

Pro gradu -tutkielma

**Verihiutaleperäisten mikroversikkeleiden kvantifiointi ja
karakterisointi**

Sami Valkonen



Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta

Biotieteiden laitos

Molekyylibiotieteiden koulutusohjelma

Biokemia ja bioteknologia

Elokuu 2014



1 Tiivistelmä

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Sami Valkonen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Verihiutaleperäisten mikrovesikkeleiden kvantifiointi ja karakterisointi			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biokemia			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year Elokuu 2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 84
Tiivistelmä – Referat – Abstract Mikrovesikkelit (MV) ovat proteiineja, lipidejä, RNA:ta ja DNA:ta sisältäviä kaksoiskalvullisia vesikkeleitä, joita tuotetaan useimmista soluista. MV:llä on rooli monissa fysiologisissa tapahtumissa ja niiden määrä sekä sisältämät molekyylit on pystytty yhdistämään erilaisiin patofysiologisiin ilmiöihin. Tulevaisuuden tavoitteena on käyttää mikrovesikkeleitä diagnostisina sekä terapeuttisina työkaluina. Tätä varten MV:en toiminnallisia mekanismeja pitäisi ymmärtää paremmin sekä kehittää ja standardoida luotettavat menetelmät niiden kvantifiointiin ja karakterisointiin. Tutkimuksen tavoitteena oli 1) määrittää erilaisten aktivaatioiden vaikutusta verihiutaleista tuotetun MV-alapopulaatioiden ominaisuuksiin, 2) pystyttää laboratorioon MV:en kvantifiointiin rikin, fosfaatin ja vanilliinin reaktioon perustuva kokonaislipidimääritysmenetelmä (SPV) ja 3) tutkia trombiini- ja proteinaasi-inhibiittoreiden vaikutusta verihiutaleiden MV-muodostukseen. Verihiutaleet eristettiin terveiltä vapaaehtoisilta luovuttajilta saadusta verestä ja MV:tä tuotettiin aktivoimalla verihiutaleet trombogeenisesti (trombiini ja kollageeni, TC), patofysiologisesti (lipopolysakkaridi, LPS) ja kalsiumionoforilla (A23187, positiivinen MV-muodostuksen kontrolli). Tuotettu MV:n määrä sekä kokojakauma mitattiin nanopartikkeleiden jäljitysanalyysin (NTA) avulla. MV:t karakterisoitiin bikinkoniinihapon reaktioon perustuvalla menetelmällä (BCA) sekä SPV-menetelmällä. MV-tuottoa inhiboitiin trombiini-proteinaasi-inhibiittori PPACK:lla, jonka vaikutusmekanismia selvitettiin vertaamalla hirudiinin ja hepariinin (trombiini-inhibiittoreita) sekä Complete:n (proteinaasi-inhibiittorivalmiste) vaikutusta mikrovesikkeleiden muodostumiseen. Mikrovesikkeleissä havaittiin aktivaatiokohtainen muutos lipidi- ja proteiinisisällössä. Ionofori-indusoitujen MV:en määrä oli suurin, mutta niiden sisältämä lipidi- ja proteiinimäärä oli vain murto-osa TC- ja LPS-indusoituihin MV:hin verrattuna. Verihiutaleiden merkittävimmistä fysiologisista aktivaatioista vain TC-indusoitujen MV:en määrä oli korkeampi kontrollialtistukseen verrattuna. Vesikkelimuodostuksessa havaittiin PPACK-inhibiittorivälitteinen väheneminen, jonka vaikutus oli mahdollisesti proteinaasi-inhibiittorivälitteinen, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Lisäksi eristetyt MV-alapopulaatiot erosivat toisistaan merkittävästi vesikkelikohtaisen lipidimäärän suhteen. Lisäksi tutkimuksessa osoitettiin, että käytetyillä jaottelusentrifugointiohjelmilla ei MV-alapopulaatioita voitu eristää luotettavasti. Lisäksi näytteen laimennos vaikutti MV:en kvantifiointiin NTA:ssa. SPV-menetelmän havaittiin reagoivan eri intensiteetillä eri lipidien kanssa, mikä yhdessä aktivaatio- sekä vesikkelipopulaatiokohtaisen lipidikoostumuksen erojen kanssa haittasi MV:en kvantifiointia kokonaislipidimäärän perusteella. Tutkimuksen aikana tehtyjen analyysien pohjalta ei voitu tehdä tilastollisesti merkittäviä havaintoja johtuen yksilöiden välisistä suurista eroista. Vesikulaation inhibiitokokeita tulisi jatkaa, jotta PPACK-inhibiittorin vaikutus vesikkelimuodostuksen estoon ja sen mekanismit voidaan selvittää. Vesikkelitutkimuksessa tulee tehdä vielä paljon metrologista kehitystä eri eristys- ja tutkimusmenetelmien optimoinnissa, jotta MV:en (pato)fysiologisia ominaisuuksia ja toiminnallisia vaikutuksia voidaan tutkia luotettavasti.			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Mikrovesikkeli, mikropartikkeli, eksosomi, kvantifiointi, karakterisointi, NTA, SPV, lipidi, proteiini, PPACK			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Pia Siljander, Maria Aatonen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Biokemian ja biotekniikan osasto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Faculty of Biological and Environmental Sciences		Laitos – Institution– Department Department of Biosciences	
Tekijä – Författare – Author Sami Valkonen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Quantification and Characterization of Platelet-derived Microvesicles			
Oppiaine – Läroämne – Subject Biochemistry			
Työn laji – Arbetets art – Level Master's thesis		Aika – Datum – Month and year August 2014	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 84
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Microvesicles (MVs) are lipid bilayered membranous vesicles containing functional lipids, proteins, RNA and DNA that are produced by most cells. The physiological significance of MVs has become evident, and increased MV counts and the contents of MVs are nowadays also associated with different pathophysiological phenomena. The goal of the field is to use MVs as diagnostic and therapeutic tools. To achieve this, the understanding of the mechanisms of the functions of MVs should be understood better and additionally, reliable methods for the quantification and characterization of MVs should be developed and standardized.</p> <p>The aim of the study was to determine differences in platelet-derived MVs produced by different activation mechanisms. The second aim was to set up and optimize a protocol based on the reaction of sulphur, phosphate and vanillin (SPV) for measuring lipid content of MVs. The third aim was to study the effect of thrombin and proteinase inhibitor PPACK to the vesiculation of platelets.</p> <p>Platelets were isolated from the whole blood of healthy volunteers and vesicles were produced by platelet agonists mediating thrombogenic activation (thrombin and collagen, TC), pathophysiological activation (lipopolysaccharide, LPS) and Ca-ionophore (A23187) as positive control for vesiculation. Quantification and size determination of produced MVs was done using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). MVs were characterized by protein content using bicinchonic acid assay (BCA) and by lipid content using SPV-reaction.</p> <p>MVs had great activation-dependent differences in the lipid and the protein content. Activation with Ca-ionophore produced the most MVs, but the lipid and protein content was only a fraction from (patho)physiologically induced MVs. Only TC increased vesiculation. Vesicle subpopulations had significant difference in lipid content. Thrombin and proteinase inhibitor PPACK mediated inhibition of platelet formation in all of the activations, but the effect was not statistically significant. The mechanism of inhibition was likely to be proteinase inhibitor mediated.</p> <p>The isolation of vesicle populations using differential centrifugation proved to isolate studied populations only partially and the quantification method with NTA was susceptible to concentrated samples. SPV protocol reacted with different intensity to different lipids.</p> <p>In the future, quantification and isolation methods for MVs and the subpopulations of MVs should be improved. Additionally, to understand the physiologically relevant mechanisms of platelet-derived vesicle formation, the inhibitor experiments with PPACK should be continued, because the number of replicates was too low to see significant effects due to a large donor-dependent deviation. Since MVs are heterogenous cellular multitools affecting varying (patho)physiological phenomena, optimization and standardization of methods should be continued in order to study MVs properly.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Microvesicle, microparticle, exosome, quantification, characterization, NTA, SPV, lipid, protein, PPACK			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Pia Siljander, Maria Aatonen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

2 Sisällysluettelo

1 Tiivistelmä	2
2 Sisällysluettelo	4
3 Lyhennelistä.....	7
4 Yleistä mikrovesikkeleistä.....	8
5 Mikrovesikkeleiden fysiologinen rooli	12
5.1 Hemostaasi ja hyytymisreaktio.....	12
5.2 Mikrovesikkelit immuunireaktioissa	13
6 Mikrovesikkelit sairauksissa.....	14
6.1 Hyytymishäiriöt.....	14
6.2 Mikrovesikkelit syövän muodostumisessa ja etenemisessä.....	15
6.3 Mikrovesikkeleiden immuunireaktiot.....	15
6.4 Mikrovesikkelit sydän- ja verisuonisairauksissa	16
7 Mikrovesikkeleiden tutkiminen.....	16
7.1 Verihiutaleperäisten mikrovesikkeleiden tuottaminen	16
7.2 Mikrovesikkelialapopulaatioiden erottelu.....	19
7.3 Kvantifiointi.....	20
7.4 Koon määrittäminen.....	22
8 Mikrovesikkelitutkimuksen tulevaisuus	23
9 Tutkimuksen tavoitteet.....	25
10 Materiaalit ja menetelmät	26
10.1 Verihiutaleiden eristys.....	26
10.2 Mikrovesikkeleiden tuottaminen	27
10.3 Mikrovesikkeleiden tuoton inhibointi.....	27
10.4 Vesikkelialapopulaatioiden eristäminen	28
10.5 Mikrovesikkeleiden konsentraation ja kokojakauman määrittäminen	29
10.6 Mikrovesikkeleiden lipidipitoisuuden määrittäminen	30

10.7 Mikrovesikkeleiden kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen	32
10.8 Tilastolliset menetelmät.....	33
11 Tulokset.....	34
11.1 Verihiutaleaktivaation vaikutus mikrovesikkeleiden konsentraatioon, proteiini- ja lipidimäärään sekä kokojakaumaan.....	34
11.1.1 Mikrovesikkelikonsentraatio	34
11.1.2 Mikrovesikkeleiden proteiinimäärä	37
11.1.3 Mikrovesikkeleiden lipidimäärä.....	38
11.1.4 Vesikkelikohtaiset lipidi- ja proteiinimäärät	39
11.1.5 Mikrovesikkeleiden koko	41
11.2 Inhibiittoreiden vaikutus vesikkelikonsentraatioon, vesikkeleiden proteiinimäärään sekä kokojakaumaan	43
11.3 Tilastolliset mallit.....	47
11.4 Käytetyt menetelmät.....	49
11.4.1 Jaottelusentrifugointi vesikkelipopulaatioiden eristyksessä.....	49
11.4.2 Vesikkelikonsentraation määrittäminen NTA:lla	51
11.4.3 Totaalilipidimääritys SPV-menetelmällä	55
11.4.4 Detergentin pitoisuuden vaikutus proteiinimäärään näytteiden proteiinipitoisuuden määrittämisessä	56
12 Tulosten pohdinta	57
12.1 Aktivaatioiden vaikutus verihiutaleiden tuottamiin mikrovesikkeleihin	57
12.2 Trombiini- ja proteinaasi-inhibiittoreiden vaikutus vesikulaatioon sekä vesikkeleiden proteiinimäärään.....	61
12.3 Käytettyjen menetelmien pohdinta	63
12.3.1 Vesikkelialapopulaatioiden eristäminen jaottelusentrifugoinnin avulla ...	63
12.3.2 NTA vesikkeleiden kvantifioinnissa	64
12.3.3 Mikrovesikkeleiden lipidi- ja proteiinimäärän kvantifiointi	65
12.3.4 Laskennalliset menetelmät	67

13 Yhteenveto	70
14 Kiitokset	72
15 Lähdeluettelo	73
15.1 Kirjalliset lähteet.....	73
15.2 Verkkolähteet	84

3 Lyhennelista

3h Ctrl	Verihiutaleiden kolmen tunnin kontrollialtistus
ACD	Hapan sitraattiglukoosi, Acid Citrate dextrose
AIC	Akaike Information Criterion, mallin suhteellisen laadun mitta
Ctrl	Verihiutaleiden 30 minuutin kontrollialtistus
Exo	Eksosomi
IONO	Verihiutaleiden kalsium-ionoforiaktivaatio
LPS	Lipopolysakkaridi / verihiutaleiden lipopolysakkaridiaktivaatio
MP	Mikropartikkeli
MV	Mikrovesikkeli
NTA	Nanopartikkeleiden jäljitysanalyysi, Nanoparticle tracking analysis
PPACK	fenyylialaniini-proliini-arginiini-klorometyyliketoni
SPV	Rikin, sulfaatin ja fosfaatin reaktioon perustuva kokonaislipidimääritysmenetelmä, Sulphur, Phosphate and Vanillin reaction
TC	Verihiutaleiden trombogeeninen aktivaatio trombiinilla ja kollageenilla

4 Yleistä mikrovesikkeleistä

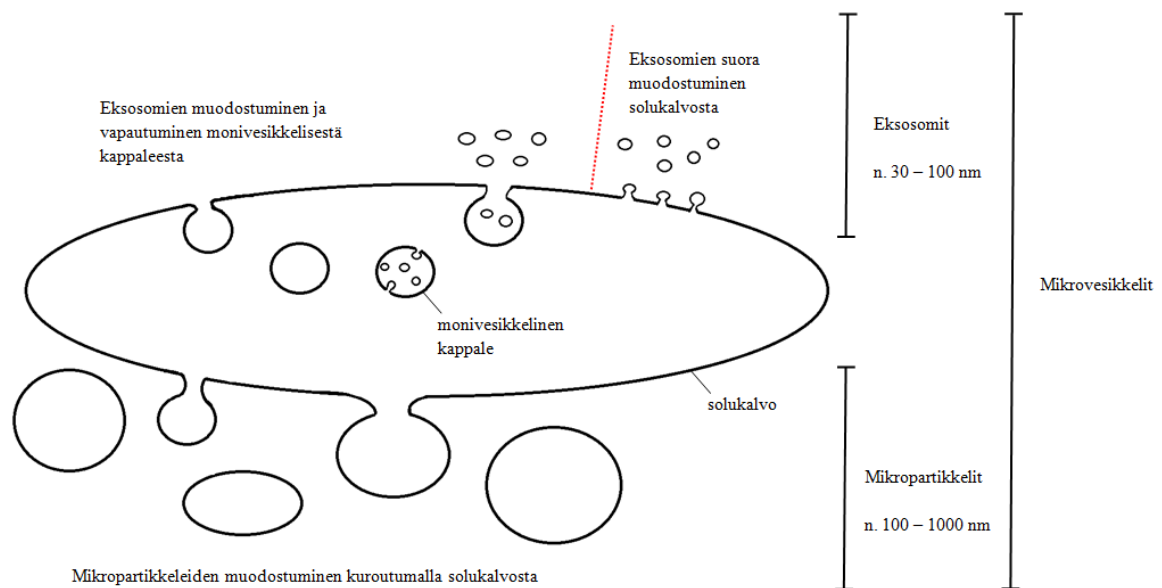
Solunulkoiset vesikkelit eli mikrovesikkelit ovat kaksoismembraanikalvollisia vesikkeleitä, joita muodostuu ja erittyy lähes kaikista eukaryootti- ja prokaryoottisoluista (Gyorgy ym. 2011b). Yleisesti mikrovesikkelit (MV) jaetaan kolmeen alapopulaatioon: apoptoottisiin kappaleisiin, mikropartikkeleihin (MP) ja eksosomeihin. Tämänhetkisellä tutkimuskentällä tilannetta kuvastaa hyvin, ettei eri vesikkelialapopulaatioiden nimistä ole yhtenäisyyttä, sillä erityisesti MP:en suhteen käytetään isäntäsolusta riippuen useita synonyymejä kirjallisuudessa (Lee ym. 2012; van der Pol ym. 2012). MV-alapopulaatioiden nimitysten lisäksi MP:en kokomääritelmä ei ole yksiselitteinen, sillä kirjallisuudessa niiden koko vaihtelee paljon. Kirjallisuudessa eksosomit ovat kooltaan noin 30 – 100 nm ja MP:t noin 100 – 1000 nm, kun taas apoptoottisten kappaleiden koko voi vaihdella 1 µm:stä jopa 5 µm:iin (Gyorgy ym. 2011b; van der Pol ym. 2012). Tarkempien mittausteknologioiden myötä eksosomien ja MP:en kokomääritelmät ovat kuitenkin muuttuneet heterogeenisimmiksi ja on osoitettu, että eksosomit voivat olla halkaisijaltaan myös yli 100 nm (Sokolova ym. 2011) MP:en ollessa mainittua 1000 nm:ä pienempiä (Yuana ym. 2013b), jolloin MV-alapopulaatioiden kokoluokissa on päällekkäisyyttä.

MV:t muodostuvat eri tavalla: eksosomien muodostuminen on kaksivaiheinen tapahtuma, missä solun sisään muodostuu ensin monivesikkelinen kappale (multivesicular body), jonka seinämästä eksosomit kuroutuvat kappaleen sisään (**kuva 1**). Eksosomit vapautuvat soluista eksosytoosivälitteisesti, kun vesikkelinomaiset kappaleet sulautuvat solukalvoon (Heijnen ym. 1999; Hurley ym. 2010; Pan ym. 1985). On tosin osoitettu, että T-soluissa eksosomit voivat muodostua suoraan solukalvosta (Lenassi ym. 2010) mikä on pääasiallinen MP:en muodostumismekanismi.

MP:en kuroutuminen solukalvosta on tarkoin säädelty prosessi: solunsisäisen kalsiumpitoisuuden ollessa matala, siirtäjäentsyymi (translocase) on aktiivinen ja kuljettaa fosfatidyyliseriiniä ja fosfatidyylietanoliamiinia solun sisään. Matala kalsiumpitoisuus pitää sekoittajaentsyymien (scramblase) inaktiivisena, mikä estää sitä kuljettamasta fosfolipidejä solukalvon puolelta toiselle. Kun solunsisäinen kalsiumpitoisuus nousee, siirtäjäentsyymi inaktivoituu, minkä lisäksi gelsoliini ja kalpaiini aktivoituvat ja vaikuttavat solun aktiinitukirankaan epästabiloivasti. Kalpaiinin ja gelsoniinin toiminta yhdistettynä sekoittaja-entsyymien aktivoitumiseen johtaa

solukalvon kuroutumiseen ja lopulta MV:en muodostumiseen (Morel ym. 2011; Piccin ym. 2007). Solunsisäinen fosfatidyyliseriini jää vesikkeleissä ulkoreunalle, mikä helpottaa hyytymistä edistävien proteiinikompleksien kokoonpanoa (Sims ym. 1989).

Kolmas vesikkelipopulaatio on ohjelmoidun solukuoleman yhteydessä muodostuvat apoptoottiset kappaleet (Gyorgy ym. 2011b), mutta tutkimuksessa keskitytään MP:en sekä eksosomien ominaisuuksiin ja puhuttaessa MV:stä tarkoitetaan MP:ta ja eksosomeja.



Kuva 1: Mikrovesikkeleiden muodostumistavat sekä tutkimuksessa käytettyjen mikrovesikkelialapopulaatioiden nimet. Kuva muokattu van der Pol ym, 2012.

MV-alapopulaatioita on eroteltu koon lisäksi myös vesikkeleiden pintareseptoreiden avulla. Erottelua varten eksosomeille ominaisina reseptoreina on pidetty CD9- sekä CD63-reseptoreita (Mathivanan ym. 2010a) sekä Alix- ja Tsg101-proteiineja (Lee ym. 2012; Urbanelli ym. 2013) ja MP:en yleisinä pintareseptoreina on pidetty erilaisia integriinejä (Zarbock ym. 2007). On kuitenkin osoitettu, että MV:en pintareseptoreissa on paljon vaihtelua (Arraud ym. 2014), joten myöskään reseptorien avulla MV-alapopulaatioita ei pystytä erottelemaan puhtaasti, sillä esimerkiksi CD63-reseptoria on havaittu molemmista MV-alapopulaatioista (Gilbert ym. 1991). Tutkimalla MV:en pinnan reseptoreja voidaan kuitenkin nykyisen näkemyksen mukaan selvittää, mistä solusta MV on muodostunut. Alkuperän selvittämisen mahdollistaa vesikkelin kuoren solukohtaiset proteiinit ja reseptorit, jotka ovat peräisin alkuperäisen solun solukalvosta, esimerkiksi verihituleperäiset MP:t voidaan tunnistaa glykoproteiini Ib:n ja

glykoproteiini IIb/IIIa:n avulla, jotka ovat verihiiutaleiden yleisimmät pintereseptorit (Zarbock ym. 2007).

MV:en interaktio kohdesolun kanssa voi tapahtua usealla eri tavalla: kommunikointi voi tapahtua kohdesolun kanssa reseptorivälitteisesti, MV:t voivat sulautua kohdesolun solukalvoon muuttuen näin osaksi kohdesolua ja kohdesolu voi fagosytoida MV:n, minkä jälkeen MV voi vapauttaa sisältönsä (Cocucci ym. 2009). MV:t voivat vaikuttaa kohdesolun signaalinvälitykseen kuljettamalla solusta toiseen entsyymejä ja ligandeja (Raimondo ym. 2011; Ratajczak ym. 2006). Proteiinien lisäksi MV:en fuusioituessa kohdesoluun siirtyy vesikkeleiden mukana lipidejä (Barry ym. 1997), jotka vaikuttavat kohdesolun toimintaan ja joita voidaan metaboloida toisessa solussa.

MV-välitteisellä proteiinikuljetuksella voidaan vaikuttaa nopeasti kohdesolun toimintaan, mutta siirtämällä genomista materiaalia, josta voidaan valmistaa tiettyä proteiinia, vaikutus kohdesoluun on sekä pitkäaikaisempi että tehokkaampi. On osoitettu, että MV:t sisältävät lähettiRNA:ta, mikroRNA:ta, pientä häiritsevää RNA:ta (small interfering RNA) ja jopa DNA:ta. Sekä eksosomit (Skog ym. 2008; Valadi ym. 2007) että MP:t (Sabin ja Kikyo 2014) voivat siirtää lähetti-RNA:ta solusta toiseen, ja on myös näytetty, että MV:t voivat siirtää DNA:ta solusta toiseen (Waldenstrom ym. 2012). RNA:n ja DNA:n siirtäminen sekä niiden avulla proteiinien tuottaminen on tehokas tapa vaikuttaa kohdesolun toimintaan ja tätä ilmiötä esimerkiksi syöpäsolut hyödyntävät muokatessaan ympäröivää solukkoa (Thakur ym. 2014).

Sen lisäksi, että solut vaikuttavat MV:en välityksellä ympäröiviin soluihin, solut poistavat MV-välitteisesti tarpeettomia molekyylejä kuten transferriniireseptoreita epäkypsistä punasoluista niiden kehittyessä punasoluiksi (Johnstone ym. 1991) sekä haitallisia apoptoottisia signaaleja kuten kaspasi 3:a (Abid Hussein ym. 2005). Apoptoottisia signaaleja sisältävien MV:en kertyminen on osoitettu aiheuttavan solukolle tuhoisia seurauksia (Boing ym. 2013), joten apoptoottisten signaaleiden hallittu poistaminen on ensiarvoisen tärkeää.

MV:tä poistetaan pernan avulla verenkierrosta (Davila ym. 2008) ja muut solut voivat fagosytoida MV:tä (Delabranche ym. 2012). Tämän lisäksi MV:tä hajotetaan lipaasivälitteisesti (Fourcade ym. 1995). Johtuen monista MV:en poistamistavoista niiden puoliintumisaikaa on vaikea määrittellä, sillä eri MV:t voivat olla alttiimpia fagosytoosille kuin toiset (Aatonen ym. 2012). MV:tä voidaan kuitenkin havaita

verenkierrasta virtaussytometrilla jopa viisi tuntia MV:en antamisen jälkeen (Rank ym. 2011).

Erilaiset solut tuottavat MV:tä ja niitä voidaan eristää monista ruumiinnesteistä kuten plasmasta, virtsasta, kyynelistä (Aatonen ym. 2014; Ludwig ja Giebel 2012; Ogorevc ym. 2013; Vlassov ym. 2012). Tutkielman kirjallisuuskatsauksessa käsitellään eri solujen tuottamien MV:en keskeisiä fysiologisia vaikutuksia sekä roolia patofysiologiassa. Vesikkelitutkimuksen hajanaisuudesta riippumatta on MV:en havaittu vaikuttavan useassa fysiologisessa tapahtumassa. Tämän lisäksi MV:en liika- ja vajaatuotanto on yhdistetty moneen patofysiologiseen tilaan (Aatonen ym. 2012; Gyorgy ym. 2011b; Herring ym. 2013; van der Pol ym. 2012; Wu ym. 2013).

Tutkimuksen kokeellisessa osiossa on keskitytty verihiutaleperäisten MV:en kvantifiointiin sekä karakterisointiin. Kirjallisuudessa MV:en koko on 30 - 1000 nm (van der Pol ym. 2012; Wu ym. 2013), mutta useiden lähteiden mukaan plasmasta eristettyjen MV:en koko olisi alle 500 nm (Aatonen ym. 2012; Gyorgy ym. 2011a; Horstman ja Ahn 1999; Yuana ym. 2013a). Verihiutaleperäisten MV:en osuus plasmassa vaihtelee eri lähteissä, on esitetty että yli 90 % plasman vesikkeleistä olisi peräisin verihiutaleista (Horstman ja Ahn 1999), mutta uudemmissa metodeiltaan edistyneemmissä tutkimuksissa verihiutaleperäisten MV:en osuus on 30 % plasman MV:stä (Arraud ym. 2014).

5 Mikrovesikkeiden fysiologinen rooli

5.1 Hemostaasi ja hyytymisreaktio

Yksi ensimmäisistä MV:en havaituista toiminnoista oli hyytymisreaktioon osallistuminen (Chargaff ja West 1946; Wolf 1967). MP:t vetävät ulkopinnalla olevan negatiivisesti varautuneen fosfadytyyliseriinin sekä muiden negatiivisesti varautuneiden fosfolipidien avulla elektrostaattisesti puoleensa hyytymisreaktioon tarvittavia proteiineja, jotka kootaan yhteen toimivaksi hyytymisreaktiokompleksiksi (Chargaff ja West 1946; Sims ym. 1988; Wolf 1967). MP:t osallistuvat kuitenkin hyytymisreaktioon muillakin tavoin, sillä MP:en vaikutusta ei voi korvata pelkillä fosfadytyyliseriinivesikkeleillä (Berckmans ym. 2002).

Hyytymisreaktion tehokkain aloitussignaali on kudostekijä (Tissue Factor), jota fysiologisissa olosuhteissa tuotetaan mm. sileälihassoluissa. Normaaleissa olosuhteissa kudostekijää ei tavata verenkierrassa, mutta verisuonen seinämän paljastuessa trauman yhteydessä vapautuu kudostekijää, joka aloittaa hyytymisreaktion. Kudostekijää on havaittu myös verestä eristetyistä MP:ssa (Novelli ym. 2014). Kudostekijä voi olla MP:ssa sekä inaktiivisessa muodossa että hyytymistä edistävässä muodossa. MP:ta, jotka sisältävät hyytymistä edistävää kudostekijää, on eristetty varsinkin laskimoveritulpan muodostaneiden syöpäpotilaiden verestä (Geddings ja Mackman 2013; Thaler ym. 2014) sekä haavaumasta tulleesta verestä (Biro ym. 2003). Eksosomien osuus hyytymisreaktiossa on kiistanalainen (van der Pol ym. 2012). Eri soluista peräisin olevien MP:en on osoitettu sisältävän myös kudostekijän reaktioreitin inhibiittoria, jolla voi inhiboida spesifisesti kudostekijä-välitteistä hyytymisreaktiota (Lacroix ym. 2013). Lisäksi endoteelisolujen tuottamien MV:en on osoitettu ehkäisevän hyytymisreaktiota inhiboimalla trombiinin tuotantoa trombomoduliinin sekä endoteeliproteiini C-reseptorin avulla (Lacroix ym. 2013).

Erityisesti endoteelisolujen tuottamat MV:t voivat osallistua verihyytymien hajottamiseen kiihdyttämällä fibrinolyysiä: fibrini pilkotaan monomeereiksi plasmiini-välitteisesti, ja jotta plasmiini on aktiivisessa muodossa, täytyy plasminogeeni aktivoida esimerkiksi urokinaasin avulla plasmiiniksi (Lacroix ym. 2013). Seriini-proteinaasi urokinaasin on osoitettu sitoutuvan urokinaasi-reseptoriin CD87, jota havaitaan esimerkiksi epiteelisoluissa. Tämän lisäksi plasmiini voi aktivoida kudostekijän

aktivaatioreitin inhibiittoria (Stalboerger ym. 2001), eli plasmiini voidaan luokitella antikoagulantiksi, jolla on fibrinolyttinen ominaisuus (Hoover-Plow 2010), mikä tekee plasmiinin hallitusta muodostamisesta tärkeän osan normaalin hemostaasin ylläpidossa. MV:stä löytyy useita fibrinolyttisiä ominaisuuksia, mikä viittaa MV:en tärkeään rooliin plasmiinin muodostumisen ketjureaktiossa (Lacroix ym. 2013) ja alleviivaa MV:en merkitystä hemostaasissa. Hemostaasin kannalta tärkeä reaktio on haavaumien umpeutumisen aloittava verihiutaleiden adheesioreaktio (Merten ym. 1999). MV:en on osoitettu olevan tärkeässä roolissa myös adheesiovuorovaikutusten muodostumisessa (Ohtsuka ym. 2013).

