



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nanosized blood microparticles

Yuana, Y.

Citation

Yuana, Y. (2011, October 27). *Nanosized blood microparticles*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17987>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17987>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Achtergrond

Hoewel het intrigerende verband tussen kanker en trombose sinds de 19de eeuw bekend is, is het mechanisme dat deze samenhang verklaart nog niet duidelijk. Micropartikels (MPs; ook wel microvesicles genoemd) kunnen ontstaan na activering van de cel door afsnoering van de celmembraan of na apoptose (geprogrammeerde zelfdood van de cel) en kunnen afkomstig zijn van diverse soorten cellen. Sinds enige jaren denkt men dat MPs een rol zouden kunnen spelen bij het ontstaan van kanker-geassocieerde trombose.

MPs dragen nog kenmerken (antigenen) van de cellen waaruit ze gevormd werden, bloedcellen, vaatendothelcellen, en vermoedelijk ook tumorcellen. Daarnaast bevatten ze op hun buitenmembraan negatief geladen fosfolipiden (fosfatidylserine, PS) ten gevolge van membraan remodelling tijdens hun vorming. Interessant is dat in plasma van patiënten met bepaalde soorten kanker het aantal MPs, dat actief tissue factor (TF, de belangrijkste initiator van de bloedstolling) bevat, sterk verhoogd blijkt te zijn. Helaas wordt de studie van de rol van MPs bij ontstaan en progressie van ziekte ernstig gehinderd door het ontbreken van gestandaardiseerde pre-analytische en analytische procedures voor het meten van MPs, hetgeen resulteert in een grote variatie in de resultaten die door verschillende onderzoeksteams worden gerapporteerd.

Het doel van het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven, was om nieuwe methoden te ontwikkelen voor het nauwkeurig kwantificeren en karakteriseren van MPs en hun deelpopulaties, en wel zoveel mogelijk in hun oorspronkelijke staat. De tot voor kort gebruikte technieken, waarmee de concentratie van MPs werd gemeten, zijn geen van alle geschikt om deeltjes met afmetingen in het nanometer gebied te meten. Daarnaast hebben we geprobeerd een methode te ontwikkelen om de cellulaire oorsprong van MPs met op hun membraan functioneel TF, vast te stellen. Tenslotte werd een mogelijk verband onderzocht tussen MPs die functioneel TF op het oppervlak hebben en het optreden van veneuze trombo-embolie (VTE) in patiënten die behandeld worden voor de kwaadaardige ziekte multipel myeloom.

Meting van micropartikels

Belangrijke factoren

Verschillende pre-analytische omstandigheden zoals bloedafname, centrifugeren tijdens de bereiding van plasma en MPs, en opslag van plasma (inclusief invriezen-ontdooien), kunnen het resultaat van de MP metingen beïnvloeden. In Hoofdstuk 2 van dit proefschrift wordt besproken dat het noodzakelijk is om *ex vivo*-activering van bloedcellen te verhinderen tijdens afname en opwerken van bloed. Dit zou namelijk kunnen leiden tot de ongewenste vorming van MPs uit bloedcellen, met name uit bloedplaatjes (PMPs), maar wellicht ook uit andere bloedcellen zoals de erytrocyt (ErMPs). Om activatie van bloedcellen buiten het lichaam zoveel mogelijk tegen te gaan, is het van belang bloed af te nemen met een naald met een grote diameter, bijvoorbeeld een 21-G naald, en tijdens de venapunctie langdurig stuwen met een tourniquet te vermijden.

Plasma voor MP metingen wordt gewoonlijk bereid door bloed tijdens afname te verzamelen in, en te mengen met, 1/10 volume natriumcitraat (0.105 of 0.129 mol/L). De keuze van dit antistollingsmiddel is gebaseerd op internationale richtlijnen voor routine bepalingen in de hematologie, maar dit kan voor MP metingen minder optimaal zijn. Daarom is het nodig de stabiliteit van MPs in bloed verzameld in andere antistollingsmiddelen zoals ethylenediaminetetra-azijn zuur (EDTA) en citraat theofylline adenosine dipyridamole (CTAD) te vergelijken met de stabiliteit van MPs in bloed afgenomen op natriumcitraat. Voorts moet het volledige proces van bloedafname tot plasmabereiding snel plaatsvinden om *ex vivo*-activering van bloedcellen in de verzamelbuis te voorkomen. De verwijdering van bloedplaatjes uit plasma door centrifugatie is essentieel, maar tegelijkertijd kan het centrifugeren tot ongewenste vorming van MPs uit bloedplaatjes (PMPs) aanleiding geven.

