

Magdalena Krajewska-Włodarczyk<sup>1</sup>, Włodzimierz Samborski<sup>2</sup><sup>1</sup>Oddział Reumatologii, Miejski Szpital Zespolony w Olsztynie<sup>2</sup>Katedra Reumatologii i Rehabilitacji Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

# Rola mikrocząsteczek w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów

## The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

### STRESZCZENIE

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą układową chorobą zapalną, którą charakteryzuje zapalenie błony maziowej oraz destrukcja stawów. Patogeneza RZS nie jest znana, ale za podłoże choroby uważa się zaburzenia immunologiczne. Mikrocząsteczki (MPs) są grupą sferycznych struktur błonowych, wydzielanych z błon komórkowych większości komórek eukariotycznych, podczas aktywacji komórek lub apoptozy. Te bardzo małe struktury błonowe o rozmiarach 0,1–1,0  $\mu\text{m}$  posiadające antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek, z których powstały. Skład i komórkowe pochodzenie MPs, mechanizmy stymulujące ich uwalnianie oraz miejsce ich wytwarzania, określają ich biologiczne właściwości, które mogą ujawniać się w patogenezie chorób autoimmunologicznych. Pochodzenie komórkowe mikrocząsteczek można określić przy wykorzystaniu

metody cytometrii przepływowej z pomocą znaczników dla antygenów komórek macierzystych, prezentowanych na powierzchni błonowej MPs. W RZS MPs mogą stymulować zapalenie błony maziowej za pomocą cytokin, chemokin, dopełniacza i czynników pobudzających angiogenezę. Mimo że MPs posiadają cechy sugerujące ich kluczową rolę w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów, to dowody na takie właściwości pochodzą głównie z badań *in vitro*. Wiedza o złożoności biologii MPs pozostaje nadal niekompletna i wymaga dalszych pogłębionych badań w celu wyjaśnienia sposobu, w jaki prowadzą one do rozwoju przewlekłego zapalenia. Mikrocząsteczki mogą stanowić w przyszłości także nowoczesny wskaźnik, który może być używany do oceny aktywności choroby oraz odpowiedzi na leczenie.

Forum Reumatol. 2017, tom 3, nr 3: 131–140

**Słowa kluczowe:** aktywność choroby; mikrocząsteczki; reumatoidalne zapalenie stawów

### SKRÓTY

aCCP (*anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies*) — przeciwciała przeciw cyklicznie cytrulinowanemu peptydowi

BAFF (*B cell-activating factor*) — czynnik aktywujący limfocyty B

BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) — kinaza tyrozynowa Brutona

CRP (*C-reactive protein*) — białko C-reaktywne

DAS 28 (*disease activity score 28*) — wskaźnik aktywności choroby liczony z 28 stawów

FLS (*fibroblast-like synoviocytes*) — synowio-cyty podobne do fibroblastów

IC (*immune complexes*) — kompleksy immunologiczne

ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) — cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1

IFN- $\gamma$  — interferon  $\gamma$

MPC-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) — proteina 1 przyciągająca monocyty

mpIC — kompleksy immunologiczne z obecnością mikrocząsteczek

mRNA (*messenger RNA*) — matrycowy kwas rybonukleinowy

**Adres do korespondencji:**  
dr n. med.

Magdalena Krajewska-Włodarczyk  
Oddział Reumatologii  
Miejski Szpital Zespolony  
w Olsztynie  
Al. Wojska Polskiego 30  
10–226 Olsztyn  
tel.: 89 678 66 51, faks: 89 678 66 68  
e-mail: magdalenakw@op.pl

miRNA (micro-ribonucleic acid) — kwas mikro-rybonukleinowy  
 MMP (matrix metalloproteinases) — metaloproteinazy macierzy komórkowej  
 MPs (*microparticles*) — mikrocząsteczki błon komórkowych  
 PMPs (*platelet microparticles*) — mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego  
 RZS — reumatoidalne zapalenie stawów  
 SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) — antyleukoproteaza  
 SYK (*spleen tyrosine kinase*) — śledzionowa kinaza tyrozynowa  
 TF (*tissue factor*) — czynnik tkankowy  
 TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) — limfopoetyna zrębu grasicy  
 VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) — cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1  
 VEGF (*vascular endothelial growth factor*) — czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

## WSTĘP

Mikrocząsteczki błon komórkowych (MPs) lub inaczej mikropęcherzyki są fragmentami błon powierzchniowych aktywnych komórek eukariotycznych. Głównym kryterium definiującym mikrocząsteczki jest kryterium wielkości określającej ich średnicę w przedziale 0,1–1  $\mu\text{m}$ . Średnica MPs jest zatem większa niż egzosomów, a mniejsza niż ciałek apoptotycznych czy małych płytek. W warunkach fizjologicznych, w okresie dojrzewania, starzenia się i apoptozy komórek, mikrocząsteczki uwalniane są przez „złuszczenie” (*exfoliation*) lub „wypychanie” (*shedding, bubbling*) do płynów ustrojowych z błon komórkowych, wszystkich elementów morfotycznych krwi oraz komórek śródbłonna naczyniowego [1, 2]. Obecność MPs można stwierdzić w osoczu, krwi pełnej, krwi pępowinowej, płynie mózgowo-rdzeniowym, moczu, mleku i ślinie. Mikrocząsteczki nie posiadają jądra komórkowego, ale zawierają materiał cytoplazmatyczny macierzystych komórek, a ekspresja antygenów powierzchniowych na ich powierzchni, umożliwia określenie ich komórkowego pochodzenia [2–4] (tab. 1). Zwiększone wydzielanie MPs w warunkach fizjologicznych, występuje u kobiet w ciąży, po intensywnym wysiłku fizycznym oraz u osób otyłych i osób z nałogiem nikotynowym [5]. Do wzrostu uwalniania mikrocząsteczek z aktywowanych płytek krwi, leukocytów, erytrocytów, komórek mięśni gładkich i śródbłonna naczyniowego, dochodzić może również w przebiegu chorób o podłożu immuno-

