

Zunajcelični membranski vezikli v transfuzijskih pripravkih – biologija in klinična pomembnost

Extracellular membrane vesicles in blood products—biology and clinical relevance

Emilija Krstova Krajnc, Mojca Jež, Primož Rožman

Zavod RS za
transfuzijsko medicino

Korespondenca/ Correspondence:

Emilija Krstova Krajnc
e: emilija.krstova.krajnc@gmail.com

Ključne besede:

zunajcelični membranski vezikli; krvni pripravki; transfuzija; detekcija; biologija

Key words:

extracellular membrane vesicles; blood products; transfusion; detection; biology

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2015;
84: 809–19

Prispelo: 23. mar. 2015,
Sprejeto: 25. sept. 2015

Izvleček

Zunajcelični membranski vezikli (ZMV) so delci, ki se stalno odcepljajo od plazemskih membran vseh vrst celic, še posebej če so celice izpostavljene različnim oblikam stimulacije ali stresa. Tudi v procesu programirane celične smrti (apoptoze) celice razpadajo na različno velike vezikle. Ti delci na zunanji strani membrane izpostavljajo fosfatidilserin in nosijo značilne membranske označevalce celic, iz katerih izhajajo. Zunajcelične vezikle lahko osamimo iz najrazličnejših bioloških tekočin in medceličnine, kot so serum, možganska tekočina, urin, solze, slina, ali pa iz hranilnih medijev celičnih kultur. Od mnogih različnih metodoloških pristopov, ki se uporabljajo za analizo zunajceličnih veziklov, se najbolj uporablja pretočna citometrija. S to metodo lahko okarakteriziramo celično poreklo, velikost populacije, število in strukturo veziklov. Zunajcelični vezikli so prisotni in se kopičijo tudi v shranjenih krvnih komponentah, to je v eritrocitih, v trombocitih in v sveže zamrznjeni plazmi (SZP). Članek poudarja pomen ZMV v medcelični komunikaciji in njihovo vlogo v patogenezi različnih bolezni. Poseben poudarek je namenjen vlogi zunajceličnih veziklov v transfuzijskih pripravkih in njihovi klinični pomembnosti. Čeprav njihova vloga v fiziologiji in pri nastanku bolezni še ni popolnoma razjasnjena, si obetamo, da bodo v prihodnosti postali zelo informativen bioznačevalec pri različnih boleznih, v kontroli kakovosti transfuzijskih pripravkov pa označevalec kakovosti in varnosti.

Abstract

Extracellular membrane vesicles are fragments shed from plasma membranes off all cell types that are undergoing apoptosis or are being subjected to various types of stimulation or stress. Even in the process of programmed cell death (apoptosis), cells disintegrate into varying sized vesicles. They expose phosphatidylserine (PS) on the outer leaflet of their membrane, and bear surface membrane antigens reflecting their cellular origin. Extracellular membrane vesicles have been isolated from many types of biological fluids, including serum, cerebrospinal fluid, urine, saliva, tears and conditioned culture media. Flow cytometry is one of the many different methodological approaches that have been used to analyze EMVs. The method attempts to characterize the EMVs cellular origin, size, population, number, and structure. EMVs are present and accumulate in blood products (erythrocytes, platelets) as well as in fresh frozen plasma during storage. The aim of this review is to highlight the importance of extracellular vesicles as a cell-to-cell communication system and their role in the pathogenesis of different diseases. Special emphasis will be given to the implication of extracellular membrane vesicles in blood products and their clinical relevance. Although our understanding of the role of EMVs in disease is far from comprehensive, they display promise as biomarkers for different diseases in the future and also as a marker of quality and safety in the quality control of blood products.

Uvod

Evkariontske in prokariontske celice sproščajo vezikle, ki so delci sferičnih oblik, ograjeni z dvoplastnim slojem fosfolipidov. Za te delce uporabljajo tudi različne druge izraze, kot so „mikropartikli“ in „mikrovezikli“. Najbolj ustrezen termin je: zunajcelični membranski vezikli (ZMV). Te delce sta prvič opisala Chargaff in West leta 1946 v plazmi, revni s trombociti, in navedla, da imajo potencial za aktiviranje trombina.¹ Več kot 20 let kasneje je Peter Wolf (1967) to podcelično frakcijo določil z elektronsko mikroskopijo. Izkazalo se je, da je sestavljena iz majhnih veziklov, ki izvirajo iz trombocitov, zato jih je poimenoval »trombocitni prah«.² Zaradi uporabe različnih metod za osamitev in karakterizacijo in različnih načinov razvrščanja je poimenovanje zunajceličnih membranskih veziklov še vedno precej nesistematično in nekonsistentno. V praksi so vsi pripravki veziklov heterogeni. ZMV lahko osamimo z različnimi protokoli, ki omogočajo prevladovanje ene vrste nad drugo. Vezikle največkrat delimo po velikosti: najmanjši so eksosomi (40–100 nm), srednji so mikrovezikli (100–1.000 nm), največji pa so apoptotska telesca (glej Preglednico 1). Njihova majhnost je tudi eden od razlogov, zakaj so šele pred nekaj leti odkrili njihov pomen. Pri mnogih metodah za karakterizacijo celic so zaradi svoje majhnosti pod mejo detekcije, zato so bili dolgo spregledani.