Hyytymisreaktio ja hyytymishäiriö ovat hemostaattisen tasapainotilan ääripäät ja tapahtuma on monimutkainen reaktioiden ketju, mutta pohjimmiltaan hyytymisreaktion ja hyytymishäiriön aiheuttaa poikkeama tasapainotilasta. MV:t ovat tärkeässä roolissa kummassakin tapahtumassa, sillä ne sisältävät sekä hyytymisreaktiota edistäviä että hyytymisreaktiota estäviä tekijöitä (Lacroix ja Dignat-George 2012). Verihiutaleperäisten MV:en osuudesta hyytymisreaktiossa ei ole selvyyttä, sillä on esitetty, että niillä olisi vain hyytymistä edistäviä tekijöitä (Lacroix ym. 2013). Gilbert ym. (1991) on kuitenkin osoittanut, että verihiutaleperäiset MV:t voivat sekä edistää että estää hyytymisreaktiota.

5.2 Mikrovesikkelit immuunireaktioissa

Solujenvälisen viestinnän lisäksi MV:t vaikuttavat myös immuunipuolustuksen toimintaan eri tavoin. Eri solujen tuottamat MV:t voivat aktivoida immuunipuolustusta esittelemällä antigeenejä immuunipuolustuksen soluille (Mobergslin ja Sioud 2014; They ym. 2009) ja on osoitettu, että esimerkiksi rintamaidosta eristetyt eksosomit voivat estää T-solujen HI-virusinfektion (Naslund ym. 2014). MV:t voivat myös vaimentaa immuunipuolustusta eri menetelmin, sillä erityisesti immuunipuolustuksen solujen tuottamalla MV:llä on havaittu olevan immunosuppressiivinen vaikutus (They ym. 2009). Raskauden aikana trofoblastisoluista erittyy immunosuppressiivisia eksosomeja, joiden vaikutuksen ansiosta kehittyvä alkio välttää äidin immuunivasteen (Mincheva-Nilsson ym. 2006).

Lipopolysakkaridi-aktivoitunut (LPS) verihiutaleperäiset MV:t voivat stimuloida soluja tuottamaan erilaisia sytokiineja (Distler ym. 2005), minkä seurauksena solu tuottaa lisää

MV:tä (Brown ja McIntyre 2011; Brown ym. 2013) ja edelleen lisää sytokiineja vahvistaen tulehdusreaktiota. Lisäksi on todistettu, että verihiutaleperäiset MV:t osallistuvat immuunipuolustuksen aktivaatioon esittelemällä antigeenejä B-soluille CD40L-reseptorivälitteisesti (Sprague ym. 2008). Tulehdustilassa plasmasta eristetyt MV:t voivat jopa aiheuttaa tuhoa solutasolla (Buesing ym. 2011; Densmore ym. 2006; Mastronardi ym. 2011).

6 Mikrovesikkelit sairauksissa

6.1 Hyytymishäiriöt

Verenkierron kohonneet MV-määrät on yhdistetty moniin erilaisiin sairauksiin (Aatonen ym. 2012; Gyorgy ym. 2011b; van der Pol ym. 2012), mutta kohonneet MV-määrät eivät ole suora osoitus patofysiologisesta tilasta, sillä esimerkiksi myös liikuntasuoritus nostaa MV:en määrää verenkierrossa (Chaar ym. 2011; Maruyama ym. 2012). Koska esimerkiksi verihiutaleet aktivoituvat herkästi tuottamaan MV:tä ja vesikkeleiden muodostumisessa on paljon yksilötason vaihtelua (Aatonen ym. 2014), on vaikeaa määrittää plasman yleistä MV-tasoa, mihin esimerkiksi sairauksien aiheuttamaa MV-määrän muutosta verrattaisiin.

Toistaiseksi ainoat todistettavasti vesikkeleistä tai niiden puutteesta johtuvat sairaudet ovat hyytymishäiriöt kuten Castamanin ja Scottin syndrooma. Scottin syndrooma on resessiivisesti periytyvä autosomaalinen sairaus, jossa verihiutaleet eivät pysty muodostamaan trombiinia normaalilla tavalla verihiutaleen pinnassa olevan pienemmän fosfadyylimäärän takia (Weiss ym. 1979; Zwaal ym. 2004). Syy tähän on vähentynyt MV:en määrä sekä puutteellinen sekoittajaentsyymien toiminta, jonka pitäisi siirtää fosfadyyliseriiniipidiä solukalvon ulkopinnalle (Suzuki ym. 2010; Zwaal ja Schroit 1997), josta fosfadyyliseriini päätyy MV:hin niiden muodostumisen yhteydessä. Myös Castamanin syndroomassa hyytymisreaktio on häiriintynyt MV:en muodostumisen vähentymisen takia, mutta poiketen Scottin syndroomasta verihiutaleet reagoivat protrombinaasin kanssa (Castaman ym. 1997). Koska verihiutaleperäisillä MV:illä on todistettu rooli hyytymisreaktiossa, on myös loogista, että ongelmat MV:en tuotannossa tai koostumuksessa johtavat hyytymishäiriöihin, mistä yllämainitut sairaudet kertovat.

Plasman MV-pitoisuuden kohotessa lisääntyy myös hyytymistä edistävien tekijöiden, erityisesti kudostekijän, pitoisuus verenkierrassa, jolloin veritulppien muodostumisen riski kasvaa. Ilmiö on merkittävä esimerkiksi potilailla, joille on tehty avosydänleikkaus tai muu suurempi operaatio, sillä näillä potilailla on havaittu kohonneet MV-pitoisuudet (Biro ym. 2011). Leikkauksen jälkeen potilaille tehty MV-analyysi on osoittanut, että MV:en pinnalla on kudostekijää, mikä lisää olennaisesti niiden potentiaalia vaikuttaa hyytymisreaktioon (Sartori ym. 2013).

6.2 Mikrovesikkelit syövän muodostumisessa ja etenemisessä

MV:en vaikutusta syövän edistymiseen on tutkittu paljon, sillä syöpäsolut muokkaavat toimintaansa ja ympäristöään monella tavalla MV-välitteisesti. Syöpäsolut vaimentavat kehon immuunivastetta erittämällä immunosuppressiivisia tekijöitä sisältäviä MV:tä (Baj-Krzyworzeka ym. 2006; Battke ym. 2011; Clayton ym. 2011; Huber ym. 2005; Iero ym. 2008; Li ym. 2006; Poutsiaka ym. 1985; Riteau ym. 2003) ja mahdollistavat jopa immuunireaktioiden välttämisen (Mincheva-Nilsson ja Baranov 2014). Lisäksi syöpäsolu poistaa MV-välitteisesti kemoterapian molekyylejä (Shedden ym. 2003). Kasvaimen laajetessa solujen tarve ravinteille sekä hapelle kasvaa, minkä lisäksi solut tuottavat yhä enemmän haitallisia metaboliatuotteita. Syöpäsolujen aineenvaihdunnan helpottamiseksi syöpäkasvain lisää MV-välitteisesti verisuoniston muodostumista (Azmi ym. 2013; Iero ym. 2008; Janowska-Wieczorek ym. 2005; Kahlert ja Kalluri 2013; Liu ym. 2014; Mineo ym. 2012). Syöpäkasvaimen MV:t edistävät syöpää myös kuljettamalla kasvaimen viereisiin soluihin syöpägenejä sekä onkogeenisia signaaleja (Atay ym. 2014; Balaj ym. 2011; Chiba ym. 2012) sekä muokkaamalla ympäröivää kudosta (Dashevsky ym. 2009; Wysoczynski ja Ratajczak 2009; Yang ym. 2013), mikä mahdollistaa kasvaimen kasvamisen. On myös esitetty, että syöpäsolujen tuottamat MV:t edistäisivät kasvaimen metastaasia kiertämällä ympäri kehoa valmistellen metastointipaikkaa uusia kasvaimia varten (Higginbotham ym. 2011; Peinado ym. 2011; Peinado ym. 2012).

6.3 Mikrovesikkeleiden immuunireaktiot

MV:en rooli allergiassa sekä allergioiden muodostumisessa on epäselvä. On osoitettu, että rintamaidon eksosomeissa on vaihtelua, mikä voi vaikuttaa allergioiden muodostumiseen (Admyre ym. 2008; Torregrosa Paredes ym. 2014). Joissain

eläinmalleissa on osoitettu, että allergeenia kohtaan voidaan kehittää toleranssi siirtämällä eksosomeja allergeenille altistuneesta yksilöstä altistumattomaan yksilöön (Almqvist ym. 2008). Kuitenkin on tutkimuksia, joissa B-solujen eksosomit välittäisivät allergeenejä T-soluille, jotka aktivoituisivat tuottamaan sytokiinejä, eli MV:en välityksellä voi sekä ehkäistä että pahentaa allergian vaikutuksia (Admyre ym. 2007).

Virukset hyödyntävät MV:tä syöpäsolujen tavoin immuunipuolustuksen supressioon tai välttämiseen sekä muiden solujen infektoimiseen (Fevrier ja Raposo 2004; Meckes ym. 2010). Myös bakteerien on osoitettu siirtävän genomista materiaalia vesikkelivälitteisesti ja vesikkelin sulautumisen jälkeen bakteerin on havaittu tuottavan biologisesti aktiivisia molekyylejä (Yaron ym. 2000).

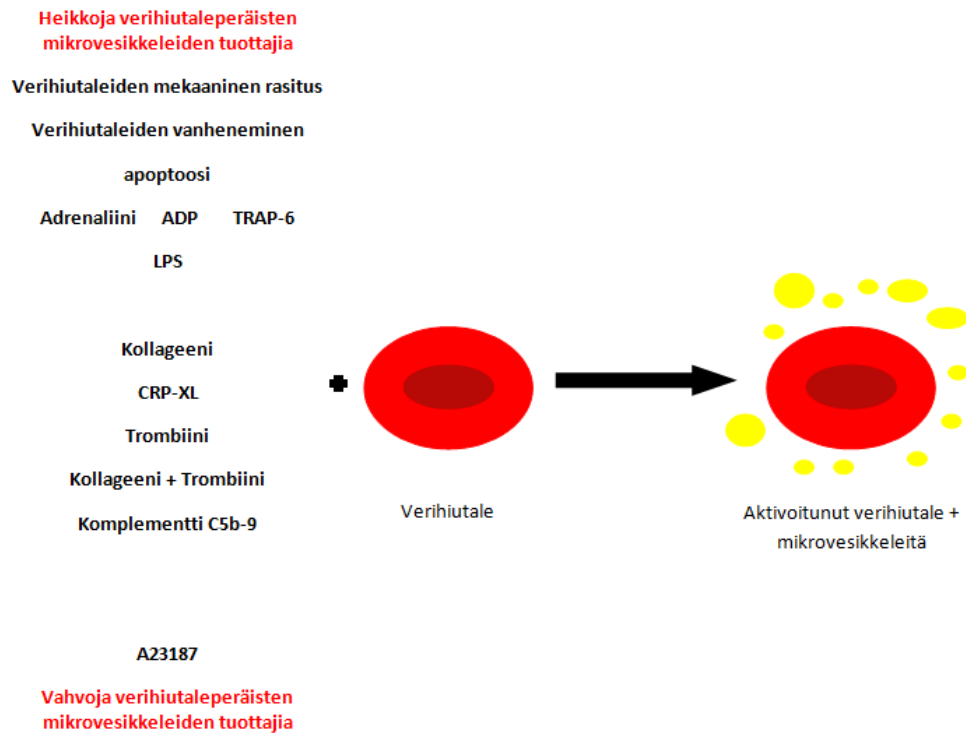
6.4 Mikrovesikkelit sydän- ja verisuonisairauksissa

Verihiutaleperäisillä MV:illä on kyky tuottaa tromboksaania, mikä vaikuttaa sileiden lihasten aktivaatioon. Eläinmalleilla onkin osoitettu, että aortan inkubaatio verihiutaleperäisillä MV:illä lisää lihasten supistuksia (Pfister 2004). Samaa ilmiötä tukevat useat muut havainnot, missä yhdistetään kohonneet MV-määrät korkeaan verenpaineeseen (Diehl ym. 2011; Preston ym. 2003). MV:en yhteyttä kardiovaskulaarisairauksiin lisää havainto statiinihoidon vaikutuksista plasman MV-määrään: statiinihoidon seurauksena plasman MV-määrä laskee ja statiinihoitoa saavien potilaiden MV:t osoittavat vähemmän aktivoitumisen merkkejä (Suades ym. 2013).

7 Mikrovesikkeleiden tutkiminen

7.1 Verihiutaleperäisten mikrovesikkeleiden tuottaminen

Isäntäsolu on avainasemassa MV:tä tutkittaessa, sillä MV:en tuottaminen vaihtelee suuresti solukosta riippuen. Syöpäsolut tuottavat MV:tä ilman erillistä aktivaatiota (Baj-Krzyworzeka ym. 2006), sen sijaan verihiutaleet täytyy aktivoida tuottamaan vesikkeleitä eri agonistein tai mekaanisen rasituksen avulla (**kuva 2**). Verihiutaleiden on osoitettu tuottavan pieniä määriä MV:tä ilman aktivaatiota varsinkin pitkään jatkuneissa säilytysolosuhteissa integriinivälitteisesti (Cauwenberghs ym. 2006). Verihiutaleiden aktivoitumisherkkyys pitää myös huomioida verihiutaleiden käsittelyssä esimerkiksi eristysvaiheessa (Aatonen ym. 2012).



Kuva 2: Verihiutaleperäisten mikrovesikkeleiden tuottamiseen käytettyjä verihiutaleiden aktivaattoreita (Aatonen ym. 2012; Aatonen 2014; Horstman ja Ahn 1999; Miyazaki ym. 1996). CRP-XL = Kollageeniin liittyvä risteävästi linkitetty proteiini (= Collagen Related Protein, cross-linked)

Jotta verihiutaleet tuottaisivat tutkimukseen riittäviä määriä MV:tä, täytyy niitä aktivoida eri aktivaattoreilla tai aktivaattoreiden yhdistelmillä (Gyulkhandanyan ym. 2013; Sims ym. 1989). Useiden reaktioreittien yhtymäkohta on solunsisäisen kalsiumin määrän nousu, millä on keskeinen osa varsinkin MP:den muodostumisessa (Morel ym. 2011; Piccin ym. 2007; Sabin ja Kikyo 2014; Savina ym. 2003). Solunsisäinen kalsiumpitoisuus voi nousta solunsisäisten kalsiumvarantojen vapautumisen tai solunulkoisen kalsiumin soluun virtaamisen ansiosta (Rink ja Sage 1990). Suurin osa solunsisäisestä kalsiumista on varastoitu endoplastiseen kalvostoon ja solunsisäisten kalsiumvarantojen tyhjenemisen on havaittu laukaisevan solunulkoisen kalsiumin virtaamisen soluun ORAI1-proteiinien muodostamien kanavien välityksellä (Varga-Szabo ym. 2009).

Verihiutaleiden aktivoiminen trombiinilla aloittaa ketjureaktion, jossa aktivoidut proteaasiaktivoidut reseptorit 1 ja 4 sekä glykoproteiinireseptori vapauttaa solunsisäiset kalsiumvarastot fosfolipaasivälitteisesti (Munzer ym. 2013). Fysiologisissa olosuhteissa kollageeni yhdessä von Willebrandin tekijän kanssa reagoi verihiutaleiden kanssa mm.

kollageenireseptori glykoproteiini VI:n ja integriini $\alpha\text{IIb}\beta\text{1}$:n kanssa, jolloin solunsisäinen Ca^{2+} -pitoisuus nousee fosfolipaasi $\text{C}\beta$ -välitteisesti (Fabre ja Gurney 2010). Trombogeenisessä aktivaatiossa verihiutaleet aktivoituvat trombiinin ja kollageenin yhteisvaikutuksesta (Sims ym. 1989), jolloin molempien reaktioreittien seurauksena solunsisäinen kalsiumpitoisuus nousee nopeasti.

Verihiutaleiden solunsisäistä kalsiumpitoisuutta nostetaan myös suoraviivaisemmin Ca^{2+} -ionoforilla, joka nostaa solunsisäistä kalsiumpitoisuutta kuljettamalla solun sisään kalsiumia solun ulkopuolelta. Verihiutaleiden kalsium-ionoforiaktivaatiota käytetään yleisesti positiivisena vesikulaation kontrollina, sillä verihiutaleet tuottavat MV:tä todella voimakkaasti ionofori-aktivaation seurauksena (Sims ym. 1989). Kalsium-ionofori-aktivaatio myös mielletään apoptoottiseksi malliksi (Henriksson ym. 2007), sillä se indusoi verihiutaleiden kaspasi-aktiivisuutta (Gyulchandanyan ym. 2012; Mutlu ym. 2012).

Tulehduksen kaltaista tilaa voidaan jäljitellä aktivoimalla verihiutaleet bakteeriperäisellä LPS:llä. LPS:n aiheuttama tulehdusaktivaatio ei nosta solunsisäistä kalsiumpitoisuutta eikä P-selektiiniekspressiota (Ward ym. 2005), joka on verihiutaleiden yleinen aktivaation merkki. LPS-aktivaatiossa verihiutaleet aktivoituvat Tollin kaltaisen reseptori 4:n välityksellä tuottamaan sytokiini interleukiini 1β :aa, mikä aktivoi soluja autokriinisesti tuottamaan lisää interleukiini 1β :aa sekä interleukiini 1α :aa, jotka voivat edelleen toimia ligandeina Tollin kaltaisen reseptori 4:lle (Brown ym. 2013). On myös esitetty, että Tollin kaltaisen reseptori 4:n aktivoituminen vaikuttaisi verihiutaleiden aktivaatioon tumatekijä $\kappa\beta$ -välitteisesti (Rivadeneira ym. 2014). Myös *in vivo* -LPS-altistuksen on osoitettu nostavan plasman MV-määrää (Soop ym. 2013).

Verihiutaleet tuottavat pieniä määriä MV:tä mekaanisen rasituksen seurauksena, sillä fysiologisessa tilassa verihiutaleiden ja verisuonen välinen mekaaninen rasitus (shear stress) vaikuttaa niiden aktivoitumiseen (Boulanger ym. 2007; Lu ym. 2013). Laboratorio-olosuhteissa ilmiöön vaikuttaa mm. putkimateriaali, joissa altistus tehdään (Gemmell 2000) sekä mahdollinen verihiutaleiden sekoittaminen (George ym. 1988), joilla mallinnetaan verihiutaleeseen kohdistuvaa mekaanista rasitusta. Myös verihiutaleiden vanheneminen vaikuttaa vesikkeleiden tuottamiseen (Cauwenberghs ym. 2006).

7.2 Mikrovesikkelialapopulaatioiden erottelu

MV-alapopulaatioiden erotteluun on useita menetelmiä, joista yleisimmät ovat erilaiset sentrifugointiin perustuvat menetelmät. Jaottelusentrifugoinnin avulla MV-alapopulaatiot eristetään toisistaan useiden eri voimakkuuksilla tehtävien sentrifugointien avulla, missä suuremmat vesikkelit eristetään matalammilla g-voimilla ja pienempi eksosomipopulaatio käyttämällä suurempaa g-voimaa (Witwer ym. 2013). Ongelmana jaottelusentrifugoinnissa on kontaminantit kuten proteiiniaggregaatit, lipoproteiinit, virukset sekä bakteerit, jotka eristyvät halutun vesikkelialapopulaation kanssa sentrifugoidessa vesikkeleitä suurilla g-voimilla (Cvjetkovic ym. 2014). Lisäksi tutkimusryhmien välinen vaihtelu käytetyissä sentrifugointiajoissa sekä käytetyissä g-voimissa vaikeuttaa tulosten vertailtavuutta eri tutkimusryhmien kesken (Piccin ym. 2007). Jaottelusentrifugointiin voidaan yhdistää esimerkiksi laboratoriosakin käytettävien (halkaisijaltaan 0,22 µm ja 0,18 µm olevien) suodattimien käyttö, jolloin suodattimilla rajataan koon mukaan haluttu osuus näytteestä pois. Ongelmana suodattimien käytössä on kuitenkin MV:en reagointi suodattimien kanssa, mikä johtaa vesikkeleiden aggregaatioon suodattimien pinnalle sekä vesikkeleiden mahdollinen hajoaminen pakotettaessa niitä suodattimien läpi (Witwer ym. 2013).

MV:en tiheyserojen vaihteluun perustuva erottaminen voidaan tehdä gradienttisentrifugoinnin avulla, missä MV-näyte siirretään sukroosi- (Chen ym. 2013) tai iodoxanol-gradientin päälle (Cantin ym. 2008). Iodixanol-gradientin etu sukroosigradiettiin verrattuna on kyky erotella eksosomit viruksista (Cantin ym. 2008). Gradienttisentrifugoinnilla näytteestä voidaan erottaa luotettavasti kontaminantit, mutta vesikkelialapopulaatioiden tiheyseroihin perustuvalla erottelulla on havaittu uusia eksosomien alapopulaatioita (Chen ym. 2013), joiden ominaisuuksia ei ole toistaiseksi kartoitettu.

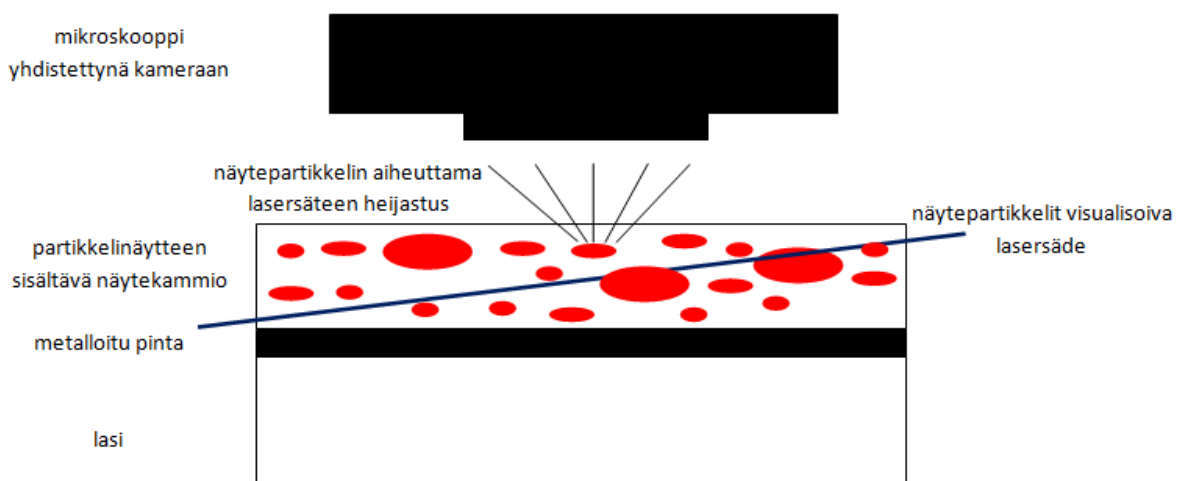
MV-alapopulaatiokohtaiset erot pintareseptoreissa mahdollistavat täsmällisen erottelun myös vasta-aineiden välityksellä (Mathivanan ym. 2010b). Vasta-aineesta riippuen näytteestä voidaan eristää haluttu populaatio tai poistaa ei-toivottu populaatio, mutta verrattuna jaottelusentrifugointiin MV-saanto jää yleensä matalaksi (Tauro ym. 2013; Witwer ym. 2013). Kuten jo aiemmin mainittiin, menetelmä on kuitenkin ongelmallinen, sillä esimerkiksi MP:ssa vesikkeleiden reseptoreissa on vaihtelua, jolloin koko populaatiota ei voida eristää yhden pintareseptorin avulla (Arraud ym.

2014). Lisäksi eksosomeille tyypillisenä pidettyä CD63-reseptoria on osoitettu olevan myös MP:ssa (Gilbert ym. 1991).

7.3 Kvantifiointi

MV-tutkimus on melko uusi tutkimuskenttä, vaikka esimerkiksi verihiutaleperäisiä MV:tä on havaittu ensimmäisen kerran jo 40-luvulla (Chargaff ja West 1946). Koska MV-tutkimuksen metodeja ei ole standardoitu, kyseenalaistetaan monissa artikkeleissa niin populaatioiden kokoluokkia kuin yleisiä eristämis-, käsittely- ja kvantifikaatiometodeja (Burger ym. 2013; Witwer ym. 2013; Yuana ym. 2013b). Erityisesti eksosomien ja pienimpien MP:en tutkiminen on ongelmallista, sillä vesikkeleiden havaitseminen ja populaatioiden toisistaan eristäminen luotettavalla tavalla on ollut hyvin haastavaa eikä tälläkään hetkellä alalla ole standardoituja protokollia, minkä mukaan toimittaisiin. Yleisimmin MV:en kvantifiointiin on käytetty virtaussytometriä, mutta menetelmän nykyisin paremmin tunnistettu heikkous on tunnistaa partikkeleita, jotka ovat halkaisijaltaan alle 300 nm (Robert ym. 2009). Koska esimerkiksi verihiutaleperäisten MV:en ajatellaan pääsääntöisesti olevan alle 500 nm (Aatonen ym. 2012), on esitetty, että virtaussytometrillä tunnistettaisiinkin mahdollisesti vain 1 % kaikista MV:stä (Arraud ym. 2014).

Toinen tapa MV:en tutkimiseen on nanopartikkeleiden jäljitysanalyysi (Nanoparticle Tracking Analysis [NTA]), missä vesikkelit visualisoidaan laserin avulla jotta näytteen konsentraatio saadaan selville (**kuva 3**).



Kuva 3: NTA:n toimintaperiaate. Kuva muokattu laitteen maahantuojan sivujen kuvan pohjalta.

Seuraamalla jokaisen näytepartikkelin liikettä NTA:lla selvitetään myös näytteen partikkeleiden kokojakauma, sillä partikkelit liikkuvat Brownin liikkeen mukaan ja kun puskurin viskositeetti ja lämpötila tiedetään, voidaan MV:en liikkeen määrän perusteella laskea niiden koko Stokes-Einsteinin yhtälön mukaan (Oosthuyzen ym. 2013; Soo ym. 2012):

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h}$$

Stokes-Einsteinin yhtälössä D = partikkelin liikkuma matka (diffuusiokerroin), k_b = Boltzmannin vakio, T = lämpötila, η = viskositeetti ja R_h = partikkelin hydrodynaaminen halkaisija.

Solumäärien mittaamiseen yleisesti käytetyllä Coulter-laskimella ei voi kvantifioida MV:tä, sillä vesikkelit ovat liian pieniä havaittavaksi Coulter-laskimella. Samaa periaatetta, eli partikkeleiden aiheuttamaa muutosta sähkönjohtoon käytetään kuitenkin hyväksi jatkuvan pulssin havaitsemismetodissa (Resistive Pulse Sensing). Tätä tutkimusta varten MV:t joudutaan suodattamaan, mikä rajoittaa tutkittavien partikkeleiden kokoluokkaa halutunlaiseksi. Menetelmä on tarkka, mutta menetelmällä voi näytteen suodattamisen takia tutkia vain tietyn kokoisia vesikkelipopulaatioita. Tämän lisäksi MV:en suodattaminen on ongelmallista, sillä ne voivat reagoida suodattimen kalvon kanssa (van der Pol ym. 2013; van der Pol ym. 2014). Myös pienkulmaröntgensironnan avulla voidaan tutkia pieniä, halkaisijaltaan alle 200 nm olevia partikkeleita. Tutkittavan materiaalin rakenne selvitetään partikkeleiden elektroneista elastisesti siroavien röntgensäteiden avulla. Menetelmän ongelma MV-tutkimuksessa on kuitenkin se, että näyte täytyy suodattaa jotta mitattavan näytteen partikkelit ovat samankokoisia, minkä lisäksi näytteessä ei saa olla kontaminantteja kuten lipoproteiineja. Lisäksi menetelmä vaatii suuren laitoksen toimiakseen eikä tällaisia laitoksia ole useita maailmanlaajuisesti (van der Pol ym. 2014; Varga ym. 2014).

MV:tä kvantifioidaan myös dynaamisen valon sironnan avulla, jossa näytteeseen suunnataan laservalo ja valon aallonpituuteen nähden pienet partikkelit sirottavat valon eri suuntiin riippuen partikkeleiden koosta. Menetelmä on kuitenkin erittäin altis näytteiden polydispersiteetille, eli näyte täytyy käsitellä tarkasti esimerkiksi korkean

erotuskyvyn nestekromatografialla, jotta näytteen partikkelit olisivat kyllin tasalaatuisia kokonsa puolesta mitattavaksi dynaamisella valonsironnalla (Sokolova ym. 2011; Varga ym. 2014).

MV:en kvantifiointiin on myös kehitetty useita menetelmiä, joissa niiden määrää mitataan epäsuorasti esimerkiksi mittaamalla veren hyytymisaikaa, johon vesikkelimäärä vaikuttaa. MV:en trombiinimäärään tai hyytymisaikaan perustuvilla kvantifikaatiomenetelmillä saadut tulokset ovat keskenään verrattavissa (Strasser ym. 2013). Epäsuorien MV:en kvantifiointiin kehitettyjen menetelmien tulosten rinnastettavuutta yleisesti käytettyjen kvantifikaatiometodien MV-tuloksiin ei ole kuitenkaan tutkittu. Tämän lisäksi MV:en määrää ilmoitetaan monissa tutkimuksissa proteiinimäärän avulla (Jang ym. 2013).

7.4 Koon määrittäminen

Vesikkeleiden kokoluokat eivät ole yksiselitteisiä, vaikka uudella tarkemman erotuskyvyn teknologialla voidaan erotella ja tutkia yhä tarkemmin pieniä partikkeleita. MV:en koon määrittämistä varten käytetään yleisesti elektronimikroskopiaa, mutta myös uudemmat tekniikat kuten NTA mahdollistavat partikkelien koon määrittämisen. Perinteinen elektronimikroskopia on osoittautunut ongelmalliseksi näytteiden käsittelyn ansiosta, sillä näytteiden käsittely aiheuttaa muutoksia vesikkeleiden morfologiaan, minkä lisäksi vesikkeleissä tapahtuu keinotekoisista kutistumista (Heijnen ym. 1999). On kuitenkin tutkimuksia, joissa MV:en tutkimiseen on käytetty kryoelektronimikroskopiaa, jonka vaatima näytekäsittely ei vaikuta yhtä huomattavasti vesikkeleihin nopean jäädytyksen ansiosta. Tutkimuksessa havaittiin, että plasman MV:en koko vaihtelisi 25 – 260 nm:n välillä ja että suurin osa väitetyistä eksosomeista olisikin todellisuudessa lipoproteiineja (Yuana ym. 2013a). Menetelmän ongelmana on suuri työmäärä ja hitaus, lisäksi kokoarviot ovat aina subjektiivisia menetelmän manuaalisuudesta johtuen. MV:en kokojakaumaa on tutkittu myös atomivoimamikroskopian avulla, jossa partikkeleiden rakennetta pystytään tutkimaan nanometriin luokassa. Eri tutkimuksien mukaan MV:en koko, joka yleisesti ilmoitetaan 100 – 1000 nm:ksi, on ilmoitettu keskiarvoltaan 180, 67,5 ja jopa 50 nm:ksi (Yuana ym. 2013b).

