

# Uloga placentalnih egzosoma u reprodukciji

---

Šomen, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:790777>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-31**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ema Šomen**

# **Uloga placentalnih egzosoma u reprodukciji**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2019.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu pod vodstvom prof.dr. sc. Ljiljane Šerman i predan na ocjenu u akademskoj godini 2018/2019.

Mentorica rada: prof.dr.sc.Ljiljana Šerman

## Popis kratica:

ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dsRNA	dvolančana ribonukleinska kiselina (engl. double-stranded RNA)
ESCRT	kompleks citosolnih proteina (engl. endosomal sorting complex required for transport)
EV	izvanstanične ili ekstracelularne vezikule (engl. extracellular vesicles)
FasL	Fas ligand
GIST	gastrointestinalni stromalni tumor
GTP	gvanozin trifosfat
hnRNPA2B1	heterogeni nuklearni ribonukleoprotein 2B1
IgG	imunoglobulin G
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
JAK3	Janus kinaze 3
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
MVB	multivezikularno tijelo
NK	prirodnoubilačke stanice (engl. natural killer)
PE	preeklampsija
PLAP	placentalna alkalna fosfataza (engl. placental alkaline phosphatase)
RNA	ribonukleinska kiselina
SEC	kromatografija isključenjem po veličini/gel-propusna kromatografija (engl. size exclusion chromatography)

## Sadržaj:

Sažetak .....	5
Summary .....	6
UVOD: .....	1
EKSTRACELULARNE VEZIKULE .....	1
Apoptotska tjelešca .....	3
Mikrovezikule.....	6
Onkosomi .....	8
Egzosomi .....	10
PLACENTALNI EGZOSOMI I NJIHOVA ULOGA U REPRODUKCIJI.....	15
Fiziološka gestacija.....	17
Placentalni egzosomi i imunološki sustav trudnica .....	19
Placentalni egzosomi kao potencijalni biomarkeri preeklampsije .....	19
Placentalni egzosomi i gestacijski dijabetes .....	21
Prijevremeni porođaj .....	22
Egzosomi u amnionskoj tekućini.....	25
PREDNOSTI I MANE KORIŠTENJA OVE TEHNOLOGIJE U SUVREMENOJ MEDICINI .....	25
ZAKLJUČAK .....	27
ZAHVALE :.....	28
LITERATURA: .....	30
ŽIVOTOPIS: .....	46

## **Sažetak**

Uloga placentalnih egzosoma u reprodukciji

EMA ŠOMEN

Ljudski organizam je izgrađen od mnoštva stanica koje moraju međusobno pravilno komunicirati. Pored danas dobro poznatih mehanizama komunikacije, znanstvenici su odnedavno otkrili i četvrti mehanizam koji se odvija putem ekstracelularnih vezikula. Pretpostavlja se da ih izlučuje većina naših stanica, koje pritom prenose različiti sadržaj poput proteina i nukleinskih kiselina. Egzosomi predstavljaju posebnu skupinu ekstracelularnih vezikula, a od ostalih se razlikuju svojom veličinom i mehanizmom nastanka. Potječu iz endosomalnog odjeljka stanice i odražavaju njene unutarnje procese. Nedavno je, također, otkriveno da stanice sinciciotrofoblasta sintetiziraju egzosome koji pritom mogu poslužiti kao biomarkeri različitih fizioloških i patoloških stanja. Placentalni egzosomi imaju imunosupresivno djelovanje, prenose mnoge važne proteine, DNA i RNA molekule te mogu značajno utjecati na tijek trudnoće i preživljenje fetusa. Cilj ovog rada je omogućiti pregled trenutnog znanja o ekstracelularnim vezikulama s posebnim osvrtom na placentalne egzosome i njihovu ulogu u gestaciji.

Ključne riječi: ekstracelularne vezikule, apoptotička tjelešca, mikrovezikule, onkosomi, egzosomi, placentalni egzosomi, trudnoća

## **Summary**

### The Role of Placental Exosomes in Reproduction

Ema Šomen

Human organism is built from many cells that need to communicate properly among them. In addition to today's well-known cell-to-cell communication mechanisms, scientists have recently discovered the fourth mechanism that takes place through extracellular vesicles. It is presumed that most of our cells are excreted, transferring different contents such as proteins and nucleic acids. Exosomes are a special group of extracellular vesicles, and the rest are different in their size and mechanism of origin. They originate from the endosomal cell compartment and reflect its internal processes. Recently, it has also been discovered that exosome are synthesized by syncytiotrophoblast cells and that they can serve as biomarkers of various physiological and pathological states. Placental exosomes have immunosuppressive activity, transmit many important proteins, DNA and RNA molecules and can significantly affect the course of pregnancy and fetal survival. The aim of this paper is to provide an overview of current knowledge on extracellular vesicles with special emphasis on placental exosome and their role in gestation.

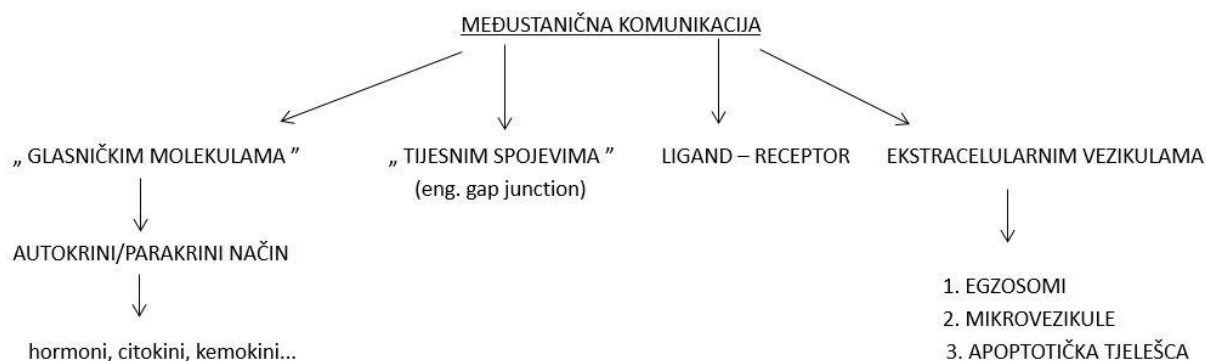
**Keywords:** extracellular vesicles, apoptotic bodies, microvesicles, oncosomes, exosomes, placental exosomes, gestation

## UVOD:

### EKSTRACELULARNE VEZIKULE

Stanična teorija po kojoj je svaki organizam izgrađen od jedne ili više stanica, utemeljena je još davne 1839. godine, a prvi su je predložili botaničar M. J. Schleiden i zoolog T. Schwann. Stanica kao osnovna građevna jedinica života mjesto je gdje se odvijaju brojne životne funkcije (1). Čovjek, kao višestanično biće, izgrađen je od više bilijuna stanica, a za njihovo pravilno funkcioniranje važna je komunikacija između istih.

Do danas su poznati različiti mehanizmi pomoću kojih se odvija međustanična komunikacija, a sažeto su prikazani na Slici 1.



#### Slika 1. Četiri tipa međustanične komunikacije

Posebnu pažnju i interes među znanstvenicima budi komunikacija između stanica putem ekstracelularnih vezikula (EV). Iako je već dugo poznato da stanice otpuštaju vezikule tijekom apoptoze, trebalo je dosta vremena za razumijevanje njihove uloge. Ekstracelularne vezikule važan su način komunikacije i među zdravim stanicama(2). Unatoč prvotnom mišljenju da EV prenose samo odbačeni stanični sadržaj, danas znamo da transportiraju aktivne molekule čiji učinak ovisi o stanicama na koje djeluju, a tu svoju ulogu ostvaruju kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima. Između ostalog, tvrdnju o važnosti informacija koje prenose potvrđuje i nalaz RNA u vezikulama. Osim mRNA, pronađene su brojne male nekodirajuće RNA, kao i DNA molekule. Sadržaj ekstracelularnih vezikula vrlo je kompleksan i raznolik, sastavljen, osim navedenog, i od jedinstvenih lipida, stotina do tisuća proteina koji su uočeni



unutar vezikula, ali i na njihovoj površini pa bi mogli služiti kao biomarkeri stanica koje iz stvaraju(3)(4)(5).

Spomenuta vrsta komunikacije među stanicama odvija se uglavnom na kraćoj udaljenosti, no mogu prenositi informacije i do udaljenijih stanica u organizmu(3). Zbog svega navedenoga neupitna je važnost ove relativno nove teme koju su prepoznali brojni znanstvenici. Dijelovi mozaika tek se slažu i još su uvijek postoji niz nepoznanica, no unatoč tome puno toga smo već otkrili o komunikaciji ekstracelularnim vezikulama.

Vezikule koje su bile i prije zamijećene u međustaničnom prostoru promatranom elektronskim mikroskopom, dugo su se smatrale nevažnim, inertnim dijelovima staničnog debrisa. Istina je da se te iste vezikule razlikuju po veličini, morfologiji, sastavu, nastanku i djelovanju(4). Ekstracelularne vezikule obložene su staničnom membranom, a nastaju odvajanjem/pupanjem plazmatske (6). Razlikujemo subpopulacije ekstracelularnih vezikula koje možemo podijeliti na nekoliko načina. Prema veličini dijelimo ih na velike, promjera 0.1-2  $\mu\text{m}$ , i male vezikule promjera od 30 do 100 nm(4). Ovisno o podrijetlu dijelimo ih u četiri glavne skupine. Apoptotska tjelešca ili apoptotski mjehurići nastaju tijekom programirane stanične smrti, fragmentiranjem jezgre na manje dijelove, od kojih je svaki okružen dijelom stanične membrane(7). Prema veličini ih ubrajamo u velike vezikule. Vrlo sličnim mehanizmom nastanka, invaginacijom stanične membrane ovog puta živuće stanice, nastaju mikrovezikule. Neki ih nazivaju još mikročestice ili ektosomi. Posljednji u skupini po veličini velikih vezikula su onkosomi, koji nastaju „pupanjem“ stanične membrane tumorskih stanica(8). Niti jedan od navedenih mehanizama nastanka nije u potpunosti razjašnjen, unatoč činjenici da se posljednje desetljeće intenzivno istražuju. Sadržaj navedenih vezikula razlikuje se ovisno o stanici od koje potječu, što ujedno i određuje njihovu funkciju, dok u građi membrane dolazi do remodeliranja, o čemu će više biti riječ kasnije u tekstu(9).

Ekstracelularne vezikule promjera manjeg od 100 nm nazivamo egzosomi. One predstavljaju male vezikule te ih karakterizira izuzetna stabilnost i veća homogenost u veličini i biološkom sastavu. Smatramo ih posebno značajnima, jer mogu potjecati od velikog broja stanica te u svom sastavu sadrže proteine i mikro RNA (miRNA) specifične za stanicu od koje su nastale. Navedeno nam može poslužiti kao vrijedna informacija o izvornoj stanici, svojevrsan prozor u prikaz njezina stanja, poput metaboličkog statusa (5). Njihov mehanizam nastanka razlikuje se od dosad navedenih

vezikula. Egzosomi su dio endomembranskog sustava, te nastaju kao krajnji proizvod endosomalnog puta iako taj mehanizam nije do kraja razjašnjen. Razlog tome je što trenutno ne poznajemo dovoljno osjetljivu i specifičnu metodu kojom bi mogli razlikovati navedene vezikule, kao i jasno definirati kriterije koji bi ih svrstavali u navedene skupine. Za sada je i dalje zlatni standard za njihovu izolaciju ultracentrifugiranje, iako se nastoje razviti nove ili modificirati postojeće metode(10)(2). Primjer toga je tehnologija protočne citometrije u detekciji ciljanih miRNA molekula(2). Sažeti prikaz podijele i pojedinih karakteristika ekstracelularnih vezikula prikazan je u Tablici 1.

Ekstracelularne vezikule pronađene su ne samo u krvi, već i u brojnim drugim tjelesnim tekućinama poput urina, sinovijalne tekućine, amnijske tekućine, majčinog mlijeka, sline, sjemene tekućine te im se koncentracija mijenja u raznim patološkim stanjima (11). Odlikuju se stabilnošću prvenstveno zbog lipidnog dijela svoje membrane koji je obogaćen kolesterolom, sfingomijelinom, aneksinom, fosfatidilserinom i glikosfingolipidima(12). Ovakav sastav im omogućava prolaz kroz razne tkivne barijere pa čak i kroz krvno-moždanu iako nam sam mehanizam tog prolaska do danas nije poznat.(13)

Mogućnost prijenosa važnih informacija do ciljnih stanica i djelovanje na iste, prolazak kroz razne tkivne barijere, prisutnost u raznim tjelesnim tekućinama i ostale navedene karakteristike ekstracelularnih vezikula, svrstava ih među potencijalno važne biološke markere kako za razvoj dijagnostičkih tako i terapijskih metoda u kojima bi one imale središnju ulogu.

