisotnost eritrocitnih MV; pipetiranje supernatanta po centrifugiranju pri 17570 *g* (E), ter mikroentrifugirka s 100 μ l suspenzije z MV, pripravljena za merjenje na citometru (F).

prekate, drug konec cevke pa je bil vstavljen v zbirno posodo. Zaradi počasnega odtekanja se je cerebrospinalna tekočina in postoperativna drenažna tekočina več ur ali dni zbirala v sterilnih plastičnih čašah, iz katerih je bila nato odvzeta vsebina v 2,7 ml epruvete s trinatrijevim citratom. Cevka za pridobitev cerebrospinalne tekočine je bila vstavljena aseptično ob uporabi splošne anestezije. Limfna tekočina in plevralna tekočina mačke je bila dobljena z vstavitvijo cevke z iglo med 7 - 9 obritim in očiščenim medrebrnim prostorom ob lokalni anesteziji. Cevka ima sesalno-odtekalni sistem (Mini Redovac, Eickemeyer, Nemčija). Zbrana tekočina je bila prelita v 2,7 ml epruvete s trinatrijevim citratom. Med posegom je bil mački dovajan kisik, po posegu pa je bila položena v inkubator s povišano ravno kisika. Vse omenjene telesne tekočine so bile pridobljene s punkcijo zaradi terapevtskih vzrokov, po mednarodnih standardih, dovoljenjih in etičnih kodeksih in bi jih sicer zavrgli.

7.3.3 Ločitev krvnih celic od plazme

Ločitev krvnih celic od plazme je bila izvedena s centrifugiranjem največ 20 minut po odvzemu krvi na KO za gastroenterologijo, UKC Ljubljana, 20 min pri 1550 *g* in pri ustrezni temperaturi (s centrifugo Centric 200/R, Tehnica Železniki, Podjetje precizne mehanike in elektronike d.o.o.). Po centrifugiranju ločimo v epruveti na pogled več predelkov: rdeče obarvanega, v katerem so pretežno eritrociti, belo obarvanega, v katerem so pretežno levkociti, rumenkasto obarvanega, v katerem so pretežno trombociti, in bistrejšo tekočino - plazmo. 250 μ l plazme nad trombociti je bilo odpipetiranih v 1,8 ml Eppendorf mikrocetrifugirke.

7.3.4 Izolacija mikroveziklov iz krvne plazme

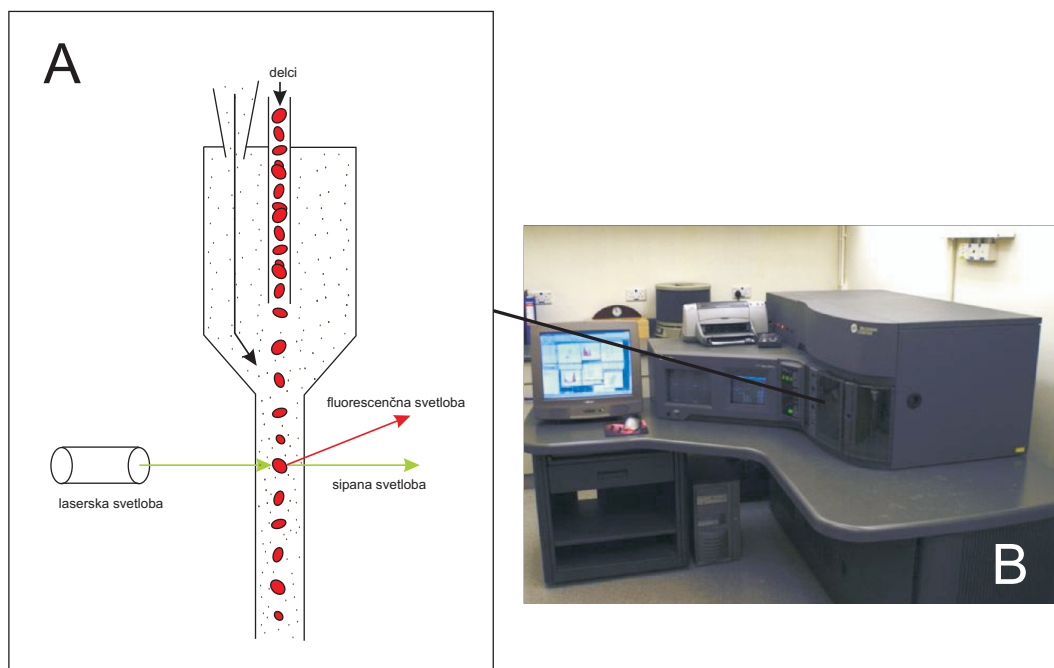
Od vsake osebe sta bila pripravljena po dva vzorca. 250 μ l plazme v 1,8 ml mikrocetrifugirkah je bilo centrifugirano pri 17570 *g*, 30 minut pri izbrani temperaturi. Po centrifugiranju so se MV zbrali na dnu mikrocetrifugirke. To je bilo vidno kot majhen prozoren madež z rdečo piko. Ta izvira iz eritrocitnih MV, ki vsebujejo hemoglobin. Iz vsakega vzorca je bilo odpipetirano 225 μ l plazme z vrha, preostalih 25 μ l plazme s peletom pa razredčeno z 225 μ l PBS - citrata (pH 7,4). Pelet je bil z vorteksiranjem na 1200 obratih v celoti resuspendiran in znova centrifugiran 30 minut na 17570 *g* pri ustrezni temperaturi. Po centrifugiranju vzorcev z MV je bilo

ponovno odpipetirano zgornjih 225 μ l supernatanta in zavrženo, k 25 μ l peleta z MV pa je bilo dodano 75 μ l PBS - citrata (pH 7,4).

7.3.5 Izolacija mikroveziklov iz ostalih telesnih tekočin živali in človeka

Telesna tekočina je bila centrifugirana pri 1550 g , 20 min pri 20 °C. Supernatant je bil odpipetiran v 24 mikrocentrifugirk, največ 1 ml v vsako mikrocentrifugirko, sediment s celicami pa je bil shranjen. Mikrocentrifugirke s supernatantom so bile centrifugirane pri 25000 g , 60 min in pri 20 °C. Sediment celic, dobljen pri prvem centrifugiranju, je bil shranjen v dve mikrocentrifugirki, resuspendiran in fiksiran z 2-odstotnim GA eno uro pri sobni temperaturi, potem pa centrifugiran 20 min pri 1550 g in pri 20 °C. Iz mikrocentrifugirk je bil po enournem centrifugiranju pri 25000 g odstranjen supernatant do 25 μ l nad peletom (pazili smo, da nismo vznemirili oziroma da se nismo dotaknili peleta). Prvi mikrocentrifugirki je bilo dodano 100 μ l pufra PBS - citrata in resuspendiran pelet. Tekočina z resuspendiranim peletom je bila prenešena v naslednjo mikrocentrifugirko, kjer je bil resuspendiran tamkajšnji pelet, vsa suspenzija pa posrkana s plastično konico. Ta postopek smo ponavljali do končne mikrocentrifugirke, kjer je bila suspenzija le dodana k peletu. Iz 24 mikrocentrifugirk je na koncu ostalo manj kot 500 μ l suspenzije. V primeru, da je ostalo več kot 500 μ l suspenzije, je bila razdeljena na 2 mikrocentrifugirki, ki pa ne smeta biti sveži, ker se nekaj MV vedno prilepi na suho steno. Mikrocentrifugirke, v katerih je bilo do 500 μ l združene suspenzije, so bile centrifugirane pri 25000 g , 30 min in pri 20 °C. Supernatant do 25 μ l je bil odstranjen, dodali smo 225 μ l PBS - citrata in resuspendirali s plastično konico (vedno pazimo, da se tekočina ne giblje po stenah mikrocentrifugirk, ker se tam prilepljajo/izgubljajo MV) in ponovno centrifugirali pri 17570 g , 30 min in pri 20 °C. S tem smo na koncu dobili po številu primerljivo populacijo MV kot pri izolaciji iz periferne krvi. PBS - citrat je bil dodan supernatantu do polovice prostornine mikrocentrifugirke, ter 2-odstotni GA do vrha mikrocentrifugirke. Nekaj PBS - citrata smo dodali tudi v pokrovček mikrocentrifugirke in pri njenem zapiranju pazili, da je bilo v njej čim manj zraka, ki bi lahko prišel v mikrocentrifugirko.

Postopke priprave MV prikazujemo tudi v obliki diagramov (Slike 14-18), ki so lahko v pomoč pri postopku izolacije.



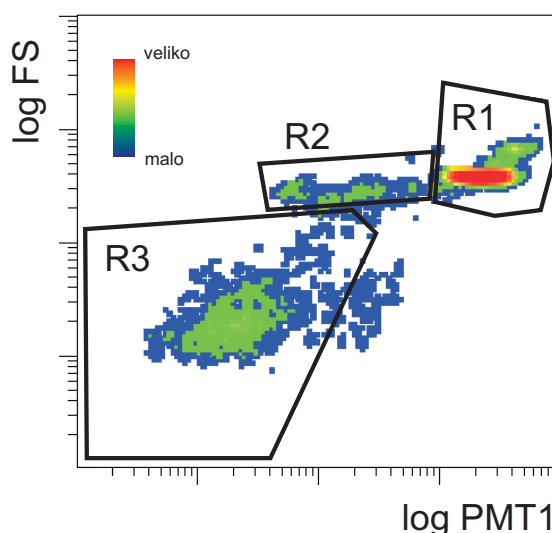
Slika 4: Prikaz potovanja delca in sipanja svetlobe v pretočni citometriji (A) in Coulter EPICS Altra pretočni citometer (Fullerton, ZDA) na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (B).

7.3.6 Merjenje števila mikroveziklov s pretočnim citometrom

Pretočna citometrija je tehnika, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji druga za drugo potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe (Slika 4 A). Svetlobni žarek se ob stiku s celico sipa in absorbira v fluorokromih, če smo jih predhodno vezali na celice; celica s fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine. Vzorci, ki so vsebovali izolirane MV, so bili analizirani s Coulter EPICS Altra pretočnim citometrom (Fullerton, ZDA) na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (Slika 4 B). Pri eni meritvi smo zabeležili vsaj 60000 dogodkov. Število MV je bilo podano glede na število merilnih kroglic (Flow-Count, Beckman Coulter, koncentracija $1,05 \times 10^6/\text{ml}$, premer kroglice = $10 \mu\text{m}$). Ustrezne prostornine vzorca z MV in raztopine kroglic smo prilagodili znotraj posameznega poskusa.

S sipano svetlobo določimo razsevni diagram, na katerem enemu dogodku ustreza en delec, ki ga zazna pretočni citometer (Slika 5). Parametra: FS, ki opisuje svetlobo, sipano v smer žarka, ter PMT1, ki opisuje svetlobo, sipano v stranski smeri, ustrezata velikosti in granuliranosti delcev. Razsevni diagram smo razdelili na tri

območja: v območje R1 smo zajeli merilne kroglice z znano velikostjo premera $10\ \mu\text{m}$, ki smo jih dodali vzorcu tik pred meritvijo; v območje R2 smo zajeli strukture z velikostjo okrog $10\ \mu\text{m}$, ki jih pripisujemo eritrocitom, v območje R3 pa smo zajeli manjše strukture, ki jih interpretiramo kot kroglaste MV.



Slika 5: Razsevni diagram dogodkov, ki jih določa svetloba, sipana v smeri naprej (FS) in v stranski smeri (PMT1). Območje R1 ustreza merilnim kroglicam z velikostjo $10\ \mu\text{m}$, območje R2 ustreza celicam, območje R3 pa mikroveziklom.

7.4 Vrstična elektronska mikroskopija

7.4.1 Predpriprava vzorca za elektronsko mikroskopijo

Za stabilizacijo in večjo obstojnost MV je bil vzorcu dodan fiksativ GA (GA, razredčen v izoosmolarnem PBS - citratu), ki na dveh mestih zamreži proteine in utrdi njihovo tridimenzionalno strukturo. GA je bilo dodano toliko, da je bila v vzorcu njegova končna koncentracija eno-odstotna. Vzorec je bil inkubiran v GA eno uro na sobni temperaturi $23\ ^\circ\text{C}$. Vzorec z 1-odstotnim GA je bil do nadaljevanja postopka shranjen v hladilniku pri temperaturi $4\ ^\circ\text{C}$. Za zamreženje in obstojnost membran v vzorcu je bil vzorec fiksiran z osmijevim tetroksidom OsO_4 , ki poveže nenasičene maščobno kislinke ostanke v fosfolipidnih molekulah v membrani. OsO_4

se veže tudi na GA, zato je bil z vzorca izpran nevezani GA s PBS - citratom; izpiranje je potekalo s štirikratno izmenjavo supernatanta s polurnimi presledki. Vzorec je bil fiksiran z 1-odstotnim OsO_4 na enak način kot z GA in inkubiran pri sobni temperaturi 23 °C za eno uro. Potem je bil nevezan OsO_4 izpran. Za nadaljnje procesiranje je bilo potrebno iz vzorca odstraniti vodo oziroma jo izmenjati z manj polarnimi tekočinami, predvsem za zavarovanje fosfolipidnih membran. Vzorec je bil dehidriran z izmenjavo pretežno vodne vsebine celic in supernatanta z manj polarnim acetonom. Vzorcju smo v 10 - minutnih korakih dodajali in izmenjavali mešanico acetona in PBS - citrata. V mešanicah acetona in PBS - citrata se je za preprečitev morebitnega osmotskega šoka koncentracija acetona stopnjevala: 50, 60, 90 odstotkov. Zadnji korak je potekal v 100-odstotnem acetonu eno uro z dvema izmenjavama acetona. Vzorci so bili na ta način predpripravljeni na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete UL ali na Department of Biology, Åbo Akademi University, Åbo/Turku, Finska.

