

Vid Šuštar<sup>1</sup>, Mojca Frank<sup>2</sup>, Vid Janša<sup>3</sup>, Petra Sušan<sup>4</sup>, Henry Hägerstrand<sup>5</sup>,  
Peter Veranič<sup>6</sup>, Veronika Kralj - Igljč<sup>7</sup>

## Mikrovezikli iz krvne plazme, opazovani z elektronsko mikroskopijo

*Microvesicles from Blood Plasma Observed by Electron Microscopy*

---

### IZVLEČEK

**KJUČNE BESEDE:** mikrovezikli, elektronska mikroskopija, krvna plazma, ultrastruktura

Prerazporejanje molekul v celični membrani lahko vodi do brstenja in odpuščanja veziklov, manjših od mikrometra (mikroveziklov), iz membrane. Mikrovezikli v svojih lastnostih odražajo stanje in vrsto celice, iz katere izvirajo. Stanje celic pa je spremenjeno pri različnih boleznih, zato lahko mikrovezikli, ki izvirajo iz teh celic, značilno predstavljajo bolezensko stanje in so zanimivo potencialno orodje za diagnostiko bolezni. Kljub mnogim raziskavam in objavljenim postopkom enotnega načina za osamitev in določanje mikroveziklov iz periferne krvi še ni. Za določanje vpliva osamitve in za določanje mikroveziklov smo kot možno orodje uporabili elektronsko mikroskopijo. Vrstična elektronska mikroskopija se je izkazala primerna za določanje tridimenzionalne oblike mikroveziklov. Transmisijska elektronska mikroskopija nam je omogočila vpogled v notranjo strukturo mikroveziklov.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** microvesicles, electron microscopy, blood plasma, ultrastructure

Lateral redistribution of molecules in cell membrane may result in budding and shedding of vesicles smaller than micrometer, called microvesicles. Microvesicles reflect in their characteristics the state and type of cells wherefrom they originate. The state of cells may be changed in diseases therefore also microvesicles, which originate from those cells, characteristically represent the disease and are an interesting potential diagnostic tool. Despite numerous studies and publications there is still no standard protocol for microvesicle isolation and characterisation from the peripheral blood. In this work we used electron microscopy as a possible tool for characterisation of microvesicles and for determination of possible artefacts acquired in the isolation procedure. Scanning electron microscopy proved useful for determination of three-dimensional form of microvesicles. Transmission electron microscopy enabled the insight into inner structure of microvesicles.

---

<sup>1</sup> Vid Šuštar, univ. dipl. biol., Laboratorij za klinično biofiziko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; vidsustar@gmail.com

<sup>2</sup> Mojca Frank, dr. med., Klinični oddelek za revmatologijo, Bolnica dr. Petra Držaja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Vodnikova cesta 62, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Vid Janša, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Petra Sušan, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>5</sup> Doc. dr. Henry Hägerstrand, mag. farm., Department for Biology, Åbo Akademi University, Biocity, Tystokatu 6a, 2nd floor, 20520 Åbo/Turku, Finska

<sup>6</sup> Doc. dr. Peter Veranič, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

<sup>7</sup> Prof. dr. Veronika Kralj - Igljč, univ. dipl. fiz., Laboratorij za klinično biofiziko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

## UVOD

Ob neenakomerni lateralni porazdelitvi molekul v zunanjem in notranjem sloju celične membrane se membrana lahko upogne (1–3). Temu procesu pravimo brstenje membrane (1, 2). Če se proces nadaljuje, se brsti v končni fazi odcepijo od materinske membrane v zunajcelični prostor, kjer se lahko prosto gibljejo (4). Odcepljene brste, ki so manjši od 1  $\mu\text{m}$ , imenujemo mikrovezikli (MV). MV so z membrano obdani delci, običajno brez citoskeleta, katerih struktura, sestava in številčnost so odvisne od celic, iz katerih izvirajo, ter stanja le-teh.

Mikrovezikli so prisotni v telesnih tekočinah, kot so kri, sklepnna tekočina ter tekočina iz trebušne in pljučne votline (5–7). Število MV je povečano pri bolezenskih stanjih, kot so na primer rak, sladkorna bolezen tipa 2, različne motnje strjevanja krvi in avtoimunske bolezni (8–15). Hkrati so lahko mikrovezikli tudi sodejavniki bolezni (19, 20).

