

Jana Ferdin¹, Metka Lenassi²

Zunajcelični vezikli in njihov klinični potencial

Extracellular Vesicles and their Clinical Potential

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: zunajcelični vezikli, eksosomi, mikrovezikli, biooznačevalci, izolacija, analiza, diagnostika

Zunajcelični vezikli so heterogena populacija membranskih veziklov s pomembno vlogo v medcelični komunikaciji, ki so iz celic v zunajcelični prostor sproščeni tako *in vivo* kot tudi *in vitro*. Izolirali so jih iz raznolikih bioloških vzorcev, kot so kri, bronhoalveolarni izpirek, sinovialna tekočina, urin, plodovnica, sperma, mleko, slina; ter iz kultur večine tipov sesalčjih celic. Glede na velikost in mesto nastanka v celici, zunajcelične vezikle ločimo na eksosome (30–100 nm), mikrovezikle (100–1.000 nm) in apoptotska telesca (1.000–5.000 nm). Njihova proteinska, nukleinska (miRNA) in lipidna sestava odseva sestavo celice izvora in je odvisna od trenutnega stanja celice. Posledično so zunajcelični vezikli postali pomemben vir novih biooznačevalcev za raznolika telesna stanja s pomembno diagnostično in prognostično vrednostjo, še posebno za bolezni osrednjega živčevja. Razi-skave potekajo tudi v smeri ciljanja zunajceličnih veziklov v diagnostične in terapevtske namene, pri čemer pa se znanstveniki srečujejo s številnimi preprekami. Ravno zaradi velikega kliničnega potenciala se je zanimanje za karakterizacijo, nastanek in vlogo zunajceličnih veziklov v zadnjih letih močno povečalo, pri čemer je prišlo tudi do pomembnega napredka pri razvoju metod za njihovo izolacijo in analizo. V tem preglednem članku bomo opisali vrste zunajceličnih veziklov, metode za njihovo izolacijo in analizo ter njihovo biološko vlogo in klinični potencial.

ABSTRACT

KEY WORDS: extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, biomarkers, isolation, characterization, diagnostics

Extracellular vesicles are a heterogeneous population of membrane vesicles, released from cells both *in vivo* and *in vitro*, with an important role in intercellular communication. They have been isolated from a variety of biological samples such as blood, bronchoalveolar lavage, synovial fluid, urine, amniotic fluid, semen, milk, saliva; and from cell cultures of most mammalian cells. Based on their size and the site of formation in the cell, they are classified as exosomes (30–100 nm), microvesicles (100–1,000 nm) and apoptotic bodies (1,000–5,000 nm). Their protein, nucleic acid (miRNA) and lipid composition reflects the composition of the parental cell and depends on the current state of the cell. Consequently, the extracellular vesicles are an important source of novel biomarkers for diverse physiological

¹ Asist. dr. Jana Ferdin, univ. dipl. mikr., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Doc. dr. Metka Lenassi, univ. dipl. mikr., Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; metka.lenassi@mf.uni-lj.si

conditions with important diagnostic and prognostic values, especially for disorders of the central nervous system. Researchers also investigate the potential use of extracellular vesicles as targets for diagnostic and therapeutic purposes, but many obstacles still have to be overcome. Due to their great clinical potential, the interest in extracellular vesicle characterization, formation and role increased importantly in recent years, fueling also development of new methods for their isolation and analysis. In the present review, we will describe the types of extracellular vesicles, methods for their isolation and analysis, their biological role and clinical potential.

UVOD

Medcelično sporazumevanje pri večceličnih organizmih poteka bodisi z izmenjavo informacij z izločanjem topnih molekul, z neposredno interakcijo s celičnimi receptorji ali z neposrednim medceličnim stikom. Pred približno 30 leti je bila pri evkariontih prvič predlagana nova oblika medcelične komunikacije, ki vključuje vezikle, sproščene iz celic preko zlitja multivezikularnih teles s plazemsko membrano (1–7). Do nedavnega so sproščanje zunajceličnih veziklov obravnavali kot ostanke membran, ki nimajo posebne biološke vrednosti. Danes pa je jasno, da vse preučevane celice v svoj zunajcelični prostor regulirano sproščajo membranske vezikle. Njihova proteinska, nukleinska in lipidna sestava odseva sestavo celice izvora in je odvisna od trenutnega stanja celice (npr. ali je transformirana, diferencirana, stimulirana ali pod stresom), zato se je zanimanje za karakterizacijo, nastanek in vlogo zunajceličnih veziklov v zadnjih letih močno povečalo.

Vloge zunajceličnih veziklov v medcelični komunikaciji so zelo raznolike, saj vezikli prenašajo raznovrstne signalne molekule, kot so lipidi, proteini ter številne nekodirajoče (miRNA) in kodirajoče RNA (mRNA) (6, 8, 9). Vezikli lahko vplivajo na delovanje tarčnih celic v neposredni bližini ali na bolj oddaljenih mestih. Njihovo vlogo so že preučevali v raznovrstnih bioloških procesih pri človeku, kot so npr. vzdrževanje homeostaze, delovanje imunskega odziva ter razvoj in napredovanje

patoloških stanj (npr. rak, mikrobne okužbe in nevrodegenerativne bolezni) (10–17). Njihovo vpletenost v biološke procese podpira tudi dejstvo, da so zunajcelične vezikle izolirali iz raznolikih bioloških vzorcev, kot so kri, bronhoalveolarni izpirek, sinovialna tekočina, urin, plodovnica, sperma, mleko, slina itd.; ter iz kultur večine tipov sesalčnih celic, vključno iz izvornih celic, primarnih celic imunskega in živčnega sistema ter številnih celičnih linij raka (18–25).

Kri je izredno bogata z zunajceličnimi vezikli, ki predstavljajo lahko dostopen vir novih bioznačevalcev za raznolika telesna stanja s pomembno diagnostično in prognostično vrednostjo. Zunajcelični vezikli v krvi so še posebno koristni kot potencialni bioznačevalci trenutnega stanja osrednjega živčevja, saj je njihova analiza v krvi manj invaziven pristop v primerjavi s tradicionalnimi diagnostičnimi metodami. Kot možne bioznačevalce se najpogosteje analizira proteine ali miRNA, ki se z vezikli izločijo glede na specifično stanje celice izvora, lahko pa se specifično stanje celice odraža tudi v količini izločenih veziklov. Raziskave potekajo tudi v smeri koriščenja zunajceličnih veziklov za diagnostične in terapevtske namene, pri čemer se znanstveniki srečujejo s številnimi preprekami (24). Tudi naš laboratorij na Inštitutu za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani preučuje vlogo zunajceličnih veziklov, sproščenih ob infekciji z virusom HIV-1, pri razvoju nevrodegenerativnih boleznih zdravljenih oseb in njihovo potencialno vlogo bioznačevalcev.

V tem preglednem članku bomo opisali vrste zunajceličnih veziklov, njihovo vlogo v bioloških procesih in njihovo potencialno uporabo v diagnostiki, prognostiki in terapiji.

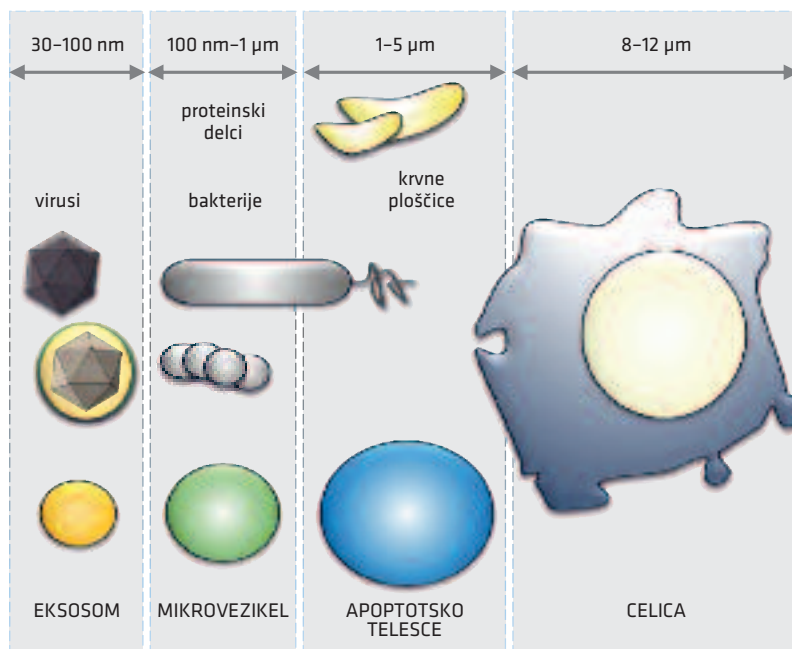
VRSTE ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV

Zunajcelični vezikli so heterogena populacija membranskih veziklov, ki so iz celic v zunajcelični prostor sproščeni tako *in vivo* kot tudi *in vitro*. So sferični delci različnih velikosti, obkroženi z membrano iz fosfolipidnega dvosloja. Sestava zunajceličnih veziklov odseva lastnosti celice izvora, zato nam karakterizacija veziklov lahko poda informacije o spremembah procesov v celici oz. v telesu. Zunajcelične vezikle razdelimo v več podskupin, ki se med seboj razlikujejo po nastanku, velikosti, celičnem izvoru, proteinski sestavi, vsebnosti RNA (mRNA, miRNA) in biološki vlogi. Njihovo poimenovanje je nekoč temeljilo na podla-

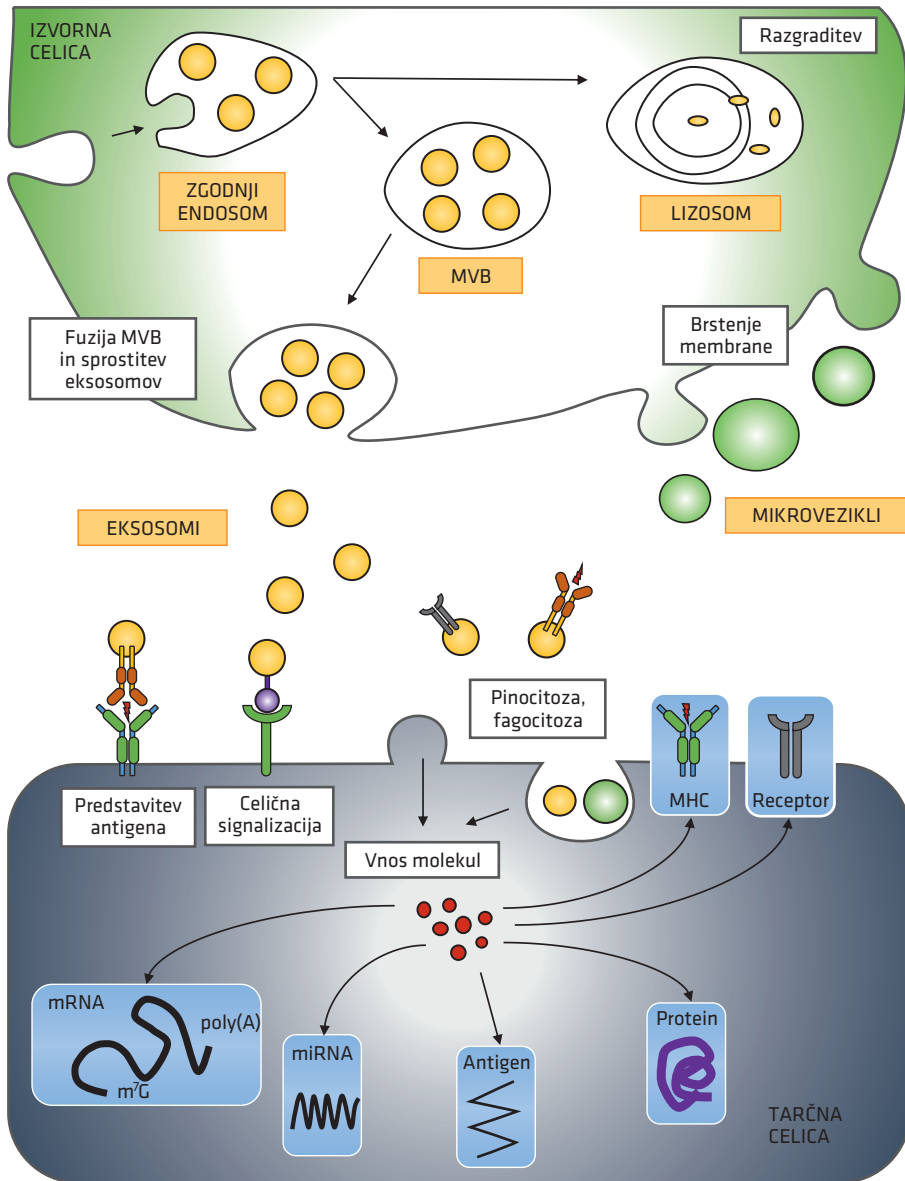
gi predvidene vloge (npr. tolerosomi) ali celičnega izvora (npr. prostasomi, prominosomi), kar je koristilo predvsem raziskovalcem na specifičnem področju, v splošnem pa je povzročilo nejasnosti. Trenutno je sprejeto poimenovanje glede na velikost in mesto nastanka veziklov v celici. Zunajcelične vezikle tako ločimo na tri podskupine, ki jih prikazuje slika 1 (26, 27):

- eksosomi (EKSO), vezikli endocitotskega izvora s premerom 30–100 nm,
- mikrovezikli (MV), vezikli premera 100–1.000 nm, ki nastanejo z brstjenjem plazemske membrane, in
- apoptotska telesca (AP), vezikli premera 1.000–5.000 nm, ki so sproščeni tekom programirane celične smrti.

Kljub številnim razlikam se posamezne lastnosti med skupinami veziklov tudi prekrivajo, zato je za vsako populacijo veziklov težko jasno določiti njihovo vlogo (28–33) (slika 2).



Slika 1. Velikostna razporeditev glavnih skupin zunajceličnih veziklov v primerjavi z mikrobi in s celičnimi delci (prirejeno po (34)).



Slika 2. Nastanek zunajceličnih veziklov in njihova interakcija s tarčno celico (prirejeno po (28)). MVB – multivesikularna telesa (angl. *multivesicular body*), MHC – poglobilni histokompatibilnostni kompleks (angl. *major histocompatibility complex*).

Eksosomi

Eksosomi so med zunajceličnimi vezikli trenutno najbolj proučevani. Prvič jih je kot izločke celice z encimsko aktivnostjo opisal Trams s sodelavci (35). Kasneje

sta njihovo sproščanje iz podganjih retikulocitov opisala Harding in Stahl, študije elektronske mikroskopije pa so potrdile eksocitozo teles velikosti približno 50 nm (6, 7).

Morfologija

Velikost eksosomov variira med 30 in 100 nm, kar se prekriva z velikostjo mnogih virusov (npr. HIV) (slika 1), njihova gostota pa je 1,13–1,19 g/ml (33, 36, 37). Pod elektronskim mikroskopom imajo eksosomi značilno čaši podobno obliko (11, 38).

Biogeneza

Izločanje eksosomov iz celice lahko poteka konstitutivno ali pa je sproženo z nekim biotskim (npr. okužba) ali abiotskim (npr. temperatura) zunanjim dejavnikom. Eksosomi se sproščajo tako v normalnih kot tudi v patoloških pogojih, vendar se le-ti razlikujejo v molekularni sestavi (11). Z elektronsko mikroskopijo so pokazali, da nastanejo znotrajcelično z brstenjem membrane v notranjost poznih endosomov, ki dozoriijo v multivezikularna telesca (angl. *multivesicular body*, MVB). MVB se nato lahko zlijeje s plazemsko membrano ter sprostijo nastale eksosome v medcelični prostor ali pa se zlijeje z lizosomi, kjer sledi njihova razgradnja (6, 39). Nastanek eksosomov v MVB poteka tako, da je usmerjenost membranskih proteinov v eksosomih podobna usmerjenosti proteinov v plazemski membrani. Količina in molekularna sestava sproščenih eksosomov sta odvisni od stanja celice izvora (33).

Sestava

Eksosomi so vezikli obdani s fosfolipidnim dvoslojem. Njihova membrana je obogateena s holesterolom, ceramidom in sfingomielinom ter s fosfatidilserinom in sladkorji na zunanji strani dvosloja (11, 33). Na membrani in v lumnu vezikla se prenašajo številni proteini, značilni za eksosome, zato so pogosto uporabljeni kot njihovi označevalci, čeprav niso vsi prisotni vedno oziroma v enakih količinah. Eksosomi zaradi njihovega endosomalnega izvora običajno vsebujejo proteine, vpletene v membranski transport in fuzijo (GTPaze, Annexin, Flotillin, LAMP1, Rab5b), tetraspanine (CD9, CD63,

CD81, CD82), stresne proteine (Hsc70, Hsp90), proteine, vpletene v biogenezo MVB (Alix, TSG101), kot tudi lipide ter fosfolipaze (33). Med njimi so za karakterizacijo eksosomov največkrat uporabljeni: tetraspanini (CD9, CD63, CD81), TSG101, Alix in Rab5b (28, 33). Poleg proteinov se v eksosomih prenašajo tudi raznolike molekule RNA, kot so mRNA in miRNA (28).