7.4.2 Priprava vzorca za vrstično elektronsko mikroskopijo

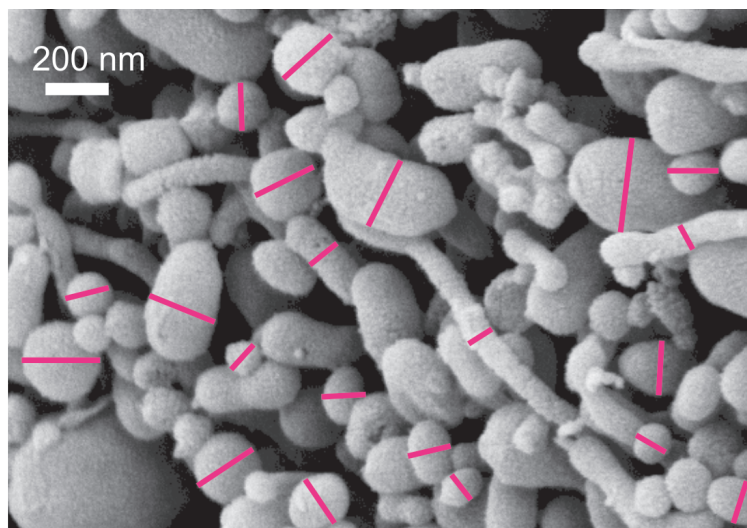
Za SEM, kjer opazujemo zunanjo tridimenzionalno strukturo, je potrebno vzorce posušiti za obstoj v vakuumu, v katerem deluje elektronski mikroskop, hkrati pa suhi vzorci ne dopuščajo pojava izparin, ki bi ovirale nemoteno pot elektronom. Za vir sekundarnih elektronov, ki se odbijajo s površine vzorca, so vzorci napršeni s težko kovino. Fosfolipidne membrane se ob direktnem sušenju na zraku poškodujejo zaradi prehajanja znotrajcelične raztopine preko membrane. Za ohranitev integritete membrane je bilo potrebno vzorce sušiti s tekočim CO_2 , ki pri kritični točki 72 barov in 31 °C sublimira v plinasto agregatno stanje. CO_2 v plinastem stanju nemoteno in brez škode prehaja preko membrane. Posušeni vzorci so bili za prevajanje toka elektronov in za vir sekundarnih elektronov napršeni z zlatom.

7.4.3 Slikanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Vzorci so bili slikani s Cambridge instruments S360-vrstičnim elektronskim mikroskopom (Cambridge Instruments GmbH, Nussloch, Nemčija) na Åbo Akademi University, Åbo/Turku in s QUANTATM 250 vrstičnim elektronskim mikroskopom (FEI Company, Nanoport, Eindhoven, Nizozemska) v Eindhovnu.

7.4.4 Merjenje povprečne velikosti populacije mikroveziklov

Izmerili smo po 20 najmanjših razsežnosti v izbranem okvirju slike (Slika 6). Upoštevali smo enoto dolžine, določeno s povečavo mikroskopa. Uporabili smo programsko opremo Corel Draw X4 (Corel Corporation, Kanada, 2008). Izračunali smo povprečno vrednost dimenzije in ustrezeni standardni odmik. Povprečne vrednosti za populacije smo primerjali s t-testom in podali ustrezne vrednosti statistične pomembnosti razlik z verjetnostjo p . Pri tem smo uporabili programsko opremo Microsoft Excell (Microsoft, ZDA, 2007).



Slika 6: Merjenje velikosti mikroveziklov.

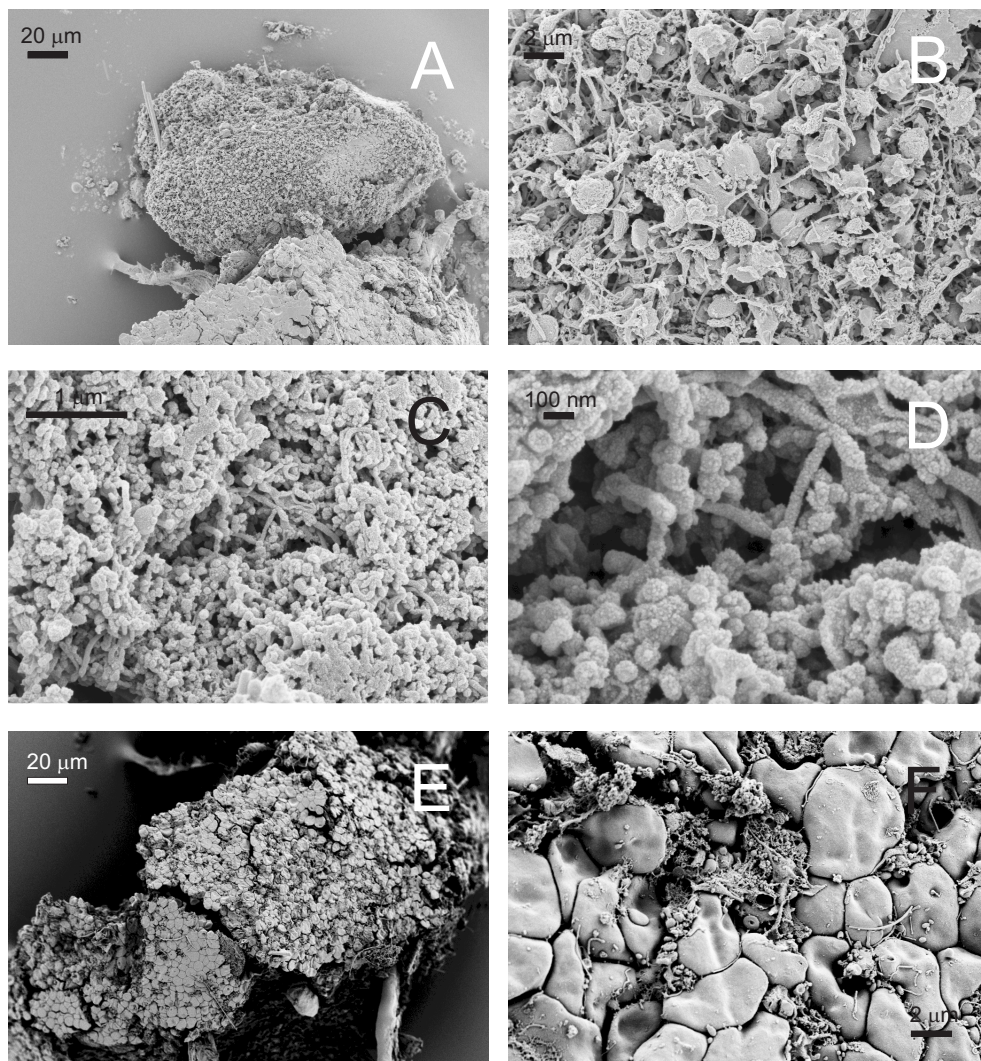
8 Rezultati

8.1 Morfološke značilnosti mikroveziklov, izoliranih iz telesnih tekočin živali in človeka

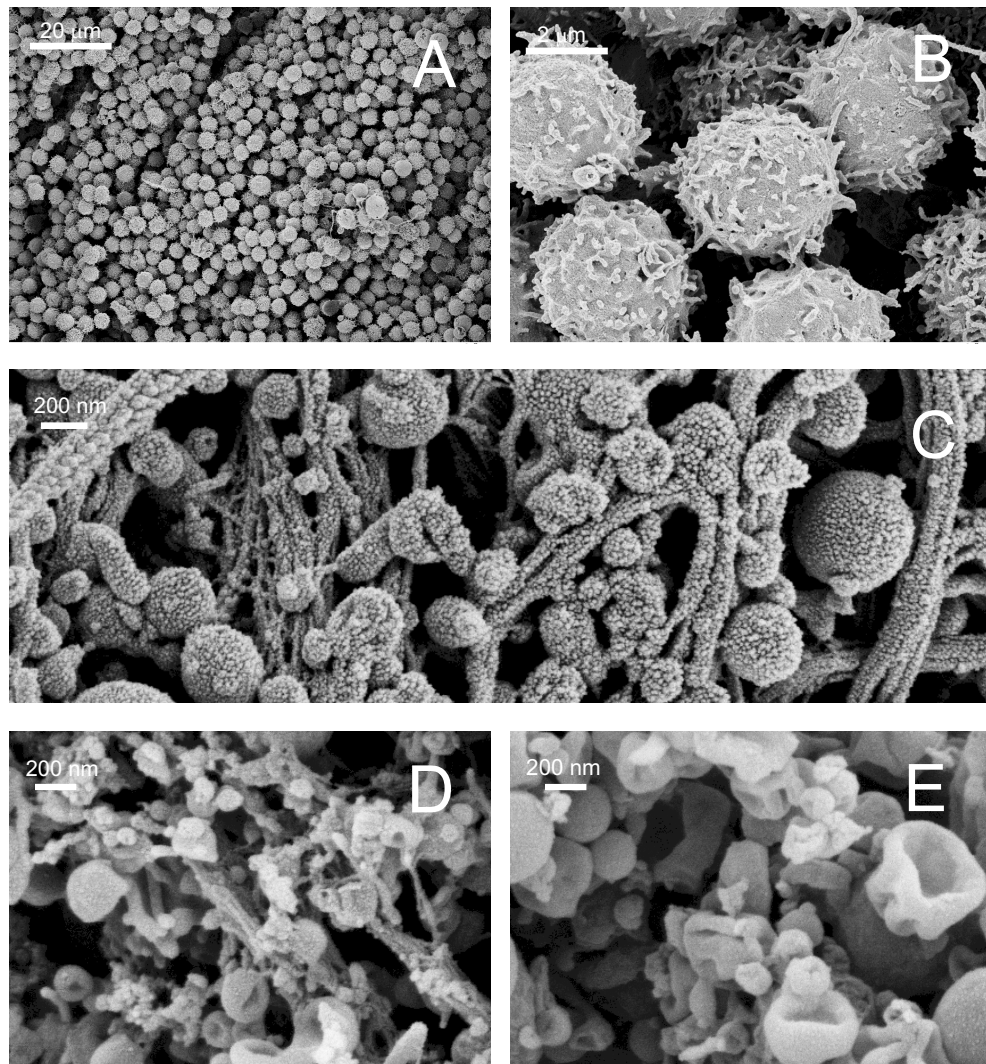
Spodaj prikazujemo slike izolatov in sedimentov vzorcev različnih telesnih tekočin živali in človeka. Zaradi primerjave vzorcev je ugodno, da lahko vidimo več slik hkrati, na drugi strani pa so oblike bolj vidne, če so slike večje. Razpored slik je tako rezultat iskanja najboljše rešitve. Zaradi boljšega prikaza podrobnosti izolat istega vzorca periferne krvi človeka (Slika 12) prikažemo na več straneh, legenda pa je pri zadnjem delu slike.

Slika 7 (A-D) prikazuje material, pridobljen s protokolom za izolacijo MV iz periferne krvi bolnice z napredovanim karcinomom trebušne slinavke. V vzorcih je prisotno veliko mikroveziklov (C, D), najdemo pa tudi številne aktivirane trombocite (B). Na sliki 7 E in F pa je prikazan sediment celic iz istega vzorca. Po pričakovanjih vidimo, da prevladujejo eritrociti (E), medtem ko večja povečava dela sedimenta pokaže, da je prisotno tudi veliko MV (F). Ne-diskocitne oblike eritrocitov (F) so posledica centrifugiranja in fiksiranja, ko so ti stisnjeni v pelet na dnu mikrocentrifugirke.