Kuten aiemmin jo mainittiin, myös NTA:n avulla saadaan selville näytteen partikkeleiden hydrodynaaminen halkaisija (Dragovic ym. 2011), mutta hydrodynaamisen ja geometrisen halkaisijan välistä suhdetta ei tiedetä, sillä se riippuu sekä määritettävien partikkeleiden että liuoksen ominaisuuksista. Virtaussytometrialla saadaan selville tutkittujen partikkeleiden keskimääräinen koko käyttämällä kalibraatiohelmiä (van der Pol ym. 2010), mutta MV:en koon määrittäminen on ongelmallista virtaussytometrialla, koska laite ei havaitse kaikkia partikkeleita (Robert ym. 2009). Tämän lisäksi kalibraatiohelmien tulee vastata tutkittavia MV:tä taitekertoimeltaan, jotta koko saataisiin määritettyä oikein.

Viiden yllämainitun metodin vertailussa havaittiin, että NTA:n, kryomikroskopian, pienkulmaröntgensironnan sekä kromatografiaan yhdistetyn dynaamisen valonsironnan tulokset vastasivat toisiaan. Sähköjohdon muutoksen havaitsemiseen perustuva Resistive Pulse Sensing ei kyennyt havaitsemaan kooltaan alle 100 nm olevia partikkeleita, mutta muuten kokojakauma vastaa muilla metodeilla saatua tulosta. (Varga ym. 2014)

8 Mikrovesikkelitutkimuksen tulevaisuus

Kohonneet MV-määrät on yhdistetty useisiin patologisiin olosuhteisiin (Aatonen ym. 2012; Wu ym. 2013). Kuitenkin MV:tä tarvitaan myös normaalin homeostaasin ylläpitoon, joten kyse on pohjimmiltaan tasapainotilasta, joka patologisissa tapauksissa on järkkynyt. Tämä tasapainotilan ymmärtäminen ja toisaalta sen hyväksikäyttäminen ovat tulevaisuuden tavoitteita, sillä MV:tä pyritään käyttämään tulevaisuudessa diagnostisina sekä terapeuttisina työkaluina (Benameur ym. 2009; Hugel ym. 2005; Martinez ja Andriantsitohaina 2011). Tiedetään, että syöpäsolut käyttävät hyväkseen MV:tä kohdesolukon muuttamisessa vastaanottavaisemmaksi valmistellakseen metastointia (Higginbotham ym. 2011). Tällaisissa tapauksissa syövän metastointia voidaan siis ennakoida ja ehkä jopa ehkäistä eristämällä verenkierrosta spesifisti tietynlaisia vesikkeleitä (Marleau ym. 2012). Koska MV:t eivät aiheuta immuunireaktiota (Feng ym. 2013), ovat ne ilmeisen hyvä ja tehokas tapa levittää proteiineja ja genomista materiaalia (Shtam ym., 2013), joten lääkkeitä voitaisiin välittää spesifisesti tiettyyn kudokseen hakeutuvilla vesikkeleillä. Eläinmalleilla on jo

siirretty eksosomivälitteisesti RNA:ta, joka tuottaa halutussa solukossa haluttua proteiinia (Alvarez-Erviti ym. 2011), minkä lisäksi MV:tä on käytetty lääkemolekyylien kuljetukseen (Kalani ym. 2014; Zhuang ym. 2011) ja syöpärokotteina (Natasha ym. 2014). Viimeaikoina myös mesenkymaalisten kantasolujen tuottamien vesikkeleiden ominaisuuksia on tutkittu, sillä kantasolujen tuottamien MV:en ajatellaan ainakin osittain aiheuttavan kantasolujen vaikutukset (Kilpinen ym. 2013). Väitettä tukevat havainnot mesenkymaalisten kantasolujen tuottamien MV:en kyvystä suojata munuaisvaurioilta (Kilpinen ym. 2013) ja soluvaurioiden toipumisen nopeuttamisesta (Choi ym. 2014; Raisi ym. 2014). Lisäksi mesenkymaalisten kantasolujen tuottamat MV:t voivat estää syöpäkasvaimen metastaasia (Bruno ym. 2013; Ono ym. 2014).

Vaikka tulokset ovat lupaavia ja antavat toivoa vastaavien menetelmien laajemmasta käytöstä, täytyy alalla tehdä huomattavan paljon perustutkimusta, jotta vesikkeleiden toimintaa voidaan ymmärtää ja myöhemmin hyödyntää. Monien koejärjestelmien heikkoutena voidaan myös mainita, että vaikka koejärjestelyissä altistetaan solukkoa MV:llä, MV-määrät fysiologisiin määriin verrattuna ovat moninkertaiset (Sverdlov 2012), sillä koejärjestelyjen standardointi on vielä pahasti kesken.

MV-tutkimuksessa tehdään intensiivistä metrologista tutkimusta ja tulevaisuuden tavoitteena on eri metodien validoinnit sekä standardoinnit, jotta eri laboratorioissa saadut tulokset olisivat keskenään verrattavissa (Herring ym. 2013). MV:en tutkimisen perimmäisenä tavoitteena on populaatioiden luotettava kvantifikaatio sekä karakterisointi, mikä auttaa ymmärtämään fysiologiaa ylläpitävien ja patofysiologiaa ilmiöitä kiihdyttävien vesikkeleiden eroja. Perusteellisen ymmärtämisen jälkeen MV:en ominaisuuksia voitaisiin hyödyntää esimerkiksi lääkkeiden kuljettamisessa sekä eri patologisten tilojen diagnosoinnissa (Burger ym. 2013).

9 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia kahden eri (pato)fysiologisesti merkittävän aktivaation vaikutusta tuotettujen verihutaleperäisten MV:en määrään sekä niiden alipopulaatioiden kokojakaumaan. MV:tä pyrittiin kvantifioimaan myös proteiini- ja lipidimäärän perusteella.

Laboratoriossa on aiemmin yritetty kvantifioida ja karakterisoida vesikkelialapopulaatioita kolesterolimäärän mukaan, mutta menetelmä osoittautui puutteelliseksi tarkoitukseen (julkaisematon opinnäytetyö, Lopez [ohjannut Siljander]). Tämän takia työn toisena tavoitteena oli pystyttää uusi vesikkeleiden kvantifikaatiometodi, joka perustuu mitattuun MV:en kokonaislipidimäärään.

Tutkimuksen kolmas tavoite oli tutkia antikoagulanttinakin käytetyn trombiini-proteinaasi-inhibiittori fenyylialaniini-proliini-arginiini-klorometyyliketonin (PPACK) vaikutusta verihutaleiden vesikulaatioon.

10 Materiaalit ja menetelmät

10.1 Verihiutaleiden eristys

Kokoverinäytteet otettiin Helsingin julistuksen mukaisesti vapaaehtoisilta ja terveiltä informoiduilta luovuttajilta, jotka eivät olleet käyttäneet verihiutaleiden toimintaan vaikuttavaa lääkitystä 10 päivään. Veri otettiin ilman puristussidettä verihiutaleiden aktivaation estämiseksi ja ensimmäiset 5 ml verta hylättiin. Verta kerättiin 50 ml:n Falcon-putkiin, joissa oli $\frac{1}{6}$ tilavuudesta ACD-antikoagulanttia (39 mM sitruunahappo, 75 mM natriumsitraatti, 135 mM d-glukoosi, pH 4,5).

Verihiutaleet eristettiin kokoverestä laboratoriossa kehitetyllä menetelmällä, jossa on minimoitu muiden solujen kontaminaatio (Aatonen ym. 2012). Veri jaettiin 10 ml:n eriin 15 ml:n sentrifuugiputkiin, minkä jälkeen veri sentrifugoitiin $200 \times g$ huoneenlämmössä (hl) 12 min ilman jarrua (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hampuri, Saksa). Verihiutalepitoinen plasma pipetoitiin uusiin sentrifuugiputkiin välttämällä valkosolukä ja punasoluja ja putkeen lisättiin 10 % v/v ACD:tä ja 100 ng/ml prostaglandiini E₁:tä (PGE₁, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Yhdysvallat) estämään hiutaleiden aktivoitumista käsittelyn aikana.

Putket sentrifugoitiin $900 \times g$, hl, 15 min (Centrifuge 5810 R) ja plasman poiston jälkeen solut suspensoitiin 6 ml:aan OptiPrep-puskuria (10 mM Hepes, 0,85 % NaCl, pH 7,4), johon lisättiin 1 µl/ml PGE₁:tä. Verihiutaleet eroteltiin puna- ja valkosolujen jäänteistä gradienttisentrifugoinnin avulla. 50 ml:n sentrifuugiputkiin tehtiin ei-jatkuva 10-17 % iodixanol-gradientti (15 ml 17 %, 14 ml 13%, 14 ml 13 % [OptiPrep, Axis-Shield, Oslo, Norja]) jonka päälle lisättiin 6 ml hiutalesuspensiota ja jota sentrifugoitiin $300 \times g$, hl, 20 min, ilman jarrua (Centrifuge 5810 R). Hiutalefraktio otettiin talteen ja jaettiin pesua varten kahteen putkeen. Hiutalefraktio pestiin OptiPrep-puskurilla, johon lisättiin 100 ng/ml PGE₁:tä ja putket sentrifugoitiin $900 \times g$, hl, 15 min (Centrifuge 5810 R).

Sentrifugoitu hiutalenappi suspensoitiin 2 ml:aan Ca²⁺-vapaata Hepes-Tyrodes-puskuria (137 mM NaCl, 0,3 mM NaH₂PO₄, 3,5 mM Hepes, 5,5 mM glukoosi, pH 7,35). Hiutalekonsentraatio määritettiin verisoluanalysaattorilla (Beckman Coulter T-540, Beckman Coulter, Brea, CA, Yhdysvallat) ja hiutalepitoisuudeksi säädettiin Hepes-Tyrodes-puskurilla 250×10^6 verihiutaletta/ml, minkä on laboratoriossa aiemmin

saatujen tulosten mukaan optimaalinen konsentraatio MV:en tuottamiseen (Aatonen ym. 2012). Hiutalesuspensioon lisättiin 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ ja 3 mM KCl.

10.2 Mikrovesikkeleiden tuottaminen

MV:en tuottamiseksi verihiiutaleita aktivoitiin kolmella eri tavalla ja niille tehtiin myös aikatäsmennetyt kontrollit. Fysiologisesti trombogeenisestä stimulaatiota jäljittelevässä aktivaatiossa (TC) verihiiutaleet aktivoitiin 1 U/ml trombiinilla (Enzyme Research Laboratories, Swansea, UK) sekä 10 ug/ml kollageenilla (NYCOMED Austria GmbH, Linz, Itävalta), tulehdustilaa jäljittelevässä aktivaatiossa (LPS) verihiiutaleet aktivoitiin 100 ng/ml LPS:llä (O111:B4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Yhdysvallat), 100 ng/ml lipopolysakkaridiin sitoutuvalla proteiinilla (LBP, R&D Systems, Minneapolis, MN, Yhdysvallat) sekä 100 ng/ml CD14-reseptorilla (R&D Systems). Ionoforiaktivaatiossa (IONO) hiiutaleet aktivoitiin 10 µM kalsimysiinillä (A21387, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Yhdysvallat). Aktivaattorit lisättiin pipetoimalla ne aktivaatioon käytetyn putken seinämään ennen verihiiutalesuspension lisäystä. IONO- ja TC-aktivoituja verihiiutaleita sekä kontrollia inkuboitettiin 30 minuuttia 37 °C ilman sekoitusta ja LPS-aktivoituja verihiiutaleita sekä niiden kontrollia inkuboitettiin kolme tuntia 37 °C ilman sekoitusta. Näytepitoisuudet sekä inkubaatioajat perustuvat laboratoriossa aiemmin käytettyihin olosuhteisiin (Aatonen ym. 2014).

10.3 Mikrovesikkeleiden tuoton inhibointi

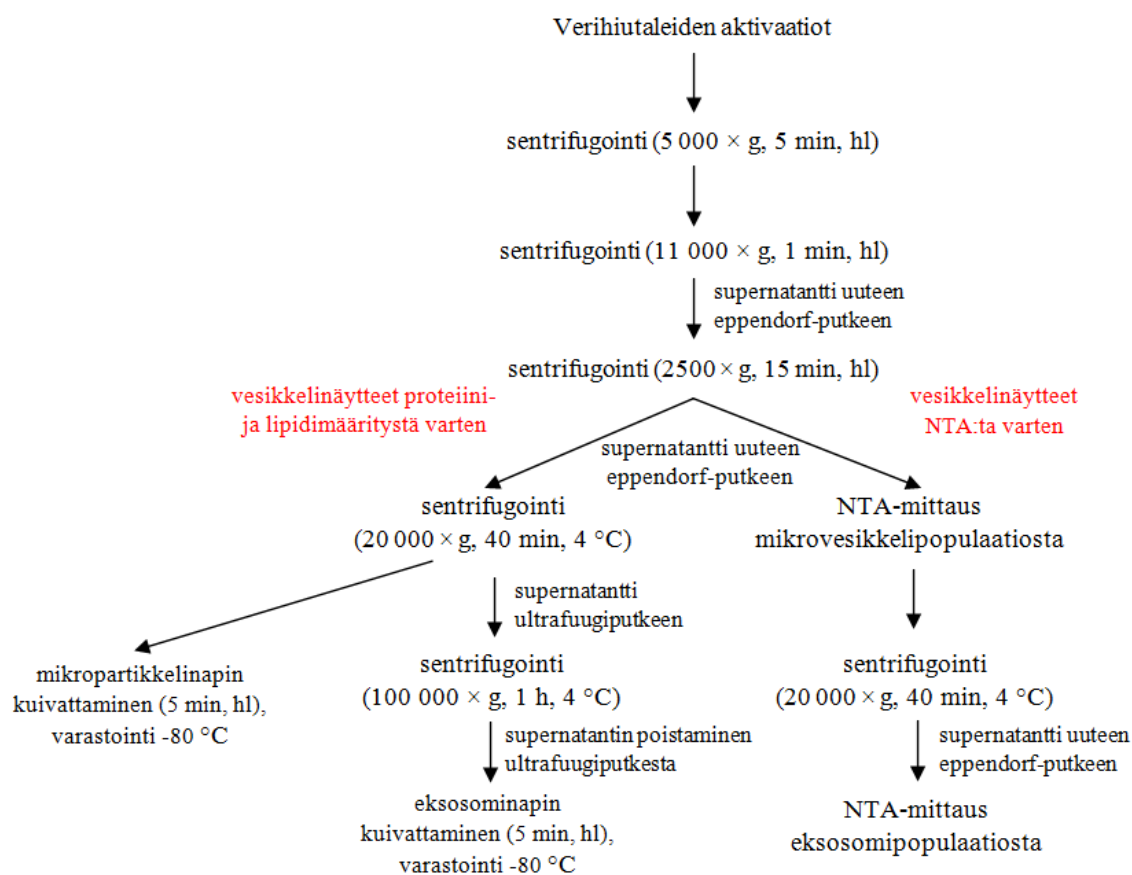
Vesikkeleiden muodostumisen estämistä tutkittiin lisäämällä verihiiutaleille 40 µM PPACK:a (Merck KGaA, Darmstadt, Saksa), 15 U/ml hepariinia (Leo Pharma, Ballerup, Tanska), 30 µg/ml hirudiinia (Verum Diagnostica GmbH, München, Saksa) tai 1:25 kokonaistilavuudesta yleistä proteinaasi-inhibiittori Completea (kantaliuos 25×, Roche, Basel, Sveitsi). Hirudiini liuotettiin Hepes-Tyrodes-puskuriin hirudiinia antikoagulanttina sisältävistä veriputkista. Inhibiittorit lisättiin samanaikaisesti aktivaattoreiden kanssa pipetoimalla ne aktivaatioon käytetyn putken seinämään ennen verihiiutalesuspension lisäämistä.

10.4 Vesikkelialapopulaatioiden eristäminen

Aktivaatioiden jälkeen hiutalesuspensiot sentrifugoitiin $5\,000 \times g$, hl, 5 min ja $11\,000 \times g$, hl, 1 min (B. Braun Biotech International 1-15, B. Braun Biotech International, Göttingen, Saksa), jotta putkissa olevista verihutaleista ja solujen jäänteistä päästiin eroon. Eristyksestä laaditun vuokaavion mukaisesti (**kuva 4**) suspensio siirrettiin uusiin putkiin ja supernatantti sentrifugoitiin $2500 \times g$, hl, 15 min. Supernatantin puhtaus verihutaleista sekä muista kontaminanteista sentrifugointikäsitteilyn jälkeen varmistettiin mittaamalla näytteet Beckman Coulter T-540-verisoluanalysointilaitteella.

Verihutalevapaa supernatantti siirrettiin uusiin putkiin ja näytteestä riippuen se joko analysoitiin NTA:lla tai niistä eristettiin MV-alapopulaatiot jatkomäärittäystä varten. NTA tehtiin aina tuoreille MV-suspensioille mittaamalla tuoreesta vesikkelinäytteestä ensin koko MV-populaation konsentraatio ja kokojakauma, minkä jälkeen MP:t eristettiin sentrifugoimalla näyte $20\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 min (Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Saksa), jolloin saman näytteen supernatantista voitiin analysoida eksosomipopulaation konsentraatio sekä kokojakauma. Näytteen käsitteilyn minimoimiseksi MP:n määrää ei selvitetty NTA:lla, vaan MP:n määrä selvitettiin NTA-tuloksista laskennallisesti vähentämällä näytteen MV:n määrästä havaittu eksosomimäärä.

Myöhemmin tehtäviä lipidi- ja proteiinimäärittäystä varten MP:t eristettiin sentrifugoimalla MV-suspensio $20\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 min (Mikro 200R), minkä jälkeen eksosomit sisältävä supernatantti siirrettiin uusiin putkiin ja eksosomit eristettiin ultrasentrifugoimalla näyte $100\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h (OptimaTM MAX-XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, Yhdysvallat, roottori TLA-55, k-tekijä 66). Supernatantin poistamisen jälkeen eppendorf-putkiin jäänyttä kosteutta haihdutettiin 5 minuutin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen eppendorf-putket siirrettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen.



Kuva 4: Vuokaavio vesikkelinäytteiden käsittelystä NTA-mittausta sekä proteiini- ja lipidimääritystä varten.

10.5 Mikrovesikkeleiden konsentraation ja kokojakauman määrittäminen

Eri aktivaatioilla tuotettujen MV-alapopulaatioiden konsentraatit sekä kokojakaumat määritettiin Nanosight-laitteella (LM14C, sininen laser (405 nm, 60 mW) Nanosight, Salisbury, Iso-Britannia), johon oli yhdistetty CMOS-kamera (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japani) vesikkeleiden Brownin liikkeen tallentamiseksi. NTA:ssa näytteen partikkelit visualisoidaan laserin avulla ja partikkeleiden kokojakauma sekä konsentraatio voidaan määrittää tunnetussa lämpötilassa ja viskositeetissa Brownin liikkeen perusteella, sillä partikkeleiden liikkeen määrä on verrannollinen niiden halkaisijaan Stokes-Einsteinin yhtälön mukaan.

Vesikkelinäyte syötettiin injektoruiskun avulla manuaalisesti laitteen näytekammioon siten, että kammio täyttyi mitattavasta näytteestä. Näytteen nestelämpötilaa mitattiin erillisellä ohjelmistolla koko mittauksen ajan ja puskurin viskositeettinä käytettiin

veden viskositeettiä. Tutkimuksessa käytettyjen NTA-mittausten asetuksilla (**taulukko 1**) yhden NTA-mittauksen pituus oli 90 sekuntia ja jokaisesta näytteestä tehtiin 3 rinnakkaista mittausta. Näytteitä laimennettiin Hepes-Tyrodes-puskurilla siten, että kaikkien näytteiden konsentraatio oli mittausten aikana samankaltainen, 10-30 partikkelia/ruutu.

Taulukko 1: NTA-mittauksissa käytetyt asetukset

Kamerataso	14
Mittausten toistettavuus	korkea
Näytteen polydispersiteetti	korkea
Partikkelimäärä/ruutu	40-100
Kameran suljinaika	1 000
Kameran vahvistus	400

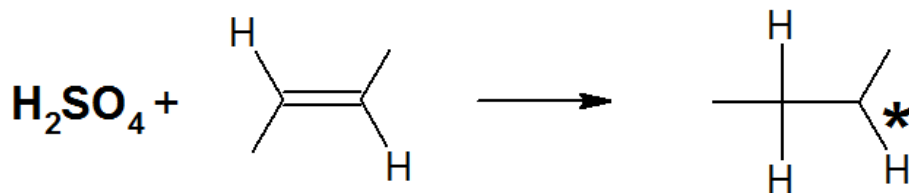
Näytteet analysoitiin NanoSight NTA –ohjelmalla (NanoSight Ltd, versio 2.3) ”Batch process” -menetelmällä, joka ottaa huomioon näytteiden rinnakkaisuuden. Analysoidessa NTA-tuloksia käytettiin taulukossa 2 ilmoitettuja asetuksia, minkä lisäksi ohjelmisto vähensi näytteistä taustan.

Taulukko 2: NTA-tulosten analysoinnissa käytetyt asetukset.

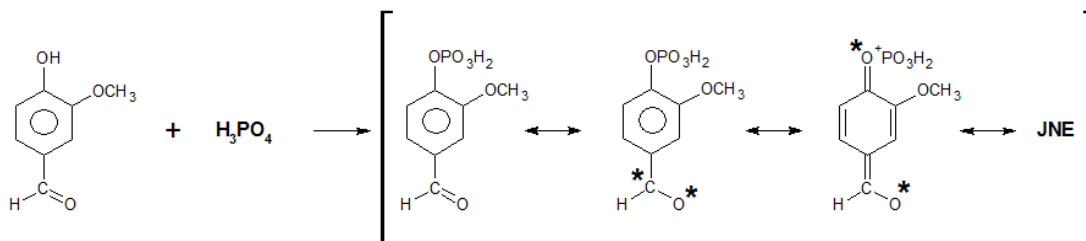
Sumeus	automaattioletus
Partikkeleiden vähimmäisliike	automaattioletus
Partikkelin detektiokynnys	10
Partikkeleiden vähimmäiskoko	50 nm

10.6 Mikrovesikkeleiden lipidipitoisuuden määrittäminen

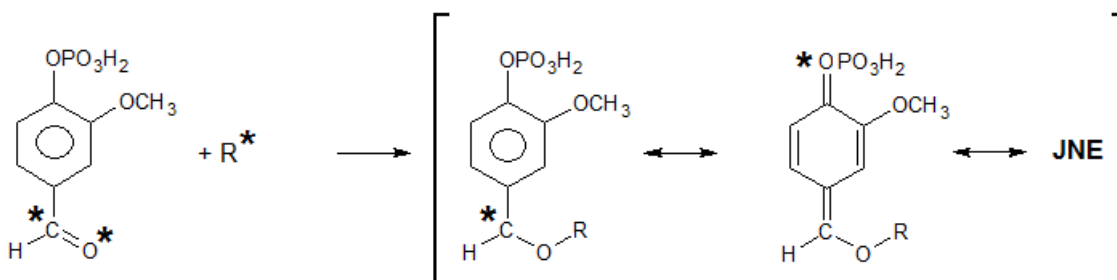
Rikin, fosforin ja vanilliinin reaktioon perustuva lipidimääritysmenetelmää (SPV) hyödynnettiin jo 60-luvulla seerumin kokonaislipidimääritykseen (Drevon ja Schmit 1964), mutta SPV-menetelmä on sittemmin ollut käytössä mm. bakteerien kvantifiointissa (Izard ja Limberger 2003). SPV-menetelmän reaktioreittiä on selitetty karbonium-ionin ja esterin reaktiolla (Knight ym. 1972).



Kun lipidinäytettä inkuboidaan rikkihapossa, rikkihapon reaktiossa kaksoissidoksellisen hiilen kanssa muodostuu karbonium-ioni.



Fosforihappo reagoi vanilliinin kanssa muodostaen esterin, jossa on erittäin reaktiivinen karbonyyliryhmä.



Karbonyyliryhmä reagoi karbonium-ionin kanssa ja reaktiossa syntyy yhdiste, joka voidaan mitata spektrofotometrillä noin 530 nm:ssä (McMahon ym. 2013). Reaktioyhtälöt muokattu Knight ym. 1972.

Lipidimäärittystä varten vesikkelinäytteitä ultrasonikoitiin ammesonikaattorissa 20 min, hl, minkä jälkeen näyteputkien korkkiin tehtiin injektioneulalla reikä ylipaineen välttämiseksi. Standardinäytteet valmistettiin pipetoimalla eppendorf-putkiin eri määriä kloroformiin liuotettua auringonkukkaöljyä (Bunge Finland Oy, Raisio, Suomi) tai kalaöljyä (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Yhdysvallat). Vesikkelipopulaatioiden eristämismetodien eroista johtuen standardisuora tehtiin polypropeeniputkiin (MP:t) sekä ultrasentrifuugiputkiin (eksosomit), koska havaittiin, että putkimateriaali vaikuttaa näytteiden absorbanssiin (**kuva 18**). Standardiputket rei'itettiin ja kloroformi haihdutettiin standardinäytteistä inkuboimalla eppendorf-putkia 90 °C:ssa (Grant

QBT2, Grant Instruments, Shepreth, Iso-Britannia) kunnes kloroformi oli haihtunut. Haihduttamisen jälkeen standardien ja näytteiden päälle pipetoitiin 100 µl 96 % rikkihappoa ja inkuboitiin 20 min 90 °C:ssa (Grant QBT2). Näytteet ja standardit pipetoitiin u-pohjaiselle 96-kuoppalevyille (Greiner Bio One, Orlando, FL, Yhdysvallat) ja näytteiden jäähdytettiin jäällä foliolla peitettynä 30 min, minkä jälkeen niihin pipetoitiin 50 µl 0,2 mg/ml vanilliinia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Yhdysvallat), joka oli liuotettu 17 % fosforihappoon. Levyn annettiin jäähtyä ja näytteiden absorptio 560 nm:ssä mitattiin spektrofotometrillä (LabSystems Multiskan EX, Milford, MA, USA).

10.7 Mikrovesikkeleiden kokonaisproteiinipitoisuuden määrittäminen

MV-näytteiden proteiinipitoisuus määritettiin µBCA-menetelmällä (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Vesikkeli suspensoitiin 100 µl:aan PBS - 0,25 % Triton-X:ää ja suspensiosta pipetoitiin 3 × 25 µl:n rinnakkaisnäytettä u-pohjaiselle 96-kuoppalevyille (Greiner Bio One). Näytekuppiin oli pipetoitu pohjalle 50 µl 0,25 % Triton-X-PBS:ää. Standardinäytteet valmistettiin menetelmäpakkauksessa olleesta naudan seerumin albumiinista. Näytteiden ja standardien pipetoinnin jälkeen kuppiin pipetoitiin valmistajan ohjeiden mukaan valmistettua reagenssisekoitusta 75 µl/kuoppa ja foliolla peitettyä 96-kuoppalevyä inkuboitiin kaksi tuntia 37 °C:ssa ilman sekoitusta. Jäähdytyksen jälkeen näytteiden absorptio 560 nm:ssä mitattiin spektrofotometrillä (LabSystems Multiskan EX). Näytteen liuottamiseen käytetty detergentti ja sen optimaalinen pitoisuus määritettiin laboratoriossa tutkimuksen aikana (**kuva 18**).

10.8 Tilastolliset menetelmät

Tulokset analysoitiin GraphPad Prism-ohjelmalla (GraphPad Software, Inc. versio 5.0.1) ja tulosten merkittävyys todettiin kaksisuuntaisella parillisella t-testillä. Tulosten merkittävyyden alarajana pidettiin p-arvoa 0,05. Vertailtaessa MV-, proteiini- ja lipidimäärien korrelaatiota käytettiin Spearmanin korrelaatiokerrointa. Lisäksi vesikkelipopulaation, aktivaatioiden ja inhibiittoreiden vaikutusta proteiini-, lipidi- sekä vesikkelimäärään tutkittiin luomalla erilaisia malleja R-ohjelmalla (The R Foundation for Statistical Computing, versio 3.0.3) ja vertaamalla mallien paremmuutta mallien Akaike Information Criterion (AIC) -arvojen perusteella. AIC-arvo on statistisen mallin suhteellisen laadun mitta, jonka avulla voidaan järjestää mallit paremmuusjärjestykseen. AIC-arvo ottaa huomioon mallin monitahoisuuden ja sen, miten hyvin malli todellisuudessa kuvastaa saatuja tuloksia.