Patofiziologija

Molekularna sestava vpliva tudi na vlogo eksosomov, saj jih ravno specifične molekule usmerjajo do pravih tarčnih celic in jim omogočijo prenos signala z interakcijo receptor-ligand ali s prenosom določenih molekul med eksosomom in tarčno celico (npr. onkogeni receptorji, HIV virusni proteini, miRNA, druge ne-kodirajoče RNA in celo mRNA), s čimer posledično vplivajo na metabolizem tarčnih celic (8, 12, 28, 34, 40–43). Sestava eksosomov nakazuje tudi na tip celic, ki aktivno izloča to vrsto veziklov (44). Mehanizmi, preko katerih eksosomi lahko vplivajo na celice, so sledeči (45):

- neposredni kontakt med površinskimi molekulami vezikla in celico,
- endocitoza vezikla ali
- fuzija vezikla s celično membrano.

Njihova dejanska usoda po vezavi s površino tarčnih celic ni popolnoma znana, vendar številne študije podpirajo zlitje eksosomov z membrano tarčnih celic in sprostitve vsebine v citosol. Eksosomom je bila sprva med zorenjem in diferenciacijo celic pripisana vloga izločanja odvečnih proteinov iz celic, kasneje pa je bilo ugotovljeno, da imajo vlogo kot antigen predstavitveni vezikli, ki stimulirajo imunski odziv, usmerjen proti infektivnim agensom ali tumorjem, oz. omogočijo toleranco le-tega (5, 8, 25, 46–48) (pregled v 11, 34, 36). Tumorske celice tako kot druge celice v okolico izločajo zunajcelične vezikle, s čimer pripomorejo k angiogenezi, širjenju rakavih celic in nastanku metastaz (43, 49, 50). Sproščeni

vezikli lahko prenašajo tudi imunosupresivne molekule, ki inaktivirajo limfocite T ali naravne celice ubijalke, oziroma spodbudijo diferenciacijo regulatornih limfocitov T ali mieloidnih celic, da le-te zavrejo imunski odziv (51–54). Eksosomi lahko tudi preprečujejo kopičenje amiloid- β peptidov v možganih in s tem vzdržujejo nemoteno aktivnost nevronske sinaps (55, 56). Vse to kaže na obširno fiziološko vlogo in vse bolj uveljavljeno vlogo pri patoloških stanjih, kot so rak, okužbe, nevrodegenerativne bolezni in splošno uravnavanje imunskega odziva (11, 15–17, 20, 36, 55, 56).

Izvor

Eksosome so izolirali iz kultur različnih celičnih linij (imunske celice, kot so npr. dendritične celice, limfociti T, limfociti B, makrofagi; hematopoetske celice, celične linije raka); iz primarnih celic; z virusom okuženih celic; kot tudi iz številnih telesnih tekočin: plazma oz. serum, bronhoalveolarni izpirek, plevralni izliv, tumorski izcedki, sinovialna tekočina, urin, plodovnica, sperma, slina, mleko, itd. (18–23, 33, 57–68). Poleg naštetega so jih izolirali tudi iz tkiv (npr. priželjc in maščobno tkivo) (69, 70).

Mikrovezikli

Njihov obstoj sta leta 1946 prvič opisala Chargaff in West, ko sta opazila usedlino v plazmi z odstranjenimi trombociti (71). Peter Wolf jih je opisal kot »trombocitni prah«, frakcija obogatena z lipidnimi delci, ki jo je pridobil po ultracentrifugiranju sveže plazme (72). Trenutne raziskave na mikroveziklih se osredotočajo predvsem na najmanjše med njimi.

Morfologija

So vezikli velikosti 100–1.000 nm (v plazmi navadno 100–400 nm) (slika 1), ki jih obkroža fosfolipidni dvosloj (34). Njihova velikost je primerljiva z velikostjo bakterij in netopnih imunskih kompleksov (34).

Biogeneza

Nastanejo z brstjenjem plazemske membrane navzven, tako da se mikrovezikli sproščajo neposredno v zunajcelični prostor (28, 73). Stopnja enakomerne sproščanja mikroveziklov iz celic je običajno precej nizka, izjema so le tumorske celice (74). Regulirano sproščanje veziklov je inducirano ob aktivaciji površinskih receptorjev celic ali s povišanjem koncentracije znotrajceličnega kalcija (34).

Sestava

Membranske lastnosti mikroveziklov so podobne značilnostim plazemske membrane, brstenje membrane pa povzroči še translokacijo fosfatidilserina na zunanjo stran membrane (11, 75, 76). Nekatere študije so pokazale, da je izpostavljen fosfatidilserin prisoten le pri nekaterih populacijah mikroveziklov (77–79). V primerjavi z eksosomi je pri mikroveziklih identificiranih veliko manj značilnih proteinov, nekateri izmed njih so: ligand CD40; ARF6, ki ima vlogo pri transportu veziklov; ter številni integrini in selektini (11, 28, 73, 80). Molekulska sestava mikroveziklov prav tako odraža trenutno stanje celice izvora, za funkcijo pa so pomembni predvsem membranski ali citosolni proteini ter mRNA in miRNA (28, 73).

Patofiziologija

Mikrovezikli lahko pospešujejo strjevanje krvi, predstavljajo način izločanja interleukina IL-1b iz celic akutne monocitne levkemije, prispevajo k patogenezi revmatoidnega artritisa, vplivajo na invazivnost nekaterih oblik tumorjev, povzročajo onkogeno transformacijo celic ter so pomembni pri komunikaciji med fetusom in materjo (81–86).

Izvor

Največkrat so omenjeni kot produkt trombocitov, rdečih krvnih celic in endotelijskih celic (34).

Apoptotska telesca

Izraz apoptotsko telo je prvi uporabil Kerr leta 1972, kasneje pa Robert Horvitz, ko je sledil razvoju celic nematode *Caenorhabditis elegans*. So najmanj preučevana skupina zunajceličnih veziklov (34, 87).

Morfologija

Apoptotska telesca so membranski vezikli, izvrženi iz celic, ki vstopajo v proces programirane celične smrti oz. apoptoze. Med opisanimi zunajceličnimi vezikli predstavljajo največjo populacijo, saj njihova velikost znaša 1.000–5.000 nm in je primerljiva velikosti trombocitov (slika 1) (88, 89).

Biogeneza

Za razliko od eksosomov in mikroveziklov se apoptotska telesca oblikujejo in sproščajo iz plazemske membrane celic, ki vstopajo v apoptozo (90). Celice v tem stanju spremenijo normalno asimetrično porazdelitev fosfolipidov na plazemski membrani, celični ligandi so s tem izpostavljeni na površini vezikla, proces fagocitoze pa je tako sprožen še preden pride do lize celice (91).

Sestava

Kot pri ostalih zunajceličnih veziklih je tudi pri apoptotskih telescih na zunanji površini lipidnega dvosloja prisoten fosfatidilserin (41, 77, 92). Značilna je tudi oksidacija površinskih molekul plazemske membrane, ki postanejo mesto vezave za trombospondin in C3b (90). Tako spremenjene membrane med normalnim celičnim delovanjem prepoznajo makrofagi, ki apoptotska telesca odstranijo s fagocitozo (93, 94). Omenjene molekule pogosto uporabljajo tudi kot označevalce za prisotnost apoptotskih telesc (90). Od drugih veziklov se apoptotska telesca razlikujejo še po tovoru, saj lahko poleg proteinov vsebujejo tudi organelne, fragmente DNA, ribosomalno RNA (18S in 28S rRNA) in histone (28, 89, 95, 96). Glede na raziskave je polnjenje apoptotskih telesc reguliran proces (97).

Patofiziologija

Tvorjenje apoptotskih telesc je mehanizem, ki preprečuje sprostitve potencialno toksičnih ali imunogenih vsebin iz propadajočih celic. S tem sta preprečena vnetni odziv in avtoimunska reakcija ter posledično uničenje okoliškega tkiva. Manjše vloge so tudi horizontalni prenos onkogenov, DNA ter predstavitev epitopov celicam T po prevzemu s fagociti (98–100).

Izvor

Apoptotskih telesc večinoma ne izolirajo, njihovo funkcijo pa preučujejo s spremljanjem ko-kulture dveh celičnih populacij (34).

IZOLACIJA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV

Kljub nekaterim očitnim razlikam med vezikli so si le-ti podobni v številnih fizikalnih in biokemijskih lastnostih, zato je ločevanje podskupin pogosto precej zahtevno (34). Za izolacijo zunajceličnih veziklov iz telesnih tekočin ali laboratorijskih kultur celičnih linij raziskovalci uporabljajo različne strategije in tehnike (24). V tem pregledu se bomo osredotočili predvsem na izolacijo eksosomov in manjših mikroveziklov, saj so ti med zunajceličnimi vezikli najpogostejše preučevani.