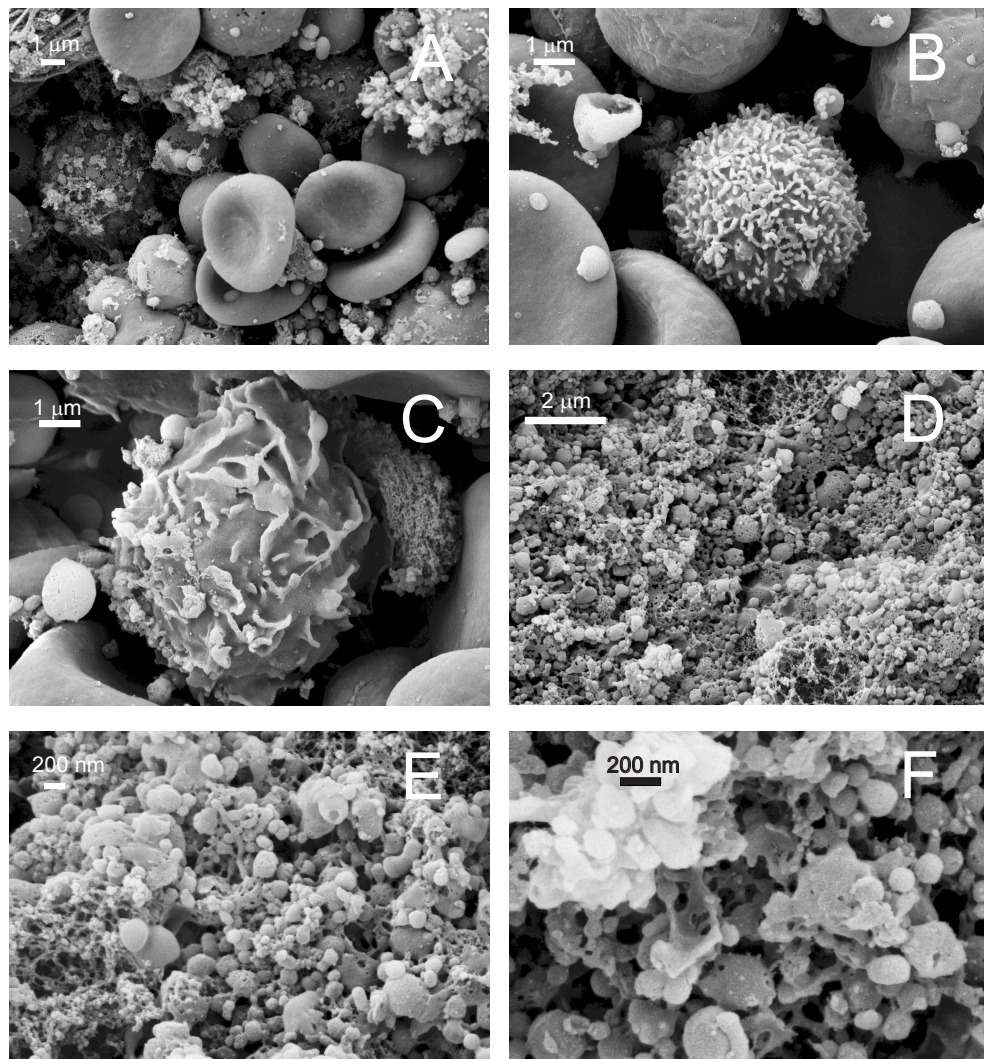
Na Sliki 8 vidimo mikrovezikle, pridobljene z izolacijo iz limfne tekočine mačke (C), sediment celic istega vzorca (A, B), ter MV, pridobljene iz plevralne tekočine mačke. Sediment limfne tekočine vsebuje predvsem aktivirane levkocite (A, B), medtem ko v supernatantu najdemo veliko MV, kar nakazuje, da ti mikrovezikli izvirajo iz aktiviranih levkocitov. Izolat iz plevralne tekočine mačke vsebuje vezikularne strukture z nizkim razmerjem med prostornino in površino (npr. oblika skodelice - stomatocitna oblika). Slika 9 prikazuje sediment in MV, izolirane iz supernatanta pooperativne človeške drenažne tekočine. Vidimo krvne celice (A-C: eritrocite in B, C: levkocite) in MV (C-F). Slika 10 A prikazuje eritrocite v sedimentu vzorca človeške cerebrospinalne tekočine, 10 B pa mikrovezikle, izolirane iz istega vzorca. MV, pridobljene iz človeškega ascitesa, vidimo na Slikah 10 C in D, medtem ko MV, pridobljene iz človeške plevralne tekočine, vidimo na Sliki 10 E in F. V izolatu krvi kobile (Slika 11) vidimo veliko aktiviranih trombocitov, ter številne globularne in tubularne mikrovezikle.



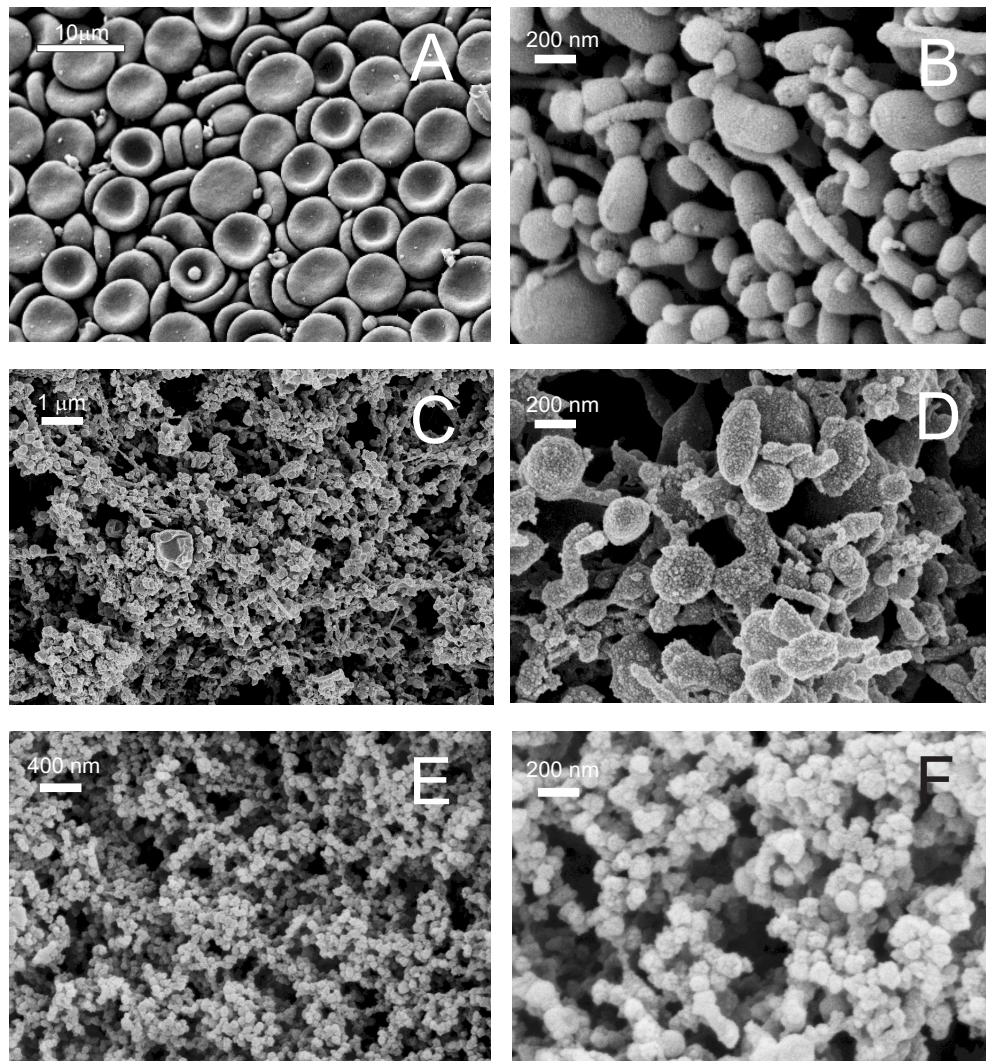
Slika 7: Vzorci, pridobljeni pri izolaciji MV iz periferne krvi človeka z napredovanim karcinomom trebušne slinavke (A-D). V vzorcih (C, D) je prisotno veliko MV, najdemo pa tudi aktivirane trombocite (B). Sediment celic iz istega vzorca (E, F). Vzorci so bili slikani s SEM.



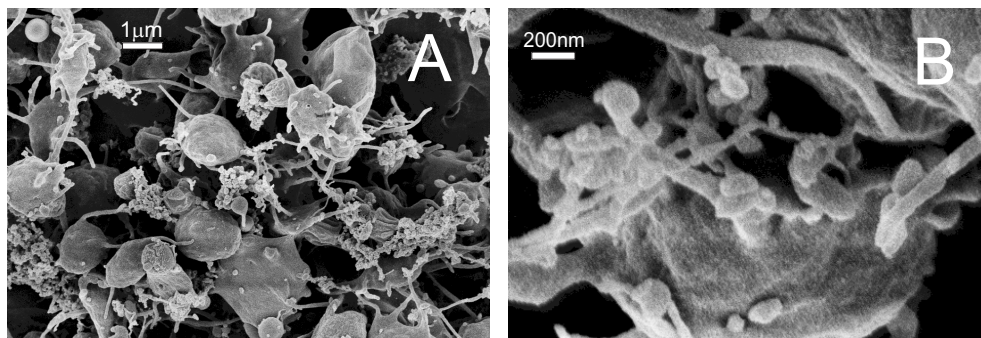
Slika 8: Sediment celic, pridobljen iz limfne tekočine mačke (A, B), slike MV, izoliranih iz istega vzorca (C) ter slike plevralne tekočine mačke (D, E). Sediment limfne tekočine vsebuje večinoma levkocite (A, B). Vzorci so bili slikani s SEM.



Slika 9: Sediment celic (A-C) in izoliranih MV (D-F) iz po-operativne drenažne tekočine človeka. Vidimo, da je prisotnih veliko eritrocitov (A), najdemo pa tudi levkocite (B, C). Številni MV so prisotni v supernatantu (D-F), kakor tudi v sedimentu (A). Vzorci so bili slikani s SEM.



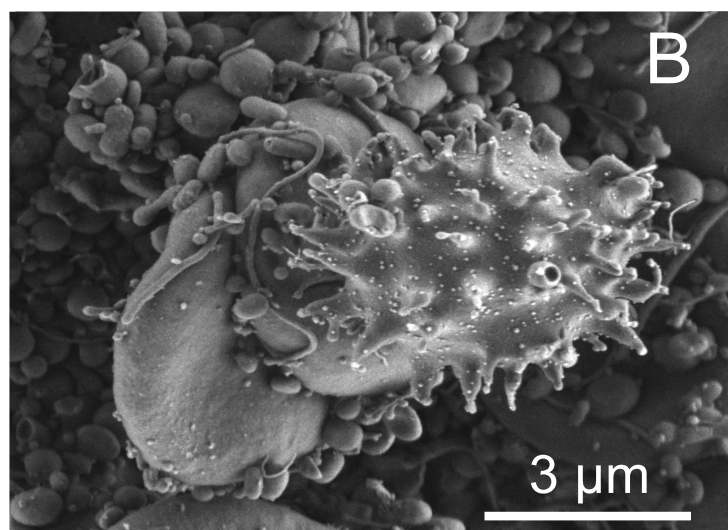
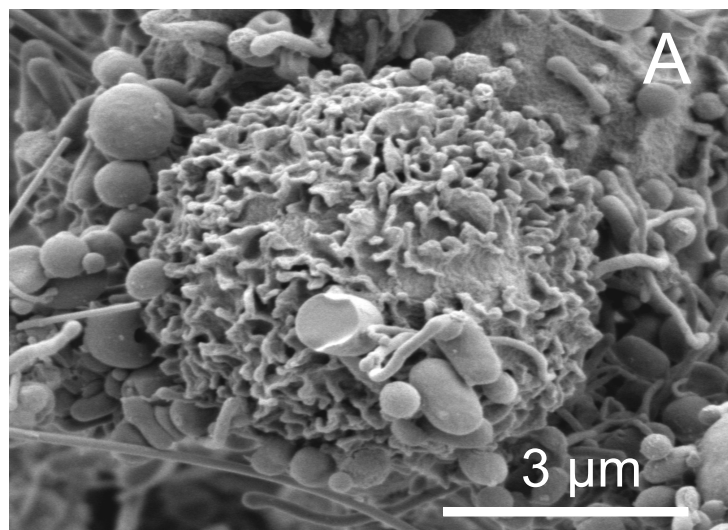
Slika 10: Sediment človeških eritrocitov iz cerebrospinalne tekočine človeka (A) in MV, izolirani iz istega vzorca (B). Mikrovezikli, izolirani iz ascitesa pri človeku (C, D) in iz plevralne tekočine bolnice z rakom debelega črevesa (E, F). Vzorci so bili slikani s SEM.

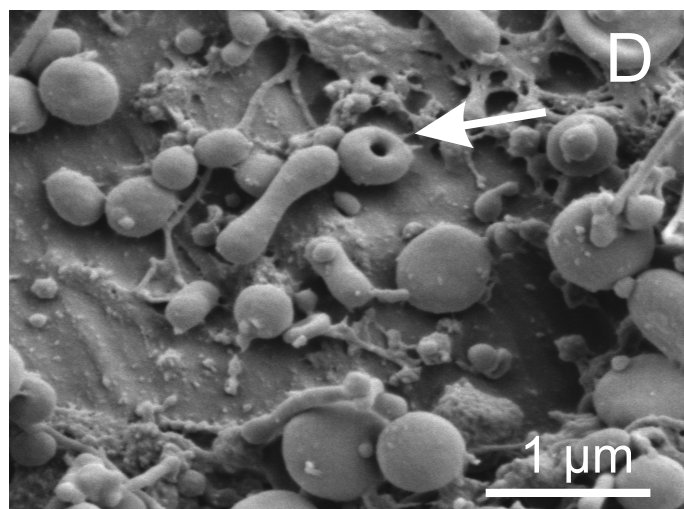
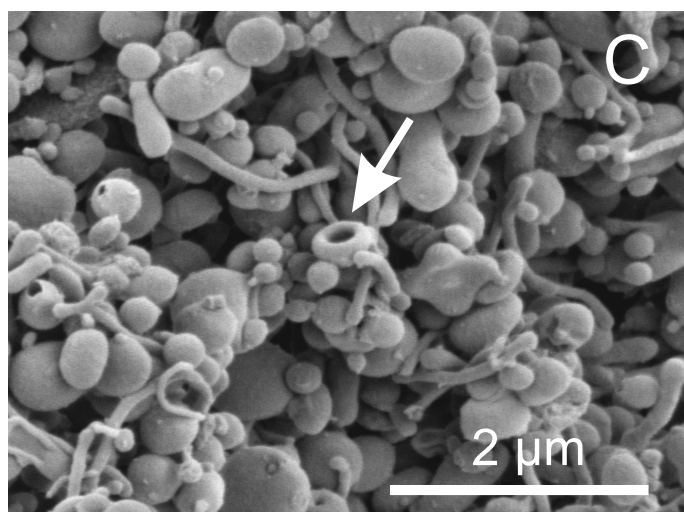