11 Tulokset

11.1 Verihiutaleaktivaation vaikutus mikrovesikkeleiden konsentraatioon, proteiini- ja lipidimäärään sekä kokojakaumaan

11.1.1 Mikrovesikkelikonsentraatio

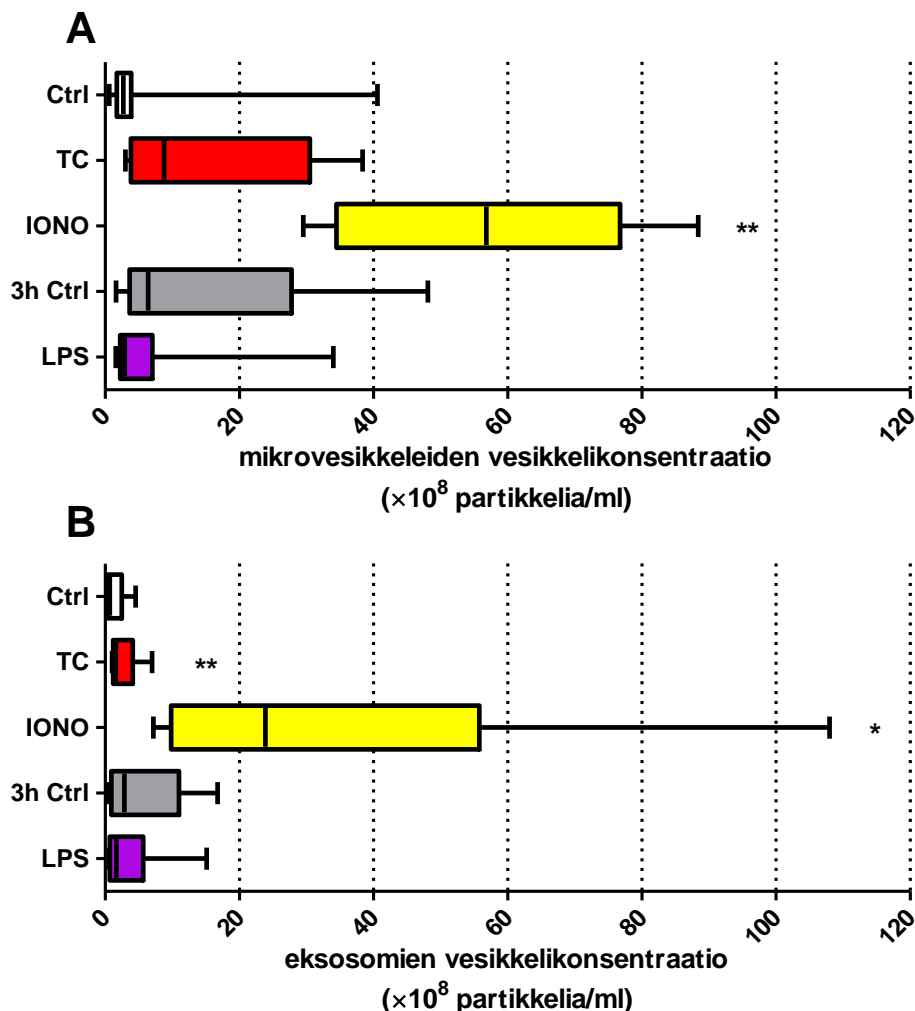
Eri aktivaatioiden vaikutusta verihiutaleiden tuottamiin MV-määriin sekä vesikkelialapopulaatioiden kokojakaumiin tutkittiin NTA:lla. Verihiutaleiden vesikkelimuodostuksessa oli aktivaatiokohtaista vaihtelua, minkä lisäksi verihiutaleilla oli suurta luovuttajakohtaista yksilötason vaihtelua MV-tuotannossa (**kuva 5**). Näytteet laimennettiin NTA:ta varten siten, että kaikkien näytteiden partikkelimäärä oli samankaltainen, noin 10 – 30 partikkelia/ruutu. NTA:n luotettavuuden arvioimiseen liittyviä tuloksia käsitellään alkaen kuvasta 16.

Esimerkkinä suuren yksilötason vaihtelusta tuotetuissa MV-määrissä oli 30 minuutin kontrollialtistus (Ctrl), jossa verihiutaleita ei aktivoitu tuottamaan vesikkeleitä. Tuotettujen MV:en vesikkelikonsentraation keskiarvo oli $7,18 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml (mediaani $2,69 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml) mutta keskihajonta MV-määrälle oli 13,55 (**kuva 5A**). Suuren hajonnan vuoksi kuvan 5 tuloksia vertailtiin mediaaniarvojen perusteella.

TC-indusoitujen MV:en määrä oli noin kolminkertainen kontrolliinsa verrattuna ($8,78$ vs $2,69 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml) sekä toiseen fysiologisesti merkittävään verihiutaleaktivaatioon, LPS-indusoitujen MV:en määrään ($8,78$ vs $2,89 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml). IONO-indusoitujen MV:en määrä oli mediaaniarvoilla verrattuna noin 20-kertainen kontrolliinsa verrattuna ($56,85$ vs $2,69 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml; $p = 0,0026$). Positiivisen vesikulaation kontrolli tuotti patofysiologisiin aktivaatioihin verrattuna noin seitsenkertaisen (TC) ja 20-kertaisen (LPS) määrän MV:tä. LPS-indusoitujen MV:en määrä oli vain kolmasosan kolmen tunnin kontrollialtistuksen (3h Ctrl) tuottamiin MV:en verrattuna ($2,89$ vs $6,39 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml). MV:tä muodostui myös ajan funktiona ilman aktivaatiota, sillä 3h Ctrl -indusoitujen MV:en määrä oli kaksinkertainen Ctrl-indusoitujen MV-määrään nähden ($6,39$ vs $2,69 \times 10^8$ vesikkeliiä/ml).

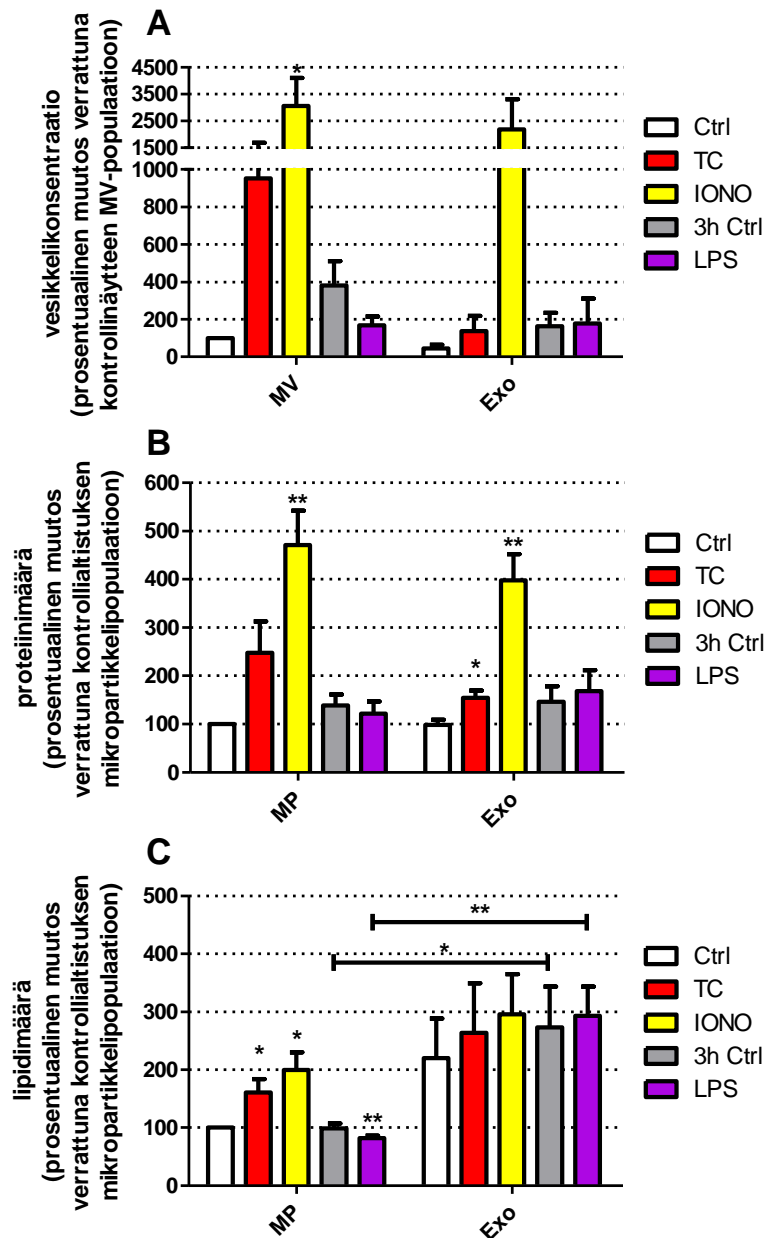
MV:hin verrattuna eksosomimäärissä oli vähemmän yksilötason vaihtelua vesikkelimäärässä (**kuva 5B**). TC-indusoitujen eksosomien konsentraatio oli

keskimäärin kaksinkertainen Ctrl-indusoitujen eksosomien määrään verrattuna ($1,60$ vs $0,66 \times 10^8$ vesikkelä/ml; $p = 0,0045$), mutta TC- sekä LPS- indusoitujen eksosomien määrässä ei ollut eroa ($1,60$ vs $1,65 \times 10^8$ vesikkelä/ml). IONO-indusoitujen eksosomien konsentraatio oli noin 35-kertainen Ctrl-indusoitujen eksosomien määrään verrattuna ($23,87$ vs $0,66 \times 10^8$ vesikkelä/ml, $p = 0,0247$) ja noin 15-kertainen verihitaleiden patofysiologisten aktivaatioiden tuottamien eksosomien määrään. LPS-indusoitujen eksosomien määrä oli pienempi kuin 3h Ctrl -indusoitujen eksosomien määrä ($1,65$ vs $2,83 \times 10^8$ vesikkelä/ml). Myös eksosomien tuottoa tapahtui ilman erillistä aktivaatiota, sillä 3h Ctrl -indusoitujen eksosomien määrä oli nelinkertainen verrattuna Ctrl-indusoitujen eksosomien määrään ($2,83$ vs $0,655 \times 10^8$ vesikkelä/ml).



Kuva 5: 30 minuutin kontrolliaktivaation (Ctrl), trombiini- ja kollageeniaktivaation (TC), kalsiumionoforiaktivaation (IONO), 3h kontrolliaktivaation (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) vaikutus verihitaleiden tuottamiin mikrovesikkelimäärään (A) ja eksosomimäärään (B). Kuvaajien pylväät kuvastavat havaintoja alakvartaalista yläkvartaaliin ja palkit vaihteluväliä, $n = 8$. * = $p < 0,05$ ja ** = $p < 0,01$.

Vesikkelimäärien suuren yksilöiden välisen vaihtelun takia muutoksia tutkitussa määreessä arvioidaan keskiarvoina prosentuaalisesta muutoksesta kunkin päivän kontrollinäytteen MV-näytteeseen (NTA) tai MP-näytteeseen (lipidi- ja proteiinimäärät) verrattuna.



Kuva 6: 30 minuutin kontrollialtistuksen (Ctrl), trombiini- ja kollageeniaktivaation (TC), kalsiumionoforiaktivaation (IONO), 3 h kontrollialtistuksen (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) vaikutus verihiutaleiden tuottamaan mikrovesikkelimäärään ja eksosomimäärään (A) sekä mikropartikkelien ja eksosomien proteiinimäärään (B) ja lipidimäärään (C). Kuvaajien pylväät esittävät prosentuaalisen muutoksen keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä (standard error mean), n = 8 (A & B), n = 7 (C). * = p < 0,05, ** = p < 0,01 ja *** = p < 0,001. MV = mikrovesikkelipopulaatio, MP = mikropartikkelipopulaatio, Exo = eksosomipopulaatio.

Kun tuotetut vesikkelimäärät muutettiin prosentuaalisiksi arvoiksi jokaisen päivän kontrollinäytteen MV-määrään verrattuna, minkään verihiutaleiden aktivaation tuottama eksosomimäärä ei merkittävästi eronnut kontrollista (**kuva 6A**). TC-indusoitujen MV:en sekä eksosomien konsentraatio oli korkeampi kuin kontrollissa, mutta erot eivät olleet kahdeksalta luovuttajalta mitattuna tilastollisesti merkittäviä, vaikka lähestyivätkin merkittävyyden rajaa (MV:en p-arvo = 0,2854, eksosomien p-arvo = 0,0576). TC-indusoitujen MV:en määrän muutos oli keskimäärin viisi kertaa korkeampi kuin LPS-indusoitujen MV:en määrän muutos, mutta tuotettujen eksosomien määrässä ei ollut eroa. LPS-indusoitujen MV:en määrä oli pienempi myös kontrolliinsa verrattuna, mutta eksosomien määrässä ei ollut eroa. Positiivinen vesikulaation kontrolli, ionofori-aktivaatio, tuotti suurimman määrän vesikkeleitä, sillä IONO-indusoitujen MV:en määrän muutos oli 30-kertainen ($p = 0,0262$) ja IONO-indusoitujen eksosomien määrän muutos oli keskimäärin 20-kertainen Ctrl-indusoitujen vesikkeleiden määrään verrattuna. IONO-indusoitujen MV:en määrän muutos oli noin keskimäärin kolme kertaa suurempi kuin TC-indusoitujen ja 15 kertaa suurempi kuin LPS-indusoitujen MV:en määrän muutos. IONO-indusoitujen eksosomien määrä oli noin 15-kertainen patofysiologisesti aktivoitujen verihiutaleiden tuottamaan eksosomimäärään. Kontrolleja verrattaessa havaittiin, että 3h Ctrl -indusoitujen vesikkeleiden määrä oli Ctrl-indusoituihin vesikkeleihin verrattuna noin nelinkertainen molemmassa populaatioissa ja erot lähestyivät merkittävyyden rajaa (MV:en p-arvo = 0,0674, eksosomien p-arvo = 0,1092).

11.1.2 Mikrovesikkeleiden proteiinimäärä

Verihiutaleiden aktivaatiokohtaista muutosta MV-määrissä pyrittiin mittaamaan myös proteiinimäärän muutoksen avulla. TC-indusoidut eksosominäytteet sisälsivät Ctrl-indusoitujen eksosominäytteiden proteiinimäärään verrattuna merkittävästi enemmän proteiinia (10,86 μg vs 7,315 μg , $p = 0,0269$), sen sijaan TC-indusoitujen MP-näytteiden lähes kolminkertainen proteiinimäärä kontrolliin verrattuna ei ollut tilastollisesti merkittävä ero (20,98 μg vs 7,31 μg). TC-indusoitujen MP-näytteiden proteiinimäärä oli noin kolminkertainen LPS-indusoitujen MP-näytteiden proteiinimäärän verrattuna, mutta eksosominäytteiden proteiinimäärässä ei ollut eroa. LPS-indusoitujen MP- ja eksosominäytteiden proteiinimäärät eivät eronneet kontrollistaan. IONO-indusoitujen MP-näytteiden proteiinimäärä oli noin viisinkertainen (32,28 μg vs 7,31 μg ; $p = 0,0012$) ja eksosominäytteiden proteiinimäärä

oli nelinkertainen (29.94 μg vs 7.32 μg ; $p = 0,0011$) Ctrl-indusoituihin näytteisiin verrattuna. Odotetusti 3h Ctrl -indusoitujen vesikkelinäytteiden proteiinimäärä oli korkeampi kuin Ctrl-indusoitujen vesikkelinäytteiden proteiinimäärä molemmissa vesikkelialapopulaatioissa. Proteiinimäärä nousi vesikkelimäärän noustessa (**kuva 6A ja 6B**) ja aineiston analysointi osoitti, että MP:n ($r^2 = 0,555$) ja eksosomien ($r^2 = 0,651$) proteiinimäärän ja vesikkelimäärän välillä oli keskivahva positiivinen korrelaatio.

11.1.3 Mikrovesikkeleiden lipidimäärä

MV:en määrää pyrittiin mittaamaan myös tutkielman aikana pystytetyllä SPV-lipidimääritysmenetelmällä. TC-indusoitujen MP-näytteiden sisältämä lipidimäärä oli suurempi kontrolliinsa (19,01 μg vs 11,86 μg ; $p = 0,0357$) sekä LPS-indusoituihin MP:hin (19,01 μg vs 9,72 μg) verrattuna (**kuva 6C**). Vaikka IONO-indusoitujen MV:en määrä oli 20-kertainen kontrolliinsa verrattuna, oli IONO-indusoitujen MP-näytteiden lipidimäärä vain kaksinkertainen kontrolliin verrattuna (22,09 μg vs 11,86 μg ; $p = 0,0128$). IONO-indusoitujen MP:en määrä oli noin 10-kertainen TC-indusoitujen MP:en määrään verrattuna, mutta näytteiden lipidimäärät eivät poikenneet toisistaan. IONO- ja LPS-indusoitujen MP:en lipidimäärässä sen sijaan oli noin kaksinkertainen ero. LPS-indusoitujen MP-näytteiden lipidimäärä oli keskimäärin pienempi kuin aikatasmennetyssä kontrollissa (9,72 μg vs 11,47 μg) ja jopa pienempi kuin Ctrl-indusoitujen MP:en lipidimäärä (9,72 μg vs 11,86 μg ; $p = 0,0061$). Huolimatta vesikkelimäärän ja proteiinimäärän eroista Ctrl- ja 3h Ctrl -indusoitujen MP:en lipidimäärässä ei ollut eroa, mikä myös voi kertoa ajan kuluessa tapahtuneesta muutoksesta vesikkelialapopulaation lipidien laadussa tai määrässä.

Yllättäen eksosominäytteiden lipidimäärät eivät merkittävästi eronneet eri aktivaatioiden välillä ja keskimäärin eksosominäytteiden lipidimäärä oli noin kaksinkertainen MP-näytteiden lipidimäärään verrattuna, vaikka eksosomeja tuotettiin määrällisesti vähemmän kuin MP:ta. LPS-indusoitujen ($p = 0,0240$) sekä 3h Ctrl -indusoitujen ($p = 0,0234$) eksosomien lipidimäärä oli merkittävästi korkeampi kuin vastaavien aktivaatioiden tuottamien MP:en lipidimäärä.

MP-näytteiden lipidimäärän ja proteiinimäärän ($r^2 = 0,325$) sekä vesikkelimäärän ($r^2 = 0,257$) välillä oli heikko positiivinen korrelaatio. Eksosominäytteiden lipidimäärän ja proteiinimäärän välillä oli heikko positiivinen korrelaatio ($r^2 = 0,464$), mutta

eksosominäytteiden lipidimäärän ja vesikkelimäärän välillä ei ollut korrelaatiota ($r^2 = 0,133$).

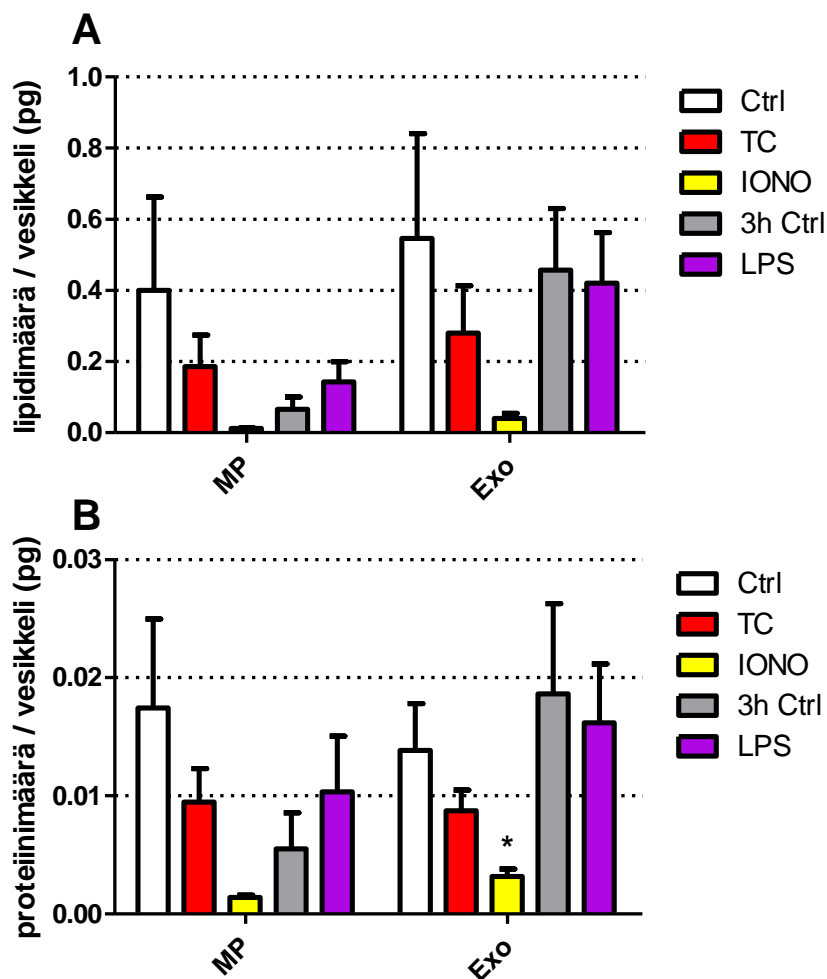
11.1.4 Vesikkelikohtaiset lipidi- ja proteiinimäärät

MP:en konsentraatio laskettiin vähentämällä NTA:lla mitatusta MV-määrästä eksosomien määrä, koska vesikkelinappien vesikkelipellettien resuspensoinnissa havaittiin sekä vesikkeleiden hävikkiä että sentrifugoinnista aiheutuvaa vesikkeleiden fuusiota (**kuva 13D**). Kaikista näytteistä MP-määrän määrittäminen kyseisellä tavalla ei ollut mahdollista, koska näytteen konsentraatiolla on suuri vaikutus mittaustulokseen NTA:ssa (**kuva 15**), jolloin MP:en määrä saattaa joissakin tapauksissa saada laskennallisesti negatiivisen arvon. Siksi analyysiin sisällytettiin vain näytteet, joiden MP-määrä oli positiivinen. Sekä MP:en että eksosomien lipidi- ja proteiinimäärässä havaittiin erittäin suurta aktivaatiokohtaista vaihtelua (**kuva 6**), mutta vesikkelialapopulaation osalta aktivaatioiden suhteen tapahtuvat vesikkelikohtaisen proteiini- ja lipidimäärien muutokset olivat samankaltaisia, mikä voi kertoa aktivaation aiheuttamasta muutoksesta tuotetun MV:n koostumukseen.

TC- ja LPS-indusoitujen MP:en vesikkelikohtaisessa lipidimäärässä ei ollut eroa, mutta LPS-indusoidut eksosomit sisälsivät laskennallisesti hiukan enemmän lipidiä kuin TC-indusoidut eksosomit (**kuva 7A**). TC-indusoidut MV:t sisälsivät vain puolet lipidiä kontrolliinsa verrattuna, kun LPS-indusoidut MP:t sisälsivät kaksinkertaisen määrän lipidiä kontrolliinsa verrattuna. LPS- ja 3h Ctrl -indusoitujen eksosomien lipidimäärissä ei havaittu eroa. Ctrl-indusoitujen vesikkeleiden vesikkelikohtainen lipidimäärä oli yli kymmenkertainen IONO-indusoitujen vesikkeleiden lipidimäärään verrattuna kummassakin MV-alapopulaatiossa ja LPS- sekä TC-indusoidut MP:t sisälsivät noin kymmenkertaisen määrän lipidiä IONO-indusoituihin MP:hin verrattuna. Ctrl-indusoidut MP:t sisälsivät keskimäärin neljä kertaa enemmän lipidiä 3h Ctrl -indusoituihin MP:hin verrattuna, mutta kontrollialtistusten eksosomikohtaisissa lipidimäärissä ei ollut eroa.

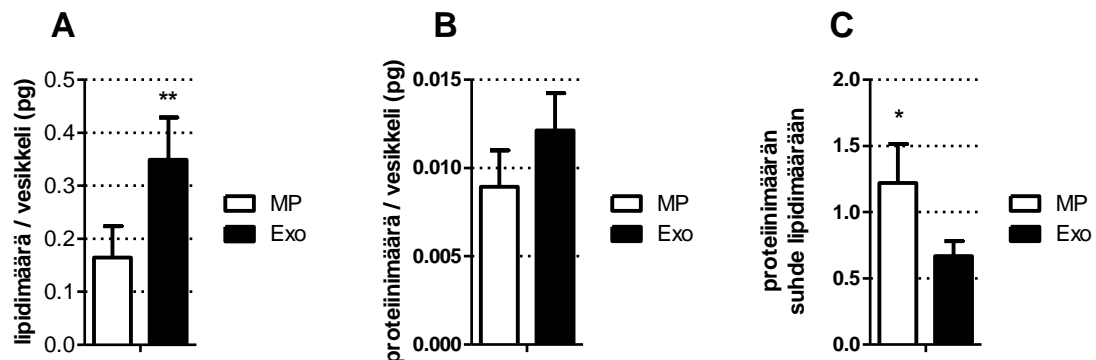
TC- ja LPS-indusoitujen MP:en vesikkelikohtaiset proteiinimäärät vastasivat toisiaan, mutta kuten lipidimäärissä, LPS-indusoidut eksosomit sisälsivät hiukan enemmän proteiinia TC-indusoituihin eksosomeihin verrattuna (**kuva 7B**). TC-indusoidut MV:t sisälsivät puolet kontrollinsa proteiinimäärästä, kun LPS-indusoidut MP:t sisälsivät kaksinkertaisen määrän proteiinia kontrolliinsa nähden. LPS- ja 3h Ctrl -indusoitujen

eksosomien proteiinimäärissä ei havaittu eroa. Vesikkelikohtainen proteiinimäärä oli Ctrl-indusoiduissa MP:ssa yli viisinkertainen IONO-indusoitujen vesikkeleiden vesikkelikohtaiseen proteiinimäärään molemmissa vesikkelialapopulaatioissa. TC- sekä LPS-indusoidut MV:t sisälsivät keskimäärin nelinkertaisen määrän proteiinia IONO-indusoituihin MV:hin verrattuna. Ctrl-indusoitujen MP:en proteiinimäärä oli nelinkertainen 3h Ctrl -indusoituihin MP:hin verrattuna, mutta kuten lipidimäärissä, eksosomikohtaisissa proteiinimäärissä ei ollut eroa.



Kuva 7: 30 minuutin kontrolliaktivaation (Ctrl), trombiini-kollageeniaktivaation (TC), kalsiumionoforiaktivaation (IONO), 3 h kontrolliaktivaation (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) vaikutus verihiutaleiden tuottamien vesikkeleiden vesikkelikohtaiseen lipidimäärään (A) ja proteiinimäärään (B) mikropartikkelipopulaatioissa sekä eksosomipopulaatioissa. Pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, n = 5-8, * = p < 0,05. MP = mikropartikkelipopulaatio, Exo = eksosomipopulaatio.

Verihiutaleiden aktivaatioista johtuvien vesikkelikoostumusten erojen lisäksi tulokset paljastivat merkittäviä MV-alapopulaatioiden välisiä eroja vesikkelikohtaisissa proteiini- ja lipidimäärissä. Eksosomit ja MP:t poikkesivat toisistaan niin lipidi- kuin proteiinimääriltään, sillä eksosomit sisälsivät laskennallisesti keskimäärin noin kaksi kertaa enemmän lipidiä kuin MP:t (0,35 pg vs 0,17 pg lipidiä/vesikkeli; $p = 0,0042$, **kuva 8A**). Sen sijaan eksosomien ja MP:en proteiinimäärässä ei ollut merkittävää eroa (0,012 pg vs 0,009 pg proteiinia/vesikkeli, **kuva 8B**). Erityisen huomionarvoista oli, että MP:en proteiinimäärän suhde lipidimäärään oli korkeampi kuin eksosomien (0,12 vs 0,07; $p = 0,0252$) proteiini-lipidi-suhde (**kuva 8C**), mikä kertoo MV-alapopulaatioiden eroista huolimatta työssä eristetyistä epäpuhtaista populaatioista.

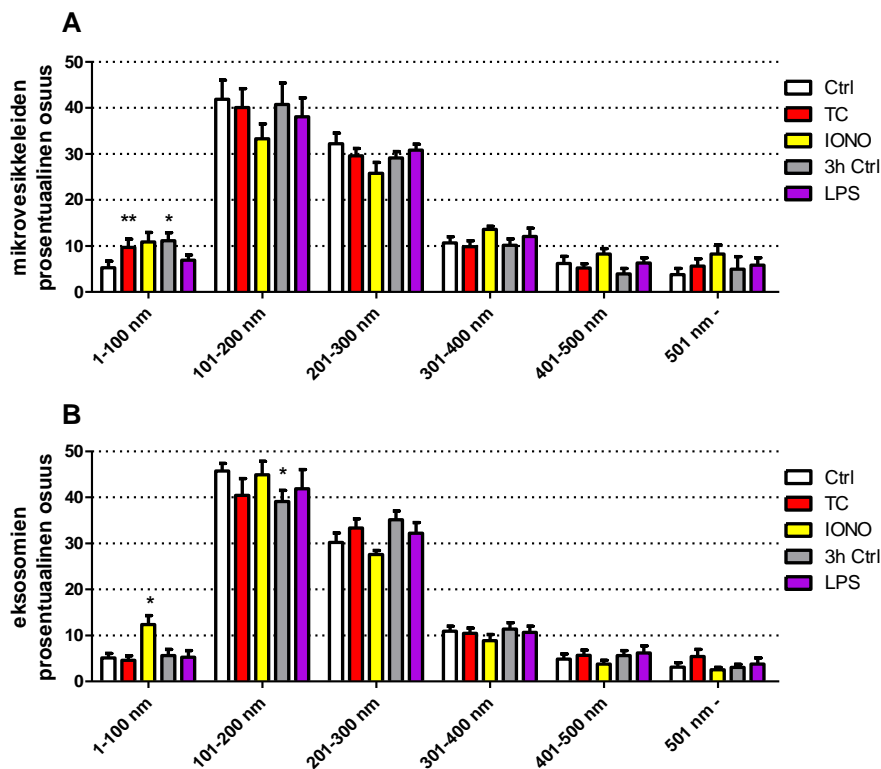


Kuva 8: Vesikkelipopulaatioiden ero vesikkelikohtaisessa lipidimäärässä (A), proteiinimäärässä (B) ja proteiini- sekä lipidimäärän suhteessa (C). Pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, $n = 30$ (MP), $n = 35$ (Exo). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. MP = mikropartikkelipopulaatio, Exo = eksosomipopulaatio.