**Tabela 1.** Pochodzenie mikrocząsteczek i antygeny różnicowania powierzchniowego

Komórka macierzysta	Markery powierzchniowe mikrocząsteczek
Płytki krwi	CD 41, CD41a, CD42a, CD42b, CD61, CD 62p, PS, TF
Komórki śródbłonna	CD31, CD51, CD62e, CD105, CD144, CD146, PS, TF
Erytrocyty	CD235a
Leukocyty	CD45
Monocyty	CD14, PS, TF
Neutrofile	CD66b
Limfocyty Th	CD4
Limfocyty Ts	CD8
Limfocyty B	CD20

CD (*cluster of differentiation*) — antygeny różnicowania komórkowego; PS (*phosphatidylserine*) — fosfatydyloseryna, TF (*tissue factor*) — czynnik tkankowy

logicznym. Zwiększoną liczbą mikrocząsteczek obserwowano w małopłytkowości immunologicznej [6], toczniu rumieniowatym układowym [7], reumatoidalnym zapaleniu stawów [8] oraz łuszczycy [9, 10]. Obecność w błonie MPs cząsteczek adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1) oraz cząsteczek adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1), umożliwia mikrocząsteczkom łączenie się z innymi komórkami i uczestniczenie w międzybłonowym transporcie białek enzymatycznych i receptorowych, cytokin, czynników wzrostu oraz kwasów: mikro RNA (miRNA), matrycowego RNA (mRNA) i deoksyrybonukleinowego (DNA) [11, 12].

Aż do 90% wszystkich mikrocząsteczek stanowią MPs pochodzące z płytek i megakariocytów (PMPs) [13]. Mikrocząsteczki pochodzenia płytkowego posiadają wiele receptorów na powierzchni błonowej w tym białka adhezyjne: glikoproteinę IIa/IIIa (CD41), Ib, IaIIb, selektynę P (CD62P) [14], zawierają również między innymi sfingolizynę (S1P), kwas arachidonowy (AA) i bioaktywne lipidy [15, 16]. W odpowiedzi na kontakt mikrocząsteczek z komórkami docelowymi może dochodzić do chemotaksji monocytów, stymulacji wydzielania cytokin, aktywacji komórek śródbłonna i nasilenia ekspresji czynnika tkankowego (TF) na powierzchni komórek śródbłonna [17]. Mikrocząsteczki płytkowe wpływając między innymi na zwiększenie ekspresji molekuly adhezyjnej CD11b na granulocytach, stymulują ich aktywność fagocytarną [18]. Obecność zwiększonej liczby mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego obserwowano w miażdżycy [19], chorobie wieńcowej, cukrzy-

cy [20], chorobie wieńcowej [21], zakrzepowej plamicy małopłytkowej [22], niedokrwistości aplastycznej i nocnej napadowej hemoglobi-nurii [23].

## **MECHANIZM POWSTAWANIA MIKROCZĄSTECZEK**

Wzrost wewnątrzkomórkowego stę-żenia jonów wapnia, wydzielanych przez retikulum cytoplazmatyczne, jest reakcją na wiele czynników, w tym: wzrost liczby wolnych rodników tlenowych, zwiększenie siły ścinającej, adenosynodifosforan (ADP, *adenosine diphosphate*) wydzielany przez aktywowane płytki krwi, ekspresję liganda CD40 (CD40 ligand, CD40L) na limfocytach T [24]. W tych warunkach dochodzi do aktywacji zależnych od stężenia wapnia enzymów (takich jak gelsoliny), specyficznej dla płytek krwi, ułatwiającej oddzielanie włókien akty-ny z cytoszkieletu płytek [25], translokazy aminofosfolipidów transportującej amino-fosfolipidy z zewnętrznej warstwy błony do wnętrza komórki [26], flopazy przenoszącej fosfolipidy z wewnętrznej strony dwuwar-stwy lipidowej na zewnątrz [27], kalpainy niszczącej włókna aktyny cytoszkieletu [28] oraz skramblazy wpływającej na przezbłono-ny transport fosfolipidów [29]. Aktywowane enzymy przyczyniają się do utraty asyme-trycznego rozkładu fosfolipidów w błonie komórkowej, charakteryzującego się wystę-powaniem fosfatydyloseryny (PS) i fosfa-tydyloetanalaminy (PE) przede wszystkim w wewnętrznej warstwie cytoplazmatycznej oraz fosfatydylocholiny (PC) i sfingomieliny (SM) w zewnętrznej warstwie dwuwarstwy lipidowej. Proces utraty asymetrii w wyniku przemieszczenia fosfatydyloseryny i fosfa-tydyloetanalaminy do zewnętrznej warstwy błony komórkowej i jednoczesna destabili-zacja cytoszkieletu umożliwiają formowanie i uwalnianie mikrocząsteczek [24, 30].

## **METODY WYKRYWANIA MIKROCZĄSTECZEK**

Identyfikacja mikrocząsteczek jest tech-nicznym wyzwaniem ze względu na bardzo małe rozmiary badanych struktur. Złotym standardem i najpowszechniej stosowaną me-todą wykrywania mikrocząsteczek jest badanie cytometryczne [31]. W badaniu cytometrycz-nym mikrocząsteczki oznaczane są przy użyciu aneksyny V znakowanej zwykle fikoerytryną i przeciwciał skierowanych przeciw specyficz-

nym antygenom komórkowym, znakowanych izotiocyjanianem fluoresceiny. Znakowa-na aneksyna V wiąże się przede wszystkim z charakterystyczną dla wszystkich typów mi-krocząsteczek fosfatydyloseryną, obecną na powierzchni błonowej MPs, a rzadziej przy za-burzeniach przepuszczalności błony, może też przyłączać się do fosfatydyloseryny zlokalizo-wanej wewnątrz mikrocząsteczek [32]. Anek-syna V często używana jest w celu identyfikacji mikrocząsteczek, lecz część MPs może nie wy-kazywać tendencji do wiązania tego białka [33]. Użycie przeciwciał przeciw różnym antygenom błonowym umożliwia typowanie pochodzenia komórkowego mikrocząsteczek.

Inny sposób oznaczania mikrocząsteczek, oparty jest na metodzie enzymatycznej ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wyko-rzystującej płytki testowe również opłaszczone aneksyną V lub specyficznymi przeciwciałami dla antygenów błon komórkowych [34]. W me-todzie ELISA przy oznaczeniu całkowitej ilości fosforu lub aktywności fosfolipidów aniono-nych, możliwa jest ocena liczebności mikro-cząsteczek [35].