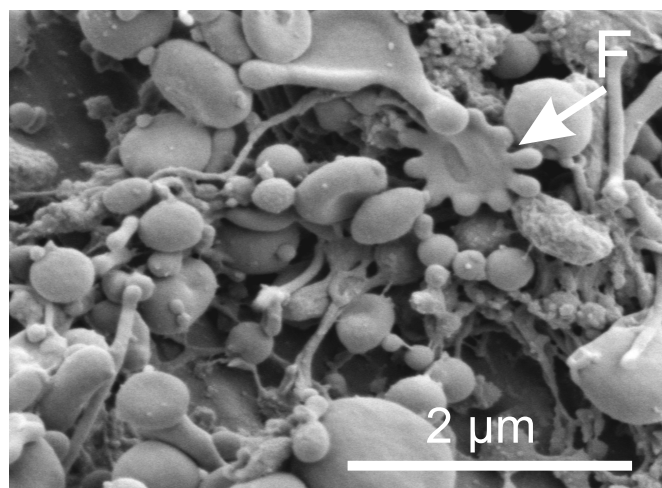
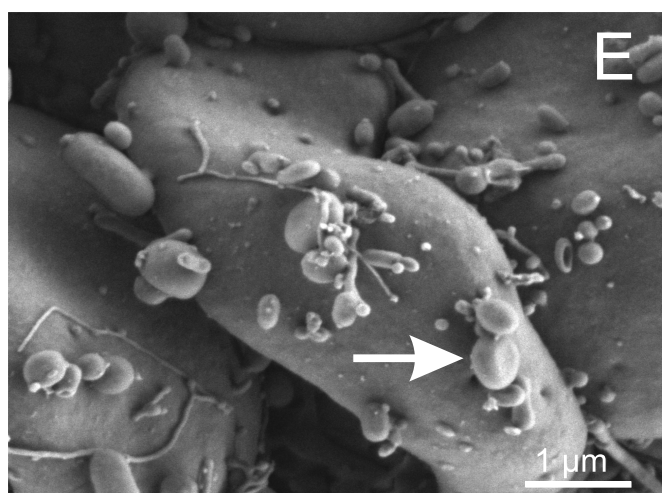
Slika 11: Material, izoliran iz periferne krvi kobile. V izolatih je prisotno veliko aktiviranih trombocitov (A) in mikroveziklov (B). Vzorci so bili slikani s SEM.

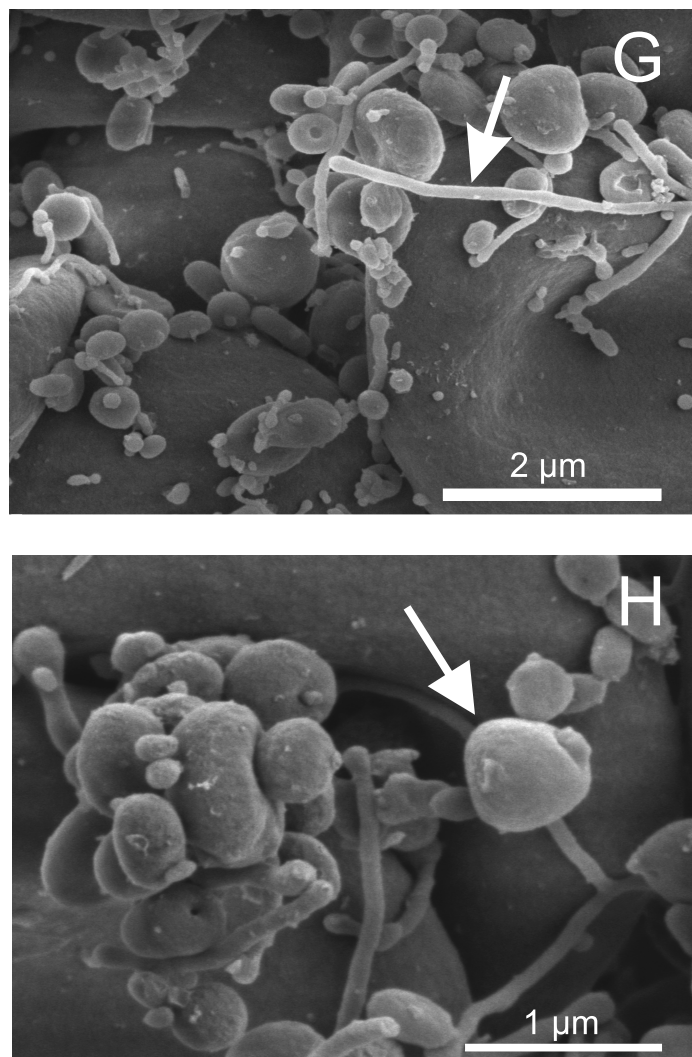
Slika 12 prikazuje izolat iz krvi človeka brez ugotovljene bolezni. Vidimo posamezne celice (na Sliki 12 A je brsteč levkocit, na Sliki 12 B pa brsteč eritrocit) in številne MV. Eritrocitni vezikli, ki so po velikosti relativno homogeni (50-80 nm) (12), nastanejo iz brstov, ki se oblikujejo na vrhu kopastih izrastkov ehinocita (Slika 12 B). MV zavzamejo značilne oblike celic brez notranje strukture, pri katerih je oblika določena z minimumom proste energije membrane. Take oblike so kroglice (Slika 12 H), stomatocitne oblike (Slika 8 E, Slika 12 C, D), diskocitne oblike (Slika 12 E), cevaste oblike (Slika 12 G) in oblike, ki jim pravimo "starfish" (Slika 12 F). Vidimo, da so ti MV, ki najverjetneje izvirajo iz trombocitov, relativno veliki (tudi do 500 nm).

Dolge cevaste strukture z ostrimi robovi, ki jih prav tako najdemo v vzorcih, pa ne ustrezajo minimumu proste energije fosfolipidnega dvosloja. Te cevaste strukture so najverjetneje artefakti, ki nastanejo med samim procesom izolacije iz vzorca (stekleni filament). Zrnate nanostrukture, ki jih lahko vidimo na mikroveziklih iz krvi, limfne tekočine in ascitesa (Slike 8 C, 10 D in F), so zlata zrnca. Ta zrnca so ostanek prekomernega napraševanja zlata pri pripravi vzorca za slikanje s SEM. Večja zlata zrnca lahko zasenčijo manjše MV iz človeške plevralne tekočine (Slika 10 F). Stomatocitna oblika MV, izoliranih iz plevralne tekočine mačke (Slika 8 D, E), kot tudi nekatere "luknje" v MV, izoliranih iz pooperativne drenažne tekočine, (Slika 9 F), so posledica sušenja pri pripravi vzorca za SEM.









Slika 12: Izolat iz periferne krvi človeka brez ugotovljene bolezni. Levkocit (A), brsteč ehinocit (B), trombocitni mikrovezikli (C-H). V vzorcu so večinoma posamezni eritrociti in številni trombocitni mikrovezikli. Trombocitni mikrovezikli zavzemajo oblike celic brez notranje strukture (puščice na kroglicah (H), stomatocitne oblike (C, D), diskocitne oblike (E), cevke (G) in "starfish" (F)). Vzorci so bili slikani s SEM.

Tabela 1 prikazuje velikosti populacij MV iz različnih izolatov živalskih in človeških tekočin. Največjo povprečno velikost MV smo izmerili pri izolatu iz krvne plazme zdravega človeka in sicer 308 nm (standardni odklon = 130 nm), najmanjšo pa pri izolatu iz plevralne tekočine človeka 107 nm (standardni odklon = 32 nm). Velikost MV se pri teh dveh vzorcih statistično pomembno razlikuje od ostalih (verjetnost $p \leq 0,05$). Razlike v povprečnih velikostih populacij in njihove statistične pomembnosti so prikazane v Tabeli 2, nad diagonalo. Statistično pomembno se razlikuje tudi cerebrospinalna tekočina od limfne tekočine, in sicer za 32 odstotkov ($p = 0,02$), ostale populacije MV se v povprečju med seboj statistično pomembno ne razlikujejo.

Tabela 1: Velikosti populacij mikroveziklov. Kratice: d.t. - drenažna tekočina, l.t. - limfna tekočina, cs.t. - cerebrospinalna tekočina, asc. - ascites, pl.m. - plevralna tekočina mačke, pl.č. - plevralna tekočina človeka.

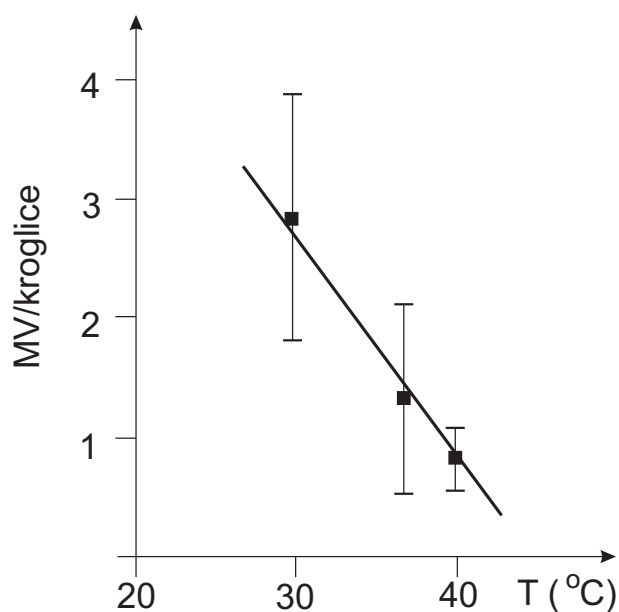
	povprečna vrednost (nm)	standardni odmik (nm)
d.t.	205	73
plazma	308	130
l.t.	231	109
cs.t.	168	58
asc.	203	72
pl.m.	209	106
pl.č.	107	32

Tabela 2: Razlike v velikostih populacij mikroveziklov; prikazana je razlika med velikostjo populacije, ki je navedena v prvem stolpcu, in velikostjo populacije, ki je navedena v prvi vrstici. Nad diagonalo: statistična pomembnost razlike, pod diagonalo: razlika v nanometrih in ustrezen odstotek. Kratice: d.t. - drenažna tekočina, l.t. - limfna tekočina, cs.t. - cerebrospinalna tekočina, asc. - ascites, pl.m. - plevralna tekočina mačke, pl.č. - plevralna tekočina človeka.

vzorec	d.t.	plazma	l.t.	cs.t.	asc.	pl.m.	pl.č.
d.t.	1	< 0,01	0,35	0,11	0,90	0,87	< 0,01
plazma	103(0,80)	1	0,05	< 0,01	0,02	0,05	< 0,01
l.t.	26(0,12)	-77(-0,29)	1	0,02	0,34	0,23	< 0,01
cs.t.	-37(-0,14)	-140(-0,59)	-63(-0,32)	1	0,44	0,16	< 0,01
asc.	-2(-0,01)	-102(-0,40)	-28(-0,13)	35(0,19)	1	0,82	< 0,01
pl.m.	4(0,02)	-99(-0,38)	-22(-0,10)	41(0,22)	6(0,03)	1	< 0,01
pl.č.	-98(-0,63)	-201(-0,97)	-124(-0,73)	-61(-0,44)	-96(-0,62)	-102(-0,65)	1

8.2 Vpliv temperature na število mikroveziklov v izolatih periferne krvi

Slika 13 prikazuje odvisnost števila MV v izolatih periferne krvi od temperature med procesom izolacije. Vidimo, da pri višjih temperaturah izmerimo manj mikroveziklov v izolatih. Vidimo tudi, da že ohladitev krvi na sobno temperaturo povzroči znatno povečanje števila MV v izolatu, kar lahko vsaj delno razloži velike razlike v številu MV, prikazane na Sliki 2.



Slika 13: Povprečna vrednost števila mikroveziklov, izoliranih iz vzorcev krvi pri različnih temperaturah.

9 Razprava

9.1 Morfološke značilnosti mikroveziklov, izoliranih iz telesnih tekočin živali in človeka

V nalogi predstavljamo slike MV, izoliranih iz različnih telesnih tekočin živali in človeka. V skladu s pričakovanjem smo MV našli v vseh telesnih tekočinah. Številne MV smo našli tako v izolatih, kot tudi v sedimentih.

Slika 7 B prikazuje, da so v vzorcih, ki smo jih pripravili v skladu s protokolom za izolacijo MV, prisotni številni aktivirani trombociti. Prisotnost aktiviranih trombocitov v vzorcu pomeni, da so poleg MV, ki so prisotni v krvi že ob odvzemu, v izolatih lahko tudi MV, ki nastanejo po odvzemu krvi, in sicer med samim procesom izolacije.

Sediment iz vzorca drenaže in cerebrospinalne tekočine vsebuje večinoma krvne celice, medtem ko se MV nahajajo v supernatantu. Na Sliki 9 A-C vidimo eritrocite in levkocit, Slika 10 A pa prikazuje homogeno populacijo eritrocitov, medtem ko so izolirani MV (Sliki 10 D-F in 12) verjetno trombocitnega izvora, čeprav trombocitov direktno nismo opazili, mogoče pa je, da so vezikulirali. Kot je namreč razvidno iz naših rezultatov, se trombociti v procesu izolacije aktivirajo (Sliki 7 B in 11 A). Ti aktivirani trombociti odpuščajo mikrovezikle in na koncu razpadejo, ter v vzorec dodajo tudi eksosome (Slika 11 B).

