

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Speciální chemicko-biologické obory:
Študijný odbor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Evelína Šťastná

Detekcia mikrovezikúl a exozómov u imunitne-podmienенých ochorení
Microvesicle and exosome detection in immune-related diseases

Bakalárska práca

Školiteľ: **RNDr. Karel Drbal, Ph.D.**

Praha, 2018

Prehlásenie

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená na získanie iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, dňa 10. 05. 2018

.....

Evelína Šťastná

Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať svojmu školiteľovi, RNDr. Karlovi Drbalovi, PhD. za odborné vedenie a cenné rady pri písaní bakalárskej práce. Taktiež by som sa rada poďakovala mojej rodine a priateľom za neustálu podporu a motiváciu.

Abstract

Exosomes (ES) and microvesicles (MV), collectively called extracellular vesicles (EV), are submicroscopic vesicles encapsulated by a phospholipid bilayer. Smaller ES (40 – 100 nm) originate in endosomal compartment, while larger MV (50 – 1000 nm) shed from cell plasma membrane. EV are secreted by all types of cells. They consist of lipids and proteins, but their composition varies according to the cell they originate from. In addition, they differ in the cargo they transport (DNA, RNA and proteins). They occur in every bodily fluid in much higher amounts compared to the original cells themselves, what makes them an attractive and accessible biomarker of autoimmunity diseases, cardiovascular diseases or tumours. For detection of EV, sensitive flow cytometry (FCM) is used, which I am going to compare to alternative methodologies.

Part of this work will be description of EV biogenesis and then I will focus on the role of EV in coagulation and inflammation related to autoimmune diseases, more specifically in rheumatoid arthritis (RA).

Keywords:

microvesicles, exosomes, biomarker, immune system, autoimmune diseases, inflammatory diseases, flow cytometry

Abstrakt

Exozómy (ES) a mikrovezikuly (MV), súhrnne extracelulárne vezikuly (EV), sú submikroskopické vezikuly obalené fosfolipidovou dvojvrstvou. Menšie ES (40 – 100 nm) majú pôvod v endozomálnom kompartmente, zatiaľ čo väčšie MV (50 – 1000 nm) sú odvodené od cytoplazmatickej membrány bunky. EV sú vylučované všetkými typmi buniek. Pozostávajú z lipidov a proteínov, ale ich zloženie sa líši v závislosti od stavu bunky, z ktorej pochádzajú. Rovnako sa líšia aj obsahom, ktorý transportujú (DNA, RNA a proteíny). Vyskytujú sa vo všetkých telových tekutinách v oveľa vyššom počte ako samotné bunky, čo z nich robí atraktívny a prístupný biomarker autoimunitných ochorení, kardiovaskulárnych ochorení alebo nádorov. Na detekciu EV je používaná citlivá prietoková cytometria (FCM), ktorú budem porovnávať s alternatívnymi metodikami.

Súčasťou práce bude popis biogenézy EV a zameriam sa na rolu EV pri koagulácii a zápale v imunitne-podmienených poruchách, akými sú autoimunitné ochorenia, konkrétne reumatoidná artritída (RA).

Kľúčové slová:

mikrovezikuly, exozómy, biomarker, imunitný systém, autoimunitné ochorenia, zápalové ochorenia, prietoková cytometria

Zoznam skratiek

12-LO	12-lipoxygenáza	12-lipoxygenase
12(S)-HETE	kyselina 12(S)-hydroxyeikosatetraoická	12-hydroxyeicosatetraenoic acid
AFM	mikroskopia atomárnych síl	atomic force microscopy
APC	bunka prezentujúca antigén	antigen presenting cell
BCR	B-bunkový receptor	B-cell receptor
DAMP	molekulový vzor asociovaný s nebezpečím	damage associated molecular pattern
DLS	dynamický rozptyl svetla	dynamic light scattering
EC	endoteliálna bunka	endothelial cell
ELISA		enzyme linked immunosorbent assay
ES	exozóm	exosome
ESCRT		endosomal sorting complex required for transport
EV	extracelulárna vezikula	extracellular vesicle
FCM	prietoková cytometria/prietokový cytometer	flow cytometry/flow cytometer
FSC	priamy rozptyl	forward scatter
HSP	proteín teplotného šoku	heat-shock protein
IC	imunokomplex	immune complex
Ig	imunoglobulín	immunoglobulin
ILV	intraluminálna vezikula	intraluminal vesicle
MHC		major histocompatibility complex
miRNA	mikroRNA	microRNA
MP	mikropartikula	microparticle
MV-IC	mikrovezikula obsahujúca imunokomplex	immune complex-containing microvesicle
MV	mikrovezikula	microvesicle
MVB	multivezikulárne teliesko	multivesicular body
MVE	multivezikulárny endozóm	multivesicular endosome
NTA		nanoparticle tracking analysis
OMV	vezikula vonkajšej membrány	outer membrane vesicle

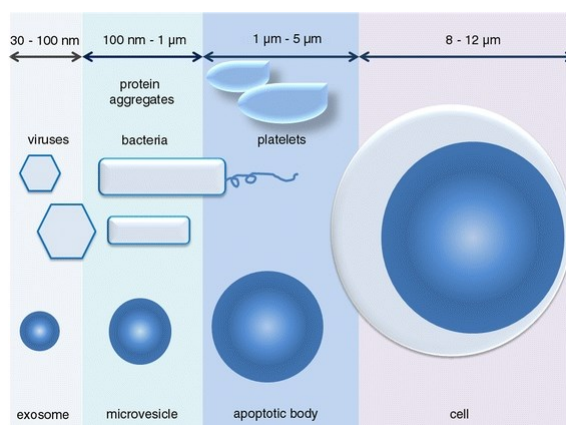
PAD	peptidyl-arginín deamináza	peptidyl-arginine deaminase
PAMP	vzor asociovaný s patogénom	pathogen associated molecular pattern
PC	fosfatidylcholín	phosphatidylcholine
PE	fosfatidyletanolamín	phosphatidylethanolamine
PI	fosfatidylinozitol	phosphatidylinositol
PM	plazmatická membrána	plasmatic membrane
PMP	mikropartikula krvných doštičiek	platelet microparticle
PMV	mikrovezikula krvných doštičiek	platelet microvesicle
PRR		pattern recognition receptor
PS	fosfatidylserín	phosphatidylserine
RA	reumatoidná artritída	rheumatoid arthritis
RI	refrakčný index	refraction index
RPS	snímanie odporového impulzu	resistive pulse sensing
rRNA	ribosomálna RNA	ribosomal RNA
SLE	systemový lupus erythematosus	systemic lupus erythematosus
SM	sfgangomyelín	sphingomyelin
sPLA ₂	sekretovaná fosfolipáza A ₂	secreted phospholipase A ₂
SSC	bočný rozptyl	side scatter
SSI	index citlivosti rozptylu	scatter sensitivity index
SUMO		small ubiquitin modifier
TCR	T-bunkový receptor	T-cell receptor
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia	transmission electron microscopy
TF	tkanivový faktor	tissue factor
TNF	nádory nekrotizujúci faktor	tumour necrosis factor
tRNA	transferová RNA	transfer RNA
VLP	vírusu podobná častica	virus-like particle
vtRNA		vault RNA

Obsah

1. Úvod.....	1
2.1 Hromadná detekcia	5
2.2 Detekcia jednotlivých častíc	6
2.2.1 Prietoková cytometria	8
2.2.2 Konvenčná a dedikovaná prietoková cytometria	10
2.3 Porovnanie detekcií	11
3. Biogenéza exozómov	12
3.1 Formácia intraluminálnych vezikúl	12
3.1.1 Biogenéza exozómov závislá na ESCRT komplexe	13
3.1.2 Biogenéza exozómov nezávislá na ESCRT komplexe	14
4. Biogenéza mikrovezikúl.....	15
4.1 Mikrovezikuly krvných doštičiek.....	16
5. Molekulárne zloženie extracelulárnych vezikúl.....	17
5.1 Zloženie exozómov.....	17
5.2 Zloženie mikrovezikúl.....	19
6. Zápal a autoimunitné ochorenia	20
6.1 Zápal a koagulácia	20
6.2 Mikrovezikuly krvných doštičiek za fyziologického stavu	21
6.3 Patológie súvisiace s mikrovezikulami krvných doštičiek	22
6.4 Reumatoidná artritída	22
6.4.1 Citrulinácia v reumatoidnej artritíde	23
6.4.2 Zápal v reumatoidnej artritíde.....	24
7. Záver.....	25
8. Použitá literatúra	27

1. Úvod

Exozómy („exosome“ – ES, v literatúre nazývané aj nanovezikuly [1]), mikrovezikuly („microvesicle“ – MV, nazývané tiež ektozómy, mikropartikuly (MP) [2]) a apoptotické telieska patria spoločne do heterogénnej skupiny extracelulárnych vezikúl („extracellular vesicles“ – EV). Všetky typy sú obalené fosfolipidovou dvojvrstvou, ale líšia sa veľkosťou, mechanizmom biosyntézy a obsahom, ktorý nesú. ES sú menšie (40 – 100 nm) a pochádzajú z endozomálneho kompartmentu bunky, kým väčšie a veľkosťou heterogénnejšie MV (50 – 1000 nm) sú odvodené od cytoplazmatickej membrány („plasmatic membrane“ – PM) bunky [3]. Najväčšie sú apoptotické telieska (1000 – 5000 nm), ktoré sú pozostatkom rozpadnutej apoptotickej bunky [4] (Obr. 1). Medzi ďalšie typy vezikúl patria onkozómy a vírusu podobné častice („virus-like particle“ – VLP) [5].



Obr. 1 Veľkostné rozpätie EV: ES patria do rovnakej veľkostnej skupiny, ako vírusy; veľkosť MV sa prekrýva s veľkosťou baktérií a proteínových agregátov (napríklad imunokomplexy) a apoptotické telieska sa veľkosťou podobajú krvným doštičkám. Prevzaté z [6]

EV sú dôležitou súčasťou biologických procesov. Sprostredkovávajú medzibunkovú komunikáciu vitálnu pre zachovanie homeostázy u mnohobunkových organizmov. Eukaryotické bunky všetkých typov, hematopoetického aj nehematopoetického pôvodu vylučujú EV. Pritom v ľudskom tele je viac ako 90% hematopoetických buniek [7]. EV sú prítomné vo všetkých telových tekutinách: v plazme, slinách, moči, materskom mlieku, žlči, slzách, semene, nosovom hliene, sekrétoch, amnionovej tekutine, cerebrospinálnej tekutine, bronchoalveolárnej laváži, synoviálnej tekutine, ascitoch, výtoku z očí a pleurálnom výtoku [8] a to v oveľa vyššej koncentrácii, ako samotné bunky. Podľa metódy nanoparticle tracking

analysis (NTA) je koncentrácia fluorescenčne označených EV v ľudskej plazme $1,2 \times 10^{10}$ častíc/ml [1]. V krvi sú EV pochádzajúce z krvných doštičiek, erytrocytov, granulocytov, monocytov, lymfocytov a endoteliálnych buniek („endothelial cell“ – EC). Nadprodukcia EV súvisí s fyziologickými a patofyziologickými stavmi, akými sú bunková adhézia, apoptóza, nádorové bujnenie, hemostáza (zastavenie krvácania), angiogenéza/neovaskularizácia (tvorba nových ciev), trombóza, kardiovaskulárne ochorenia ale aj normálne či patologické tehotenstvo [9]. Pri poranení prispievajú k iniciácii koagulácie (zrážania krvi) [10]. EV sú vylučované aj prokaryotickými bunkami: G⁻ baktérie uvoľňujú vezikuly z vonkajšej membrány („outer membrane vesicle“ – OMV), s obsahom virulentných faktorov. EV využívajú vo svojom životnom cykle aj vírusy, ktoré v nich transportujú vírusové proteíny a RNA z infikovaných do neinfikovaných buniek [11]. EV tak hrajú významnú imunologickú rolu pri šírení infekcie, či sú odvodené od patogénu, alebo hostiteľa a modifikujú imunitnú odpoveď pri mikrobiálnych ochoreniach pozitívne aj negatívne. Ovplyvňujú vrodenu aj adaptívnu imunitu, pretože EV sú navzájom vymieňané medzi rôznymi typmi imunitných buniek [12].

EV sa skladajú z proteínov, lipidov, uhl'ovodíkov a nukleových kyselín (DNA, RNA). Obsahujú cytoskeletárne molekuly (aktín, tubulín), adhezívne molekuly, signálne – transdukčné proteíny (G-proteíny, kinázy), cytokíny, chemokíny, cytoplazmatické enzýmy, proteinázy, molekuly ochraňujúce pred lýzou komplementom (CD55, CD59) a ďalšie špecifické antigény pre stimuláciu adaptívnej imunitnej odpovede [13]. Zloženie je dynamické a závisí od typu bunky, z ktorej sú odvodené ako aj od jej fyziologického a patologického stavu. Keďže EV sú generované zdravými aj patologickými bunkami, odzrkadľujú genetický a proteomický stav danej bunky. EV figurujú ako nosič aj pri odstraňovaní nepotrebných a prebytočných vnútrobunkových komponentov, ktoré vynášajú von z bunky. Z cirkulácie ich eliminujú fagocytujúce bunky, pre ktoré sa stanú cieľom po rozpoznaní napríklad vystaveného fosfatidylserínu („phosphatidylserine“ – PS) [14].

EV značne prispievajú k spúšťaniu a šíreniu zápalov, lebo môžu obsahovať signály nebezpečia: molekulárne vzory asociované s patogénom („pathogen associated molecular pattern“ – PAMP, iniciujú a udržiavajú infekčnú zápalovú odpoveď) a nebezpečím („damage associated molecular pattern“ – DAMP, iniciujú a udržiavajú neinfekčnú zápalovú odpoveď) [15]. MV sa podpisujú pod autoimunitné ochorenia, charakteristické chronickým zápalom a aktiváciou prirodzenej imunity. EV nesú autoantigény (DAMP), ako chaperóny– proteíny

teplotného šoku („heat shock protein“ – HSP), α -enolázu (metabolický enzým) a históny [16]. Príkladmi autoimunitných ochorení, na ktoré majú EV vplyv, sú reumatoidná artritída („rheumatoid arthritis“ – RA), systémový lupus erythematosus („systemic lupus erythematosus“ – SLE) a Sjögrenov syndróm. RA postihuje kĺby a tvoria sa autoprotílátky nazývané reumatidný faktor, namierené proti Fc časti imunoglobulínu („immunoglobulin“ – Ig). Pri SLE napáda imunitný systém (protílátky IgG) DNA [17]. Primárny Sjögrenov syndróm je charakteristický nadmernou aktiváciou vrodenej imunity a produkciou interferónov, ktoré aktivujú autoreaktívne B-bunky. So SLE, aj so Sjögrenovým syndrómom sú asociované autoprotílátky proti bunkovému jadru – anti-TRIM21 („tripartite motif containing 21“) a anti-SSB („Sjögren syndrome antigen B“), zhrnuté v [18]. Pri všetkých troch ochoreniach sú v plazme detegované zvýšené hladiny mikrovezikúl z membrány doštičiek („platelet microvesicle“ – PMV; v literatúre sú nazývané aj ako mikropatikuly krvných doštičiek, teda „platelet microparticle“ – PMP, význam je rovnaký) po ich degranulácii. PMV sú dôsledok ich aktivácie. PMV propagujú zápal a pri RA bolo dokázané, že sú nositeľmi autoantigénov, proti ktorým sú namierené autoprotílátky. Autoimunita je liečená imunosupresívami [17].