Ultracentrifugiranje

V večini do danes objavljenih študijah veziklov iz bioloških tekočin ali celičnih kultur je za koncentriranje in delno čiščenje le-teh uporabljeno diferencialno centrifugiranje z ali brez filtriranja. S tem postopkom izoliramo heterogeno populacijo veziklov podobnih velikosti in primerljive gostote. Običajno ga sestavlja centrifugiranje pri nizkih obratih (2.000 × g) za odstranitev celic in celičnega debrija, pri večjih obratih (10.000–20.000 × g) za odstranitev delcev, kot so celični organeli in večji mikrovezikli, ter pri visokih obratih (100.000–120.000 × g) za usedanje manjših veziklov, kot so eksosomi

in manjši mikrovezikli (37). Sedimentacija veziklov ni odvisna le od njihove velikosti, temveč tudi od njihove gostote, vsebine in razdalje, ki jo morajo prepotovati. Za odstranitev nečistoč, ki se usedejo skupaj z vezikli, se najpogosteje uporablja ločevanje na gradientih saharoze ali iodiksana, ki razvrstita delce na osnovi njihove gostote (24). Razvrščanje veziklov v gradientu ni odvisno le od hitrosti vrtiljav (sila g), temveč tudi od tipa rotorja (nihajoči ali s fiksnim kotom), učinkovitosti usedanja (faktor rotorja k), viskoznosti vzorca in lastnosti gradienta (24). Nekatere raziskave kažejo, da lahko ultracentrifugiranje povzroči poškodbe virusnih delcev, medtem ko vpliv na ne-virusne delce ni znan, lahko pa ti agregirajo (24).

Mikrofiltriranje

Zunajcelične vezikle lahko ločimo po velikosti glede na njihovo sposobnost prehajanja preko fizične ovire, kot so npr. filtri z različno velikimi porami (ali kolone). S tem postopkom izoliramo heterogeno populacijo veziklov, ki so manjši od velikosti por. Z mikrofiltriranjem se populacije zunajceličnih veziklov ne obogati, razen v primeru uporabe filtrov za koncentriranje vzorca. Posledica filtriranja preko por je lahko poškodba in razbitje večjih veziklov, zato je priporočljiva uporaba čim manjše sile filtriranja (24). Ta metoda izolacije se pogosto uporablja v kombinaciji z ultracentrifugiranjem in drugimi tehnikami.

Imunoafinitetna izolacija

S to metodo se za izolacijo izrablja prisotnost specifičnih proteinov na površini zunajceličnih veziklov (CD63, CD81, CD82, CD9, Rab5b, posamično ali v kombinacijah) in protitelesa proti njim. Protitelesa za negativno ali pozitivno selekcijo so na magnetne kroglice, kromatografske matrice ali plošče vezana kovalentno ali visoko-afinitetno, kar omogoča fizično ločevanje s centrifugiranjem pri nizkih obratih ali z magnetom (37, 101). S tem pristopom se omejimo

na izolacijo le specifične subpopulacije določenega tipa zunajceličnih veziklov, kar je lahko zaželeno, lahko pa pri tem nevede zanemarimo obstoječo heterogenost. Način selekcije vpliva tudi na manjši izkupiček v primerjavi z zgoraj omenjenimi metodami (24). Omenjeni princip izolacije s pomočjo protiteles proti CD63, CD81 ali CD9 izkorišča tudi komercialno dostopen produkt *ExoTESTTM* (HansaBioMed Ltd.) (33).

Sedimentacija s polimeri

Za obogatitev zunajceličnih veziklov lahko biološke tekočine preko noči inkubiramo s polimeri, nato pa vezikle usedemo že s centrifugiranjem pri nižjih obratih. Ta metoda je tehnično in časovno nezahtevna, vendar je izolirana populacija veziklov izredno heterogena, vprašljiva pa je tudi njihova čistost in funkcionalnost (24, 102). Pogosto se uporablja za analizo miRNA, prisotne v veziklih iz bioloških vzorcev, vendar je pri tem potrebna kritična analiza dobljenih rezultatov (24). Omenjeni princip uporabljajo tudi komercialni seti *ExoQuickTM* (System Biosciences) (33).

Mikrofluidne naprave

Mikrofluidne naprave omogočajo izolacijo zelene populacije zunajceličnih veziklov iz manjše količine biološko kompleksnega vzorca (približno 400 μ l), ki se pretaka po kanalčkih z različno obdelano površino in posledično različnimi principi izolacije (prisotnost določenih proteinov, velikost, gostota, površinski naboj). Prednost tega pristopa je velika površina, na kateri poteka izolacija veziklov, poraba majhnih količin reagentov, čistost izolata in relativno krajši čas izolacije (103). Mikrofluidne naprave delimo na tri skupine – izolacija zunajceličnih veziklov (104):

- z imunoafinitetnim pristopom,
- s pomočjo sipanja ali filtracije v električnem polju in
- preko lovljenja s pomočjo raznoliko strukturiranih mikrostebov.

Nobena od teh metod ni popolna. Imunofinitetno ločevanje je visoko specifično in kratkotrajno (približno 1,5 ure), vendar s to metodo zanemarimo preostali del populacije veziklov, ki na svoji površini nima specifičnih receptorjev, katere prepoznajo izbrana protitelesa (103). Pri filtraciji v električnem polju ni potrebna predhodna obdelava vzorca, kar omogoča direktno analizo vzorca krvi, vendar problem predstavlja nizka stopnja obogatitve veziklov ter njihove poškodbe zaradi strižnih sil. Lovljenje s pomočjo mikrostebrov naj bi vodilo do izolatov velike čistosti, vendar je postopek relativno zamuden (traja več kot en dan) (103). Mikrofluidne naprave kljub napredku še niso v splošni uporabi, so pa že bile uporabljene za obogatitev zunajceličnih veziklov iz plazme in celičnega medija (101, 105).

Način izolacije veziklov je odvisen tudi od narave vzorca (celični medij, plazma, slina, urin, likvor). V večini študij so vezikli iz vzorcev izolirani z ultracentrifugiranjem, ki zaenkrat še vedno predstavlja »zlati standard« (106). Navadno je ultracentrifugiranje povezano še z ločevanjem na saharoznem gradientu ali s čiščenjem preko saharozne raztopine (37). Za viskozne vzorce, kot sta kri in slina, je priporočeno predhodno redčenje s fosfatnim pufrom. Za razredčene vzorce, kot je urin, je priporočeno koncentriranje vzorca na nanomembranah (24). Na kvaliteto izoliranih veziklov močno vpliva tudi pravilno zbiranje bioloških vzorcev. Pri krvi je pomembna izbira plazme (priporočeno) ali seruma, tipa anti-koagulanta (heparin, EDTA, NaF/KOx ali natrijev citrat), načina in mesta odvzema ter igle. Pomembni so tudi čas odvzema in procesiranja krvi, prisotnost hemolize, ter čim boljša odstranitev trombocitov. Postopek odvzema in procesiranja vzorcev mora biti za vse med seboj primerjane vzorce enak (24).

Izbira strategije je odvisna tudi od tipa študije in želene stopnje čistosti, homogenosti in funkcionalnosti izoliranih veziklov. Možne nečistoče v izolatih zunajceličnih

veziklov so lahko neželene populacije veziklov, prisotnost lipoproteinov, mikrobov, kromatina in proteinskih agregatov. Biološki sistemi vsebujejo raznolike populacije zunajceličnih veziklov. Kljub trudu, da bi jih osamili in izolirali kot posamične populacije, je to skoraj nemogoče. Lipoproteinski delci, kot je HDL, se kljub manjši velikosti (10 nm) izolirajo skupaj z zunajceličnimi vezikli, saj njihova gostota sovпада z gostoto eksosomov (1,13–1,19 g/ml). Ločevanje med najmanjšimi zunajceličnimi vezikli in HDL je možno le z usedanjem pri $100.000 \times g$ (eksosomi) in $300.000 \times g$ (HDL). Velikost zunajceličnih veziklov se lahko prekriva tudi z velikostjo številnih mikrobov, kot so virusi in bakterije. V primeru virusov se le-te loči od veziklov z uporabo gradienta iz izoosmotske raztopine iodiksana. Poleg tega se iz nekrotičnih celic lahko sproščajo membranski delci, organeli in makromolekule, kot je DNA. DNA se lahko sama ali skupaj s kromatinskimi proteini veže na zunajcelične vezikle in ustvari agregate s spremenjeno gostoto, ki sedimentirajo pri nižjih obratih in s tem povzročijo količinsko izgubo pri izolaciji tarčnih veziklov. Zato je priporočljiva odstranitev genomske DNA z DNazami ali s kolonami. Biofizikalne lastnosti proteinskih agregatov prav tako sovpadajo z lastnostmi zunajceličnih veziklov. Imunski kompleksi, ki so pogosto nečistoče v izolatih veziklov iz bioloških tekočin, se usedajo skupaj z večjimi vezikli pri manjši hitrosti, ločevanje od veziklov pa je možno le z ultracentrifugiranjem na gradientih (24).