Večje znanje o mikroveziklih bi pripomoglo k njihovi uporabi za nove diagnostične metode naštetih bolezni in pomagalo pri odločitvi o najustreznejšem načinu zdravljenja.

Kljub številnim raziskavam in širokemu zanimanju za MV enotnega in zanesljivega načina za njihovo izolacijo in analizo še ni. Največ raziskav v zvezi z MV se opravi s pretočno citometrijo, kjer laserski žarek sveti na curek medija, v katerem so MV, fotodetektor pa beleži odklone žarka zaradi MV v curku. Ta analiza nam poda informacije predvsem o številu in velikostni zastopanosti MV v populaciji. Če MV označimo s fluorescentnimi protitelesi za določene molekule in se ta vežejo na MV, nam analiza MV lahko potrdi ali ovrže prisotnost določenih molekul na MV oz. na podpopulaciji analiziranih MV. Pretočna citometrija nam ne razkrije strukture, oblike in drugih morfoloških značilnosti mikroveziklov (8–21).

Oblika in notranja struktura celic je vidna s svetlobno mikroskopijo. V hematologiji se za opazovanje celic in njihovih nepravilnosti običajno uporablja svetlobna mikroskopija v kombinaciji z barvili za celice (22). Zaradi majhnih dimenzij MV oz. zaradi nezadostne ločljivosti mikroskopa pa svetlobna mikroskopija ni primerna za opazovanje MV.

Ločljivost mikroskopa je dovolj velika za opazovanje, če med seboj ločimo dve sosednji točki, ki sta oddaljeni za razdaljo  $d$ . Zaradi uklona na objektivu je  $d = \frac{0,61\lambda}{NA}$ , kjer je  $\lambda$  valovna dolžina sevanja,  $NA$  je numerična apertura objektiva,  $NA = n \sin \alpha$ ,  $n$  je lomni količnik sredstva med predmetom in objektivom,  $\alpha$  pa kot med optično osjo in zveznico, ki povezuje gorišče in rob objektiva (1–2).

Valovna dolžina ni le lastnost svetlobe, ampak jo lahko pripišemo tudi delcem z maso, kot je leta 1924 ugotovil Louis de Broglie (23). De Broglieva enačba,  $\lambda = \frac{h}{p}$ , poveže valovno dolžino  $\lambda$  z gibalno količino  $p$ , enačba  $f = \frac{E}{h}$ , pa frekvenco  $f$  in energijo  $E$ , pri čemer je  $h$  Planckova konstanta (3–4).

Zaradi mase in posledično večje gibalne količine v primerjavi s fotoni elektroni dosežajo večje frekvence valovanja in manjše valovne dolžine od vidne svetlobe. Elektroni imajo mnogo manjšo valovno dolžino ( $10^{-2}$ – $10^{-3}$  nm) od valovne dolžine vidne svetlobe (400–700 nm), zato je tudi ločljivost mikroskopa, ki uporablja snop elektronov namesto svetlobe, boljša ( $d$  je manjša).

Elektroni pri elektronski mikroskopiji (EM) ob težjih atomih na preparatu spremenijo smer gibanja – se sipajo. V transmisijski EM (TEM) se elektroni sipajo, ko prehajajo skozi preparat, ki mora biti označen s težkimi kovinami, hkrati pa dovolj tanek. Pri vrstični EM (angl. *scanning*, SEM) površino vzorca napršimo s težko kovino, npr. z zlatom, in opazujemo sekundarno izbite elektrone s tridimenzionalne površine. Pri SEM je povečava manjša od povečave pri TEM (24, 25).

Brstenje membrane je mogoče tudi umetno spodbuditi. To lahko naredimo z dodajanjem molekul, ki vplivajo na reakcije v celici. Primer take molekule je kalcijev ionofor A21387, ki omogoči vnos ionov  $\text{Ca}^{2+}$  iz celične okolice preko celične membrane v celico. V trombocitih tako pride do porasta znotrajcelične koncentracije kalcija, kar povzroči njihovo aktivacijo (iz diskaste oblike preidejo v zvezdasto obliko, v okolico sprostitjo granule itd.) ter nastajanje veziklov, obdanih z membrano (26). Za primerjavo notranje strukture izoliranih MV, ki so nastali na različne načine, smo umetno sprožili vezikulacijo prašičjih trombocitov s kalcijevim ionofo-

rom A21387 in jih primerjali z izoliranimi MV iz človeške plazme.