Om MP kenmerken zo goed mogelijk te behouden zouden de MP metingen bij voorkeur direct in vers bereid plasma moeten worden uitgevoerd. Het is echter vaak niet praktisch uitvoerbaar om een meting direct uit te voeren na afname van het bloed. Plasmamonsters moeten dan worden ingevroren en bewaard. Dit teneinde in een later stadium plasmamonsters van verschillende individuen, afgenomen op verschillende tijdstippen, tegelijk te meten, zodat monsters onderling vergeleken kunnen worden. Helaas zijn er nog geen gestandaardiseerde protocollen beschikbaar voor het invriezen en ontdooien van plasma voor het meten van MPs. In Hoofdstuk 2 adviseren wij, dat wanneer MP metingen worden gedaan in ingevroren en vervolgens ontdooid plasma, vooral de aantallen PMPs

en annexin V positieve MPs met terughoudendheid moeten worden geïnterpreteerd.

Zoals vermeld in de introductie van dit proefschrift, variëren MPs in grootte in het submicrongebied. Daarom is een methode nodig, die MPs met nanometer afmetingen nauwkeurig kan meten. De huidige flowcytometers kunnen echter MPs kleiner dan 0.5 μm niet nauwkeurig detecteren. Er zijn wel nieuwe typen flowcytometers in ontwikkeling, die ook deeltjes die iets kleiner zijn dan 0.5 micron nauwkeurig kunnen meten, maar het betrouwbare meetgebied zal niet liggen onder de 0.3 μm . Ook zijn deze nieuwere flowcytometers nog niet uitgebreid getest voor het routinematig meten van aantallen MPs. Wanneer desalniettemin flowcytometrie gebruikt blijft worden voor MP tellingen, zullen een aantal analytische omstandigheden moeten worden gestandaardiseerd. Onlangs stelde de Vascular Biology groep van de Scientific and Standardization Committee (SSC) van de International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) voor om het meten van PMPs groter dan 0.5 μm te standaardiseren door bolletjes met een gekalibreerde grootte (Megamix) te gebruiken om de instelling van de flowcytometer aan te passen en de resolutie te verhogen.

Andere methoden, die gebruikt worden om plasma MPs te bestuderen, zijn elektronenmicroscopie, capture-based analyses en functionele analyses van geïsoleerde MPs. In Hoofdstuk 2 bespreken wij de voor- en nadelen van deze methoden. In het algemeen kunnen ze gebruikt worden om metingen aan plasma MPs te doen mits ze gebruik maken van gestandaardiseerde protocollen, inclusief het gebruik van geschikte reagentia en referentiematerialen. Deze zijn nodig om de reproduceerbaarheid van de bepaling zoals verricht in verschillende laboratoria te vergroten. Wij bespreken in Hoofdstuk 2 ook enkele nieuwe methoden om MPs te meten zoals proteoom analyse, impedance-based flowcytometrie, atoomkrachtmicroscopie (AFM), nanoparticle tracking analysis (NTA), en dynamic light scattering (DLS). Op dit ogenblik zijn deze methoden niet eenvoudig toepasbaar in het laboratorium omdat ze tijdrovend en arbeidsintensief zijn. Ook geeft geen van deze methoden informatie over de functionele eigenschappen van MPs.