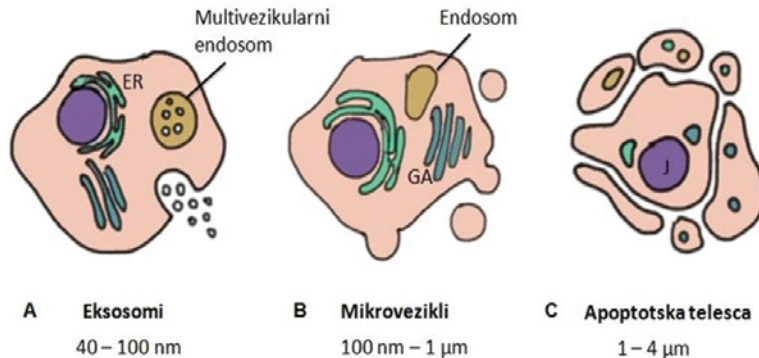
Vezikli igrajo pomembno vlogo v medcelični komunikaciji, saj lahko tovorijo molekule mRNA, miRNA ali celo proteine (citoplazmatske ali citosolne) in jih prenašajo med celicami. Tovor, ki ga prenašajo, lahko vpliva na procese v prejemniški celici. Vezava vezikla na tarčno celico in sproščanje njegove vsebine v celico lahko vnese nove molekule mRNA, ki se nato prevedejo v proteine in spremenijo lastnosti prejemniške celice. Sestava veziklov zrcali sestavo celice, iz katere nastajajo, razne molekule pa se vanje pakirajo selektivno. Zunajcelični membranski vezikli lahko na svoji površini nosijo tudi receptorje in z njimi stimulirajo tarčne celice ter tako povzročajo odziv v oddaljenih celicah.³

Eksosomi nastajajo z eksocitozo in se sproščajo iz multivezikularnega endosoma, ko se le-ta zlije s celično membrano. Mikrovezikli nastajajo neposredno z izvihavanjem celične membrane (eksocitoza) na določenih območjih, ki vsebujejo specifične lipide in proteine. Apoptotska telesca nastajajo v procesu apoptoze – celica razpade na več veziklov, ki se pozneje razgradijo. Ti vezikli so največji in vsebujejo celične organele in dele DNA (glej Sliko 1).

Zunajcelični membranski vezikli so torej mikropartikli, ki se odcepljajo iz vseh vrst celic, še posebej če so celice izpostavljene različnim oblikam stimulacije ali stresa.⁶ Stimulacijo lahko povzročajo kemični dražljaji, kot so citokini, trombin in endotoksini, ali fizikalni dražljaji, kot sta strižna napetost in hipoksija.⁷ ZMV so osamili iz različnih bioloških tekočin, vključno s serumom, možgansko tekočino, urinom, slino, solzami pa tudi iz običajnih celičnih gojišč.⁸

Njihova običajna koncentracija v krvi je od 5–50 µg/ml.⁹ Izražanje površinskih označevalcev iz starševske celice omogoča identifikacijo ZMV glede na njihov izvor, saj ima membranska sestava ZMV značilnosti celic, iz katerih izhajajo. Ločimo zunajcelične membranske vezikle iz trombocitov, levkocitov, eritrocitov ali pa iz endotelnih in drugih tkivnih celic.¹⁰

Plazemska membrana celic je sestavljena iz lipidnega dvosloja in je asimetrična – fosfolipidi v notranjem sloju so drugačni kot tisti v zunanem. Fosfatidilserin (FS) se normalno nahaja na notranji strani membrane. Povečanje koncentracije kalcija v celici je eden od dejavnikov, ki povzroča z encimi nadzorovano preoblikovanje plazemske membrane in premestitev anionskih fosfolipidov iz notranje plasti membrane v zunanjo,¹¹ kar privede do izvihavanja membrane in sproščanja ZMV.¹² Encimi, ki pri tem sodelujejo, so flopaze, flipaze in skramblaze. Med sproščanjem zunajceličnih membranskih veziklov se normalna asimetrična porazdelitev fosfolipidov v plazemski membrani poruši, kar privede do izpostavljenosti FS na površini celice in torej tudi na površini veziklov. Fiziološke funkcije ZMV in vpliv



Slika 1: Vrste in nastanek veziklov.⁵

A) Eksocitoza iz multivezikularnih endosomov – večji vezikel nastane že v notranjosti celice in je poln manjših veziklov, ki jih celica nato sprosti v okolje. B) Brstenje veziklov s celične membrane – membrana se izviha navzven in odcepi kot mehurček. C) Apoptotska telesca nastajajo v procesu apoptoze – celica razpade na več veziklov, ki se pozneje razgradijo. Ti vezikli so največji in vsebujejo celične organele in dele DNA. Okrajšave: J – jedro, ER – endoplazemski retikulum, GA – golgijev aparat

tozora, ki ga prenašajo v prejemniške celice v številnih tkivih, ostajajo večinoma neznane, vendar njihovo vlogo v patofiziologiji, onkologiji, imunologiji in pri diferenciaciji celic intenzivno raziskujejo.

Metode za odkrivanje in osamitev zunajceličnih membranskih veziklov

Najpogostejši pristopi za preiskovanje ZMV so pretočna citometrija, mikroskopija, dinamično sipanje svetlobe (*angl.* Dynamic Light Scattering, DLS), analiza nanodelcev s sledenjem (*angl.* Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), funkcionalni testi in testi ELISA.¹³ S temi metodami poskušamo okarakterizirati celično poreklo ZMV, določiti njihovo velikost in število in izražanje različnih označevalcev. S funkcionalni testi pa neposredno ali posredno določamo biološke funkcije ZMV in sicer preko določanja prokoagulantne aktivnosti, glede na prisotnost fosfolipidov, tkivnega faktorja ali drugih označevalcev na ZMV.¹⁴ Za določanje ZMV je potrebno zelo previdno predanalitično ravnanje in obdelovanje vzorcev krvi (flebotomija, transport, cikel zmrzovanja/odtavanja vzorcev in shranjevanje), da preprečimo eksperimentalne artefakte in umetno nastajanje ZMV.¹⁵

Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je najbolj razširjena metoda za identifikacijo in kvantifikacijo

zunajceličnih membranskih veziklov. Suspenzije veziklov označimo s fluorescentno konjugiranimi monoklonskimi protitelesi. S protitelesi nato identificiramo različne podtipove veziklov. Tako npr. anti-glikoforin A uporabimo za identifikacijo eritrocitnih zunajceličnih veziklov, anti-CD45 pa za levkocitne zunajcelične vezikle. Za trombocitne ZMV so najbolj pogosti označevalci površinski receptorji CD41, CD61 ali CD42b, oziroma od trombocitne aktivacije odvisni P-selektin (CD62). Protitelesa, specifična za VE-kadherin (CD144), E-selektin (CD62) in V-CAM1, se uporabljajo za identifikacijo endotelialnih ZMV. Aneksin-V se lahko uporablja kot splošni označevalec za identifikacijo, saj se nahaja na zunanji strani membrane večine veziklov.¹⁶ Glavna prednost pretočne citometrije je v tem, da lahko analiziramo veliko število ZMV v enem vzorcu, da identificiramo njihove celične značilnosti in da odkrijemo več antigenov hkrati na enem ZMV. Na žalost sedanji običajni pretočni citometri niso sposobni analizirati ZMV, manjših od 300 nm, torej ni primerna za eksosome. To težavo delno rešimo, če vezikle obarvamo s protitelesi z vezanimi fluorokromi, saj je tako dobljeni fluorescentni signal dovolj močan, da ga v osnovi lahko zaznamo s pretočnim citometrom. Kljub vsemu je pretočna citometrija še vedno najboljši pristop in je zlati standard za analizo zunajceličnih membranskih veziklov. Obstajajo tudi impedančni pretočni citometri ali novi digitalni pretočni citometri, ki omogočajo odkrivanje manjših veziklov.¹⁷ Podobno lahko tudi s testi ELISA določamo prisotnost antigenov na ZMV.

Mikroskopija

Transmisijska elektronska mikroskopija in atomska mikroskopija se lahko uporabljata za določitev fenotipskih lastnosti ZMV, vendar trenutno ne omogočata analize velikega števila veziklov ter njihove kvantifikacije. Zaradi dolgotrajne priprave in obdelave vzorcev ti metodi nista primerni za presejalno testiranje številnih vzorcev.

Dinamično sipanje svetlobe (*angl. Dynamic Light Scattering, DLS*)

DLS je fizikalna metoda, s katero lahko določimo velikost majhnih delcev v suspenziji. Vzorec, ki vsebuje ZMV, osvetlimo z laserjem. Svetloba se na ZMV sipa, način sipanja pa je odvisen od oblike, zgradbe in gibanja ZMV. Z analizo sipanja torej lahko določimo velikost veziklov.¹⁸ Prednost te tehnike je, da potrebujemo le majhno količino vzorca, hkrati pa lahko določimo koncentracijo in porazdelitev ZMV po velikosti.¹⁹

Analiza nanodelcev s sledenjem (*angl. Nanoparticle Tracking Analysis, NTA*)

Metoda deluje podobno kot prej opisana metoda DLS. Majhni delci v tekočini se gibljejo z Brownovim gibanjem, ki je sorazmerno z njihovo velikostjo. Analiza nanodelcev s sledenjem omogoča določanje velikosti in razporeditve delcev v tekočini.²⁰

Trenutno ni soglasja, kateri postopki za osamitev zunajceličnih membranskih veziklov so najboljše. V nadaljevanju se bomo osredinili na zunajcelične membranske vezikle, ki nastajajo iz različnih vrst krvnih celic.

Zunajcelični membranski vezikli v krvnih pripravkih

Že od leta 1970 je znano, da shranjene enote polne krvi, trombocitov in eritrocitov v supernatant sproščajo mikrodelce. Čim dlje enote shranjujemo, tem večje je število mikrodelcev v supernatantu, kar predstavlja le eno od sprememb oziroma poškodb, ki nastajajo ob shranjevanju.²¹

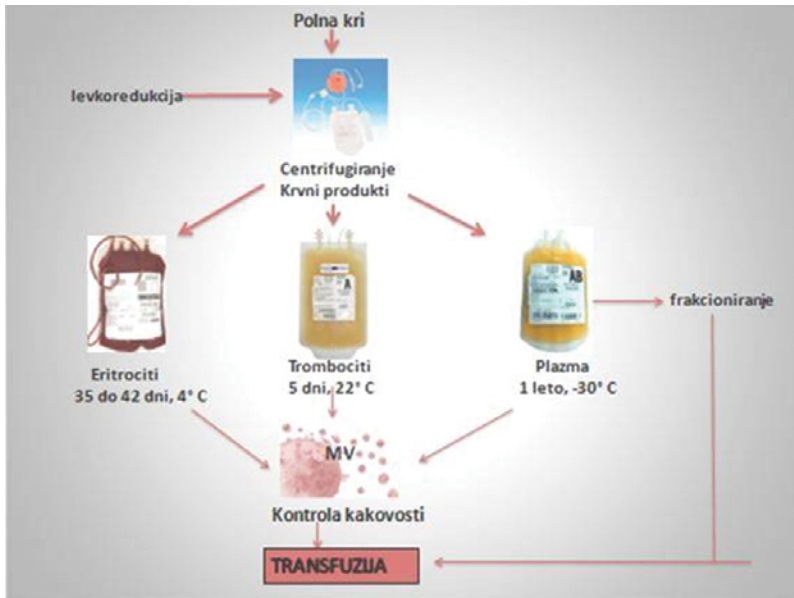
ZMV se nahajajo v vseh krvnih pripravkih, namenjenih transfuziji. Najdemo jih v celičnih (eritrocitnih, trombocitnih) koncentratih kakor tudi v sveži zmrznjeni plazmi.¹³ Ker se ZMV kopičijo v krvnih pripravkih med shranjevanjem, s transfuzijo več enot ali „starejših“ enot transfundiramo prejemniku večje število ZMV. Transfundirani

ZMV lahko povzročajo neželene učinke in inducirajo hiperkoagulabilno stanje, ki vodi do trombemboličnih zapletov. V določenih primerih transfuzije pa je lahko hiperkoagulabilno stanje koristno, saj zmanjša ali celo pomaga pri zaustavitvi krvavitve. V obeh primerih predstavlja kopičenje ZMV, njihovo celično poreklo in sestava parametre za nadzor kakovosti transfuzijskih pripravkov. Iz polne krvi lahko z različnimi kemičnimi in fizikalnimi (centrifugiranje, filtriranje, zmrzovanje) postopki pripravimo posamezne krvne komponente, ki so za transfuzijo bolj primerne in povzročajo manj neželenih učinkov. S filtriranjem skozi posebne absorpcijske filtre odstranimo 99,9 % levkocitov in zmanjšamo možnost nastanka nehemolitičnih vročinskih reakcij in prenos virusnih okužb. Glede na to, da levkocite ponavadi odstranimo že na začetku priprave krvnih pripravkov, ti ne prispevajo dosti k populaciji ZMV v končnih krvnih pripravkih (glej Sliko 2).