V članku prikazujemo poskus uporabe elektronske mikroskopije ter ugotavljanje primernosti te metode za opazovanje zunanje in notranje strukturne lastnosti MV, ki so zanimivi za razumevanje določenih bolezni in kot možno diagnostično orodje.

## METODE

Metodi odvzema človeške krvi in diferencialnega centrifugiranja sta povzeti po Diamantu et al., metode odvzema prašičje krvi, umetno sproženega brstenja in vezikulacije prašičjih trombocitov (PT) v MV (PMV) ter njihovega TEM-mikroskopiranja so povzete po Hagerstrandu et al. (11, 26).

### Odvzem krvi

Teščim prostovoljcem, ki so se strinjali s poskusom, smo odvzeli do 15 ml krvi v epruvete, ki so vsebovale antikoagulant 0,109 M natrijev citrat (10% končnega volumna) (11). Prašičjo kri iz bližnje klavnice smo zajeli v epruveto z 0,15 v/v prostornine citrata dekstroze (angl. *acid citrate dextrose*, ACD; 85 mM trina-trijevega citrata, 111 mM glukoza, 71 mM citronske kisline). Odvzemi krvi so bili izvedeni v skladu s Helsinško-tokijsko deklaracijo in etičnimi načeli.

### Diferencialno centrifugiranje za pridobitev MV iz odvzetih telesnih tekočin

Za ločitev krvnih celic od plazme z MV (supernatanta) smo odvzeto kri centrifugirali 20 minut pri hitrosti 1550 g in temperaturi 20 °C. Za usedanje MV iz plazme smo 250 µl supernatanta ponovno centrifugirali pri višji hitrosti (17570 g pri temperaturi 20 °C, 30 minut). Za izpiranje MV in odstranjevanje plazme smo po centrifugiranju odstranili 225 µl vrhnjega supernatanta (plazma brez MV) in usedlini (MV) dodali 225 µl izoosmolarnega fosfatnega pufra s citratom (angl. *phosphate buffer saline*, PBS: 0,109 M trinatrijevega citrata, v V : V, 9 : 1). Za boljše izpiranje smo usedlino MV ponovno suspendirali v pufru na mešalniku. Pred izvedbo nadaljnjih postopkov je bilo potrebno ponovno koncentriranje

in usedanje MV, zato smo ponovili zadnji korak centrifugiranja pri 17570 g (20 °C, 30 minut).

Prašičjo kri z antikoagulantom ACD smo centrifugirali 20 min pri 150 g. Supernatant, to je plazma, bogata s trombociti (angl. *platelet rich plasma*, PRP), smo prenesli v novo 15-mililitrsko epruveto in centrifugirali 15 min pri 200 g za dodatno odstranitev krvnih celic.

Da bi preprečili agregacijo PT ob nadaljnjem centrifugiranju, smo dodali 5 ng prostaglandina I na 1 ml PRP. Nato smo PRP centrifugirali 15 min pri 800 g, da smo dosegli usedanje trombocitov. Dobljeni PT smo ponovno suspendirali v pufru za PT (163 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NHCO<sub>3</sub>, 0,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 5,6 mM glukoza, pH 7,4), ki je vseboval 5 % plazme brez PT. Po 60-minutni inkubaciji pri temperaturi 37 °C s 300 ng/ml PGI<sub>2</sub> smo celice sprali s centrifugiranjem, kot že omenjeno, in ponovno suspendirali do 10<sup>9</sup> celic/ml v pufru. Za poskus smo uporabili kri dveh živali. Vsi poskusi so bili izvedeni takoj po osamitvi celic.

### Tretiranje prašičjih trombocitov z A21387

Alikvote na 37 °C predogrete suspenzije PT smo pipetirali v 2 ml epruvete, ki so vsebovale na 37 °C predogreti PT-pufer in 1 mM kalcijev ionofor A21387. Končna koncentracija PT je bila 10<sup>8</sup> celic/ml in inkubacija je bila izvedena v 1 minuti pri 37 °C.