Vďaka adhezívnym molekulám sa EV efektívne viažu na cieľové bunky. EV priamo kontaktujú bunku a fúzujú s ňou alebo vstupujú endocytózou sprostredkovanou klatrínom, fagocytózou alebo makropinocytózou [12; 19]. V organizme dokážu EV doposiaľ nepreskúmaným mechanizmom prekonávať obrovské vzdialenosti, aby sa dostali k svojmu cieľu [10]. Sú schopné vystúpiť z krvného obehu do tkanív (napríklad kostí) a orgánov [20].

EV sú komplexné štruktúry a preto si ich štúdium vyžaduje obsiahle metódy schopné určiť ich biomolekulárnu stavbu a charakterizovať aj ich fyzikálne vlastnosti. Fyzikálna charakteristika zahŕňa parametre ako sú tvar, morfológia, veľkosť, refrakčný index (RI – index lomu, teda pomer rýchlostí svetla v danom prostredí a napríklad vzduchu dodá informáciu o intenzite rozptylu svetla), mechanické vlastnosti a náboj. Tieto vlastnosti dohromady reflektujú pôvod vezikúl a môžu predpovedať aj ich biologické funkcie [21]. Charakteristická hustota EV je 1,13 – 1,19 g/ml (HeLa bunky 1,04 – 1,08 g/ml), preto najjednoduchší spôsob ich izolácie je diskontinuálnou ultracentrifugáciou a/alebo ultrafiltráciou cez filter na základe molekulárnej hmotnosti a môžu byť ešte purifikované gélovou chromatografiou [2; 22; 23].

Základné delenie detekčných metód je na hromadnú detekciu (z anglického „ensemble“) a detekciu jednotlivých častíc. Na rozdiel od metódik pre detekciu jednotlivých častíc, hromadné detekcie neumožňujú analyzovať heterogenitu populácií vezikúl. Na detekciu EV je najpoužívanejší prietokový cytometer („flow cytometer“ – FCM; skratka použitá aj pre „flow cytometry“), ktorý je ale nutné prispôbiť. Dôležitý je hlavne parameter rozptylu svetla (závislý od veľkosti – priemeru častíc a ich RI) a zníženie rýchlosti prúdenia častíc [24]. Častou alternatívou FCM je NTA. NTA využíva rozptyl laserového svetla odrazeného od častíc, ktoré sa v roztoku pohybujú Brownovým pohybom [25]. Ďalšie metódy detekcie jednotlivých častíc sú snímanie odporového impulzu („resistive pulse sensing“ – RPS) a mikroskopia atomárných síl („atomic force microscopy“ – AFM). EV sú vizualizované na transmisnom elektrónovom mikroskope (TEM) [26], ktorý umožňuje určiť veľkosť aj morfológiu EV. Medzi hromadné metódy patrí metóda dynamického rozptylu svetla („dynamic light scattering“ – DLS), vďaka ktorej možno zistiť rozsah priemerov analyzovaných EV, ale nedodáva informácie o ich biochemickej štruktúre ani bunkovom pôvode (fenotype) [27]. Na zistenie proteínovej či lipidovej kompozície je používaná hmotnostná spektrometria, Western blot a ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) [28]. Žiadna z hromadných metód neodhaľuje heterogenitu populácií, ani počet častíc.

Rovnaká bunka má schopnosť produkovať súčasne viac typov sekretovaných vezikúl, pozornosť tejto práce sa však upriamuje na ES a MV. Subpopulácii apoptotických teliesok, teda pozostatkom buniek, ktoré prekonal programovanú bunkovú smrť, sa venovať nebudem, pretože majú odlišný pôvod a na rozdiel od ES a MV nevznikajú konštitutívne alebo po aktivácii bunky, ale iba na konci života bunky v priebehu apoptózy [5]. Líšia sa aj obsahom, nesú kondenzovanú jadrovú DNA s tupými koncami, alebo súčasti cytoplazmy [29]. Za fyziologických podmienok sú fagocytované makrofágmi, ktoré na ich membráne rozpoznávajú molekulárne signály „find me“ (chemotaktický signál) a „eat me“ (profagotický signál) a tento proces má na imunitný systém protizápalový a tolerogénny účinok [4].

Cieľom tejto práce je zhrnúť možnosti detekcie EV, nie len pomocou najpoužívanejšej metódy FCM ale aj alternatívnych metódik, ktoré sa v súčasnosti rozvíjajú. Popíšem rozdiely medzi nimi a ich využitie. Vysvetlím biogénu ES a MV a vzájomné rozdiely v zložení a funkcii, s ohľadom na ich pôvod. Na konci práce predstavím úlohu a význam MV v patogeneite autoimunitného ochorenia RA a dejoch súvisiacich s RA ako sú zápal a koagulácia.

2. Detekcia exozómov a mikrovezikúl

Metódy detekcie EV sa delia na detekciu hromadnú – ELISA, DLS, genomika (sekvenácia alebo hybridizácia DNA/RNA), proteomika (hmotnostná spektrometria) a na analýzu jednotlivých častíc – FCM, RPS, NTA, TEM, AFM. Každá z metód má svoje výhody, ale aj limitácie (Tab. 1), preto je vhodné vzorku analyzovať kombináciou metód alebo porovnať výsledky z rôznych metód.

2.1 Hromadná detekcia

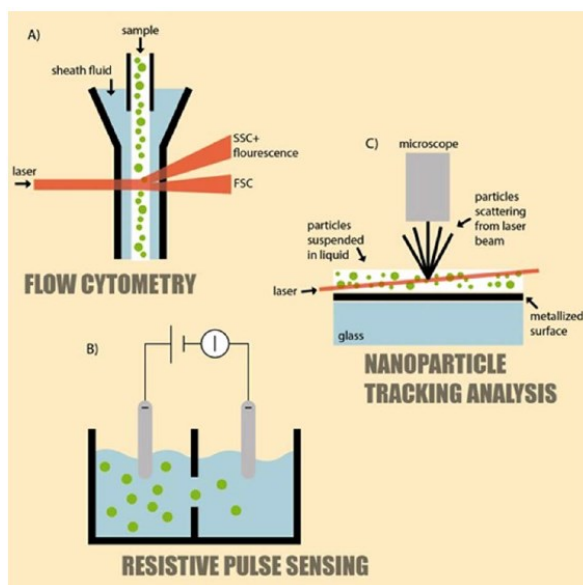
Hromadná detekcia EV umožňuje analýzu veľkého množstva častíc naraz a je založená na meraní celkových obsahov proteínov a/alebo lipidov v biologických vzorkách – proteomika a lipidomika. Tieto metódy však nedokážu rozlíšiť zmenu počtu častíc od zmeny molekulovej kompozície častíc, ani ich vizuálne rozlíšiť. V súčasnosti je problémom nedostatok markerov pre EV [30], ktoré sú špecifické a dostatočne koncentrované na EV.

Pomocou DLS (známa aj ako fotónová korelačná spektroskopia) je možné rozpoznať jednotlivé neagregované častice s priemerom >20 nm. DLS je založená na určovaní výkyvov intenzity rozptýleného svetla spôsobených Brownovým pohybom častíc [31]. Stredná hodnota amplitúdy signálu a rozptyl svetla závisia od priemeru, koncentrácie a RI vezikuly. Veľké EV môžu byť prekážkou pre presné určenie veľkosti, ak väčšinu populácie tvoria malé vezikuly, lebo intenzita rozptýleného svetla je proporcionálna k priemeru častíc. Veľkostné rozhranie môže byť teda skreslené a veľkosti EV sú len relatívne [28].

ELISA a Western blot sú konvenčné techniky používané na určenie fenotypu EV pomocou protilátok proti proteínovému markeru, zvoleného podľa pôvodu EV. Western immunoblot je metóda považovaná za „zlatý štandard“ určovania identity EV [27]. Metóda ELISA je založená na zachytení EV na dne jamky ELISA doštičky a kvantitatívnom určení povrchových antigénov alebo biomarkerov pomocou detekčných protilátok, ktoré generujú fluorescenčný alebo kolorimetrický signál [21].

2.2 Detekcia jednotlivých častíc

Detekcia EV po jednotlivých časticiach je vhodná na zistenie heterogenity. Má potenciál detegovať všetky subpopulácie vo vzorke, napríklad za pomoci imunofenotypizácie. Schémy najpoužívanejších techník na detekciu jednotlivých častíc sú naznačené na Obr. 2.

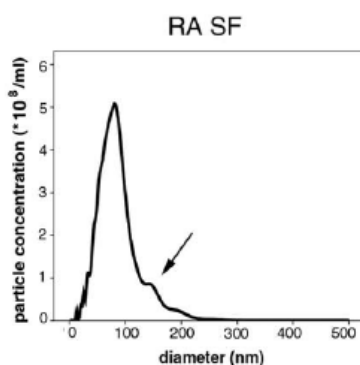


Obr. 2 Schémy najčastejšie používaných techník detekcie EV: A) FCM: Vzorke je zmiešaná s unášacou tekutinou a prúdi cez kanál. Laser pretína prúd vzorky a generuje rozptyl a fluorescenčný signál. B) RPS: Keď EV v roztoku elektrolytu vstúpi cez pór, premiestni sa rovnaký objem elektrolytu, čím sa zvýši impedancia obvodu a generuje sa pulz proporcionálny k objemu častíc. C) NTA: Laserový lúč prechádza cez komôrku so vzorkou a mikroskop s kamerou zachytáva Brownov pohyb častíc. Prevzaté z [28]

RPS je metóda nezávislá na tvare a RI častíc. Systém pozostáva z membrány s otvormi (mikro/nanopóry) a elektrolytu. Po aplikácii elektrického prúdu začnú prúdiť ióny. Keď nanopórom prejde častica, prúd iónov je pozmenený za vzniku odporového impulzu, ktorý je proporcionálny k objemu častíc. Meria sa odporový impulz a z výšky a rýchlosti impulzov sa vypočíta veľkosť častíc, koncentrácia [28] a aj náboj, pretože častice migrujú k anóde alebo katóde [32]. Tieto vlastnosti súvisia s frekvenciou, veľkosťou a dĺžkou elektrických impulzov.

NTA je priama metóda umožňujúca vizualizáciu fluorescenčných EV v reálnom čase [1]. Podobne, ako DLS je založená na Brownovom pohybe častíc (DLS však častice nevizualizuje, ale zaznamenáva fluktuáciu rozptylu v čase a z intenzity zaznamenaného svetla sa počíta priemerná veľkosť). NTA umožňuje vyčísliť EV (koncentrácia) a určiť veľkosti jednotlivých vezikul (Obr. 3), ale neumožňuje zistenie vnútornej kompozície častíc. Častice v suspenzii rozptyľujú svetlo, lebo sú osvetľované laserovým lúčom. Rozptyl a pohyb sú svetelným mikroskopom nahrávané na video a individuálny Brownov pohyb každej častice sa softvérovo analyzuje. Vypočíta sa stredná kvadratická odchýlka pre každú časticu a z nej hydrodynamický priemer, teda veľkosť konkrétnej častice pomocou Stokes-Einsteinovej

rovnice [25; 33]. Nevýhodou je, že vyžaduje opakované meranie vzoriek v rôznych riedeniach a pri líšiach sa nastaveniach kamery, aby boli detegované všetky častice. Metóda NTA je najpresnejšia pri koncentrácii EV $2 \times 10^8 - 20 \times 10^8/\text{ml}$ [25]. Príprava vzorky a meranie pomocou NTA sú rýchle a jednoduché. Na zistenie fenotypu môžu byť detegované povrchové antigény pomocou fluorescenčného značenia.

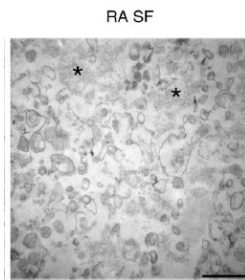


Obr. 3: NTA analýza MV zo synoviálnej tekutiny: Veľkostný histogram znázorňuje priemer MV (v nm) a koncentráciu MV ($\times 10^8/\text{ml}$) v synoviálnej tekutine. Menší vrchol vyznačený šípkou indikuje MV vo veľkostnom rozhraní 100 – 200 nm, avšak väčšina MV má priemer < 100 nm. Prevzaté z [34]

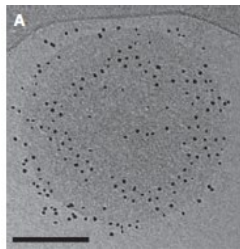
AFM je mikroskopická metóda s vysokým rozlíšením. Skenovací snímač bez kontaktu s tekutou vzorkou sníma jej povrch a so subnanometrovým rozlíšením sa meria výška, dĺžka a šírka pohybu snímača. Vďaka substrátom obaleným protilátkou je možno zistiť pôvod EV [28]. Pomocou AFM je mapovaná topografia vzorky a sú snímané mechanické a chemické vlastnosti [21].

TEM sa uskutočňuje v prostredí vákuua, preto sú vzorky fixované a dehydrované (zobrazenie MV na TEM Obr. 4). Vzorky sa farbja, aby boli kontrastnejšie—imunoelektrónová mikroskopia umožňuje detekciu špecifickej povrchovej molekuly EV použitím protilátok konjugovaných so zlatými guľčkami o veľkosti v ráde 5 – 15 nm. Izolované ES sú okrúhleho tvaru, pod TEM však majú charakteristický „pohárikovitý“ tvar, ktorý je dôsledkom dehydratácie—zmrštenia pri príprave vzorky na mikroskopickú analýzu [13]. Kryoelektrónová mikroskopia (Obr. 5) naopak, nevyžaduje fixáciu, farbenie ani dehydratáciu. Vzorka—roztok, je rapídne zamrazená, aby nevznikli kryštály vody a zamrazená ostáva aj pri pozorovaní pod mikroskopom [21]. V kombinácii s receptorovo—špecifickým značením zlatom je možný detailný popis morfológie, veľkostného rozhrania

a fenotypu EV [35]. Elektronová mikroskopia nie je kvantitatívna metóda, a pri určovaní veľkostí EV býva ich rozmer podhodnocovaný [27].



Obr. 4 Elektronový mikrogram z TEM zobrazuje MV zo synoviálnej tekutiny pacienta s RA, farbené 1% uranyl-acetátom v 50% etanole. Mierka 500 nm, zväčšené 30 000 ×, prevzaté z [34]



Obr. 5 Kryo-TEM MV sú značené zlatými nanopartikulami s Annexínom V, ktoré sa viažu na PS. MV je husto značená zlatými nanopartikulami, čo dokazuje vysokú špecificitu značenia Annexínom V. Mierka 100 nm, prevzaté z [35]

2.2.1 Prietoková cytometria

Prietokový cytometer vďaka svojej robustnosti a možnosti multiparametrického použitia je hlavným nástrojom na identifikáciu EV– nielen ich prítomnosti ale aj bunkového pôvodu. Charakterizáciu EV robí náročnou ich polydisperznosť, široká variácia veľkostí a nízky RI [24]. RI EV závisí od pomeru cytosól-membrána, typu a množstva nákladu a membránových proteínov. Tieto parametre sa menia v závislosti od bunkového pôvodu EV. RI sa počíta z dát z NTA [36]. Ďalšou komplikáciou je okrem malej veľkosti (podľa kryo-EM je 80% EV v rozmedzí 50 – 500 nm [35]) malý povrch EV a tým pádom málo povrchových proteínov, ktoré môžu byť fluorescenčne označené, aby bol dosiahnutý prah detekcie (270 – 600 nm pri konvenčnej FCM) [28].