### **Apoptotska tjelešca**

Apoptozu su prvi puta opisali znanstvenici Kerr, Wyllie i Currie 1972. godine (7). Definiramo je kao programiranu smrt stanice, koja aktivacijom vlastitih proteina i enzima dovodi do svog samouništenja. Važna je u brojnim fiziološkim i patološkim procesima, te nezaobilazan čimbenik u normalnom životnom ciklusu organizma. Apoptozom se nastoje odstraniti sve oštećene stanice, te se smatra da poremećaji u apoptotskim putevima imaju važnu ulogu u patogenezi mnogih bolesti, između ostalog i malignih, čija je glavna karakteristika preživljenje stanica s oštećenom DNA. (14)

U procesu apoptoze dolazi do kondenzacije kromatina i fragmentacije DNA, a potom do fragmentiranja stanice tijekom čega nastaje mnoštvo manjih dijelova koje nazivamo apoptotska tjelešca. Važno je naglasiti da apoptotska tjelešca nastaju

isključivo procesom apoptoze umiruće stanice, što ih razlikuje od ostalih ekstracelularnih vezikula te su bez obzira na to obavijeni funkcionalnom, polupropusnom staničnom membranom. Govoreći o njima kao o ekstracelularnim vezikulama, ne možemo zanemariti njihovu ulogu u međustaničnoj komunikaciji što je važna karakteristika i jedan od razloga zašto se apoptoza odvija bez razvoja upale. Vezikule prenose molekularne signale do fagocita kako bi ih oni lakše pronašli i uklonili, vodeći brigu tako i o brzini vlastite eliminacije(15)(16). Među najbolje opisanima je nekoliko promjena koje se događaju na membrani apoptotskih vezikula. Dolazi do translokacije fosfatidilserina u vanjski sloj lipidnog dvosloja i njegova vezanja za aneksin V, kojega prepoznaju fagociti(17). Sljedeći dobro opisani proces uključuje oksidaciju površinskih molekula i vezanje trombospondina ili komplementarnog C3b proteina koje potom prepoznaju fagociti. Iz navedenoga je jasno zašto aneksin, trombospondin i C3b protein služe kao markeri apoptotskih tjelešaca. Uklanjanje apoptotskih tjelešaca događa se uglavnom lokalno, u blizini gdje se i nalazila izvorna stanica, ali mogući je i dalji prijenos genetičkih informacija njihovim unosom u stanice(18). Dodano objašnjenje izostanaka upalnog odgovora na apoptozu leži u činjenici kako te stanice ne izlučuju upalne medijatore (7).

Apoptotska tjelešca, za razliku od ostalih ekstracelularnih vezikula, mogu međusobno najviše varirati u promjeru. Tako mogu biti manji od egzosoma, veličine svega 50 nm, ili doseći promjere od 5000 nm(15)(16). Razlog tome mogao bi biti u činjenici kako je proces fragmentacije stanice djelomično posljedica interakcija aktina i miozina koje dovode do povišenja hidrostatskog tlaka te posljedično stvaranja različitih fragmenata stanice(19). Ove varijacije u veličini stvaraju poteškoće u detekciji i njihovom razlikovanju od ostalih ekstracelularnih vezikula. Ono što je specifično za apoptotska tjelešca je njihov sadržaj. Kako dolazi do pupanja stanične membrane i fragmentiranja stanice, tako se vezikule međusobno razlikuju ne samo po veličini, već i u sadržaju, ovisno iz kojeg dijela stanice nastaju. Zbog toga razlikujemo dvije vrste apoptotskih tjelešaca. Vezikule koje u svom sastavu sadrže dio jezgre zovemo jezgrine apoptotske vezikule ili „DNA noseće vezikule“, budući da se molekula DNA u procesu apoptoze lomi na manje fragmente veličine nukleosoma. Vezikule sastavljene samo od citoplazmatske komponente, nazivaju se citoplazmatske vezikule. Nabrojene činjenice iznimno su nam važne pri detekciji i diferencijaciji različitih ekstracelularnih vezikula jer će se ove dvije vrste vezikula razlikovati i u specifičnim markerima, ovisno o tome imaju li više izražene citoplazmatske ili nuklearne proteine.(20)

Tablica 1. Podjela i pojedine karakteristike ekstracelularnih vezikula

Karakteristike ↳	Podrijetlo (nastanak)	Mehanizam nastanka	Veličina	Gustoća (* u saharози)	Specifični markeri (svaki od vezikula sadrži još specifičnih markera, ovisno i o stanici od koje potječu)
EVs ↓					
Apoptotska tjelešca	Fragmenti umiruće stanice (15)(7)	Fragmentiranjem jezgre okružene citoplazmom i staničnom membranom; pod djelovanjem endonukleaze (15)(7)	50-5000 nm („velike vezikule“) – najveće varijacije u veličini u odnosu na druge vezikule; (15)(10)(21)	1.16- 1.28 g/ml (4)	Histoni, DNA, C3b, TSP (trombospondin), Annexin V (4)(2)(16)(5)
Mikrovezikule	Plazmatska membrana (22)	Izvrtnjem stanične membrane nastaje vezikula koja se otpušta direktno u ekstracelularni prostor; (16)(22)	50-1000 nm („velike vezikule“) (4)(22)(21)	Nije utvrđena (4)	actinin-4, mitofilin, ARF6, VCAMP3, CD40, metaloproteinaze, integrini; (4)(16)(22)
Onkosomi	Plazmatska membrana (10)	Izvrtnjem stanične membrane nastaje vezikula koja se otpušta direktno u ekstracelularni prostor; (10)(23)	100-1000 nm („velike vezikule“) (10)(23)	Nije utvrđena (4)	actinin-4, citokeratin18, HSAP5(heat shock70kDa protein5),GAPH (gliceraldehid-3- fosfat- dehidrogenaza); (23)
Egzosomi	Plazmatska membrana + Dijelovi citosola(MVB) (krajnji produkti endosomalnog puta); (4)	Spajanjem kasnog multivezikularnog endosoma s plazmatskom membranom i njihovo otpuštanje u ekstracelularni prostor ; (4)(16)(24)	30-100 nm („male vezikule“) (4)(21)	1.13- 1.19g/ml (4)(25)	syntenin-1, EHD4, annexin XI and ADAM10, CD9, CD63, CD81,TSG101; (4)(25)(5)

## Mikrovezikule

Davno prije njihova otkrića, znanstvenici su elektronskim mikroskopom vidjeli diskretne vezikule u ekstracelularnom prostoru koje su smatrali artefaktima ili ostatcima koji nastaju uslijed nekroze susjednih stanica(26). Povodeći se stvorenom dogmom, a i nedostatkom ostalih tehnika, ta svoja zapažanja su zanemarili. S obzirom na to da se radi o relativno novom području ni terminologija nije u potpunosti razjašnjena, pa se tako nazivlje razlikuje od autora do autora. Neki pod nazivom mikrovezikule smatraju zbirni naziv za mješovite vezikule nastale odvajanjem od stanične membrane, ali i egzosome. U ovom tekstu naziv mikrovezikule ili ektosomi kako ih se još naziva, odnosit će se isključivo na vezikule nastale direktnim odvajanjem stanične membrane gotovo svih stanica, izuzimajući onkosome koje ću posebno opisati.

Mikrovezikule nastaju pupanjem stanične membrane i pritom dolazi do selekcije specifičnih proteina i molekula koje ulaze u sastav vezikula. Biogeneza uključuje lateralnu i vertikalnu redistribuciju stanične membrane koja je potaknuta kontrakcijama citoskeleta(10). Važan signal je translokacija fosfatidilserina u vanjski sloj lipidnog dvosloja pomoću enzima aminofosfolipid - translokaze koja omogućuje promjene u sastavu lipidnog dvosloja(27). Ova promjena pokreće *pupanje* mikrovezikula, koje nastaju kontrakcijom citoskeletnih struktura, točnije aktina i miozina. Formiranje mikrovezikula omogućuje nekoliko GTPaza poput ADP-ribolizacijskog faktora 6 i GTP-vezujućeg proteina. Potonji, u aktivnom stanju, potiče signalnu kaskadu započetu aktivacijom fosfolipaze D, a završenu fosforilacijom i aktivacijom lakih lanaca miozina i konačno nastajanjem vezikula(28). Za odvajanje vezikula potrebni su kontraktilni proteini, koji nakratko spajaju pukotine membrane matične stanice što nastaju kao posljedica pupanja vezikula. Naravno, postavlja se pitanje kako stanica kompenzira ovaj kontinuirani gubitak dijelova stanične membrane koji obavijaju nastajajuće vezikule. Iako ovo nije problem u metabolički manje aktivnim stanicama, sintetički produktivnije stanice moraju ipak aktivirati mašineriju citosolnih proteina koja mora nadoknaditi ovaj nesrazmjer. Stoga kod njih dolazi do egzocitoze nesekretornih vezikula koja kompenzira ovaj gubitak membrane. Zanimljivo je kako se, neovisno o vrsti stimulacije, prva generacija novostvorenih mikrovezikula pojavljuje tek nakon nekoliko desetaka sekundi do 2 minute. Ova odgoda je duža od drugih odgovora stanice posredovanih egzocitozom. Pojavu dijelom

možemo objasniti hipotezom da se egzocitoza nesekretornih vezikula događa prije pupanja mikrovezikula što nije još u potpunosti dokazano. (22)

Sortiranje sadržaja vezikula uočeno je i dokazano metodom imunohistokemije, no sam mehanizam nam nije u potpunosti jasan. Smatra se da kolesterolom bogate mikrodomene stanične membrane imaju važnu ulogu u nastajanju vezikula(29)(30). Isto se pokazalo i kod formiranja egzosoma, a još važnijim kod formiranja onkosoma (11)(20).

Nekoliko GTP-aza smatramo važnim za formiranje vezikula i selekciju molekula koje ulaze u njihov sastav poput ADP-ribolizacijskih faktora(31), Rho(28) i Rab(32). Vezikule u svom sastavu, između ostalog, sadrže mRNA, nekodirajuću RNA, mikro-RNA (miRNA), MHC I (glavni sustav tkivne snošljivosti I), topive proteine, membranske integrine i citosolne proteine. (33). Veziklopedija, baza podataka o ekstracelularnim vezikulama, kao najzastupljenije proteine navodi one uključene u međustaničnu komunikaciju, transdukciju signala, regulaciju metabolizma nukleinskih kiselina, aktere raznih metaboličkih i energetskih procesa, kao i transportu(34)(21). Razlike u sadržaju vezikula ovise o stanici porijekla pa je logično da se njihov sadržaj također međusobno razlikuje. Budući da dolazi do remodeliranja membranskog sastava, nisu svi proteini stanične membrane pronađeni i u mikrovezikulama. No, oni uključeni u sastav, a specifični za određenu stanicu nam omogućuju identifikaciju izvorne stanice.(35) Sadržaj vezikula kao i njihova funkcija su vrlo kompleksni, a važnu ulogu imaju ne samo u međustaničnoj komunikaciji već i u aktivaciji raznih molekula, kao i upravljanju, odnosno koordiniranju raznih kompleksnih procesa. Primjer za navedeno je interakcija između astrocita i mikroglije, gdje vezikule dostavljaju transmembranski signal za aktivaciju membranskih receptora, dok u procesima koagulacije i upalnim procesima imaju ulogu ne samo kao glasničke molekule, već i važne platforme za koordinaciju ovih složenih procesa.(36)(29) Uloga mikrovezikula najbolje je opisana upravo u upalnim procesima, gdje je njihov utjecaj ovisan o fazi upalne reakcije u trenutku njihova pojavljivanja, i procesima koagulacije(22). S obzirom na to da mikrovezikule nastaju i pupanjem stanica koje su zahvaćena upalom, a pronalazimo ih u svim tjelesnim tekućinama, mogu nam poslužiti kao važni biomarkeri za prognozu, dijagnozu i terapiju niza patoloških stanja(28). Isto tako s obzirom na svoju građu, vezikule mogu primiti i retrogradne signale te se endocitozom spojiti sa svojom ciljnom stanicom što je važan put eliminacije

mikrovezikula iz cirkulacije(37). Spajanjem s njihovom ciljnom stanicom, vezikule mogu prenijeti važne komponente membrane poput receptora i liganada te time povećati mogućnost infekcije, primjerice HIV infekcije ili razviti rezistenciju na apoptozu(38). Čak 80% u krvi cirkulirajućih mikrovezikula potječe od trombocita i nalaze se u relativno malim koncentracijama. Pretpostavlja se da je poticaj za njihovo nastajanje aktivacija trombocita, signalizacija glikoproteina IIb/IIIa, ali i vježbanje. Donose bioaktivne medijatore poput citokina, te moduliraju djelovanje ciljne stanice. Potiču lučenje progenitornih stanica i obnovu oštećenih krvnih žila, kontrolirajući angiogenezu i upalni odgovor, a mogu imati i ulogu protuupalnih medijatora(22)(3).

