Vanstanične vezikule i njihova uloga u bolestima

Barberić, Tomislav

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:634111

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







BIOLOŠKI ODSJEK
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
ROOSEVELTOV TRG 6

VANSTANIČNE VEZIKULE I NJIHOVA ULOGA U BOLESTIMA

EXTRACELLULAR VESICLES AND THEIR ROLE IN DISEASES

Tomislav Barberić
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. GRAĐA I SVOJSTVA VANSTANIČNIH VEZIKULA 2

2.1. GRAĐA I SVOJSTVA EGZOSOMA 3

2.2. GRAĐA I SVOJSTVA MIKROVEZIKULA 5

2.3. GRAĐA I SVOJSTVA APOPTOTSKIH TIJELA 7

3. IZOLACIJA I DETEKCIJA VANSTANIČNIH VEZIKULA 9

4. ULOGA VANSTANIČNIH VEZIKULA U BOLESTIMA I NJIHOVA PRIMJENA U MEDICINI 12

5. ZAKLJUČCI 14

6. LITERATURA 15

7. SAŽETAK 21

8. SUMMARY 22

1. Uvod

Vanstanični prostor kako u eukariota tako i u prokariota osim metabolita, iona, proteina i polisaharida sadrži i vanstanične vezikule (EVs, od eng. *extracellular vesicles*) čije je otpuštanje očuvan proces i u prokariota i u eukariota. Konzerviranost tog procesa ukazuje na važnost tog dinamičnog vanstaničnog vezikularnog odjeljka te se iz dana u dan otkrivaju nove uloge vanstaničnih vezikula u fiziološkim, ali i patološkim procesima (György i sur., 2011a). Vanstanične vezikule membranske su vezikule substanične strukture omeđene fosfolipidnim dvoslojem koje su povijesno imenovane različitim, često zbunjujućim, i nedovoljno jednoznačnim imenima: egzosomi, mikrovezikule, ektosomi, mikročestice, virosomi, čestice nalik virusima, onkosomi, prostasomi, deksosomi, teksosomi i mnogim drugim imenima (Akers i sur., 2013). Neka imena bila su odraz veličine vezikula, neka izvora iz kojeg su izolirane, a neka njihove biogeneze. U sklopu ovog rada obradit će se tri najvažnije i najviše prihvaćene skupine vanstaničnih vezikula koje su opisane na temelju biogeneze – egzosomi, mikrovezikule (MV, od engl. *microvesicles*) i apoptotska tijela (Thery i sur., 2009).

Vanstanične vezikule predstavljaju veoma heterogenu populaciju membranskih vezikula koje otpuštaju normalne, aktivirane i tumorske stanice, a stopa kojom se vanstanične vezikule otpuštaju iz aktiviranih i tumorskih stanica povećana je naspram stope otpuštanja iz normalnih stanica. Osim povećane stope otpuštanja, vanstanične vezikule tumorskih stanica razlikuju se od vezikula koje otpuštaju normalne stanice i po svojem proteinskom i nukleinskom sastavu (Akers i sur., 2013). Vanstanične vezikule zadužene su za komunikaciju između stanica bilo međureakcijom proteina koje se nalaze na njihovoj površini s proteinima na površini staničnih membrana, bilo unosom sadržaja vanstanične vezikule u recipijentnu stanicu (Akers i sur., 2013). Komunikacija unošenjem sadržaja vanstanične vezikule podrazumijeva i unos nukleinskih kiselina, primarno mRNA, miRNA i drugih RNA, u recipijentnu stanicu što daje vanstaničnim vezikulama sposobnost da reguliraju ekspresiju gena recipijentne stanice na posttranskripcijskoj razini.