ANALIZA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV

Za analizo zunajceličnih veziklov so razvili in prilagodili različne optične (npr. optično in fluorescentno mikroskopiranje, pretočna citometrija, optično sledenje posameznemu delcu in ostale) in ne-optične (npr. elektronska mikroskopija, mikroskopija na atomsko silo, pretočna citometrija na osnovi impedance in ostale) metode, pri čemer je

največji izziv predstavljala njihova majhnost (107). Za določanje številnih značilnosti veziklov, kot so velikost, število, vsebnost RNA, proteinov in lipidov, se uporabljajo različne tehnike. Nekatere izmed njih smo v nadaljevanju natančneje opisali vključno z njihovimi prednostmi in s pomanjkljivostmi. Za uporabo teh metod v diagnostiki bolezni ter njeni prognozi bo potrebno premagati njihove pomanjkljivosti, kar bo omogočilo tudi standardizacijo analize zunajceličnih veziklov.

Določanje morfologije in velikosti veziklov

Elektronska mikroskopija

Za neposreden dokaz prisotnosti vezikularnih struktur ter za analizo njihove morfologije, velikosti in prisotnosti specifičnih markerjev se pogosto uporablja transmissijska elektronska mikroskopija (TEM) ali vrstična elektronska mikroskopija (angl. *scanning electron microscopy*, SEM) z mejo ločljivosti približno 1 nm (8). Pri obeh metodah je potrebno predhodno označevanje veziklov s težkimi kovinami (osmijev tetroksid ali uranil acetat), saj s tem povečamo kontrast slike, posnete po izpostavitvi preparata snopu elektronov. TEM se pogosto uporablja v kombinaciji z zlatimi delci, ki so vezani na protitelesa proti proteinom, značilnim za zunajcelične vezikle. Prednosti metode so predvsem majhna poraba vzorca ter detekcija nečistoč, kot so proteinski agregati in delci membrane (107). Ob tem se moramo zavedati, da predpriprava vzorca (fiksacija in označevanje s težkimi kovinami) lahko vpliva na morfologijo veziklov, da so preučevani vzorci dehidrirani ter da imajo lahko posamezne skupine veziklov različno sposobnost vezave na površino mreže (107).

Mikroskopija na atomsko silo

Z mikroskopijo na atomsko silo (angl. *atomic force microscopy*, AFM) lahko analiziramo topografijo površine veziklov na atom natančno v vertikalni osi in na nanometer

natančno v horizontalni osi (107). Čeprav podobno sliko 3D-površine pridobimo tudi s SEM, pa je princip detekcije različen, saj površino pri AFM namreč obsevamo z laserskim žarkom. Prednost metode AFM v primerjavi s SEM je, da zanjo ni potrebna kemična predpriprava vzorcev, saj biološki vzorec vežemo neposredno na negativno nabito površino, kot je na primer steklo, kar zmanjša možnost nastanka morfoloških sprememb. Biološke vzorce lahko analiziramo v različnih pogojih, na primer pri sobni temperaturi in celo v tekočem okolju. Sicer pa je metoda AFM v primerjavi s SEM počasnejša, z njo ni možno določiti sestavo preučevanega materiala, pri neustrezni uporabi ali zaradi narave vzorca pa se lahko tvorijo tudi artefakti (107, 108).

Določanje koncentracije veziklov

Optično sledenje posameznemu delcu

Najpogosteje uporabljeno orodje za določanje koncentracije in velikosti delcev v vzorcu je trenutno optično sledenje posameznemu delcu (angl. *optical single particle tracking*) z metodo *NanoSight* (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA); NanoSight Ltd., Wiltshire, UK). Metoda na podlagi lomljenja svetlobe laserskega žarka in Brownovega gibanja delcev, zabeleženega s CCD (angl. *charge-coupled device*) kamero, z razpon delcev 50–1000 nm. Metoda je relativno enostavna za uporabo in omogoča hkratno merjenje tako velikosti kot tudi koncentracije delcev v vzorcu, kar zmanjša količino porabljenega vzorca in reagentov. Slabosti metode so nujne optimizacije nastavitve pred vsako meritvijo, ki so močno odvisne od človeškega faktorja, ter nesposobnost ločevanja med proteinskimi agregati (ali celo mehurčki) in vezikli s podobnim Brownovim gibanjem (24). Poleg tega morajo biti vezikli v vzorcu po velikosti relativno homogeni, saj večji vezikli hitro motijo detekcijo majhnih. Omenjene slabosti vplivajo predvsem na odstopanja pri izmerjenih koncentracijah delcev kot tudi

pri določanju velikosti preučevanih veziklov. Kljub temu da se s to metodo ne določa biokemijske sestave ali celičnega izvora veziklov, je možna analiza tudi s fluorescenco označenih veziklov (24).

Dinamično sipanje svetlobe

Podoben princip delovanja kot NTA ima tudi metoda dinamičnega sipanja svetlobe (angl. *dynamic light scattering*, DLS), ki na osnovi zaznavanja razpršenosti svetlobe odvisno od velikosti delcev določi povprečno velikost homogene populacije izoliranih veziklov. Pri analizi homogenih vzorcev DSL v primerjavi z NTA poda statistično bolj robustne in ponovljive rezultate, saj povprečno velikost delcev oceni na večji populaciji delcev, pri analizi velikostno heterogenih vzorcih pa je vpliv večjih delcev na oceno povprečne velikosti veziklov velik (107).

Rezistentno zaznavanje pulza

Rezistentno zaznavanje pulza (angl. *resistive pulse sensing*) s *qNano* tehniko (Izon Science Ltd.) je alternativna metoda za merjenje koncentracije in velikostne razporeditve populacije veziklov. Ta metoda zazna posamezen vezikel s pomočjo prehodnega zmanjšanja ionskega toka zaradi prehoda vezikla preko nanopore v membrani (109). Ključna prednost pred metodo NTA je, da je z njo možno analizirati velikostno zelo heterogene vzorce (10–900 nm), iz meritev pa pridobimo tudi informacije o samem delcu, kot so na primer oblika, napetost površine in koncentracija (110).

Pretočna citometrija

S pretočno citometrijo lahko kvalitativno in kvantitativno analiziramo celice in manjše delce, kot so tudi zunajcelični vezikli. Običajni pretočni citometri zaznajo le delce s premerom > 500 nm, novejši pretočni citometri pa so zmožni detekcije veziklov premera do 200 nm (111) ali celo do 100 nm, vendar je za optimalne nastavitve pretočnega citometra potrebno veliko izkušenj (111,

112). Zunajcelične vezikle lahko pred analizo s pretočnim citometrom označimo z lipofilnimi barvili (PKH67 ali PKH26) ali s fluorescentno označenimi protitelesi proti specifičnim proteinom (113). Slabost uporabe pretočne citometrije za majhne delce je oteženo ločevanje veziklov od proteinskih agregatov ali skupkov fluorescentnega barvila. Ta problem lahko rešimo z dvojnimi označevanjem veziklov, z barvilom, specifičnim za proteine (CFSE) in za lipide (FM), saj jih tako ločimo od običajnih nečistoč v vzorcu, kot so proteinski agregati ali miceli iz nevezanega lipofilnega barvila (113). S pretočno citometrijo lahko analiziramo tudi proteinsko sestavo veziklov, pri čemer le-te preko protiteles predhodno vežemo na mikrometrске lateksne kroglice, nato pa prisotnost značilnih proteinov preverimo s specifičnimi protitelesi, označenimi s fluorescentnimi barvili. V tem primeru izgubimo možnost kvantifikacije veziklov in njihovega ločevanja na različne podskupine (37).

Določanje proteinske sestave veziklov

Prenos western

Prenos western je metoda s katero s pomočjo specifičnih protiteles dokažemo prisotnost proteinov, ki so značilni za določeno populacijo zunajceličnih veziklov (opisano pri vrstah zunajceličnih veziklov). Iz izoliranih veziklov najprej ekstrahiramo proteine, ki jih ločimo po velikosti s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata. Nato jih prenesemo na nitrocelulozno membrano, ki jo nadalje analiziramo s primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Metoda je splošno uporabljena za identifikacijo značilne proteinske sestave veziklov in za analizo prisotnosti nečistoč v izolatu. Pomanjkljivost te metode je, da lahko preverjamo le prisotnost proteinov, ki jih v izoliranih veziklih pričakujemo, za identifikacijo nepoznanih proteinov pa je potrebno proteom veziklov analizirati z masno spektrometrijo (29, 38).