Odvajanje mikrovezikula složeni je proces za koji je potrebna energija ATP-a što je dokazano aktivnošću proteina respiratornog lanca u tim stanicama(39). U fazi mirovanja, stanice konstantno otpuštaju mikrovezikule različitom brzinom, no uočeno je kako kalcijevi ioni stimuliraju stanicu na intenzivniju proizvodnju vezikula. Ioni kalcija nisu jedini poznati sekundarni glasnici, pa tako forbol esteri aktivacijom protein kinaze C također stimuliraju različite stanice. U stanicama mikroglije, makrofazima i dendritičkim stanicama snažna stimulacija postiže se aktivacijom proteina  $P_2X_7$  (engl. P2X purinoceptor 7), dok se u nekim drugim stanicama djelotvornom pokazala aktivacija  $P_2Y$  (engl. purinergic G protein-coupled receptors Y) u kombinaciji s Gq proteinima (engl. heterotrimeric G protein Gq) . (10)(3)(22)

Sve navedeno pokazuje kako je ovo još uvijek nedovoljno istraženo područje s velikim potencijalima. Vođeni dosadašnjim spoznajama, vjerujemo da će daljnja istraživanja mikrovezikula dovesti do velikog kako dijagnostičkog tako i terapijskog napretka.

### **Onkosomi**

S obzirom na činjenicu da im je promjer 1-10  $\mu\text{m}$ , onkosome svrstavamo u velike ekstracelularne vezikule(10)(4). Nastaju istim mehanizmom kao i mikrovezikule, ali u ovom slučaju odvajanjem od stanične membrane tumorskih stanica. Već spomenute mikrodomene stanične membrane bogate kolesterolom smatraju se iznimno važnim kod nastanka onkosoma, što je i potvrđeno njihovim inhibiranjem(23). Primijećeno je kako tumorske stanice mogu ispuštati i vezikule manjih dimenzija, koje bi odgovarale egzozomima(40). Iako postoje brojna istraživanja kojima se nastoje identificirati proteini specifični za određenu vrstu vezikula, njihov sastav kao i građa

još uvijek su nam nedovoljno poznati. Ono što se, zasada, zna je da su proteini u vezikulama nano veličina više zaduženi za adheziju, mobilnost i odgovore na hipoksiju, dok se u vezikulama većih dimenzija nalaze proteini zaduženi za metabolizam. I jedna i druga vrsta vezikula igraju važnu ulogu u rastu i širenju tumora, a njihove funkcije se najviše razlikuju ovisno o sadržaju i stanici iz koje potječu(23). Zanimljiv primjer je pojava vezikula iz tumorskih stanica gastrointestinalnog stromalnog tumora (GIST) gdje su otkrivene vezikule koje u svom sastavu sadrže onkosomalni protein tirozin kinazu. Upravo se ona smatra ključnom za širenje tumora u intersticijalnu stromu. Također valja naglasiti kako je analizom mikrovezikula GIST-a zamijećen i njihov kapacitet transformacije muskularnih stanica(41).

U okruženju tumorskih masa nalaze se brojne vezikule, iako nisu sve nužno onkosomi, već neke nastaju od neutrofila i makrofaga u blizini. No, one iz tumorskih stanica potiču rast tumorskih masa raznim procesima (22). Akumulacijom lijekova u membrani smanjuju njihovu koncentraciju i omogućavaju rezistenciju malignih stanica na lijekove koji bi inače djelovali antineoplastično. Također, onkosomi mogu djelovati na aktivirane limfocite potičući Fas-ovisnu apoptozu. Mikrovezikule nastale odvajanjem od tumorskih stanica obogaćene su metaloproteinazama i ostalim proteolitičkim enzimima koji svojom funkcijom u razgradnji ekstracelularnog matriksa potiču upalu i pokretljivost tumorskih stanica olakšavajući invaziju u tkivo, ulazak u cirkulaciju i metastaziranje(42). Proteolitički enzimi razgradnjom matriksa potiču i angiogenezu što je iznimno važno za rast i metastaziranje tumorske mase, ali i za preživljavanje malignih stanica. Pojačanu vaskularizaciju postižu stimuliranjem endotelnih stanica na ispuštanje vezikula koje u svom sastavu sadrže VEGF (engl. vascular endothelial growth factor ), ali i metaloproteinaze koje pomažu u degradaciji matriksa i širenju malignih stanica(22). Onkosomi se nalaze u različitim tjelesnim tekućinama i relativno su stabilni pa mogu poslužiti ne samo kao važni biomarkeri već i mete za terapijske postupke(10). U slini ljudi oboljelih od karcinoma pluća uočena je pojava onkosoma pa bi oni mogli poslužiti kao neinvazivni dijagnostički markeri u detekciji karcinoma(10)(43)(40). Slično nalaz imaju oboljeli od karcinoma prostate kod kojih je uočena korelacija sa stadijem bolesti, no za bolje razumijevanje i sigurnije zaključke moramo još mnogo toga istražiti (10).



## Egzosomi

Egzosomi čine posebnu skupinu mikrovezikula koje se od ostalih nabrojanih razlikuju kako veličinom tako i mehanizmom nastanka. To su male, nano-vezikule, promjera do 100 nm. Prvi puta su otkrivene prije nekoliko desetaka godina, proučavanjem procesa maturacije retikulocita(44). Uočeno je, točnije dr. Rose Johnstone je uočila da retikulociti u svojoj citoplazmi sadrže mnoštvo relativno podjednako velikih, membranom okruženih vezikula. Daljnjim proučavanjem dr. Johnstone uočava receptore za transferin putem kojih taj protein ulazi u vezikule te stvaranjem protutijela na iste, proučava sudbinu navedenih vezikula. Zaključuje da se najveće vezikule spajaju s membranom stanice i izbacuju svoj sadržaj u izvanstanični prostor. Proces nalikuje endocitozi, ali u suprotnom smjeru pa su nazvane egzosomi(45). Unatoč ranom otkriću, tek nedavno su shvaćene u kontekstu četvrtog mehanizma komunikacije među stanicama te je uočen njihov veliki potencijal i započeto intenzivnije istraživanje.

Egzosomi se izdvajaju od ostalih mikrovezikula po svojim specifičnim značajkama. Međusobno različiti veličinom, no vrlo homogeni oblikom koji se opisuje kao „*cup-shaped* oblik“, ove vezikule nastaju u kasnom endosomu koji se spoji sa staničnom membranom i aktivno secernira u izvanstanični prostor. Tako formirane vezikule sadrže površinske membranske proteine i molekule, ali i komponente citosola. (4)

Nakon početne invaginacije plazmatske membrane slijedi uobičajeni endosomalni put i nastaje rani, a onda i kasni endosom. Na razini multivezikularnog tjelešca (MVB) i proteina koji su sortirani, odlučuje se koje će vezikule biti aktivno izlučene u ekstracelularni prostor kao egzosomi, a koje će biti degradirane tako što će se MVB spojiti s lizosomom i postati autofagosomi dok se kao treća mogućnost izdvaja recikliranje uz povratak proteina na površinu stanice (16)(43). Sudbina vezikula nije dovoljno istražena i za sada postoje samo pretpostavke o tome koje će vezikule nastaviti put i biti izlučene, a koje će biti razgrađene. Jedna od teorija povezuje sudbinu vezikule i količinu kolesterola u njejoj membrani. One vezikule s više kolesterola se izlučuju iz stanice, dok one s manjim udjelom kolesterola u membrani se razgrađuju. Raspravlja se i o ulozi p75 receptora budući da MVB koja ga imaju u svojoj membrani mogu izbjeći degradaciju. Spekulira se o još nekoliko načina i molekula, ali još uvijek je nejasno utječe li to zaista na biogenezu, promet i sudbinu vezikula(46). Neka istraživanja navode kako je izlučivanje egzosoma svojevrsna

reakcija stanice na intracelularni stres. Na takav zaključak ih je navelo pojačano izlučivanje egzosoma u stanju hipoksije(47), zračenju stanica(48) ili liječenju s cisplatinom(49). Moguće da se tako stanica rješava nepotrebnog sadržaja ili ukazuje na intracelularni stres. Također je zabilježeno da povećana degradacija vezikula, smanjuje količinu izlučenih egzosoma(50). I sami lizosomi mogu izbacivati svoj sadržaj procesom lizosomalne egzocitoze. Ukoliko njihov sadržaj nije do kraja degradiran, a u svom sastavu sadrži intraluminalne vezikule, one će se izlučiti u ekstracelularni prostor kao egzosomi.(51) Za vjerovati je da u trenucima kada stanica više ne može degradirati sadržaj putem lizosoma, bilo zbog lizosomalnog defekta, prevelike opterećenosti ili interferencije s nekim drugim procesima, izlučivanje MVB-a i lizosomalna egzocitoza mogu biti alternativni putevi za preživljenje stanice. Naravno, egzosomi su uključeni u značajno više procesa od samog preživljenja stanice.

Cijeli proces nastanka i sortiranja proteina u sastav vezikula vrlo je složen i još uvijek nedovoljno razjašnjen, a uključuje brojne molekule. Najbolje istražen kompleks uključen u biogenezu egzosoma je ESCRT. Skraćenica je akronim od engleskog naziva *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*. Kompleks se sastoji od 4 multiproteinska kompleksa nazvanih ESCRT 0, ESCRT I, II, III i važan je za invaginaciju membrane i formiranje intraluminalnih vezikula, njihov transport kao i za sortiranje proteina koji će ući u njihov sastav (52). Ako ovaj sustav zakaže, aktiviraju se o ESCRT-neovisni mehanizmi(53). Jedan od njih uključuje *tetraspanine* sastavljene od 4 transmembranska proteina složena u karakterističnu strukturu neophodnu za njihovo djelovanje u nastanku intraluminalnih vezikula te selekciji proteina koji ulaze u njihov sastav(54). Posebno važni za formiranje egzosoma su *tetraspanini* CD9 i CD63 te bi se zbog svoje učestalosti u membrani egzosoma mogli koristiti kao biljezi u njihovoj izolaciji, makar trenutno ne postoji dovoljno dokaza koji bi potvrdili njihovu specifičnost. Također, CD63 membranski marker se može pojaviti i u mnogim drugim procesima poput u neutrofila u apoptozi, trombocita, T limfocitima, bazofilima (24). Tetraspanin 8 (Tspan8) se, također, smatra važnim u biogenezi egzosoma(55). Proučavan je u stanicama adenokarcinoma štakora i uočeno je da ne djeluje toliko na učestalost i ukupnu količinu izlučenih egzosoma koliko na njihov sastav poput u mRNA i proteina(56). Rab GTP-aze pripadaju velikoj obitelji visoko konzerviranih proteina od 60 članova, a posljednjih godina otkriveno je da reguliraju promet

vezikula u eukariota. Nakon endocitoze, u Rab5 pozitivnim endosomima dolazi do sortiranja sadržaja vezikula, te se nastavlja put ka recikliranju, spajanju s plazmatskom membranom, odnosno izbacivanju sadržaja u obliku egzosoma. Sadržaj vezikula može biti recikliran sporim (Rab25, Rab11a, Rab11b)(57) ili brzim (Rab4, Rab35) procesom reciklaže(58). Suprotno navedenom, endosomi koji sadrže Rab7 proteine, te su se prije toga procesom „maturacije endosoma“ oslobodili Rab5 GTP-aze, sortiraju proteine u intracelularne vezikule, podižu pH vrijednost svoje mikrookoline i unose hidrolitičke proteaze, koje mogu razgraditi njihov sadržaj. Također, ako Rab7 pozitivni endosom sadrži protein Rab 27a/b, fuzionira se s membranom i otpušta vezikule u ekstracelularni prostor. Ovisno o tipu stanice, svi Rab11, Rab27, Rab35, Rab5, i Rab7 su bili uključeni u otpuštanje vezikula, dok je izraženija ekspresija Rab5 kočila proces maturacije endosoma. Potonje se moglo spriječiti povećanom ekspresijom proteina Rab7 (46). Iz svega navedenog zaključujemo da su Rab proteini važni u procesu nastajanja egzosoma i da promjenom njihove ekspresije, možemo utjecati na sudbinu vezikula.