### Predpriprava vzorca za elektronsko mikroskopijo

Za stabilizacijo in večjo obstojnost MV smo vzorcu dodali fiksativ glutaraldehid (angl. *glutaraldehyde*, GA, razredčen v izoosmolarnem PBS-citratu), ki zamreži proteine na dveh mestih in utrdi njihovo tridimenzionalno strukturo. GA smo dodali toliko, da je bila v vzorcu njegova končna koncentracija 1%. Vzorec smo inkubirali v GA 1 uro na sobni temperaturi (23 °C). Vzorec z 1 % GA smo do nadaljevanja postopka hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Za zamreženje in obstojnost membran v vzorcu smo vzorec fiksirali z OsO<sub>4</sub>, ki poveže nenasičene maščobno kislinske ostanke v fosfolipidnih molekulah v membrani. OsO<sub>4</sub> se veže tudi na GA, zato

smo z vzorca izprali nevezani GA s PBS-citratom; izpiranje je potekalo s štirikratno izmenjavo supernatanta s polurnimi presledki. Vzorec smo z  $\text{OsO}_4$  fiksirali na enak način kot z GA (končna koncentracija  $\text{OsO}_4$  1%). Nato smo ga inkubirali pri sobni temperaturi 23 °C za eno uro in nevezani  $\text{OsO}_4$  izprali. Za nadaljnjo pripravo je bilo treba iz vzorca odstraniti vodo oziroma jo izmenjati z manj polarnimi tekočinami, predvsem za zavarovanje fosfolipidnih membran. To smo storili 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-citratnega pufra. V mešanicah acetona in pufra smo z namenom, da bi preprečili morebitni osmotski šok, koncentracijo acetona stopnjevali: 50%, 60%, 90%. Zadnji korak je potekal v 100% acetonu 1 uro z dvema izmenjavama acetona.

PT smo koncentrirali v usedlino s centrifugiranjem pri 3000 g 10 minut. Prašičje mikrovezikle (PMV) smo centrifugirali pri 30000 g 60 minut iz supernatanta po centrifugiranju pri 11000 g 2 minuti za odstranjevanje preostalih trombocitov. PT in PMV smo fiksirali v suspenziji v 1% GA 30 minut, postfiksirali v 1%  $\text{OsO}_4$  v 0,9% NaCl 30 minut pri 22 °C, dehidrirali v stopnjujočih serijah aceton-voda (50–100% v/v).

### Priprava vzorca za SEM

Za SEM-mikroskopijo, kjer opazujemo zunanjo tridimenzionalno strukturo, je treba vzorce posušiti za obstoj v vakuumu, v katerem deluje EM, hkrati pa suhi vzorci ne dopuščajo pojave izparin, ki bi ovirale nemoteno pot elektronov. Za vir sekundarnih elektronov, ki se odbijajo s površine vzorca, so vzorci napršeni s težko kovino. Fosfolipidne membrane se ob neposrednem sušenju na zraku poškodujejo zaradi prehajanja znotrajcelične raztopine preko membrane. Za ohranitev celovitosti membrane smo morali vzorce sušiti s tekočim  $\text{CO}_2$ , ki pri kritični točki 72 barov in 31 °C sublimira v plinasto agregatno stanje.  $\text{CO}_2$  v plinastem stanju nemoteno in nekvarno prehaja preko membrane. Da bi omogočili prevajanje toka elektronov in vzpostavili vir sekundarnih elektronov, smo posušene vzorce napršili z zlatom. Vzorce smo opazovali z mikroskopom *Cambridge Instruments S360*.