Zunajcelični membranski vezikli, nastali iz levkocitov, torej predstavljajo le majhen delež krvnih veziklov. Lahko izvirajo iz granulocitov, monocitov/makrofagov in limfocitov. Na svoji površini nosijo označevalce iz starševskih celic in vsebujejo citoplazemske proteine kot tudi bioaktivne lipide, vpletene v različne fiziološke procese. Sodelujejo pri hemostazi, trombozi, vnetjih, aterosklerozi in angiogenezi ter lahko vplivajo hkrati na vnetne in protivnetne procese. Vendar pa je razlaga teh podatkov iz različnih študij še vedno težka, predvsem zaradi pomanjkanja standardizacije eksperimentalnih pogojev in analiznih metod.

Zunajcelični membranski vezikli v eritrocitnih pripravkih

Zunajcelični membranski vezikli se od eritrocitov odcepljajo pri normalnem dozorevanju, pri staranju in tudi med shranjevanjem eritrocitov za transfuzijo. So praviloma manjše velikosti od tistih opisanih za druge vrste celic in v premeru merijo približno 150 nm; torej sodijo med mikrovezikle. Nastajanje eritrocitnih ZMV je proces membranskega preoblikovanja shranjenih eritrocitov, ki poteka celotni čas shranjeva-



Slika 2: Zunajcelični membranski vezikli v krvnih pripravkih.²² Krvne pripravke eritrocite, trombocite in plazmo pripravimo iz polne krvi s fizikalnimi metodami (centrifugiranje, filtriranje, zmrzovanje). ZMV se nahajajo v vseh krvnih pripravkih, namenjenih transfuziji.

nja. Med staranjem so eritrociti podvrženi različnim biokemičnim in fizikalnim spremembam. Te spremembe vključujejo oksidacijo lipidov in proteinov, deformacije in porušenje osmotske stabilnosti, kar povzroča precejšnjo hemolizo s sproščanjem prostega hemoglobina in železa.²³ Ostale spremembe vključujejo povečanje koncentracije lipidov, kalija, laktata, znižanje pH, glukoze, 2,3-difosfoglicerata, natrija in ATP. Eritrociti lahko izgubijo do približno 20 % membranske površine s sprostitvijo zunajceličnih membranskih veziklov. Z vezikulacijo se eritrociti znebijo škodljivih snovi, kot so denaturirani hemoglobin, band 3-neoantigeni ali imunoglobulin G, ki se sicer kopičijo v celicah. S sproščanjem ZMV eritrociti izločajo te molekule in se tako izognejo zgodnjemu staranju in razgradnji.¹³

Staranje eritrocitov opisujeta dva glavna modela: model eriptoze (*angl.* eryptosis) in model grupiranja proteina band 3 (anionski transporter). Eriptozo je mehanizem, podoben apoptozi. Eriptozo lahko stimuliramo z osmotskim šokom,²⁴ oksidativnim stresom,²⁵ pomanjkanjem energije in raznimi kemičnimi substancami. Ključni dogodek eriptoze je povečanje koncentracije citosolnega Ca^{2+} . Ca^{2+} sproži vezikulacijo²⁶ in preurejanje celične membrane.²⁷ Dotok ionskega kalcija v celico preko nespecifičnih kationskih kanalov vodi do aktiviranja različnih encimov, kot so kalpain ali skramblaze. Razlogi za vnos kalcija v celico so večinoma

neznani, vendar se kot najpogostejši vzrok omenjajo spremembe nespecifičnih kationskih kanalov.²⁸ Model grupiranja proteina band 3 povezuje oksidacijo hemoglobina z dimerizacijo proteina band 3 na membrani. Dimerizacija povzroči strukturno spremembo v zunajcelični domeni proteina band 3. Na ta način nastane neoantigen, ki eritrocite naredi prepoznavne za uničenje. V ZMV so opazili veliko molekul proteina band 3 in njegovih dimerov, kar kaže, da ima lahko vezikulacija vlogo pri odstranjevanju neoantigenov band 3 z membrane eritrocitov.

Pri obeh modelih pride na koncu do prenosa FS na zunanjo stran membrane in razgradnje citoskeleta, ki ji sledi sprememba fosforilacije banda 3. Te spremembe zagotovijo, da je membrana dovolj prožna, da lahko nastajajo zunajcelični membranski vezikli. Sestava eritrocitnih ZMV je odvisna od dražljajev, ki delujejo na celice, ali od *in vitro* oziroma *in vivo* pogojev, v katerih se eritrociti nahajajo.²⁹ Poročajo, da sproščanje eritrocitnih ZMV v shranjenih enotah eritrocitov povzroči spremembo oblike celic iz diskoidne preko ehinocitne do sferocitne, kar so opazovali z elektronskim mikroskopom.³⁰ V prvih desetih dneh shranjevanja do sprememb skoraj ne prihaja, nato pa sledi hitro spreminjanje od desetega do petnajstega dneva. Po petnajstem dnevu sledijo majhne enakomerne spremembe še od štiri do pet tednov. Obseg mikrovezikulacije v eritrocitnih pripravkih ni odvisen le od trajanja shranjevanja, ampak tudi od uporabljenih ohranitvenih raztopin, v kateri shranjujemo eritrocite: nižjo akumulacijo ZMV so ugotovili pri shranjevanju eritrocitov v ohranitveni raztopini CPD-SAGM (*angl.* citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol), ki učinkovito preprečuje oksidativni stres,³¹ a tudi po levkoredukciji.³²