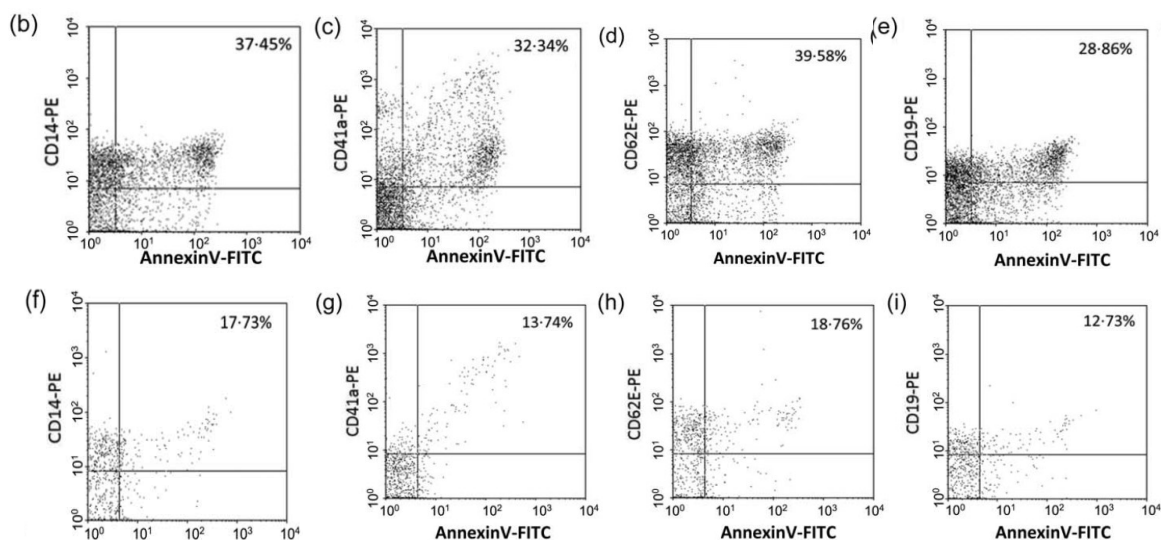
Vezikuly prúdia v suspenzii jedna za druhou a sú zachytávané laserovým svetlom, ktoré odrážajú a rozptyľujú rôznymi smermi, čo je merané detektormi. V FCM sú dva smery rozptylu svetla: priamy rozptyl („forward scatter“– FSC) s malým uhlom 0,5 – 15° a 90° bočný rozptyl („side scatter“– SSC). Intenzita FSC zodpovedá veľkosti častice a intenzita SSC zodpovedá granularite (zrnitosti). Väčšina EV je menšia ako vlnová dĺžka svetla, čoho výsledkom je malý rozptyl, so signálom menším než je pozadie prístroja [37]. Submikrónové častice sa správajú inak ako bunky a svetlo rozptyľujú nezávisle od uhlu, pod akým je rozptyl meraný [38]. Keďže k priamemu rozptylu svetla zvyčajne nedochádza, nie je efektívne FSC

detektor používať a preto sa používa SSC, kde je rozlíšenie presnejšie a častice nie sú v „šume“ – pozadí. Aby sa šum čo najviac zredukoval a signál bol čistý, meranie musí prebiehať na čo najnižších rýchlostiach prístroja – zmenší sa odstup medzi časticami a zároveň i priemer prúdu častíc, ktoré sa nevychýľujú od centra, kde sú detegované laserom [39]. Meranie na vysokých rýchlostiach vedie k javu nazývanému koincidencia, tiež „swarm“ efekt, keď sa v mieste merania nachádzajú dve alebo viac častíc a FCM ich deteguje ako jedinú časticu („event“). Koincidencii sa dá predísť dostatočným zriedením vzoriek do koncentrácií, v ktorých FSC a fluorescenčný signál ostávajú konštantné a suspenzia vezikúl je meraná po jednej [40].

Dnes existujú extrémne citlivé prístroje, navrhnuté pre detekciu submikrónových častíc, ako sú EV. Citlivosť je číselne vyjadrená ako index citlivosti rozptylu („scatter sensitivity index“ – SSI, mal by dosahovať hodnoty > 3) a druhým kritériom je pomer šumu v pozadí (n), teda počtu udalostí nameraných za sekundu k maximálnemu možnému počtu udalostí za sekundu, ktoré je prístroj schopný namerať bez veľkých „abort“ hodnôt. Vzhľadom na tieto 2 kritéria bolo v práci [24] dokázané, že LSR II Fortessa je prístroj s najlepším rozlíšením ($SSI = 7,9 \pm 1,3$; $n=7$). Tento prístroj používa SSC, pričom až 87% SSC FCM malo dostačujúce rozlíšenie, teda $SSI > 3$, kým pre FSC to bolo 75% prístrojov. Spomedzi prístrojov používajúcich FSC mali najlepšie rozlíšenie BD influx a Apogee A50 ($SSI = 11,3$; $n = 2$, šum mal optický pôvod) [24].

Na nastavenie prístroja sa používajú kalibračné guľôčky, napríklad silikátové, s parametrami podobnými EV – veľkosť (110 – 1300 nm) a RI (guľôčky 1,42 a EV $1,40 \pm 0,02$) [41]. Guľôčky sú v heterogénnom mixe, fluorescenčne značené aj neznačené.

Využíva sa aj metóda zachytenia EV na jednotlivé guľôčky („bead assay“), čím sa zväčší povrch a rozptýli sa viac svetla [39]. Guľôčky sú obalené protilátkou a inkubujú sa s EV a tie sa na ne prichytia. Tieto komplexy sú premyté a označené sekundárnou protilátkou (protilátka proti primárnej protilátke), ktorej fluorescenčná intenzita sa zisťuje pri meraní FCM. Vrchná hranica detekcie je dosiahnutá, keď sú guľôčky nasýtené EV a nevykazujú veľké variácie vo fluorescenčnej intenzite [42].



Obr. 6 FCM analýza MV z plazmy z RA pacientov (b-e) a zdravých kontrol (f-i). MV boli označené annexínom V (Annexín V sa viaže na negatívne nabité fosfolipidy na membráne MV [43]) a indikovanou monoklonálnou protilátkou (b, f) monocytárne MV CD14⁺; c, g) PMV CD41⁺; d, h) EC MV CD62E; e, i) MV z B-buniek CD19⁺). Nárast koncentrácií MV je zreteľný u všetkých populácií, v porovnaní so zdravou kontrolou. Percentá zodpovedajú MV pozitívnym na annexín V a indikovanú protilátku. Prevzaté z [44]

Detekcia pomocou FCM je závislá od zastúpenia a dostupnosti antigénov na EV (aby boli detekovateľné, ukážka dát Obr. 6), na ktoré sa naviažu špecifické protilátky. Optimálna je kombinácia fluorescenčných značiek špecifických pre proteíny a pre lipidy membrány a/alebo použitie primárnych protilátok [39]. Pri aplikácii protilátok sa používa „no wash“ metóda, pretože ak by sa protilátky zmyli, došlo by k stratám vzorky. V tomto prípade, na redukcii koncentrácie nenaviazanej protilátky stačí vzorku zriediť. Pri „no wash“ metóde je vyžadovaná priama imunofluorescencia. EV nevykazujú autofluorescenciu, ich objem je miliónkrát menší, ako objem buniek [37].

2.2.2 Konvenčná a dedikovaná prietoková cytometria

Na detekciu submikrónových častíc je najpoužívanejšia konvenčná FCM (60% vedeckých pracovníkov), hoci nie je najvhodnejšou metódou. Jej nevýhodou je, že významný počet EV kvôli ich malej veľkosti vôbec nie je detekovateľných, pretože konvenčný FCM má vysoký prah detekcie. Prípadne, ak detegované sú, problémom je spomínaná koincidencia [28]. Pri konvenčnej FCM je vhodné použiť fluorescenciu ako „threshold“ parameter, ktorý zlepšuje detekciu malých EV voči pozadiu, musia byť však fluorescenčne značené a optimálne nariadené [40], pričom nedostatky fluorescenčného značenia EV už boli spomenuté. Konvenčný FCM meria celkové množstvo fotónov emitovaných z fluorescenčnej

molekuly a signál je proporcionálny k počtu miest, kam sa fluorochróm môže naviazať. EV obyčajne majú niekoľko 100 až 1000 molekúl fluorofóru. Pri použití rozptylu ako „trigger“ faktoru (hodnota, pod ktorú už FCM nie je schopný detekcie) nie je možné určiť absolútny počet častíc [28].

Termínom dedikovaná FCM sa označujú FCM, ktoré sú určené na detekciu submikroskopických častíc a nie je potrebné dodatočné prispôsobovanie prístroja [39]. Takýmto prístrojom je A50-Micro (Apogee) [45]. Dedikovaná FCM poskytuje najvyššiu pravdepodobnosť odlišenia jednotlivých populácií vezikúl a distribúciu ich veľkostí. Dedikovaný FCM sa od konvenčného líši v tom, že má vysoko výkonné lasere s lúčmi skoncentrovanými do menšieho bodu, má stabilný prúd s nízkou rýchlosťou a malým priemerom prúdu (1 – 2 μm) a má vysoko citlivé detektory pre SSC aj FSC [36]. Dedikovaná FCM je založená na fakte, že objekty blížiac sa svojou veľkosťou k vlnovej dĺžke svetla, rozptyľujú viac svetla pri väčších uhloch (15 – 150°) kvôli difrakcii [46].

2.3 Porovnanie detekcií

V štúdií od [45] boli porovnané koncentrácie a distribúcie veľkostí EV z moču, v porovnaní s referenčnými guľôčkami za pomoci najčastejšie používaných techník: TEM, NTA, konvenčná FCM, dedikovaná FCM a RPS (schematické znázornenie NTA, FCM a RPS na Obr. 2). Výsledky z menovaných techník sa navzájom líšili koncentráciou, aj distribúciou veľkostí, pretože pre každú z techník je minimálna detekčná veľkosť vezikúl iná: 70 – 90 nm pre NTA; 270 – 600 nm pre konvenčnú FCM; 150 – 190 nm pre dedikovanú FCM; 70 – 100 nm pre RPS; kým TEM dokáže po adhézii častíc na povrch detegovať aj najmenšie častice. Dedikovaná FCM sa ukázala, ako najpresnejšia pri rozlišovaní veľkostí referenčných guľôčok, no bola menej presná pre heterogénne EV s líšiacimi sa RI.

Jednotlivé typy detekcií EV sú s ohľadom na výhody, nevýhody a dáta, ktoré poskytujú, porovnané v nasledujúcej tabuľke (Tab. 1):

Tab. 1: Výhody a nevýhody najvýznamnejších typov detekcií, prevzaté a upravené z [47]

Technika	Výstupné dáta	Výhody	Nevýhody
Prietoková cytometria (FCM)	Počet, fenotypizácia	Citlivá, špecifická a rýchla multiparametrická analýza veľkých populácií, nie je potreba izolovať a purifikovať vzorku	Veľkostná limitácia v konvenčnej FCM, nedodá informácie o štruktúre a morfológii
Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	Počet, veľkostná distribúcia, pri fluorescenčnom module fenotypizácia	Rýchle, citlivé a presné meranie, stačí malý objem vzorky, softvér na štatistickú analýzu	Bez fluorescenčného modulu nerozozná rôzne EV, chýbajú informácie o fenotype, štruktúre a morfológii
Kryo-elektrónová mikroskopia	Veľkostná distribúcia, morfológia, štruktúra	Natívna štruktúra EV zachovaná, vhodná na analýzu biologických vzoriek, 3D štruktúra	Náročnosť počítania EV a prípravy vzorky
Atómová mikroskopia (AFM)	Počet, veľkostná distribúcia	Detekcia malých EV, polydisperzné vzorky, zachovaná natívna štruktúra EV, 3D topológia	Náročnosť prípravy vzorky, malý prechodový výkon
Snímanie odporového impulzu (RPS)	Počet, veľkostná distribúcia	Rýchle, detekcia malých EV (70 – 100 nm)	Časté upchatie apertúry, podcenenie veľkostí, bez fenotypizácie, nedodá informácie o štruktúre a morfológii
Dynamický rozptyl svetla (DLS)	Počet, veľkostná distribúcia	Rýchle výsledky, jednoduché použitie	Nevhodné na zmiešané a polydisperzné vzorky, nedodá informácie o štruktúre a morfológii
ELISA	Počet, funkčný rozbor	Vhodné na klinickú aplikáciu, jednoduché použitie	Nedodá informácie o veľkosti, štruktúre ani morfológii, interakcia s rozpustnými antigénmi

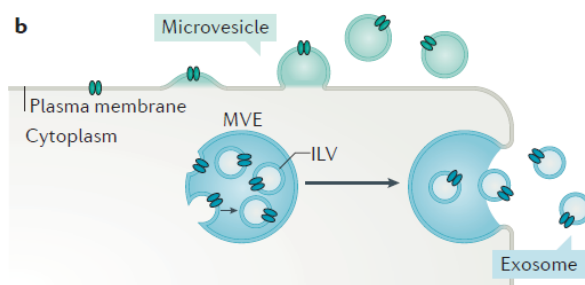
3. Biogenéza exozómov

3.1 Formácia intraluminálnych vezikúl

ES majú endocytický pôvod a ich vývoj začína v tzv. skorom endozóme (endozómy sú na membránu viazané kompartmenty ohraničené endocytickou membránou pochádzajúcou z trans Golgi membrán). Skorý endozóm je naplnený primárne ubiquitinovanými proteínmi transportovanými napríklad z Golgiho aparátu, alebo molekulami prijatými z povrchu bunky (napríklad aktivované receptory rastového faktoru) [13]. Ubiquitinačný signál je kovalentné

pripojenie malej molekuly ubiquitínu cez jeho C-terminálny koniec na -NH₂ koniec postranného lyzínu proteínu.

Budúci obsah ES, teda proteíny a lipidy sú najprv transportované do endozómov, kde sa dostanú do nascentných intraluminálnych váčkov („intraluminal vesicle“ – ILV), ktoré budú vylúčené do cytoplazmy. Budúci ES vzniká pučaním endozomálnej membrány dovnútra, oddelí sa od nej invagináciou a uvoľní sa ako ILV vo vnútri endozómu. Celý endozóm spolu s ILV sa nazýva multivezikulárne teliesko („multivesicular body“ – MVB) [13], viď Obr. 7. MVB je organela, ktorá je súčasťou endozomálne-lyzozomálneho systému. Invagináciou skorého endozómu dovnútra vznikajú ILV, ktoré dozrievajú a formujú MVB. MVB napokon fúzuje s neskorým endozómom, ktorý je druhým miestom triedenia v endozomálnom systéme [48].