### Priprava vzorca za TEM

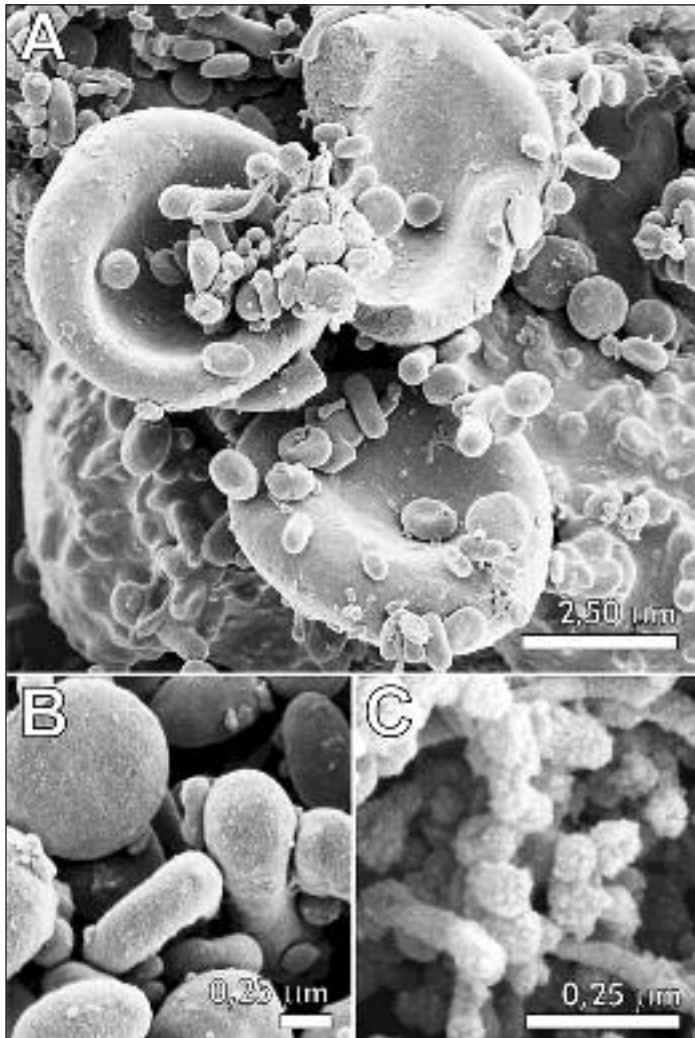
Vzorce za TEM je za zadovoljivo prehodnost elektronov in njihovo sipanje le v določeni ravnini treba narezati na 40–50 nm debele (ultratanke) rezine. Za rezanje vzorca na ultratanke rezine smo vzorec potopili v eponsko smolo, ki se po segrevanju polimerizira in strdi. Utrjene vzorce lahko režemo z diamantnim ali s steklenim nožem.

Po dehidraciji z acetonom v predpripravi smo vzorce inkubirali v mešanici epona in acetona. Mešanico acetona in epona smo izmenjali v korakih, s stopnjujočim (zaradi preprečevanja osmotskega šoka) deležem epona. Vzorec smo inkubirali pri 23 °C za 10 minut v mešanici epon-aceton (1:1), za 30 minut v mešanici epon-aceton (2:1) ter preko noči v 20  $\mu\text{l}$  100% epona, da je izhlapele preostali aceton v vzorcju. 100% epon smo izmenjali (odstranili 100% epona nad vzorcem in dodali enak volumen 100% epona) in vzorce dali na inkubacijo ter polimerizacijo epona v pečico na 60 °C za 48 ur. Vzorce smo narezali na mikrotomu na 40 nm tanke rezine. Rezine smo nabrali na mrežice, na katere smo nanесли folijo iz formvara. Za večji kontrast oziroma sipanje elektronov pri opazovanju smo rezine na mrežicah kontrastirali z raztopinami soli težkih elementov, in sicer z uranil acetatom in s svinčevim citratom. Po sušenju na zraku so bili pripravljene za opazovanje. Človeške vzorce smo opazovali z elektronskim mikroskopom JEM 100 CX, PT ter PMV z JEOL 100 SX (JEOL, Japonska) pri delovni napetosti 80 kV.

## REZULTATI

### SEM-mikrografi

Slika 1 prikazuje izolate iz krvne plazme zdravega prostovoljca. Objekti na SEM-mikrografih so v povprečju za 30% manjši kot v resnici. Premer eritrocitov je na SEM-mikrografu (slika 1A) v povprečju 5  $\mu\text{m}$  (*in vivo* okoli 7  $\mu\text{m}$ ). Na sliki 1A so ob eritrocitih vidne manjše globularne in podolgovate oblike s povprečnim premerom 0,46  $\mu\text{m}$  ( $n = 120$ , standardna deviacija = 0,21  $\mu\text{m}$ ). Povprečni premer MV na sliki 1B je 0,39  $\mu\text{m}$  ( $n = 35$ , standardna deviacija = 0,23  $\mu\text{m}$ ), ustrezní povprečni premer MV na sliki 1C je 0,086  $\mu\text{m}$  ( $n = 30$ , stan-



Slika 1. Vrščni elektronski mikrograf mikroveziklov, izoliranih z diferencialnim centrifugiranjem iz človeške krvi. S centrifugiranjem najprej posedamo in odstranimo celice in v naslednjem, hitrejšem centrifugiranju še mikrovezikle (MV) iz supernatanta. A – V izolatu MV so še vedno lahko prisotni posamezni eritrociti. B in C – drugo področje iste frakcije MV, C – znate strukture na MV so posledice priprave vzorcev. Na slikah je vidna velikostna in oblikovna raznolikost MV.

dardna deviacija =  $0,03 \mu\text{m}$ ). Na sliki 1C so vidne posledice priprave vzorca, nanašanja zlatega poprha, to so znate strukture na površini MV.