## **ROLA MIKROCZĄSTECZEK W REUMATOIDALNYM ZAPALENIU STAWÓW**

Reumatoidalne zapalenie stawów jest przewlekłą, autoimmunologiczną chorobą, prowadzącą do przewlekłego zapalenia sta-wów i ich destrukcji oraz do wielu pozasta-wowych powikłań. Badania przeprowadzone wśród chorych na RZS i inne choroby o pod-łożu autoimmunologicznym, jak toczeń rumie-niowaty układowy, twardzinę układową, zespół antyfosfolipidowy, zapalenie skórno-mięśni-owe i wielomięśniowe oraz zapalenia naczyń, wykazują zwiększoną pulę mikrocząsteczek w porównaniu z populacją kontrolą. Wzrost liczby krążących mikrocząsteczek w choro-bach autoimmunologicznych jest szczególnie widoczny w przypadku towarzyszącego zajęcia naczyń i najczęściej dotyczy mikrocząsteczek po-chodzenia płytkowego, rzadziej śródbłonkowego [36–43]. Nieliczne dotychczas przeprowadzone badania sugerują lub wręcz potwierdzają patoge-netyczny związek mikrocząsteczek z RZS. Wpływ MPs na rozwój procesów zapalnych w RZS może odbywać się w różny sposób (tab. 2).

Zwiększenie wytwarzania MPs ściśle wią-że się ze wzrostem produkcji cytokin i wydaje się być istotnym czynnikiem, wpływającym na rozwój zapalenia w obrębie błony maziowej w przebiegu RZS [43]. W jednym z pierw-

**Tabela 2.** Rola mikrocząstek w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów

Aktywacja komórek immunokompetentnych
Działanie prozakrzepowe
Aktywacja komórek śródbłonki naczyniowego
Stymulacja produkcji metaloproteinaz
Stymulacja produkcji i uwalniania cytokin prozapalnych
Aktywacja dopełniacza
Udział w formowaniu kompleksów immunologicznych

szych przeprowadzonych badań oceniających związek MPs z RZS, obejmującym 19 chorych Knifj-Dutmer i wsp. obserwowali zwiększoną liczbę krążących PMPs w porównaniu z grupą osób zdrowych oraz istotną zależność między liczbą krążących mikrocząstek pochodzenia płytkowego a aktywnością choroby ocenioną wskaźnikiem aktywności liczonym z 28 stawów (DAS28). Dodatkowo badacze sugerowali możliwy wpływ PMPs na rozwój chorób sercowo-naczyniowych u chorych na RZS, prowadzących do związanej z powikłaniami naczyniowymi, zwiększonej śmiertelności w porównaniu z populacją ogólną [44]. W niedawno przeprowadzonym badaniu Viñuela-Berni i wsp. opisali zwiększoną liczbę MPs z obecnymi antygenami CD3, CD14, CD19, CD41 i CD63E w osoczu oraz CD3, CD14 i CD19 w moczu chorych na RZS z wysoką aktywnością choroby (DAS 28 > 5,1). Wyizolowane mikrocząsteczki w warunkach *in vitro* dodatkowo stymulowały uwalnianie przez monocyty IL-1, IL-17 oraz TNF- $\alpha$  [45]. Związek nasilenia stanu zapalnego w RZS z liczbą i aktywnością uwalnianych mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego ostatnio potwierdzili Barbati i wsp. Zwiększona początkowo w ich badaniu całkowita pula krążących MPs oraz MPs pochodzenia śródbłonkowego uległa zmniejszeniu po trzech miesiącach od włączenia terapii anty TNF- $\alpha$ . Wbrew oczekiwaniom badacze nie zaobserwowali u chorych na RZS zwiększonej liczby ani PMPs, ani MPs pochodzenia leukocytarnego [46].

Boilard i wsp. w analizowanych próbkach płynu stawowego chorych na RZS, stwierdzili obecność dużej liczby struktur z antygenem powierzchniowym CD41 pochodzenia płytkowego. Przy użyciu cytometrii przepływowej, badacze zaobserwowali, że oceniane struktury są znacznie mniejsze niż płytki krwi i mogą zatem odpowiadać mikrocząsteczkom. Obecna liczba PMPs w tym badaniu, w płynie stawowym chorych na RZS, wynosiła średnio  $2 \times 10^5$  CD41+

MPs/ $\mu$ l, podczas gdy w płynie stawowym 19 z 20 badanych osób z chorobą zwyrodnieniową, liczba PMPs była nieoznaczalna. Liczba oznaczanych mikrocząstek w reumatoidalnym płynie stawowym była znacznie wyższa niż w surowicy chorych na RZS, gdzie średnio wynosiła 600/ $\mu$ l. W płynie stawowym, w znacznie mniejszej liczbie niż PMPs, obecne były MPs z antygenami powierzchniowymi neutrofilów, monocytów i limfocytów T. Interesującym spostrzeżeniem było oznaczenie grupy leukocytów obojętnochłonnych obecnych w płynie stawowym, posiadających jednocześnie na powierzchni antygen leukocytarny CD45 i płytkowy CD41. Immunofluorescencyjny sygnał był tu wynikiem przyłączenia do neutrofilii ciałek odpowiadających MPs, a nie całych płytek krwi [8]. Nie do końca jest znany sposób w jaki płytki krwi mogą dostawać się do płynu stawowego, chociaż obecność w płynie stawowym nieuszkodzonych płytek, agregatów płytkowych i płytek przylegających do leukocytów, obserwowana była w badaniach prowadzonych wśród chorych na RZS od wielu lat [47–49]. Prawdopodobnym jest, że kolagen, fibrynogen, enzymy proteolityczne, cytokiny prozapalne oraz siły ścinające występujące w stawie, mogłyby stymulować produkcję płytkowych MPs. Możliwe jest również, że wymiary mikrocząstek ułatwiają im penetrację do płynu stawowego i błony maziowej, gdyż liczba mikrocząstek pochodzenia płytkowego w płynie stawowym w przebiegu RZS znacznie przekracza liczbę PMPs we krwi obwodowej, co może sugerować lokalnie zwiększone uwalnianie mikrocząstek z aktywowanych płytek w naczyniach w okolicy stawów. Możliwą drogą lokalnej aktywacji płytek jest stymulacja za pośrednictwem kolagenu, specyficznego receptora płytkowego zawierającego glikoproteiną VI (GPVI) [50]. Aktywacja płytek zachodząca przy udziale receptora GPVI w badaniu Boilarda i wsp., prowadzonym *in vivo* na zwierzęcym modelu wykorzystującym transgeniczne myszy K/BxN, indukowała uwalnianie mikrocząstek zawierających obie formy interleukiny 1 (IL-1): IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , stymulujących produkcję i uwalnianie IL-6 i IL-8 przez synowiocyty podobne do fibroblastów (FLS). Wyniki tej pracy wskazują na prozapalny potencjał PMPs oraz ich aktywny udział w patogenezie RZS [8]. Aktywacja płytkowego receptora GPVI prowadzi do pobudzenia śledzionowej kinazy tyrozynowej (SYK) w płytkach i limfocytach B, wpływając dalej na aktywację kinazy tyrozynowej Brutona (BTK), odgrywającej kluczową