De atoomkrachtmicroscopie

In Hoofdstuk 3 beschrijven wij de ontwikkeling van een geheel nieuwe methode om MPs afkomstig uit bloed te meten door gebruik te maken van een atoomkrachtmicroscop (AFM) of tastmicroscop. Eerst hebben we een methode ontwikkeld om MPs met een specifiek antilichaam te binden aan een zeer zuiver en glad mica-oppervlak. De AFM werd vervolgens gebruikt om met de zogenaamde

vloeistof tapping mode de MPs te detecteren die specifiek aan anti-CD41-gecoat mica waren gebonden. We meten met deze techniek dus alleen MPs die zelf het antigeen CD41 (een bloedplaatjes antigeen) bevatten. Voordelen van deze methode zijn dat zelfs krachten van een paar picoNewton zeer gevoelig kunnen worden gedetecteerd en dat de eigenschappen van de micropartikels worden behouden. In Hoofdstuk 3 toonden we aan dat de binding van MPs aan anti-CD41-gecoat mica specifiek was. Er werden duidelijk geringere aantallen MPs gemeten op mica gecoat met een IgG1 isotype controle. Ook werd een lineair verband gevonden tussen het aantal CD41-positieve MPs, dat per $100\ \mu\text{m}^2$ mica gebonden werd, en de MP concentratie in het monster. Wij maten het aantal CD41-positieve MPs in uit vers, dubbel-gecentrifugeerd plaatjes-arm plasma (PPP) geïsoleerde MPs van 7 bloeddonoren en 3 kankerpatiënten met zowel AFM als flowcytometrie. Wij vonden dat de aantallen CD41-positieve MPs, die met AFM worden gemeten, 1.000-maal hoger waren dan de aantallen gemeten met flowcytometrie ($3\text{-}702 \times 10^9/\text{L}$ plasma versus $11\text{-}626 \times 10^6/\text{L}$ plasma). De MPs die met AFM werden gedetecteerd hebben diameters (d_{sph}) van 10-475 nm met een piek bij 67.5 nm, die duidelijk ver onder de detectiegrens van conventionele flowcytometrie ligt.

We hebben ook onderzocht of de AFM kon worden gebruikt voor de detectie van TF-positieve MPs (Hoofdstuk 4). Daartoe werd gemodificeerd mica met FITC-gelabeld anti-humaan TF MoAb gecoat. TF-positieve MPs werden geïsoleerd uit het supernatant van gekweekte MDA-MB231 borstkankercellen, die met calcium ionofore waren gestimuleerd. TF-positieve MPs met diameters (d_{sph}) van 6 tot 296 nm (mediaan: 40,4 nm met een gemiddelde van $46,4 \pm 26,0$ nm) werden met succes gebonden en gedetecteerd op een FITC-gelabeld anti-TF-gecoat oppervlak. Slechts enkele MPs werden gebonden op een mica oppervlak, dat was gecoat met FITC-gelabeld muis IgG1 isotypecontrole. We vonden ook dat het aantal TF-positieve MPs gemeten met de AFM 2.000-maal hoger was dan dat gemeten met flowcytometrie in hetzelfde monster (8×10^6 per μL supernatant vs 4×10^3 per μL supernatant).

Om MPs direct in plasma te kunnen detecteren is een geheel nieuwe meetopstelling gemaakt, waarbij we gebruik hebben gemaakt van een combinatie van microfluidics en AFM (Hoofdstuk 5). Tienvoudig verdund-EDTA PPP werd door een capillair (een heel dun kanaal) van een microfluidic chip geïnjecteerd onder een gecontroleerde constante druk. Deze veroorzaakt een laminaire stroming die nodig is om direct contact tussen het anti-humaan CD41 antilichaam-gecoate mica en MPs te bewerkstelligen. MPs met CD41 antigeen werden gebonden op dit oppervlak en vervolgens gedetecteerd door middel van AFM in vloeistof tapping mode. De meerderheid van de gebonden MPs bleken een diameter (d_{sph}) van 45 nm (bereik: 30-90 nm) te hebben, hetgeen goed overeenkomt met wat wij eerder