Opazovane strukture, dobljene z izolacijo iz vzorcev, so sferične, diskocitne, zvezdaste in cevaste oblike. V procesu brstenja celic najprej pride do prerazporeditve membranskih sestavin, kar vpliva na lokalno ukrivljenost membrane in razvoj brsta. Takšne oblike teoretično opišemo z minimizacijo proste energije membrane (104), zato lahko sklepamo, da opazovane strukture nastanejo v spontanem procesu ukrivljanja membrane (105). Ko ukrivljenost membrane doseže določeno obliko, se izoblikuje tanek vrat, ki brst povezuje z materinsko membrano (105). Tanek vrat, ki ima zelo majhno površino, se lahko zaradi strižne sile pretrga, brst se odcepi in postane prost MV, pri čemer pa ohrani obliko in površino. Simetrično obliko MV z zaobljenimi zaključki lahko pripišemo značilnim fizikalnim lastnostim fosfolipidnega dvosloja. MV iz plevralne tekočine imajo nesimetrično obliko. Prav zaradi takšne oblike se postavlja vprašanje, ali so ti delci dejansko membranski MV, ali pa so to kakšni drugi mikrodelci, katerih obliko določa tudi njihova vsebina. Za bolj

podrobno razumevanje sestave bi bile potrebne dodatne analize.

Nejasen je tudi mehanizem nastanka glavnine MV, ki jih najdemo v izolatih iz krvi (Slika 12). Ti delci niso dosti manjši od trombocitov, iz slik aktiviranih trombocitov (Slika 7 B, Slika 11) pa je razvidno, da so brsti trombocitov veliko ožji (manjši od 100 nm). Zato se ne zdi verjetno, da bi ti MV lahko nastali z odcepljanjem brstov od aktiviranih trombocitov. Opaženi delci bi lahko bili ostanki trombocitov, ki so zaradi brstenja izgubili velik del svoje površine in prostornine in se močno deformirali. Očitno je namreč, da ti delci nimajo značilne oblike ploščice, ki jo zavzame mirujoč trombocit, niti značilne oblike aktiviranega trombocita s cevastimi izrastki. Po obliki opaženi MV bolj ustrezajo eritrocitom, pri katerih je oblika določena z lastnostmi membrane, njeno površino in osmotskim statusom.

Iz slik s SEM lahko sklepamo na morebitne artefakte, ki se pojavljajo med pripravo vzorca za SEM, kakor tudi tiste, ki nastajajo med samim procesom izolacije MV. Slikanje izoliranega materiala tako dopolnjuje metode za določanje MV in pomaga ugotoviti, kje se dejansko nahaja populacija MV na razsevnem diagramu, pridobljenem s pretočno citometrijo. Po tem, ko smo v izolatih opazili veliko število celic, smo modificirali protokol za izolacijo MV in iz razsevnega diagrama pretočne citometrije izključili dogodke, ki predstavljajo visoko verjetnost prisotnosti preostalih celic v vzorcu, ki niso MV.

Na podlagi prikazanih slik lahko ugotovimo, da so MV prisotni v vseh obravnavanih telesnih tekočinah, kar kaže, da je mikrovezikulacija splošen pojav. Ker so številni MV prisotni tudi v sedimentih vzorcev, številne celice pa v izolatih, ugotovimo, da je število dogodkov, ki jih pri vzorcih izmerimo s pretočnim citometrom, močno odvisno od postopka izolacije.

9.2 Vpliv zunanjih parametrov in dinamike izolacije na število mikroveziklov v izolatih periferne krvi

Zanesljivost in točnost metode za izolacijo MV predstavlja ključni korak v kliničnih raziskavah, kjer želimo populacije kvantitativno primerjati. V tem delu smo se omejili na študij vpliva temperature pri postopku izolacije na število MV v izolatih. Študirali smo populacijo preiskovancev brez ugotovljene bolezni. Ugotovili smo, da v izolatih izmerimo manj MV, če je temperatura med celotnim postopkom izolacije višja (Slika 13). Možni poglobljen vpliv na ta pojav je zmanjšana viskoznost krvi pri

višjih temperaturah, kar posledično vpliva na hitrost usedanja celic, zlasti trombocitov, v krvnih vzorcih. V ravnovesju namreč velja, da je vsota vseh sil, ki delujejo na delec, ki potuje v centrifugirki, enaka 0. Upoštevali smo silo zaradi centrifugalnega pospeška, silo vzgona in silo upora tekočine,

$$F_{\text{centrifugalna}} - F_{\text{vzgon}} - F_{\text{upora}} = 0. \quad (1)$$

Vzamemo, da je

$$F_{\text{centrifugalna}} = ma, \quad (2)$$

kjer je m masa delca, a pa pospešek centrifuge (v našem primeru 1550 g),

$$F_{\text{vzgon}} = m'a, \quad (3)$$

kjer je m' masa izpodrinjene tekočine, v kateri se giblje delec,

$$F_{\text{upora}} = \alpha d \eta v, \quad (4)$$

kjer je α brezdimenzijski koeficient, ki opisuje obliko delca, d razsežnost delca, η viskoznost tekočine, v kateri se giblje delec, in v hitrost delca pri usedanju. Če vstavimo enačbe (2) - (4) v enačbo (1), in jo uredimo, dobimo

$$v = \frac{(m - m')a}{\alpha d \eta}. \quad (5)$$

Vidimo, da se celice počasneje usedajo, če je viskoznost tekočine, v kateri plavajo, manjša, saj je hitrost obratnosorazmerna viskoznosti. Ker viskoznost tekočine pada z dviganjem temperature, se pri nižjih temperaturah celice dlje časa zadržujejo v zgornjem delu epruvete (v območju plazme), pri tem pa nenehno sipajo MV. V plazmi bo tako pri nižjih temperaturah nastalo več MV kot pri višjih, ustvari pa se tudi gradient koncentracije MV v epruveti. Zato je pomembno, katero plast plazme vzamemo. Dinamika sedimentacije (usedanja) pri posamezniku je odvisna tudi od velikosti in oblike krvnih celic, predvsem trombocitov (parametrov a in d).

Menimo, da je šibka točka metode temperaturna regulacija v centrifugi. Zaradi trenja med deli centrifuge se slednja med vrtenjem segreva. Pri tem se avtomatsko vključi hlajenje, ko temperatura preseže določeno vrednost. Nihanja v temperaturi so lahko velika tudi do nekaj stopinj Celzija, časovni potek temperaturne regulacije pa ni predvidljiv in ponovljiv. Menimo, da postopka izolacije ni mogoče izboljšati brez predhodnega izboljšanja delovanja centrifuge.

Odvzem plazme po centrifugiranju smo izvajali ročno (s pipeto). Pri takem odvzemu je možnost kontrole hitrosti vsesavanja tekočine omejena, razen tega ni ponovljivo, kateri del vzorca vsesamo v pipeto. Za izboljšanje ponovljivosti odvzema plazme iz epruvete bi bilo potrebno uporabiti avtomat z nastavljivo hitrostjo sesanja in senzorjem za ustrezno postavitev konice za sesanje glede na gladino vzorca.

Ker izboljšane aparature še niso na voljo, na osnovi naših rezultatov menimo, da je primernejša temperatura za izolacijo 37 °C, namesto sobne temperature, kot navajajo drugi avtorji (90). Pri 37 °C je viskoznost vzorcev manjša, zato se celice v centrifugi hitreje posedajo in v predelek, iz katerega odvzamemo vzorec, odpustijo manjše število mikroveziklov. Pri telesni temperaturi tudi ne pride do aktivacije trombocitov zaradi ohlادتve na sobno temperaturo.

Pretočna citometrija je sodobna, elegantna in pogosto uporabljana metoda določanja števila MV. Prednosti pretočne citometrije so v tem, da ne zahteva fiksacije in drugih dolgotrajnih postopkov. Slabosti pa so, da ostane pri merjenju oblika značilnih mikroskopskih struktur v vzorcu nejasna in da štetje s citometrom ni dovolj natančno. Če imata dva delca različno sestavo in enako velikost, se pri absorpciji svetlobe njena amplituda različno zmanjša, tako da je signal, ki potuje naravnost, za oba delca različen, kar predstavlja artefakt. Artefakti se pojavljajo tudi pri štetju delcev, katerih velikost je blizu valovne dolžine svetlobe, ki jo merimo (106).

Artefakt metode predstavlja tudi dejstvo, da se kri, ki je odvzeta preiskovancu, razlikuje od krvi *in vivo*, pri odvzemu in pri centrifugiranju pride do aktivacije trombocitov, stanje krvi pa se spremeni tudi zaradi prisotnosti antikoagulantov v epruvetah za odvzem (107). Mikrovezikli se lahko lepijo na stene igle, epruvet in centrifugirk, pa tudi na konice pipet. Pomembnost posameznih vplivov na končni rezultat in analiza vseh korakov, ki sodelujejo v postopku izolacije MV, še nista bili izvedeni. Tako analizo je pomembno izdelati, saj je izboljšava obstoječih protokolov za izolacijo MV iz krvi predpogoj, da se ustvari trdna podlaga za klinične študije. Mikrovezikli predstavljajo zanimivo in obetavno področje v kliničnih raziskavah zaradi potencialne možnosti uporabe v diagnostične in terapevtske namene pri različnih boleznih. Seveda bi bilo nujno potrebno vložiti dodatna prizadevanja v izboljšanje protokola za izolacijo in opazovanje.

Dosedanje raziskave mikrovezikulacije temeljijo predvsem na študiju biokemijskih vzrokov. Ugotovili so, da trombocitni MV vsebujejo arahidonsko kislino (49), ki

lahko sproži številne odzive. Lipopolisaharidno-stimulirani monociti sproščajo MV in aktivirajo adhezijske komplekse (73), kar jih naredi sposobne razširjati dvojni prokoagulantni potencial, iz ne-stimuliranih monocitov izhaja trombomodulin (73). Levkocitni MV aktivirajo endotelijske celice in stimulirajo indukcijo tkivnega faktorja (108), obratno pa endotelijski MV inducira monocitno aktivacijo in izražanje tkivnega faktorja (109). Mikrovezikli endotelijskega porekla vsebujejo matriks metaloproteinaz z vplivom na angiogenezo, prav tako so našli plazminogeni aktivator inhibitor-1, ki služi spodbujanju prokoagulantne generacije MV endotelialnih celic (110). Cirkulirajoči MV pri pacientih s kronično odpovedjo srca ali miokardialno kapjo povzročajo endotelialno disfunkcijo (111), kar se močno zmanjša z ustrezno terapijo (112), to pa se kaže z velikim upadom števila MV (113). Sproščanje MV je pri človeških eritrocitih stimulirano s strani stalnega dvigovanja znotrajceličnega kalcija (37). Ostali dogodki, povezani z dvigom kalcija v eritrocitih, vključujejo: odpiranje od kalcija odvisnih kalijevih kanalčkov, kar vodi v sproščanje kalijevih ionov iz celice; aktivacija od kalcija odvisnih proteaz, vključno s kalpainom (37, 91); aktivacija fosfolipidnega transporterja skramblaze, kar vodi v izpostavitve fosfatidilserina na zunanji strani dvoslojne membrane; citoskeletalne spremembe (114), predvsem sprememba v morfologiji eritrocitov iz normalne diskocitne oblike v ehinocitno (91). Študije trombocitov so pokazale, da je defosforilacija tirozina tista, ki uravnava proteine, vključene v proces nastanka MV (115).

Naša študija izpostavlja tudi biofizikalne vzroke. Ker pri slikanju nismo našli trombocitov v sedimentih, v izolatih pa smo našli samo aktivirane trombocite, sklepamo, da trombociti vezikulirajo med postopkom izolacije. To je v skladu z ugotovitvami drugih avtorjev, da je 80-90 % MV izoliranih iz krvi trombocitnega izvora (90) in da so pripravki krvi uporabni le v določenem časovnem intervalu, ker trombociti v pripravkih krvi vezikulirajo (116). Ugotovili smo tudi, da je število MV v izolatih iz periferne krvi odvisno od temperature med izolacijo, saj temperatura vpliva tako na aktivacijo trombocitov kot tudi na hitrost usedanja trombocitov v epruveti med izolacijo. Zaradi dokazov, ki sledijo iz slik izolatov in sedimenta in zaradi velike občutljivosti števila MV na temperaturo med izolacijo, sklepamo, da je v izolatih prisotno veliko trombocitnih MV, ki so nastali po odvzemu krvi (zaradi biokemijskih vzrokov, zaradi spremembe temperature ali zaradi strižnih sil ob odvzemu krvi in pri sedimentaciji v centrifugi).

10 Zaključki

- Izolirali smo mikrovezikle iz različnih telesnih tekočin živali in človeka (krvi, limfne tekočine, plevralne tekočine, ascitesa, cerebrospinalne tekočine in drenažne tekočine). Številne mikrovezikle najdemo tudi v ustreznih sedimentih, številne celice pa so prisotne v izolatih.
- Temperatura med procesom izolacije pomembno vpliva na število mikroveziklov v izolatih iz periferne krvi; pri nižjih temperaturah dobimo večje število mikroveziklov.
- Postopka izolacije mikroveziklov, ki je občutljiv na zunanje parametre in dinamiko izolacije, ni mogoče izboljšati brez tehnološko naprednih rešitev. Potrebno je nadgraditi instrumente, ki v sedanji obliki ne zagotavljajo zadostne kontrole postopka.
- V okviru obstoječih možnosti predlagamo izboljšavo protokola za izolacijo mikroveziklov glede na temperaturo, ki naj bo 37 °C namesto sobne temperature.