Klinična pomembnost sprememb, do katerih prihaja med shranjevanjem, je slabo raziskana. Nekatera nepovratna poslabšanja shranjenih eritrocitov, kot so hemoliza, sproščanje kalija in kopičenje zunajceličnih membranskih veziklov, povezujemo z zmanjšano potranfuzijsko učinkovitostjo in povečanim tveganjem za nastanek neželenih učinkov pri prejemnikih.³³

Ugotovili so, da lahko eritrocitni ZMV *in vitro* vežejo komponente komplementa in na ta način delujejo provnetno preko aktivacije komplementnega sistema. To najverjetneje prispeva k protrombotičnemu stanju, ki ga opazujemo pri hemolitičnih boleznih, vključno z anemijo srpastih celic, paroksizmalno nočno hemoglobinurijo, talasemijo, dedno sferocitozo in eliptocitozo.^{32,34} Te ugotovitve kažejo, da so eritrocitni ZMV v shranjeni krvi morda razlog za nekatere s komplementom posredovane neželene učinke transfuzije.

Pri anemiji srpastih celic nenormalni hemoglobin S prispeva k nestabilnosti membrane in spodbuja razvoj ZMV.³⁵ Pri tej bolezni je število zunajceličnih membranskih veziklov v korelaciji s stopnjo znotrajžilne hemolize in stopnjo aktivacije strjevanja krvi³⁶ ter tako določa subklinične fenotipe s povečanimi zapleti.

Tung in sodelavci menijo, da so trombocitni in eritrocitni zunajcelični membranski vezikli, ki nastanejo s podaljšanim shranjevanjem krvnih pripravkov, potencialni posrednik TRALI (*angl.* Transfusion Related Acute Lung Injury).³⁷ Na modelu ovce so pokazali, da se žival odzove z indukcijo vnetja preko lipopolisaharidov, ki aktivirajo nevtrofilce; ko so transfundirali bodisi supernatant pet dni starih trombocitov ali supernatant dvainštirideset dni starih eritrocitov, je prišlo do sekvestracije nevtrofilcev v pljučih in razvoja TRALI pri 80–90 % poskusnih živali.³⁸ Poleg tega eritrocitni ZMV izražajo tudi krvnoskupinske antigene

starševskih celic, vključno z antigeni sistema Rhesus^{39,40} in so zato lahko potencialno imunogeni, če so prisotni v velikem številu. Eritrocitni ZMV tudi lahko prenašajo FS na površino raznih celic in jih lahko „označijo“ kot lažno apoptotične.⁴¹

Vloga eritrocitnih ZMV je torej dvojna. Omogočajo izločanje strupenih molekul ter odstranjevanje različnih celičnih signalov in tako izboljšujejo preživetje transfundiranih eritrocitov pri prejemnikih. Lahko pa okrepijo škodljive učinke, ki utegnejo poslabšati mikroobtok in na ta način prispevajo k poslabšanju zdravstvenega stanja bolnikov.¹⁰

Zunajcelični membranski vezikli v trombocitnih pripravkih

Trombociti so krvne celice brez jedra, ki nastanejo z razpadom megakariocitov. Od krvnih komponent so koncentrirani trombociti najbolj občutljivi na shranjevanje.⁴² Med shranjevanjem, ki traja največ 5–7 dni in poteka na sobni temperaturi 20–24 °C, prihaja do aktivacije, proteolize in sprememb v morfologiji ter izražanju površinskih receptorjev trombocitov.⁴³ Trombocitni ZMV se lahko sprostijo iz trombocitov v normalnih fizioloških pogojih ali kot posledica aktivacije in apoptoze. Prav trombocitni zunajcelični membranski vezikli predstavljajo največji delež veziklov pri zdravih osebah (70–90 % vseh v krvi)⁴⁴ in sicer v območju od 100–1.000/μl.⁴⁵ Nastajajo tudi med ob-

Tabela 1: Značilnosti eksosomov, mikroveziklov in apoptotskih teles.⁴

	Eksosomi	Mikrovezikli	Apoptotska telesa
Velikost (nm)	40–100	100–1.000	≥1.000
Nastanek	iz multivezikularnih teles v notranjosti celice	membrana se izviha navzven in odcepi kot mehurček	celica razpade na več veziklov
Označevalci	CD63, CD81, CD9, Tsg101, Alix, Hsc70, FS↓	z lipidnim raftom – povezane molekule (TF, flotilin), FS↑	FS
Vsebina	proteini, lipidi, mRNA in miRNA; redko DNA	proteini, lipidi, mRNA in miRNA; redko DNA	fragmentirana DNA in celični organeli

Okrajšave: Hsc70 – protein toplotnega šoka 70; FS – fosfatidilserin; TF – tkivni faktor; Tsg101 – Tumor susceptibility gene 101.

delavo krvnih celic in shranjevanjem⁴⁶ in lahko povzročajo neželene potransfuzijske učinke.⁴⁵

Sproščanje trombocitnih ZMV lahko *in vitro* izzovemo z različnimi dražljaji, kot so npr. epinefrin, adenozin difosfat, trombin, kolagen in kalcij, ki aktivirajo trombocite.⁴⁵ Pri predelavi krvi in s trombociti bogate plazme uporabljamo centrifugiranje in prenose med vrečkami. Vsi ti postopki predstavljajo mehaničen stres, povzročen s strižnimi silami v tekočini, ki poveča nastajanje veziklov. Gracia in sodelavci so ugotovili, da trombocitni ZMV vsebujejo površinske membranske proteine, kot so GPIIIa, IIb in P-selektin.⁴⁷