vonden met MPs onmiddellijk geïsoleerd uit vers PPP. Blijkbaar heeft de hoge-snelheid centrifugatie, die nodig is om MPs te isoleren, geen invloed op de grootteverdeling van de MPs. Gebruik van microfluidics bleek ook de efficiëntie waarmee MPs op het mica oppervlak werden gebonden, te verhogen. We gebruikten de microfluidics om PMPs aanwezig in het plasma van gezonde donoren te tellen en we vergeleken de resultaten met die verkregen met de zogenaamde druppelmethode. We constateerden dat aanzienlijk meer CD41-positieve MPs per $100 \mu\text{m}^2$ oppervlak gebonden werden, wanneer het plasma werd gemeten met microfluidics dan wanneer deze gemeten werd met een druppelmethode. Uit onze voorlopige gegevens bleek ook dat er een lineair verband bestond tussen het aantal CD41-positieve MPs per $100 \mu\text{m}^2$ oppervlak en de MP concentratie in het monster.

Tot slot, door gebruik te maken van een specifiek MoAb en AFM in vloeistof tapping mode zijn wij in staat om een deelpopulatie van MPs met grote gevoeligheid te detecteren en nauwkeurig te kwantificeren. In combinatie met microfluidics kunnen MPs ook direct worden gemeten in plasma. Dit verkort de tijd tussen venapunctie en MP meting en het voorkomt ook verlies van MPs in de wasstappen, die nodig zijn tijdens de isolatie van MPs. Omdat deze methode afhankelijk is van het gebruik van antilichamen, die een specifieke subpopulatie van MPs kunnen binden, zijn specifieke antilichamen nodig met een hoge affiniteit voor het geselecteerde antigeen. Bovendien, om in de toekomst het precieze aantal MPs te kunnen bepalen in een monster, zal de beschikbaarheid van een externe standaard (bijv. MPs met een bekende concentratie) van essentieel belang worden.

Cryo-elektronenmicroscopie

Conventionele elektronenmicroscopie (EM) werd eerder gebruikt om de morfologie van geïsoleerde MPs te bestuderen. In de conventionele EM is voor de monstervoorbereiding en beeldvormende technieken uitdroging, chemische fixatie en kleuring van het preparaat nodig. Daarom is conventionele EM minder geschikt om de morfologie van MPs direct in plasma te bestuderen. We hebben in Hoofdstuk 6 onderzocht of Cyro-EM kan worden gebruikt om de grootte en de morfologie van submicrondeeltjes (MPs en exosomen) in plasma te bestuderen, en ook om het aantal van deze deeltjes in een vers plasmamonster te schatten zonder gebruik te maken van kleuringen of chemische fixatie procedures. We gebruikten vers plasma (bloedplaatjes-rijk plasma/PRP, bloedplaatjes arm plasma/PPP, bloedplaatjes-vrij plasma/PFP), geïsoleerde MPs, en ook (trombine geactiveerde-) geïsoleerde bloedplaatjes. Deze monsters werden direct op een EM grid ingevroren voor Cyro-EM metingen.

In Hoofdstuk 6 hebben we vastgesteld, dat bloedplaatjes in vers citraat PRP meer geactiveerd waren dan in EDTA PRP, maar duidelijk minder dan in monsters van trombine-geactiveerde bloedplaatjes. Om *in vitro*-activatie van bloedplaatjes en vorming van PMP te verminderen wordt daarom voor de studie van plasma MPs bloedafname in EDTA aanbevolen. Het merendeel van de submicrondeeltjes aangetroffen in plasma van gezonde vrijwilligers bestond uit bolvormige elektronen-dichte deeltjes, die op lipoproteïne deeltjes lijken. Lage aantallen van elektronen-arme deeltjes met een waarneembare lipide dubbellaag (lipide vesikels) werden ook gevonden. De laatste kunnen MPs zijn, exosomen of beide. Soortgelijke lipide vesikels werden gevonden in monsters van trombine-geactiveerde geïsoleerde bloedplaatjes en geïsoleerde MPs. Alle soorten deeltjes hebben ongeveer dezelfde grootteverdeling (mediaan: 30 nm, bereik: 25-260 nm). Omdat MPs slechts een minderheid vormen van alle submicrondeeltjes, die in vers plasma aanwezig zijn, moeten we de beperkingen overwegen van de technieken die gebruikt worden om MPs direct in plasma te meten. Het vinden van manieren om MPs en / of exosomen direct in plasma te kleuren met behulp van specifieke gelabelde antilichamen is van essentieel belang voor de verdere studies van deze deeltjes met technieken als NTA en cryo-EM.