11.1.5 Mikrovesikkeleiden koko

NTA:lla analysoitiin näytteen vesikkelipitoisuuden lisäksi tuotettujen MV:en sekä eksosomien kokojakauma. Kokojakauman tutkimiseksi vertailtiin vesikkeleiden prosentuaalista osuutta seuraavissa kokoluokissa: 0-100 nm, 101-200 nm, 200-300 nm, 301-400 nm, 401-500 nm ja yli 501 nm. Kokojakaumaan sisällytettiin näytteen sisältämät halkaisijaltaan yli 500 nm olevien partikkelien prosentuaalinen osuus erittelemättä tarkemmin tämän kokoluokan partikkeleiden kokoa, koska yli 90 % verihiutaleperäisten MV:en on osoitettu olevan halkaisijaltaan alle 500 nm (Aatonen ym. 2012). Vesikkelialapopulaatiosta huolimatta näytteiden prosentuaalinen kokojakauma oli lähes identtinen, ja myös aktivaatiosta riippumatta noin 70 %

verihituleiden tuottamista MV:stä oli kokoluokkaa 101-300 nm (**kuvat 9A ja 9B**). Halkaisijaltaan 100 - 200 nm olevien vesikkeleiden prosentuaalinen osuus oli hiukan korkeampi (noin 40 %) verrattuna halkaisijaltaan 201 - 300 nm olevien vesikkeleiden prosentuaaliseen osuuteen (noin 30 %) molemmissa vesikkeliapopulaatioissa aktivaatiosta riippumatta. Muiden kokoluokkien prosentuaalinen osuus oli aktivaatiosta tai vesikkeliapopulaatiosta riippumatta keskimäärin hiukan alle 10 % kokoluokkaa kohden. Tilastollisen analyysin perusteella merkittäviä muutoksia havaittiin seuraavissa kokoluokissa: TC-indusoitujen ($p = 0,0084$) sekä 3h Ctrl-indusoitujen ($p = 0,0274$) halkaisijaltaan alle 100 nm olevien MV:en prosentuaalinen osuus oli kaksinkertainen (10 % vs 5 %) kontrolliin verrattuna. IONO-indusoitujen eksosomien halkaisijaltaan alle 100 nm olevien partikkeleiden osuus oli noin kaksinkertainen kontrolliin verrattuna (12 % vs 6 %; $p = 0,0152$) ja 3h Ctrl -indusoitujen eksosomien halkaisijaltaan 101 - 200 nm olevien vesikkeleiden osuus laski hiukan alle 10 % ($p = 0,0312$) kontrolliin verrattuna.



Kuva 9: 30 minuutin kontrollialtistuksen (Ctrl), trombiini-kollageeniaktivaation (TC), kalsium-ionoforiaktivaation (IONO), 3h kontrollialtistuksen (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) vaikutus verihituleiden tuottamien vesikkeleiden kokojakaamaan koko mikrovesikkelipopulaatioissa (A) ja eksosomeissa (B) mitattuna NTA:lla. Kuvaajien pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, $n = 8$. * = $p < 0,05$ ja ** = $p < 0,01$.

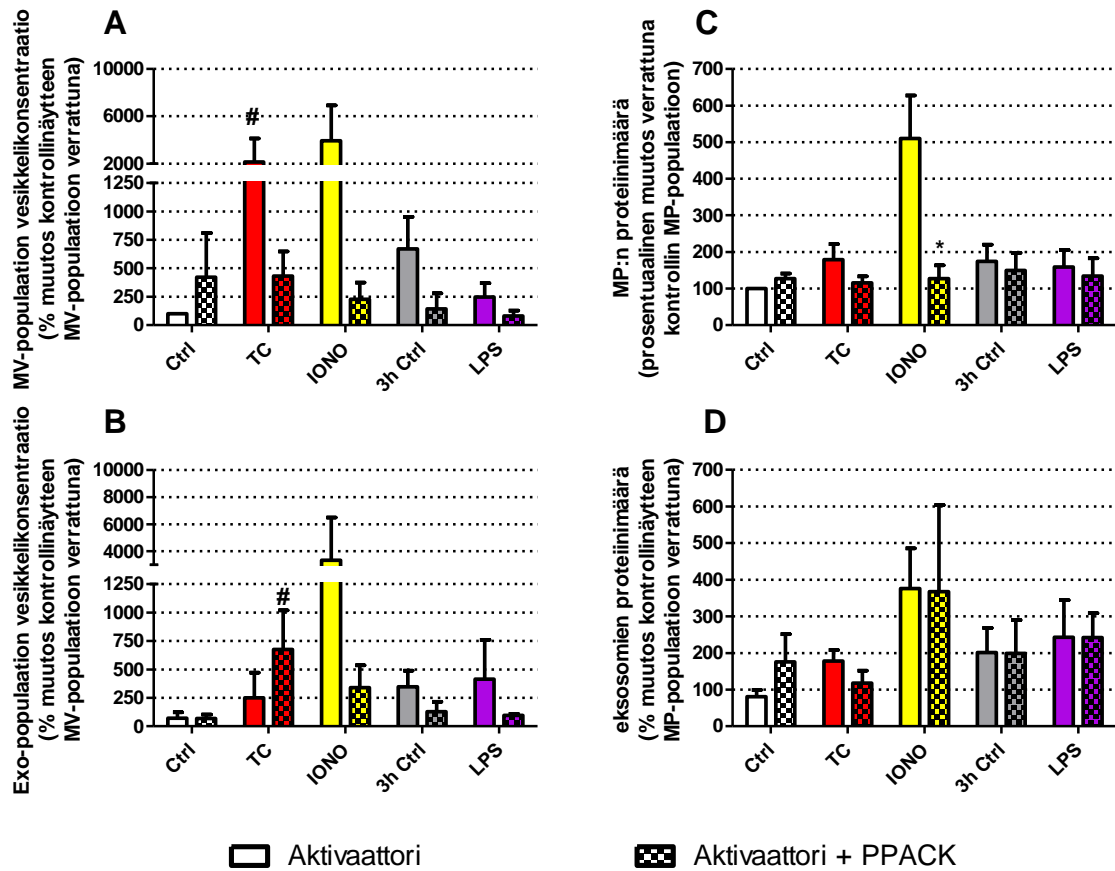
11.2 Inhibiittoreiden vaikutus vesikkelikonsentraatioon, vesikkeleiden proteiinimäärään sekä kokojakaumaan

NTA:lla mitattiin trombiini-inhibiittoreiden hirudiinin ja hepariiniin, trombiini-proteaasi-inhibiittori PPACK:n ja proteinaasi-inhibiittori Complete:n vaikutusta trombogeenisesti aktivoitujen, ionofori- ja LPS-aktivoitujen sekä aikatäsmennettyjen kontrollialtistettujen verihiutaleiden tuottamaan vesikkelimäärään sekä muutoksiin tuotettujen vesikkeleiden kokojakaumassa koko MV-populaatiossa ja eksosomeissa (kaikkia tuloksia ei esitetä). Lisäksi mitattiin inhibitioiden vaikutusta MP:en ja eksosomien proteiinimäärään, sillä kvantifioimalla proteiinimäärä on pyritty kvantifioimaan MP:en määrää. Inhibiittoreiden vaikutusta tuotettuun lipidimäärään ei sisällytetty koejärjestelyihin alustavien tulosten perusteella, joiden mukaan näytteiden lipidimäärällä ei voida mitata vesikkelimäärää.

PPACK-inhibiitio vähensi selkeästi tuotettujen MV:en määrää kaikissa aktivaatioissa vähintään kolmasosaan inhiboimattomaan näytteeseen verrattuna lukuun ottamatta Ctrl-indusoitujen MV:en määrää (**kuva 10A ja 10B**). Havainnoista huolimatta PPACK-inhibiitioilla ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittävää vaikutusta muodostuneiden MV:en määrään eri aktivaatioissa. PPACK-inhibiitio vaikutti samalla tavalla myös eksosomien muodostumiseen, sillä PPACK-inhibiitio laski IONO-, LPS- sekä 3h Ctrl -indusoitujen eksosomien määrää inhiboimattomiin näytteisiin verrattuna. PPACK-inhibiitio ei vaikuttanut Ctrl-indusoitujen eksosomien määrään. Yllättäen PPACK-inhiboitujen TC-indusoitujen eksosomien määrä nousi inhiboimattomaan näytteeseen verrattuna, mikä oli päinvastainen tulos verrattuna MV-näytteeseen, mutta tulos selittyy tavalla esittää vesikkelimäärän muutos prosentuaalisena muutoksena päivän kontrollialtistukseen verrattuna (Ks. Käytettyjen menetelmien pohdinta).

Vaikka PPACK-inhibiitio vaikutti MV:en määrään, näytteiden proteiinimäärissä ei havaittu yhtä suurta muutosta (**kuva 10C ja 10D**). Kuten MV-määrissä, MP-näytteiden proteiinimäärät laskivat Ctrl-indusoitujen MP-näytteiden proteiinimäärää lukuun ottamatta kaikissa aktivaatioissa PPACK-inhibition seurauksena. IONO-indusoitujen MP-näytteiden proteiinimäärä oli nelinkertainen niiden PPACK-inhiboitujen näytteiden proteiinimäärään verrattuna ($p = 0,0435$). Muissa aktivaatioissa PPACK-inhibition aiheuttama muutos proteiinimäärissä oli huomattavasti pienempi, eivätkä erot olleet

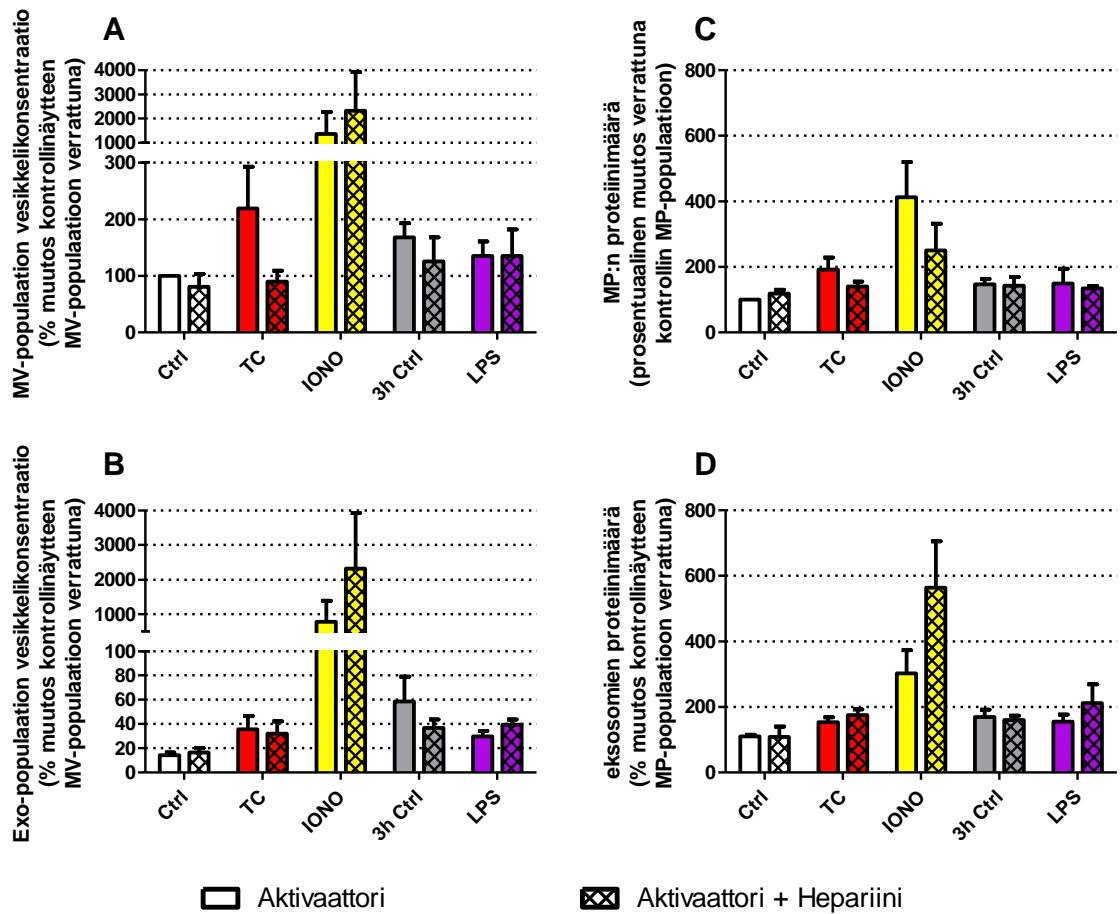
tilastollisesti merkittäviä. PPACK-inhiboitujen eksosominäytteiden proteiinimäärissä ei ollut eroa inhiboimattomien ja inhiboitujen näytteiden välillä.



Kuva 10: PPACK-inhibition vaikutus 30 minuutin kontrollialtistuksen (Ctrl), trombiini-kollageeniaktivaation (TC), kalsium-ionoforiaktivaation (IONO), 3h kontrollialtistuksen (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) tuottamaan mikrovesikkelimäärään (A), eksosomimäärään (B), mikropartikkeleiden proteiinimäärään (C) ja eksosomien proteiinimäärään (D). Inhibiittorin vaikutusta on verrattu kunkin päivän vastaavan aktivaation inhiboimattomaan näytteeseen. Pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, n = 3 ja * = p < 0,05. # = johtuen tavasta esittää vesikkelimäärä prosentuaalisena muutoksena kontrolliin verrattuna tuloksissa voi olla laskennallisesta metodista aiheutuvaa suurta vaihtelua, jolloin tuloksen keskiarvo vääristyy. Näytteitä ei poistettu vertailusta pienen toistojen määrän takia.

Odotetusti trombiini-inhibiittori hepariini laski TC-indusoitujen MV:en määrää noin puoleen inhiboimattomaan näytteeseen verrattuna. Vaikutus ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittävä, kuten hepariini-inhibition vaikutus ei ollut merkittävä muissakaan aktivaatioissa (**kuva 11A ja 11B**). Vaikka hepariini-inhibiittori laski TC-indusoitujen MV:en määrää, ei hepariini-inhibitiolla ollut vaikutusta TC-indusoitujen eksosomien määrään. Hepariini ei vaikuttanut myöskään muissa aktivaatioissa tuotettuun eksosomimäärään sekä MP- tai eksosominäytteiden proteiinimäärään (**kuva**

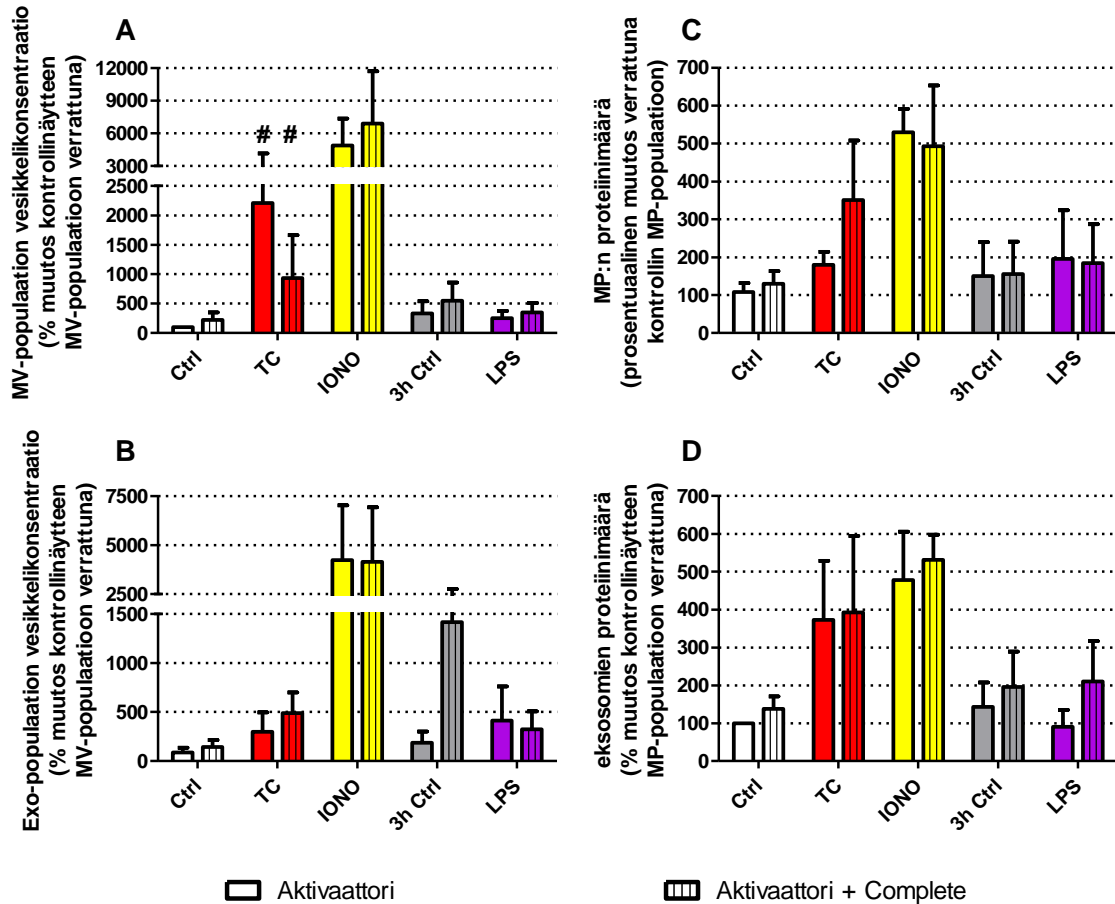
11 B-D). Tulosten samankaltaisuudesta johtuen hirudiini-inhibition vaikutusta MV-määrään tai proteiinimäärään ei esitetä.



Kuva 11: Hepariini-inhibition vaikutus 30 minuutin kontrollialtistuksen (Ctrl), trombiini-kollageeniaktivaation (TC), kalsium-ionoforiaktivaation (IONO), 3h kontrollialtistuksen (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) tuottamaan mikrovesikkelimäärään (A), eksosomimäärään (B), mikropartikkeleiden proteiinimäärään (C) ja eksosomien proteiinimäärään (D). Inhibiittorin vaikutusta on verrattu kunkin päivän vastaavan aktivaation inhiboimattomaan näytteeseen. Pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, n = 3.

Proteinaasi-inhibiittori Complete nosti tuotettujen MV:en määrää TC-indusoitujen MV:tä lukuun ottamatta kaikissa aktivaatioissa, tosin tuotettu MV:n määrä ei ollut missään aktivaatioissa merkittävästi korkeampi inhiboimattomaan näytteeseen verrattuna (kuva 12A). Kuvan 9 tavoin TC-indusoitujen Complete-inhiboimattomien näytteiden korkea MV-määrää selittää tapa ilmoittaa MV-määrä prosentuaalisena muutoksena päivän kontrollialtistuksen tuottamaan MV:n määrään verrattuna.

Complete-inhibitiolla ei ollut vaikutusta tuotettuun eksosomimääriin eri aktivaatioissa (kuva 12B). Complete-inhibitiolla ei myöskään ollut vaikutusta MP-näytteiden proteiinimäärän eikä eksosominäytteiden proteiinimäärään (kuva 12C ja 12D).



Kuva 12: Complete-inhibition vaikutus 30 minuutin kontrollialtistuksen (Ctrl), trombiini-kollageeniaktivaation (TC), kalsium-ionoforiaktivaation (IONO), 3h kontrollialtistuksen (3h Ctrl) ja LPS-aktivaation (LPS) tuottamaan mikrovesikkelimäärään (A), eksosomimäärään (B), mikropartikkeleiden proteiinimäärään (C) ja eksosomien proteiinimäärään (D). Inhibiittorin vaikutusta on verrattu kunkin päivän vastaavan aktivaation inhiboimattomaan näytteeseen. Pylväät esittävät keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, n = 3. # = johtuen tavasta esittää vesikkelimäärä prosentuaalisena muutoksena kontrolliin verrattuna tuloksissa voi olla laskennallisesta metodista aiheutuvaa suurta vaihtelua, jolloin tuloksen keskiarvo vääristyy. Näytteitä ei poistettu vertailusta pienen toistojen määrän takia.

11.3 Tilastolliset mallit

Vesikkelialapopulaatioiden eroja tutkittiin usealla eri menetelmällä, mutta vaikka tuloksissa (esimerkiksi inhibiittoreiden vaikutuksessa) paljastui eroja, tilastollisesti merkittäviä vaikutuksia ei havaittu. Siksi tilastollisen analyysin lisäksi aineistoa selitettiin erilaisilla malleilla, joissa huomioitiin eri yhdistelmiä vesikkeli-, proteiini- ja lipidimäärään vaikuttavia tekijöitä. Malleja vertailtiin toisiinsa AIC-arvojen perusteella, joka on mallin suhteellisen laadun mitta. Verihiutaleiden vesikkelituotannossa oli paljon aktivaatiokohtaista vaihtelua, mikä näkyi myös malleissa: Mallilla, joka otti huomioon yksilöiden välisen vaihtelun lisäksi aktivaatiot, oli pienempi AIC-arvo kuin malleilla, jotka ottivat huomioon vesikkelialapopulaatiot tai käytetyt inhibitiot (**taulukko 3**). Pienempi AIC-arvo osoittaa mallin kuvastavan paremmin aineistoa. Vesikkelikonsentraatiotuloksia parhaiten kuvasti kuitenkin malli, joka otti huomioon yksilöiden välisen vaihtelun, aktivaatiot, inhibitiot, vesikkelialapopulaatiot ja kaikkien tekijöiden interaktiot. Interaktioilla tarkoitetaan sitä, että malli ottaa huomioon esim. inhibitioiden vaikutukset eri aktivaatioissa ja eri vesikkelialapopulaatioissa.

Taulukko 3: Eri tekijöiden vaikutus tilastollisissa malleissa, jotka selittävät verihiutaleiden tuottamaa vesikkelimäärää, n = 199.

Mitä malli ottaa huomioon	AIC-arvo
yksilöiden välisen vaihtelun	1777,29
Mitä malli ottaa huomioon yksilöiden välisen vaihtelun lisäksi	AIC-arvo
vesikkelialapopulaatiot	1769,52
aktivaatiot	1668,56
inhibitiot	1781,20
aktivaatiot ja vesikkelialapopulaatiot	1659,28
aktivaatiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	1607,83
inhibitiot ja vesikkelialapopulaatiot	1750,41
inhibitiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	1731,85
aktivaatiot ja inhibitiot	1657,95
aktivaatiot, inhibitiot ja interaktiot	1609,15
aktivaatiot, inhibitiot ja vesikkelialapopulaatiot	1647,93
aktivaatiot, inhibitiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	1527,79

MV-määrän ohella myös vesikkelinäytteiden proteiinimäärän havaittiin vaihtelevan paljon aktivaatoririippuvaisesti ja mallien vertailun perusteella suurin yksittäinen näytteiden proteiinimäärään vaikuttava tekijä oli käytetyt aktivaatiot (**taulukko 4**). Ainoastaan vesikkelialapopulaatiot tai käytetyt inhibitiot huomioivat mallit eivät

selittäneet aineistoa yhtä hyvin. Myös proteiinimäärien vaihtelua kuvasti parhaiten malli, joka otti huomioon verihyönteiden eri aktivaatiot, inhibitiot sekä vesikkelialapopulaatiot ja tekijöiden interaktiot.

Taulukko 4: Eri tekijöiden vaikutus tilastollisissa malleissa, jotka selittävät vesikkelinäytteiden sisältämää proteiinimäärää, n = 199.

Mitä malli ottaa huomioon	AIC-arvo
yksilöiden välisen vaihtelun	1760,11
Mitä malli ottaa huomioon yksilöiden välisen vaihtelun lisäksi	AIC-arvo
vesikkelialapopulaatiot	1729,91
aktivaatiot	1692,35
inhibitiot	1738,94
aktivaatiot ja vesikkelialapopulaatiot	1651,58
aktivaatiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	1625,93
inhibitiot ja vesikkelialapopulaatiot	1707,60
inhibitiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	1688,46
aktivaatiot ja inhibitiot	1668,63
aktivaatiot, inhibitiot ja interaktiot	1569,43
aktivaatiot, inhibitiot ja vesikkelialapopulaatiot	1625,2
aktivaatiot, inhibitiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	1382,61

Sekä aktivaatioilla että vesikkelialapopulaatiolla oli suuri vaikutus näytteiden lipidimäärään. Myös mallien vertailu paljastaa saman, sillä aktivaatiolla sekä vesikkelialapopulaatiolla on lähes yhtä suuri vaikutus AIC-arvoon verrattuna malliin, joka ottaa huomioon vain yksilöiden välisen vaihtelun (**taulukko 5**). Paras malli saatiin kuitenkin ottamalla huomioon molemmat tekijät ja niiden interaktiot. Vaikka lipidimäärää kuvaavia malleja luotiin enemmän, vesikkelimäärän ja proteiinimäärän huomioiminen ei parantanut tulosta (johtuen mallin monitahoisuuden kasvamisesta pieneen näytemäärään nähden). Sen sijaan proteiinimäärän sekä sen interaktioiden huomiointi eri aktivaatioissa ja vesikkelialapopulaatioissa paransi mallia, mikä havaittiin myös tuloksissa: vesikkelimäärän ja proteiinimäärän välillä havaittiin keskivahvaa positiivista korrelaatiota proteiinimäärien kanssa, mutta korrelaatio ei ollut lineaarista.

Taulukko 5: Eri tekijöiden vaikutus tilastollisissa malleissa, jotka selittävät vesikkelinäytteiden sisältämää lipidimäärää, n = 35.

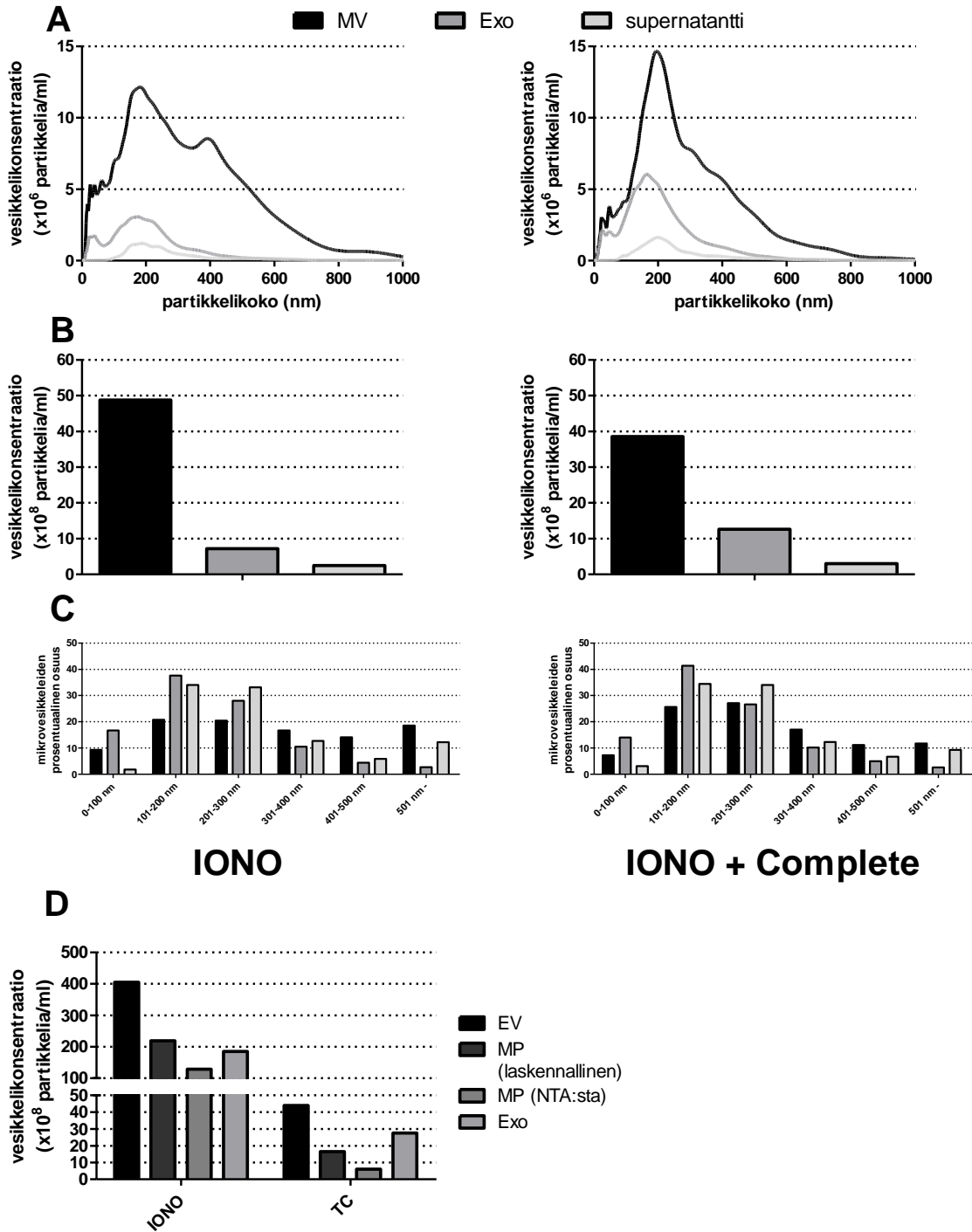
Mitä malli ottaa huomioon	AIC-arvo
yksilöiden välisen vaihtelun	620,40
Mitä malli ottaa huomioon yksilöiden välisen vaihtelun lisäksi	AIC-arvo
vesikkelialapopulaatiot	605,94
aktivaatiot	603,37
aktivaatiot ja vesikkelialapopulaatiot	589,02
aktivaatiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot	568,80
Malli ottaa huomioon aktivaatioiden, vesikkelipopulaation ja niiden interaktioiden lisäksi	AIC-arvo
vesikkelikonsentraation	572,70
vesikkelikonsentraation ja interaktiot	571,46
proteiinimäärän	571,50
proteiinimäärän ja interaktion	553,11
vesikkelikonsentraation ja proteiinimäärän	574,76
vesikkelikonsentraation, proteiinimäärän ja kaikki interaktiot	578,93

11.4 Käytetyt menetelmät

11.4.1 Jaottelusentrifugointi vesikkelipopulaatioiden eristyksessä

MP:en eristykseen käytettiin $20\,000 \times g$:ssä tehtävää 40 minuuttia kestäväää sentrifugointia, joka eristi tehokkaasti halkaisijaltaan yli 600 nm olevat vesikkelit (**kuva 13A**). Eksosomien eristykseen käytetyn ($100\,000 \times g$, 1 h) sentrifugoinnin jälkeen näytteen supernatanttiin jäi vielä noin 25 % eksosomipopulaatiosta (**kuva 13B**) joista noin 70 % oli kokoluokkaa 101 - 300 nm (**kuva 13C**). Eksosomien teoreettinen ja aiemmin raportoitu koko on noin 30 - 130 nm (Sokolova ym. 2011), kuitenkin MP:en eristämisen jälkeisen eksosomit sisältävän supernatantin partikkeleista noin 45 % oli halkaisijaltaan yli 200 nm ja eri mittauksissa NTA:lla havaittiin halkaisijaltaan jopa yli 500 nm olevia vesikkeleitä (**kuva 13C**). Halkaisijaltaan yli 500 nm olevien partikkeleiden osuus oli kuitenkin yli 10 % molemmissa tutkituissa supernatanteissa.