Samo sortiranje proteina koji ulaze u sastav prvo intraluminalnih vezikula, a potom i egzosoma, baš kao i biogeneza vezikula, još uvijek nisu dovoljno dobro razjašnjeni, Ova problematika se intenzivno istražuje te je predloženo je nekoliko teorija, no pravi odgovor još uvijek ne znamo pa je moguće da se radi o kombinaciji procesa.

Sadržaj proteina najviše ovisi o stanici podrijetla, a uočeno je da postoje određene pravilnosti u učestalosti pojavljivanja nekih molekula. Egzosomi su općenito bogati fuzijskim i ciljnim proteinima (eng.targeting proteins), poput integrina, tetraspanina, laktadherina, zatim citoplazmatskim enzimima (peroksidaze, piruvat kinaze i laktat dehidrogenaze), citoskeletnim proteinima (tubulin, aktin), kao i proteinima uključenim u stvaranje multivezikularnih tjelešaca (ALIX, TSG101, klatrin). Također, u njima nalazimo proteine uključene utransdukciju signala kao i transportne transmembranske proteine poput proteina obitelji Rab, ARF GTPaza (engl. ADP-ribosylation factor GTPases), i aneksina(59). Donedavno se nije previše znalo ni o mehanizmima po kojima su RNA molekule sortirane u egzosome no zahvaljujućim brojnim istraživanjima danas o tome više znamo. Uočeno je da određene sekvence poput sekvence GGAG prisutne u miRNA, omogućavaju sortiranje miRNA u sastav egzosoma i utječu na njenu lokalizaciju u egzosomu(60). Detaljnije opisano, heterogeni nuklearni ribonukleoprotein A2B1 (hnRNP A2B1) prepoznaje i veže se za

sekvencu GGAG i kontrolira unos miRNA u egzosom. Egzosomalna hnRNPA2B1 je SUMO-lizirana, što se smatra presudnim jer kontrolira vezanje za GGAG sekvencu (61). SUMO-lizacija je posttranslacijski proces analogan ubikvitinaciji u pogledu samog procesa i vrste enzima uključenih u proces, no umjesto ubikvitina, u ovaj proces su uključene SUMO molekule (eng. small ubiquitin-like modifiers). Proces može utjecati na strukturu proteina i njegovu subcelularnu lokalizaciju (62). U mnogim radovima se spominju i brojni drugi procesi uključeni u sortiranje RNA molekula. Između ostalog, geni *KRAS* (eng. Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) mogu biti uključeni u sortiranje sadržaja vezikula, što se zaključilo proučavajući vezikule stanica kolorektalnog karcinoma s mutacijom gena *KRAS*. (63). Također, i sama egzosomalna mRNA mogla bi igrati ulogu u sortiranju mRNA molekula u vezikule, jer je uočeno da je egzosomalna mRNA bogata GGAG sekvencama na 3' dijelu transkripta koji se ne prevodi (eng. 3' untranslated region; 3'UTR) (64). Za sortiranje miRNA odgovornim se smatra i YBX1 (eng. Y-box protein X1), RNA-vezujuću protein Y-box protein koji se veže za miR-223 i utječe na sortiranje, ali i na sekreciju egzosoma(65).

Kao što je već i ranije navedeno, membrana egzosoma bogata je lipidima specifičnim za stanicu podrijetla, posebice kolesterolom, sfingomijelinom i glikosfingolipidima(12). Nadalje, sfingozin 1-fosfat (S1P) se pokazao kao važna lipidna domena koja regulira ulazak specifičnih proteina u vezikule. Sortiranje ostvaruju putem inhibitornih G-proteina udruženih s S1P receptorom smještenim na membrani MVB. Navedeni receptori inače su konstantno aktivni, iako sam mehanizam njihove interakcije nije do kraja razjašnjen, kao ni način djelovanja enzima kinaze koja ih kontrolira(66). Iz svega navedeno zaključujemo da su i lipidi vrlo važni za sortiranje specifičnih proteina u sastav vezikula.

Intraluminalne vezikule koje se nalaze u kasnom endosomu i čine MVB, kao što je već bilo i prikazano, mogu nastaviti put u smjeru sekrecije ili biti razgrađene. Sekrecijom u ekstracelularni prostor, intraluminalne vezikule dobivaju naziv egzosom(44). Da bi stanica secernirala vezikulu, ona se mora fuzionirati s njenom membranom kako bi mogle dospjeti u izvanstanični prostor. U ovaj složen proces uključen je niz proteina, a sami detalji i točan mehanizam nisu do kraja razjašnjeni te se logično pretpostavlja da ipak najviše ovisi o stanicama koje te egzosome secerniraju.

Transport vezikula u stanici ovisan je o interakciji citoskeletalnih proteina: mikrofilamenata aktina i mikrotubula (16). Aktin – vezujući protein, kortaktin, iznimno je važan u transportu vezikula, a snimanje i slikovni prikaz živućih stanica pokazalo je da nije važan samo u transportu već i u spajanju vezikula sa staničnom membranom(67). Također, razni proteini obitelji Rab su uključeni, ne samo u selekciju proteina, već i u transport i fuziju membrana(68). Način na koji rade nije jasan. Zanimljiva je činjenica da isti proteini u različitim stanicama imaju različitu ulogu, nekad čak i suprotnu. Primjer toga je Rab11 protein, inače prvi dokazan član obitelji Rab GTP-aza uključen u sekreciju egzosoma, koji povećava izlučivanje, konkretno u ovom pokusu, u ljudskim leukemičnim K562 stanicama(69), dok u HeLa stanicama nije uočena njegova povećana sekrecija(70). Još neki od proteina obitelji Rab GTP-aza uključeni u sekreciju egzosoma su Rab35, Rab2b, Rab5a, Rab9a, Rab27a, Rab27b, Rab7. Na sekreciju mogu utjecati na različite načine, bilo da ju potiču ili priječe, primjerice smanjenjem vezanja MVB-a za staničnu membranu(24). Moguće je da su i male GTPaze iz drugih proteinskih obitelji poput Rho/Rac uključene u proces sekrecije egzosoma(71). Važno je naglasiti da sekrecija egzosoma može biti regulirana i količinom kalcija. Povišena intracelularna koncentracija kalcija dovodi do pojačanog izlučivanja egzosoma. Također, postoje određene molekule koje djeluju kao kalcijски senzori te su uključene u vezikularnu sekreciju. Primjer toga su sinaptotagmini.(72)

Pri procesu sekrecije, točnije fuzije membrana, događaju se brojne interakcije između proteina kao i između proteina i lipida, koje stvarajući energiju potpomažu prolazak kroz barijere, ali i određuju specifičnost(24). Proteini važni za fuziju membrana su između ostalih, SNARE skupina proteina (engl. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor). Ova proteinska obitelj se dijeli na R- i Q-SNARE proteine, a za fuziju membrana potreban je jedan R- i tri Q-SNARE proteina(73). Također, i udio kolesterola u membrani vezikula igra ulogu u sekreciji, kao i prekursori lipidnih etera, koji zatim povećavaju količinu lipidnih etera u stanici i utječe na sekreciju egzosoma(24). Sve navedeno govori u prilog činjenici kako smo tek na početku otkrivanja svih mehanizama uključenih u ove složene procese.

## **PLACENTALNI EGZOSOMI I NJIHOVA ULOGA U REPRODUKCIJI**

Ekstracelularne vezikule predstavljaju vrlo važan način komunikacije među stanicama, uključene su u brojne procese, a prijenosom materijala koji sadrže u svom sastavu mogu utjecati na stanicu-primatelja te mijenjati njezinu funkciju. Početna hipoteza, kako služe isključivo za oslobađanje stanice od nepotrebnog sadržaja, danas se pokazala nepotpuna, pa znamo da su uključeni u brojne fiziološke procese poput laktacije, trudnoće i imunološkog odgovora, no važne su i u patološkim stanjima kod progradacije bolesti, posebice neurodegenerativnih bolesti i tumora(44). Prednosti prijenosa informacija putem vezikula su što je taj prijenos neovisan o direktnom kontaktu stanica, te se tako mogu slati informacije na mjesta udaljena od izvorne stanice. Nadalje, struktura proteina i njihova biološka aktivnost su očuvane, a proteini su u vezikulama koncentrirani, dijelom zbog smanjene mobilnosti(4). Iz svega navedenog jasan je veliki potencijal ekstracelularnih vezikula, posebice egzosoma koji dolaze iz endosomalnog odjeljka, u razvoju daljnje medicine, kako za dijagnostiku i otkrivanje bolesti, tako i za ciljano liječenje.

Ekstracelularne vezikule, kako je već bilo i spomenuto, pronađene su u svim tjelesnim tekućinama, a izlučuju ih razne stanice(11). Smatramo da im je jedna od najvažnijih uloga mogućnost prijenosa genetičkih informacija do ciljnih stanica i njihov snažan učinak koji mogu ostvariti na imunološki sustav, koji se između ostalog i najviše proučavao. Možemo ih podijeliti u dvije skupine ovisno o njihovom sadržaju i djelovanju jer imaju imunostimulirajući ili imunosupresivni učinak. Primjerice, egzosome smatramo nužnim u interakciji zrelih dendritičkih stanica i limfocita B čija je zadaća prezentiranje antigen MHC II kompleksa limfocitima T(59). Također, egzosomi mogu imati važnu ulogu u aktivaciji NK- stanica (eng. natural killer cells)(74). Općenito govoreći, egzosome nastale od antigen prezentirajućih stanica, kao što su dendritičke stanice, makrofazi i B stanice, smatramo imunostimulirajućima. No, zanimljiva je činjenica da egzosomi nastali od dendritičkih stanica s pojačanom ekspresijom IL-4 i IL-10 djeluju supresivno na pojavu odgođene hipersenzitivne reakcije. Također, za istu supresiju smatramo važnim i FasL prisutan na membrani egzosoma(75). Suprutno tome, egzosomi većine tumorskih stanica, kao i epitelnih stanica, imaju imunosupresivni učinak(76). Dokazano je da i placentalni egzosomi imaju imunosupresivan učinak na tijelo majke pa su vrlo važni u trudnoći(77).

Reprodukcija čovjeka područje je koje se konstantno istražuje no i dalje imamo niz pitanja na koja ne znamo odgovore. Zdrava trudnoća u ljudi traje od 37.-40. tjedna gestacije, ali poticaji nužni za završetak trudnoće i indukciju poroda nisu još uvijek dovoljno istraženi. Brojna su pitanja vezana uz trudnoću i imunološki sustav majke koji je tijekom gestacije, dijelom suprimiran.

Taylor i njegovi suradnici ostvarili su veliki napredak uočivši „fragmente placente“, kasnije nazvane egzozomi, i proučavajući njihovu ulogu u trudnoći i tijelu trudnice (78). Dokazano je da placenta, osim dosad poznatih funkcija, komunicira i s ostalim majčinim organima i tkivima putem ekstracelularnih vezikula, među kojima su najzanimljiviji egzozomi. Budući da sadržaj egzozoma odražava sastav stanice iz koje potječe služe kao dobri pokazatelji stanja izvorne stanice i nose vrijedne informacije o njoj. S obzirom na to da i placenta ispušta svoje egzozome, a mogući je izvor brojnih patologija u trudnoći, mogu nam poslužiti kao važni biomarkeri u identifikaciji različitih fizioloških, ali i patoloških stanja. Također je uočeno, da se količina ukupnih, a posebno placentalnih egzozoma, razlikuje ovisno o tome radili se o normalnoj ili patološkoj trudnoći(5).

Placentalni egzozomi nastaju istim mehanizmom nastanka kao i egzozomi svih drugih stanica(4). Potječu iz endosomalnog odjeljka stanica sinciotrofoblasta, a najveći dio današnjih spoznaja o placentalnim egzozomima saznali smo proučavajući egzozome iz periferne krvi trudnica, izolirane iz *ex vivo* placentalnih presađaka, kao i iz kultiviranih stanica trofoblasta(79). Placentalni egzozomi služe kao svojevrsan bioplat placente, donoseći informacije o stanju trofoblasta i širu sliku od klasične biopsije, a pritom se radi o neinvazivnom procesu. Najveći problem je njihova valjana izolacija. Od današnjih metoda najčešće se koristi tehnika ultracentrifuge(80). Međutim, koristeći tehniku ultracentrifugiranja egzozomi mogu biti kontaminirani drugim proteinskim agregatima ili lipoproteinima visoke gustoće koji onda mogu smanjiti uspješnost izolacije. Iz navedenog razloga, sve se češće upotrebljava kromatografija (eng. SEC – Size exclusion chromatography), no i dalje se traga za novim tehnološkim mogućnostima(81).