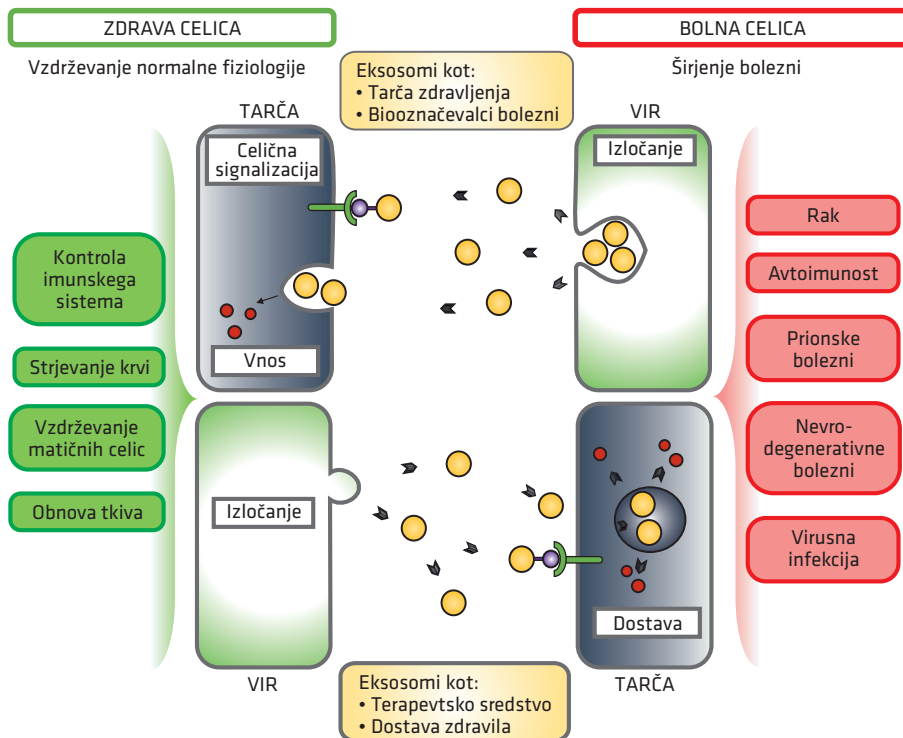
VLOGA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV

Zunajcelični vezikli imajo ključno vlogo pri razvoju različnih bolezni in pri uravnavanju normalnih fizioloških procesov, kot so angiogeneza, celični metabolizem, procesiranje mRNA, celična invazija, rast, vzdrževanje zarodnih celic, popravilo tkiva, imunski nadzor in strjevanje krvi (slika 3) (8, 38, 46, 73, 114–116). Do danes so njihovo prisotnost že povezali z nastankom tumorjev, s širjenjem virusov in s številnimi patološkimi dejavniki kot na primer amiloid- β -nastali peptidi in α -sinuklein, ki sta povezana z nevrodegenerativnimi obolenji pri človeku (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen) (56, 117–124). Medcelični prenos zunajceličnih veziklov omogoča posredovanje imunskega odziva na patogene, kot so virus HIV-1, bakteriji *Mycobacterium*

bovis in *Salmonella typhimurium* ter parazit *Toxoplasma gondii*; ali pa patogenom omogočajo izogib imunskemu odzivu gostitelja (14, 43, 125–128).

MOŽNOSTI UPORABE ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV V KLINIČNE NAMENE (DIAGNOSTIKA IN ZDRAVLJENJE)

Medcelično sporazumevanje z zunajceličnimi vezikli predstavlja temelj uporabe veziklov v klinične namene. Analizo veziklov je možno izkoristiti kot orodje odkrivanja ali za potrjevanje diagnoze ter nadzor zdravljenja. Raziskave potekajo tudi v smeri ciljanja zunajceličnih veziklov z zdravilnimi učinkovinami za preprečevanje razvoja bolezni, njihove uporabe kot terapevtsko sredstvo, pri čemer se znanstveniki srečujejo s številnimi preprekami in vprašanji (90, 129) (slika 3).



Slika 3. Vloga zunajceličnih veziklov pri normalni fiziologiji celice in širjenju bolezni (prirejeno po (28)).

Vezikli kot biooznačevalci bolezni

Zunajcelični vezikli so pomemben vir potencialnih biooznačevalcev za zgodnjo diagnozo različnih bolezni, saj so v velikem številu prisotni v vseh telesnih tekočinah, njihova proteinska, RNA in lipidna sestava pa odraža stanje izvorne celice, ki se lahko nahaja v bližnjem ali oddaljenem tkivu. Minimalno invazivna diagnostika (analiza krvi) ali ne-invazivna diagnostika (uporaba vzorcev urina ali sline) sta zaradi zmanjšanja bolečin in neprijetnosti odvzema vzorca, hitrosti in manjših stroškov analize, najboljši alternativi tradicionalnim biopsijam, ki so pogoste pri nevroloških obolenjih in nedostopnih tumorjih (33). V serumu nekaterih bolnikov z glioblastomom so v izoliranih zunajceličnih veziklih poleg mutiranih RNA in miRNA dokazali tudi prisotnost tumor-specifičnega proteina EGFRvIII, kar kaže na to, da so zunajcelični vezikli pomembni prenašalci diagnostičnih informacij, ki so ključne tudi za usmeritev zdravljenja (12). Pred leti so številne skupine poročale o prisotnosti miRNA v krvi kot viru zelo pomembnih biooznačevalcev, sedaj pa je postalo jasno, da so te molekule večinoma zaščitene pred razgradnjo z eksosomi (33). Podobno velja tudi za urin, saj eksosomi ohranijo molekularno sestavo, poleg tega pa jih je možno izolirati na neinvaziven način (130). Številne študije so jih že preučevale kot vir biooznačevalcev za ledvična, urogenitalna in sistemska obolenja (21, 130). V klinični študiji so na podlagi primerjave proteomov eksosomov, izoliranih iz urina sladkornih bolnikov z diabetično nefropatijo, z eksosomi zdravih osebkov odkrili različno količino proteinov AMBP, MLL3 in VDAC1, ki bi bili v prihodnosti lahko v pomoč pri diagnozi in spremljanju tega obolenja (131). Pisitkun s sodelavci je po uspešni izolaciji eksosomov iz človeškega urina z masno spektrometrijo dokazal prisotnost 295 različnih membranskih proteinov, pri čemer so števil-

ni povezani z različnimi obolenji in lahko potencialno služijo kot biooznačevalci (21). Ker mnogo študij temelji na primerjalni analizi, je učinkovita in ponovljiva metoda za čiščenje eksosomov nujno potrebna za pridobitev zanesljivih kvantitativnih in kvalitativnih rezultatov (18).

Tudi številna komercialna podjetja so se v zadnjih nekaj letih osredotočila na razvoj diagnostike, ki temelji na eksosomih. Podjetje Caris Life Sciences Inc. razvija pristop za izolacijo in analizo mikroveziklov v krvi. Leta 2010 so na tržišču predstavili test za analizo eksosomalnih proteinov povezanih z rakom prostate (*Carisome® Prostate cMV*) (33). Podjetje Exosome Diagnostics Inc. prav tako razvija molekularni test analize telesnih tekočin (33), pri podjetju Exosome Sciences pa so izdelali diagnostično orodje za detekcijo in kvantifikacijo eksosomov v telesnih tekočinah. Njihov glavni produkt različice testa ELISA je bil preverjen za določanje eksosomov, ki nakazujejo na prisotnost virusa HIV, tuberkuloze in različnih oblik raka (33). Podjetje HansaBioMed Ltd. se je usmerilo predvsem na diagnostiko eksosomov pri raku in nevrodegenerativnih boleznih (33).

Vezikli kot tarče za preprečevanja razvoja bolezni

Vedno večje število študij potrjuje vpletenost zunajceličnih veziklov v patogenezo raznolikih bolezni, kot na primer vpletenost eksosomov v širjenje mutiranih in nepravilno zvitih proteinov, povezanih z nevrološkimi obolenji, kot so Alzheimerjeva, Parkinsonova in prionska bolezen (132). Za preprečevanje negativnega vpliva zunajceličnih veziklov na potek bolezni, lahko le-te odstranimo z naslednjimi pristopi: preprečevanje nastajanja, sproščanja ali vnosa veziklov in njihovih specifičnih komponent v tarčne celice. Na osnovi teh pristopov se razvijajo različne terapevtske intervencije, katerih namen je zmanjšati kopičenje zunajceličnih veziklov ali preprečiti

aktivnost/prisotnost ključne komponente le-teh. Pri tem moramo biti previdni, saj večina študij patološko vlogo zunajceličnih veziklov preučuje z uporabo precej visokih koncentracij zunajceličnih veziklov, ki običajno presega število veziklov, prisotnih v telesnih tekočinah (133). Poseganje v biogenezo veziklov lahko povzroči tudi nespecifične učinke, saj so vezikli pogosto vpleteni v uravnavanje normalnih bioloških procesov ali pa so tarčni proteini, ki so ključni za biogenezo veziklov, pomembni tudi za druge procese v celici (11).