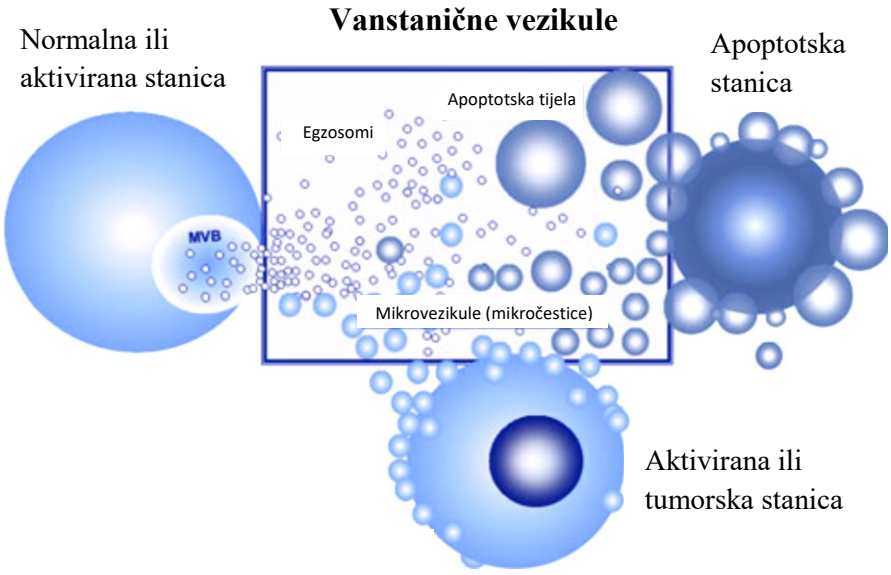
Upravo činjenica da sastav vanstaničnih vezikula odražava svojstva stanice iz koje su proizišle omogućava korištenje vanstaničnih vezikula u razumijevanju i otkrivanju patofizioloških stanja kao što su kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, infektivne bolesti i tumorska oboljenja (György i sur., 2011a). U tu svrhu koristi se čitav niz metoda za otkrivanje i karakterizaciju vanstaničnih vezikula od kojih se najčešće koriste – transmisijski elektronski mikroskop (TEM), imunobojanje i TEM, mikroskopija atomskih sila

(AFM, od engl. *atomic force microscopy*), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS, od engl. *dynamic light scattering*), protočna citometrija (FC, od engl. *flow cytometry*) i fluorescencijska mikroskopija (György i sur., 2011b; Lötvall i sur., 2014).

Zbog svojih svojstava vanstanične vezikule predstavljaju potencijalno ogroman izvor informacija o fiziološkim i patofiziološkim procesima u tijelu, ali još uvijek postoje problemi oko karakterizacije i imenovanja pojedinih skupina vezikula. Daljnji napredak na području otkrivanja i karakterizacije vanstaničnih vezikula mogao bi omogućiti nove neinvazivne metode otkrivanja tumorskih, ali i drugih oboljenja (György i sur., 2011a; Akers i sur., 2013). Napredak u razumijevanju mehanizma „ciljanja" vanstaničnih vezikula mogao bi omogućiti ciljanu terapiju koristeći se vanstaničnim vezikulama kao vektorima za specifičnu dostavu lijeka.

2. Građa i svojstva vanstaničnih vezikula

Vanstanične vezikule (EVs) mogu se klasificirati prema veličini, prema izvoru iz kojeg su izolirane i prema načinu biogeneze. Uglavnom afirmiranu klasifikaciju vanstaničnih vezikula uspostavili su Thery i sur. (2009), a koja se temelji na načinu biogeneze. Prema toj podjeli razlikujemo tri glavne skupine vanstaničnih vezikula – egzosome, mikrovezikule (MVs) i apoptotska tijela (Slika 1). Osim njih neki neki autori navode i vezikule nalik na retroviruse (Akers i sur., 2013) i mikročestice, koje su zapravo mikrovezikule (György i sur., 2011a).