Immuno-magnetische beads

Er is nog geen methode, die informatie geeft over de cellulaire oorsprong van de MPs met actief TF, die uit plasma geïsoleerd kunnen worden. In Hoofdstuk 7 hebben we gerapporteerd over de ontwikkeling van een methode die gebruik maakt van een specifiek gebiotinyleerd antilichaam en magnetische streptavidine beads om een bepaalde populatie van MPs uit het plasma te isoleren.

Deze methode werd geoptimaliseerd voor het isoleren van PMPs uit plasma van gezonde vrijwilligers. Plasma werd met gebiotinyleerd anti-humaan CD41 MoAb geïncubeerd voordat streptavidine magnetische beads werden toegevoegd. Na het aanbrengen van dit mengsel op een kolom van magnetische streptavidine beads, werden positieve (met daarin de geselecteerde subset van MPs) en negatieve (met daarin het gedepleteerde plasma) fracties verzameld en direct gebruikt voor de isolatie en analyse van MPs voor specifieke antigenen en TF activiteit.

Met behulp van flowcytometrie laten we zien dat gebiotinyleerd anti-humaan CD41 MoAb specifiek het antigeen CD41 van PMPs verzadigt. De magnetische streptavidine beads interfereren niet met de binding van anti-CD41 en anti-CD61 antilichamen aan PMPs. Na de scheiding waren er geen CD41-positieve MPs en slechts enkele CD61-positieve MPs in de negatieve fractie, waaruit blijkt dat bijna

alle PMPs (CD41-positieve MPs) werden gebonden door de beads. De binding was CD41-specifiek, want de meeste CD41/CD61-positieve MPs werden in de negatieve fractie gevonden, indien gebiotinyleerd IgG1 MoAb werd gebruikt in plaats van gebiotinyleerd anti-CD41 MoAb.

Met behulp van gebiotinyleerd anti-CD14 MoAb en magnetische streptavidine beads werden CD14-positieve MPs gevangen uit normaal plasma, dat verrijkt was met MPs geïsoleerd uit het supernatant van LPS-gestimuleerde geïsoleerde monocysten (MoMPs). TF-activiteit werd zowel in de positieve als negatieve fracties gevonden. Dit geeft aan dat zowel de CD14-positieve als negatieve MoMPs actief TF hebben. Dit lijkt in overeenstemming met onze bevinding dat niet alle MoMPs met actief TF, die geïsoleerd werden uit het supernatant van LPS gestimuleerde monocysten, CD14-positief waren.

In de toekomst zal de beads capture methode gebruikt kunnen worden om de oorsprong van MPs met actief TF in het plasma van patiënten met kanker te onderzoeken. Hierbij zal gebruik gemaakt moeten worden van celspecifieke of tumorspecifieke antilichamen, zoals anti-MUC1 (borst-en pancreaskanker cellen), anti-FasL (melanoom cellen), anti-EGFRVIII (glioblastoma cellen) en anti-CXCR-4 (leukemische cellen).

MP-geassocieerde TF activiteit in patiënten met multipel myeloom

Voor het meten van MP-geassocieerde tissue factor activiteit (MP-TF activiteit) werden vers geïsoleerde MPs geïncubeerd met een overmaat FVII(a) en FX in de aanwezigheid van calcium, waarna de vorming van FXa met een specifiek chromogeen substraat kon worden gemeten in een eenstaps of tweestaps bepaling. Deze bepalingen werden in detail in Hoofdstuk 2 van dit proefschrift besproken. Voor de meting van MP-TF activiteit in multipel myeloom (MM) patiënten hebben we de eenstaps bepaling gebruikt. (Hoofdstuk 8).