Trombocitni ZMV imajo klinično pomembno vlogo pri koagulaciji pri bolnikih z levkemijo in trombocitopenijo. Kljub nizkemu številu trombocitov ti bolniki nimajo težav s krvavitvami, kar prepisujejo visokemu številu cirkulirajočih trombocitnih mikroveziklov. Zaradi njihove visoke prokoagulantne aktivnosti so Boulanger in sodelavci predlagali, da verjetno prispevajo k patogenezi arterijskih trombotičnih bolezni. Številne študije so pokazale, da so lahko zunajcelični membranski vezikli v krvnem obtoku zanimiv napovedni označevalec za aterosklerotične žilne bolezni.⁴⁸

Michelsen in sodelavci so prikazali, da imajo bolniki, ki so preživeli miokardni infarkt, povečano število trombocitnih veziklov.⁴⁹ Ugotovili so, da trombogeni tkivni faktor (*angl.* tissue factor, TF) na levkocitnih zunajceličnih membranskih veziklih sodeluje pri spontanem nastajanju tromboze.⁵⁰ Kot vir cirkulirajočega TF so predlagali monocite in nevtrofilce. Takšen primer vpliva trombocitnih ZMV na koagulacijo *in vivo* je Scottov sindrom, redka dedna hemoragična bolezen, povezana s pomanjkanjem aktivnosti encima skramblaza, ki je odgovoren za naključno potovanje fosfolipidov preko celične membrane. Pri pomanjkanju skramblaze se ob aktiviranju trombocitov fosfolipidne površine ne prenašajo na zunanjo stran celične membrane. V tem primeru ne pride do ekspresije FS niti do sproščanja zunajceličnih membranskih veziklov. Tako ni katalitične površine za interakcijo koagulacijskih faktorjev, zato je sistem koagulacije

zelo oslavljen. Pride do hemoragične diateze.⁵¹

ZMV iz trombocitov so kot napovedni označevalec raziskovali pri sindromu koronarnih arterij, anevrizmah, trombozah, pljučni emboliji, trombotično-trombocitopenični purpuri, paroksizmalni nočni hemoglobinuriji, s heparinom inducirani trombocitopeniji, anemiji srpastih celic, sepsi, revmatoidnih boleznih, sklerozah, preeklampsiji, mieloproliferativnih boleznih in nekaterih vrstah raka.⁵² Številne študije so pokazale, da trombocitni vezikli inducirajo angiogenezo in sodelujejo pri metastaziranju raka.⁵³ Po drugi strani pa razvijajo tudi več protokolov zdravljenja raka, z zunajceličnimi membranskimi vezikli. Ker jih lahko osamimo iz periferne krvi in so torej enostavno dosegljivi, so zanimivi označevalci za diagnostiko raka. Molekule, ki sodelujejo pri nastajanju zunajceličnih membranskih veziklov in njihovem sproščanju bi bile lahko v prihodnosti pomembne tarče protirakavih učinkovin. Menijo tudi, da bi zunajcelične membranske vezikle lahko uporabili kot sistem za vnos zdravičnih učinkovin (npr. miRNA) v rakave celice, npr. v kombinaciji s kemoterapijo. Aktivirani trombociti in trombocitni ZMV lahko sproščajo tudi rastni faktorji, kot so vaskularni endotelni rastni faktor (*angl.* vascular endothelial growth factor, VEGF), trombocitni rastni faktor (*angl.* platelet derived growth factor, PDGF) in bazični fibroblastni rastni faktor (*angl.* basic fibroblast growth factor, bFGF), ki imajo proangiogeno aktivnost in spodbujajo rast tumorja.⁵⁴ ZMV lahko uporabimo za napovedovanje hiperkoagulabilnih stanj pri bolnikih z rakom⁵⁵ in pri bolnikih z večjim tveganjem metastaziranja. Trombocitni ZMV lahko prispevajo k patofiziologiji revmatoidnega artritisa. Povzročajo tromboze pri okužbah in vnetih sklepih zaradi stimulacije kolagenskih receptorjev, GPVI.⁵⁶

Zunajcelični membranski vezikli v pripravkih iz plazme

Zunajcelični membranski vezikli v sveži zmrazjeni plazmi povzročajo nastanek krvnih strdkov in vzdrževanje hemostaze zato, ker izpostavljajo FS, ki zagotavlja vezna me-

sta za aktivirane faktorje strjevanja krvi.⁵⁷ Sposobnost SZP, da ustvarja trombin in tvori strdek, je ključnega pomena za izboljšanje hemostaze *in vivo*. Pretočna citometrija je pokazala, da je največ ZMV v plazmi, pripravljeni iz polne krvi, ki je bila čez noč shranjena na 4 °C. Ugotovili so, da imajo ZMV iz sveže zmrznjene plazme minimalen učinek na koagulacijske teste, npr. protrombinski čas (PČ) in koagulacijske faktorje (faktor VIII, antitrombin III ...).⁵⁷ Število in celično poreklo ZMV v SZP je drugačno v primerjavi s tistimi v periferni krvi.⁵⁷ Kopičenje eritrocitnih ali trombocitnih ZMV v SZP je odvisno od tega, ali so levkodeplekcijo izvedli na polni krvi ali po ločitvi plazme.⁵⁸

S filtriranjem zmanjšamo število trombocitnih ZMV v krvnih pripravkih, povečamo pa število eritrocitnih ZMV v nastalem pripravku. Daljše shranjevanje krvi pred ločitvijo in zmrzovanjem plazme tudi prispeva k nastanku trombocitnih ZMV in s tem izboljša njeno hemostazno funkcionalnost. Plazemske enote, pripravljene iz polne krvi, zadržane čez noč na 4 °C pred predelavo, vsebujejo znatno povečano število ZMV v primerjavi s plazmo, ki je bila predelana 8 ur po odvzemu krvi.⁵⁹

Zunajcelični membranski vezikli iz matičnih celic

Zaradi prenosa proteinov, maščob in nukleinskih kislin delujejo ZMV iz matičnih celic parakrino/endokrino in sodelujejo pri signalizaciji med matičnimi in zreliimi diferenciranimi celicami. Lahko povzročajo tudi epigenetske spremembe v tarčnih celicah in na ta način uravnavajo rast, regeneracijo in diferenciacijo celic. Skupaj z matičnimi celicami prispevajo k regeneraciji po poškodbah.⁶⁰

Ratajczak in sodelavci⁶¹ so pokazali, da zunajcelični vezikli iz embrionalnih matičnih celic povečajo potentnost krvotvornih matičnih celic s prenosom določenih molekul mRNA, ki zapisujejo transkripcijske dejavnike. Zunajcelični membranski vezikli, ki se sproščajo iz poškodovanih tkiv, lahko spodbujajo regeneracijo.