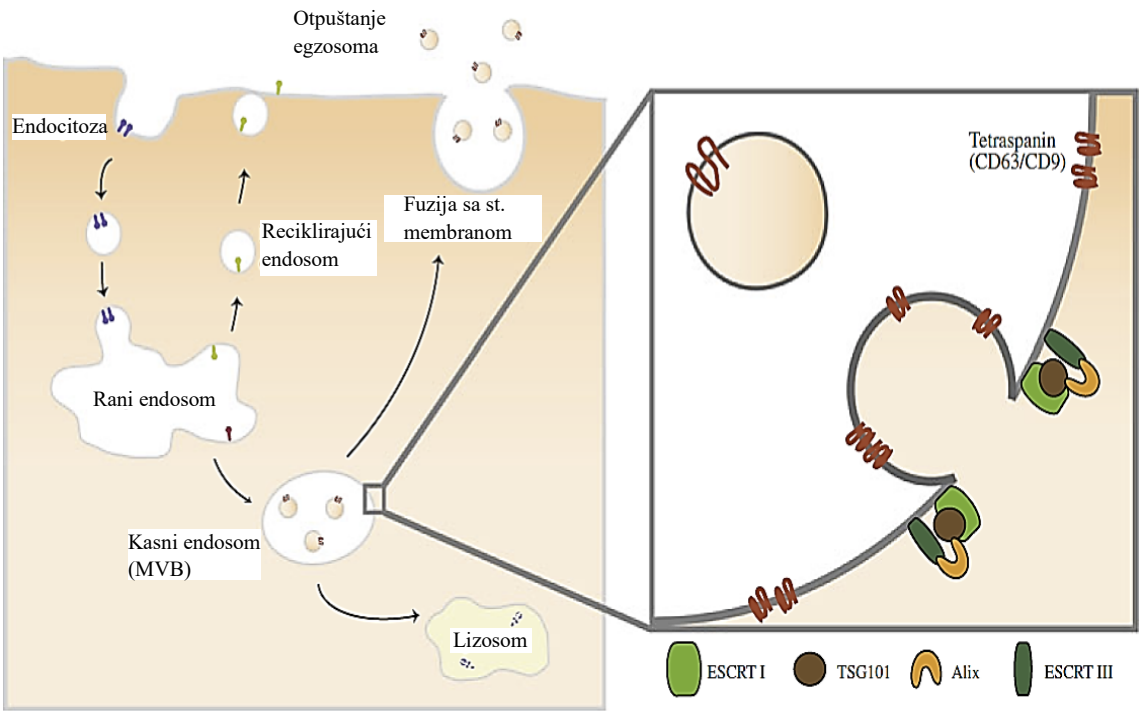


Slika 1.: Prikaz 3 glavne vrste vanstaničnih vezikula - egzosoma, mikrovezikula (mikročestica) i apoptotskih tijela. Radi jednostavnosti svaki tip vezikula prikazan je kao da ga otpušta jedna vrsta stanica. Preuzeto iz György i sur. (2011a).

2.1. Građa i svojstva egzosoma

Egzosomi su prvotno opisani kao vezikule koje su nastale ljuštenjem, a koje imaju ektoenzimsku aktivnost od strane Trams i sur. (1981) te im je, koristeći se EM, veličina procijenjena na otprilike 50 nm od strane Pan i sur. (1985). Prva fiziološka uloga koja im je pripisana bila je uloga u sazrijevanju retikulocita (Harding i sur., 1983; Johnstone i sur., 1987).

Danas se o egzosomima zna mnogo više te se zna da je njihovo glavno svojstvo, koje ih razlikuje od mikrovezikula i apoptotskih tijela, biogeneza unutar endosomalnog sustava. Egzosomi svoje postojanje započinju za vrijeme transformacije ranog endosoma u kasni. Tijekom tog procesa dolazi do formiranja intraluminalnih vezikula (ILVs, od engl. *intraluminal vesicles*) invaginacijom membrane endosoma prema unutra. Nastali kasni endosom, koji se još naziva i multivezikularno tijelo (MVB, od engl. *multivesicular body*), ispunjen je vezikulama čiji će se sadržaj ili razgraditi fuzijom s lizosomom ili izlučiti iz stanice fuzijom sa staničnom membranom (Akers i sur., 2013). Izlučivanje egzosoma može biti konstitutivno i inducirano (Thery i sur., 2009). Izlučene vezikule, sad egzosomi, omeđene su fosfolipidnim dvoslojem i promjera su 30-100 nm te se veličinom preklapaju s virusima (György i sur., 2011a; Akers i sur., 2013). Nastanak intraluminalnih vezikula, potencijalnih egzosoma, zahtjeva dva bitna procesa. U prvi proces uključeni su tetraspanini CD9 i CD63 koji grade tetraspaninom obogaćene mikrodomene na koje će se kasnije vezati proteini odgovorni za drugi proces u nastanku intraluminalnih vezikula. U drugom procesu formiraju se endosomalni sortirajući kompleksi zaduženi za transport (ESCRT, od engl. *endosomal sorting complex required for transport*) od kojih su ESCRT I i ESCRT II odgovorni za pupanje membrane, a ESCRT III, koji se na ESCRT I i II veže preko proteina Alix, odgovoran je za dovršenje pupanja (Akers i sur., 2013). Nastanak ILV-ova prikazan je na Slici 2.



Slika 2.: Prikaz procesa nastanka intraluminalnih vezikula tijekom transformacije ranog endosoma u kasni endosom, odnosno multivezikularno tijelo. Nastanak ILV-ova zahtjeva invaginaciju membrane endosoma u dva koraka opisanih u tekstu. Preuzeto iz Akers i sur. (2013).