Chemotherapie in combinatie met anti-angiogene geneesmiddelen bij multipel myeloom is geassocieerd met een hoog risico op trombo-embolische complicaties. We hebben MP-TF activiteit gemeten in MPs geïsoleerd uit PFP van 122 patiënten met MM voor en na de chemotherapie en onderzochten of de MP-TF activiteit geassocieerd is met VTE. MP-TF activiteit van niet-behandelde patiënten was significant hoger dan die van gezonde vrijwilligers [17,6 fM FXa / min (IQR 8,6-33,2) versus 4,1 fM FXa / min (IQR 2,3 tot 6,6), $P < 0,001$]. Geen van de patiëntkenmerken (geslacht, leeftijd, ziekte stadium) of laboratoriummetingen (beta-2 microglobuline, albumine, calcium, hemoglobine, bloedplaatjes) bleek gecorreleerd met de MP-TF activiteit.

Voor de start van de behandeling was er geen verschil in MP-TF-activiteit tussen patiënten die tijdens de follow-up wel een VTE ontwikkelden (n = 15) en degenen die geen VTE ontwikkelden (n = 107). Bij 75 patiënten van wie plasma beschikbaar was van voor en na de chemotherapie, daalde de MP-TF-activiteit aanzienlijk na chemotherapie (van 17,4 [10,2-32,8] tot 12,0 [7,0-18,5] fM Xa / min, P = 0,006). Deze daling werd in alle ISS stadia van de ziekte waargenomen. Dit suggereert dat de tumormassa niet met MP-TF activiteit is geassocieerd. De MP-TF activiteit verminderde ook onafhankelijk van het therapeutische regime [vincristine, adriamycine en dexamethason (VAD); thalidomide, adriamycine en dexamethason (TAD); of bortezomib, adriamycine en dexamethason (PAD)]. MP-TF activiteit bleef echter na chemotherapie verhoogd bij patiënten die VTE hadden ontwikkeld (15,1 [10,3-25,2]), in tegenstelling tot patiënten die geen VTE hadden ontwikkeld (11,4 [7,0-25,2], p <0,001).

In toekomstige studies moet MP-TF activiteit vaker gemeten worden tijdens de inductietherapie van MM om te leren of MP-TF activiteit een pathogenetische rol speelt bij het ontstaan van VTE bij MM patiënten.

Discussie

Tot nu toe is er geen consensus over de grootte en het aantal MPs in plasma. Dit komt doordat de in de literatuur gerapporteerde resultaten van MP metingen sterk verschillen. Wij zijn ons ervan bewust dat deze verschillen niet alleen veroorzaakt worden door verschillen tussen de tot dusver gebruikte methoden om MPs te meten. Pre-analytische procedures zoals bloedafname, plasma/MP bereidingen en de opslag van plasma zijn ook belangrijke factoren, die het aantal, de morfologie en andere kenmerken van MPs, zouden kunnen beïnvloeden. Het gebruik van EDTA in plaats van citraat voor de bloedafname kan *in vitro*-activatie van bloedplaatjes en vorming van PMP verminderen (Hoofdstuk 6) en heeft daarom de voorkeur voor de studie van plasma MPs. We hebben ook een aanwijzing dat de hoge-snelheid centrifugatie die gebruikt wordt om de MPs te isoleren geen belangrijk effect heeft op de grootteverdeling van de MPs (Hoofdstuk 5). Uiteindelijk is het belangrijk richtlijnen voor de pre-analytische procedures op te stellen om de intra- en inter-laboratorium reproduceerbaarheid te verbeteren.

In het verleden werden MPs gevonden in het micrometergebied, terwijl we ze nu vinden in het nanometergebied (Hoofdstuk 3, 4, 5 en 6). Dit wordt verklaard door de technische beperkingen van de methoden, die eerder gebruikt werden om MPs te karakteriseren. Bijvoorbeeld, methoden zoals flowcytometrie met een detectiegrens van 0,5 micrometer en conventionele EM waarvoor uitdroging, chemische fixatie en kleuring van monsters nodig is, zijn minder geschikt voor de