Karakteristika placentalnih egzozoma je prisutnost placentalnog tipa alkalne fosfataze (eng. PLAP-placental-type alkaline phosphatase) (82). Iako alkalna fosfataza nije specifična samo za placentu jer se nalazi i u ostalim tkivima, molekuli PLAP nedostaju posljednje 24 aminokiseline u odnosu na druge alkalne fosfataze, što ju čine specifičnom. Također, to joj donosi i određene karakteristike, kao što je stabilnost

(eng. heat stability), nemogućnost kemijske inaktivacije i specifičnost za supstrat(83). Dosada glavne opisane funkcije PLAP su asistiranje u transferu majčine IgG do fetusa(84), te stimulacija sinteze DNA i proliferacija stanica fibroblasta(85).

Nadalje, na placentalnim egzozomima nema MHC molekula, ali su prisutne MICA/B (engl. MHC class I chain-related proteins A and B), transkripcijski faktori RAET1/ULBP1-5 i ligandi za aktivaciju NK staničnog receptora NKG2D. Također, placentalni egzozomi sadrže FasL, koji ima proapoptičko djelovanje pa je važan za razvoj imunotolerancije, kao i TRAIL (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand) molekule. Neke od ovih molekula nalaze se na plazmatskoj membrani sinciciotrofoblasta, a neke dolaze iz intracelularnog miljea. Primjerice ULBP (engl. UL16 Binding Protein) i FasL proteini nisu prisutni na površini sinciciotrofoblasta nego samo u kasnom endosomu, što nije bio slučaj sa MICA/B molekulama koje se mogu naći i na površini i u stanici. Ovo se smatra važnim jer ekspresija na površini stanice lakše može izazvati i potaknuti imunološku reakciju pa se spomenuto može smatrati važnim mehanizmom zaštite fetusa od majčinog imunološkog sustava. Također, primijećeno je da neke molekule imaju kratak životni poluvijek na površini stanice, ali značajno duži kada se nalaze unutar egzozoma. Primjer toga su MICB molekule (engl. MHC class I polypeptide-related sequence B). Kinetikom otpuštanja i bioaktivnosti placentalnih egzozoma upravlja i kontrolira placentalni mikrookoliš (4)(86).

Jednom kada su ispušteni, egzozomi putuju do svoje ciljane stanice te ostvaruju interakciju putem receptora, fuzijom ili internalizacijom pomoću endocitoze ili makropinocitoze(87). Također, unos egzozoma može se odvijati klatrin-ovisnim ili klatrin-neovisnim putem. Do sada je prikazana klatrin-ovisna endocitoza(88), lipidnim nakupinama posredovana endocitoza(89), endocitoza posredovana heparin sulfat proteoglikanima(90) ili fagocitoza(91). Naravno, i ostali mehanizmi unosa su također mogući.

## **Fiziološka gestacija**

Smatra se kako su egzozomi iznimno važni u ranoj trudnoći budući da epiteloidni egzozomi olakšavaju komunikaciju između zametka i endometrija, a važni su i za proces implantacije. Sudjeluju u brojnim procesima ljudske reprodukcije, poput maturacije spermija i oocite, oplodnje, prevenciji polispermije, što je posljedica međustanične komunikacije koju omogućuju.(92)



U perifernoj krvi zdravih trudnica uočena je pojava placentalnih egzosoma već od 6. tjedna gestacije(93). Usporedbom koncentracije egzosoma u trudnica i žena koje nisu trudne, uočeno je da je značajno viša razina egzosoma u trudnica. Također je uočeno da je kod patoloških trudnoća razina egzosoma veća od one u fiziološkoj gestaciji, što bi moglo poslužiti kao važan prognostički i dijagnostički marker. Nadalje, proučavana je razina egzosoma u trudnica koje su imale terminski porod i onih koje su prijevremeno rodile, te je uočeno da je razina egzosoma veća kod trudnica s terminski rođenim djetetom.(4)(5) Uspoređivana je i razina egzosoma kod trudnica normalne tjelesne težine i onih s povišenom tjelesnom težinom, bez patologije trudnoće te se dokazalo da se i pri tome razlikuju razine egzosoma što se mora uzeti u obzir prilikom analize podataka. Žene s povišenom tjelesnom težinom imale su najviše razine egzosoma, ali se značajniji porast dogodio nešto kasnije u gestaciji. (94)

Placentalne egzosome najčešće identificiramo pomoću PLAP markera, placentalne alkalne fosfataze, što ukazuje na podrijetlo iz sinciotrofoblasta. Zanimljivo je da se osim količine placentalnih egzosoma, koja se povećava tijekom cijelog perioda fiziološke gestacije, a svoj najveći porast ostvaruje u prvom trimestru, povećava i razina PLAP molekula povezanih s egzosomima. Značaj porast je zamijećen od prvog do trećeg trimestra, a količina egzosomalnih PLAP molekula korelira s težinom placente u kasnijem periodu gestacije.(5) Također je zamijećeno kako se proporcija placentalnih egzosoma povećava u odnosu na neplacentalne egzosome, a taj porast se zamjećuje sredinom gestacije, oko 20. tjedna i održava do kraja trudnoće.(93)

Placentalni egzosomi prenose vrijedne informacije i imaju ulogu u međustaničnoj komunikaciji. Između ostalog, prenose i genetičke informacije. miRNA klaster gena na kromosomu 19 označava specifičnu placentalnu miRNA, koja se u egzosomu prenosi majčinom cirkulacijom, . miRNA je nekodirajuća RNA molekula koja je uključena u brojne fiziološke i patološke procese, a svoju funkciju translacijskog represora ostvaruje vezanjem za molekulu mRNA.(95) Napredovanjem trudnoće mijenja se i ekspresija miRNA , a nakon poroda, ona se polako gubi iz majčine plazme. Placentalni egzosomi predstavljaju način komunikacije sinciotrofoblasta s majčanim tkivima putem placenta specifične miRNA.(96)

Također je uočeno da egzosomi utječu na migraciju endotelnih stanica krvnih žila, što može dovesti do razvoja preeklampsije (PE)(97). Promijene u sadržaju egzosoma mogu biti važan pokazatelj placentalne disfunkcije i dobar dijagnostički marker.

Točna uloga i zadaća placentalnih egzosoma još uvijek nije do kraja razjašnjena, ali sigurno je da pružaju veliki potencijal te da su od velike dijagnostičke i prognostičke vrijednosti.

### **Placentalni egzosomi i imunološki sustav trudnica**

Placentalni egzosomi imaju veliku ulogu u međustaničnoj komunikaciji između placente i imunološkog sustava trudnice. Uključeni su u brojne procese na lokalnoj razini, ali i distalno izvan direktnog fetomaternalnog kontakta, sve u svrhu imunosupresivnog djelovanja i jačanja majčine tolerancije na fetus. Već je prije bila spomenuta proapoptotička aktivnost placentalnih egzosoma koju ostvaruju pomoću FasL i TRAIL molekula. Smatra se da, uz apoptotičku aktivnost, placentalni egzosomi utječu i na citotoksičnost i T-stanični odgovor (4).

Inkubacija T-stanica zajedno s placentalnim egzosomima rezultirala je smanjenom ekspresijom Janus kinaze 3 (JAK3) i CD3- $\zeta$ , te smanjenoj aktivaciji kaspaze 3. Ovi rezultati govore u prilog, već prije zamijećenoj i postavljenoj hipotezi o odstupanju Th2 imunološkog odgovora za vrijeme trudnoće. Navedeno djelovanje je bilo u korelaciji s ekspresijom molekula FasL i PD-L1 na egzosomima, pa je moguće da smanjenje nastaje zbog indukcije apoptoze ciljanih stanica(79). Nadalje, egzosomi koji sadrže ligande za NKG2D receptore mogu suprimirati navedene receptore na Nk-, CD8+ i  $\gamma\delta$ T stanicama ovisno o dozi. Dakle, egzosomom potaknuta internalizacija NKG2D receptora utječe na citotoksičnost, bez utjecanja na litički potencijal stanice. Za ovaj učinak najviše su zaslužne MIC molekule koje se nalaze u sastavu egzosoma. (98)

### **Placentalni egzosomi kao potencijalni biomarkeri preeklampsije**

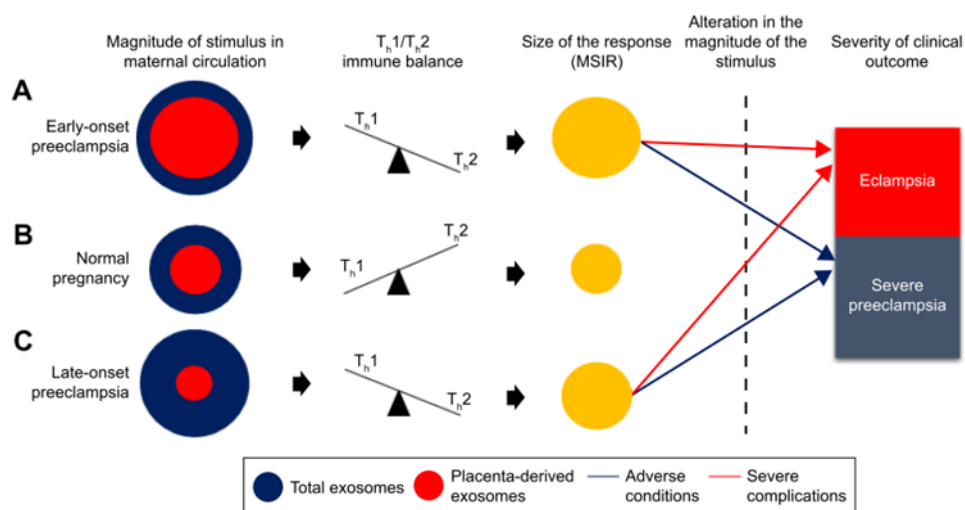
Preeklampsija (PE) je jedna od najozbiljnijih komplikacija trudnoće, posebice u trećem trimestru i čest uzrok majčine i fetalne smrti. To je sistemski, multiorganski poremećaj koji se javlja u trudnoći. Zbog multifaktorijalne etiologije, pravi razlog nastajanja i dalje je nepoznat. Danas postoje brojne teorije i hipoteze, a kao najuvrženiju smatramo onu koja navodi razlog u abnormalnoj placentaciji zbog smanjene invazije trofoblasta i neadekvatnog remodeliranja spiralnih arterija, što

dovodi do abnormalnog protoka krvi kroz posteljicu. Također, danas smo svjesni da i egzosomi imaju svoju ulogu u razvoju preeklampsije i da bi mogli biti biomarkeri za identifikaciju iste. U žena koje su razvile PE tijekom trudnoće, uočena je povišena količina ukupnih, kao i placentalnih egzosoma u odnosu na žene s fiziološkom trudnoćom.(86)

Poremećaje u povišenom krvnom tlaku trudnica klasificiramo u 4 kategorije: kronična hipertenzija (bilo kojeg uzroka), preeklampsija s eklampsijom, kronična hipertenzija koja se preklapa s preeklampsijom i gestacijska hipertenzija(99). Danas još uvijek nemamo na raspolaganju dijagnostički test koji bi na vrijeme identificirao preeklampsiju, pa se dijagnoza postavlja na temelju kliničke slike koja uključuje neobjašnjivu proteinuriju udruženu s novodijagnosticiranom hipertenzijom.

Djelovanje placentalnih egzosoma na imunološki sustav smatra se važnim za nastanak preeklampsije. Povećani oksidativni stres placente i abnormalna placentacija mogle bi biti ključne u nastanku PE, a dovode do povećanog izlučivanja placentalnih egzosoma(100). Količina ukupnih egzosoma povišena je u trudnoćama s preeklampsijom u odnosu na zdravu trudnoću. No, kod rane pojave preeklampsije visina placentalnih egzosoma je povišena u odnosu na normalnu trudnoću, što nije slučaj kod kasnog nastupa preeklampsije.(80)(101) Placentalni egzosomi mogu reagirati sa stanicama imunološkog sustava, primjerice monocitima i dovesti do povećanog lučenja proinflammatoryh citokina, što dovodi do majčine sistemne imunološke reakcije. S obzirom na navedeno, nastala je hipoteza da razlika u količini ukupnih i placentalnih egzosoma u preeklampsiji u odnosu na normalnu trudnoću kontrolira Th1/Th2 imunološke odgovore tijekom trudnoće, što je onda direktno povezano s jačinom majčine upalne reakcije. Dakle, razlika stvorenih placentalnih egzosoma u korelaciji s ukupnim egzosomima i gestacijskom dobi mogla bi biti važan i pouzdan pokazatelj razvoja preeklampsije tijekom trudnoće. Hipoteza se temelji na činjenici da se količina izlučenih placentalnih egzosoma povećava kako napreduje gestacija normalne trudnoće, što se nije pokazalo takvim u trudnica koje su razvile patologiju preeklampsije. Navedena hipoteza tek treba biti dodatno evaluirana u kliničkim uvjetima, no značila bi da u svakom trenutku trudnoće, na temelju navedene usporedbe i računic, možemo saznati stanje placente i rizik za razvoj komplikacija.(102) Također je uočeno da se sadržaj placentalnih egzosoma razlikuje ovisno o tome radi li se o normalnoj, fiziološkoj trudnoći ili trudnoći s komplikacijom

preeklampsije(5). U trudnoćama s razvijenom preeklampsijom zamijećeno je da mikrovezikule u svom sastavu sadrže više vaskularnih proteina povezanih s upalom i proliferacijom krvnih žila (103). Nadalje, zamijećeno je smanjenje ekspresije sinciciotrofoblast-specifičnog proteina 2 u egzosomima trudnica s razvijenom preeklampsijom. Navedeni je svojevrsni humani endogeni retrovirusni protein te ima važnu ulogu u razvoju placente i invaziji stanica trofoblasta.(86) Iz svega navedenoga, jasan je potencijal i mogućnost koju nam predstavljaju placentalni egzosomi u identifikaciji komplikacija u trudnoći. Također, mnogi su znanstvenici svjesni kako patofiziologija preeklampsije nastupa u ranim fazama trudnoće te bi nam placentalni egzosomi bili odlični rani pokazatelji sudbine razvoja trudnoće.