Egzosomi su uglavnom opisani u stanica imunosnog sustava (dendritičke stanice, T stanice, B stanice i makrofazi), u kojima igraju ulogu u prezentaciji antigena te u regulaciji imunosnog odgovora (Thery i sur., 2009), i tumorskim stanicama (György i sur., 2011a). Načini na koji egzosomi djeluju na ciljnu stanicu uključuju izravan doticaj između površina membrana vezikule i stanice, endocitozu vezikule te fuziju vezikule i stanične membrane (Thery i sur., 2009). Egzosomi mogu horizontalnim transferom u ciljnu stanicu prenijeti mRNA i miRNA molekule (Valadi i sur., 2007), ali i onkogene receptore (Al-Nedawi i sur., 2008). Također je primijećeno da egzosomi sudjeluju u virusnim infekcijama prenoseći virusne čestice između stanica time izbjegavajući imunosni sustav organizma ili moduliraju ponašanje stanica koje tek trebaju biti zaražene (van Dongen i sur., 2016).

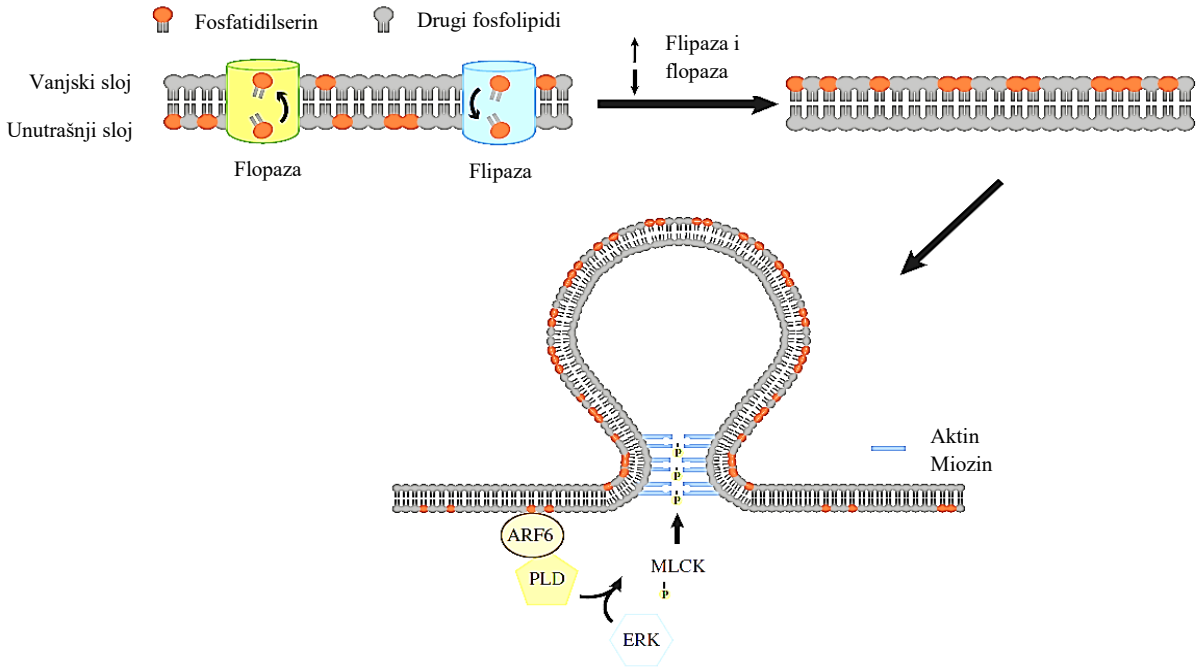
Kao specifični biljeg za egzosome mogu se koristiti CD9, CD63, CD81, LAMP1 i TSG101, ali i aneksin V zbog prisutnosti fosfatidilserina na površini membrana egzosoma (György i sur., 2011a; Akers i sur., 2013). Postoje podaci koji ukazuju na postojanje ESCRT-neovisnog puta formiranja egzosoma što bi značilo da u tom slučaju CD9 i CD63 ne bi bili iskoristivi kao biljezi za egzosome (Akers i sur., 2013). Najčešće primijenjene metode otkrivanja egzosoma su diferencijalno i centrifugiranje u gradijentu gustoće saharoze, snimanje

transmisijskim elektronskim mikroskopom, western blot, masena spektroskopija i protočna citometrija (György i sur., 2011a).