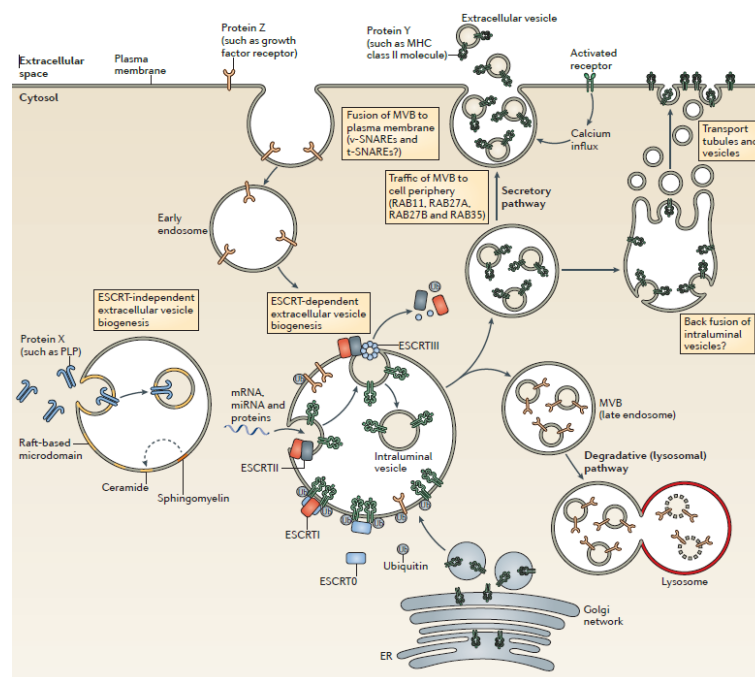
Obr. 7 Vznik EV: ES sa formujú najprv ako ILV v lumen MVB, tu MVE („multivesicular endosome“), ILV fúzujú s PM a uvoľnia sa ES. MV sú uvoľnené pučaním membrány smerom von, viď nasledujúca kapitola. Upravené, prevzaté z [49]

3.1.1 Biogenéza exozómov závislá na ESCRT komplexe

Prvý typ formácie ILV je závislý od štvorice komplexov ESCRT 0-III („endosomal sorting complex required for transport“), ktoré sa nachádzajú na endozomálnej membráne [50]. ESCRT-0, -I a -II rozpoznávajú a interagujú s ubiquitínovanými proteínmi cez cytosólické domény viažuce ubiquitín, čím uskutočňujú triedenie nákladu. ESCRT-0 zostavuje na povrchu membrány veľké zhluky ubiquitínu (segreguje ich do mikrodomén), ktoré pritiahnu komplex ESCRT-I a -II a ich spolupráca umožní reverzné pučanie membrány, ktorá obalí budúci náklad [51]. Pomocou HGS („hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate“) dokáže ESCRT-0 rozpoznať monoubiquitínované proteíny nákladu a asociuje s proteínmi STAM („signal transducing adaptor molecule“), EPS15 („epidermal growth factor receptor pathway substrate 15“) a klatrínom. HGS spolupracuje aj na pritiahnutí komplexov -I a -II [52]. ESCRT-III rekrutuje deubiquitínujúce

enzýmy, aby sa ubiquitínové molekuly uvoľnili pred začlenením nákladu do ILV [53]. Nakoniec sa podjednotky ESCRT-III – CHMP4B a CHMP6 („charged multivesicular body protein“ 4B, 6) sústredia do miesta pučania membrány a invagináciu reverzne odštiepia za vzniku ILV [51]. Disociácia a recyklácia ESCRT aparátu vyžaduje interakciu s AAA-ATPázou VPS4A („vacuolar protein sorting 4 homolog A“) [52]. Nie u všetkých proteínov je ubiquitinácia triediacim signálom– napríklad u MHC II („major histocompatibility complex“ II. triedy) [54].

Nakoniec sú voľný ubiquitín a ESCRT podjednotky uvoľnené do cytosólu a recyklujú sa [13]. Proces je naznačený na Obr. 8.



Obr. 8 Biogenéza ES: ES sú generované ako ILV v MVB mechanizmom závislým alebo nezávislým na ESCRT aparáte. Prevzaté z [13]

3.1.2 Biogenéza exozómov nezávislá na ESCRT komplexe

Druhý typ formácie je nezávislý na ESCRT. Pučanie, pri ktorom vzniká v lumen endozómu ILV je regulované sfingomyelinázou, CD63 a APOE („apolipoprotein E“) [55]. Dej je založený na špecifickom lipidovom zložení endozomálnej membrány [56], ako sú lipidové kotvy a mikrodomény (lipidové rafty) obsahujúce sfingolipidy. Sfingolipidy sú hydrolyticky štiepené sfingomyelinázami za vzniku ceramidu a fosforylcholínu [57]. Po inhibícii sfingomyelinázy sa ES netvorili, čo potvrdilo rolu ceramidu v biogenéze ES. Ceramid má kužeľovitú štruktúru a spôsobuje asymetrické zakrivenie membrány vytvárajúce rozdiely

medzi vrstvami a podporuje sekréciu ES [55]. Ceramid na vonkajšej vrstve indukuje splývanie malých mikrodomén do väčších celkov a to podporuje pučanie z týchto domén [58]. Hlavná teória, ktorá pojednáva o rozhodovaní ohľadom obsahu a sekrécii ES a MV zahŕňa prítomnosť lipidových raftov. Aby boli proteíny sekretované v EV, musia byť lokalizované v oblasti lipidových raftov [10]. Lipidové rafty sú vysokoorganizované dynamické membránové mikrodomény, zhluky obohatené o ceramid, cholesterol, gangliozidy a glykosfingolipidy. V týchto miestach sa koncentrujú určité proteíny, napríklad signálne [59].

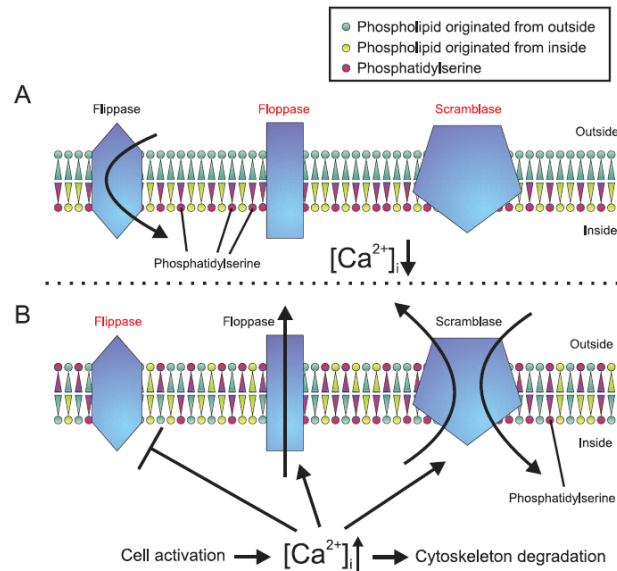
Oba typy dráh, závislá aj nezávislá na ESCRT komplexe (procesy zreteľne znázornené na Obr. 8), nie sú oddelené, ale fungujú synergicky. Faktorom pri výbere dráhy a kontrole sekrécie je typ bunky a bunková homeostáza [60].

4. Biogenéza mikrovezikúl

Biogenéza MV sa líši od ES, pretože nevznikajú pomocou endocytickej dráhy, ale pučaním PM. Pre vznik MV je nutný externý stimul, prítomnosť aktivátorov alebo poškodenie bunky. Tieto procesy zvýšia koncentráciu Ca^{2+} vnútri bunky vtokom iónov z extracelulárneho prostredia do cytoplazmy alebo z vnútorných zdrojov z organel. Vzostup koncentrácie Ca^{2+} spustí kalpaínové štiepenie kortikálneho aktínového cytoskeletu a jeho výsledkom je tvorba MV [61]. Pri pučaní MV sa využíva AARDC („arrestin containing protein 1“) a TSG101, podobne ako u ES [62].

Za proces vzniku a uvoľnenia MV je zodpovedná transmembránová redistribúcia PS [63]. Bunka v stave klľudu má nenabité fosfolipidy, teda fosfatidylcholín („phosphatidylcholine“ – PC) a sfingomyelín („sphingomyelin“ – SM) prítomné vo vonkajšej vrstve membrány, kým vo vnútornej vrstve sú záporne nabité aminofosfolipidy, teda PS a fosfatidyletanolamín („phosphatidylethanolamine“ – PE). Po aktivácii bunky dôjde k procesu „flip-flopping“ [64]. Dlhodobý nárast cytosólickej koncentrácie Ca^{2+} v dôsledku apoptózy, mechanickej deštrukcie alebo stimulácie bunky aktivuje ATP-závislý flip-flop a ten vedie ku kolapsu membránovej asymetrie. Proces je stimulovaný flopázou a skramblázou (v klľudovom stave sú neaktívne, Obr. 9) a inhibovaný flipázou (internalizuje negatívne fosfolipidy a udržiava asymetriu). Výsledkom tohto procesu je, že PS sa ocitne na povrchu

MV. U PMV slúži PS ako katalytický templát pre vznik enzymatických komplexov a kofaktorov koagulačnej kaskády [63].



Obr. 9 Asymetrickú distribúciu fosfolipidov v membráne zabezpečujú 3 enzýmové systémy: flipáza, flopáza a skrambláza. Prevzaté z [9]

Avšak, nie všetky MV vystavujú PS a PE na povrchu, napríklad MV z aktivovaných EC [9]. PS-negatívne MV vznikajú odlišným mechanizmom, pri ktorom je udržiavaná membránová asymetria, ako fragmentáciou bunky [35]. Formácia a sekrécia MV sa zväčša študuje *in vitro* na bunkových kultúrach, molekulárny proces *in vivo* nie je ešte objasnený [8].

4.1 Mikrovezikuly krvných doštičiek

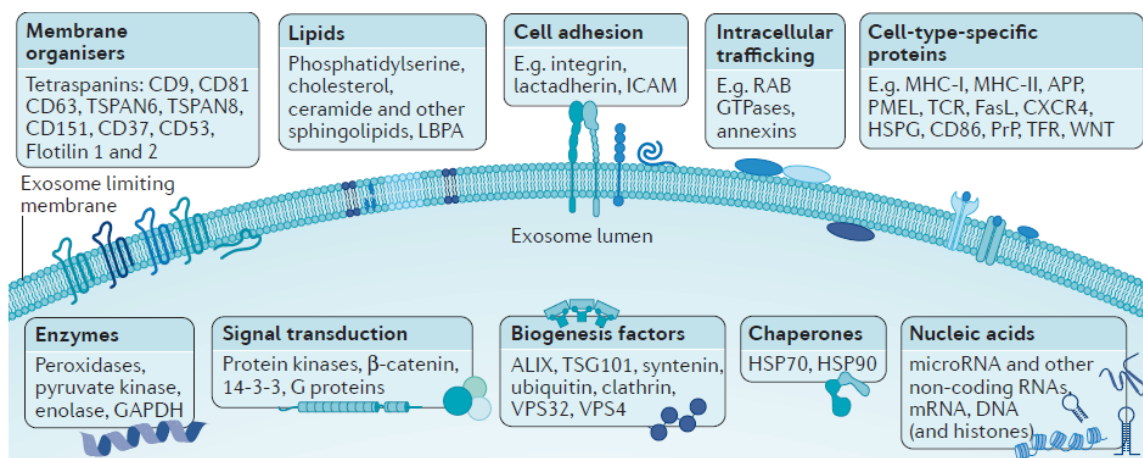
PMV sú fragmenty PM degranulovaných krvných doštičiek, s kompozíciou reflektujúcou PM bunky, z ktorej pochádzajú. Sú obohatené o prokoagulačné schopnosti [63] (prokoagulácia je asociácia častíc vedúca ku koagulácii). Vznik PMV je indukovaný vysokým strižným napätím [65], ktoré vyvolá influx extracelulárneho Ca^{2+} . Intracelulárny vzostup koncentrácie Ca^{2+} riadi aktiváciu enzýmov gelsolínu a kalpaínu, ktoré spôsobujú disociáciu membránového aktínu a odštiepenie aktínových filament, čím sa preruší kontakt medzi fosfolipidmi membrány a cytoskeletom [9]. K vzniku PMV ale dochádza aj po inhibícii kalpaínu pri stimulácii doštičiek komplementovým komplexom C5b-9 [66]. V práci [9] bolo dokázané, že aktivácia kolagénového receptora GPVI („glycoprotein VI platelet“ ktorý interaguje s γ -reťazcom Fc receptoru) na membráne doštičiek dáva vznik PMV, po odstránení

FcR- γ -reťazca alebo GPVI receptora bol počet PMV zredukovaný. PMV svojím obsahom propagujú zápal a ich počet sa za takýchto podmienok zvyšuje.

5. Molekulárne zloženie extracelulárnych vezikúl

Topológia EV a bunky je podobná. Na povrchu obsahujú lipidy, extracelulárne receptory a ligandy a vo vnútri cytoplazmatické proteíny a RNA. Dvojvrstvá fosfolipidová membrána EV je rigidnejšia, ako PM bunky, vďaka vyššiemu obsahu sfingolipidov (SM) a disaturovaných lipidov [67] a nižšiemu obsahu PC. Proteíny spoločné pre obe subpopulácie ES a MV, ktoré sú považované za ich marker sú ALIX („ALG2-interacting protein X“), TSG101 („tumour susceptibility 101“) a tetraspaníny CD9, CD81 a CD63 [22]. Tieto molekulárne markery subpopulácií EV ale nie sú jasne stanovené ani spoľahlivé. Preto je špecifickejšie delenie EV podľa bunkového pôvodu stále problematické. Zistila sa však odlišná citlivosť EV k detergentom – počet MV odvodených od PM bunky bol zredukovaný aniónovým detergentom SDS, ES boli lyzované neiónovým detergentom Triton X-100. Zisťovala sa najnižšia koncentrácia, pri ktorej boli EV lyzované, teda kedy sa ich počet znížil. Tento poznatok môže slúžiť na odlišenie ES od MV [68].

5.1 Zloženie exozómov



Obr. 10 Typické zloženie ES, molekuly sú rozdelené podľa distribúcie na povrchu a v lumen.. Prevzaté z [49]

Membrána ES a bunky má rovnakú orientáciu transmembránových a intraluminálnych proteínov [69], ale u ES je obohatená o špecifické lipidy ako ceramid, cholesterol a PS [55]. V membráne ES sa nachádza MVB-špecifická kyselina lyzobisfosfatidová a membrána

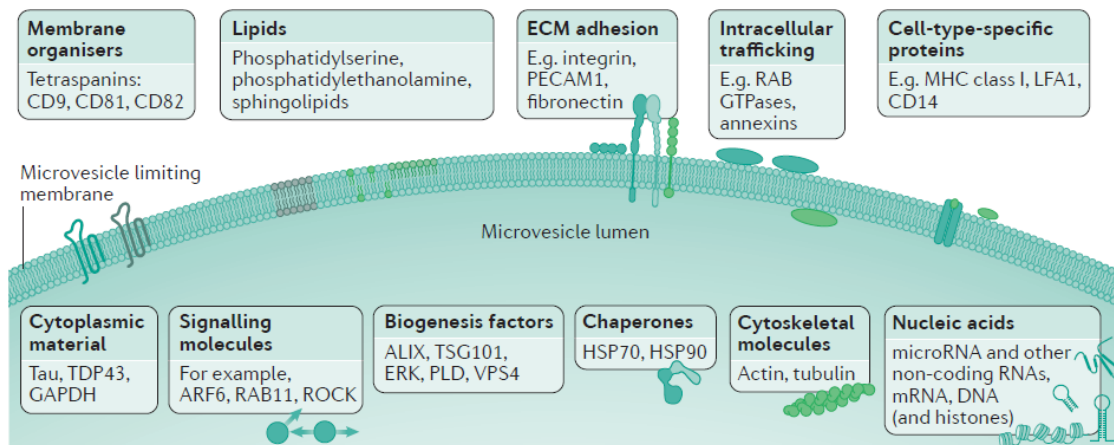
obsahuje aj GPI-kotvené molekuly (napríklad acetylcholinesteráza, CD55). ES membrána môže tiež prekonávať rapidný „flip-flop.“ ES obsahujú molekuly relevantné pri ich biogenéze a sekrécii, napríklad TSG101, ALIX, Rab proteíny a annexíny. Všetky ES obsahujú cytoskeletárne komponenty (aktín, tubulín, kofilín, profilín), integríny a flotilíny, zhrnuté v [70] (molekuly sú naznačené na Obr. 10). Súčasťou membrány sú aj tetraspaníny – proteíny so štyrmi transmembránovými doménami. Najčastejšie tetraspaníny sú CD9, CD63, CD81, CD82 a CD151. Prispievajú k adhézii a fúzii EV s bunkou, a tiež k motilite a signalizácii [71]. 45% proteínového obsahu ES tvoria komponenty mikrodomén obohatené o tetraspaníny [72].