rolę w aktywacji limfocytów B, niezbędnej do ich prawidłowego funkcjonowania i rozwoju. Zahamowanie kinazy Brutona selektywnym inhibitorem BTK, w badaniu Hsu i wsp. zmniejszało produkcję PMPs indukowaną kolagenem [51]. W innych badaniach, blokada BTK w hodowli aktywowanych płytek krwi, również wiązała się ze zmniejszeniem tworzenia mikrocząsteczek oraz z wyhamowaniem produkcji i uwalniania IL-6 i IL-8 [52, 53].

Obecność mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego nie jest charakterystyczną cechą RZS i obserwowana była także w płynie stawowym chorych na inne przewlekłe zapalenia stawów, w tym młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, łuszczycowe zapalenie stawów (ŁZS) oraz dnawe zapalenie stawów [8]. Poza mikrocząsteczkami pochodzenia płytkowego w płynie stawowym chorych na RZS stwierdzano również MPs pochodzące z monocytów, granulocytów, limfocytów T i B oraz erytrocytów [54–56]. Mikrocząsteczki błon komórkowych pochodzenia monocytarnego w pracy Headland i wsp. były obecne w znacznie większej liczbie w płynie stawowym niż w osoczu osób chorych na RZS. Ciekawe wyniki badacze uzyskali dodatkowo na modelu zwierzęcym, gdzie zaobserwowali ochronny wpływ monocytarnych mikrocząsteczek na chrząstkę stawową, wiążący się ze spadkiem uwalniania IL-8 i prostaglandyny E2 [57].

Mikrocząsteczki za pośrednictwem układu TF/czynnik VII wykazują dużą aktywność prokoagulacyjną, wpływając stymulująco między innymi na produkcję trombiny. Przyczyniać się również mogą do rozwoju proatrogennych zapaleń naczyń oraz do lokalnego tworzenia „ciałek ryżowych” w obrębie stawów, jako wyraz miejscowo przebiegających procesów krzepnięcia [58]. W ciekawym badaniu Berckmans i wsp. obejmującym chorych na RZS i niezróżnicowane zapalenie stawów, inkubacja MPs uzyskanych z płynu stawowego w obecności FLS pozyskanych za pomocą biopsji błony maziowej, skutkowała wzrostem produkcji i wydzielania przez synowocyty IL-6, IL-8, proteiny 1 przyciągającej monocytu (MPC-1), chemokiny RANTES (*regulation on activation normal T-cells expressed and secreted*) oraz czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) [59]. Lokalny wzrost wydzielania VEGF może znacząco wpływać na wzmoczoną angiogenezę w obrębie tkanek stawów w przebiegu RZS, szczególnie we wczesnym okresie choroby [55]. Stymulacja angiogenezы w zajętych stawach w RZS może odbywać się rów-

nież za pośrednictwem chemokin. Reich i wsp. stwierdzili stymulujący wpływ MPs pochodzenia leukocytnego na produkcję i uwalnianie przez reumatoidalne synowocyty proangiogenicznej chemokiny grupy CXC z występującym motywem ELR — sekwencją trzech następujących po sobie aminokwasów: kwasu glutaminowego–leucyny–argininy (Glu–Leu–Arg). Autorzy w badaniu zaobserwowali wzrost ekspresji mRNA dla ligandów chemokiny CXC ELR<sup>+</sup>: CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 oraz CXCL6 [60].

Metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMP) odpowiedzialne są za procesy przebudowy składników macierzy pozakomórkowej oraz ich degradację. Distler i wsp. wykazali, że MPs pochodzące z limfocytów T i monocytów mogą stymulować reumatoidalne FLS dodatkowo do syntezy metaloproteinaz 1, 3, 9 i 13, biorących udział w niszczeniu zewnątrzkomórkowej macierzy tkanki chrzęstnej i kostnej w przebiegu RZS. W pracy tej, badane mikrocząsteczki pobudzały również produkcję przez fibroblasty IL-6, IL-8, MCP-1 i MCP-2 [61].

Układ dopełniacza, złożony z około czterdziestu białek, pełni ważną funkcję w regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, poprzez wspomaganie procesów fagocytozy i nasilanie toczącej się reakcji zapalnej. Aktywacja układu odbywa się w sposób kaskadowy. Jedną z funkcji układu dopełniacza jest usuwanie komórek apoptotycznych i nekrotycznych [62]. Komórki te aktywują dopełniacz głównie za pośrednictwem klasycznej drogi, na skutek reakcji składnika C1q kompleksu z domeną CH2 fragmentu Fc przeciwciała [63–65]. Mikrocząsteczki, jako struktury pochodzące z określonych komórek posiadają powierzchnię o cechach charakterystycznych dla komórek apoptotycznych i nekrotycznych z eksponowanymi fosfatydyloseryną, fosfatydyloetanolaminą, oksydowanymi fosfolipidami, mogą zatem również brać udział w rozwoju zapalenia w przebiegu RZS przez aktywację kaskady dopełniacza. Udowodniono, że MPs powstałe z apoptotycznych białaczkowych komórek Jurkat [66] i pobudzonych granulocytów obojętnochłonnych [67, 68] przyłączając składową C1q potrafią aktywować dopełniacz *in vitro* za pośrednictwem klasycznej drogi aktywacji. Biro i wsp. stwierdzili obecność składowych C1q, C4 i/lub C3 na mikrocząsteczkach izolowanych z płynu stawowego i w mniejszym stopniu na mikrocząsteczkach pozyskanych z surowicy [69]. Wydaje się, że mikrocząstecz-