**Slika 2.** A) U ranom nastupu preeklampsije, povećana količina placentalnih egzosoma i ukupnih egzosoma dovodi do pomaka prema Th1 imunološkom odgovoru i rezultira pretjeranom imunološkom reakcijom majke B) U normalnoj trudnoći, razina ukupnih i placentalnih egzosoma je u ravnoteži što dovodi do Th2 imunološke reakcije i ravnoteže majčinog imunološkog sustava te uspješne trudnoće C) U kasnom nastupu preeklampsije povećana količina ukupnih egzosoma i smanjena količina placentalnih egzosoma u usporedbi s normalnom trudnoćom ponovno dovodi do Th1 imunološkog odgovora i sistemne imunološke reakcije majke ; Prema: Pillay P, Moodley K, Moodley J, Mackraj I. Placenta-derived exosomes: Potential biomarkers od preeclampsia. Int J Nanomedicine.(2017), str.10

## Placentalni egzosomi i gestacijski dijabetes

Gestacijski dijabetes je jedan od najčešćih metaboličkih poremećaja koji se javlja za vrijeme trudnoće. To je vrsta šećerne bolesti koja se manifestira ili se prvi puta uoči za vrijeme trudnoće. Posteljica stvara brojne hormone koji imaju mehanizam djelovanja

suprotan inzulinu, stoga gušterača mora proizvoditi dodatne količine inzulina kako bi održala normalnu razinu glukoze u krvi (104). Gestacijski dijabetes nastupa kada je ta ravnoteža poremećena i inzulina nema u dostatnim količinama. Može prouzročiti abnormalnosti posteljice i njezinih funkcija, dovesti do preranog porođaja, fetalnog distresa, pa čak i do smrti fetusa. (86) Salomon i njegovi suradnici su u longitudinalnoj studiji proučavali količinu i aktivnost egzosoma u trudnica s razvijenim gestacijskim dijabetesom i usporedili je s razinom ukupnih egzosoma u zdravoj trudnoći. Razina ukupnih egzosoma bila je povišena kod trudnica s gestacijskim dijabetesom, no omjer placentalnih egzosoma, identificiranih po PLAP specifičnom markeru posteljice, i ukupnih egzosoma bio je snižen u odnosu na normalnu trudnoću. To nam ukazuje ili na promjenu u oslobađanju placentalnih egzosoma ili na povećanje izlučivanja neplacentalnih egzosoma, a koji je od ta dva mehanizma točan ili se radi o njihovoj kombinaciji još uvijek ne znamo.(105) Također, placentalni egzosomi mogu povećati lučenje proupalnih citokina iz endotelih stanica(106) što je dokaz utjecaja upalnog mikrookoliša na majčin metabolizam glukoze. Osim navedenog uočeno je kako žene s gestacijskim dijabetesom imaju drugačiji egzosomalni profil od zdravih trudnica, a postoje razlike u miRNA i adiponektinskom putu, koji je uključen u glikemijsku kontrolu.(107) Proučavanjem biološkog djelovanja placentalnih egzosoma u zdravih trudnica i u žena koje su imale povišenu koncentraciju šećera u krvi uočeno je kako placentalni egzosomi imaju proupalnu ulogu u normalnoj i patološkoj trudnoći, ali kod žena s povećanim razinama šećera to je bilo više izraženo. Također, povećana upalna reakcija majke, koja se definira povećanim brojem leukocita u početnoj fazi gestacije, ukazuje na veći rizik od razvoja gestacijskog dijabetesa(108). Već je ranije bila opisana neravnoteža između cirkulirajućih proupalnih i antiupalnih citokina u pacijentica s razvijenim gestacijskim dijabetesom. Navedeno se može objasniti mogućim kontradiktornim učinkom egzosoma u imunomodulaciji, jer je kod povećane koncentracije šećera u krvi zamijećena povišena koncentracija TNF-  $\alpha$  i IL-6, kao i protuupalnog IL-4. (109)(110)

## **Prijevremeni porođaj**

Svjetska zdravstvena organizacija prijevremeni porođaj definira kao svaki porođaj koji nastupi prije 37. tjedna gestacije, od posljednje menstruacije (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>). U svijetu se rodi otprilike oko 15 milijuna nedonoščadi/prematurusa svake godine, što predstavlja veliki

zdravstveni problem jer se kod njih mogu razviti brojne komplikacije.(111) Najčešće su to djeca niske porođajne težine, s razvijenim respiratornim distres sindromom, mogućim gastrointestinalnim, imunološkim, neurološkim problemima, kao i problemima s vidom i sluhom. Suvremena medicina i dalje nema pouzdane dijagnostičke testove ili kriterije kojima bi mogli prepoznati trudnice sa sudbinom prijevremenog poroda od normalnih trudnoća s terminski rođenom djecom. Danas se služimo pregledom vrata maternice u kombinaciji s mjerenjem fetalnog fibronektina. Njihova kombinacija može ukazati na mogućnost prijevremenog poroda, no te metode nisu dovoljno pouzdane. (95)

Mehanizam nastanka prijevremenog poroda nije do kraja razjašnjen, ali se zna da uključuje više faktora od kojih su najčešći intrauterine infekcije. (112). No, uočeno je da uzrok prijevremenog porođaja može biti i sterilna upala, što znači upalna reakcija bez prisutnosti mikroorganizama.(113) S obzirom na to da placenta komunicira s majkom putem ekstracelularnih vezikula, posebno egzosoma, pažnja znanstvenika je usmjerena na okrivanje njihove uloge u ovom procesu.

Za početak poroda je karakterističan porast intrauterinih prostaglandina(114). Taj porast nije posljedica poroda, već se javlja prije i smatramo ga jednim od razloga indukcije poroda. Zanimljivo je kako egzosomi u svom sastavu, između ostalog prenose i prostaglandine, arahidonsku kiselinu, fosfolipaze, leukotriene, enzime i ostale molekule uključene u indukciju poroda. Posebno su važne fosfolipaze koje su nužne za sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Egzosomi, osim što mogu potaknuti upalni odgovor, mogu utjecati i mijenjati metabolizam i funkciju svoje ciljne stanice te tako potaknuti dodatno lučenje upalnih citokina. (115) Istraživanja su pokazala kako egzosomi majki s fiziološkom trudnoćom mogu inhibirati produkciju IL-2 koje stvaraju aktivirane T stanice, dok egzosomi trudnica kod kojih je došlo do prijevremenog poroda to nisu mogli (79). Za prijevremeni porod je karakteristično ubrzano sazrijevanje fetalnih membrana čija je maturacija u korelaciji s rastom fetusa te je znak za početak poroda. Ova pojava je prisutna i u normalnoj trudnoći, ali je u slučaju prijevremenog poroda značajno ubrzana. Smatra se kako u prijevremenom porodu, kao odgovor na rizične čimbenike koji dovode do oksidativnog stresa, dolazi do ubrzanje sazrijevanja fetalnih membrana, produkcije i lučenje egzosoma u fetalnim stanicama i dodatnog poticaja na upalni odgovor.(116) Iz svega navedenog

neupitna je uloga egzosoma u svakom pa i u prijevremenom porodu, ali jasan odgovor na njihovu ulogu do danas nije poznat.

Tablica 2. Kratki sažetak – placentalni egzosomi

<b>PLACENTALNI EGZOSOMI</b>			
Identifikacija	PLAP, miRNA (kromosoma19); (CD9, CD63); (24)(95)(86)		
Izolacija	Ultracentrifugiranje, kromatografija (SEC); (117)		
Specifičnosti	„cup-shaped“; <100nm;odsutnost MHC molekula (prisutne MICA/B, RAET1/ULB1-5,FasL,TRAIL molekule); količina u korelaciji s težinom placente; mikrookoliš utječe na sekreciju; pojavljuju se rano u trudnoći i razina im raste kako napreduje gestacija; (4)(5)(86)		
Fiziološka gestacija (funkcije)	Feto-maternalna komunikacija; prijenos genetičke informacije do ciljane stanice; regulacija feto-maternalne metaboličke homeostaze; inhibicija majčine T stanične signalizacije što potiče imunotoleranciju majke; regulacija angiogeneze i migracije endotelnih stanica; (86)		
Patološka gestacija	<p style="text-align: center;"><b><u>PE</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Utjecaj na imunološki sustav</li> <li>• Promjenjen sastav (profil)</li> <li>• Smanjena ekspresija sinciotrofoblast-specifičnog proteina2</li> </ul> <p style="text-align: center;">(5)(102)(86)</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>GDM</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Promjenjen omjer ukupnih i placentalnih egzosoma</li> <li>• Poticanje upale</li> <li>• Promjenjen sastav(profil)</li> <li>• Neregulirana miRNA i adiponektinski put</li> </ul> <p style="text-align: center;">(5)(86)(105)</p>	<p style="text-align: center;"><b><u>Prijevremeni porod</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poticanje upale</li> <li>• Ubrzano sazrijevanje fetalnih membrana</li> </ul> <p style="text-align: center;">(86)(95)</p>

## **Egzosomi u amnionskoj tekućini**

Amnionska tekućina štiti dijete, atijekom trudnoće je u dinamičkoj ravnoteži te se konstantno stvara i nestaje. Kako točno nastaje amnionska tekućina nije u potpunosti jasno, ali se zna da je produkt fetusa. Vjeran je pokazatelj metaboličkih promjena djeteta, iako u svom sastavu može sadržavati mali udio majčinog sadržaja, budući da dolazi do transdukcije majčinog seruma. Volumen plodne vode najveći je između 36. - 38. tjedna gestacije, nakon čega dolazi do njegovog laganog smanjenja(118). Nakon 20. tjedna gestacije jednu od vodećih uloga proizvodnje amnionske tekućine preuzimaju fetalni bubrezi. Egzosomi identificirani u amnionskoj tekućini i dalje su nepoznatog podrijetla. Većina znanstvenika se slaže da potječu od fetusa zbog markera koji ukazuju na fetalno podrijetlo, te njihov sadržaj nalik onomu u egzosomima urina novorođenčadi(5). Keller i suradnici uočili su da egzosomi u amnionskoj tekućini sadrže specifični marker CD24, te proteine aneksin-1 i akvaporin-2 koji ukazuju na podrijetlo iz fetalnih bubrega (119). Ukoliko se navedene pretpostavke pokažu ispravne, bile bi važan pokazatelj ravoja fetalnih bubrega, a možda i drugih organa fetusa.