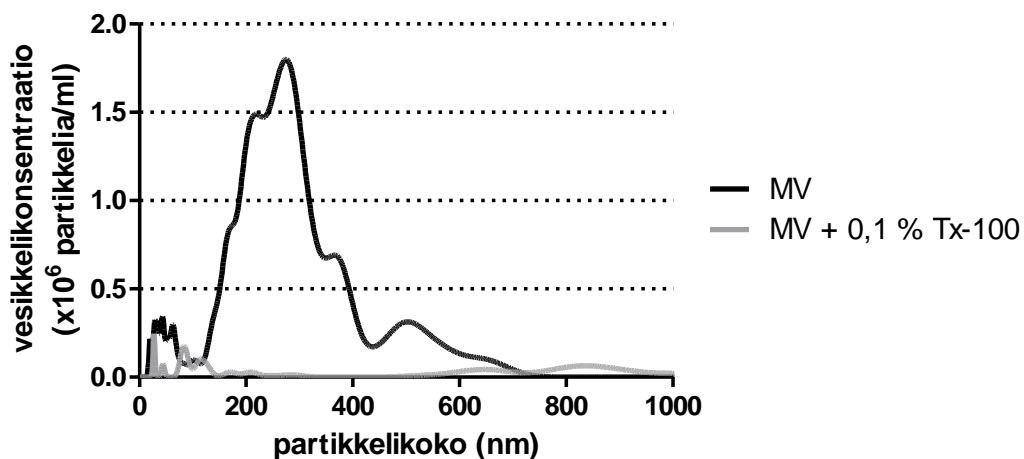
Koska MP:en määrä saatiin laskennallisesti vähentämällä mitattu eksosomien määrä mitatusta MV:en määrästä, selvitettiin myös, miten laskennallinen MP:n määrä eroaa mitatusta MP:en määrästä. Kävi ilmi, että eri aktivaatioissa mitattu MP-määrä oli pienempi kuin laskennallinen MP-määrä (**Kuva 13D**), mikä osoitti ylimääräisen käsittelyn aiheuttavan hävikkiä MP-näytteessä.



Kuva 13: Jaottelusentrifugoinnin vaikutus vesikkelinäytteen kokojakaumaan sekä konsentraatioon. IONO-indusoitujen (vasemmalla) sekä IONO-indusoitujen ja Complete-inhiboitujen (oikealla) vesikkeleiden konsentraation (A ja B) sekä koon (C) muutos, kun näytteestä eristetään mikropartikkelit ja eksosomit jaottelusentrifugoinnin avulla. Supernatantilla tarkoitetaan liuosta, josta on eristetty sekä mikropartikkelit että eksosomit. Lisäksi IONO- ja TC-indusoitujen mikropartikkeleiden laskennallisen ja NTA:lla mitatun konsentraation ero (D). MV = mikrovesikkelipopulaatio, MP = mikropartikkelipopulaatio Exo = eksosomipopulaatio. Yhdestä näytteestä tehty kolme mittausta.

11.4.2 Vesikkelikonsentraation määrittäminen NTA:lla

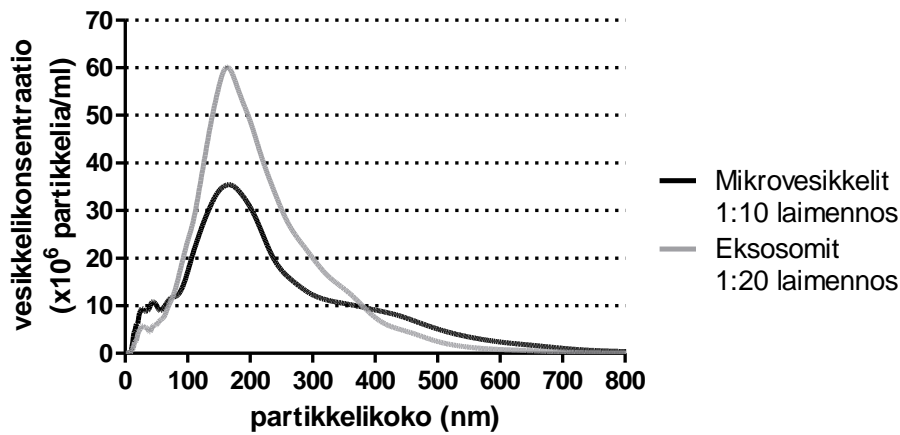
Epäpuhtaudet vaikuttavat NTA-tuloksiin nostamalla partikkelipitoisuutta ja vääristämällä näytteen kokojakaamaa, sillä menetelmä mittaa ainoastaan näytekurissa olevan partikkelin liikkuman matkan, mistä tunnetuissa olosuhteissa laskennallisesti määritetään partikkelin hydrodynaaminen halkaisija. Koska NTA on verrattain uusi menetelmä ja tutkimuksen yhteydessä havaittiin koejärjestelyn vaikuttavan tuloksiin, NTA:n menetelmällisiä parametrejä haluttiin tutkia tarkemmin. NTA-mittauksen vesikkelipopulaation puhtaus varmistettiin mittaamalla MV-näyte, joka käsiteltiin NTA-mittauksen jälkeen PBS:n liuotetulla 0,1 % Triton X-100:lla vesikkeleiden hajottamiseksi (**kuva 14**). Detergenttikäsittelyn jälkeen näytteen tapahtumien määrä putosi alle 10 %:iin alkuperäisestä, mikä osoitti, että verihitaleaktivaation jälkeisestä supernatantista pääosa NTA:lla havaituista tapahtumista oli peräisin vesikkeleistä.



Kuva 14: Detergenttikäsittelyn vaikutus näytteen vesikkelimäärään NTA-mittauksessa. IONO-indusoitujen mikroversikkeleiden konsentraation ja kokojakauman muutos, kun näyte käsitellään 0,1 % Triton X-100:lla. MV = mikroversikkelipopulaatio.

Vesikkelikonsentraatiota mitattaessa NTA:lla havaittiin, että näytteen laimennoksella oli suuri merkitys näytteen konsentraatioon (**kuva 15**). Näytteestä mitattiin koko MV-populaation konsentraatio (1:10 laimennettu näyte), minkä jälkeen siitä poistettiin MP:t. Eksosomit laimennettiin 1:20 ja mitattiin. NTA:n havaitsemien tapahtumien perusteella eksosomien konsentraatio oli noin 30 % korkeampi kuin saman näytteen MV-populaation konsentraatio. Tutkimuksen aikana ilmiötä ehkäistiin laimentamalla MV-

näytteet NTA:ta varten siten, että kaikkien näytteiden pitoisuus oli samankaltainen, noin 10 – 30 partikkelia/ruutu.

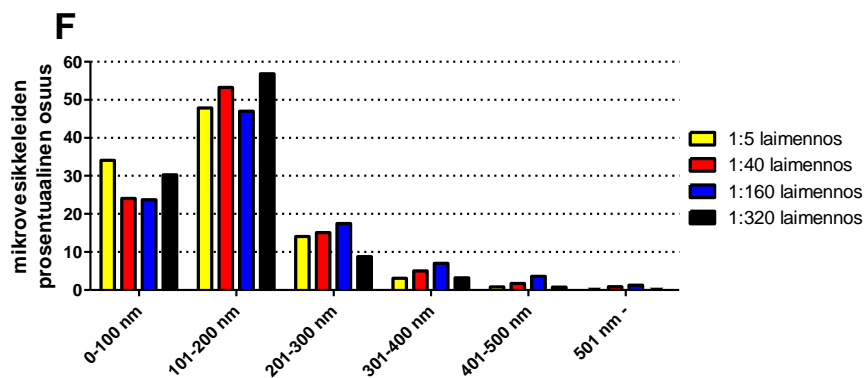
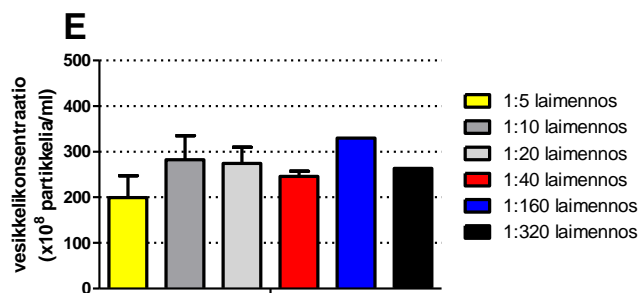
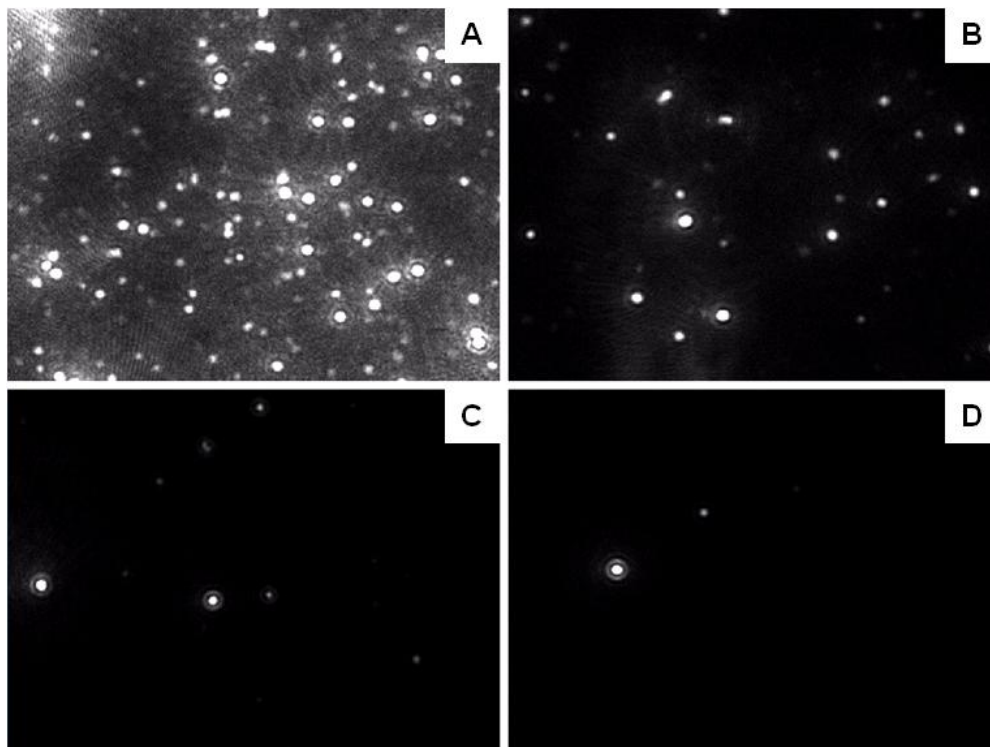


Kuva 15: Laimennoksen vaikutus vesikkelikonsentraatioon NTA-mittauksessa. IONO-indusoitujen vesikkeleiden konsentraation ja kokojakauman muutos, kun näytteestä eristetään mikropartikkelit ja jäljelle jäävä eksosomiopulaatio laimennetaan laimeammaksi koko mikrovesikkelinäytteeseen verrattuna.

Yksi NTA:n tunnettu ongelma on ns. naamiointi-ilmiö (masking effect), jossa liian konsentroituneen näytteen voimakkaasti valoa siroavat partikkelit peittävät NTA:ssa omalla heijastuksellaan osan näytteen sisältämistä partikkeleista, jolloin näytteen kaikkia partikkeleita ei kvantifoida. NTA:n naamiointi-ilmiötä tutkittiin koejärjestelyllä, jossa erittäin konsentroituneesta MV-näytteestä tehtiin laimennoksia, joiden konsentraatio ja kokojakauma mitattiin NTA:lla. NTA:lla pystyttiin määrittämään kaikkien koejärjestelyyn (**kuva 16A-D**) valmistettujen näytteiden konsentraatio. Tutkimuksessa valmistettujen näytteiden konsentraatioissa oli vaihtelua ja siksi näytteet laimennettiin NTA:ta varten siten, että niiden partikkelimäärä oli samalla tasolla. Tutkittavien NTA-näytteiden laimennos vastasi kuvaa 16B tai 16C.

Konsentroituneiden näytteiden vesikkelipitoisuus osoittautui laskennallisesti matalammaksi kuin laimennettujen näytteiden vesikkelipitoisuus (**kuva 16E**). Vesikkelikonsentraatio 1:40 laimennetussa näytteessä oli noin 25 % korkeampi verrattuna 1:5 laimennettuun näytteeseen, kuten oli 1:160 laimennetun näytteen vesikkelikonsentraatio verrattuna 1:40 laimennettuun näytteeseen. Kaikista laimennetuimmalla näytteen konsentraatio kuitenkin laski noin 25 % 1:160 laimennettuun näytteeseen verrattuna. Halkaisijaltaan yli 200 nm olevien partikkeleiden

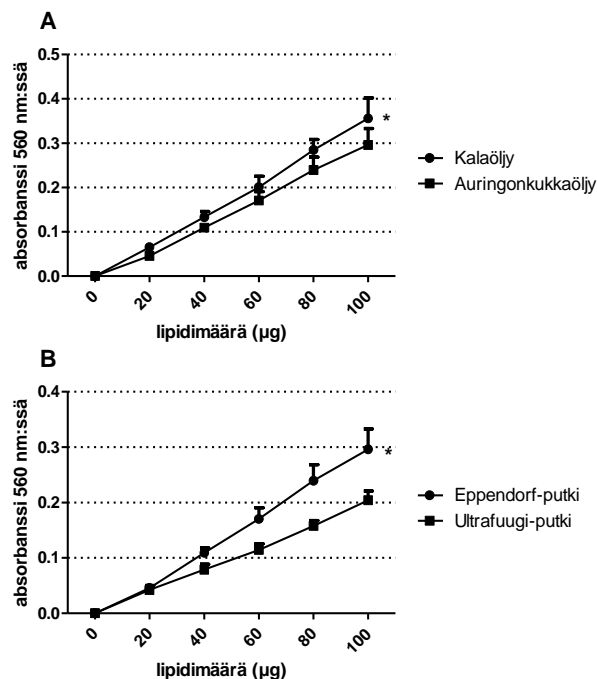
osuus nousi joka kokoluokassa n. 2 % verrattaessa 1:5 laimennettua näytettä 1:40 laimennettuun näytteeseen ja 1:40 laimennettua näytettä verrattaessa 1:160 laimennettuun näytteeseen (**kuva 16F**), minkä perusteella naamiointi-ilmiötä ei havaittu. Laimeimmassa näytteessä halkaisijaltaan alle 100 nm ja 100 – 200 nm olevien partikkeleiden osuus oli korostunut muihin näytteisiin verrattuna, mutta kyseiset kokoluokat olivat prosentuaalisesti suurimmat myös muissa laimennoksissa. On siis todennäköistä, että laimeassa näytteessä oli enemmän kyseisten kokoluokkien partikkeleita ja partikkelimäärän ollessa pieni kokoluokan prosentuaalinen osuus nousi huomattavan korkeaksi.



Kuva 16: Kuvakaappaus 1:5 (A), 1:40 (B), 1:160 (C) ja 1:320 (D) laimennetusta vesikkelinäytteestä NTA:ssa. Pisteet ovat tutkittavien partikkeleiden siroamaa valoa, joka aiheutuu suunnattaessa lasersäde vesikkelinäytteeseen mittauksen aikana. Lisäksi esitetty laimennosten vaikutus mitattuun vesikkelikonsentraatioon (E) ja vesikkeleiden prosentuaaliseen kokojakaumaan (F). Yhdestä näytteestä tehty kolme mittausta.

11.4.3 Totaalilipidimääritys SPV-menetelmällä

Menetelmän kokeellisuuden vuoksi tutkimuksessa vertailtiin eri muuttujien kuten eri öljyjen sekä käytetyn putkimateriaalin vaikutusta näytteen absorbanssiin. Kalaöljynäytteiden tuottama absorbanssi 560 nm:ssä oli merkittävästi korkeampi ($p = 0,0176$) auringonkukkaöljynäytteisiin verrattuna, vaikka lipidiä oli määrällisesti saman verran (**kuva 17A**). Myös putkimateriaali vaikutti näytteiden absorbanssiin, sillä auringonkukkaöljyllä tehdyillä standardinäytteillä oli merkittävä ero näytteiden absorbanssissa ($p = 0,0398$, **kuva 17B**). Putkimateriaalin vaikutus näytteiden absorbanssiin huomioitiin tekemällä eppendorf-putkissa oleville MP-näytteille oma standardisuora sekä ultrafuugi-putkissa oleville eksosominäytteille oma standardisuoransa vastaavaan putkimateriaaliin. Vesikkelinäytteiden lipidimäärä saatiin vertaamalla absorbanssia auringonkukkaöljyllä tehtyyn standardisuoraan, koska auringonkukkaöljyä oli saatavilla ensimmäisestä koejärjestelystä lähtien. SPV-lipidimääritysmenetelmä havaittiin luotettavaksi menetelmäksi, sillä mittausten välinen vaihtelu absorbanssissa auringonkukkanäytteiden auringonkukkaöljyllä tehdyissä standardinäytteissä oli keskimäärin alle 18 %.

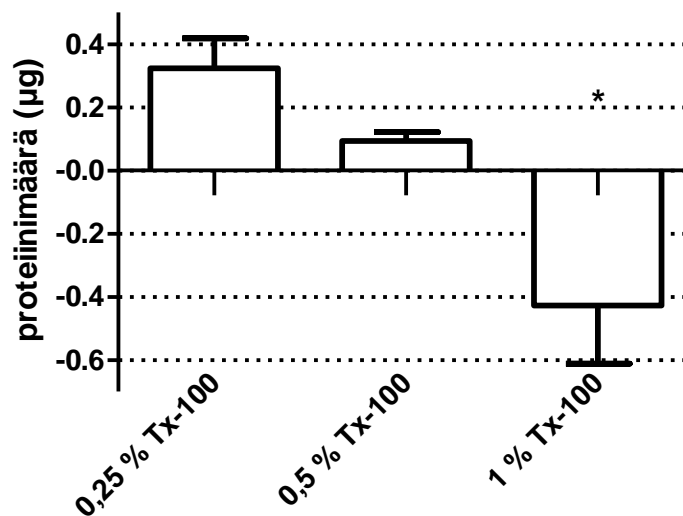


Kuva 17: Lipidimäärityksessä käytettyjen kalaöljy- ja auringonkukkaöljystandardinäytteiden absorbanssien ero 560 nm:ssä (A) sekä auringonkukkaöljynäytteillä tehty vertailu putkimateriaalin vaikutuksesta absorbanssiin 560 nm:ssä (B). Pisteet kuvaavat keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, $n = 4$ (kalaöljystandardi), $n = 5$ (aurionkukkaöljystandardi). * = $p < 0,05$.

11.4.4 Detergentin pitoisuuden vaikutus proteiinimäärään näytteiden proteiinipitoisuuden määrittämisessä

Tutkimuksessa määritettiin käytetyn detergentin optimaalinen pitoisuus vertailemalla saman näytteen proteiinipitoisuutta eri detergenttikäsittelyjen jälkeen. Kun TritonX-100-pitoisuutta nostettiin, tuotti detergentti enemmän taustaa mittaukseen ja proteiinimäärältään matala näyte sai laskennallisesti jopa negatiivisen proteiinimäärän väkevimmällä detergenttikäsittelyllä (kuva 18). Ero laimeimmalla detergenttikäsittelyllä valmistettuun näytteeseen oli tilastollisesti merkittävä ($p = 0,0149$).

Proteiinimääritykseen käytetty menetelmä havaittiin luotettavaksi menetelmäksi, sillä mittausten välinen vaihtelu standardinäytteiden absorbanssissa oli keskimäärin alle 29 %, mikäli proteiinimäärältään pienintä standardinäytettä ei huomioida. Mikäli kaikki standardinäytteet huomioidaan, mittaustenvälistä vaihtelua standardinäytteiden absorbanssissa oli keskimäärin 35 %.



Kuva 18: Proteiinimäärityksessä käytettyjen detergenttien pitoisuuksien vaikutus näytteen mitattuun proteiinimäärään. Pylväät kuvaavat keskiarvoja ja palkit keskiarvon keskivirhettä, $n = 3$. * = $p < 0,05$.

12 Tulosten pohdinta

12.1 Aktivaatioiden vaikutus verihiutaleiden tuottamiin mikrovesikkeleihin

Kaikista eristetyistä MV:stä noin 80 % oli halkaisijaltaan alle 300 nm, mikä mukailee laboratoriossa aiemmin saatuja arvoja (Aatonen ym. 2014) sekä kirjallisuudessa uudemmissa mittaustekniikoilla kuten atomivoima- ja elektronimikroskopiolla saatuja vertailuarvoja (Yuana ym. 2013b). Kuitenkin myös jaottelusentrifugoinnin jälkeisestä eksosomipopulaatiosta noin 70 % oli kokoluokkaa 101 – 300 nm vertailuarvojen ollessa noin 30 – 120 nm (Sokolova ym. 2011), mikä osoitti käytetyn jaottelusentrifugointiohjelman puutteellisuuden MV-alapopulaatioiden luotettavassa eristämisessä.

Verihiutaleiden patofysiologista tilaa jäljittelevät TC- ja LPS-aktivaatiot erosivat toisistaan sekä kontrolleistaan tuotetun MV-määrän sekä vesikkelikohtaisen proteiini- ja lipidimäärän osalta, mikä osoitti verihiutaleiden kyvyn muuttaa tuotettujen MV:en sisältöä aktivaatoriippuvaisesti. Myös aiemmin on osoitettu, että eri aktivaation indusoiduissa verihiutaleperäisissä vesikkeleissä on vaihtelua lipidikoostumuksessa (Biro ym. 2005), minkä lisäksi MV:en proteomissa on vaihtelua (Dean ym. 2009). Havaintoa korosti LPS-indusoidut MV:t, sillä vaikka LPS-indusoitujen MV:en määrä oli kontrolliaan pienempi, poikkesivat erityisesti LPS-indusoidut eksosomit vesikkelikohtaiselta proteiini- ja lipidimäärältään kontrollista sekä TC-indusoiduista eksosomeista. LPS-aktivaation vaikutus verihiutaleiden tuottamien MV:en proteomiin on havaittu aiemminkin (Soop ym. 2013; Aatonen ym. 2014), joten on ymmärrettävää, että laadullisten muutosten ohella myös MV:en proteiinimäärässä on muutoksia.

Koska IONO-indusoidut MV:t poikkesivat niin lipidi- kuin proteiinimäärältään patofysiologisten aktivaatioiden ja ajan funktiona muodostuneista vesikkeleistä, voidaan tulosten perusteella todeta, ettei kalsium-ionofori-aktivaatio kuvasta realistisesti positiivista vesikulaation mallia. IONO-indusoitujen vesikkelinäytteiden matalaa proteiini- ja lipidimäärää voi selittää verihiutaleiden äärimmäisen nopeasta solunsisäisen kalsiumpitoisuuden noususta johtuva solurakenteen destabiloituminen ja hajoaminen (Carson ym. 1994; Hess ja Siljander 2001), mikä näkyy NTA:ssa vesikkelinomaisina partikkeleina. Matala proteiini- ja lipidimäärä kuvastanee hajonneen

solukalvon todellista proteiini- ja lipidimäärää, sillä todistettavasti vesikkeleiden proteiinimäärä (Dean ym. 2009) ja lipidimäärä (Pienimaeki-Roemer ym. 2013) on lisääntynyt tavalliseen solukalvoon verrattuna.

Vaikka verihiutaleiden ionoforiaktivaatio voidaan mieltää myös apoptoottiseksi malliksi (Henriksson ym. 2007), tuotetut vesikkelit eivät kuitenkaan vastaa suoraan apoptoottisia kappaleita, sillä ionofori-indusoidut vesikkelit ovat huomattavan paljon pienempiä kirjallisuuden mukaisten apoptoottisten kappaleiden kokoon verrattuna (van der Pol ym. 2012). Vaikka vesikkelinäytteestä eristetään suuremmat solujäämät aktivaatioiden jälkeen (**kuva 4**), mikä selittäisi suurten apoptoottisten kappaleiden puuttumisen, on IONO-indusoitujen MV:en kokojakauma hyvin samanlainen kuin muiden aktivaatioiden tuottama MV-populaatio. Mikäli ionoforiaktivaatiota seuraisi verihiutaleiden apoptoosi, voisi olettaa, että MV-näytteessä halkaisijaltaan yli 500 nm olevien MV:en osuus olisi kasvanut. Sen sijaan havaittiin halkaisijaltaan alle 100 nm olevien partikkeleiden prosentuaalisen osuuden kasvaminen, mikä on havaittu myös aiemmin laboratoriossa (Aatonen ym. 2014). Koska eksosomien muodostumisen monivesikkelisten kappaleiden välityksellä on arvioitu kestävän prosessina noin kolme tuntia (Pan ym. 1985), on vaikea uskoa, että ionofori-aktivaatio nostaisi merkittävästi eksosomien määrää puoli tuntia kestäneen aktivaation seurauksena. Havainto pienistä vesikkelinomaisista kappaleista voisi selittyä eksosomien muodostumisella suoraan solukalvosta, mutta koska ilmiötä ei ole havaittu verihiutaleilla (Lenassi ym. 2010), verihiutaleen solurakenteen destabiloitumisesta johtuva hajoaminen selittäisi sekä pienet vesikkelinomaiset partikkelit että niiden matalan vesikkelikohtaisen lipidi- ja proteiinimäärän.

Koska verihiutaleiden tiedetään erittävän MV:tä ilman aktivaatiota esimerkiksi veripankkien säilytysolosuhteissa (Cauwenberghs ym. 2006), verihiutaleiden MV:en peruseritystä tutkittiin vertailemalla kahden eri aikapisteen tuotettuja MV:tä. Vaikka aikapistet määräytyivät muiden aktivaatioiden mukaan ja ajan funktiona muodostuvia vesikkeleitä ei tutkittu omana koejärjestelynä useilla eri aikapisteillä, havaittiin ajan funktiona tuotetuissa MV-määrissä odotettu ero. Lisäksi kontrollialtistukset tukivat ajatusta aktivaatioiden vaikutuksesta tuotettujen MV:en koostumukseen, sillä kontrollialtistusten tuottamien eksosomien lipidi- ja proteiinimäärät olivat samankaltaiset.

Verihiutaleiden trombogeenistä aktivaatiota, joka mallintaa esimerkiksi veritulppien muodostusta, pidetään verihiutaleiden voimakkaimpana fysiologisena aktivaationa. TC-aktivaation on osoitettu olevan mekanismiltaan nopea aktivaatio, jossa valtaosa verihiutaleista on aktivoitunut jo 15 minuutissa (Gyulkhandanyan ym. 2013). Verihiutaleita kuitenkin aktivoitiin puoli tuntia verihiutaleiden aktivaation varmistamiseksi ja vesikkelimäärän maksimoimiseksi. Koska TC-indusoitujen MV:en määrä ei eronnut kontrollista, tulisi tulevissa koejärjestelyissä kokeilla aktivaatioajan pidentämistä esimerkiksi tuntiin ja tutkia, voiko MV:en muodostumista tehostaa pidennetyllä aktivaatioajalla. Samasta syystä myös aktivaattoreiden konsentraation vaikutusta tulisi tutkia. Koska inhibitiokokeissa estettiin trombiini-inhibiittoreilla trombiiniin verihiutaleita aktivoiva vaikutus, verihiutaleita käytännössä aktivoi ainoastaan kollageeni. Tulevaisuudessa pitäisikin varmistaa, vastaako kollageeni-indusoitujen MV:en määrä trombiini-inhiboitua trombiini-kollageeni-indusoitujen MV:en määrää.