ki, zwłaszcza pochodzenia płytkowego, ekspozujące antygen CD41, mogą także brać udział w tworzeniu kompleksów immunologicznych (IC), zazwyczaj opisywanych jako struktury zawierające przeciwciała, antygeny oraz składowe dopełniacza. Cloutier i wsp. używając cytometrii przepływowej wysokiej rozdzielczości oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej, stwierdzili obecność MPs w kompleksach immunologicznych obecnych w płynie stawowym chorych na RZS, tworzących w ten sposób specyficzne mpIC [70]. Mikrocząsteczki w reumatoidalnym płynie stawowym mogą podlegać procesowi cytrulinacji białek — posttranslacyjnej deiminacji reszt argininy, katalizowanemu przez enzym deiminazę peptydyloargininową (PAD, *peptidylarginine deiminase*), skutkującemu produkcją przeciwciał przeciw cyklicznie cytrulinowanemu peptydom (aCCP). W przypadku opisanych w badaniu Cloutier i wsp. mikrocząsteczek pochodzenia płytkowego, które odznaczały się ekspresją receptora FcγRIIa, mpIC powstawały nie przez łączenie przeciwciał do tego receptora, lecz przez wiązanie z białkami cytrulinowanymi MPs, jak fibrynogen i wimentyna. Badacze stwierdzili, że płytkowe MPs mogą reagować z przeciwciałami aCCP, za pośrednictwem mechanizmu będącego następstwem cytrulinacji białek powierzchniowych PMPs oraz przez wiązanie mikrocząsteczek i białek cytrulinowanych. W pracy tej opisano także stymulujący wpływ płytkowych mpIC na produkcję leukotrienów przez neutrofile. Ciekawy wynik badacze uzyskali, porównując liczbę mpIC w płynie stawowym pobranym od chorych na RZS i łuszczykowe zapalenie stawów. Mimo obecności MPs i immunoglobulin również w płynie stawowym chorych na ŁZS, liczba oznaczonych mpIC była około 20-krotnie niższa niż u chorych na RZS ( $2000 \pm 900$  mpICs/ $\mu$ l vs.  $39400 \pm 9400$  mpICs/ $\mu$ l) [70]. W odróżnieniu od poprzedniego, dwa inne badania nie znalazły dowodów na istnienie związku między liczbą krążących we krwi mikrocząsteczek oraz kompleksów immunologicznych, zawierających MPs u chorych na RZS, a wskaźnikami używanymi tradycyjnie do oceny aktywności choroby [71, 72]. Stan taki może jednak wskazywać na wysoce skuteczny naczyniowy i siateczkowo-śródbłonkowy mechanizm eliminacji IC lub na lokalne tworzenie mpIC w stawach objętych procesem zapalnym.

W patogenezie RZS bardzo ważną rolę odgrywają aktywowane limfocyty B. Dane z badania Meeser i wsp. wskazują na rolę mi-

krocząsteczek obecnych w płynie stawowym w indukowaniu uwalniania czynnika aktywującego limfocyty B (BAFF), limfopoetyny zrębu grasicy (TSLP) oraz antyleukoproteazy (SLPI) przez synowioocyty podobne do fibroblastów. Obecne w płynie stawowym MPs w równym stopniu stymulowały wydzielanie BAFF, co użyty jako badanie kontrolne IFN- $\gamma$ . Efekt ten obserwowano zarówno wśród badanych chorych na RZS, jak i wśród osób z chorobą zwyrodnieniową stawów, co wskazywało na aktywność MPs w stymulowaniu limfocytów B, niezależnie od rodzaju choroby. Główna różnica w tym badaniu miała charakter ilościowy. W płynie stawowym chorych na RZS liczba MPs znacząco była wyższa niż u osób bez zapalenia stawów. W badaniu poddawano ocenie zdolność MPs pochodzących z linii komórek monocytarno-makrofagowych THP-1 oraz z linii limfocytów CEM, do syntezy i uwalniania BAFF, TLSP i SLPI przez aktywowane FLS. Mikrocząsteczki pochodzenia monocytarno-makrofagowego charakteryzowały się wysoką aktywnością prozapalną, wskazując na ważny udział monocytów w inicjacji odpowiedzi zapalnej. Mikrocząsteczki błon komórkowych pochodzące z pobudzonych limfocytów T, będących stymulatorami wydzielania IL-6 i IL-8, nie stymulowały uwalniania BAFF, lecz TLSP i SLPI przez synowioocyty. Takie same MPs, po poddaniu działaniu aktynomycyny D, nie wpływały na uwalnianie BAFF, TLSP i SLPI, sugerując brak wpływu MPs pochodzących z apoptotycznych limfocytów T na aktywację limfocytów B [73].

### **MIKROCZĄSTECZKI JAKO WSKAŹNIK OCENY AKTYWNOŚCI CHOROBY W RZS**

Mikrocząsteczki przyciągają uwagę badaczy jako potencjalny wskaźnik aktywacji komórek eukariotycznych. Mikrocząsteczki błon komórkowych wyposażone są w antygeny powierzchniowe komórek swojego pochodzenia, co umożliwia identyfikację ich subpopulacji. Mikrocząsteczki błon komórkowych mogłyby zatem dostarczać cennych informacji na temat toczących się procesów zapalnych, aktywności choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie oraz rokowania, służąc jako jeden ze wskaźników oceny choroby.

Hsu i wsp. zademonstrowali, że po zahamowaniu aktywności kinazy BTK, uwalnianie MPs z aktywowanych kolagenem płytek uległo znacznemu zmniejszeniu [51]. Obniżenie liczby PMPs w innych badaniach z inhibitorem ki-

nazy BTK w hodowlach płytkowych, związane były ze spadkiem produkcji i wydzielania cytokin prozapalnych IL-6 i IL-8 [52, 53].