2.2. Građa i svojstva mikrovezikula

Mikrovezikule (MVs), ili mikročestice (MPs, od engl. *microparticles*) kako ih neki autori nazivaju, prvi put su opisali Chargaff i West (1946) kao istaloživi faktor u plazmi bez trombocita koji ima potencijal stvarati trombin. Wolf (1967) je opisao „trombocitnu prašinu" kao frakciju koja je uglavnom sadržavala lipidima bogate čestice nakon ultracentrifugiranja svježe plazme.

Mikrovezikule su vanstanične vezikule omeđene fosfolipidnim dvoslojem te imaju promjer 100-1000 nm po nekima (Thery i sur., 2009), a po nekima 50-2000 nm (Akers i sur., 2013). Stopa otpuštanja mikrovezikula je općenito niska, osim u tumora koji ih otpuštaju konstitutivno (György i sur., 2011a). Veličinom se mikrovezikule preklapaju s bakterijama i netopljivim imunokompleksima (György i sur., 2011b), a manje mikrovezikule veličinom se preklapaju i s egzosomima, ali se od njih jasno razlikuju biogenezom (Akers i sur., 2013). Biogeneza mikrovezikula odvija se pupanjem stanične membrane prema van uslijed rearanžmana fosfolipida i kontrakcije proteina citoskeleta. Pupanje membrane započinje prebacivanjem fosfatidilserina u vanjski sloj dvosloja, a završava kontrakcijom, baziranom na međudjelovanju aktina i miozina, koja oslobađa vezikulu od stanične membrane (Akers i sur., 2013). Nastanak mikrovezikula prikazan je na Slici 3 na modelu melanoma koji je opisan od strane Muralidharan-Chari i sur. (2009) – aktivirani oblik ARF6 (engl. *ADP-ribosylation factor 6*) započinje signalizacijsku kaskadu koja počinje aktivacijom fosfolipaze D i završava aktivacijom lakog lanca miozina što omogućava međudjelovanje aktina i miozina. Otpuštanje mikrovezikula može se potaknuti aktivacijom receptora na površini stanice ili apoptozom.



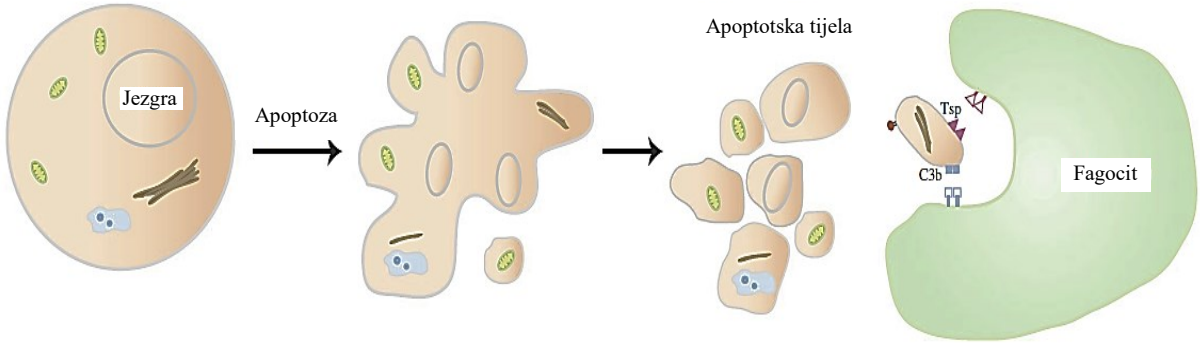
Slika 3.: Prikaz procesa nastanka mikrovezikula na modelu melanoma koji je opisan od strane Muralidharan-Chari i sur. (2009). Prvi korak u formiranju mikrovezikule podrazumijeva prebacivanje fosfatidilserina u vanjski sloj fosfolipidnog dvosloja što uzrokuje pupanje membrane, dok se drugi korak, korak odvajanja, odvija pomoću međudjelovanja aktina i miozina. Preuzeto iz Akers i sur. (2013).