Najpogostejše uporabljena vrsta matičnih celic v regenerativni medicini so mezenhim-

ske matične celice (MMC), multipotentne matične celice, ki se lahko diferencirajo v celice kosti, hrustanca, mišic in maščobne celice.⁶² MMC sproščajo znatno količino ZMV, ki vsebujejo razne molekule mRNA in zrele miRNA.⁶³ Te se lahko prenesejo do prejemniških celic in na ta način povzročajo funkcionalne in fenotipske spremembe. Presajene MMC spodbujajo angiogenezo, povečujejo preživetje celic na mestu poškodbe in spodbujajo njihovo proliferacijo ter uravnavajo vnetni proces. Najnovejše ugotovitve kažejo tudi, da igrajo zunajcelični membranski vezikli iz MMC določeno regenerativno vlogo, vključno z regeneracijo ledvic, srca, jeter in živcev. Timmers in sodelavci⁶⁴ so dokazali, da aplikacija medija, v katerem so gojili človeške MMC, znatno zmanjša pogostost infarkta v prašičjih in mišjih modelih ishemije/reperfuzije. Kasneje je ista skupina dokazala, da je učinek zaščite srca posledica sproščanja ZMV iz MMC.⁶⁵

V drugi študiji so Herrera in sodelavci⁶⁶ pokazali, da po vnosu ZMV iz humanih jetrnih matičnih celic pride do inducirane proliferacije in odpornosti na apoptozo pri človeških in podganjih hepatocitih. Ta učinek so dosegli s horizontalnim prenosom specifičnih podskupin mRNA in obdelavo ZMV z encimom RNazo pred uporabo. Ko so ZMV uporabili *in vivo*, so pospešili morfološko in funkcionalno okrevanje jeter v modelu 70 % hepatektomiranih podgan.

Torej je vloga ZMV v regenerativni medicini samo delno raziskana, ponuja nove in zanimive možnosti uporabe ZMV za spodbujanje tkivne regeneracije. Glede na obetavne rezultate, uporabe veziklov iz MMC lahko v bližnji prihodnosti pričakujemo tudi humane klinične študije. Poleg tega uporaba ZMV namesto matičnih celic predstavlja popolnoma novo terapevtsko strategijo. Glavna prednost pri tem je, da lahko ZMV v laboratoriju spremenimo po svojih željah in vanje tudi naložimo molekule s ciljnim učinkom. Zaradi svoje majhnosti so manj imunogeni, kar zanesljivo predstavlja prednost pred alogenskimi celicami.

Zaključek

Celice so tako *in vivo* kot *in vitro* veliko bolj dinamične, kot si običajno predstavljamo. Stalno se premikajo, komunicirajo s sosednjimi celicami, izločajo hormone ali druge signalne molekule. Od vseh vrst celic se odcepljajo zunajcelični membranski vezikli, ki so le eden od načinov medcelične komunikacije.

Pri raziskavah ZMV se soočamo s številnimi izzivi, povezanimi najprej s standardizacijo metodologije. V zadnjem desetletju je bil dosežen velik napredek. Toda naše razumevanje molekularnih mehanizmov, preko

katerih zunajcelični membranski vezikli delujejo, še vedno nepopolno. Merila za identifikacijo različnih vrst veziklov so le delno določena. Biološkega pomena zunajceličnih membranskih veziklov v zdravju in pri boleznih še vedno ne razumemo. Za povečanje njihove klinične koristnosti bo potrebno razviti nove in zanesljive instrumente za njihovo zaznavanje in osamitev ter standardizirati laboratorijske meritve. Zunajcelični membranski vezikli bodo v prihodnosti zanimivi biološki označevalci za različne bolezni, uporabni bodo tudi pri posredovanju določenih, regenerativnih funkcij, kot je npr. spodbujanje angiogeneze in proliferacije.

Literatura

- Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946; 166: 189–97.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Haematol Br J* 1967; 13: 269–88.
- Mause Sebastian F, Weber C. Microparticles:protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047–57.
- Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transpl* 2012; 27: 3037–42.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014; 306: 621–33.
- Van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 2012; 64: 676–705.
- Vanwijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, VanBavel E, Kublickiene KR. Isolated microparticles, but not whole plasma from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am J Obs Gynecol* 2002; 187: 1686–93.
- Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 15–26.
- Hoyer FF, Nickenig G, Werner N. Microparticles-messengers of biological information. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 2250–56.
- Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, et al. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res.* 2012; 93: 633–44.
- Zwaal RF, Comfurius P, Bevers E. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 971–88.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles:two sides of the coin. *Physiology* 2005; 20: 22–7.
- Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells:an approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang.* 2008; 95: 288–97.
- Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104: 93–102.
- Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 437–46.
- Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry:sources of variability within the assay. *Thromb Res.* 2011; 127: 370–77.
- Zwicker JI, Lacroix R, Dignat-George F, Furie BC, Furie B. Measurement of platelet microparticles. *Methods Mol Biol* 2012; 788: 127–39.
- Lawrie AS, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie IJ HP. Microparticles sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 2009; 96: 206–12.
- Xu Y, Nakane N, Maurer-Spurej E. Novel test for microparticles in platelet-rich plasma and platelet concentrates using dynamic light scattering. *Transfusion* 2011; 51: 363–70.
- Gyorgy B, Szabo TG, Turiac L, Wright M, Herczeg P, Ledecz Z et al. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle(cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One* 2012; 7.
- Rumsby MG, Trotter J, Allan D, Michell R. Recovery of membrane micro-vesicles from human erythrocytes stored for transfusion:a mechanism for the erythrocyte discocyte-to-spherocyte shape transformation. *Biochem Soc Trans* 1977; 5: 126–28.