Rodriguez-Cario i wsp. przeprowadzili badania liczby krążących we krwi mikrocząstek i ich pochodzenia wśród 114 chorych na RZS. Całkowita liczba MPs oceniona w osoczu ubogopłytkowym była znacznie wyższa wśród osób z zapaleniem stawów w porównaniu z grupą kontrolą zdrowych osób. Występowanie różnych podtypów MPs w tym badaniu różniło się znacznie w grupie z RZS i związane było z przebiegiem klinicznym zapalenia stawów: liczba MPs pochodzenia śródbłonkowego wiązała się z długością trwania choroby, pochodzenia granulocytowego z aktywnością choroby ocenianej wskaźnikiem DAS28 natomiast pochodzenia monocytarnego z obecnością czynnika reumatoidalnego. Liczba MPs związana była również z występowaniem tradycyjnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego [73]. Wyniki pracy Cloutier i wsp. mogłyby wskazywać na potencjalne możliwości wykorzystania badań krążących mpICs przy ocenie aktywności RZS [69]. Odmiennie wnioski jednak przedstawili van Eijk i wsp. na podstawie badania, do którego włączono 24 chorych na wczesną postać RZS. Aktywność choroby oceniono tu na podstawie szybkości odczynu Biernackiego (OB), stężenie białka C reaktywnego (CRP), wysokości wskaźnika DAS28. U chorych określono dodatkowo stężenie osoczowego amyloidu P (SAP, *serum amyloid-P*) oraz liczby krążących MPs i MPs eksponujących składową

C1q dopełniacza. Dziewięciu chorych poddano ponownej ocenie po 8-tygodniowym, intensywnym leczeniu według schematu COBRA (*COmBination therapy in Rheumatoid Arthritis*), obejmującym skojarzoną terapię metotrexatem, sulfasalazyną i prednizolonem. Zgodnie z oczekiwaniami OB, CRP oraz DAS28 w wyniku leczenia uległy znacznej poprawie, lecz nieco niespodziewanie ani liczba krążących MPs, ani MPs z przyłączoną składową C1q nie uległy zmniejszeniu, sugerując brak związku aktywności stanu zapalnego z wydzielaniem MPs i tworzeniem mpIC [71].

## PODSUMOWANIE

Mikrocząsteczki charakteryzują się szczególnymi właściwościami biologicznymi, dzięki którym mogą uczestniczyć w patogenezie przewlekłego zapalenia. Mogą również stanowić czuły wskaźnik toczącego się procesu zapalnego. Większość opublikowanych badań przeprowadzonych wśród chorych na RZS opisuje wzrost liczby krążących MPs oraz MPs obecnych w płynie stawowym w stawach objętych zapaleniem. Mikrocząsteczki w RZS potrafią stymulować produkcję i wydzielanie czynników prozapalnych, brać udział w ich transporcie, uczestniczyć w formowaniu kompleksów immunologicznych i prowokować wytwarzanie autoprzeciwciał. W przyszłości MPs mogą posłużyć jako jeden z elementów oceny aktywności choroby i monitorowania odpowiedzi na leczenie RZS.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease characterised by synovitis and joint destruction. The pathogenesis of RA is not clear, but is considered to be an immune-mediated inflammatory disorder. Microparticles (MPs) are heterogeneous group of spherical membrane structures secreted from the cell membranes of most eucariotic cells during cell activation or apoptosis. These very small membrane structures are 0.1–1.0  $\mu\text{m}$  in size and express cell surface antigens characteristic for cells of their origin. MPs and their composition and cellular origin, mechanisms of stimuli leading to their formation and sites of formation determine their biological functions that can mediate autoimmune diseases pathogenesis. The origin of microparticles can

be traced using flow cytometry with the help of antigenic markers of their parental cell that they present on their surface. In a course of rheumatoid arthritis they can stimulate synovitis via cytokines, chemokines, complement and angiogenesis factors. Although MPs have properties suggesting a key role in the pathogenesis of rheumatic disease, evidence for this possibility comes primarily from *in vitro* studies. The understanding of the complexity of MPs biology remains incomplete and requires further in depth research to define the pathways by which they promote chronic inflammation. In the future microparticles may also represent novel biomarkers that may be used to assess disease activity and response to therapy.