Mikrovezikule najbolje su opisane u trombocita, eritrocita i endotelnih stanica, a neke od fizioloških uloga mikrovezikula su prokoagulativna aktivnost, sekrecija IL-1β, komunikacija fetusa i majke te indukcija onkogenih promjena u stanici (György i sur., 2011a). Kao biljege za otkrivanje mikrovezikula može se koristiti aneksin V zbog postojanja fosfatidilserina na površini lipidnog dvosloja, iako su pronađene i neke mikrovezikule bez fosfatidilserina na površini što predstavlja dodatnu komplikaciju pri njihovom otkrivanju, ARF6 te tkivno i stanično specifični biljezi (György i sur., 2011a; Akers i sur., 2013). Za razliku od egzosoma, mikrovezikule nemaju povećan udio receptora za transferine što, uz niz drugih biljega, omogućava lakše razlikovanje egzosoma od mikrovezikula (Akers i sur., 2013). U slučaju melanoma mikrovezikule su obogaćene receptorom za B1 integrin i VAMP3, što može poslužiti za njihovo otkrivanje (Muralidharan-Chari i sur., 2009). Najčešće korištene metode izolacije i otkrivanja mikrovezikula su diferencijalno centrifugiranje, protočna citometrija i metoda koja se temelji na hvatanju mikrovezikula (engl. *capture-based assay*) (György i sur., 2011a).

2.3. Građa i svojstva apoptotskih tijela

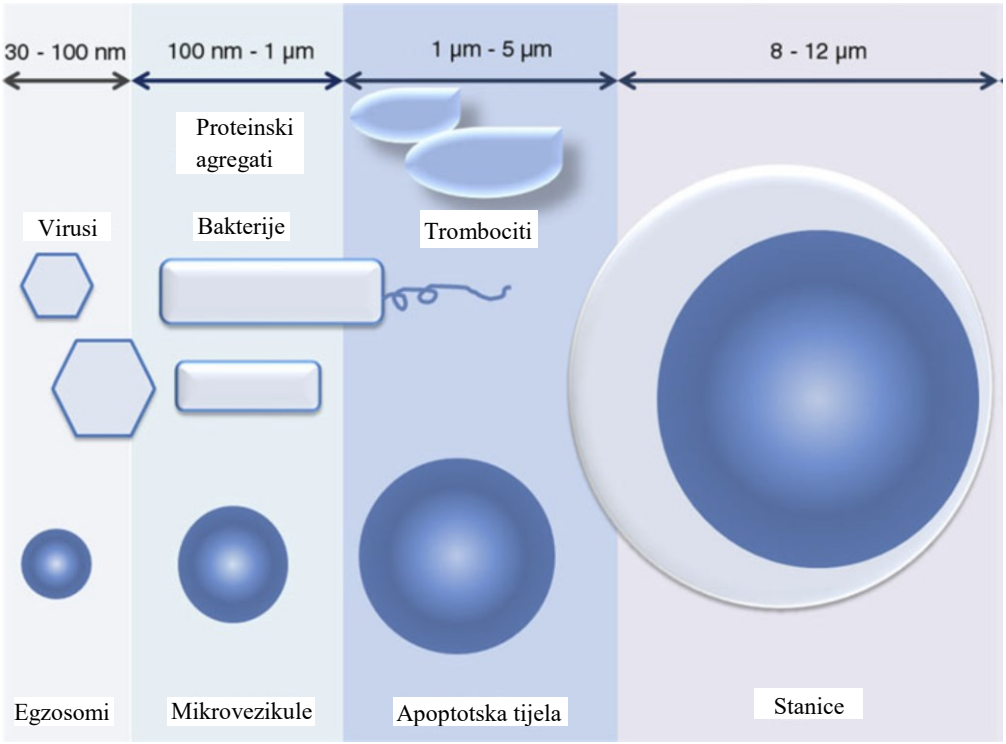
Pojam apoptotskog tijela u biologiju uveo je Kerr 1972. godine dok je proučavao proces apoptoze (Kerr i sur., 1972). Proučavajući razvoj oblića *Caenorhabditis elegans*, Fixsen i sur. (1985) otkrili su važnost apoptoze u procesu embriogeneze.