Ďalšie molekuly sú špecificky vkladané do ES bunkou z ktorej pochádzajú, napríklad cytokíny a ich receptory (TNF α , TGF β , IL-1 β) [73], signálne molekuly a enzýmy [70]. Obsah závisí na stave bunky – či je infikovaná, aktivovaná alebo transformovaná a charakteristike danej bunky. ES z T-buniek obsahujú na povrchu T-bunkový receptor („T-cell receptor“ – TCR) a ES z B-buniek obsahujú B-bunkový receptor („B-cell receptor“ – BCR) a kostimulačné molekuly CD83 a CD40. ES z APC sú bohaté na proteíny prezentujúce antigény ako MHC I a II [70].

Charakteristické je selektívne triedenie RNA do ES [56]. RNA prítomná v ES je biologicky aktívna a preto dokáže meniť proteínový profil a celkový stav a fenotyp recipientnej bunky [3]. V ES sú najhojnejšie zastúpené fragmenty tRNA (transferová RNA), rRNA (ribosomálna RNA – podjednotky 28S a 18S) a vtRNA (vault RNA – ribonukleoproteínová častica) a ďalšie nekódujúce RNA fragmenty [74]. Bol zistený špecifický mechanizmus triedenia miRNA („microRNA“ – malá nekódujúca RNA) do ES, ktorý je závislý na HNRNPA2B1 („heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1“), ktorý je sumoylovaný (SUMO – „small ubiquitin modifier“, je posttranslačná modifikácia proteínov podobná ubiquitínu, ale nevedie k degradácii). Vďaka sumoylácii HNRNPA2B1 špecificky viaže exozomálnu miRNA a kontroluje jej vkladanie do ES [69].

ES je možné deliť podľa hustoty, ktorá je závislá od proteínového zloženia na väčšie ES (75 – 200 nm) s nižšou hustotou (1,13 – 1,19 g/ml, čo je aj bežne uvádzaná hustota ES [2]) a menšie, veľkostne homogénnejšie ES s vysokou hustotou (1,26 – 1,29 g/ml) [22].

5.2 Zloženie mikrovezikúl



Obr. 11 Typické zloženie MV, molekuly sú rozdelené podľa distribúcie na povrchu a v lumen. Prevzaté z [49]

MV obsahujú adhezívne molekuly (P-selektín), flotilíny, cytokíny, chemokíny, proteázy, metaloproteinázy, tetraspaníny (CD9, CD81), integríny, chaperóny (HSP70, HSP90), komponenty komplementovej kaskády (C3 komplement), cytoskeletárne proteíny (aktín, tubulín) a enzýmy [75; 76; 8; 49] (Obr. 11). Proteíny z MV sa zúčastňujú regulácie apoptózy, koagulácie, adhézie, signálnej transdukcie a bunkovej komunikácie [8]. Na membráne PMV je aktívny CD40L, ktorý je exprimovaný a uvoľňovaný pri aktivácii doštičiek [77; 78]. Po stimulácii doštičiek trombínom boli PMV obohatené o miR-223. MiR-223 môže regulovať expresiu endogénnych génov v recipientných bunkách, napríklad v EC [79].

V štúdií [76] bola prevedená proteomická analýza MV z plazmy zdravých jedincov a ako najčastejšie prítomné proteíny boli určené LGALS3BP („galectin-3-binding protein“), HRG („histidine rich glycoprotein“), A2M („alpha-2-macroglobulin“), klasterín, hemoglobín a fibrinogén. MV zväčša RNA nenesú, alebo len vo veľmi malých množstvách. V MV bola detegovaná rRNA po inkubácii s TRAIL, čo môže byť vysvetlené prítomnosťou apoptotických teliesok [80].

MV z plazmy, kde majoritu tvoria PMV (viď ďalej) sa skladajú z 59,2% PC, 20,6% SM, 9,4% PE a zvyšok tvoria minoritné fosfolipidy medzi ktoré patrí PS a fosfatidylinozitol („phosphatidylinositol“ – PI) so zastúpením pod 5% [81].

6. Zápaly a autoimunitné ochorenia

Zápaly predstavujú obranný mechanizmus proti infekcii a opravný mechanizmus poškodených tkanív pri tkanivovom poranení. Zápal je aj súčasťou autoimunit a práve EV dokážu zápalové odpovede modulovať. Imunotolerancia, teda stav, kedy imunitný systém neodpovedá na určité tkanivá alebo látky, ako neškodné autoantigény, pri autoimunitne nefunguje a imunitná homeostáza je deregulovaná. Za imunosupresiu sú zodpovedné najmä regulačné T-bunky, ktoré sú primárnou príčinou vzniku zápalových a autoimunitných ochorení, ak nefungujú [82]. Rolu však hrajú aj dendritické bunky, monocyty či mastocyty. Vznik autoimunitných chorôb je dôsledkom vytvorenia abnormálnej imunitnej odpovede spustenej výskytom stresového alebo infekčného faktoru u geneticky predisponovaného jedinca. Medzi tieto faktory patria antigény PAMP a DAMP, ktoré sú prenášané v EV. PAMP a DAMP aktivujú PRR receptory („pattern recognition receptor“ – PRR) na APC. PRR rozoznávajú PAMP a DAMP a pre APC slúžia ako pomocné látky (adjuvans), podporujú ich maturáciu, ktorá vedie k aktivácii lymfocytov a tým k produkcii prozápalových cytokínov [83]. Zápaly aj autoimunitné ochorenia sú charakteristické aktiváciou buniek, počas ktorej sa uvoľňujú MV z leukocytov (subpopulácie MV: z erytrocytov, lymfocytov, monocytov, granulocytov a EC), no najmä MV pochádzajúce z krvných doštičiek [9].

6.1 Zápal a koagulácia

Koagulácia má vplyv na aktivitu zápalov. Tkanivový faktor („tissue factor“ – TF) je hlavný bunkový iniciátor zrážania krvi a spolupracuje s membránovým PS (na povrchu MV). Rezervoárom TF v cirkulujúcej krvi sú MV, ktoré majú samy o sebe prokoagulačný povrch [8; 84]. TF je receptor pre koagulačný faktor VII a preto je kľúčovým komponentom včasného štádia zrážania krvi [85]. Komplex TF:VIIa sprostredkováva syntézu koagulačnej proteázy trombínu [86], po aktivácii koagulácie. TF s trombínom fungujú pri premene monomérov fibrinogénu na fibrínovú sieť. Extravaskulárne bunky v tkanivách, ktoré nie sú v priamom kontakte s krvou (bunky hladkého svalstva) produkujú TF konštitutívne, ale krvné bunky TF za fyziologických podmienok neprodukujú, iba za patologických [14]. TF sa po kontakte s krvou stáva zymogénom koagulačných faktorov. V kľude, endotel reprimuje expresiu TF a uvoľňuje antitrombogénne faktory. Pri zápale, za prítomnosti zápalových

cytokínov ale narastá expresia TF, naruší sa hemostáza a zvýši sa prokoagulácia. Zápalová signalizácia TF však nevyžaduje aktívnu koaguláciu [85].

Zápaly inhibujú fyziologické antikoagulačné systémy– antitrombínový systém a proteín C (hlavný spojovník koagulácie so zápalom). Zápaly podnecujú koaguláciu aktivovanú trombínom a inhibujú fibrinolýzu t.j. rozloženie fibrínovej zátky (produktu koagulácie). Vďaka inhibícii fibrinolýzy, sa pri zápale fibrín nadbytočne intravaskulárne ukladá [86], pri RA sa fibrín ukladá v synoviálnych kĺboch. Produkty degradácie fibrinogénu a fibrínu majú prozápalové vlastnosti. Medzi tieto produkty patrí typický biomarker zápalu a koagulácie D-dimér, prítomný aj v RA, zhrnuté v [87].

Zápal propaguje vznik MV z buniek, ktoré sú v kontakte s krvou [84]. Rovnováha medzi protizápalovým IL-10 (inhibujúcim expresiu TF) a prozápalovým TNF- α reguluje vznik PMV [64]. PMV podporujú vznik trombínu podporujúceho koaguláciu [64] a viažu koagulačné faktory VIII a Va. Keď sú doštičky aktivované trombínom, uvoľnia zápalové mediátory, schopné aktivovať koagulačnú dráhu a utlmiť antikoagulačné procesy – cytokíny, chemokíny, antimikrobiálne peptidy, bioaktívne lipidové mediátory a vazoaktívne látky [88]. Trombín reaguje s receptormi na doštičkách, doštičky aktivuje, čoho výsledkom je generovanie PMV. PMV má takmer rovnakú prokoagulačnú aktivitu, ako aktivovaná doštička, povrch PMV je síce menší (0,26 μm^2 ; kým doštičky majú 24,8 μm^2), ale ich aktívny povrch na jednotku plochy je 50 až 100 násobne viac prokoagulačný, ako povrch aktivovaných doštičiek. 25% prokoagulačnej aktivity v krvi tvoria PMV, zhrnuté v [9].

6.2 Mikrovezikuly krvných doštičiek za fyziologického stavu

Za fyziologických podmienok je koncentrácia MV v periférnej krvi 5 – 50 $\mu\text{g/ml}$ [43], z toho 70 – 90% pochádza z krvných doštičiek (PMV), má ich povrchové markery a zvyšok je odvodený z EC a leukocytov [89]. Hlavným markerom doštičiek je CD41⁺ a hladina CD41⁺ je u RA pacientov zvýšená, pretože sa nachádza na povrchu PMV v synoviálnej tekutine [90]. V zdravom organizme sú PMV tiež najhojnejšími cirkulujúcimi MV, pretože 10⁴ PMV/ μl nesie CD41⁺ molekulu [35]. Počas života PMV zistený pomocou aferézy (metóda, ktorou sa prístrojovým spracovaním získava jedna alebo viac zložiek z plnej krvi, pričom ostatné zložky sú vrátené späť do krvi) je 5,3 – 5,8 hodiny [91], čo je oveľa menej v porovnaní so životnosťou doštičiek (10 dní) [92].

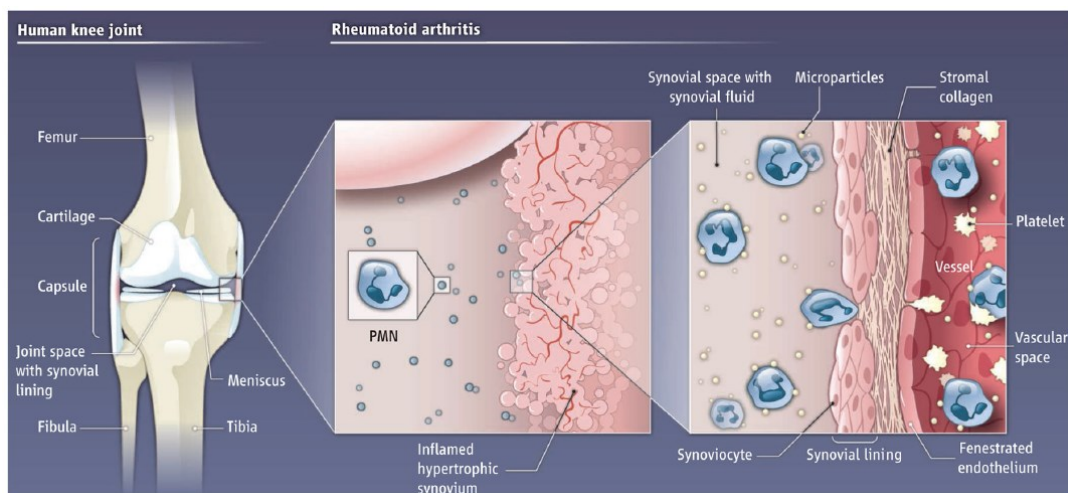
6.3 Patológie súvisiace s mikrovezikulami krvných doštičiek

Medzi patológie súvisiace s PMV a zvýšením ich hladiny patrí zápal, RA, SLE, primárny Sjögrenov syndróm, sepsa, bunková aktivácia a dysfunkcia, cievna tromboembólia, kosáčikovitá anémia, hypertenzia, angiogenéza, akútny koronárny syndróm a kardiovaskulárne ochorenia [9]. PMV prispievajú k rozvoju adhezivnosti a tým spôsobujú cievne poškodenia prítomné pri zápaloch [64]. Po *in vitro* stimulácií, PMV exprimovali cytokíny z rodiny interleukínov 1 (IL-1) a to IL-1 α a IL-1 β (v pomere 19,1 pg/mg a 0,1 pg/mg), ktoré dokážu aktivovať zápaly kĺbov cez rezidentné synoviálne fibroblasty (vnútorná výstelka kĺbov) [90]. Kalpaín je zodpovedný za odštiepenie N-terminálnej aminokyseliny IL-1 α prekursoru za vzniku jeho maturovanej formy [93].

U ochorení primárny Sjögrenov syndróm, SLE a RA sú detegované zvýšené hladiny cirkulujúcich MV (z leukocytov a krvných doštičiek) oproti zdravým kontrolám. Na rozlíšenie subpopulácií MV boli použité protilátky anti-CD45 (leukocyty) a anti-CD61 (krvné doštičky) proti membránovo-špecifickým antigénom. Dáta boli namerané pomocou FCM: Sjögrenov syndróm $91,700 \pm 31,292$; SLE $71,230 \pm 19,160$; RA $127,200 \pm 46,825$ a zdravá kontrola 6422 ± 3472 MV vztiahnuté na μl plazmy [17]. Aktivácia doštičiek prebieha lokálne, svedčí o tom porovnanie koncentrácií PMV v podmienkach RA v synoviálnej tekutine ($2 \times 10^5/\mu\text{l}$) a periférnej krvi ($600/\mu\text{l}$) [94; 90]. V nasledujúcej podkapitole sa budem hlbšie venovať patológií RA.

6.4 Reumatoidná artritída

RA je chronické zápalové autoimunitné ochorenie spôsobujúce zápaly kĺbov, bolesti, opuchy, deformácie až postihnutie. Etiológia je však nejasná. RA je bližšie charakterizovaná perzistentnou synovitiidou, teda zápalom synoviálnej blanky kĺbov (Obr. 12). V kĺboch sa akumulujú autoprotiľátky, ktoré poškodzujú chrupavku a kĺb. Reumatoidný faktor je autoprotiľátka, ktorú organizmus pri RA vytvára. Rozpoznáva Fc doménu na IgG. Proti Fc doméne IgG sú namierené reumatoidné faktory IgM a IgA [95]. Podstatou RA, ako aj iných autoimunitných ochorení je porušenie imunotolerancie imunitného systému k vlastným štruktúram – v prípade RA k citrulinovaným autoantigénom. Na doštičkových a leukocytárnych MV sú prítomné citrulinované epitopy, proti ktorým sa tvoria protilátky, viď ďalšia podkapitola.