**Forum Reumatol. 2017, tom 3, nr 3: 131–140**

**Key words: disease activity; microparticles; rheumatoid arthritis**

1. Gelderman MP, Simak J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol.* 2008; 484: 79–93, doi: [10.1007/978-1-59745-398-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-398-1_6), indexed in Pubmed: [18592174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18592174/).
2. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007; 21(3): 157–171, doi: [10.1016/j.bre.2006.09.001](https://doi.org/10.1016/j.bre.2006.09.001), indexed in Pubmed: [17118501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17118501/).
3. Maślanka K, Smoleńska-Sym G. Mikrocząstki błon komórkowych. *Acta Haemat Pol.* 2009; 40: 481–491.
4. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev.* 2006; 20(1): 1–26, doi: [10.1016/j.tmr.2005.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tmr.2005.08.001), indexed in Pubmed: [16373184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16373184/).
5. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, et al. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2118–2127, doi: [10.1172/JCI119385](https://doi.org/10.1172/JCI119385), indexed in Pubmed: [9151784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9151784/).
6. Semple JW, Provan D, Garvey MB, et al. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17(6): 590–595, doi: [10.1097/MOH.0b013e32833eaeef3](https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833eaeef3), indexed in Pubmed: [20739879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20739879/).
7. Dieker J, Tel J, Pieterse E, et al. Circulating Apoptotic Microparticles in Systemic Lupus Erythematosus Patients Drive the Activation of Dendritic Cell Subsets and Prime Neutrophils for NETosis. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68(2): 462–472, doi: [10.1002/art.39417](https://doi.org/10.1002/art.39417), indexed in Pubmed: [26360137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26360137/).
8. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science.* 2010; 327(5965): 580–583, doi: [10.1126/science.1181928](https://doi.org/10.1126/science.1181928), indexed in Pubmed: [20110505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20110505/).
9. Takeshita J, Mohler ER, Krishnamoorthy P, et al. Endothelial cell-, platelet-, and monocyte/macrophage-derived microparticles are elevated in psoriasis beyond cardiometabolic risk factors. *J Am Heart Assoc.* 2014; 3(1): e000507, doi: [10.1161/JAHA.113.000507](https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000507), indexed in Pubmed: [24584739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24584739/).
10. Martínez-Sales V, Vila V, Ricart JM, et al. Increased circulating endothelial cells and microparticles in patients with psoriasis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2015; 60(3): 283–290, doi: [10.3233/CH-131766](https://doi.org/10.3233/CH-131766), indexed in Pubmed: [24002122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24002122/).
11. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008; 3(11): e3694, doi: [10.1371/journal.pone.0003694](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694), indexed in Pubmed: [19002258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19002258/).
12. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, et al. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood.* 2012; 119(26): 6288–6295, doi: [10.1182/blood-2011-12-396440](https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-396440), indexed in Pubmed: [22596260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22596260/).
13. Siljander PRM. Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res.* 2011; 127 Suppl 2: S30–S33, doi: [10.1016/S0049-3848\(10\)70152-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(10)70152-3), indexed in Pubmed: [21193112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21193112/).
14. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2002; 30(5): 450–459, indexed in Pubmed: [12031651](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12031651/).
15. Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, et al. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1999; 274(11): 7545–7556, indexed in Pubmed: [10066822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10066822/).
16. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, et al. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2118–2127, doi: [10.1172/JCI119385](https://doi.org/10.1172/JCI119385), indexed in Pubmed: [9151784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9151784/).
17. Barry OP, Praticò D, Savani RC, et al. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998; 102(1): 136–144, doi: [10.1172/JCI2592](https://doi.org/10.1172/JCI2592), indexed in Pubmed: [9649567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9649567/).
18. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, et al. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation.* 1999; 99(19): 2577–2582, indexed in Pubmed: [10330391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10330391/).
19. Tan KT, Lip GYH. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2005; 94(3): 488–492, doi: [10.1160/TH05-03-0201](https://doi.org/10.1160/TH05-03-0201), indexed in Pubmed: [16268460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16268460/).
20. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45(10): 1622–1630, doi: [10.1016/j.jacc.2005.02.047](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.047), indexed in Pubmed: [15893178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15893178/).
21. Vidal C, Spaulding C, Picard F, et al. Flow cytometry detection of platelet procoagulation activity and microparticles in patients with unstable angina treated by percutaneous coronary angioplasty and stent implantation. *Thromb Haemost.* 2001; 86(3): 784–790, indexed in Pubmed: [11583308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11583308/).
22. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, et al. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol.* 2001; 115(2): 451–459, indexed in Pubmed: [11703349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11703349/).
23. Hugel B, Socié G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood.* 1999; 93(10): 3451–3456, indexed in Pubmed: [10233897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10233897/).
24. Morel O, Morel N, Freyssinet JM, et al. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets.* 2008; 19(1): 9–23, doi: [10.1080/09537100701817232](https://doi.org/10.1080/09537100701817232), indexed in Pubmed: [18231934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18231934/).
25. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, et al. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature.* 1993; 364(6439): 685–692, doi: [10.1038/364685a0](https://doi.org/10.1038/364685a0), indexed in Pubmed: [8395021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395021/).
26. Belezny Z, Zachowski A, Devaux PF, et al. ATP-dependent aminophospholipid translocation in erythrocyte vesicles: stoichiometry of transport. *Biochemistry.* 1993; 32(12): 3146–3152, indexed in Pubmed: [8457575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8457575/).
27. Connor J, Pak CH, Zwaal RF, et al. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Bio Chem.* 1992; 267: 19412–19417.
28. Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CP, et al. Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood.* 1992; 80(9): 2246–2251, indexed in Pubmed: [1421394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1421394/).



29. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochem Soc Trans.* 1993; 21(2): 248–253, indexed in Pubmed: [8359475](#).
30. Schroit AJ, Tanaka Y, Madsen J, et al. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidyl-serine and possible implication of membrane phospholipid asymmetry. *Biol Cell.* 1984; 51(2): 227–239.
31. Thiagarajan P, Tait JF. Collagen-induced exposure of anionic phospholipid in platelets and platelet-derived microparticles. *J Biol Chem.* 1991; 266(36): 24302–24307, indexed in Pubmed: [1662206](#).
32. Dachary-Prigent J, Freyssinet JM, Pasquet JM, et al. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. *Blood.* 1993; 81(10): 2554–2565, indexed in Pubmed: [8490169](#).
33. Connor DE, Exner T, Ma DD, et al. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010; 103(5): 1044–1052, doi: [10.1160/TH09-09-0644](#), indexed in Pubmed: [20390225](#).
34. Miyamoto S, Marcinkiewicz C, Edmunds LH, et al. Measurement of platelet microparticles during cardiopulmonary bypass by means of captured ELISA for GPIIb/IIIa. *Thromb Haemost.* 1998; 80(2): 225–230, indexed in Pubmed: [9716142](#).
35. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(10): 1842–1851, doi: [10.1111/j.1538-7836.2004.00936.x](#), indexed in Pubmed: [15456497](#).
36. Baka Z, Senolt L, Vencovsky J, et al. Increased serum concentration of immune cell derived microparticles in polymyositis/dermatomyositis. *Immunol Lett.* 2010; 128(2): 124–130, doi: [10.1016/j.imlet.2009.12.018](#), indexed in Pubmed: [20043950](#).
37. Brogan PA, Shah V, Brachet C, et al. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(3): 927–936, doi: [10.1002/art.20199](#), indexed in Pubmed: [15022336](#).
38. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2004; 91(4): 667–673, doi: [10.1160/TH03-07-0487](#), indexed in Pubmed: [15045126](#).
39. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2008; 47(12): 1820–1825, doi: [10.1093/rheumatology/ken373](#), indexed in Pubmed: [18927191](#).
40. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, et al. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation.* 1999; 99(19): 2577–2582, indexed in Pubmed: [10330391](#).
41. Nagahama M, Nomura S, Ozaki Y, et al. Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2001; 33(2): 85–94, indexed in Pubmed: [11264787](#).
42. Oyabu C, Morinobu A, Sugiyama D, et al. Plasma platelet-derived microparticles in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol.* 2011; 38(4): 680–684, doi: [10.3899/jrheum.100780](#), indexed in Pubmed: [21239749](#).
43. Sellam J, Proulle V, Jünger A, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(5): R156, doi: [10.1186/ar2833](#), indexed in Pubmed: [19832990](#).
44. Knijff-Dutmer EAJ, Koerts J, Nieuwland R, et al. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(6): 1498–1503, doi: [10.1002/art.10312](#), indexed in Pubmed: [12115179](#).
45. Viñuela-Berni V, Doniz-Padilla L, Figueroa-Vega N, et al. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Immunol.* 2015; 180(3): 442–451, doi: [10.1111/cei.12598](#), indexed in Pubmed: [25639560](#).
46. Barbati C, Alessandri C, Colasanti T, et al. FRI0054 Microparticles from Rheumatoid Arthritis Patients Induce Apoptosis and Autophagy in Cultured Endothelial Cells. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 2016; 75(Suppl 2): 445.2–445, doi: [10.1136/annrheumdis-2016-eular.3641](#).
47. Endresen GK. Investigation of blood platelets in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 1981; 10(3): 204–208, indexed in Pubmed: [7027433](#).
48. Endresen GK, Førre O. Human platelets in synovial fluid. A focus on the effects of growth factors on the inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1992; 10(2): 181–187, indexed in Pubmed: [1505113](#).
49. Farr M, Wainwright A, Salmon M, et al. Platelets in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 1984; 4(1): 13–17, indexed in Pubmed: [6718950](#).
50. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 2004; 114(4): 221–233, doi: [10.1016/j.thromres.2004.06.046](#), indexed in Pubmed: [15381385](#).
51. Hsu J, Gu Y, Tan SL, et al. Bruton's Tyrosine Kinase mediates platelet receptor-induced generation of microparticles: a potential mechanism for amplification of inflammatory responses in rheumatoid arthritis synovial joints. *Immunol Lett.* 2013; 150(1-2): 97–104, doi: [10.1016/j.imlet.2012.12.007](#), indexed in Pubmed: [23266841](#).
52. Tan SL, Liao C, Lucas MC, et al. Targeting the SYK-BTK axis for the treatment of immunological and hematological disorders: recent progress and therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(2): 294–309, doi: [10.1016/j.pharmthera.2013.02.001](#), indexed in Pubmed: [23396081](#).
53. Uckun FM, Qazi S. Bruton's tyrosine kinase as a molecular target in treatment of leukemias and lymphomas as well as inflammatory disorders and autoimmunity. *Expert Opin Ther Pat.* 2010; 20(11): 1457–1470, doi: [10.1517/13543776.2010.517750](#), indexed in Pubmed: [20831363](#).
54. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scand J Immunol.* 2007; 66(2-3): 159–165, doi: [10.1111/j.1365-3083.2007.01984.x](#), indexed in Pubmed: [17635793](#).
55. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6(1): 21–29, doi: [10.1038/nrrheum.2009.229](#), indexed in Pubmed: [19949432](#).
56. Distler JHW, Distler O. Inflammation: Microparticles and their roles in inflammatory arthritides. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6(7): 385–386, doi: [10.1038/nrrheum.2010.87](#), indexed in Pubmed: [20596049](#).