Verihiutaleiden LPS-aktivaatiolla jäljiteltiin verihiutaleiden vastetta tulehdustilaan. Tutkimuksessa ei onnistuttu suuremmista aktivaattoripitoisuuksista huolimatta toistamaan aiemmin havaittua LPS-aktivaation vaikutusta verihiutaleiden tuottamaan vesikkelimäärään (Brown ja McIntyre 2011). Verihiutaleiden vaste LPS-aktivaation on mekanismiltaan hidas verrattuna TC-aktivaatioon, sillä verihiutaleita täytyy inkuboida vähintään kolme tuntia vesikulaation eron havaitsemiseksi, mutta inkubaatioajan pidentyessä LPS-indusoitujen vesikkeleiden määrä kuitenkin kasvaa huomattavasti korkeammaksi kontrollialtistukseen verrattuna (Brown ja McIntyre 2011). LPS-indusoidun vesikulaation tehostamiseksi aktivaatioaikaa tulisi pidentää esimerkiksi neljään tai viiteen tuntiin. Suurempi aktivaatioajan kasvattaminen on teknisesti haastavaa, sillä vesikkelinäytteet pitää mitata NTA:lla niiden ollessa tuoreita ja MV-alapopulaatiot pitää eristää muita tutkimuksia varten, mikä yhdistettynä verihiutaleiden eristämiseen sekä kuusi tuntia tai pidempään kestävään aktivaatioon olisi mahdotonta toteuttaa. Myös yön yli kestävä inkubaatio on ongelmallinen, sillä laboratoriossa saatujen alustavien tulosten mukaan kahdeksan tuntia kestävässä inkubaatiossa verihiutaleet vaikuttavat ajautuvan apoptoosiin jolloin aktivaation vaikutusta vesikulaatioon on vaikea määrittää. Toinen vaihtoehto on tehostaa vesikulaatiota muuttamalla aktivaattoreiden konsentraatiota, mutta tutkimuksessa käytetyt

aktivaattoreiden konsentraatiot ovat jo korkeampia mitä kirjallisuudessa (Brown ja McIntyre 2011) on käytetty.

Vaikka LPS-indusoitujen MV:en määrä ei eronnut kontrollista, oli LPS-indusoitujen MV:en koostumus poikkeava. Koska LPS-indusoitujen eksosomien vesikkelikohtainen proteiini- ja lipidimäärä oli lisääntynyt kontrolliin verrattuna, tulisi esimerkiksi verihitaleiden kahden tunnin LPS-aktivaatiolla tarkistaa, onko LPS-indusoitujen eksosomien vesikkelikohtainen proteiini- ja lipidimäärä yhä korkeampi kuin esimerkiksi TC-indusoiduissa eksosomeissa. Mikäli eksosomit sisältäisivät vähemmän lipidiä ja proteiinia, todistaisi se, että kolmen tunnin LPS-aktivaatiossa muodostuvien eksosomien määrään ja koostumukseen vaikuttaa LPS-aktivaatio, sillä eksosomien muodostumisen monivesikkelisen kappaleen kautta oletetaan kestävän kolme tuntia (Pan ym. 1985).

Sen lisäksi, että MV:ssä oli aktivaatiokohtaista vaihtelua koostumuksessa, havaittiin MV-alapopulaatioiden välillä eroja. Vaikka MV-alapopulaatioita ei voitu eristää puhtaasti toisistaan, sisälsivät eristetyt eksosomit enemmän lipidiä MP:hin nähden, mikä voisi mahdollisesti selittää MP:en sekä eksosomien pieniä tiheyseroja (van der Pol ym. 2012).

Verrattaessa eri aktivaatioiden aiheuttamien MV-alapopulaatioiden muutoksia vesikkelikohtaisessa proteiini- ja lipidimäärässä, havaittiin, että kuvaajat vastaavat toisiaan huomattavan paljon. Koska aktivaatioista aiheutuvat muutokset ovat yhdenmukaisia proteiini- ja lipidimäärissä sekä vesikkelialapopulaatioiden välillä, nousee tuloksista esiin ajatus parannuksesta kvantifikaatiometodiin, jossa vesikkelialapopulaatiolle, aktivaatioille tai jopa solulinjalle voitaisiin laskea korjauskerroin lipidi- tai proteiinimäärän suhteen, jotta vesikkelimäärä voitaisiin määrittää laskennallisesti tarkemmin. MV:tä kvantifioidaan yleisesti proteiinimäärän avulla (Jang ym. 2013) menetelmän edullisuuden ja vaivattomuuden takia, joten huomioimalla solu-, aktivaatio- tai MV-alapopulaatiokohtainen korjauskerroin vesikkeleitä voitaisiin kvantifioida tarkemmin, sillä tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella vesikkeleissä on huomattavaa aktivaatiokohtaista vaihtelua proteiini- ja lipidimäärissä. Varsinkin tasaisesti MV:tä tuottavalle syöpäsolulinjalle luotettavan korjauskertoimen määrittäminen olisi helpompaa kuin verihitaleperäisille MV:lle, sillä verihitaleiden vesikulaatiossa on aktivaatiokohtaisen vaihtelun lisäksi suurta

yksilötason vaihtelua. Tutkimuksen puitteissa tehtyjen toistojen määrän perusteella tällaisen korjauskertoimen luotettava määrittäminen ei kuitenkaan ole mahdollista.

12.2 Trombiini- ja proteinaasi-inhibiittoreiden vaikutus vesikulaatioon sekä vesikkeleiden proteiinimäärään

Käytetyistä inhibiittoreista PPACK-inhibitiolla oli selvimmin havaittava vaikutus sekä vesikkelimääriin että vesikkelinäytteiden proteiinimääriin. Verihiutaleiden aktivaatiota estettiin neljällä eri inhibiittorilla: antikoagulanttinakin käytetyllä PPACK:illa on antitrombiininen vaikutus (Andre ym. 2003), minkä lisäksi PPACK on serini-proteinaasi-inhibiittori (Belenky ym. 2004). Verihiutaleita inhiboitiin myös yleisesti antikoagulantteina käytetyillä hepariinilla sekä hirudiinilla. Hirudiini ovat ns. suora antikoagulantti, joka reagoi trombiinin kanssa estäen spesifisti ja tehokkaasti trombiinin toiminnan (Hirsh 2003; Lindhout ym. 1990; Stone ja Hofsteenge 1986). Hepariini vaikuttaa useaan tapahtumaan hyytymisprosessissa antitrombiini III:n välityksellä, eli hepariini on ns. epäsuora antikoagulantti. Tämän lisäksi hepariini edistää glyseridien muodostusta vapauttamalla lipoproteiinilipaasia (Hirsh 1991). PPACK:n proteinaasi-inhibitorisen vaikutuksen kontrollina käytettiin kaupallista Complete-inhibiittoria, joka on seos useita eri proteinaasi-inhibiittoreita ja jonka tarkkaa sisältöä ei tiedetä. Koska tutkimuksen puitteissa pystyttiin tekemään vain kolme biologista toistoa inhibitiokokeista, yhdistettiin laboratoriossa aiemmin saatujen inhibitiokokeiden havaintoja tutkimuksessa saatuihin tuloksiin. Tuloksia ei analysoitu yhdessä laitepäivityksistä johtuen.

Vesikulaatiota ei pystytty estämään trombiini-inhibiittori hirudiinilla ja hepariinilla eri aktivaatioissa lukuun ottamatta TC-indusoitujen MV:en sekä eksosomien määrää, joita hirudiini sekä hepariini laskivat. Tutkimusten tulokset yhdessä laboratoriossa aiemmin tehtyjen kokeiden perusteella viittaavat PPACK-inhibition vaikutuksen olevan proteinaasi-inhibiittori-välitteinen, sillä Complete-inhibitiot aiheuttivat kaikissa aktivaatioissa usein halkaisijaltaan yli 300 nm olevien MV:en osuuden pienenemisen, jolloin halkaisijaltaan 101-200 nm olevien MV:en prosentuaalinen osuus oli kasvanut (**kuva 13A**). Koska Complete-inhibitio vaikuttaisi estävän erityisesti MP:en tuottoa, tulisi inhibitiokokeita jatkaa havainnon varmistamiseksi ja tulevaisuudessa tulisi myös tutkia, vaikuttaako Complete-inhibitio vastaavalla tavalla muiden solujen vesikulaatioon. Vesikulaation proteinaasi-inhibitorinen vaikutus voi perustua

verihiutaleen pinnalla olevien reseptoreiden pilkkomisen estämiseen. Reseptoreiden pilkkominen aloittaa monissa tapauksissa reaktioketjun, jonka päätteeksi solunsisäinen kalsiumpitoisuus nousee (Fabre ja Gurney 2010). Complete-inhibiittorin tarkkaa koostumusta ei kuitenkaan tiedetä, joten jatkotutkimuksissa tulisi selvittää, mikä proteinaasi-inhibiittori mahdollisesti on vesikulaation inhihoimisen vaikuttava tekijä.

Vaikka käytetyillä inhibiittoreilla ei ollut systemaattista tilastollisesti merkittävää vaikutusta tuotettuun vesikkelimäärään tai vesikkelinäytteiden proteiinimäärään, laadittuja tilastollisia malleja vertailemalla havaittiin, että inhibiittoreiden vaikutus tulisi huomioida selitettäessä verihiutaleiden tuottamia MV-määriä sekä MV:en sisältämiä proteiinimääriä (**taulukot 3 ja 4**).

Tilastollisesti merkittävien tulosten puuttumista selittää pieni toistojen määrä, minkä lisäksi verihiutaleilla voi olla yksilötason vaihtelua vasteessa inhibiittoreihin. Tätä ajatusta tukee tutkimuksen aiempi havainto yksilötason vaihtelusta vasteessa käytettyihin aktivaattoreihin. Jotta solujen vastetta inhibiittoriin voidaan tutkia ilman suurta yksilötason vaihtelua, tulisi inhibiittoreiden vaikutusta vesikulaatioon tutkia verihiutaleita vastaavalla solulinjalla. Suoranaista verihiutalesolulinjaa ei ole kaupallisesti saatavilla, mutta leukemiasolulinja kuten K562, jonka solut voivat erilaistua punasolun kaltaisiksi soluiksi (Andersson ym. 1979), voisi toimia verihiutaleen mallina. Inhibiittoreiden vaikutusta verihiutaleiden vesikulaatioon voisi myös tehostaa esi-inkuboimalla verihiutaleita inhibiittoreiden kanssa esimerkiksi 15 minuuttia ennen verihiutaleiden aktivaattoreiden lisäämistä, sillä lisättäessä verihiutalesuspensio yhtäaikaisesti aktivaattoreiden ja inhibiittoreiden päälle, osa verihiutaleista aktivoituu ilman että inhibiittori vaikuttaa niihin, jolloin verihiutaleet voivat tuottaa MV:tä.

12.3 Käytettyjen menetelmien pohdinta

12.3.1 Vesikkelialapopulaatioiden eristäminen jaottelusentrifugoinnin avulla

Tutkimuksessa osoitettiin, että käytetyt sentrifugointiohjelmat eivät eristäneet puhtaasti MP- eivätkä eksosomipopulaatioita. Saatujen eri vesikkelialapopulaatioiden kokojakaumista voidaan päätellä, että jaottelusentrifugointi ei eristänyt järjestelmällisesti tietyn kokoisia vesikkeleitä, mikä olisi näkynyt kokojakaumissa vesikkelikokoluokkien prosentuaalisten osuuksien muutoksina, vaan pikemminkin kaiken kokoisia vesikkeleitä eristyi tasaisesti näytteestä. Ilmiö on tunnustettu myös muissakin tutkimuksissa ja erityisesti ns. ”fixed angle” –sentrifugoinnissa oletetaan, että jopa pienimmät vesikkelit eristyisivät tahattomasti sentrifugoidessa, koska vesikkeleillä on lyhyempi matka putken seinämään kuin ”swing out” –roottorityyppiä käyttäessä (Cvjetkovic ym. 2014). Varsinkin puutteellinen MP:en eristäminen aiheutti sen, että jäljelle jääneessä eksosomipopulaatiossa oli yhä jopa halkaisijaltaan 400 nm olevia vesikkeleitä (**kuvat 9B ja 13C**), kun kirjallisuudessa todetaan, että eksosomit ovat halkaisijaltaan korkeintaan noin 100 nm (Sokolova ym. 2011). Eksosomien eristämiseen käytetty sentrifugointiohjelma jätti myös noin 25 % eksosomipopulaatiosta näytteeseen ja eksosomien eristämisen jälkeisestä supernatantista havaittiin vielä NTA:lla halkaisijaltaan jopa 400 nm olevia partikkeleita. NTA:lla ei kuitenkaan pystytty osoittamaan, olivatko nämä partikkelit useamman vesikkelin muodostamia aggregaatteja, vai yksittäisiä halkaisijaltaan n. 400 nm olevia vesikkeleitä. Vaikka vesikkeleiden fuusioituminen sentrifugoinnin seurauksena on osoitettu olevan mahdollista (Gyorgy ym. 2011a), on kuitenkin epätodennäköistä, että kaikki näytteen vesikkelit olisivat aggregoituneet ja muodostaneet halkaisijaltaan suurempia partikkeleita, koska supernatantista havaittiin myös vesikkeleitä, joiden halkaisija oli alle 100 nm. Havainnon perusteella supernatantin suuret vesikkelit ovat todennäköisemmin vesikkeleitä, jotka eivät ole eristyneet puutteellisen eristämishjelman seurauksena.

Näytteen liiallinen sentrifugointi voi aiheuttaa kontaminanttien – kuten proteiiniaggregaattien ja lipoproteiinien – eristymisen vesikkeleiden mukana, mutta toisaalta liian kevyt sentrifugointi ei eristä koko vesikkelipopulaatiota (Cvjetkovic ym. 2014). Vaikka tutkielmassa käytetyt protokollat ovat tehokkaimpien yleisesti MV-tutkimuksessa käytettyjen sentrifugointiohjelmien mukaisia (Cvjetkovic ym. 2014;

Piccin ym. 2007), voi saatujen tulosten perusteella todeta, että MP:en sekä eksosomien eristämiseen käytettävää sentrifugointiohjelmaa voisi vielä tehostaa esimerkiksi pidentämällä sentrifugoimisaikaa, jotta MV-alapopulaatiot voidaan eristää puhtaammin. Tosin vesikkeleiden eristämiseen käytettävä roottorimalli tulisi vaihtaa toisentyypiseksi, jotta pienimpien vesikkeleiden tahaton eristäminen vältettäisiin. Jotta MV-alapopulaatioiden välisiä eroja voidaan tutkia, on populaatioiden eristäminen luotettavalla tavalla ensiarvoisen tärkeä asia.

Kuten tutkielmassakin havaittiin, MV-alapopulaatiot ovat äärimmäisen heterogeenisiä, mikä tekee niiden luotettavasta eristämisestä todella haastavaa. Vaihtoehtoisia menetelmiä MV-alapopulaation eristämiseen voisi olla MV-näytteen geelisuodattaminen (Dean ym. 2009) tai MV:en tiheyseroihin perustuva gradienttisentrifugointi (Chen ym. 2013). Tutkimuksen tulokset osaltaan selittävät myös MV-alapopulaatioiden tiheyseroja, sillä suuri vaihtelu lipidimäärissä MV-alapopulaatioiden välillä edesauttaa tiheyserojen muodostumista.

12.3.2 NTA vesikkeleiden kvantifiointissa

Tutkielmassa käytettiin vesikkelikoon sekä -konsentraation määrittämiseen NTA-menetelmää, jonka etuna on pienienkin partikkeleiden havaitseminen näytteestä. NTA perustuu partikkeleiden optiseen havaitsemiseen ja tunnetuissa olosuhteissa partikkeleiden liikemäärää seuraamalla saadaan selville niiden koko. MV:tä kvantifoidaan yleisesti virtaussytometrialla, mutta perinteisellä virtaussytometrialla ei voida havaita pieniä, halkaisijaltaan paljoa alle 400 nm olevia partikkeleita (van der Pol ym. 2010). Tutkielmassa havaittiin, että verihiutaleperäisistä MV:stä korkeintaan 20 % oli halkaisijaltaan yli 400 nm, mikä vahvistaa käsitystä siitä, ettei virtaussytometrialla voida kvantifioida koko vesikkelipopulaatiota luotettavasti (Arraud ym. 2014). Menetelmällä pystyttiin havaitsemaan halkaisijaltaan jopa alle 50 nm olevia partikkeleita, mutta koska NTA perustuu partikkeleiden visuaaliseen kvantifointiin, menetelmä ei pysty erottamaan näytepuskurin epäpuhtauksia kuten lipoproteiineja mitattavista partikkeleista, tässä tapauksessa MV:stä.

Laimeamman MV-näytteen vesikkelikonsentraatio nousi tiettyyn laimennospisteeseen asti ja laimeammassa näytteessä suurempien partikkeleiden prosentuaalinen osuus kasvoi, eli tutkimuksen mukaan NTA:n ongelma on naamiointi-ilmiön sijaan konsentraatiovaikutus. konsentraatioilmiö johtuu liian konsentroituneesta näytteestä,

jossa partikkelit eivät voi liikkua vapaasti. Tällöin partikkeleiden kulkema pienempi matka vääristää kokojakaamaa siten, että näytteiden vesikkelit olisivat todellista pienempiä. Näytettä laimennettaessa partikkelit voivat liikkua rajoittamattomasti, mikä analysoinnin jälkeen näkyy suurempien partikkeleiden prosentuaalisen osuuden nousemisena. Tällöin myös näytteen konsentraation määrittäminen on tarkempi, sillä rinnakkaisten mittausten väliset erot pienenevät. konsentraatioilmiö vaikuttaa tutkimuksen tulosten mukaan paitsi näytteiden kokojakaamaan myös konsentraatioon, sillä lähestyttäessä optimaalista laimennosta näytteen konsentraatio kasvoi. Näytteen oikean laimentamisen merkitys NTA:ssa korostuu, koska tutkimuksessa havaittiin, että näytteen liiallinen laimentaminen on lähes yhtä haitallista kuin liian konsentroitunut näyte, sillä liian laimea näyte ei kuvasta todellista vesikkelipopulaatiota ja varsinkin vesikkelipopulaation kokojakaama vääristyy. NTA:lla mitattavassa näytteessä tulisi olla riittävä määrä mitattavaa materiaalia ilman että mitattavien partikkeleiden liikettä rajoitetaan liian konsentroituneella näytteellä ja optimaalisen konsentraation tulisi olla osa mittausprotokollaa.

12.3.3 Mikrovesikkeleiden lipidi- ja proteiinimäärän kvantifiointi

Tutkimuksen aikana pystytetyssä lipidimäärityksen standardisuorien absorbanssissa oli yllättäen jopa vähemmän vaihtelua standardinäytteiden absorbanssissa määrittämisestä toiseen mitä kaupallisessa proteiinimäärän määrittämiseen käytetyssä menetelmässä oli, joten menetelmä osoittautui todella luotettavaksi. SPV-menetelmää on kritisoitu reaktiivisuuden vaihtelusta eri lipidien kanssa (Knight ym. 1972), mikä havaittiin myös tehtäessä standardisuora sekä kalaöljyllä että auringonkukkaöljyllä: eri öljyillä tehdyillä standardinäytteillä oli merkittävä absorbanssiero. Vahvana hapon rikkihappo reagoi heikon emäksen, kaksoissidoksellisen hiilen, kanssa muodostaen karbonium-ionin, joka muodostaa stabiilin värillisen kompleksin aromaattisen fosfaattierin karbonyyliryhmän kanssa, joka muodostuu fosforihapon ja vanilliinin reaktiossa. Tyydyttymättömiä rasvahappoja sisältävä näyte reagoi rikkihapon kanssa muodostaen karbonium-ionin, mutta on myös osoitettu, että kaksoissidoksellinen hiiliatomi ei ole välttämätön reaktiota varten, sillä myös jotkut tyydyttyneet rasvahapot voivat muodostaa karbonium-ionin (McMahon ym. 2013). Tyydyttyneiden ja tyydyttymättömien rasvahappojen välillä havaittava ero absorbanssissa johtuu muodostuneiden karbonium-ionien määrästä ja ero korostuu vertailtaessa monitydyttymätöntä rasvahappoa tyydyttyneeseen rasvahappoon (Knight ym. 1972).

Havaittu ero standardinäytteiden absorbanseissa selittyy standardiöljyjen koostumuksen eroilla, sillä kalaöljy sisältää enemmän tyydyttymättömiä rasvahappoja kuin auringonkukkaöljy (Bester ym. 2010). Syöpäsolujen tuottamien eksosomien lipidomitutkimuksissa on eristetty eksosomeista jopa 300 erilaista lipidiä, joista noin 50 % oli tyydyttymättömiä rasvahappoja ja tyydytysteistä rasvahapoista noin 20 % oli monitydyttymättömiä rasvahappoja (Llorente ym. 2013). Varsinkin korkeampi monitydyttymättömien rasvahappojen osuus selittäisi eksosomien näennäisen korkean lipidimäärän MP:en lipidimäärään verrattuna.

Toistaiseksi MV-alapopulaatioiden lipidomia on kuitenkin tehty vähän johtuen MV-näytteiden rajoitetusta saatavuudesta. Lipidomiikkatutkimuksiin vaaditaan vesikkeleitä proteiinimäärän mukaan kvantifioituna 100 µg ja jotta verihutaleperäisiä MV:tä saataisiin tuotettua tarvittava määrä verihutaleiden fysiologisilla aktivaatioilla, pitäisi sitä varten saada 125 ml verta noin kahdeksalta luovuttajalta (keskustelut Pia Siljanderin kanssa). MV:ille tehdyissä lipidomitutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että MV:en lipidikoostumuksessa on vaihtelua (Biro ym. 2005; Llorente ym. 2013), jolloin voidaan kyseenalaistaa standardinäytteiden rinnastettavuus näytteisiin: todennäköisesti kumpikaan standardisuora ei ole realistinen vertailukohta MV:en lipideihin. Lisäksi on todennäköistä, että eri lähteistä eristettyjen MV:en välillä on vaihtelua vesikkeleiden lipidikoostumuksessa. MV:en lipidikoostumusta kuvaavien standardinäytteiden luominen vaatisi parempaa vesikkeleiden lipidikoostumuksen tutkimusta.

Saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että SPV-menetelmä ei ole ongelmaton, eikä menetelmällä voi kvantifioida vesikkeleitä, varsinkaan eksosomeja, johtuen MV-alapopulaatioiden aktivaatio- sekä populaatiokohtaisista eroista lipidimäärissä. Totaalilipidimääritys auttaa kuitenkin vesikkeleiden karakterisoinnissa ja tutkimuksessa havaittiin, että eksosomeissa on keskimäärin kaksinkertainen lipidimäärä vesikkeliä kohden MP:hin verrattuna. Karakterisointituloksen biologisen merkityksen pohdintaa vaikeuttaa kuitenkin se, että jaottelusentrifugoinnin avulla ei saatu eristettyä puhtaita MV-alapopulaatioita.

Proteiinipitoisuuden määrittämisessä näytteiden detergenttikäsittelyyn käytetyn detergentin konsentraatio vaikutti merkittävästi näytteiden absorbanssiin, mikä vääristi absorbanssista laskennallisesti saatua proteiinimäärää. Koska tutkimuksesta riippuen vesikkelinäytteet käsitellään erilaisilla detergenttipitoisuuksilla ja detergenttinä voidaan

käyttää TritonX-100:n lisäksi natriumdodekylsulfaattia, alleviivaavat tutkimuksen tulokset menetelmän epävarmuutta käyttää proteiinimäärää MV:en kvantifiointiin. Vaikka MV:t olivat lähtöisin samasta solusta, aktivaatiokohtaiset erot vesikkelikohtaisessa proteiinimäärässä estävät myös verihiutaleperäisten MV:en luotettavan kvantifioinnin proteiinimäärän perusteella. Koska aktivaatiokohtaisen vaihtelun lisäksi MV-alapopulaatioiden välillä havaittiin eroja lipidi- ja proteiinimäärissä, erityisesti eksosomien kvantifiointi proteiini- tai lipidimäärän perusteella on epätarkka metodi, sillä tutkimuksen perusteella eksosomit sisältävät vesikkelinäkökohden enemmän lipidiä ja proteiinia kuin MP:t. Myös inhibitiokokeet osoittivat, että vesikkeleiden kvantifiointi proteiinimäärän mukaan ei kuvasta todellista vesikkelimäärää, koska inhiboitujen vesikkelinäytteiden proteiinimäärän muutokset eivät vastanneet vesikkelimäärien muutoksia.

12.3.4 Laskennalliset menetelmät

Tutkimuksessa vertailtiin eri tavoin tuotettujen verihiutaleperäisten MV:en konsentraatiota, kokojakaumaa, proteiinimäärää sekä lipidimäärää ja tuloksia tulkittiin tilastollisin menetelmin käyttäen tilastanalyysseja sekä tilastollisia malleja. Tutkielmassa ei juuri saatu tilastollisesti merkittäviä eroja, mutta suurin osa merkittävien erojen puuttumisesta on selitettävissä primäärisolujen aktivaatiolla, pienellä toistojen määrällä sekä suurissa yksilöiden välisissä vesikulaation eroissa, mikä vaikuttaa jossain määrin myös näytteiden proteiini- sekä lipidimäärään. Aktivaatioiden ja inhibitioiden vaikutusta erityisesti verihiutaleiden vesikulaatioon on vaikea tutkia yksilöiden välisten erojen takia, sillä erittäin suuresta hajonnasta johtuen tulosten vertailu sekä analysointi on äärimmäisen hankalaa. MV:tä käsittelevissä julkaisuissa ilmiö näkyy mm. siinä, että kuvaajissa käytetään yleisesti keskihajonnan sijaan keskiarvon keskivirhettä, jotta kuvaajat saadaan siistimmän näköisiksi ja helpommin luettavaan muotoon (Cauwenberghs ym. 2006).

Samasta syystä johtuen aktivaatioiden sekä inhibiittoreiden vaikutus tutkittuun määreeseen ilmoitettiin tutkielmassa prosentuaalisena muutoksena verrattuna kyseisen päivän kontrollinäytteeseen ja hajonta esitettiin keskiarvon keskivirheenä. Muuttamalla MV:en, proteiinien tai lipidin määrä prosentuaaliseksi muutoksiksi kontrolliin verrattuna pyrittiin sivuuttamaan henkilökohtaiset erot tutkituissa määreissä, jolloin vain aktivaatiosta tai inhibitiosta johtuvat erot olisivat nähtävissä. Tämä puhtaasti

laskennallinen menetelmä ei kuitenkaan ole ongelmaton, sillä vertailtavuuden onnistumiseksi vaaditaan aktivaation tai inhibition lisäksi kontrollinäyte. Jos kontrollialtistuksen tuottama MV-määrä on poikkeava, kasvaa altistuksen aiheuttama prosentuaalinen muutos todella suureksi muiden päivien tuloksiin verrattuna (havainnollistettu **kuvassa 10**).

Huomionarvoista oli lisäksi se, että vertailtaessa esimerkiksi vesikkelikonsentraation absoluuttisia arvoja sekä prosentuaalisia muutoksia samat altistukset eivät aiheuttaneet tilastollisesti merkittävää muutosta. Koska prosentuaalisena muutoksena ilmoitetuissa vesikkelimäärissä ei havaittu samoja merkittäviä muutoksia mitä absoluuttisissa vesikkelimäärissä, voidaan päätellä, että absoluuttisia vesikkelimääriä verratessa suuret yksilötason vaihtelut vasteessa aktivaattoriin tai inhibiittoriin osaltaan edesauttavat tuloksien merkittävien erojen muodostumista.

MP:en määrää ei mitattu NTA:lla, sillä sitä varten MP:t olisi pitänyt eristää MV-populaatiosta sentrifugoimalla sekä resuspensoida mittausta varten ja työvaiheissa pyrittiin minimoimaan kaikki ylimääräinen vesikkelinäytteen käsittely. Resuspensoidun MP-napin mittaaminen NTA:lla osoitti, että näytteestä häviää käsittelyn aikana vesikkeleitä, sillä laskennallinen MP:en määrä oli korkeampi kuin mitattu MP:en määrä. Tämän takia oli perusteltua laskea MP:en määrä näytteistä vähentämällä koko MV-populaatiosta eksosomipopulaatio. Menetelmä ei kuitenkaan ollut täysin luotettava, sillä puhtaasti laskennallisen menetelmän takia muutaman näytteen kohdalla MP-määrä sai negatiivisen arvon, mikä johtuu osittain NTA:ssa havaitusta konsentraatiovaikutuksesta. MP:n määrää pyrittiin myös arvioimaan proteiinimäärän perusteella, mutta proteiinimäärä ei tutkimuksen mukaan ollut suoraan verrannollinen näytteen vesikkelimäärään. Tutkielman yhtenä heikkoutena voi siis pitää MP:n määrän määrittämistä, sillä kaikki käytetyt arvot perustuvat oletuksiin.

Koska tutkimuksen kohteena oli primäärisolujen aktivaatio ja kyseessä oli verrattain pieni toistojen määrä, olisi tulosten tulkinta ainoastaan parillista t-testiä käyttäen tuottanut vain harvoja tilastollisesti merkittäviä tuloksia. Tämän takia tuloksia käsiteltiin myös tilastollisten mallien avulla. Mallien avulla osoitettiin, että suurin yksittäinen tekijä, mikä vaikutti vesikkeli-, proteiini- ja lipidimäärään oli verihitaleiden aktivaatio, mikä oli nähtävissä myös tuloksissa suurena aktivaatiokohtaisena vesikkeli-, proteiini- ja lipidimäärän vaihteluna. Erityisesti

inhibiittoreiden vaikutusta ei voitu tilastollisesti todistaa pienen toistojen määrän takia, mutta mallien avulla voitiin osoittaa, että inhibiittoreillakin oli merkittävä vaikutus proteiini- ja vesikkelimäärään, sillä paras malli proteiini- ja vesikkelimääriä kuvastamaan saatiin huomioimalla verihutaleiden aktivaatiot, inhibitiot, vesikkelialapopulaatiot ja interaktiot. Tulos oli yllättävä, sillä kaikki yksittäiset tekijät sekä niiden interaktiot huomioiva malli oli todella monitahoinen malli ja AIC-arvo rankaisee mallin liiallisesta monitahoisuudesta. Esimerkiksi pelkän aktivaation vaikutukset MV-, proteiini- ja lipidimäärän muutokseen huomioivan mallin AIC-arvo oli matala, sillä aktivaatiolla oli suuri vaikutus, minkä lisäksi malli oli yksinkertainen. Mallien vertailun perusteella inhibitioiden vaikutusten tutkimista vesikulaatioon kannattaa jatkaa, sillä tutkielmassa tehdyt kolme biologista toistoa eivät riitä tilastollisesti merkittävien tulosten toteamiseen.