## **PREDNOSTI I MANE KORIŠTENJA OVE TEHNOLOGIJE U SUVREMENOJ MEDICINI**

Sposobnost egzosoma da prenose molekule, između ostalog i mRNA kao i da mogu mijenjati ciljanu stanicu, njezin metabolizam i funkciju, postavlja velika očekivanja u njihovoj budućoj primjeni. Većina stanica, ako ne i sve izlučuju egzosome, što također povećava njihovu važnost u proučavanju patoloških stanja na koja bi mogli utjecati. Osim dijagnostičkih mogućnosti, očekuje se njihova primjena i u terapijske svrhe. S obzirom na to da sudjeluju u međustaničnoj komunikaciji, imaju dobar potencijal u modulaciji metabolizma i funkcije ciljane stanice(5). Mogu epigenetički reprogramirati oštećenu stanicu u mnogim patološkim stanjima, mijenjajući brojne procese i signalne puteve često putem miRNA. Upravo zbog mogućnosti tog transfera, mogli bi biti dobra alternativa genskoj terapiji, s obzirom na to da nema rizika od aneuploidije, te je smanjena stopa odbacivanja nakon alogenične primjene. Između ostalog, egzosomi su se pokazali kao obećavajući terapijski agensi u brojnim stanjima poput kardiovaskularnih bolesti, oštećenjima bubrega, bolestima imunološkog sustava, tumorskim procesima i neurološkim bolestima.(102) Egzosome možemo pronaći u



skoro svim tjelesnim tekućinama, što omogućava njihovu jednostavnu i neinvazivnu dijagnostičku primjenu. Također, egzosomi su vezikule koje nastaju endosomalnim putem, te su vjerni pokazatelj stanja stanice. Ova činjenica vrlo je važna i vrijedna pri identifikaciji raznih bolesti te bi nam omogućila pravovremeno otkrivanje patoloških stanja za koje još uvijek nemamo valjan dijagnostički test ili se identificiraju tek u svojoj uznapređenoj fazi. Terapijska metoda može biti i inhibicija proizvodnje ekstracelularnih vezikula, kako bi se smanjila rezistencija na lijekove, posebice pri kemoterapiji.(16) Između ostalog, egzosomi mogu biti odličan način dostave lijekova raznim stanicama(120). S obzirom na njihova svojstva, malu veličinu, fleksibilnost i mogućnost prijelaza brojnih barijera i membrana, odličan su vektor za prijenos lijekova.(121)

Otkriće placentalnih vezikula koje služe za komunikaciju između fetusa i majke otvorilo je brojne mogućnosti korištenja istih u otkrivanju raznih gestacijskih bolesti. Možemo zamisliti kako je fetus okružen placentom oko koje se nalazi najviša koncentracija egzosoma, koji onda odlaze u majčinu cirkulaciju i time nastaje gradijent njihove koncentracije kako raste udaljenost od placente(4). Identifikacija PLAP specifičnog markera vrlo je važna jer omogućuje distinkciju od ostalih vezikula što je bitno u korištenju placentalnih egzosoma kao ranih biomarkera patoloških stanja poput preeklampsije. Smatramo da bi egzosomi mogli biti uključeni u ranu fazu etiopatogeneze tog patološkog stanja. Osim što bi mogli poslužiti kao važni markeri, budući da se mogu vrlo jednostavno pronaći u krvi trudnice, iskoristivi su za *in vitro* modifikacije i primjenu u liječenju. Taj proces uključivao bi *in vitro* genetičku preinaku izoliranih stanica te korištenje, primjerice plazmida kao vektora za selektivni prijenos dvolančane RNA molekule (dsRNA) u vezikule tijekom *in vitro* biogeneze egzosoma pa bi se time omogućilo smanjenje ekspresije gena uključenih u patofiziologiju preeklampsije. Također, manipulacijom i modifikacijom površinskih molekula egzosoma, moglo bi se utjecati na ciljne stanice, povećati njihov broj, ali i reprogramirati ih. (102). Trenutni dokazi podupiru teoriju kako je većina patoloških stanja u trudnoći posljedica abnormalne placentacije u ranom stadiju trudnoće stoga bi egzosomi mogli poslužiti kao rani biomarkeri u detekciji tih stanja, jer su vjeran prikaz stanja placente i mijenjaju svoj sadržaj ovisno o mikrookolišu svoje izvorne stanice. Time bi imali razvijene testove probira u još asimptomatskih trudnica kako bi mogli pravovaljano reagirati. (122)

Unatoč činjenici otvaranja novog velikog područja, punog mogućnosti i napretka, i dalje se puno toga ne zna. Potrebno je razumjeti patofiziologiju raznih stanja, ali isto tako i ulogu egzosoma u njihovom nastanku. Osim toga, još uvijek je veliki problem identifikacija različitih vezikula. Internacionalno društvo za ekstracelularne vezikule izdalo je smjernice i protokole za izolaciju i identifikaciju različitih vezikula. Smjernice su obnovljene 2018. godine (21). Problem je nepostojanje dovoljno osjetljive metode u identifikaciji tako sitnih vezikula, a još uvijek ne znamo cijeli sastav pojedinih vezikula što dodatno otežava razlikovanje.(123).

Otkrivanje kompletnog sastava molekula u egzosomima, kao i na njihovoj površini te dovoljno osjetljive metode koja bi omogućila njihovu distinkciju od ostalih vezikula, pomoglo bi nam u razjašnjavanju mnogih patofizioloških procesa u kojima egzosomi sigurno igraju veliku ulogu, te bi nam otvorilo mogućnosti dijagnostičkog i terapijskog djelovanja.

## **ZAKLJUČAK**

Otkriće ekstracelularnih vezikula kao četvrtog mehanizma međustanične komunikacije otvorilo je nove vidike i mogućnosti ne samo u znanosti već i u klinici. Ukupno 4 vrste

ovih vezikula je uključeno u brojne fiziološke i patološke procese. Egzosomi koji su veličinom najmanji, izdvajaju se mehanizmom nastanka te privlače najviše pažnje. Razlog tomu je njihov endosomalni put nastanka, prenošenje genetičkih informacija, ali i mijenjanje sadržaja ovisno o mikrookolišu i stanju izvorne stanice. Mogu utjecati na fenotip i funkciju ciljne stanice te time imati terapijsko djelovanje.

Placentalni egzosomi se izdvajaju kao važni biomarkeri stanja placente te mogući pokazatelji daljnje sudbine razvoja trudnoće. Njihova važnost, prije svega se uočila u patološkim stanjima poput preeklampsije i gestacijskog dijabetesa. Placentalni egzosomi omogućavaju neinvazivni probir iz krvi ili urina trudnice, a zahvaljujući specifičnom markeru, lako ih možemo izolirati.

Potječu od stanica sinciotrofoblasta i osim nabrojenog, vrlo su važni u fetomaternalnoj komunikaciji, modifikaciji majčinog imunološkog sustava, upali, pa time vjerojatno i indukciji poroda, angiogenezi, prezentaciji antigena i općenito imaju važnu ulogu u normalnoj i patološkoj trudnoći. Razvojem boljih metoda identifikacije kao i produbljivanjem znanja o sastavu i funkciji egzosoma, možemo reći da imaju veliki potencijal i važnu ulogu u budućnosti u dijagnostici, ali i liječenju patoloških trudnoća.

**ZAHVALE :**

Prvenstveno bih se htjela zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ljiljani Šerman, na prekrasnom odnosu, savjetima, podršci, korekcijama i pristupačnosti tijekom odabira teme i pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem se svojoj obitelji i najbližim prijateljima na strpljenju i podršci tijekom cijelog studija.

## LITERATURA:

1. stanična teorija | Hrvatska enciklopedija [Internet]. [cited 2019 Mar 26]. Available from: <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=57777>
2. Extracellular vesicles: an introduction | Abcam [Internet]. [cited 2019 Mar 26]. Available from: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/extracellular-vesicles-an-introduction>
3. Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. Trends Cell Biol [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 26];27(3):172–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27979573>
4. Mincheva-nilsson L, Baranov V. The Role of Placental Exosomes in Reproduction. 2010;63:520–33.
5. Salomon C, Nuzhat Z, Dixon CL, Menon R. Placental Exosomes During Gestation : Liquid Biopsies Carrying Signals for the Regulation of Human Parturition Placental Exosomes During Gestation : Liquid Biopsies Carrying Signals for the Regulation of Human Parturition. 2018;(February).
6. Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q. Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2012 Mar 13 [cited 2019 Apr 26];109(11):4146–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315426>
7. SVEU Č ILIŠTE U SPLITU ANA Č ARI Ć IZRAŽAJ KASPAZE-3 U APOPTOTSKIM STANICAMA SEROZNIH TUMORA JAJNIKA Magistarski rad. 2009;
8. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. Bioscience [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2019 Apr 27];65(8):783–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26955082>
9. S. J, D. Z, M.L. S, M.F. C, R. C, J. S, et al. Emerging technologies in extracellular vesicle-based molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn [Internet]. 2014;14(3):307–21. Available from:

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L372698301%0Ahttp://dx.doi.org/10.1586/14737159.2014.893828>

10. Panfoli I, Petretto A, Ramenghi LA, Santucci L, Ghiggeri G, Candiano G, et al. Microvesicles as promising biological tools for diagnosis and therapy. *Expert Rev Proteomics* [Internet]. 2018;15(10):801–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1528149>
11. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2008 [cited 2019 Apr 26];18(5):199. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754907/>
12. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2014;1841(1):108–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.004>
13. Jarmalavičiūtė A, Pivoriūnas A. Exosomes as a potential novel therapeutic tools against neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*. 2016;113:816–22.
14. Žlender Vi. Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol* [Internet]. 2004;54(4):267–74. Available from: <http://hrcak.srce.hr/344>
15. Hauser P, Wang S, Didenko V V. Chapter 12 Vesicles. 1554:193–200.
16. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*. 2013;113(1):1–11.
17. Martínez MC, Freyssinet J-M. Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: Phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC Cell Biol* [Internet]. 2001 [cited 2019 Apr 27];2:20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC59679/>
18. Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S. Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett* [Internet]. 1996 Nov 18 [cited 2019 Apr 27];397(2–3):269–72. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(2896\)2901197-0](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(2896)2901197-0)

19. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death Differ* [Internet]. 2012 May [cited 2019 Mar 27];19(5):735–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421963>
20. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* [Internet]. 1972 Aug [cited 2019 Apr 27];26(4):239–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027>
21. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2018 Dec 23 [cited 2019 Mar 26];7(1):1535750. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2018.1535750>
22. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43–51.
23. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria P-J, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget* [Internet]. 2015 May 10 [cited 2019 Mar 26];6(13):11327–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857301>
24. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(2):193–208.
25. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30(1):255–89.
26. Beaudoin AR, Grondin G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *BBA - Rev Biomembr*. 1991;1071(3):203–19.
27. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 May 15 [cited 2019 Apr 28];123(Pt 10):1603–11. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445011>

28. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 28];8(4):220–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27494381>
29. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2019 Apr 28];106(5):1604–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741221>
30. Stein JM, Luzio JP. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. The sorting of endogenous plasma-membrane proteins and lipids into shed vesicles. *Biochem J* [Internet]. 1991 Mar 1 [cited 2019 Apr 28];274 ( Pt 2)(Pt 2):381–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1848755>
31. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2019 Apr 28];19(22):1875–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19896381>
32. Wang D, Sun W. Urinary extracellular microvesicles: Isolation methods and prospects for urinary proteome. *Proteomics*. 2014;14(16):1922–32.
33. van Balkom BWM, Eisele AS, Pegtel DM, Bervoets S, Verhaar MC. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell vesicles* [Internet]. 2015 [cited 2019 Apr 28];4:26760. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26027894>
34. Vesiclepedia: Browse [Internet]. [cited 2019 Apr 28]. Available from: <http://microvesicles.org/browse>
35. Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic* [Internet]. 2018 May [cited 2019 Apr 28];19(5):319–27. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/tra.12558>
36. Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Möller T, Matteoli M, et al. Astrocyte-



- derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2019 Apr 28];174(11):7268–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905573>
37. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* [Internet]. 2007 Oct 1 [cited 2019 Apr 28];110(7):2440–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536014>
  38. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, 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.
  39. Benedikter BJ, Weseler AR, Wouters EFM, Savelkoul PHM, Rohde GGU, Stassen FRM. Redox-dependent thiol modifications: implications for the release of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018 Jul [cited 2019 Apr 28];75(13):2321–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29594387>
  40. Whiteside TL. Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Adv Clin Chem* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 26];74:103–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27117662>
  41. Junquera C, Castiella T, Muñoz G. Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors : ultrastructural profiles of spherosomes. *Histochem Cell Biol*. 2016;
  42. Dolo V, Ginestra A, Cassarà D, Violini S, Lucania G, Torrisi MR, et al. Selective localization of matrix metalloproteinase 9,  $\beta$  1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 1998;58(19):4468–74.
  43. Shang M, Ji JS, Song C, Gao BJ, Jin JG, Kuo WP, et al. Chapter 1 Precision Medicine. 2017;1660.
  44. Rashed MH, Bayraktar E, Helal GK, Abd-ellah MF. Exosomes : From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 2017 Mar 2;18(3). pii: E538. doi:

10.3390/ijms18030538.

45. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20.
46. Alenquer M, Amorim MJ. Exosome Biogenesis , Regulation , and Function in Viral Infection. 2015;(September):5066–83.
47. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* [Internet]. 2012 Dec 24 [cited 2019 Apr 30];12(1):421. Available from:  
<http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-421>
48. Beer L, Zimmermann M, Mitterbauer A, Ellinger A, Gruber F, Narzt M-S, et al. Analysis of the Secretome of Apoptotic Peripheral Blood Mononuclear Cells: Impact of Released Proteins and Exosomes for Tissue Regeneration. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Nov 16 [cited 2019 Apr 30];5:16662. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567861>
49. Xiao X, Yu S, Li S, Wu J, Ma R, Cao H, et al. Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2019 Apr 30];9(2):e89534. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586853>
50. Hessvik NP, Øverbye A, Brech A, Torgersen ML, Jakobsen IS, Sandvig K, et al. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016 Dec 20 [cited 2019 Apr 30];73(24):4717–37. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2309-8>
51. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 May [cited 2019 Apr 30];14(5):283–96. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609508>
52. Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* [Internet]. 2010 Apr 8 [cited 2019 Apr 30];464(7290):864–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305637>

53. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2019 Apr 30];23(4):452–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570275>
54. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2019 Apr 30];6(10):801–11. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm1736>
55. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, et al. Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Feb 15 [cited 2019 Apr 30];70(4):1668–78. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>
56. Hurwitz SN, Conlon MM, Rider MA, Brownstein NC, Meckes DG, Jr. Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 30];5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4947197/>
57. Mohrmann K, Leijendekker R, Gerez L, van Der Sluijs P. rab4 regulates transport to the apical plasma membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Mar 22 [cited 2019 May 27];277(12):10474–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790789>
58. Casanova JE, Wang X, Kumar R, Bhartur SG, Navarre J, Woodrum JE, et al. Association of Rab25 and Rab11a with the Apical Recycling System of Polarized Madin–Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1999 [cited 2019 May 27];10(1):47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC25153/>
59. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Aug 5 [cited 2019 Apr 30];9(8):581–93. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2567>
60. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* [Internet]. 2015 [cited 2019 Apr 30];13(1):17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411500/>

61. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* [Internet]. 2013 [cited 2019 Apr 30];4:2980. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24356509>
62. Sumoylation - Latest research and news | Nature [Internet]. [cited 2019 Mar 17]. Available from: <https://www.nature.com/subjects/sumoylation>
63. Cha DJ, Franklin JL, Dou Y, Liu Q, Higginbotham JN, Demory Beckler M, et al. KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *Elife* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2019 Apr 30];4. Available from: <https://elifesciences.org/articles/07197>
64. Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Ströbel T, Erkan EP, et al. miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* [Internet]. 2012 Feb 7 [cited 2019 Apr 30];1(2):e10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23344721>
65. Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis K V, Ri S, Schekman R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 30];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27559612>
66. Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S. Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun* [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2019 May 2];4(1):2712. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms3712>
67. Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 2];214(2):197–213. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27402952>
68. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2019 May 2];10(8):513–25. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm2728>
69. Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by

- Rab11. *J Cell Sci* [Internet]. 2002;115(Pt 12):2505–15. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045221>
70. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010 Jan 6 [cited 2019 May 2];12(1):19–30. Available from:  
<http://www.nature.com/articles/ncb2000>
71. Loomis RJ, Holmes DA, Elms A, Solski PA, Der CJ, Su L. Citron kinase, a RhoA effector, enhances HIV-1 virion production by modulating exocytosis. *Traffic* [Internet]. 2006 Dec [cited 2019 May 2];7(12):1643–53. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118119>
72. Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI. Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 May 30 [cited 2019 May 2];278(22):20083–90. Available from:  
<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M301642200>
73. Pfeffer SR. Unsolved Mysteries in Membrane Traffic. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2007 Jun 7 [cited 2019 May 2];76(1):629–45. Available from:  
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.76.061705.130002>
74. Frängsmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *MHR Basic Sci Reprod Med* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2019 May 2];11(1):35–41. Available from:  
<http://academic.oup.com/molehr/article/11/1/35/987971/Cytoplasmic-microvesicular-form-of-Fas-ligand-in>
75. Kim SH, Bianco NR, Shufesky WJ, Morelli AE, Robbins PD. Effective Treatment of Inflammatory Disease Models with Exosomes Derived from Dendritic Cells Genetically Modified to Express IL-4. *J Immunol* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2019 May 2];179(4):2242–9. Available from:  
<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.4.2242>
76. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Res*

- [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2019 May 2];67(15):7458–66. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-3456>
77. Gercel-Taylor C, O'Connor SM, Lam GK, Taylor DD. Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: link with induction of apoptosis. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2002 Jul [cited 2019 May 2];56(1–2):29–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165037802000256>
  78. EBLEN AC, GERCEL -TAYLOR C, NAKAJIMA ST, TAYLOR DD. Modulation of T-Cell CD3-Zeta Chain Expression in Early Pregnancy\*. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2002 Mar [cited 2019 May 3];47(3):167–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0897.2002.1o050.x>
  79. Sabapatha A, Gercel-taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J Reprod Immunol*. 2006;56(5–6):345–55.
  80. Dragovic RA, Collett GP, Hole P, Ferguson DJP, Redman CW, Sargent IL, et al. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterisation by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. *Methods* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 May 3];87:64–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202315001450>
  81. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell vesicles* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 3];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25279113>
  82. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. Placenta-Derived Exosomes and Syncytiotrophoblast Microparticles and their Role in Human Reproduction: Immune Modulation for Pregnancy Success. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 May 3];72(5):440–57. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/aji.12311>
  83. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, et al. A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 3];9(6):e98667. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905832>

84. Stefaner I, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R. Expression of placental alkaline phosphatase does not correlate with IgG binding, internalization and transcytosis [Internet]. Vol. 327, *Biochem. J.* 1997 [cited 2019 May 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1218833/pdf/9359433.pdf>
85. She Q-B, Mukherjee JJ, Huang J-S, Crilly KS, Kiss Z. Growth factor-like effects of placental alkaline phosphatase in human fetus and mouse embryo fibroblasts. *FEBS Lett* [Internet]. 2000 Mar 10 [cited 2019 May 3];469(2–3):163–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2800%2901273-4>
86. Jin J, Menon R. Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79(5):1–10.
87. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Dec 4 [cited 2019 May 3];284(49):34211–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801663>
88. Tian T, Zhu Y-L, Zhou Y-Y, Liang G-F, Wang Y-Y, Hu F-H, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Aug 8 [cited 2019 May 3];289(32):22258–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951588>
89. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, et al. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Jun 14 [cited 2019 May 3];288(24):17713–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23653359>
90. Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li J-P, Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Oct 22 [cited 2019 May 3];110(43):17380–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101524>
91. Feng D, Zhao W-L, Ye Y-Y, Bai X-C, Liu R-Q, Chang L-F, et al. Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic* [Internet]. 2010

- May [cited 2019 May 3];11(5):675–87. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x>
92. Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA. Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 4];22(2):182–93. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26663221>
  93. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med* [Internet]. 2014 Aug 8 [cited 2019 May 5];12:204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104112>
  94. Elfeky O, Longo S, Lai A, Rice GE, Salomon C. Influence of maternal BMI on the exosomal profile during gestation and their role on maternal systemic inflammation. *Placenta* [Internet]. 2017 Feb [cited 2019 May 5];50:60–9. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400416306749>
  95. Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, Koh YQ, Duncombe G, Illanes SE, et al. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015;213(4):S173–81. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.001>
  96. Luo S-S, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, et al. Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes<sup>1</sup>. *Biol Reprod* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2019 May 5];81(4):717–29. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.108.075481>
  97. Salomon C, Yee SW, Mitchell MD, Rice GE. The possible role of extravillous trophoblast-derived exosomes on the uterine spiral arterial remodeling under both normal and pathological conditions. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 5];2014:693157. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25302305>
  98. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung T-Y, Lau T-K, Chiu RWK, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2019 May 5];54(3):482–90. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218722>

99. Kalesić R, Hipertenzivni Č, Trudnoći PU. SVEUČILIŠTE U ZAGREBU MEDICINSKI FAKULTET [Internet]. [cited 2019 May 28]. Available from: <https://repozitorij.mef.unizg.hr/islandora/object/mef:189/preview>
100. Salomon C, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Smith M, Duncombe G, Ilanes S, et al. Oxygen tension regulates glucose-induced biogenesis and release of different subpopulations of exosome vesicles from trophoblast cells: A gestational age profile of placental exosomes in maternal plasma with gestational diabetes mellitus. *Placenta* [Internet]. 2015 Apr [cited 2019 May 5];36(4):488. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400415005172>
101. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: Maternal circulating levels in normal pregnancies and, early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 May 5];46:18–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400416304842>
102. Pillay P, Moodley K, Moodley J, Mackraj I. Placenta-derived exosomes: Potential biomarkers of preeclampsia. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:8009–23.
103. Lee SM, Romero R, Lee YJ, Park IS, Park C-W, Yoon BH. Systemic inflammatory stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast as a model for inflammatory response in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2019 May 28];207(4):337.e1-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021701>
104. Gilmartin ABH, Ural SH, Repke JT. Gestational diabetes mellitus. *Rev Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 [cited 2019 May 28];1(3):129–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015764>
105. Salomon C, Rice GE. Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders [Internet]. 1st ed. Vol. 145, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2017. 163-179 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.006>
106. Salomon C, Scholz-romero K, Sarker S, Sweeney E, Kobayashi M, Correa P, et al. Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and

- Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation. 2016;65(December 2015):598–609.
107. Santovito D, De Nardis V, Marcantonio P, Mandolini C, Paganelli C, Vitale E, et al. Plasma Exosome MicroRNA Profiling Unravels a New Potential Modulator of Adiponectin Pathway in Diabetes: Effect of Glycemic Control. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2019 May 7];99(9):E1681–5. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article/99/9/E1681/2537496>
  108. Wolf M, Sauk J, Shah A, Vossen Smirnakis K, Jimenez-Kimble R, Ecker JL, et al. Inflammation and Glucose Intolerance: A prospective study of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2019 May 7];27(1):21–7. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.27.1.21>
  109. Chen Y, Chen J, Hu J, Yang Z, Shen Y. Enhancement of lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 2 expression and inflammatory cytokine secretion in HUVECs under high glucose conditions. *Life Sci* [Internet]. 2013 Mar [cited 2019 May 7];92(10):582–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320513000490>
  110. Kuzmicki M, Telejko B, Zonenberg A, Szamatowicz J, Kretowski A, Nikolajuk A, et al. Circulating Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Polish Women with Gestational Diabetes. *Horm Metab Res* [Internet]. 2008 Aug [cited 2019 May 7];40(08):556–60. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2008-1073166>
  111. Preterm birth [Internet]. [cited 2019 Apr 25]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
  112. Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2012 Feb [cited 2019 May 7];17(1):12–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944863>
  113. Romero R, Miranda J, Chaemsaihong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2015 Aug [cited 2019 May 7];28(12):1394–409. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25190175>

114. Practice Bulletin No. 171. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 May 28];128(4):e155–64. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00006250-201610000-00061>
115. Peiris HN, Vaswani K, Almughlliq F, Koh YQ, Mitchell MD. Review: Eicosanoids in preterm labor and delivery: Potential roles of exosomes in eicosanoid functions. *Placenta* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.013>
116. Menon R, Boldogh I, Hawkins HK, Woodson M, Poletini J, Syed TA, et al. Histological evidence of oxidative stress and premature senescence in preterm premature rupture of the human fetal membranes recapitulated in vitro. *Am J Pathol* [Internet]. 2014;184(6):1740–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.011>
117. Tannetta D, Collett G, Vatish M, Redman C, Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles – Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta* [Internet]. 2017;52:134–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.11.008>
118. Amniotic fluid: *MedlinePlus Medical Encyclopedia* [Internet]. [cited 2019 May 28]. Available from: <https://medlineplus.gov/ency/article/002220.htm>
119. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int*. 2007;72(9):1095–102.
120. Vickers KC, Remaley AT. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2019 May 7];23(2):91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418571>
121. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011 Apr 20 [cited 2019 May 7];29(4):341–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.1807>
122. Redman CWG, Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Southcombe JH, Collett GP, et al. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2019 Apr 25];33:S48–54. Available

from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143400411005868>

123. Xu R, Greening DW, Zhu H-J, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2019 Apr 25];126(4):1152–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27035807>

## **ŽIVOTOPIS:**

Rođena sam 19.04.1995. godine u Karlovcu gdje sam završila Osnovnu školu Grabrik, nakon koje upisujem Gimnaziju Karlovac, opći smjer. 2013. godine završila sam srednju školu i nakon položene državne mature, upisala sam se iste godine na Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sam redovni student. Radila sam kao demonstrator na Zavodu za anatomiju i kao demonstrator iz pedijatrije. Od 2018. godine urednica sam fakultetskog časopisa Medicinar, rubrike Znanost, za koji inače pišem od početka studija.

Pričam engleski, njemački i španjolski jezik.