Apoptotska tijela, ili apoptosomi po nekima, membranske su vezikule omeđene fosfolipidnim dvoslojem, a promjera su 500-4000 nm po nekima (Akers i sur., 2013), a po nekima 1000-5000 nm (György i sur., 2011a) te se veličinom preklapaju s trombocitima. Nastaju isključivo u procesu programirane stanične smrti, odnosno apoptoze. Apoptoza, kao programirana stanična smrt, jedan je od glavnih mehanizama smrti normalnih i tumorskih stanica. Ona može biti aktivirana na više načina, a sam proces započinje kondenzacijom kromatina. Zatim slijedi pupanje membrane (engl. *membrane blebbing*) pa potpuno narušavanje cjelovitosti membrane uslijed koje dolazi do otpuštanja apoptotskih tijela u kojima se, za razliku od prije spomenutih egzosoma i mikrovezikula, mogu naći čitavi organeli (Akers i sur., 2013). Osim velikih apoptotskih tijela, tijekom apoptoze otpuštaju se i manje vezikule veličine 50-500 nm (Simpson & Mathivanan, 2012) za koje se trenutno ne zna sa sigurnošću nastaju li uslijed membranskog pupanja ili ne. Kao što je bio slučaj i kod mikrovezikula, nastanak apoptotskih tijela ovisi o međureakciji aktina i miozina (Sebbagh i sur., 2001). Razgradnja apoptotskih tijela odvija se fagocitozom od strane lokalno raspoređenih makrofaga koji prepoznaju apoptotska tijela preko promjena u svojstvima njihovih membrana. Dva najbolje opisana mehanizma prepoznavanja apoptotskih tijela su prepoznavanje fosfatidilserina u vanjskom sloju fosfolipidnog dvosloja i prepoznavanje oksidiranih površinskih molekula. Prepoznavanje fosfatidilserina odvija se preko aneksina V, dok se na oksidirane molekule na površini membrane apoptotskih tijela vežu trombospondin i protein komplementa C3b koje onda prepoznaje makrofag (Akers i sur., 2013). Gore opisan proces prikazan je na Slici 4.



Slika 4.: Proces formiranja apoptotskih tijela i njihove fagocitoze od strane fagocita. Fagocit (makrofag) prepoznaje trombospondin (Tsp) i C3b koji su vezani na oksidacijom oštećene molekule na membrani apoptotskog tijela. Preuzeto iz Preuzeto iz Akers i sur. (2013).

Kao što je prethodno spomenuto, apoptotska tijela opisana su samo u stanicama koje umiru apoptozom, a biljezi za njihovo prepoznavanje su aneksin V, trombospondin i C3b (György i sur., 2011a, Akers i sur., 2013). Osim njih prisutnost organela i molekula DNA, koji nisu prisutni u egzosomima i mikrovezikulama, može poslužiti kao biljeg apoptotskog tijela (György i sur., 2011a, Akers i sur., 2013). Neke od uloga apoptotskih tijela su horizontalni prijenos DNA (Holmgren i sur., 1999), horizontalni prijenos onkogena (Bergsmedh i sur., 2001), predočavanje epitopa T stanica nakon unosa u fagocitne stanice, (Bellone i sur., 1997) i imunosupresija (Savill i sur., 2002). Većina istraživanja bavi se proučavanjem apoptotskih tijela indirektno, koristeći se ko-kulturama stanica u apopotozi i stanica koje će primiti apopototska tijela. Kratak pregled raspona veličina tri prethodno opisane vrste vanstaničnih vezikula prema György i sur. (2011a) prikazan je na Slici 5.



Slika 5.: Prikaz raspona veličina vanstaničnih vezikula. Prema György i sur. (2011a) egzosomi su promjera 30-100 nm te se veličinom preklapaju s virusima, mikrovezikule su promjera 100-1000 nm te se preklapaju s bakterijama, a apoptotska tijela promjera su 1000-5000 nm i preklapaju se s trombocitima. Preuzeto iz György i sur. (2011a).

3. Izolacija i načini otkrivanja vanstaničnih vezikula

Vanstanične vezikule moguće je izolirati iz različitih tjelesnih tekućina kao što su krv, urin, cerebrospinalni likvor, limfa, suze, slina, nazalni sekret, tekućina nakupljena u peritonealnoj šupljini i sjeme (Akers i sur., 2013). Postojeći protokol za izolaciju egzosoma naširoko je prihvaćen i podrazumijeva nekoliko koraka – diferencijalno centrifugiranje kako bi se uklonio veći stanični otpad, zatim ultracentrifugiranje kako bi se vezikule spustile u talog (engl. *pellet*) i konačno ultracentrifugiranje u gradijentu gustoće saharoze kako bi se vezikule pročistile (György i sur., 2011a). Metode izolacije mikrovezikula nisu standardizirane, ali postoje preporuke kako izolirati mikrovezikule iz krvi. Izolaciji mikrovezikula iz krvi najveći problem predstavljaju trombociti. Uklanjanjem trombocita isključivo centrifugiranjem može dovesti do velikog gubitka mikrovezikula stoga se preporuča gravitacijska filtracija s porama veličine 800 nm kako bi se izbjegla fragmentacija vezikula u manje vezikule koja se može dogoditi ukoliko se primjenjuje prisilna filtracija (György i sur., 2011a; György i sur., 2011b). Standardizirane metode izolacije apoptotskih tijela također izostaju u literaturi. Prilikom