11 Zahvala

V okviru predstavljenega dela so bili izvedeni laboratorijski poskusi in klinične študije. Delo je potekalo v Laboratoriju za klinično biofiziko Medicinske fakultete UL. Klinične študije so potekale na KO za gastroenterologijo UKC Ljubljana. Delo je potekalo od septembra leta 2009.

Kompleksen pristop k problematiki je terjal sodelovanje mnogih strokovnjakov doma in v tujini ter delo z opremo, ki presega možnosti Laboratorija za klinično biofiziko. Ker brez sodelovanja in podpore kolegov to delo ne bi bilo mogoče, se jim zahvaljujem za njihov pomemben prispevek.

Posebna zahvala velja tudi mentorici, prof. dr. Veroniki Kralj-Iglič, univ. dipl. fiz. iz Laboratorija za klinično biofiziko Inštituta za biofiziko Medicinske fakultete UL, ki naju je spremljala in vodila skozi vse faze raziskovalnega dela. Iskrena hvala za njeno vzpodbudo in izreden človeški občutek tako za živali kot ljudi.

Najina zahvala gre tudi somentorju, prof. dr. Vojtehu Cestniku, dr. vet. med., z Inštituta za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete UL za pomoč pri oblikovanju tako zahtevnega in kompleksnega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štabucu, dr. med., predstojniku KO za gastroenterologijo UKC Ljubljana in asist. Radu Janši, dr. med., iz iste ustanove, ter prof. dr. Romanu Jerali s Kemijskega inštituta, ker so nama omogočili delo na kliniki in s pretočnim citometrom.

Zahvaljujem se dr. Apoloniji Bedini-Zavec s Kemijskega inštituta in Laboratorija za klinično biofiziko za meritve na pretočnem citometru, prof. dr. Henryju Hägerstrandu in Vidu Šuštarju, univ.dipl.biol. za slikanje vzorcev z elektronskim mikroskopom na Åbo Akademi University ter dr. Kyrii Mam iz FET Company, Nanoport, za slikanje vzorcev z elektronskim mikroskopom v Eindhovnu, Nizozemska.

Aniti Mrvar-Brečko, dr. med., iz KO za anesteziologijo in reanimatologijo UKC Ljubljana, doc. dr. Petru Kruljcu, dr. vet. med. z Veterinarske fakultete UL in Emirju Mujagiću, dr. vet. med. iz Prve klinike za male živali za vzorce telesnih tekočin.

Prof. dr. Alešu Igliču s Fakultete za elektrotehniko UL in prof. dr. Petru Veraniču z Medicinske fakultete UL se zahvaljujema za nasvete in diskusije.

Dr. Mojci Frank, dr. med. iz KO za revmatologijo UKC Ljubljana in Vidu Šuštarju, univ. dipl. biol. iz Laboratorija za klinično biofiziko Medicinske fakultete UL se zahvaljujema za izboljšave protokola za izolacijo mikroveziklov.

Za sodelovanje pri poskusih se zahvaljujema dr. Mojci Frank, dr. med., Vidu Šuštarju, univ. dipl. biol., Vidu Janši, študentu medicine in Petri Sušanji, študentki medicine.

Za odvzem krvi se zahvaljujema Ines Hribar Ignasčenko, viš. med. ses. iz KO za gastroenterologijo UKC Ljubljana. Posebna zahvala gre darovalcem krvi.

Za lektoriranje slovenskega teksta se zahvaljujema Marijanu Pušavcu, prof. slov.

Za lektoriranje angleškega teksta se zahvaljujema dr. Suzani Žižek, univ. dipl. biol.

Za skrben pregled literature se zahvaljujema mag. Brigiti Greccs-Smole, univ. dipl. bibl.

Za podporo in vzpodbudo se zahvaljujema najinima družinama in prijateljem.

12 Popravek

Ob kritičnem branju naloge je bilo ugotovljeno, da je v konferenčni objavi (102), v kateri je objavljen del rezultatov našega dela, napaka, in sicer je pri Sliki 1 na strani 85 navedena velikost merilnih kroglic $1\ \mu\text{m}$, kar je napačno. Prava velikost je $10\ \mu\text{m}$.

13 Literatura

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma.
Br J Haematol 1967; 13: 269-88.
2. Rumsby MG, Trotter J, Allan D, Michell RH. Recovery of membrane microvesicles from human erythrocytes stored for transfusion: a mechanism for the erythrocyte discocyte-to-spherocyte shape transformation.
Biochem Soc Trans 1977; 5: 126-8.
3. Shukla SD, Coleman R, Finean JB, Michell RH. Use of phospholipase-c to detect structural-changes in membranes of human erythrocytes aged by storage.
Biochim Biophys Acta 1978; 512: 341-9.
4. Cole WF, Rumsby MG, Longster GH, Tovey LAD. Changes in the inhibition of specific agglutination by plasma due to microvesicles released from human red-cells during storage for transfusion. Vox Sang 1979; 37: 73-7.
5. Dumaswala UJ, Bryan DJ, Greenwalt TJ. Biochemical-characterization of microvesicles shed by red-cells during sickling and storage.
Fed Proc 1983; 42: 2197.
6. Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles.
Transfusion 2006; 46: 143-52.
7. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers.
Transfus Med Rev 2006; 20: 1-26.
8. Allan D, Billah MM, Finean JB, Michell RH. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca^{2+}]$.
Nature 1976; 261: 58-60.
9. Araki T. Release of cholesterol-enriched microvesicles from human erythrocytes caused by hypertonic saline at low-temperatures.
FEBS Lett 1979; 97: 237-40.

10. Hägerstrand H, Isomaa B. Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 982: 179-86.
11. Yamaguchi T, Kajikawa T, Kimoto E. Vesiculation induced by hydrostatic-pressure in human erythrocytes. *J Biochem* 1991; 3: 355-9.
12. Hägerstrand H, Isomaa B. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1109: 117-26.
13. Hägerstrand H, Isomaa B. Lipid and protein-composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190: 409-15.
14. Hägerstrand H, Bobrowska-Hägerstrand M, Lillsunde I, Isomaa B. Vesiculation induced by amphiphiles and ionophore A23187 in porcine platelets: a transmission electron microscopic study. *Chem-Biol Interact* 1996; 101: 115-26.
15. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ and Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94: 3791-9.
16. Cerri C, Chimenti D, Conti I, Neri T, Paggiaro P, Celi A. Monocyte/macrophage-derived microparticles up-regulate inflammatory mediator synthesis by human airway epithelial cells. *J Immunol* 2006; 177: 1975-80.
17. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K et al. Tumor-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumor cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 808-18.
18. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1004-9.

19. Brogan PA, Shah V, Brachet C, et al. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 927-36.
20. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104: 93-102.
21. Shet AS, Aras O, Gupta K, et al. Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102: 2678-83.
22. Black PH. Shedding from normal and cancer-cell surfaces. *New Engl J Med* 1980; 303: 1415-6.
23. Taylor DD, Homesley HD, Doellgast GJ. Membrane-associated immunoglobulins in cysts and ascites fluids of ovarian cancer patients. *Am J Reprod Immunol* 1983; 3: 7-11.
24. Taylor DD, Chou IN, Black PH. Isolation of plasma-membrane fragments from cultured murine melanoma-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 470-6.
25. Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* 2005; 25: 3703-7.
26. Kralj-Iglič V, Batista U, Hägerstrand H, Iglič A, Majhenc J, Sok M. On mechanisms of cell plasma membrane vesiculation. *Radiol Oncol* 1998; 32: 119-23.
27. Whiteside TL. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *Br J Cancer* 2005; 92: 209-11.
28. Huber V, Fais S, Iero M, et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128: 1796-804.
29. Valenti R, Huber V, Iero M, Filipazzi P, Parmiani G, Rivoltini L. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res* 2007; 67: 2912-5.

30. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassara D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res* 1998; 18: 3433-7.
31. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003; 63: 4331-7.
32. Ratajczak MZ. Microvesicles: from "dust to crown". *Blood* 2006; 108: 2885-6.
33. Bastida E, Ordinas A, Jamieson GA. Identity of procoagulant and platelet aggregating activities in microvesicles from human glioblastoma cells. *Thromb Haemost* 1983; 50: 218.
34. Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Jamieson GA. Identical thrombogenic effects of human-tumor cells and shed microvesicles with different mechanisms of platelet activation. *Thromb Haemost* 1985; 54: 264.
35. Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Jamieson GA. Morphometric evaluation of thrombogenesis by microvesicles from human-tumor cell-lines with thrombin-dependent (u87mg) and adenosine-diphosphate dependent (sknmc) platelet-activating mechanisms. *J Lab Clin Med* 1986; 108: 622-7.
36. Rauch U, Antoniak S. Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thromb Haemost* 2007; 97: 9-18.
37. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 392-401.
38. Taylor DD, Black PH. Neoplastic and developmental importance of plasma membrane vesicles. *Am Zool* 1987; 26: 411-5.
39. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22-7.
40. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3337-48.

41. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 182-7.
42. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell to cell communication. *Leukemia* 2006; 20: 1487-95.
43. Pisetsky DS. Microparticles as biomarkers in autoimmunity: from dust bin to center stage. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: No. 135.
44. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002; 30: 450-9.
45. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98: 3143-9.
46. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids* 2003; 17: 33-42.
47. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847-56.
48. Fevrier B, Vilette D, Archer F, et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9683-8.
49. Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF, McNicol A. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 2006; 107: 3907-11.
50. Vella LJ, Greenwood DLV, Cappai R, Scheerlinck JP, Hill AF. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 124: 385-93.

51. Reich CF, Pisetsky DS. The content of DNA and RNA in microparticles released by Jurkat and HL-60 cells undergoing in vitro apoptosis. *Exp Cell Res* 2009; 315: 760-8.
52. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol* 2007; 66: 159-65.
53. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 55: 808-18.
54. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 2004; 12: 310-6.
55. Coltel N, Combes V, Wassmer SC, Chimini G, Grau GE. Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria. *Microbes Infect* 2006; 8: 2305-16.
56. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 2006; 172: 923-35.
57. Lopez JA, Del Conde I, Shrimpton CN. Receptors, rafts, and microvesicles in thrombosis and inflammation. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1737-44.
58. Holmes CE, Levis JE, Ornstein DL. Activated platelets enhance ovarian cancer cell invasion in a cellular model of metastasis. *Clin Exp Metab* 2009; 26: 653-61.
59. Janowska-Wieczorek A, Marquez-Curtis LA, Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion* 2006; 46: 1199-209.
60. Greer IA. Endothelial cell microparticles and antiphospholipid syndrome: pathologic explanation and diagnostic opportunities. *Thromb Haemost* 2004; 91: 636-8.

61. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1498-503.
62. Brogan PA, Dillon MJ. Endothelial microparticles and the diagnosis of the vasculitides. *Intern Med* 2004; 43: 1115-9.
63. Kim HK, Song KS, Park YS, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastatic predictor. *Eu J Cancer* 2003; 39: 184-91.
64. Vanderburg C, Delalle I. Exosomal miRNAs profiles in bipolar disorder and schizophrenia. In: *Keystone Symposium The Molecular Basis of Schizophrenia and Bipolar Disorder*. Keystone, CO, 2009: 2009.
65. Schetter AJ, Harris CC. Plasma microRNAs: a potential biomarker for colorectal cancer? *Gut* 2009; 58: 1318-9.
66. Junkar I, Šuštar V, Frank M, et al. Blood and synovial microparticles as revealed by atomic force and scanning electron microscope. *Open Autoimmun J* 2009; 1(9): e50-8.
67. Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 114-21.
68. Mrvar-Brečko A, Šuštar V, Janša V, et al. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cell Mol Dis* 2010; 44: 307-12.
69. Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, et al. Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2492-501.
70. Pascual, M, Steiger, G, Sadallah S, et al. Identification of membranebound CR1 (CD35) in human urine: evidence for its release by glomerular podocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 889-99.

71. Bona R, Lee E, Rickles F. Tissue factor apoprotein - intracellular-transport and expression in shed membrane-vesicles. *Thromb Res* 1987; 48: 487-500.
72. Furie B, Zwicker J, LaRocca T, Kos C, Bauer B, Furie BC. Tissue factor-bearing microparticles and cancer-associated thrombosis. *Haematol Rep* 2005; 1: 5-8.
73. Müller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17: 476-8.
74. del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106: 1604-11.
75. Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 3962-70.
76. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2857-66.
77. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99: 348-53.
78. del Conde I, Bharwani LD, Dietzen DJ, Pendurthi U, Thaigarajan P, Lopez JA. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 70-4.
79. Hron G, Kollars M, Weber H, et al. Tissue factor positive microparticles - cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2007; 97: 119-23.
80. Rauch U, Antoniak S. Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thromb Haemost* 2007; 97: 9-18.