Obr. 12 Synovium (vnútorná kĺbová blana) je pri RA zapálená. V synoviálnej tekutine sa hromadia polymorfonukleárne leukocyty (na obr. označené ako PMN), cytokíny, chemokíny a iné zápalové mediátory. Kolagén a synoviocyty (bunky synoviálnej membrány) môžu lokálne aktivovať doštičky a tie uvoľnia PMV. PMV vstúpia do kĺbovej medzery, produkujú IL-1 a amplifikujú zápal. Prevzaté z [96]

6.4.1 Citrulinácia v reumatoidnej artritíde

K patogeneze RA prispievajú posttranslačne modifikované citrulinované proteíny (teda deiminované, aminokyselina arginín je v proteíne premenená na neesenciálny citrulín), ktoré sú autoantigénmi. Spolu s inými autoantigénmi ako vimentín a fibronogén a protilátkami proti nim vytvárajú prozápalové imunokomplexy („immune complex“ – IC), ktorých následkom je chronický zápal [97]. Citrulinácia je ireverzibilná. V synoviálnej tekutine sa nachádzajú enzýmy peptidyl-arginín deaminázy (PAD), aktivované redoxným prostredím a kalcium [98]. Pri RA je prítomný enzým PAD4, ktorý modifikuje peptidyl-arginín na peptidyl-citrulín [99], MV teda môžu byť citrulinované, dávať vznik IC a prenášať ich. Vznikajú mikrovezikuly obsahujúce imunokomplex („immunocomplex-containing microvesicle“ – MV-IC) s citrulinovanými epitopmi, nie sú to len PMV, ale aj MV z leukocytov. MV predstavujú antigénny povrch pre vznik funkčných IC.

PMV sa rozdeľujú na väčšie (700 – 3000 nm), ktoré nesú IC (pomocou FCM nameraných $39\,400 \pm 9400$ MV-IC/ μ l synoviálnej tekutiny; pričom väčšinu detegovaných IC, teda $62 \pm 7\%$ predstavujú IC asociované s MV) a menšie (100 – 300 nm), ktoré IC nenesú, ani nie sú asociované s IgG. MV-IC neboli nájdené v krvi, vyskytujú sa zrejme len lokálne v synoviálnej tekutine vo vnútri zapáleného kĺbu. MV-IC stimulujú neutrofile v kĺboch a tie produkujú leukotriény, ktoré vyvolávajú a propagujú zápal [97], PMV sú v zápalových

podmienkach do neutrofilov internalizované (viď ďalej). PMV zo synoviálnej tekutiny asociujú s autoantigénmi fibrinogénom a vimentínom, nesú ich na povrchu a keď sú citrulinované, viažu sa na ne autoprotilátky, čo prispieva k patogenéze RA. V PMV, ktoré nesú IC boli identifikované aj autoprotilátky proti citrulinovaným RA autoantigénom ako proti filaggrínu, histónu H2A/a a enoláze [97].

6.4.2 Zápal v reumatoidnej artritíde

Dôležitú rolu hrá enzým sekretovaná fosfolipáza A₂ („secretory phospholipase A₂“ – sPLA₂), ktorý katalyzuje hydrolyzu na *sn*-2 pozícií glycerofosfolipidov na lyzofosfolipidy a mastné kyseliny. U človeka je exprimovaných deväť druhov sPLA₂, sPLA₂-IIA má prozápalovú aktivitu a sPLA₂-V naopak protizápalovú. Pri RA sú oba enzýmy prítomné v synoviálnej tekutine. Protizápalová skupina V ľudskej sPLA₂ spúšťa fagocytózu (vykonávaná CD14+ makrofágmi) IC obsahujúcich IgG [100]. Hladina sPLA₂-IIA stúpa s aktivitou zápalových ochorení. sPLA₂-IIA je neaktívna na intaktných bunkách a substrátom sú pre ňu MV, ktoré stratili fosfolipidovú asymetriu membrány, teda na povrchu membrány vystavujú negatívne nabité fosfolipidy [101]. Hladiny MV a sPLA₂ spolu korelujú inverzne (čím závažnejšie je ochorenie, tým je vyššia aktivita sPLA₂, ale nižší počet MV) [17]. Tento jav sa dá vysvetliť ako dôsledok zvýšenej aktivity sPLA₂, ktorá hydrolyzuje lipidy v membráne MV za vzniku kyseliny lyzofosfatidovej, po rozpoznaní ich preskupenia [101]. Pri RA môžu byť MV použité ako biomarker, nie však na monitorovanie ochorenia, ak sa pritom neurčuje aj hladina sPLA₂ [17].

Pri RA, PMV exprimujú 12-lipoxygenázu („12- lipoxygenase“ - 12-LO) ktorá spolu so sPLA₂-IIA produkuje eikosanoid kyselinu 12(S)-hydroxyeikosatetranoickú (12(S)-HETE). Pomocou 12(S)-HETE, ako hlavného sprostredkovateľa, sú PMV internalizované do aktivovaných neutrofilov (infiltrovaných do miesta zápalu), hlavne do jadra, alebo ostávajú na povrchu neutrofilov, podmienkou je prítomnosť 12-LO a sPLA₂-IIA. Internalizácia nie je pasívna, je propagovaná PMV cez lipidový mediátor zápalu 12(S)-HETE, uskutočňuje sa pomocou endocytózy závislej na dynamíne, klatríne alebo kaveolíne. sPLA₂-IIA je extracelulárny enzým prítomný len v zápalových výpotkoch (v synoviálnej tekutine). Z toho vyplýva, že PMV sú do neutrofilov internalizované len v zápalových podmienkach v prítomnosti sPLA₂-IIA, je to istá forma regulácie. Nie je však známe, či je tento proces zápalový, alebo protizápalový, len, že je to bežný jav pri zápalových procesoch [102].

Ireverzibilné poškodenie tkanív, hlavne chrupaviek, je pri RA zapríčinené produkciou enzýmov degradujúcich matrix, ktorú sú produkované synoviálnymi fibroblastami [15]. Enzýmy metaloproteinázy ako agrekanáza, degradujúca agrekán (hlavná zložka extracelulárnej matrix chrupaviek) [103] a glykozidázy (β -D-hexózaaminidáza a β -glukuronidáza) sú prenášané v MV zo synoviálnych fibroblastov. Expresia glykozidáz (na rozdiel od iných proteáz) vo fibroblastoch je značne inhibovaná TGF- β 1 a v malej miere aj inými prozápalovými cytokínmi IL-1 β , IL-17 a TNF α [104].

Za patologické stavy v RA nie sú zodpovedné len PMV, ale aj iné MV – z leukocytov, alebo synoviálnych fibroblastov. PMV a leukocytárne MV majú v synoviálnej tekutina RA pacientov podstatnú rolu pri zápale, koagulácií až hyperkoagulácií a degradácii extracelulárnej matrix.

7. Záver

V tejto bakalárskej práci som zhrnula doposiaľ známe poznatky o populácii EV. Použila som primárne články, ako aj kľúčové review z tejto problematiky. Biogenéza ES je preskúmaná podrobnejšie v porovnaní s MV, ktorých štúdium biogenézy *in vivo* si vyžaduje ešte ďalší výskum zainteresovaných molekúl a procesov. Koncentrácie MV pri RA, ktorej patológiu som v tejto práci popisovala, narastajú najviac v prípade MV z krvných doštičiek, ktoré sú ale najkoncentrovanejšie aj za fyziologických podmienok. Pomocou FCM bolo v plazme RA pacientov nameraných $127,200 \pm 46,825$ MV z doštičiek a leukocytov vztiahnuté na μ l plazmy; pričom zdravá kontrola predstavovala 6422 ± 3472 MV/ μ l plazmy. Táto skutočnosť je viditeľná aj na Obr. 6 na výstupných dátach z FCM, kde boli merané koncentrácie a veľkosť MV zo synoviálnej tekutiny RA pacientov. Pri NTA analýze MV zo synoviálnej tekutiny (Obr. 3) bolo zistené veľkostné rozhranie. Majorita MV, teda 5×10^8 MV/ml, mala priemer menší, ako 100 nm. Na PMV a leukocytárnych MV sú prítomné citrulinované antigény, proti ktorým pôsobí imunitný systém. Zápalové prostredie je dotvárané sPLA₂, ktorá hydrolyzuje membránu MV, ich hladiny korelujú so závažnosťou ochorenia inverzne. sPLA₂-IIA spolu s 12-LO, ktorú produkujú PMV zabezpečuje proces bežný pri zápale – internalizáciu do neutrofilov. MV zo synoviálnych fibroblastov produkujú enzýmy (agrekánáza, glykozidázy), ktoré ireverzibilne poškodzujú chrupavky.

Veľa výziev zostáva v oblasti presnej a rýchlej detekcie EV, pretože chýbajú spoľahlivé markery a ich submikroskopická veľkosť je väčšinou pod prahom detekcie bežných prístrojov. EV majú obrovský potenciál stať sa biomarkerom ochorení, ako spomínanej RA, ale aj nádorových, kardiovaskulárnych či infekčných ochorení. Je potrebné spresniť metodiky ich detekcie v telových tekutinách ako aj rozboru ich vnútorného obsahu. Zatiaľ za najlepšiu metódu, vhodnú aj do klinickej praxe je považovaná dedikovaná FCM (prah detekcie 70 – 100 nm) s použitím dedikovaného prístroja pre malé EV, akým je Apogee A50. Na analýzu jednotlivých častíc je však rutinne stále najviac používaná konvenčná FCM, ktorej prah detekcie (270 - 600 nm) nie je dostatočne nízky na detekciu všetkých analyzovaných častíc.

8. Použitá literatúra

- [1] DRAGOVIC, Rebecca A., Christopher GARDINER, Alexandra S. BROOKS, Dionne S. TANNETTA, David J. P. FERGUSON, Patrick HOLE, Bob CARR, Christopher W. G. REDMAN, Adrian L. HARRIS, Peter J. DOBSON, Paul HARRISON a Ian L. SARGENT. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* [online]. 2011, **7**(6), 780–788. ISSN 1549-9642. Dostupné z: [doi:10.1016/j.nano.2011.04.003](https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003)
- [2] THÉRY, Clotilde, Matias OSTROWSKI a Elodie SEGURA. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2009, **9**(8), 581–593. ISSN 1474-1741. Dostupné z: [doi:10.1038/nri2567](https://doi.org/10.1038/nri2567)
- [3] LEE, Yi, Samir EL ANDALOUSSI a Matthew J. A. WOOD. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics* [online]. 2012, **21**(R1), R125–R134. ISSN 0964-6906. Dostupné z: [doi:10.1093/hmg/dds317](https://doi.org/10.1093/hmg/dds317)
- [4] POON, Ivan K. H., Christopher D. LUCAS, Adriano G. ROSSI a Kodi S. RAVICHANDRAN. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2014, **14**(3), 166–180. ISSN 1474-1741. Dostupné z: [doi:10.1038/nri3607](https://doi.org/10.1038/nri3607)
- [5] AKERS, Johnny C., David GONDA, Ryan KIM, Bob S. CARTER a Clark C. CHEN. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology* [online]. 2013, **113**(1), 1–11. ISSN 1573-7373. Dostupné z: [doi:10.1007/s11060-013-1084-8](https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8)
- [6] GYÖRGY, Bence, Tamás G. SZABÓ, Mária PÁSZTÓI, Zsuzsanna PÁL, Petra MISJÁK, Borbála ARADI, Valéria LÁSZLÓ, Eva PÁLLINGER, Erna PAP, Agnes KITTEL, György NAGY, András FALUS a Edit I. BUZÁS. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* [online]. 2011, **68**(16), 2667–2688. ISSN 1420-9071. Dostupné z: [doi:10.1007/s00018-011-0689-3](https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3)
- [7] SENDER, Ron, Shai FUCHS a Ron MILO. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology* [online]. 2016, **14**(8), e1002533. ISSN 1545-7885. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pbio.1002533](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533)
- [8] SUADES, Rosa, Teresa PADRÓ a Lina BADIMON. The Role of Blood-Borne Microparticles in Inflammation and Hemostasis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2015, **41**(6), 590–606. ISSN 1098-9064. Dostupné z: [doi:10.1055/s-0035-1556591](https://doi.org/10.1055/s-0035-1556591)
- [9] BURNIER, Laurent, Pierre FONTANA, Brenda R. KWAK a Anne ANGELILLO-SCHERRER. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2009, **101**(3), 439–451. ISSN 0340-6245. Dostupné z: [doi:10.1160/TH08-08-05211](https://doi.org/10.1160/TH08-08-05211)
- [10] LAI, Frances W., Brian D. LICHTY a Dawn M. E. BOWDISH. Microvesicles: ubiquitous contributors to infection and immunity. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2015, **97**(2), 237–245. ISSN 0741-5400, 1938-3673. Dostupné z: [doi:10.1189/jlb.3RU0513-292RR](https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0513-292RR)
- [11] DE TORO, Julieta, Leticia HERSCHLIK, Claudia WALDNER a Claudia MONGINI. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in Immunology* [online]. 2015, **6**, 203. ISSN 1664-3224. Dostupné z: [doi:10.3389/fimmu.2015.00203](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00203)
- [12] MAAS, Sybren L. N., Xandra O. BREAKEFIELD a Alissa M. WEAVER. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in Cell Biology* [online]. 2017, **27**(3), 172–188. ISSN 1879-3088. Dostupné z: [doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.003)
- [13] ROBBINS, Paul D. a Adrian E. MORELLI. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. *Nature reviews. Immunology* [online]. 2014, **14**(3), 195–208. ISSN 1474-1733. Dostupné z: [doi:10.1038/nri3622](https://doi.org/10.1038/nri3622)