22. Kriebardis A, Antonelou M, Stamoulis K, Papassideri I. Cell-derived microparticles in stored blood products: innocent bystanders or effective mediators of post-transfusion reactions? *Blood Transfus* 2012; 10 Suppl 2: 25–38.
23. Card RT. Red cell membrane changes during storage. *Transfus Med Rev* 1988; 2: 40–7.
24. Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F et al. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ* 2003; 10: 249–56.
25. Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15: 1–18.
26. Allan D, Michell RH. Calcium iondependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions. *Biochem J* 1977; 166: 495–99.
27. Niemoeller OM, Akel A, Lang PA, Attanasio P, Kempe DS, Hermle T, et al. Induction of eryptosis by cyclosporine. *Naunyn Schmiedberg Arch Pharmacol* 2006; 374: 41–49.
28. Lang F, Gulbins E, Lerche H, Huber SM, Kempe DS, Foller M. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22: 373–80.
29. Tissot JD, Rubin O, Canellini G. Analysis and clinical relevance of microparticles from red blood cells. *Curr Opin Hematol* 2010; 17: 571–7.
30. Shukla SD, Coleman R, Finean JB, Michell RH. The use of phospholipase c to detect structural changes in the membranes of human erythrocytes aged by storage. *Biochim Biophys Acta* 1978; 512: 341–9.
31. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion* 2010; 50: 376–89.
32. Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: submicron clotting bombs? *Blood Transfus* 2010; 8: s31–s38.
33. Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotny VM, Bos H, et al. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 2008; 48: 827–35.
34. Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y, Chiba S, Nino-miya H. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2011; 152: 631–9.
35. Bosman GJ. Erythrocyte aging in sickle cell disease. *Cell Mol Biol* 2004; 50: 81–6.
36. van Beers EJ, Schaap MC, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009; 94: 1513–9.
37. Tung JP, Fung YL, Nataatmadja M, Colebourne KI, Esmaeel HM, Wilson K, et al. A novel in vivo ovine model of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Vox Sang* 2011; 100: 219–30.
38. Tung JP, Fraser JF, Nataatmadja M, Barnett, Adrian G, Colebourne, et al. Dissimilar respiratory and hemodynamic response in TRALI induced by stored red cells and whole blood platelets. *Blood* 2010; 116: 484–5.
39. Greenwalt TJ. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion* 2006; 46: 143–52.
40. Oreskovic RT, Dumaswala UJ, Greenwalt TJ. Expression of blood group antigens on red cell microvesicles. *Transfusion* 1992; 32: 848–9.
41. Liu R, Klich I, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Zubas-Surma EK. Erythrocyte-derived microvesicles may transfer phosphatidylserine to the surface of nucleated cells and falsely “mark” them as apoptotic. *Eur J Haematol* 2009; 83: 220–9.
42. Shrivastava M. The platelet storage lesion. *Transfus Apher Sci* 2009; 41: 105–13.
43. George JN, Pickett EB, Heinz R. Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion* 1988; 28: 123–6.
44. Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol* 2007; 137: 36–48.
45. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 2006; 20: 1–26.
46. Saas P, Angelot F, Bardiaux L, Seilles E, Garnache-Ottou F, Perruche S. Phosphatidylserine expressing cell by products in transfusion: A pro-inflammatory or an anti-inflammatory effect? *Transfus Clin Biol* 2012; 19: 90–7.
47. Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res* 2005; 4: 1516–21.
48. Boulanger CM, Amabile N, Tedqui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 180–6.
49. Michelsen AE, Brodin E, Brosstad F, Hansen JB. Increased level of platelet microparticles in survivors of myocardial infarction. *Sc Clin Lab Invest* 2008; 68: 386–92.
50. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2311–5.
51. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1636: 119–28.
52. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cell. *Blood* 1997; 89: 1121–32.
53. Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR, Lee SN. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol* 2004; 124: 376–84.
54. Falanga A, Tartari CJ, Marchetti M. Microparticles in tumor progression. *Thromb Res* 2012; 129 Suppl :s132–6.
55. Toth B, Liebhardt S, Steinig K, Ditsch N, Rank A, Bauerfeind I et al. Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. *Thromb Haemost* 2008; 100: 663–9.
56. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010; 327: 580–3.

57. Lawrie AS, Harrison P, Cardigan RA, Mackie IJ. The characterization and impact of microparticles on haemostasis within fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 2008; 95: 197–204.
58. Krailadsiri P, Seghatchian J, Macgregor I, Drummond O, Perrin R, Spring F, et al. The effects of leukodepletion on the generation and removal of microvesicles and prion protein in blood components. *Transfusion* 2006; 46: 407–17.
59. Lawrie AS, Cardigan RA, Williamson LM, Machin SJ, Mackie IJ. The dynamics of clot formation in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* 2008; 94: 306–14.
60. Quesenberry PJ, Aliotta JM. The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches and microvesicles. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 137–47.
61. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847–56.
62. Rožman P, Jež M. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo. *Pojmovnik*. Celje: Mohorjeva družba; 2011. p. 289.
63. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20: 1053–67.
64. Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hofer IE, Doevedans PA et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res*. 2007; 1: 129–37.
65. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med*. 2011; 6: 481–92.
66. Herrera MB, Fonsato V, Gatti S, Deregibus MC, Sordi A, Cantarella D, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J Cell Mol Med*. 2010; 14: 1605–18.