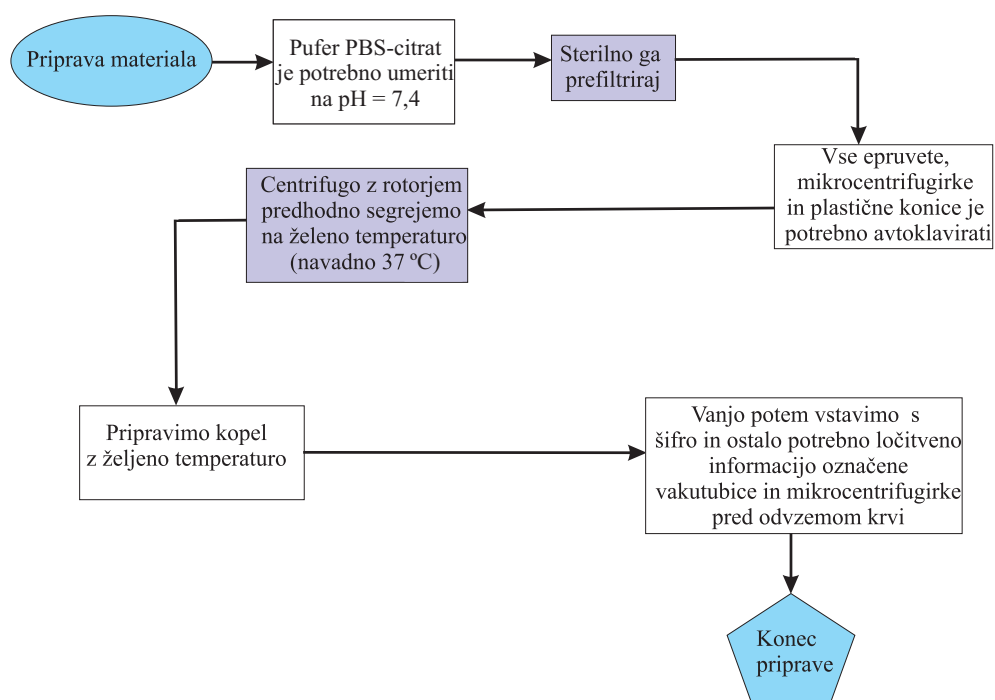
81. Furie B, Furie BC. Cancer-associated thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 177-81.
82. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004; 91: 667-73.
83. Jy W, Tiede M, Bidot CJ, et al. Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2007; 121: 319-25.
84. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, et al. 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* 1994; 84: 3691-9.
85. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus : association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006; 95: 94-9.
86. Sheremata WA, Jy W, Horstman LL, Ahn YS, Alexander S, Minagar A. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2008; 5: No. 7.
87. Kravitz MS, Shoenfeld Y. Thrombocytopenic conditions-autoimmunity and hypercoagulability: commonalities and differences in ITP, TTP, HIT, and APS. *Am J Hematol* 2005; 80: 232-42.
88. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 113: 752-60.
89. Juntres P. Prenosljive spongiformne encefalopatije - TSE, BSE, FSE, CWD in druge. In: Juntres P, ed. *Veterinarski teden: svetovni dan stekline, prenosljive spongiformne encefalopatije (TSE)*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2009: 21-7.

90. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 2442-7.
91. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 1982; 60: 834-40.
92. Biro E, Nieuwland R, Sturk A. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1843-4.
93. Hugel B, Zobairi F, Freyssinet JM. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1846-7.
94. Nomura S. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1847-8.
95. Shet AS, Key NS, Hebbel RP. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1848-50.
96. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-87.
97. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48; 180-6.
98. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Elevated levels of procoagulant microparticles in a patient with myocardial infarction, antiphospholipid antibodies and multifocal cardiac thrombosis. *Thromb J* 2005; 3: 15.
99. Janša R, Šuštar V, Frank M, et al. Number of microvesicles in peripheral blood and ability of plasma to induce adhesion between phospholipid membranes in 19 patients with gastrointestinal diseases. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41: 124-32.
100. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1498-503.

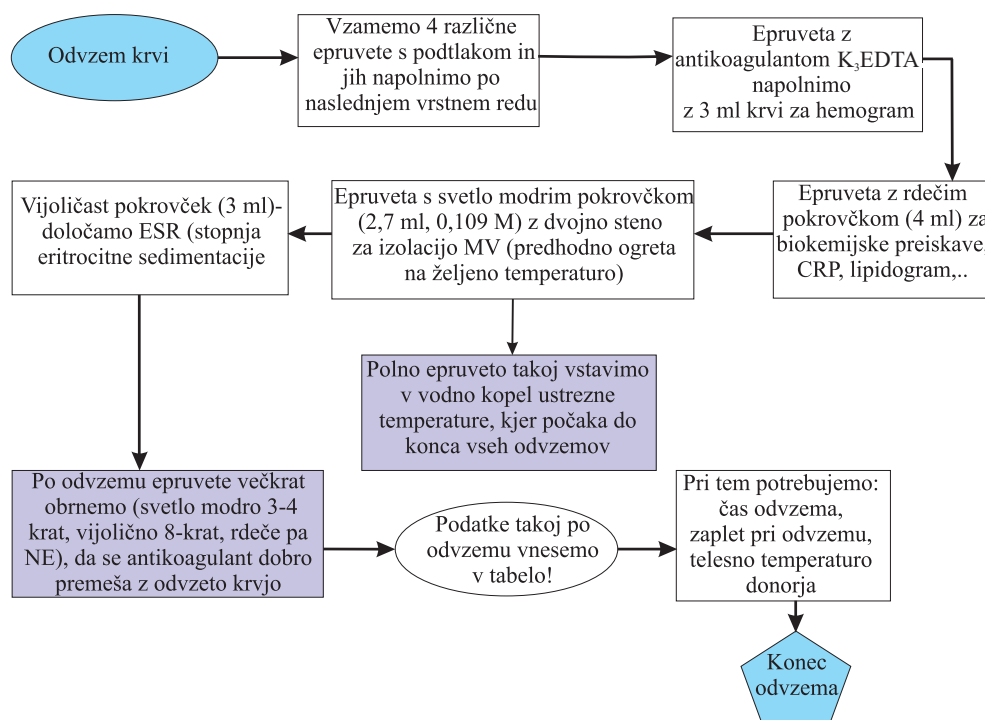
101. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS. Measuring circulation cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1842-3.
102. Bedina-Zavec A, Frank M, Janša V, et al. Assessment of nanovesicles isolated from peripheral blood. In: *SLONANO: book of abstracts*. Ljubljana: Kemijski inštitut, 2009: 85-6.
103. Maurer-Spurej E, Pfeiler G, Maurer N, Lindner H, Glatter O, Devine DV. Room temperature activates human blood platelets. *Lab Invest* 2001; 81: 581-92.
104. Iglič A, Babnik B, Gimsa U, Kralj-Iglič V. On the role of membrane anisotropy in the beading transition of undulated tubular membrane structures. *J Phys A* 2005; 38: 8527-35.
105. Kralj-Iglič V, Heinrich V, Svetina S, Žekš B. Free energy of closed membrane with anisotropic inclusions. *Eur Phys J B* 1999; 10: 5-8.
106. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-72.
107. George FD, Sabatier F, Camoin-Jau L, Sampol J. Measuring circulation cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1844-5.
108. Galli M, Grassi A, Barbui T. Platelet-derived microvesicles in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Thromb Haemost* 1996; 75: 427-31.
109. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, et al. Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* 2003; 63: 5573-81.
110. Arteaga RB, Chirinos JA, Soriano AO, et al. Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2006; 98: 70-4.
111. Ederhy S, Di AE, Mallat Z, et al. Levels of circulating procoagulant microparticles in nonvalvular atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2007; 100: 989-94.

112. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2000; 101: 841-3.
113. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, et al. Fas-ligand positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1010-20.
114. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175: 720-31.
115. Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer* 2009; 125: 1595-603.
116. Wilkerson MJ, Shuman V. Alterations in normal canine platelets during storage in EDTA anticoagulated blood. *Vet Clin Pathol* 2001; 30: 107-13.

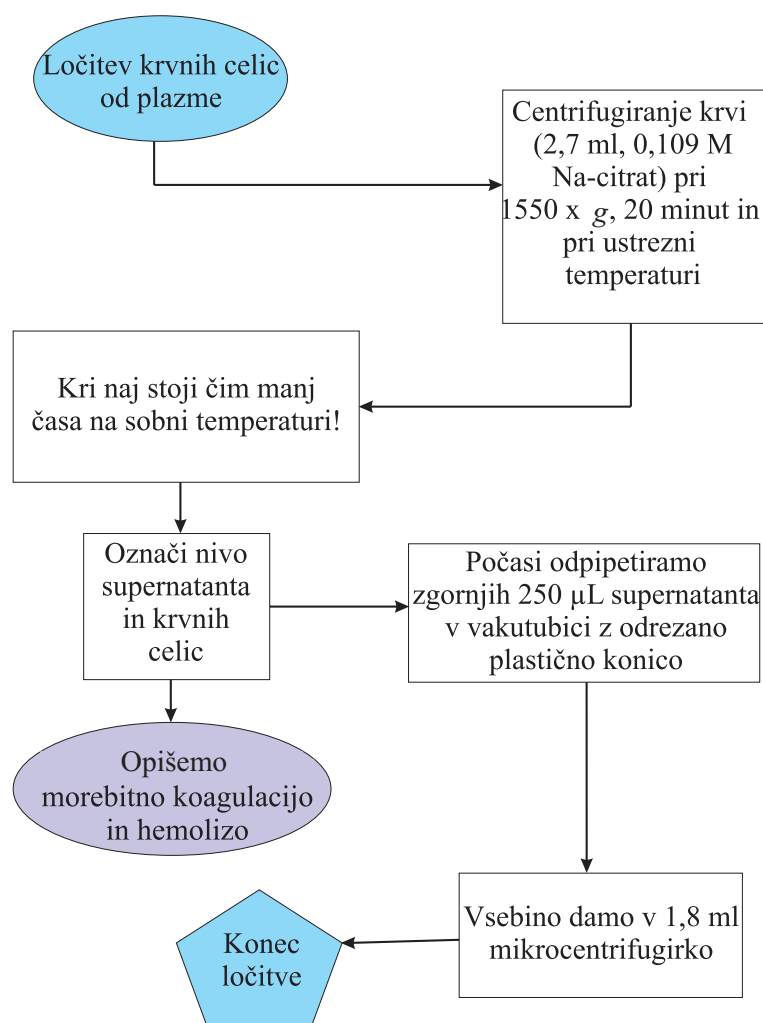
14 Dodatek



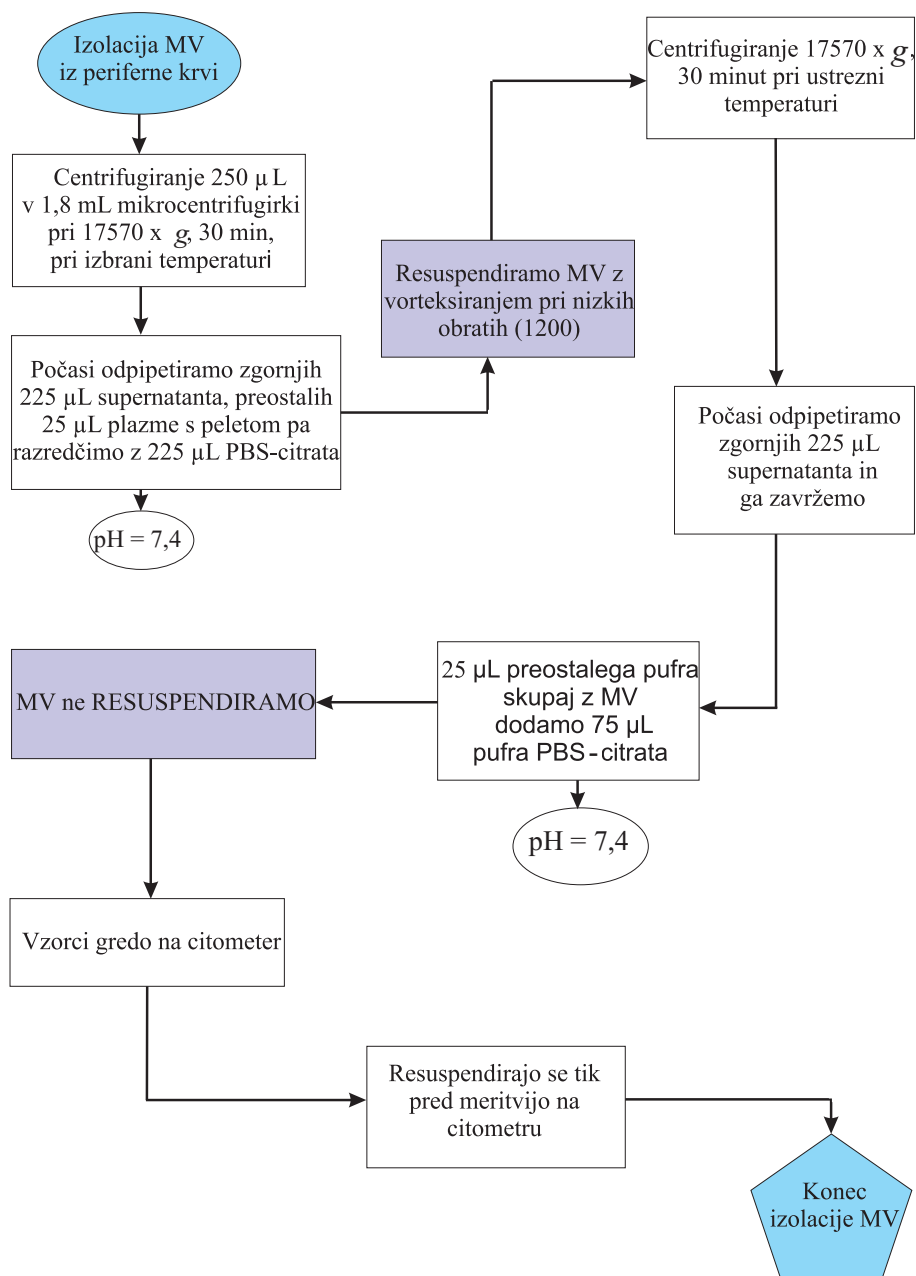
Slika 14: Shema poteka priprave na poskus.