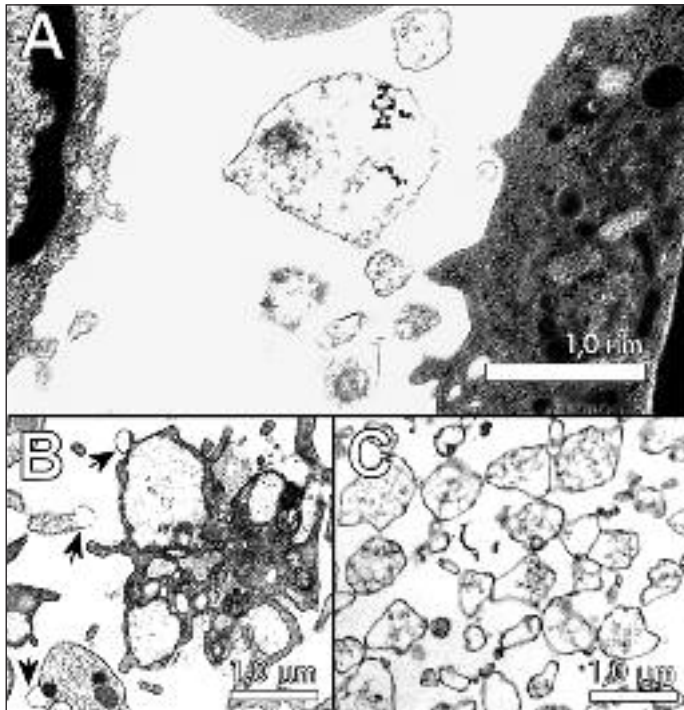
### TEM-mikrografi

Objekti na TEM-mikrografu na sliki 2A so v povprečju veliki  $0,38 \mu\text{m}$  ( $n=9$ , standardna deviacija =  $0,33$ ). Oblika MV je v primerjavi

z obliko MV na SEM-mikrografih oglata. Vsebinsko MV je bolj prosojna kot citoplazma sosednjih celic (levkocita levo in desno ter eritrocita na sredini na sliki 2A).

MV so po obliki membrane in prosojnosti vsebine podobni MV, pridobljenim s sproženim brstenjem prašičjih trombocitov z ionoforom A23187 (slika 2B – aktivirani trombociti, slika 2C – s centrifugiranjem koncentrirani mikrovezikli).





Slika 2. A – Transmisijski elektronski mikroskopski mikrofotograf mikroveziklov, izoliranih z diferencialnim centrifugiranjem iz človeške krvi. Na desni in levi sta vidna dela levkocitov, zgoraj sredi del eritrocita. Primerjava sestave in izvora mikroveziklov z umetno sproženo aktivacijo in brstenjem prašičjih trombocitov z ionoforom A23187. B – Puščice prikazujejo brstenje mikroveziklov na aktiviranih trombocitih. C – S centrifugiranjem koncentrirani mikrovezikli.

## RAZPRAVA

Mikrovezikle, izolirane iz periferne krvi zdravega prostovoljca, smo opazovali s SEM in TEM. Ugotovili smo, da je povprečna velikost MV, izmerjena iz mikrofotograf, skladna z dimenzijami MV, navedenimi v literaturi, ugotovljenimi s pretočno citometrijo (6–20). Ugotovili smo, da je koncentracija in velikostna razporeditev MV na različnih delih vzorca različna. Možen vzrok za to je centrifugiranje. Največji delci, mnogo gostejši od medija, se pri centrifugiranju usedajo najhitreje in jih je največ na dnu usedline, medtem ko je manjših in manj gostih delcev več na vrhu usedline. Ob analiziranju posameznih mikrolokacij na usedlini se je treba zavedati, kje se – glede na prvotno orientacijo usedline – posamezna mikrolokacija nahaja.

Z uporabo SEM smo ugotovili, da je pretežni del mikroveziklov okroglo oziroma

diskoidne oblike, manjši del pa cevaste oblike. Samo z uporabo TEM tega ne bi bilo mogoče ugotoviti, saj omogoča analizo le v dveh dimenzijah.