Vesikkelialapopulaatio sekä verihutaleiden aktivaatio selittivät lähes yhtä paljon lipidimäärää (**taulukko 5**), mikä oli huomattavissa myös tuloksissa, sillä 1) MP:n lipidimäärässä oli aktivaatiokohtaista vaihtelua ja 2) MV-alapopulaatioiden välillä oli merkittävä ero lipidimäärissä. Mallia yritettiin parantaa huomioimalla vesikkeli- ja proteiinimäärä, mutta vesikkelimäärän huomioiminen ei parantanut lipidimäärää selittävää mallia. Havainto tukee tulosten korrelaatioanalyysiä, jossa havaittiin, että lipidimäärän ja vesikkelimäärän välillä oli vain hyvin heikkoa positiivista korrelaatiota. Koska datamäärältään pienen mallin monitahoisuus nousee eikä korrelaatiota vesikkelimäärän ja lipidimäärän välillä ole, sai malli huonomman AIC-arvon. Sen sijaan proteiinimäärän huomioiva malli sai pienemmän AIC-arvon, mikä tukee havaintoa lipidi- ja proteiinimäärän heikosta positiivisesta korrelaatiosta.

Mallien käyttöä voi suositella tilastollisen tarkastelun tukena, kun kyseessä on monimuuttujatutkimus, jossa näytelähteiden välinen biologinen vaihtelevuus on suurta. Luotettavien mallien luominen ja vertaileminen vaatii kuitenkin suuren aineiston, mitä tutkimuksessa ei ollut mahdollista tuottaa. Tästä johtuen mallien tulkintaan tulee suhtautua varauksella. Tutkielman tilastoanalyysissä ei kuitenkaan turvauduttu pelkästään mallien analyysiin, vaan pikemminkin eri malleja vertailemalla saatiin vahvistusta havainnoille, jotka todettiin muilla keinoilla.

13 Yhteenveto

Jotta MV:tä voitaisiin hyödyntää diagnostisina tai jopa terapeuttisina työkaluina, pitää MV-alapopulaatiot pystyä eristämään, kvantifioimaan sekä karakterisoimaan nykyistä paremmin. MV:en mahdollista kliinistä potentiaalia on alettu ymmärtää yhä paremmin erilaisten tekniikoiden kehittyessä, mutta varsinkin MV-alapopulaatioiden ominaisuuksien tutkiminen on haasteellista niiden heterogeenisyyden takia. Vaikka MV:tä tutkitaan jo laajalti, on myös tutkimustulosten vertaileminen haastavaa standardoitujen protokollien puuttuessa.

Verihiutaleiden eri aktivaatioiden tuottamat MV-alapopulaatiot poikkesivat toisistaan niin proteiini- kuin lipidimääriltään, mikä osoittaa vesikulaation olevan tarkoin kontrolloitu mekanismi ja verihiutaleiden kyvyn vaikuttaa tuotettujen MV:en koostumukseen. MV:en lipidomin ja proteomin muuttaminen on tärkeä vaste fysiologisiin sekä patofysiologisiin ilmiöihin, joihin voidaan vaikuttaa MV-välitteisesti.

Tutkimuksen puitteissa pystytetty SPV-menetelmä osoittautui toimivaksi ja luotettavaksi menetelmäksi lipidimäärän mittaamiseen, tosin standardin tulee vastata lipidikoostumukseltaan mitattavaa näytettä. Menetelmää voidaan käyttää vesikkeleiden karakterisoinnissa ja työssä havaittiinkin, että eksosomit sisälsivät noin kaksi kertaa enemmän lipidiä vesikkeliä kohden MP:en lipidimäärään verrattuna ja että eksosomien proteiini-lipidisuhde oli pienempi kuin MP:lla.

MV-näytteen vesikkeli-, lipidi- ja proteiinimäärän keskinäistä vertailtavuutta ei ole aiemmin tutkittu. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, että verihiutaleiden aktivaatioista aiheutuvasta proteiini- ja lipidikoostumuksen vaihtelusta johtuen eri reittien kautta muodostuvien MV:en määrää ei voida luotettavasti kvantifioida proteiini- tai kokonaislipidimäärityksen perusteella, sillä proteiini- tai lipidimäärä ei korreloi lineaarisesti MV-määrän kanssa. Vaikka tutkimuksessa ei juuri havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja, tukivat tilastollisten mallien analysoinnista saadut tulokset havaittuja tuloksia: suurin tekijä, mikä vaikutti MV-, proteiini- ja lipidimääriin, oli käytetty aktivaatio. Mallien vertailu osoitti, että vesikkelialapopulaatiolla ei ollut yhtä suurta merkitystä proteiini- ja vesikkelimääriin, mikä on osittain selitettävissä puutteellisella vesikkelialapopulaatioiden eristämällä.

PPACK-inhibition havaittiin laskevan tuotettujen MV:n määrää sekä vesikkelinäytteiden proteiinimäärää suurimmassa osassa tutkituista aktivaatioista, mutta inhibiittorikokeissa ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja. Tutkimuksen tulokset viittaavat vaikutuksen olevan proteinaasi-inhibiittorivälitteinen, joten tulevaisuudessa tulisi selvittää, mikä proteinaasi on vaikutuksen takana, minkä lisäksi tulisi tutkia, onko PPACK-inhibitiolla vastaavanlainen vaikutus myös muiden solujen vesikulaatioon. Inhibiittorikokeet vahvistivat havaintoa, että proteiinimäärän kvantifiointi ei ole luotettava tapa MV:en kvantifikaatioon.

NTA:lla pystyttiin kvantifioimaan pienimpiäkin MV:tä, mutta näytteen laimentamiseen liittyvät tekijät täytyy huomioida NTA:ssa mahdollisena virhelähteenä. Tutkimuksessa osoitettiin myös puhtaiden MV-alapopulaatioiden eristämisen hankaluus jaottelusestrifugoinnilla.

Vesikkelitutkimuksen suurin heikkous on puutteellinen menetelmien validointi ja standardointi, mikä yhtenäistäisi tutkimusta. Vaikka vesikkelitutkimuksen saralla on tehty edistyksellisiä koejärjestelyjä joissa MV:tä on käytetty esimerkiksi lääkkeiden kuljetukseen, perustavanlaatuiset asiat, kuten luotettava vesikkeleiden kvantifikaatio, ovat vielä ratkaisematta. Tutkimuksessa selvitettiin eri aktivaatioiden ja inhibitioiden vaikutusta verihituleiden tuottamaan ja vesikkelimäärään sekä vesikkeleiden kokojakaumaan, minkä lisäksi vesikkeleitä pyrittiin kvantifioimaan proteiini- ja lipidimäärän perusteella. Tässä tutkimuksessa havaittiin, että juuri standardoimattomat metodologiset perusasiat kuten MV-alapopulaatioiden eristäminen sekä kvantifiointi vaikeuttavat luotettavien mekanististen sekä solubiologisten johtopäätösten tekemistä. Menetelmien kehittämiseksi tulisi tehdä metrologista tutkimusta, jotta vesikkelitutkimuksen käytännöt voitaisiin validoida ja standardoida.

14 Kiitokset

Olen erittäin kiitollinen ohjaajalleni Pia Siljanderille ennakkoluulottomasta suhtautumisesta savolaisuuteen sekä lukemattomista keskusteluista, jotka syvensivät käsitystäni mikrovesikkeleiden lumoavasta maailmasta. Ilman näitä keskusteluja sekä asiantuntevaa näkemystä tutkimus ei olisi tässä muodossa.

Haluan myös kiittää Maria Aatosta, joka on sekä näyttänyt että opettanut mikrovesikkelitutkimuksen laboratoriopuolen saloja, joiden avulla tutkimus oli mahdollista tehdä (10/2013-2/2014).

Suurin kiitos kuuluu kihlatulleni Iidalle, joka on jaksanut tukea epätoivoisina hetkinä koko tutkielman kirjoittamisen ajan, sillä ilman Iidaa koko tutkielma olisi tuskin valmistunut ollenkaan.

15 Lähdeluettelo

15.1 Kirjalliset lähteet

Aatonen M, Gronholm M, Siljander PR: Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin Thromb Hemost* 38: 102-113, 2012

Aatonen M, Ohman T, Nyman TA, Laitinen S, Gronholm M, Siljander PR: Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3: 2.4692, <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.2.4692>, 2014

Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, Evers LM, Meesters EW, Sturk A: Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost* 3: 888-896, 2005

Admyre C, Bohle B, Johansson SM, Focke-Tejkl M, Valenta R, Scheynius A, Gabrielsson S: B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 120: 1418-1424, 2007

Admyre C, Telemo E, Almqvist N, Lotvall J, Lahesmaa R, Scheynius A, Gabrielsson S: Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 63: 404-408, 2008

Almqvist N, Lonnqvist A, Hultkrantz S, Rask C, Telemo E: Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. *Immunology* 125: 21-27, 2008

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakkhal S, Wood MJ: Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 29: 341-345, 2011

Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG: K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* 23: 143-147, 1979

Andre P, LaRocca T, Delaney SM, Lin PH, Vincent D, Sinha U, Conley PB, Phillips DR: Anticoagulants (thrombin inhibitors) and aspirin synergize with P2Y12 receptor antagonism in thrombosis. *Circulation* 108: 2697-2703, 2003

Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, Brisson AR: Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 12: 614-627, 2014

Atay S, Banskota S, Crow J, Sethi G, Rink L, Godwin AK: Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 711-716, 2014

Azmi AS, Bao B, Sarkar FH: Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 32: 623-642, 2013

Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Branski P, Ratajczak MZ, Zembala M: Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 55: 808-818, 2006

Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, Skog J: Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2: 180, 2011

Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA: Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 99: 2118-2127, 1997

Battke C, Ruiss R, Welsch U, Wimberger P, Lang S, Jochum S, Zeidler R: Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC. *Cancer Immunol Immunother* 60: 639-648, 2011

Belenky A, Smith A, Zhang B, Lin S, Despres N, Wu AH, Bluestein BI: The effect of class-specific protease inhibitors on the stabilization of B-type natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta* 340: 163-172, 2004

Benameur T, Andriantsitohaina R, Martinez MC: Therapeutic potential of plasma membrane-derived microparticles. *Pharmacol Rep* 61: 49-57, 2009

Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan MC, Breedveld FC, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* 46: 2857-2866, 2002

Bester D, Esterhuysen AJ, Truter EJ, van Rooyen J: Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr Res Rev* 23: 334-348, 2010

Biro E, Akkerman JW, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, Nieuwland R: The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost* 3: 2754-2763, 2005

Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R: Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 1: 2561-2568, 2003

Biro E, van den Goor JM, de Mol BA, Schaap MC, Ko LY, Sturk A, Hack CE, Nieuwland R: Complement activation on the surface of cell-derived microparticles during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass - is retransfusion of pericardial blood harmful? *Perfusion* 26: 21-29, 2011

Boing AN, Stap J, Hau CM, Afink GB, Ris-Stalpers C, Reits EA, Sturk A, van Noorden CJ, Nieuwland R: Active caspase-3 is removed from cells by release of caspase-3-enriched vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1844-1852, 2013

Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, Pannier B, Leroyer AS, Mallat CN, Tedgui A, London GM: In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease. *Hypertension* 49: 902-908, 2007

Brown GT, McIntyre TM: Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J Immunol* 186: 5489-5496, 2011

Brown GT, Narayanan P, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM: Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J Immunol* 191: 5196-5203, 2013

Bruno S, Collino F, Derigibus MC, Grange C, Tetta C, Camussi G: Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth. *Stem Cells Dev* 22: 758-771, 2013

Buesing KL, Densmore JC, Kaul S, Pritchard KA, Jr, Jarzembowski JA, Gourlay DM, Oldham KT: Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury. *J Surg Res* 166: 32-39, 2011

Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM: Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)* 124: 423-441, 2013

Cantin R, Diou J, Belanger D, Tremblay AM, Gilbert C: Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 338: 21-30, 2008

- Carson SD, Perry GA, Pirruccello SJ: Fibroblast tissue factor: calcium and ionophore induce shape changes, release of membrane vesicles, and redistribution of tissue factor antigen in addition to increased procoagulant activity. *Blood* 84: 526-534, 1994
- Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F: Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol* 96: 458-463, 1997
- Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW: Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 580: 5313-5320, 2006
- Chaar V, Romana M, Tripette J, Broquere C, Huisse MG, Hue O, Hardy-Dessources MD, Connes P: Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. *Clin Hemorheol Microcirc* 47: 15-25, 2011
- Chargaff E, West R: The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 166: 189-197, 1946
- Chen CY, Hogan MC, Ward CJ: Purification of exosome-like vesicles from urine. *Methods Enzymol* 524: 225-241, 2013
- Chiba M, Kimura M, Asari S: Exosomes secreted from human colorectal cancer cell lines contain mRNAs, microRNAs and natural antisense RNAs, that can transfer into the human hepatoma HepG2 and lung cancer A549 cell lines. *Oncol Rep* 28: 1551-1558, 2012
- Choi HY, Moon SJ, Ratliff BB, Ahn SH, Jung A, Lee M, Lee S, Lim BJ, Kim BS, Plotkin MD, Ha SK, Park HC: Microparticles from kidney-derived mesenchymal stem cells act as carriers of proangiogenic signals and contribute to recovery from acute kidney injury. *PLoS One* 9: e87853, 2014
- Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z: Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol* 187: 676-683, 2011
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J: Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19: 43-51, 2009
- Cvjetkovic A, Lotvall J, Lasser C: The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3: 10.3402/jev.v3.23111. eCollection 2014, 2014
- Dashevsky O, Varon D, Brill A: Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer* 124: 1773-1777, 2009
- Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J, Baker CH, Francis JL: Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost* 6: 1517-1524, 2008
- Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW: Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* 102: 711-718, 2009
- Delabranche X, Berger A, Boisrame-Helms J, Meziani F: Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect* 42: 335-343, 2012
- Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, Kaul S, Jones DW, Sabina RE, Pritchard KA, Jr, Guice KS, Oldham KT: Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock* 26: 464-471, 2006

Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, Bode C, Moser M: Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis* 31: 173-179, 2011

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* 52: 3337-3348, 2005

Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ, Hole P, Carr B, Redman CW, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL: Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* 7: 780-788, 2011

Drevon B, Schmit JM: The Sulfo-Phospho-Vanillic Reaction in the Evaluation of the Serum Lipids and Lipoproteins of the Monkey (*Cynocephalus Babuin*); Comparison with Human Serum. *C R Seances Soc Biol Fil* 158: 778-780, 1964

Fabre JE, Gurney ME: Limitations of current therapies to prevent thrombosis: a need for novel strategies. *Mol Biosyst* 6: 305-315, 2010

Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L, Jeong SH, Walker C, Lanford RE, Lemon SM: A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496: 367-371, 2013

Fevrier B, Raposo G: Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16: 415-421, 2004

Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H: Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80: 919-927, 1995

Geddings JE, Mackman N: Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood* 122: 1873-1880, 2013

Gemmell CH: Flow cytometric evaluation of material-induced platelet and complement activation. *J Biomater Sci Polym Ed* 11: 1197-1210, 2000

George JN, Pickett EB, Heinz R: Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion* 28: 123-126, 1988

Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ: Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem* 266: 17261-17268, 1991

Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, Paloczi K, Pasztoi M, Misjak P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgar A, Toth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzas EI: Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117: e39-48, 2011a

Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI: Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68: 2667-2688, 2011b

Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V: Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol* 161: 245-254, 2013

Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, Leytin V: Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis* 33: 397-411, 2012

- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, 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* 94: 3791-3799, 1999
- Henriksson CE, Klingenberg O, Hellum M, Landsverk KS, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P: Calcium ionophore-induced de-encryption of tissue factor in monocytes is associated with extensive cell death. *Thromb Res* 119: 621-630, 2007
- Herring JM, McMichael MA, Smith SA: Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med* 27: 1020-1033, 2013
- Hess MW, Siljander P: Procoagulant platelet balloons: evidence from cryopreparation and electron microscopy. *Histochem Cell Biol* 115: 439-443, 2001
- Higginbotham JN, Demory Beckler M, Gephart JD, Franklin JL, Bogatcheva G, Kremers GJ, Piston DW, Ayers GD, McConnell RE, Tyska MJ, Coffey RJ: Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr Biol* 21: 779-786, 2011
- Hirsh J: Current anticoagulant therapy--unmet clinical needs. *Thromb Res* 109 Suppl 1: S1-8, 2003
- Hirsh J: Heparin. *N Engl J Med* 324: 1565-1574, 1991
- Hoover-Plow J: Does plasmin have anticoagulant activity? *Vasc Health Risk Manag* 6: 199-205, 2010
- Horstman LL, Ahn YS: Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 30: 111-142, 1999
- Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregni E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L: Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 128: 1796-1804, 2005
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM: Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 20: 22-27, 2005
- Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rozycki B: Membrane budding. *Cell* 143: 875-887, 2010
- Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L: Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* 15: 80-88, 2008
- Izard J, Limberger RJ: Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *J Microbiol Methods* 55: 411-418, 2003
- Jang JY, Lee JK, Jeon YK, Kim CW: Exosome derived from epigallocatechin gallate treated breast cancer cells suppresses tumor growth by inhibiting tumor-associated macrophage infiltration and M2 polarization. *BMC Cancer* 13: 421-2407-13-421, 2013
- Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ: Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 113: 752-760, 2005
- Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K: Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol* 147: 27-36, 1991

Kahlert C, Kalluri R: Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* 91: 431-437, 2013

Kalani A, Kamat PK, Chaturvedi P, Tyagi SC, Tyagi N: Curcumin-primed exosomes mitigate endothelial cell dysfunction during hyperhomocysteinemia. *Life Sci* 107: 1-7, 2014

Kilpinen L, Impola U, Sankkila L, Ritamo I, Aatonen M, Kilpinen S, Tuimala J, Valmu L, Levijoki J, Finckenberg P, Siljander P, Kankuri E, Mervaala E, Laitinen S: Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J Extracell Vesicles* 2: 10.3402/jev.v2i0.21927. eCollection 2013, 2013

Knight JA, Anderson S, Rawle JM: Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clin Chem* 18: 199-202, 1972

Lacroix R, Dignat-George F: Microparticles as a circulating source of procoagulant and fibrinolytic activities in the circulation. *Thromb Res* 129 Suppl 2: S27-9, 2012

Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F: Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 11 Suppl 1: 24-35, 2013

Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ: Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet* 21: R125-34, 2012

Lenassi M, Cagney G, Liao M, Vaupotic T, Bartholomeeusen K, Cheng Y, Krogan NJ, Plemenitas A, Peterlin BM: HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* 11: 110-122, 2010

Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ: Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med* 10: 364-375, 2006

Lindhout T, Blezer R, Hemker HC: The anticoagulant mechanism of action of recombinant hirudin (CGP 39393) in plasma. *Thromb Haemost* 64: 464-468, 1990

Liu Y, Zhu XJ, Zeng C, Wu PH, Wang HX, Chen ZC, Li QB: Microvesicles secreted from human multiple myeloma cells promote angiogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 35: 230-238, 2014

Llorente A, Skotland T, Sylvanne T, Kauhanen D, Rog T, Orłowski A, Vattulainen I, Ekroos K, Sandvig K: Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1831: 1302-1309, 2013

Lu Q, Hofferbert BV, Koo G, Malinauskas RA: In vitro shear stress-induced platelet activation: sensitivity of human and bovine blood. *Artif Organs* 37: 894-903, 2013

Ludwig AK, Giebel B: Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 11-15, 2012

Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, Tullis RH: Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 10: 134-5876-10-134, 2012

Martinez MC, Andriantsitohaina R: Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circ Res* 109: 110-119, 2011

Maruyama K, Kadono T, Morishita E: Plasma levels of platelet-derived microparticles are increased after anaerobic exercise in healthy subjects. *J Atheroscler Thromb* 19: 585-587, 2012

- Mastronardi ML, Mostefai HA, Meziani F, Martinez MC, Asfar P, Andriantsitohaina R: Circulating microparticles from septic shock patients exert differential tissue expression of enzymes related to inflammation and oxidative stress. *Crit Care Med* 39: 1739-1748, 2011
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ: Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73: 1907-1920, 2010a
- Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ: Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* 9: 197-208, 2010b
- McMahon A, Lu H, Butovich IA: The spectrophotometric sulfo-phospho-vanillin assessment of total lipids in human meibomian gland secretions. *Lipids* 48: 513-525, 2013
- Meckes DG,Jr, Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N: Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20370-20375, 2010
- Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR: Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* 99: 2577-2582, 1999
- Mincheva-Nilsson L, Baranov V: Cancer exosomes and NKG2D receptor-ligand interactions: Impairing NKG2D-mediated cytotoxicity and anti-tumour immune surveillance. *Semin Cancer Biol* 2014
- Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, Hernestal J, Baranov V: Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol* 176: 3585-3592, 2006
- Mineo M, Garfield SH, Taverna S, Flugy A, De Leo G, Alessandro R, Kohn EC: Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis* 15: 33-45, 2012
- Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S: High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 88: 3456-3464, 1996
- Mobergslien A, Sioud M: Exosome-derived miRNAs and cellular miRNAs activate innate immunity. *J Innate Immun* 6: 105-110, 2014
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F: Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 15-26, 2011
- Munzer P, Tolios A, Pelzl L, Schmid E, Schmidt EM, Walker B, Frohlich H, Borst O, Gawaz M, Lang F: Thrombin-sensitive expression of the store operated Ca(2+) channel Orai1 in platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 25-30, 2013
- Mutlu A, Gyulkhandanyan AV, Freedman J, Leytin V: Activation of caspases-9, -3 and -8 in human platelets triggered by BH3-only mimetic ABT-737 and calcium ionophore A23187: caspase-8 is activated via bypass of the death receptors. *Br J Haematol* 159: 565-571, 2012
- Naslund TI, Paquin-Proulx D, Paredes PT, Vallhov H, Sandberg JK, Gabrielsson S: Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS* 28: 171-180, 2014
- Natasha G, Gundogan B, Tan A, Farhatnia Y, Wu W, Rajadas J, Seifalian AM: Exosomes as Immunotherapeutic Nanoparticles. *Clin Ther* 36: 820-829, 2014

Novelli F, Neri T, Tavanti L, Armani C, Noce C, Falaschi F, Bartoli ML, Martino F, Palla A, Celi A, Paggiaro P: Procoagulant, tissue factor-bearing microparticles in bronchoalveolar lavage of interstitial lung disease patients: an observational study. *PLoS One* 9: e95013, 2014

Ogorevc E, Kralj-Iglic V, Veranic P: The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. *Radiol Oncol* 47: 197-205, 2013

Ohtsuka M, Sasaki K, Ueno T, Seki R, Nakayoshi T, Koiwaya H, Toyama Y, Yokoyama S, Mitsutake Y, Chibana H, Itaya N, Okamura T, Imaizumi T: Platelet-derived microparticles augment the adhesion and neovascularization capacities of circulating angiogenic cells obtained from atherosclerotic patients. *Atherosclerosis* 227: 275-282, 2013

Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, Yoshida M, Tsuda H, Tamura K, Ochiya T: Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 7: ra63, 2014

Oosthuyzen W, Sime NE, Ivy JR, Turtle EJ, Street JM, Pound J, Bath LE, Webb DJ, Gregory CD, Bailey MA, Dear JW: Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis. *J Physiol* 591: 5833-5842, 2013

Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM: Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101: 942-948, 1985

Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D: Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 18: 883-891, 2012

Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D: The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 21: 139-146, 2011

Pfister SL: Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* 43: 428-433, 2004

Piccin A, Murphy WG, Smith OP: Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21: 157-171, 2007

Pienimaeki-Roemer A, Ruebsaamen K, Boettcher A, Orso E, Scherer M, Liebisch G, Kilalic D, Ahrens N, Schmitz G: Stored platelets alter glycerophospholipid and sphingolipid species, which are differentially transferred to newly released extracellular vesicles. *Transfusion* 53: 612-626, 2013

Poutsika DD, Schroder EW, Taylor DD, Levy EM, Black PH: Membrane vesicles shed by murine melanoma cells selectively inhibit the expression of Ia antigen by macrophages. *J Immunol* 134: 138-144, 1985

Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS: Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 41: 211-217, 2003

Raimondo F, Morosi L, Chinello C, Magni F, Pitto M: Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* 11: 709-720, 2011

Raisi A, Azizi S, Delirez N, Heshmatian B, Farshid AA, Amini K: The mesenchymal stem cell-derived microvesicles enhance sciatic nerve regeneration in rat: a novel approach in peripheral nerve cell therapy. *J Trauma Acute Care Surg* 76: 991-997, 2014

- Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grutzner S, Iberer M, Toth B, Pihusch R: Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* 22: 111-116, 2011
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ: Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20: 847-856, 2006
- Rink TJ, Sage SO: Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol* 52: 431-449, 1990
- Riteau B, Faure F, Menier C, Viel S, Carosella ED, Amigorena S, Rouas-Freiss N: Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol* 64: 1064-1072, 2003
- Rivadeneira L, Carestia A, Etulain J, Pozner RG, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M: Regulation of platelet responses triggered by Toll-like receptor 2 and 4 ligands is another non-genomic role of nuclear factor-kappaB. *Thromb Res* 133: 235-243, 2014
- Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, Sampol J, Dignat-George F: Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 7: 190-197, 2009
- Sabin K, Kikyo N: Microvesicles as mediators of tissue regeneration. *Transl Res* 163: 286-295, 2014
- Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, Campello E, Radu CM, Saggiorato G, d'Avella D, Scienza R, Cella G, Simioni P: Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thromb Haemost* 110: 378-385, 2013
- Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI: Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278: 20083-20090, 2003
- 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* 63: 4331-4337, 2003
- Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ: Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 263: 18205-18212, 1988
- Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ: Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 264: 17049-17057, 1989
- Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO: Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10: 1470-1476, 2008
- Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, Giebel B: Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 87: 146-150, 2011
- Soo CY, Song Y, Zheng Y, Campbell EC, Riches AC, Gunn-Moore F, Powis SJ: Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology* 136: 192-197, 2012
- Soop A, Hallstrom L, Frostell C, Wallen H, Mobarrez F, Pisetsky DS: Effect of lipopolysaccharide administration on the number, phenotype and content of nuclear molecules in blood microparticles of normal human subjects. *Scand J Immunol* 78: 205-213, 2013

Sprague DL, Elzey BD, Crist SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, Ratliff TL: Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* 111: 5028-5036, 2008

Stalboerger PG, Panetta CJ, Simari RD, Caplice NM: Plasmin proteolysis of endothelial cell and vessel wall associated tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 86: 923-928, 2001

Stone SR, Hofsteenge J: Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* 25: 4622-4628, 1986

Strasser EF, Happ S, Weiss DR, Pfeiffer A, Zimmermann R, Eckstein R: Microparticle detection in platelet products by three different methods. *Transfusion* 53: 156-166, 2013

Suades R, Padro T, Alonso R, Mata P, Badimon L: Lipid-lowering therapy with statins reduces microparticle shedding from endothelium, platelets and inflammatory cells. *Thromb Haemost* 110: 366-377, 2013

Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S: Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468: 834-838, 2010

Sverdlöv ED: Amedeo Avogadro's cry: what is 1 microg of exosomes? *Bioessays* 34: 873-875, 2012

Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ: Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics* 12: 587-598, 2013

Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D: Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 24: 766-769, 2014

Thaler J, Koder S, Kornek G, Pabinger I, Ay C: Microparticle-associated tissue factor activity in patients with metastatic pancreatic cancer and its effect on fibrin clot formation. *Transl Res* 163: 145-150, 2014

Thery C, Ostrowski M, Segura E: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 581-593, 2009

Torregrosa Paredes P, Gutzeit C, Johansson S, Admyre C, Stenius F, Alm J, Scheynius A, Gabrielsson S: Differences in exosome populations in human breast milk in relation to allergic sensitization and lifestyle. *Allergy* 69: 463-471, 2014

Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, Tancini B, Emiliani C: Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel)* 4: 152-170, 2013

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659, 2007

van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R: Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64: 676-705, 2012

van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R: Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 11 Suppl 1: 36-45, 2013

van der Pol E, Coumans FA, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, Sturk A, van Leeuwen TG, Nieuwland R: Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission

- electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* 2014
- van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R: Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 8: 2596-2607, 2010
- Varga Z, Yuana Y, Grootemaat AE, van der Pol E, Gollwitzer C, Krumrey M, Nieuwland R: Towards traceable size determination of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3: 10.3402/jev.v3.23298. eCollection 2014, 2014
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B: Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 7: 1057-1066, 2009
- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R: Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 1820: 940-948, 2012
- Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G: Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 7: e34653, 2012
- Ward JR, Bingle L, Judge HM, Brown SB, Storey RF, Whyte MK, Dower SK, Buttle DJ, Sabroe I: Agonists of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 are unable to modulate platelet activation by adenosine diphosphate and platelet activating factor. *Thromb Haemost* 94: 831-838, 2005
- Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J: Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med* 67: 206-213, 1979
- Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, Bora A, Lasser C, Lotvall J, Nolte-'t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Thery C, Wauben MH, Hochberg F: Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2: 10.3402/jev.v2i0.20360. eCollection 2013, 2013
- Wolf P: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13: 269-288, 1967
- Wu ZH, Ji CL, Li H, Qiu GX, Gao CJ, Weng XS: Membrane microparticles and diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17: 2420-2427, 2013
- Wysoczynski M, Ratajczak MZ: Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer* 125: 1595-1603, 2009
- Yang L, Wu XH, Wang D, Luo CL, Chen LX: Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Mol Med Rep* 8: 1272-1278, 2013
- Yaron S, Kolling GL, Simon L, Matthews KR: Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 4414-4420, 2000
- Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, Rensen PC, Koster AJ, Bertina RM, Osanto S: Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles* 2: 10.3402/jev.v2i0.21494. eCollection 2013 Dec 31, 2013a
- Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R: Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev* 27: 31-39, 2013b
- Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K: Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 21: 99-111, 2007

Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, Ju S, Mu J, Zhang L, Steinman L, Miller D, Zhang HG: Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 19: 1769-1779, 2011

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1636: 119-128, 2004

Zwaal RF, Schroit AJ: Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 89: 1121-1132, 1997

15.2 Verkkolähteet

Kuva 3 muokattu verkkolähteen kuvan pohjalta.

<http://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis/default.aspx>

(1.7.2014)