57. Headland SE, Jones HR, Norling LV, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*. 2015; 7(315): 315ra190, doi: [10.1126/scitranslmed.aac5608](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5608), indexed in Pubmed: 26606969.
58. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*. 2002; 46(11): 2857–2866, doi: [10.1002/art.10587](https://doi.org/10.1002/art.10587), indexed in Pubmed: 12428225.
59. Berckmans RJ, Nieuwland R, Kraan MC, et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7(3): R536–R544, doi: [10.1186/ar1706](https://doi.org/10.1186/ar1706), indexed in Pubmed: 15899040.
60. Reich N, Beyer C, Gelse K, et al. Microparticles stimulate angiogenesis by inducing ELR(+) CXC-chemokines in synovial fibroblasts. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(4): 756–762, doi: [10.1111/j.1582-4934.2010.01051.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01051.x), indexed in Pubmed: 20219013.
61. Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(8): 2892–2897, doi: [10.1073/pnas.0409781102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409781102), indexed in Pubmed: 15701693.
62. Gaipf US, Kuenkele S, Voll RE, et al. Complement binding is an early feature of necrotic and a rather late event during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 2001; 8(4): 327–334, doi: [10.1038/sj.cdd.4400826](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400826), indexed in Pubmed: 11550084.
63. Ciurana CLF, Zwart B, van Mierlo G, et al. Complement activation by necrotic cells in normal plasma environment compares to that by late apoptotic cells and involves predominantly IgM. *Eur J Immunol*. 2004; 34(9): 2609–2619, doi: [10.1002/eji.200425045](https://doi.org/10.1002/eji.200425045), indexed in Pubmed: 15307193.
64. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, et al. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000; 192(3): 359–366, indexed in Pubmed: 10934224.
65. Zwart B, Ciurana C, Rensink I, et al. Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells. *Autoimmunity*. 2004; 37(2): 95–102, indexed in Pubmed: 15293879.
66. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 2002; 32(6): 1726–1736, doi: [10.1002/1521-4141\(200206\)32:6<1726::AID-IMMU1726>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200206)32:6<1726::AID-IMMU1726>3.0.CO;2-R), indexed in Pubmed: 12115656.
67. Gasser O, Hess C, Miot S, et al. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*. 2003; 285(2): 243–257, indexed in Pubmed: 12706119.
68. Gasser O, Schifferli JA. Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. *Exp Cell Res*. 2005; 307(2): 381–387, doi: [10.1016/j.yexcr.2005.03.011](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.011), indexed in Pubmed: 15950620.
69. Biró E, Nieuwland R, Tak PP, et al. Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66(8): 1085–1092, doi: [10.1136/ard.2006.061309](https://doi.org/10.1136/ard.2006.061309), indexed in Pubmed: 17261534.
70. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med*. 2013; 5(2): 235–249, doi: [10.1002/emmm.201201846](https://doi.org/10.1002/emmm.201201846), indexed in Pubmed: 23165896.
71. Nielsen CT, Østergaard O, Stener L, et al. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(4): 1227–1236, doi: [10.1002/art.34381](https://doi.org/10.1002/art.34381), indexed in Pubmed: 22238051.
72. van Eijk IC, Tushuizen ME, Sturk A, et al. Circulating microparticles remain associated with complement activation despite intensive anti-inflammatory therapy in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(7): 1378–1382, doi: [10.1136/ard.2009.118372](https://doi.org/10.1136/ard.2009.118372), indexed in Pubmed: 19919943.
73. Messer L, Alsaleh G, Freyssonet JM, et al. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2009; 11(2): R40, doi: [10.1186/ar2648](https://doi.org/10.1186/ar2648), indexed in Pubmed: 19291304.
74. Rodríguez-Carrió J, Alperí-López M, López P, et al. Altered profile of circulating microparticles in rheumatoid arthritis patients. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 128(7): 437–448, doi: [10.1042/CS20140675](https://doi.org/10.1042/CS20140675), indexed in Pubmed: 25369551.