Pri pripravi se vzorci skrčijo ob sušenju pri kritični točki CO<sub>2</sub>, zato je treba vse izmerjene velikosti interpretirati z upoštevanjem tega dejavnika. Pri interpretaciji velikosti lahko ocenimo dejansko velikost vidnih objektov s primerjavo prisotnih celic, katerih velikost že poznamo. Primerni za to so eritrociti, ki imajo homogeno velikost. Na SEM posnetku so veliki 5 μm, v nativnem stanju pa so (pod optičnim mikroskopom) veliki okrog 7 μm. S pomočjo tega razmerja ocenimo nativno velikost neznanega objekta. Ocena je približna. Do razlike pri krčenju celic in mikroveziklov bi lahko prišlo zaradi različne sestave in vpliva citoskeleta, ki nudi določeno oporo celicam. Še boljši način ugotavljanja vpliva priprave preparatov je primerjava rezultatov,

dobljenih z enakim preparatom s TEM. Pri pravi vzorca za TEM ni vpliva krčenja zaradi sušenja, saj se vzorec vklopi v eponsko smolo, ki polimerizira in ohrani strukture v prvotni velikosti.

Na površini MV je (npr. na sliki 1C) vidna zrnata strukturiranost, ki je posledica priprave vzorca za SEM, najverjetneje naprševanja zlata. Podobnih struktur ni videti na prečnem prerezu MV s TEM, kjer ni naprševanja zlata na površino vzorca ali druge dodatne obdelave površine vzorca.

TEM v primerjavi s SEM omogoča analizo notranjosti MV. Ugotovili smo, da se MV po notranji strukturiranosti razlikujejo od bližnjih celic. Notranjost MV je, kot je vidno na mikrogrih, bolj prosojna od notranjosti sosednjih celic, kar bi lahko bila posledica odsotnosti ali pa delnega razkranja citoskeleta v MV.

Natančnejše sklepanje, iz katere vrste celic izvirajo posamezni MV, kakšen je izvor in mera ohranitve vsebine MV glede na izvorne celice, smo dosegli z uporabo dodatne tehnike.

Določevalne značilnosti nekega tipa izvornih celic smo dosegli z analizo *in vitro* sprožene mikrovezikulacije na celičnih kulturah. Umetno spodbujeno brstenje je možno doseči z dodajanjem različnih molekul v raztopino, ki obdaja celice. Primer za umetno inducirano vezikulacijo je dodajanje kalcijevega ionofora A23187 trombocitov (27). A23187 nase veže in prenaša ione  $Ca^{2+}$  v notranjost celic, tudi trombocitov, ter s tem povzroči aktivacijo, agregacijo in brstenje trombocitov (26–28). Ob primerjavi MV, izoliranih iz krvne plazme, z umetno induciranimi MV iz prašičjih trombocitov (slika 2A, B in C), se pokaže podobna ultrastruktura obeh populacij MV. Ta ugotovitev je skladna z dejstvom, da večina MV izvira iz trombocitov (29). Obstaja torej verjetnost, da izolirani MV na mikrogrih izvirajo iz trombocitov. Za tehtnejšo primerjavo MV in določanje izvora MV na podlagi notranje strukture bi bilo treba inducirati in primerjati MV iz več vrst celic.

Za določanje izvora MV obstajajo tudi manj agresivne metode, kot je umetno spodbujeno brstenje. Metoda, s kakršno bi se približali bolj naravnemu stanju MV in celic, bi bila uporaba imunolokalizacije s koloidnimi

zrnci zlata. Pri tej metodi bi celicam in MV dodali specifična protitelesa za antigene, ki se nahajajo le na določenih tipih celic. Na protitelesa proti določenim antigenom so pritrjene nanometrskke kroglice zlata (oz. so pritrjene na sekundarna protitelesa, ki se specifično vežejo na primarna protitelesa, ta pa se vežejo na antigene) (30). Če bi se protiteleso vezalo hkrati na mikrovezikel in le na določen tip celice, bi lahko sklepali, da s protitelesi označeni mikrovezikel izvira (vsebuje komponente, ki so hkrati prisotne) iz z enakimi protitelesi označenega tipa celic.