detectie en karakterisering van MPs. Verder zijn er geen geschikte referentiematerialen (standaarden) om de instellingen van de verschillende methoden voor de analyse van MPs te kalibreren. Op dit moment maken nieuwe methoden, zoals AFM, NTA, en cryo-EM het mogelijk MPs in het nanometergebied in hun fysiologische toestand te detecteren en te karakteriseren. Maar deze methoden zijn nog niet geschikt voor gebruik in de kliniek omdat ze tijdrovend en arbeidsintensief zijn en nog moeten worden geoptimaliseerd en gevalideerd met betrekking tot hun nauwkeurigheid, specificiteit, detectielimiet en kwantificering, lineariteit en bereik, en robuustheid. Daarvoor zijn verbeteringen nodig zoals bijvoorbeeld geautomatiseerde monsterbehandelingsystemen, gestandaardiseerde reagentia, referentiematerialen voor de kalibratie van apparatuur instellingen en een externe standaard om absolute aantallen MPs te kunnen rapporteren. Uiteindelijk zou een klein MP meetapparaat wenselijk zijn dat slechts gebruik maakt van een speldenprik bloed en voor een routine test resultaten levert in minder dan 30 minuten (lab-on-a-chip).

Er is bewijs dat MP-TF-activiteit is verhoogd bij patiënten met kanker die VTE ontwikkelen (kanker-geassocieerde VTE). Verder onderzoek is nodig om te leren of een verhoogde MP-TF-activiteit bij patiënten met kanker daadwerkelijk de oorzaak is van trombose. Om het onderliggend mechanisme van het verband tussen kanker en trombose te begrijpen, is het bovendien belangrijk om vast te stellen of TF-dragende MPs afkomstig zijn uit de kankercel zelf of niet. In het laatste geval is het belangrijk om de cel van oorsprong (monocyten, endotheelcellen, bloedplaatjes) en het mechanisme waarmee de actieve TF wordt geproduceerd te onderzoeken.

Uiteindelijk is nader onderzoek nodig om te onderzoeken hoe MPs precies worden gevormd. Volgens een algemeen aanvaarde hypothese vormen cellen MPs ten gevolge van het verlies van membraanfosfolipiden-asymmetrie tijdens processen als activering en apoptose, waarbij PS beschikbaar komt op de buitenkant van het celoppervlak. Deze hypothese wordt ondersteund door de zeldzame bloedaandoening, Scott syndroom. Dit syndroom wordt gekenmerkt door een verminderde activiteit van het enzym scramblase hetgeen resulteert in een verminderde expressie van PS en verminderde vorming van MPs. Interessant is dat de aanwezigheid van MPs die geen PS-expressie hebben de hypothese van MP vorming lijkt tegen te spreken. De vraag blijft of het bestaan van PS-negatieve MPs het gevolg is van de beperkingen van de huidige meetmethoden. Annexine V wordt op grote schaal gebruikt voor de meting van PS-expressie in flowcytometrie en capture-gebaseerde testen. Echter, de binding van annexine V aan MPs is afhankelijk van de calciumconcentratie en de PS dichtheid op de membraan. Een andere mogelijke verklaring voor het vinden van PS-negatieve MPs zou kunnen zijn dat ze gevormd worden door fusies van plasmamembraancomponenten met

celresten of kleine uitgescheiden endosomale blaasjes (exosomen). Ook is het mogelijk, dat MPs worden afgestoten door de plasmamembraan ten gevolge van destabilisatie van het actine-cytoskelet via $\alpha\text{IIb}\beta_3$ signalering, waarvoor geen verlies van membraamfosfolipiden-assymetrie nodig is.

Tot slot, MPs worden niet langer beschouwd als cellulaire brokstukken of experimentele artefacten. In feite kunnen MPs deelnemen aan processen van stolling, ontstekingen en tumorvorming. Het is van belang om te onderzoeken uit welke cellen MPs worden gevormd, waarom ze worden gevormd en hoe ze met andere cellen in het lichaam communiceren. Standaardisering van pre-analytische en analytische procedures voor de meting van MPs is dringend nodig om hun aanwezigheid in bloed te begrijpen en om hun fysiologische functie en rol in ziektes toe te lichten. De toekomst zal leren of MP metingen gebruikt kunnen worden als diagnostische en misschien voorspellende (bio)marker in verschillende ziekten.