- [14] YÁÑEZ-MÓ, María, Pia R.-M. SILJANDER, Zoraida ANDREU, Apolonija Bedina ZAVEC, Francesc E. BORRÁS, Edit I. BUZAS, Krisztina BUZAS, Enriqueta CASAL, Francesco CAPPELLO, Joana CARVALHO, Eva COLÁS, Anabela CORDEIRO-DA SILVA, Stefano FAIS, Juan M. FALCON-PEREZ, Irene M. GHOBRIAL, Bernd GIEBEL, Mario GIMONA, Michael GRANER, Ihsan GURSEL, Mayda GURSEL, Niels H. H. HEEGAARD, An HENDRIX, Peter KIERULF, Katsutoshi KOKUBUN, Maja KOSANOVIC, Veronika KRALJ-IGLIC, Eva-Maria KRÄMER-ALBERS, Saara LAITINEN, Cecilia LÄSSER, Thomas LENER, Erzsébet LIGETI, Aija LINĒ, Georg LIPPS, Alicia LLORENTE, Jan LÖTVALL, Mateja MANČEK-KEBER, Antonio MARCILLA, Maria MITTELBRUNN, Irina NAZARENKO, Esther N. M. NOLTE-'T HOEN, Tuula A. NYMAN, Lorraine O'DRISCOLL, Mireia OLIVAN, Carla OLIVEIRA, Éva PÁLLINGER, Hernando A. DEL PORTILLO, Jaume REVENTÓS, Marina RIGAU, Eva ROHDE, Marei SAMMAR, Francisco SÁNCHEZ-MADRID, N. SANTARÉM, Katharina SCHALLMOSE, Marie Stampe OSTENFELD, Willem STOORVOGEL, Roman STUKELJ, Susanne G. VAN DER GREIN, M. Helena VASCONCELOS, Marca H. M. WAUBEN a Olivier DE WEVER. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2015, **4**, 27066. ISSN 2001-3078. Dostupné z: [doi: 10.3402/jev.v4.27066](https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066)
- [15] BUZAS, Edit I., Bence GYÖRGY, György NAGY, András FALUS a Steffen GAY. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nature Reviews. Rheumatology* [online]. 2014, **10**(6), 356–364. ISSN 1759-4804. Dostupné z: [doi:10.1038/nrrheum.2014.19](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.19)
- [16] TURIÁK, Lilla, Petra MISJÁK, Tamás G. SZABÓ, Borbála ARADI, Krisztina PÁLÓCZI, Oliver OZOHANICS, László DRAHOS, Agnes KITTEL, András FALUS, Edit I. BUZÁS a Károly VÉKEY. Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice. *Journal of Proteomics* [online]. 2011, **74**(10), 2025–2033. ISSN 1876-7737. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jprot.2011.05.023](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.023)
- [17] SELLAM, Jérémie, Valérie PROULLE, Astrid JÜNGEL, Marc ITTAH, Corinne MICELI RICHARD, Jacques-Eric GOTTENBERG, Florence TOTI, Joelle BENESSIANO, Steffen GAY, Jean-Marie FREYSSINET a Xavier MARIETTE. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2009, **11**(5), R156. ISSN 1478-6362. Dostupné z: [doi:10.1186/ar2833](https://doi.org/10.1186/ar2833)
- [18] NOCTURNE, Gaëtane a Xavier MARIETTE. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *Nature Reviews. Rheumatology* [online]. 2013, **9**(9), 544–556. ISSN 1759-4804. Dostupné z: [doi:10.1038/nrrheum.2013.110](https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.110)
- [19] MULCAHY, Laura Ann, Ryan Charles PINK a David Raul Francisco CARTER. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2014, **3**. ISSN 2001-3078. Dostupné z: [doi:10.3402/jev.v3.24641](https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641)
- [20] PEINADO, Héctor, Maša ALEČKOVIĆ, Simon LAVOTSHKIN, Irina MATEI, Bruno COSTA-SILVA, Gema MORENO-BUENO, Marta HERGUETA-REDONDO, Caitlin WILLIAMS, Guillermo GARCÍA-SANTOS, Cyrus GHAJAR, Ayuko NITADORI-HOSHINO, Caitlin HOFFMAN, Karen BADAL, Benjamin A. GARCIA, Margaret K. CALLAHAN, Jianda YUAN, Vilma R. MARTINS, Johan SKOG, Rosandra N. KAPLAN, Mary S. BRADY, Jedd D. WOLCHOK, Paul B. CHAPMAN, Yibin KANG, Jacqueline BROMBERG a David LYDEN. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* [online]. 2012, **18**(6), 883–891. ISSN 1546-170X. Dostupné z: [doi:10.1038/nm.2753](https://doi.org/10.1038/nm.2753)
- [21] RUPERT, Déborah L. M., Virginia CLAUDIO, Cecilia LÄSSER a Marta BALLY. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. 2017, **1861**(1 Pt A), 3164–3179. ISSN 0006-3002. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bbagen.2016.07.028](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.028)
- [22] WILLMS, Eduard, Henrik J. JOHANSSON, Imre MÄGER, Yi LEE, K. Emelie M. BLOMBERG, Mariam SADIK, Amr ALAARG, C. I. Edvard SMITH, Janne LEHTIÖ, Samir EL ANDALOUSSI, Matthew J. A. WOOD a Pieter VADER. Cells release subpopulations of exosomes with distinct

- molecular and biological properties. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**, 22519. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/srep22519](https://doi.org/10.1038/srep22519)
- [23] PHILIPS, Ron Milo & Ron. » *What is the density of cells?* [online]. [vid. 2018-04-08]. Dostupné z: <http://book.bionumbers.org/what-is-the-density-of-cells/>
- [24] COINTE, S., C. JUDICONE, S. ROBERT, M. J. MOOBERRY, P. PONCELET, M. WAUBEN, R. NIEUWLAND, N. S. KEY, F. DIGNAT-GEORGE a R. LACROIX. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* [online]. 2017, **15**(1), 187–193. ISSN 1538-7836. Dostupné z: [doi:10.1111/jth.13514](https://doi.org/10.1111/jth.13514)
- [25] SOO, Chin Y, Yaqiong SONG, Ying ZHENG, Elaine C CAMPBELL, Andrew C RICHES, Frank GUNN-MOORE a Simon J POWIS. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology* [online]. 2012, **136**(2), 192–197. ISSN 0019-2805. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03569.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03569.x)
- [26] LINARES, Romain, Sisareuth TAN, Céline GOUNOU a Alain R. BRISSON. Imaging and Quantification of Extracellular Vesicles by Transmission Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2017, **1545**, 43–54. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-6728-5_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_4)
- [27] GERCEL-TAYLOR, Cicek, Safinur ATAY, Richard H. TULLIS, Mehmet KESIMER a Douglas D. TAYLOR. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Analytical Biochemistry* [online]. 2012, **428**(1), 44–53. ISSN 1096-0309. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ab.2012.06.004](https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.004)
- [28] ERDBRÜGGER, Uta a Joanne LANNIGAN. Analytical challenges of extracellular vesicle detection: A comparison of different techniques. *Cytometry Part A* [online]. 2016, **89**(2), 123–134. ISSN 1552-4930. Dostupné z: [doi:10.1002/cyto.a.22795](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22795)
- [29] HAUSER, Paul, Sha WANG a Vladimir V. DIDENKO. Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2017, **1554**, 193–200. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-6759-9_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9_12)
- [30] VAN DER VLIST, Els J., Esther N. M. NOLTE-'T HOEN, Willem STOOORVOGEL, Ger J. A. ARKESTEIJN a Marca H. M. WAUBEN. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nature Protocols* [online]. 2012, **7**(7), 1311–1326. ISSN 1750-2799. Dostupné z: [doi:10.1038/nprot.2012.065](https://doi.org/10.1038/nprot.2012.065)
- [31] *Dynamic Light Scattering* [online]. [vid. 2018-04-08]. Dostupné z: <https://cnx.org/contents/P8mNrZNN@2/Dynamic-Light-Scattering>
- [32] GIEBEL, Bernd a Clemens HELMBRECHT. Methods to Analyze EVs. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2017, **1545**, 1–20. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-6728-5_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6728-5_1)
- [33] MAAS, Sybren L. N., Jeroen DE VRIJ, Els J. VAN DER VLIST, Biaina GERAGOUSIAN, Louis VAN BLOOIS, Enrico MASTROBATTISTA, Raymond M. SCHIFFELERS, Marca H. M. WAUBEN, Marike L. D. BROEKMAN a Esther N. M. NOLTE-'T HOEN. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. 2015, **200**, 87–96. ISSN 1873-4995. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.041](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.041)
- [34] GYÖRGY, Bence, Tamás G. SZABÓ, Lilla TURIÁK, Matthew WRIGHT, Petra HERCZEG, Zsigmond LÉDECZI, Agnes KITTEL, Anna POLGÁR, Kálmán TÓTH, Beáta DÉRFALVI, Gergő ZELENÁK, István BÖRÖCZ, Bob CARR, György NAGY, Károly VÉKEY, Steffen GAY, András FALUS a Edit I. BUZÁS. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One* [online]. 2012, **7**(11), e49726. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0049726](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049726)

- [35] ARRAUD, N., R. LINARES, S. TAN, C. GOUNOU, J.-M. PASQUET, S. MORNET a A. R. BRISSON. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* [online]. 2014, **12**(5), 614–627. ISSN 1538-7836. Dostupné z: [doi:10.1111/jth.12554](https://doi.org/10.1111/jth.12554)
- [36] WELSH, Joshua A., Judith A. HOLLOWAY, James S. WILKINSON a Nicola A. ENGLYST. Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 2017, **5** [vid. 2017-12-13]. ISSN 2296-634X. Dostupné z: [doi:10.3389/fcell.2017.00078](https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00078)
- [37] NOLAN, John P. a Erika DUGGAN. Analysis of Individual Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2018, **1678**, 79–92. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-7346-0_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7346-0_5)
- [38] *What Is Flow Cytometry Light Scatter And How Cell Size And Particle Size Affects It | Expert Cytometry* [online]. [vid. 2018-05-05]. Dostupné z: <https://expertcytometry.com/whats-flow-cytometry-light-scatter-how-cell-size-particle-size-affects-it/>
- [39] POSPICHALOVA, Vendula, Jan SVOBODA, Zankruti DAVE, Anna KOTRBOVA, Karol KAISER, Dobromila KLEMOVA, Ladislav ILKOVICS, Ales HAMPL, Igor CRHA, Eva JANDAKOVA, Lubos MINAR, Vit WEINBERGER a Vitezslav BRYJA. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2015, **4**, 25530. ISSN 2001-3078. Dostupné z: [doi: 10.3402/jev.v4.25530](https://doi.org/10.3402/jev.v4.25530)
- [40] KORMELINK, Tom Groot, Ger J. A. ARKESTEIJN, Frans A. NAUWELAERS, Ger VAN DEN ENGH, Esther N. M. NOLTE-'T HOEN a Marca H. M. WAUBEN. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. *Cytometry Part A* [online]. 2016, **89**(2), 135–147. ISSN 1552-4930. Dostupné z: [doi:10.1002/cyto.a.22644](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22644)
- [41] KONOKHOVA, Anastasiya I., Maxim A. YURKIN, Alexander E. MOSKALENSKY, Andrei V. CHERNYSHEV, Galina A. TSVETOVSKAYA, Elena D. CHIKOVA a Valeri P. MALTSEV. Light-scattering flow cytometry for identification and characterization of blood microparticles. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2012, **17**(5), 057006. ISSN 1560-2281. Dostupné z: [doi:10.1117/1.JBO.17.5.057006](https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.5.057006)
- [42] VOLGERS, Charlotte, Birke J. BENEDIKTER, Gert E. GRAULS, Paul H. M. SAVELKOUL a Frank R. M. STASSEN. Bead-based flow-cytometry for semi-quantitative analysis of complex membrane vesicle populations released by bacteria and host cells. *Microbiological Research* [online]. 2017, **200**, 25–32. ISSN 1618-0623. Dostupné z: [doi:10.1016/j.micres.2017.04.003](https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.003)
- [43] HOYER, Friedrich Felix, Georg NICKENIG a Nikos WERNER. Microparticles--messengers of biological information. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2010, **14**(9), 2250–2256. ISSN 1582-4934. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01114.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01114.x)
- [44] VIÑUELA-BERNI, V., L. DONÍZ-PADILLA, N. FIGUEROA-VEGA, H. PORTILLO-SALAZAR, C. ABUD-MENDOZA, L. BARANDA a R. GONZÁLEZ-AMARO. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2015, **180**(3), 442–451. ISSN 1365-2249. Dostupné z: [doi:10.1111/cei.12598](https://doi.org/10.1111/cei.12598)
- [45] VAN DER POL, E., F. a. W. COUMANS, A. E. GROOTEMAAT, C. GARDINER, I. L. SARGENT, P. HARRISON, A. STURK, T. G. VAN LEEUWEN a R. NIEUWLAND. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [online]. 2014, **12**(7), 1182–1192. ISSN 1538-7836. Dostupné z: [doi:10.1111/jth.12602](https://doi.org/10.1111/jth.12602)
- [46] SHAPIRO, Howard M. *Practical Flow Cytometry*. B.m.: John Wiley & Sons, 2005. ISBN 978-0-471-43403-0.

- [47] KAILASHIYA, Jyotsna. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Analytical Biochemistry* [online]. 2018, **546**, 78–85. ISSN 1096-0309. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ab.2018.01.030](https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.030)
- [48] SCOTT, Cameron C., Fabrizio VACCA a Jean GRUENBERG. Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2014, **31**, 2–10. ISSN 1096-3634. Dostupné z: [doi:10.1016/S0140-6736\(10\)60826-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60826-4)
- [49] VAN NIEL, Guillaume, Gisela D'ANGELO a Graça RAPOSO. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. 2018. ISSN 1471-0080. Dostupné z: [doi:10.1038/nrm.2017.125](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125)
- [50] RUSTEN, Tor Erik, Thomas VACCARI a Harald STENMARK. Shaping development with ESCRTs. *Nature Cell Biology* [online]. 2011, **14**(1), 38–45. ISSN 1476-4679. Dostupné z: [doi:10.1038/ncb2381](https://doi.org/10.1038/ncb2381)
- [51] WOLLERT, Thomas a James H. HURLEY. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* [online]. 2010, **464**(7290), 864–869. ISSN 1476-4687. Dostupné z: [doi:10.1038/nature08849](https://doi.org/10.1038/nature08849)
- [52] COLOMBO, Marina, Catarina MOITA, Guillaume VAN NIEL, Joanna KOWAL, James VIGNERON, Philippe BENAROCHE, Nicolas MANEL, Luis F. MOITA, Clotilde THÉRY a Graça RAPOSO. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science* [online]. 2013, **126**(Pt 24), 5553–5565. ISSN 1477-9137. Dostupné z: [doi:10.1242/jcs.128868](https://doi.org/10.1242/jcs.128868)
- [53] WILLIAMS, Roger L. a Sylvie URBÉ. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* [online]. 2007, **8**(5), 355–368. ISSN 1471-0072. Dostupné z: [doi:10.1038/nrm2162](https://doi.org/10.1038/nrm2162)
- [54] BUSCHOW, Sonja I., Esther N. M. NOLTE-'T HOEN, Guillaume VAN NIEL, Maaïke S. POLS, Toine TEN BROEKE, Marjolein LAUWEN, Ferry OSSENDORP, Cornelis J. M. MELIEF, Graça RAPOSO, Richard WUBBOLTS, Marca H. M. WAUBEN a Willem STOORVOGEL. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* [online]. 2009, **10**(10), 1528–1542. ISSN 1600-0854. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x)
- [55] TRAJKOVIC, Katarina, Chieh HSU, Salvatore CHIANTIA, Lawrence RAJENDRAN, Dirk WENZEL, Felix WIELAND, Petra SCHWILLE, Britta BRÜGGER a Mikael SIMONS. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2008, **319**(5867), 1244–1247. ISSN 1095-9203. Dostupné z: [10.1126/science.1153124](https://doi.org/10.1126/science.1153124)
- [56] DREYER, Florian a Andreas BAUR. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles. In: *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools* [online]. B.m.: Humana Press, New York, NY, 2016 [vid. 2017-12-15], *Methods in Molecular Biology*, s. 201–216. ISBN 978-1-4939-3751-6. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-4939-3753-0_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3753-0_15)
- [57] JUSTICE, Matthew J., Irina BRONOVA, Kelly S. SCHWEITZER, Christophe POIRIER, Janice S. BLUM, Evgheny V. BERDYSHEV a Irina PETRACHE. Inhibition of Acid Sphingomyelinase Disrupts LYNUS Signaling and Triggers Autophagy. *Journal of Lipid Research* [online]. 2018. ISSN 1539-7262. Dostupné z: [doi:10.1194/jlr.M080242](https://doi.org/10.1194/jlr.M080242)
- [58] GULBINS, Erich a Richard KOLESNICK. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* [online]. 2003, **22**(45), 7070–7077. ISSN 0950-9232. Dostupné z: [doi:10.1038/sj.onc.1207146](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207146)
- [59] DAVIZON, Pavel, Adam D. MUNDAY a José A. LÓPEZ. Tissue factor, lipid rafts, and microparticles. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [online]. 2010, **36**(8), 857–864. ISSN 1098-9064. Dostupné z: [doi:10.1055/s-0030-1267039](https://doi.org/10.1055/s-0030-1267039)