Metodi umetno spodbujenega brstenja in imunolokalizacije s protitelesi bi lahko združili in primerjali spontano nastale in umetno spodbujene vezikle glede na vsebnost komponent iz matičnih celic. Z združitvijo metod bi deloma lahko sklepali na mehanizme, ki so prisotni pri tvorbi mikroveziklov, in na stanje materinskih celic, prisotno ob določenih vrsti brstenja.

## ZAKLJUČEK

Na podlagi rezultatov naše študije lahko zaključimo, da je uporaba kombinacije SEM in TEM primeren način za ugotavljanje in analiziranje ultrastrukture mikroveziklov ter za določanje lastnosti populacije mikroveziklov, izoliranih iz človeške plazme. Ugotovili smo, da se po izmerjeni velikosti mikrovezikli ujemajo z navedbami iz literature. Za natančnejše ugotavljanje izvora in karakterizacijo mikroveziklov bi bilo primerno, v kombinaciji z obstoječo, uporabiti še dodatne metode. Primer dodatne metode je umetno spodbujeno brstenje tipov celic, ki so potencialni izvor nativnih MV. Hkrati bi bila primerna dodatna metoda imunolokalizacija značilnih komponent MV in celic njihovega izvora s koloidnim zlatom.

## ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo Anii Wrobel za nasvete in diskusije ter Lindi Štrus z Inštituta za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in Gunilli Henriksson iz Abo Akademi na Finskem za pomoč pri pripravi EM-vzorcev.

**LITERATURA:**

1. Iglič A, Kralj - Iglič V. Budding of liposomes – role of intrinsic shape of membrane constituents. In: Leitmanova Liu A, ed. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*, Vol. 4. Amsterdam: Elsevier; 2006. p. 253–79.
2. Iglič A, Babnik B, Bohinc K, et al. On the role of anisotropy of membrane constituents in formation of a membrane neck during budding of a multicomponent membrane. *J Biomech* 2007; 40: 579–85.
3. Fošnarič M, Iglič A, May S. Influence of rigid inclusions on the bending elasticity of a lipid membrane. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2006; 74: 051503.
4. Iglič A, Slivnik T, Kralj - Iglič V. Elastic properties of biological membranes influenced by attached proteins. *J Biomech*. 2007; 40: 2492–500.
5. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967; 13: 269–88.
6. 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.
7. 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: 50–8.
8. Rauch U, Antoniak S. Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thromb Haemost*. 2007; 97: 9–10.
9. Langer F, Spath B, Haubold K, et al. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles in patients with cancer-associated disseminated intravascular coagulation. *Ann Hematol*. 2008; 87: 451–57.
10. Janowska-Wieczorek A, Marquez-Curtis LA, Wysoczynski M, et al. Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion*. 2006; 46: 1199–209.
11. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, et al. 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.
12. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, et al. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*. 1999; 99: 348–53.
13. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001; 85: 639–46.
14. 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.
15. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, et al. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*. 2005; 52: 3337–48.
16. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006; 48: 180–6.
17. Van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A, et al. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2003; 59: 277–87.
18. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, et al. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 392–401.
19. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007; 21: 157–71.
20. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*. 2003; 1: 1655–62.
21. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1842–3.
22. McKenzie S. *Textbook of Hematology*. 2nd ed. Philadelphia (PA): Williams & Wilkins; 1996.
23. De Broglie L. [Researches on the quantum theory]. Thesis. 1924.
24. Hayat M A. *Principles and Techniques of Electron Microscopy Biological Applications*. 4th ed. UK: Cambridge University Press; 2000.
25. Crewe AV, Isaacson M, Johnson D. A Simple Scanning Electron Microscope. *Rev Sci Inst*. 1969; 40: 241–46.
26. Hagerstrand H, Bobrowska-Hagerstrand M, Lillsunde I, et al. Vesiculation induced by amphiphiles and ionophore A23187 in porcine platelets: a transmission electron microscopic study. *Chem Biol Interact*. 1996; 101: 118–26.
27. F Basse, P Gaffet, A Bienvenue. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1190: 217–24.
28. Stark R J, O'Doherty J. Effect of ionophore A23187 on cytosolic Ca<sup>2+</sup> and enzyme secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1982; 243: 196–9.
29. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999; 30: 111–42.
30. Roth J, Heitz PU. Immunolabeling with the protein A-gold technique: an overview. *Ultrastructural Pathol*. 1989; 13 (5–6): 467–84.