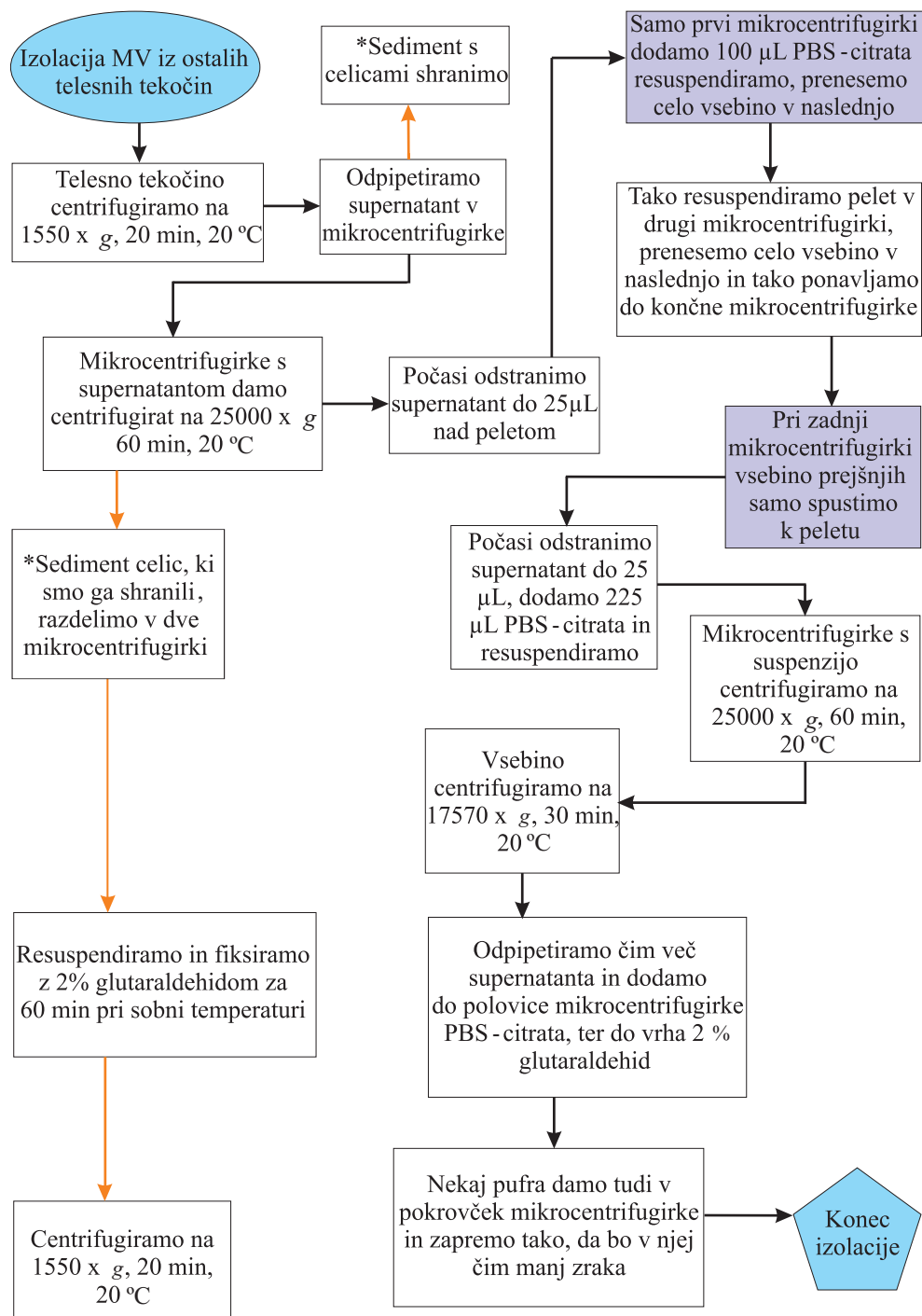
Slika 15: Shema odvzema krvi.



Slika 16: Shema ločitve krvnih celic od plazme.



Slika 17: Shema izolacije mikroveziklov iz krvne plazme.



Slika 18: Shema izolacije mikroveziklov iz ostalih telesnih tekočin in njihove priprave za vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM).

IZJAVA O SODELOVANJU V RAZISKAVI

Mikrovesikli nastanejo v procesu brstenja membran in prenašajo snov in informacije do oddaljenih celic. Najdemo jih v telesnih tekočinah, med njimi tudi v periferni krvi. Klinične študije kažejo, da je število mikrovesikov v periferni krvi ob tromboemboličnih zapletih, pri raku, ob vnetnih procesih in ob avtoimunih boleznih, povečano, prav tako je povečano v pripravkih krvi. V okviru naloge bi želeli slikati mikrovesikle živali in človeka z različnimi tehnikami in preverjati hipotezo o antikoagulantnem in antitumorskem delovanju plazemskih proteinov, v skladu s katero naj bi bilo v periferni krvi manj mikrovesikov, če lahko plazma posreduje močnejšo privlačno interakcijo med membranskimi strukturami. Pričakujemo dokaze v prid zgornji hipotezi. Izboljšanje razumevanja mehanizmov mikrovesikulacije je aktualen in klinično pomemben problem, ki je povezan z razvojem metod zdravljenja živali in ljudi, predvsem preprečevanja tromboembolije in upočasnjevanja napredovanja raka.

Vljudno prosimo za Vaše soglasje, da Vaši živali pri odvzemu krvi za namene zdravljenja, odvezamemo dodatnih 2,7 ml za izolacijo mikrovesikov, oziroma v primeru punkcije, da punktirate namesto, da bi ga zavrgli, uporabimo za znanstvene namene. Živalim ne bomo odvezemali telesnih tekočin zgolj za namene raziskave.

Nalogo izvajata Rok Hrženjak, študent Veterinarske fakultete in Roman Štukelj, študent Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Veronike Kralj-Iglič, Medicinska fakulteta UL in somentorstvom prof. dr. Vojteha Cestnika, Veterinarska fakulteta UL

Podpisani _____, lastnik _____,
pasme _____, starosti _____,
št. kartoteke _____ sem seznanjen(a) s postopkom, ki bo
opravljen pri moji živali in z njim soglašam ter dovoljujem, da se pridobljene podatke o
zdravstvenem stanju moje živali uporabi v raziskavi »Mikrovesikli v telesnih tekočinah
domačih živali in človeka«. Želim biti obveščen(a) o izsledkih raziskave da ne.

Datum _____ Podpis lastnika(ce) živali:

Slika 19: Formular, ki so ga izpolnili lastniki živali, ki so darovale telesne tekočine.

Spoštovani kolegi!

V novembru in decembru boste imeli zdravniški pregled, pri katerem Vam bodo odvzeli kri za hemogram, lipidogram in biokemijske analize, po nekaj mililitrov. Pri odvzemu sestra ali tehnik vstavi (navadno v medialno kubitalno veno) iglo in nastavi epruveto, v kateri je vakuum, tako da predpisana količina krvi steče v epruveto. Če se boste odločili za sodelovanje v naši raziskavi, bi Vam odvzeli dodatno 2,7 mililitrov krvi.

Temen naše raziskave je izboljšanje protokola za izolacijo mikrovesiklov iz periferne krvi, zanimajo pa nas tudi korelacije med številom mikrovesiklov in parametri, ki so določeni z lipidogramom, hemogramom in biokemijskimi preiskavami.

Mikrovesikli (na sliki spodaj so prikazani mikrovesikli, izolirani iz periferne krvi zdravega človeka) nastanejo kot končni produkt brstenja celic in s krvnim in limfnim obtokom potujejo po telesu. Mikrovesikli so prisotni tudi v telesnih tekočinah živali. Klinične študije kažejo, da je pri bolnikih s tromboemboličnimi zapleti, rakom in avtoimunimi boleznimi njihovo število povečano. Določanje lastnosti, števila in sestave mikrovesiklov v periferni krvi je potencialna diagnostična metoda, med prvimi uporabi te metode je bilo določanje prisotnosti ustrezne mikro RNA v krvi živali z BSE (bovina spongioforna encefalopatija, bolj znana kot bolezen norih krav). Tako so lahko preverili prisotnost bolezni z odvzemom krvi živim živalim, ne pa z analizo možganov mrtvih živali.

Zenkrat še ne obstoja standardiziran protokol za določanje števila mikrovesiklov, predvsem zaradi tega, ker na končni rezultat vpliva mnogo parametrov in metoda še ni dovolj ponovljiva in preseljena. V okviru te študije bi raziskali vpliv temperature pri odvzemu krvi, načina ločitve plazme od celic in časa procesiranja na občutljivost določanja števila mikrovesiklov v krvi zdravih prostovoljcev. Študirali bi tudi možne korelacije med številom mikrovesiklov in krvnim holesterolom, krvnim sladkorjem, številom krvnih celic in ostalimi parametri, ki jih bodo določali ob pregledu.

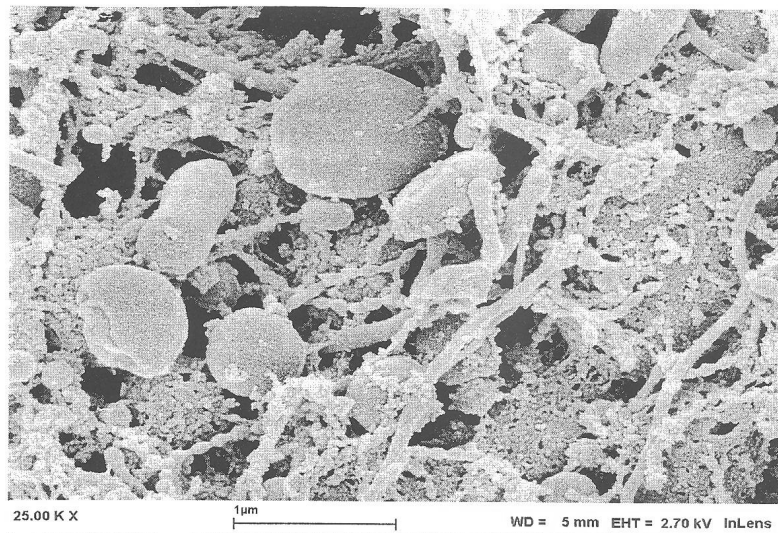
Z darovanjem krvi pomagata potencialnim bolnikom, tako ljudem kot živalim, saj bi metoda nadomestila bolj invazivne posege kot so biopsije in izboljšala diagnostiko tumorjev in zlasti možganskih bolezni, saj mikrovesikli lahko prehajajo bariero med možgani in krvjo.

Pri odvzemu krvi pride do določenega tveganja, prisotni pa so tudi stranski učinki kot bolečina in strah ob vbodu, možnost infekcije in vrtoglavica. Tveganje za neželene učinke je manjše, če sledite navodilom osebja. Pred odvzemom se za nekaj minut umirite, po odvzemu pa morate dovolj dolgo pritiskati na mesto vboda, da ne pride do izliva krvi in posledično, do modrice. Zaradi odvzema dodatnih 2,7 mililitrov krvi (za raziskavo) ne bo prišlo do povečanega tveganja. Če se strinjate s sodelovanjem v raziskavi Vas vljudno prosim, da podpišete izjavo.

Naslov in telefonska številka zdravnika, pri katerem lahko oseba dobi nujno medicinsko pomoč je Urgenca Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Zaloška 7, tel. 01 5225276.

Za Vaš prispevek se Vam iskreno zahvaljujemo.
prof. dr. Veronika Kralj-Iglič v imenu sodelavcev Laboratorija za klinično biofiziko
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Ljubljana, 5.11.2009



Slika 1: Izolat, slikan z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Šuštar in sod., v pripravi). Večje strukture, ki na sliki merijo okrog 1 mikrometra, pripišemo trombocitom, manjše tubularne in globularne strukture dimenzij nekaj deset do nekaj sto nanometrov pa mikrovesiklom. Slike so bile izdelane na Abo Akademi University, Finska.

IZJAVA

Podpisani

Izjavljam, da prostovoljno sodelujem v raziskavi izboljšanja protokola za izolacijo mikrovesiklov iz periferne krvi, tako, da ob odvzemu krvi za hematološke in biokemijske preiskave pri rednem zdravniškem pregledu, dovolim odzem dodatnih 2,7 mililitrov krvi.

Seznanjen(a) sem z vsebino raziskave in s tveganjem ob sodelovanju.

Rezultati raziskave me zanimajo (obkrožite odgovor) **da** **ne**

Ljubljana,

Podpis:

Slika 20: Formular, ki so ga izpolnili darovalci krvi.



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Veronika Kralj-Iglič, dr. med.
Laboratorij za klinično biofiziko
Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta v Ljubljani
Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

Štev.: 117/02/10
Datum: 23. 3. 2010

Spoštovana gospa prof. dr. Kralj-Iglič,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 11. 2. 2010¹ poslali vašo prošnjo za mnenje o etični primernosti raziskave z naslovom:

"Mikrovezikli v telesnih tekočinah domačih živali in človeka."

KME je na seji 23. 2. 2010 ocenila, da raziskava ni v nasprotju z etičnimi standardi, in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj
predsednik Komisije za medicinsko etiko

¹ Vaša vloga ni imela spretnega dopisa.

Slika 21: Soglasje etične komisije.