- [60] HESSVIK, Nina Pettersen a Alicia LLORENTE. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2018, **75**(2), 193–208. ISSN 1420-682X. Dostupné z: [doi:10.1007/s00018-017-2595-9](https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9)
- [61] DEOLINDO, Poliana, Ingrid EVANS-OSES a Marcel Ivan RAMIREZ. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2013, **41**(1), 252–257. ISSN 1470-8752. Dostupné z: [doi:10.1042/BST20120217](https://doi.org/10.1042/BST20120217)
- [62] NABHAN, Joseph F., Ruoxi HU, Raymond S. OH, Stanley N. COHEN a Quan LU. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(11), 4146–4151. ISSN 1091-6490. Dostupné z: [doi:10.1073/pnas.1200448109](https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109)
- [63] FREYSSINET, Jean-Marie a Florence TOTI. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thrombosis Research* [online]. 2010, **125 Suppl 1**, S46-48. ISSN 1879-2472. Dostupné z: [doi:10.1016/j.thromres.2010.01.036](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.036)
- [64] NOMURA, Shosaku a Michiomi SHIMIZU. Clinical significance of procoagulant microparticles. *Journal of Intensive Care* [online]. 2015, **3**, 2. ISSN 2052-0492. Dostupné z: [doi:10.1186/s40560-014-0066-z](https://doi.org/10.1186/s40560-014-0066-z)
- [65] VARON, D. a E. SHAI. Platelets and their microparticles as key players in pathophysiological responses. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH* [online]. 2015, **13 Suppl 1**, S40-46. ISSN 1538-7836. Dostupné z: [doi:10.1111/jth.12976](https://doi.org/10.1111/jth.12976)
- [66] WIEDMER, T., S. J. SHATTIL, M. CUNNINGHAM a P. J. SIMS. Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. *Biochemistry*. 1990, **29**(3), 623–632. ISSN 0006-2960.
- [67] ZABOROWSKI, Mikołaj P., Leonora BALAJ, Xandra O. BREAKFIELD a Charles P. LAI. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* [online]. 2015, **65**(8), 783–797. ISSN 0006-3568. Dostupné z: [doi:10.1093/biosci/biv084z](https://doi.org/10.1093/biosci/biv084z)
- [68] OSTEIKOETXEA, Xabier, Barbara SÓDAR, Andrea NÉMETH, Katalin SZABÓ-TAYLOR, Krisztina PÁLÓCZI, Krisztina V. VUKMAN, Viola TAMÁSI, Andrea BALOGH, Ágnes KITTEL, Éva PÁLLINGER a Edit Irén BUZÁS. Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic & Biomolecular Chemistry* [online]. 2015, **13**(38), 9775–9782. ISSN 1477-0539. Dostupné z: [doi:10.1039/c5ob01451d](https://doi.org/10.1039/c5ob01451d)
- [69] VILLARROYA-BELTRI, Carolina, Cristina GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Fátima SÁNCHEZ-CABO, Daniel PÉREZ-HERNÁNDEZ, Jesús VÁZQUEZ, Noa MARTIN-COFRECES, Dannys Jorge MARTINEZ-HERRERA, Alberto PASCUAL-MONTANO, María MITTELBRUNN a Francisco SÁNCHEZ-MADRID. Sumoylated hnRNP2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* [online]. 2013, **4**, 2980. ISSN 2041-1723. Dostupné z: [doi:10.1038/ncomms3980](https://doi.org/10.1038/ncomms3980)
- [70] GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Cristina, Carolina VILLARROYA-BELTRI, María MITTELBRUNN a Francisco SÁNCHEZ-MADRID. Transfer of extracellular vesicles during immune cell-cell interactions. *Immunological reviews* [online]. 2013, **251**(1), 125–142. ISSN 0105-2896. Dostupné z: [doi:10.1111/imr.12013](https://doi.org/10.1111/imr.12013)
- [71] ANDREU, Zoraida a María YÁÑEZ-MÓ. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology* [online]. 2014, **5**, 442. ISSN 1664-3224. Dostupné z: [doi:10.3389/fimmu.2014.00442](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442)
- [72] PEREZ-HERNANDEZ, Daniel, Cristina GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, Inmaculada JORGE, Soraya LÓPEZ-MARTÍN, Angeles URSA, Francisco SÁNCHEZ-MADRID, Jesús VÁZQUEZ a María YÁÑEZ-MÓ. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their

- function as sorting machineries toward exosomes. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2013, **288**(17), 11649–11661. ISSN 1083-351X. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.M112.445304](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304)
- [73] OBREGON, Carolina, Barbara ROTHEN-RUTISHAUSER, Peter GERBER, Peter GEHR a Laurent P. NICOD. Active uptake of dendritic cell-derived exovesicles by epithelial cells induces the release of inflammatory mediators through a TNF-alpha-mediated pathway. *The American Journal of Pathology* [online]. 2009, **175**(2), 696–705. ISSN 1525-2191. Dostupné z: [doi:10.2353/ajpath.2009.080716](https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080716)
- [74] NOLTE-'T HOEN, Esther N. M., Henk P. J. BUERMANS, Maaïke WAASDORP, Willem STOOORVOGEL, Marca H. M. WAUBEN a Peter A. C. 'T HOEN. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research* [online]. 2012, **40**(18), 9272–9285. ISSN 0305-1048. Dostupné z: [doi:10.1093/nar/gks658F](https://doi.org/10.1093/nar/gks658F)
- [75] MATHIVANAN, Suresh, Hong JI a Richard J. SIMPSON. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics* [online]. 2010, **73**(10), 1907–1920. ISSN 1876-7737. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006)
- [76] BASTOS-AMADOR, Patricia, Felix ROYO, Esperanza GONZALEZ, Javier CONDE-VANCELLS, Laura PALOMO-DIEZ, Francesc E. BORRAS a Juan M. FALCON-PEREZ. Proteomic analysis of microvesicles from plasma of healthy donors reveals high individual variability. *Journal of Proteomics* [online]. 2012, **75**(12), 3574–3584. ISSN 1876-7737. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jprot.2012.03.054](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.054)
- [77] KAPUR, Rick, Anne ZUFFEREY, Eric BOILARD a John W. SEMPLE. Nouvelle cuisine: platelets served with inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* [online]. 2015, **194**(12), 5579–5587. ISSN 1550-6606. Dostupné z: [doi:10.4049/jimmunol.1500259](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500259)
- [78] NURDEN, Alan T. The biology of the platelet with special reference to inflammation, wound healing and immunity. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. 2018, **23**, 726–751. ISSN 1093-4715. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.2741/4613>
- [79] LAFFONT, Benoit, Aurélie CORDUAN, Hélène PLÉ, Anne-Claire DUCHEZ, Nathalie CLOUTIER, Eric BOILARD a Patrick PROVOST. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* [online]. 2013, **122**(2), 253–261. ISSN 1528-0020. Dostupné z: [doi:10.1182/blood-2013-03-492801](https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492801)
- [80] CRESCITELLI, Rossella, Cecilia LÄSSER, Tamas G. SZABÓ, Agnes KITTEL, Maria ELDH, Irma DIANZANI, Edit I. BUZÁS a Jan LÖTVALL. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of Extracellular Vesicles* [online]. 2013, **2**. ISSN 2001-3078. Dostupné z: [doi:10.3402/jev.v2i0.20677](https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20677)
- [81] WEERHEIM, A. M., A. M. KOLB, A. STURK a R. NIEUWLAND. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry* [online]. 2002, **302**(2), 191–198. ISSN 0003-2697. Dostupné z: [doi:10.1006/abio.2001.5552](https://doi.org/10.1006/abio.2001.5552)
- [82] SAKAGUCHI, Shimon, Tomoyuki YAMAGUCHI, Takashi NOMURA a Masahiro ONO. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* [online]. 2008, **133**(5), 775–787. ISSN 1097-4172. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cell.2008.05.009](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009)
- [83] TURPIN, Delphine, Marie-Elise TRUCHETET, Benjamin FAUSTIN, Jean-François AUGUSTO, Cécile CONTIN-BORDES, Alain BRISSON, Patrick BLANCO a Pierre DUFFAU. Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* [online]. 2016, **15**(2), 174–183. ISSN 1873-0183. Dostupné z: [doi:10.1016/j.autrev.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.11.004)
- [84] PETÄJÄ, Jari. Inflammation and coagulation. An overview. *Thrombosis Research* [online]. 2011, **127** **Suppl 2**, S34–37. ISSN 1879-2472. Dostupné z: [doi:10.1016/S0049-3848\(10\)70153-5](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70153-5)

- [85] WITKOWSKI, Marco, Ulf LANDMESSER a Ursula RAUCH. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends in Cardiovascular Medicine* [online]. 2016, **26**(4), 297–303. ISSN 1873-2615. Dostupné z: [doi:10.1016/j.tcm.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.12.001)
- [86] LEVI, Marcel, Tymen T. KELLER, Eric VAN GORP a Hugo TEN CATE. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovascular Research* [online]. 2003, **60**(1), 26–39. ISSN 0008-6363. Dostupné z: [doi:10.1016/S0008-6363\(02\)00857-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00857-X)
- [87] DAVALOS, Dimitrios a Katerina AKASSOGLU. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology* [online]. 2012, **34**(1), 43–62. ISSN 1863-2300. Dostupné z: [doi:10.1007/s00281-011-0290-8](https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8)
- [88] DAHLBÄCK, Björn. Coagulation and inflammation--close allies in health and disease. *Seminars in Immunopathology* [online]. 2012, **34**(1), 1–3. ISSN 1863-2300. Dostupné z: [doi:10.1007/s00281-011-0298-0](https://doi.org/10.1007/s00281-011-0298-0)
- [89] PEREZ-PUJOL, Sílvia, Paul H. MARKER a Nigel S. KEY. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* [online]. 2007, **71**(1), 38–45. ISSN 1552-4922. Dostupné z: [doi:10.1002/cyto.a.20354](https://doi.org/10.1002/cyto.a.20354)
- [90] BOILARD, Eric, Peter A. NIGROVIC, Katherine LARABEE, Gerald F. M. WATTS, Jonathan S. COBLYN, Michael E. WEINBLATT, Elena M. MASSAROTTI, Eileen REMOLD-O'DONNELL, Richard W. FARNDAL, Jerry WARE a David M. LEE. Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2010, **327**(5965), 580–583. ISSN 0036-8075. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1181928](https://doi.org/10.1126/science.1181928)
- [91] RANK, A., R. NIEUWLAND, A. CRISPIN, S. GRÜTZNER, M. IBERER, B. TOTH a R. PIHUSCH. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* [online]. 2011, **22**(2), 111–116. ISSN 1369-1635. Dostupné z: [doi:10.3109/09537104.2010.520373](https://doi.org/10.3109/09537104.2010.520373)
- [92] FLAUMENHAFT, Robert. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Molecules & Diseases* [online]. 2006, **36**(2), 182–187. ISSN 1079-9796. Dostupné z: [doi:10.1016/j.bcmd.2005.12.019](https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.019)
- [93] WATANABE, N. a Y. KOBAYASHI. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. *Cytokine*. 1994, **6**(6), 597–601. ISSN 1043-4666.
- [94] KNIJFF-DUTMER, E. a. J., J. KOERTS, R. NIEUWLAND, E. M. KALSBECK-BATENBURG a M. a. F. J. VAN DE LAAR. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* [online]. 2002, **46**(6), 1498–1503. ISSN 0004-3591. Dostupné z: [doi:10.1002/art.10312](https://doi.org/10.1002/art.10312)
- [95] SCOTT, David L., Frederick WOLFE a Tom W. J. HUIZINGA. Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* [online]. 2010, **376**(9746), 1094–1108. ISSN 1474-547X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.semcd.2014.03.034](https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.034)
- [96] ZIMMERMAN, Guy A. a Andrew S. WEYRICH. Immunology. Arsonists in rheumatoid arthritis. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2010, **327**(5965), 528–529. ISSN 1095-9203. Dostupné z: [doi:10.1126/science.1185869](https://doi.org/10.1126/science.1185869)
- [97] CLOUTIER, Nathalie, Sisareuth TAN, Luc H BOUDREAU, Catriona CRAMB, Roopashree SUBBAIAH, Lauren LAHEY, Alexandra ALBERT, Ruslan SHNAYDER, Reuben GOBEZIE, Peter A NIGROVIC, Richard W FARNDAL, William H ROBINSON, Alain BRISSON, David M LEE a Eric BOILARD. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Molecular Medicine* [online]. 2013, **5**(2), 235–249. ISSN 1757-4676. Dostupné z: [doi:10.1002/emmm.201201846](https://doi.org/10.1002/emmm.201201846)

- [98] DARRAH, Erika a Felipe ANDRADE. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Current Opinion in Rheumatology* [online]. 2018, **30**(1), 72–78. ISSN 1531-6963. Dostupné z: [doi:10.1097/BOR.0000000000000452](https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000452)
- [99] ANDRADE, Felipe, Erika DARRAH, Marjan GUCEK, Robert N. COLE, Antony ROSEN a Xiaoming ZHU. Autocitrullination of human peptidyl arginine deiminase type 4 regulates protein citrullination during cell activation. *Arthritis and Rheumatism* [online]. 2010, **62**(6), 1630–1640. ISSN 1529-0131. Dostupné z: [doi:10.1002/art.27439](https://doi.org/10.1002/art.27439)
- [100] BOILARD, Eric, Ying LAI, Katherine LARABEE, Barbara BALESTRIERI, Farideh GHOMASHCHI, Daisuke FUJIOKA, Reuben GOBEZIE, Jonathan S. COBLYN, Michael E. WEINBLATT, Elena M. MASSAROTTI, Thomas S. THORNHILL, Maziar DIVANGAHI, Heinz REMOLD, Gérard LAMBEAU, Michael H. GELB, Jonathan P. ARM a David M. LEE. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO molecular medicine* [online]. 2010, **2**(5), 172–187. ISSN 1757-4684. Dostupné z: [doi:10.1002/emmm.201000072](https://doi.org/10.1002/emmm.201000072)
- [101] FOURCADE, O., M. F. SIMON, C. VIODÉ, N. RUGANI, F. LEBALLE, A. RAGAB, B. FOURNIÉ, L. SARDA a H. CHAP. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. 1995, **80**(6), 919–927. ISSN 0092-8674.
- [102] DUCHEZ, Anne-Claire, Luc H. BOUDREAU, Gajendra S. NAIKA, James BOLLINGER, Clémence BELLEANNÉE, Nathalie CLOUTIER, Benoit LAFFONT, Raifish E. MENDOZA-VILLARROEL, Tania LÉVESQUE, Emmanuelle ROLLET-LABELLE, Matthieu ROUSSEAU, Isabelle ALLAEYS, Jacques J. TREMBLAY, Patrice E. POUBELLE, Gérard LAMBEAU, Marc POULIOT, Patrick PROVOST, Denis SOULET, Michael H. GELB a Eric BOILARD. Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-IIA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2015, **112**(27), E3564-3573. ISSN 1091-6490. Dostupné z: [doi:10.1073/pnas.1507905112](https://doi.org/10.1073/pnas.1507905112)
- [103] LO CICERO, Alessandra, Iwona MAJKOWSKA, Hideaki NAGASE, Italia DI LIEGRO a Linda TROEBERG. Microvesicles shed by oligodendrogloma cells and rheumatoid synovial fibroblasts contain aggrecanase activity. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* [online]. 2012, **31**(4), 229–233. ISSN 1569-1802. Dostupné z: [doi:10.1016/j.matbio.2012.02.005](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.02.005)
- [104] PÁSZTÓI, Mária, György NAGY, Pál GÉHER, Tamás LAKATOS, Kálmán TÓTH, Károly WELLINGER, Péter PÓCZA, Bence GYÖRGY, Marianna C. HOLUB, Agnes KITTEL, Krisztina PÁLÓCZY, Mercédesz MAZÁN, Péter NYIRKOS, András FALUS a Edit I. BUZAS. Gene expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy* [online]. 2009, **11**(3), R68. ISSN 1478-6362. Dostupné z: [doi:10.1186/ar2697](https://doi.org/10.1186/ar2697)