Vezikli matičnih celic kot terapevtsko sredstvo

Zunajcelični vezikli sodelujejo pri spremembi normalnih fizioloških procesov, zato bi bili lahko ustrezni tudi kot terapevtsko sredstvo pri obnovi tkiva in pri usmerjanju imunskega odziva v želeno smer: antigen-specifično ali nespecifično. Obnova tkiva bi lahko bila odvisna od prenosa eksosomov, napoljenih z rastnimi dejavniki, topnimi proteini, bioaktivnimi lipidi in genetskim materialom (miRNA, mRNA in druge nekodirajoče molekule RNA) do tarčnih celic (28, 134–136). Klasično za regenerativno medicino preučujejo predvsem uporabnost multipotentnih matičnih celic, izoliranih iz kostnega mozga ali periferne krvi. Terapevtski potencial teh celic se odraža tudi v številnih kliničnih študijah, kjer preučujejo njihovo uporabnost v srčno-žilnih boleznih, pri Crohnovi bolezni in pri akutni poškodbi ledvic (28). Vezikli, sproščeni iz matičnih celic, so sposobni sprožiti angiogenezo mirujočih epitelnih celic, upočasniti proces apoptoze in zmanjšati proliferacijo, dostaviti imunske signale kot tudi rekrutirati in/ali reprogramirati celice, ki so potrebne za obnovo tkiva (28). Tudi vezikle, sproščene iz specifičnih diferenciranih celic, je možno izkoristiti za preprečitev specifičnega imunskega odziva (28).

Vezikli za dostavo zdravilnih učinkovin

Zaradi »naravnega« izvora zunajceličnih veziklov in njihove vpletenosti v medcelično komunikacijo v telesu, je vedno več zanimanja tudi za uporabo zunajceličnih veziklov kot dostavnega sistema. Uporabili bi jih lahko za namensko dostavo RNA, proteinov ali zdravila, saj so zunajcelični vezikli s svojim vstopom v tarčno celico sposobni vplivati na strukturne spremembe tako na nivoju RNA, proteinov kot tudi celičnega fenotipa (137). Pri tej obliki zdravljenja bi lahko izkoristili naravni potencial zunajceličnih veziklov, kot so sprememba imunskega odziva, spodbujanje obnavljanja ter preprečevanje vpliva patogenih organizmov. Vse te lastnosti je mogoče poudariti oziroma prilagoditi do te mere, da omogočimo čim širši spekter njihove zdravilne uporabnosti, vključno s cepljenjem, izboljšanjem izida nosečnosti, zdravljenjem avtoimunskih bolezni, raka in poškodbe tkiva (11, 33, 138–141).

Že desetletje se za dostavo zdravilnih učinkovin v klinične namene uporablja fosfolipidne vezikle ali liposome. Kljub temu bi bilo za lažje posnemanje naravnih transportnih veziklov, kot tudi zaradi varnosti inocene kvalitete proizvodov, namesto uporabe celokupnih zunajceličnih veziklov smiselno prenesti le njihove ključne komponente na v praksi večkrat uporabljene nanodelce ali liposome (137, 141). Med zunajceličnimi vezikli in liposomi obstajajo številne podobnosti in razlike, vendar imata oba tipa pomembne lastnosti, ključne za najučinkovitejšo dostavo zdravila: obstoj učinkovine v telesnem obtoku ter njena prerazporeditev in interakcija s celicami (137). Kljub temu so pri tej obetajoči obliki zdravljenja prisotni številni strateški izzivi: izbira zdravilne učinkovine, princip vnosa učinkovin v zunajcelične vezikle (s kurkumino, z elektroporacijo), učinkovitost proizvedenih veziklov (preverjanje na celičnih kulturah), vzdrževanje sta-

bilnosti veziklov, ciljna usmerjenost veziklov ter uspešna dostava vsebine vezikla v notranjost tarčnih celic (28, 137, 141–145). Ker je uporaba zunajceličnih veziklov za dostavo zdravilnih učinkovin še vedno v povojih, je pred tem potrebno obravnavati tudi splošna vprašanja v zvezi s podrobnejšim razumevanjem vseh poti nastanka veziklov, prehod na proizvodnjo veziklov v večjem obsegu in poznavanje njihovih interakcij v *in vivo* okolju. To bo prispevalo k razvoju uspešnih, cenovno ugodnih ter učinkovitih sistemov dostave zdravilnih učinkovin na osnovi zunajceličnih veziklov (137, 141).

ZAKLJUČEK

V tem pregledu literature smo strnili trenutno znanje o zunajceličnih veziklih s pou-

darkom na opisu vrst zunajceličnih veziklov, metod za njihovo izolacijo in analizo, že znanih bioloških vlog in njihovega kliničnega potenciala. Kljub ogromnemu napredku v zadnjih nekaj letih ostajajo številni problemi predvsem pri razumevanju heterogenosti populacij zunajceličnih veziklov, pri poenotenju klasifikacije veziklov, pri razvoju standardiziranih metod za izolacijo čiste in ohranjene populacije veziklov ter pri razvoju enostavnih in standardiziranih metod za njihovo analizo. Napredek na omenjenih področjih bo še pospešil proučevanje in (potencialno) klinično uporabo zunajceličnih veziklov kot biooznačevalce v diagnostiki, kot tarče za preprečevanje razvoja bolezni ter kot terapevtsko sredstvo ali dostavni sistem za zdravilne učinkovine.

LITERATURA

1. Chatterjee SN, Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J Gen Microbiol*. 1967; 49 (1): 1–11.
2. Ellis TN, Kuehn MJ. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74 (1): 81–94.
3. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*. 1999; 181 (16): 4725–33.
4. Schertzer JW, Whiteley M. Bacterial outer membrane vesicles in trafficking, communication and the host-pathogen interaction. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2013; 23 (1–2): 118–30.
5. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983; 33 (3): 967–78.
6. Pan BT, Teng K, Wu C, et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985; 101 (3): 942–8.
7. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol*. 1983; 97 (2): 329–39.
8. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*. 1996; 183 (3): 1161–72.
9. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, et al. Tumor shedding and coagulation. *Science*. 1981; 212 (4497): 923–4.
10. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 27066.
11. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9 (8): 581–93.
12. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008; 10 (12): 1470–6.

13. Mitchell PJ, Welton J, Staffurth J, et al. Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med.* 2009; 7: 4.
14. Zhu W, Huang L, Li Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett.* 2012; 315 (1): 28–37.
15. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, et al. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell.* 2013; 153 (5): 1120–33.
16. Izquierdo-Useros N, Naranjo-Gomez M, Erkizia I, et al. HIV and mature dendritic cells: Trojan exosomes riding the Trojan horse? *PLoS Pathog.* 2010; 6 (3): e1000740.
17. Vella LJ, Sharples RA, Nisbet RM, et al. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J.* 2008; 37 (3): 323–32.
18. Caradec J, Kharmate G, Hosseini-Beheshti E, et al. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clin Biochem.* 2014; 47 (13–14): 1286–92.
19. Ashcroft BA, de Sonnevile J, Yuana Y, et al. Determination of the size distribution of blood microparticles directly in plasma using atomic force microscopy and microfluidics. *Biomed Microdevices.* 2012; 14 (4): 641–9.
20. Keller S, Ridinger J, Rupp AK, et al. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med.* 2011; 9: 86.
21. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (36): 13368–73.
22. Ren Y, Yang J, Xie R, et al. Exosomal-like vesicles with immune-modulatory features are present in human plasma and can induce CD4+ T-cell apoptosis in vitro. *Transfusion.* 2011; 51 (5): 1002–11.
23. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* 2005; 17 (7): 879–87.
24. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2.
25. Chaput N, Thery C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 2011; 33 (5): 419–40.
26. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10 (12): e1001450.
27. Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2.
28. Andaloussi SEL, Mager I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013; 12 (5): 347–57.
29. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013; 200 (4): 373–83.
30. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16 (4): 415–21.
31. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21 (4): 575–81.
32. Schneider A, Simons M. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell Tissue Res.* 2013; 352 (1): 33–47.
33. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1820 (7): 940–8.
34. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68 (16): 2667–88.
35. Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr., et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 645 (1): 63–70.
36. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic.* 2008; 9 (6): 871–81.
37. Thery C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006; Chapter 3: Unit 3.22.
38. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010; 73 (10): 1907–20.
39. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008; 319 (5867): 1244–7.

40. Nolte-t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, et al. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*. 2009; 113 (9): 1977–81.
41. Arnold PY, Mannie MD. Vesicles bearing MHC class II molecules mediate transfer of antigen from antigen-presenting cells to CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 1999; 29 (4): 1363–73.
42. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci*. 2011; 124 (Pt 3): 447–58.
43. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9 (6): 654–9.
44. Choudhuri K, Llodra J, Roth EW, et al. Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. *Nature*. 2014; 507 (7490): 118–23.
45. Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol*. 2011; 13 (1): 1–9.
46. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006; 20 (5): 847–56.
47. Johnstone RM, Adam M, Pan BT. The fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro. *Can J Biochem Cell Biol*. 1984; 62 (11): 1246–54.
48. Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol*. 2013; 200 (4): 367–71.
49. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2010; 36 (8): 888–906.
50. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res*. 2011; 71 (11): 3792–801.
51. Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res*. 2011; 17 (5): 959–64.
52. Yang C, Ruffner MA, Kim SH, et al. Plasma-derived MHC class II+ exosomes from tumor-bearing mice suppress tumor antigen-specific immune responses. *Eur J Immunol*. 2012; 42 (7): 1778–84.
53. Peche H, van Denderen B, Roussel JC, et al. Presentation of donor major histocompatibility complex class II antigens by dna vaccination prolongs heart allograft survival. *Transplantation*. 2004; 77 (5): 733–40.
54. Peche H, Heslan M, Usal C, et al. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*. 2003; 76 (10): 1503–10.
55. An K, Klyubin I, Kim Y, et al. Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of Abeta assemblies in vivo. *Mol Brain*. 2013; 6: 47.
56. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, et al. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol*. 2012; 3: 124.
57. Ji H, Greening DW, Barnes TW, et al. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics*. 2013; 13 (10–11): 1672–86.
58. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, et al. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12 (3): 587–98.
59. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9 (2): 197–208.
60. Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. *J Immunol*. 2006; 176 (3): 1534–42.
61. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010; 101 (10): 2087–92.
62. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008; 110 (1): 13–21.
63. Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, et al. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J*. 2003; 22 (4): 578–83.
64. Prado N, Marazuela EG, Segura E, et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol*. 2008; 181 (2): 1519–25.
65. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002; 360 (9329): 295–305.

66. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol.* 2008; 79 (1): 12–7.
67. Gatti JL, Metayer S, Belghazi M, et al. Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod.* 2005; 72 (6): 1452–65.
68. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 2007; 179 (3): 1969–78.
69. Wang GJ, Liu Y, Qin A, et al. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *J Immunol.* 2008; 181 (8): 5242–8.
70. Deng ZB, Poliakov A, Hardy RW, et al. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2009; 58 (11): 2498–505.
71. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946; 166 (1): 189–97.
72. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967; 13 (3): 269–88.
73. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009; 19 (2): 43–51.
74. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, et al. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res.* 2008; 7 (5): 2088–96.
75. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* 1997; 89 (4): 1121–32.
76. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, et al. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005; 20: 22–7.
77. Nielsen MH, Beck-Nielsen H, Andersen MN, et al. A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma. *J Extracell Vesicles.* 2014; 3.
78. 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): 1044–52.
79. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res.* 2003; 109 (4): 175–80.
80. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol.* 2009; 19 (22): 1875–85.
81. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med.* 2008; 263 (5): 528–37.
82. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, et al. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity.* 2001; 15 (5): 825–35.
83. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science.* 2010; 327 (5965): 580–3.
84. Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, et al. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia.* 2008; 10 (5): 481–8.
85. Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (12): 4852–7.
86. Pap E, Pallinger E, Falus A, et al. T lymphocytes are targets for platelet- and trophoblast-derived microvesicles during pregnancy. *Placenta.* 2008; 29 (9): 826–32.
87. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26 (4): 239–57.
88. Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, et al. The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch.* 1998; 433 (5): 443–7.
89. Hristov M, Erl W, Linder S, et al. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood.* 2004; 104 (9): 2761–6.
90. Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013; 113 (1): 1–11.
91. Williamson P, Schlegel RA. Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1585 (2–3): 53–63.
92. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol.* 1969; 41 (1): 59–72.
93. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (2): 243–50.

94. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407 (6805): 784–8.
95. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009; 2 (100): ra81.
96. Cline AM, Radic MZ. Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2004; 112 (2): 175–82.
97. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res*. 2000; 260 (2): 248–56.
98. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, et al. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem Cell Biol*. 2008; 130 (2): 197–209.
99. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, et al. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*. 2010; 5 (1): e8577.
100. Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*. 2011; 17 (4): 345–54.
101. Chen C, Skog J, Hsu CH, et al. Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip*. 2010; 10 (4): 505–11.
102. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int*. 2012; 82 (9): 1024–32.
103. Liga A, Vliegenthart AD, Oosthuizen W, et al. Exosome isolation: a microfluidic road-map. *Lab Chip*. 2015; 15 (11): 2388–94.
104. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, et al. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip*. 2014; 14 (11): 1891–900.
105. Davies RT, Kim J, Jang SC, et al. Microfluidic filtration system to isolate extracellular vesicles from blood. *Lab Chip*. 2012; 12 (24): 5202–10.
106. Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2.
107. van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, et al. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010; 8 (12): 2596–607.
108. Gyorgy B, Modos K, Pallinger E, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*. 2011; 117 (4): 39–48.
109. Garza-Licudine E, Deo D, Yu S, et al. Portable nanoparticle quantization using a resizable nanopore instrument – the IZON qNano. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010; 2010: 5736–9.
110. Kozak D, Anderson W, Vogel R, et al. Advances in Resistive Pulse Sensors: Devices bridging the void between molecular and microscopic detection. *Nano Today*. 2011; 6 (5): 531–45.
111. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, et al. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32 (4): 1054–8.
112. van der Vlist EJ, Nolte-'t Hoen EN, Stoorvogel W, et al. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry. *Nat Protoc*. 2012; 7 (7): 1311–26.
113. Pospichalova V, Svoboda J, Dave Z, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 25530.
114. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26 (5): 1474–83.
115. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005; 106 (5): 1604–11.
116. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2012; 21 (1): 125–34.
117. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res*. 2011; 1 (1): 98–110.
118. Rak J, Guha A. Extracellular vesicles-vehicles that spread cancer genes. *Bioessays*. 2012; 34 (6): 489–97.
119. D'Asti E, Garnier D, Lee TH, et al. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression. *Front Physiol*. 2012; 3: 294.
120. Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*. 2000; 6 (7): 769–75.

121. Shelton MN, Huang MB, Ali SA, et al. Secretion modification region-derived peptide disrupts HIV-1 Nef's interaction with mortalin and blocks virus and Nef exosome release. *J Virol.* 2012; 86 (1): 406–19.
122. Lenassi M, Cagney G, Liao M, et al. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic.* 2010; 11 (1): 110–22.
123. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci.* 2010; 30 (20): 6838–51.
124. Porto-Carreiro I, Fevrier B, Paquet S, et al. Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35 (2): 143–8.
125. Li XB, Zhang ZR, Schluessener HJ, et al. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med.* 2006; 10 (2): 364–75.
126. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, et al. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem.* 2003; 278 (52): 52347–54.
127. Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, et al. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood.* 2007; 110 (9): 3234–44.
128. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* 2004; 12 (7): 310–6.
129. D'Souza-Schorey C, Di Vizio D. Biology and proteomics of extracellular vesicles: harnessing their clinical potential. *Expert Rev Proteomics.* 2014; 11 (3): 251–3.
130. Huebner AR, Somporn P, Benjachat T, et al. Exosomes in urine biomarker discovery. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 845: 43–58.
131. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J Proteomics.* 2014; 96: 92–102.
132. Tsilioni I, Panagiotidou S, Theoharides TC. Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. *Clin Ther.* 2014; 36 (6): 882–8.
133. Sverdlov ED. Amedeo Avogadro's cry: what is 1 microg of exosomes? *Bioessays.* 2012; 34 (10): 873–5.
134. Ratajczak MZ, Kucia M, Jadczyk T, et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia.* 2012; 26 (6): 1166–73.
135. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27 (8): 3037–42.
136. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65 (3): 336–41.
137. van der Meel R, Fens MH, Vader P, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field. *J Control Release.* 2014; 195: 72–85.
138. Chaput N, Schartz NE, Andre F, et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol.* 2004; 172 (4): 2137–46.
139. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med.* 1998; 4 (5): 594–600.
140. Andre F, Chaput N, Schartz NE, et al. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 172 (4): 2126–36.
141. Gyorgy B, Hung ME, Breakefield XO, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015; 55: 439–64.
142. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther.* 2011; 19 (10): 1769–79.
143. Kramer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl.* 2007; 1 (11): 1446–1.
144. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011; 29 (4): 341–5.
145. El-Andaloussi S, Lee Y, Lakhali-Littleton S, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. *Nat Protoc.* 2012; 7 (12): 2112–26.