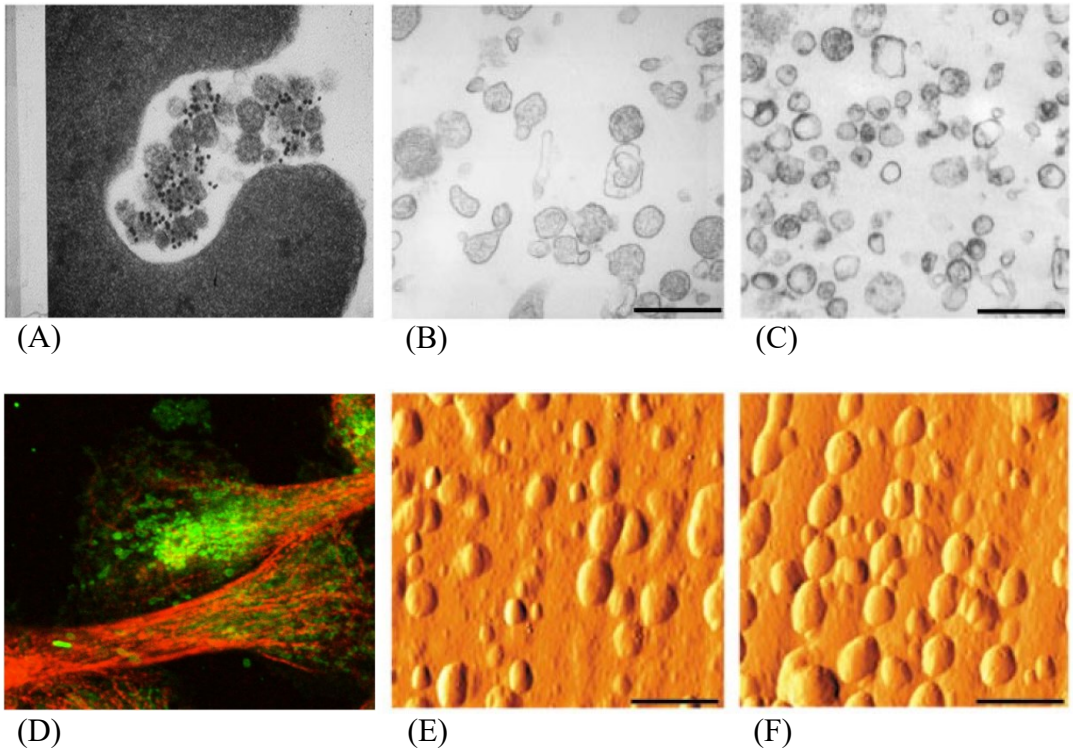
izolacije sve tri skupine vanstaničnih vezikula tri najveća problema predstavljaju gubitak vezikula u talog tijekom diferencijalnog centrifugiranja, preklapanje vezikula po veličini i fragmentacija vezikula samim postupkom izolacije (György i sur., 2011a).

Osim same izolacije vezikula problem predstavljaju i uvjeti od trenutka sakupljanja, preko čuvanja uzoraka do trenutka analize. Ovo predstavlja najveći problem u dijagnostici vanstaničnim vezikulama, poglavito mikrovezikulama iz krvi, stoga postoji potreba za standardizacijom svih koraka od prikupljanja uzoraka do analize – debljine igle za vađenje krvi, trajanja podvezivanja vene, tipa antikoagulansa, uvjeta centrifugiranja, regulacije temperature uzorka, vrijeme od uzorkovanja do analize i na kraju sam protokol analize (Yuana i sur., 2011). Različita istraživanja ukazuju na pojačano otpuštanje vezikula iz stanica uslijed mehaničkog stresa (Miyazaki i sur., 1996; Rubin i sur., 2010), ciklusa smrzavanja i odmrzavanja (Connor i sur., 2010), te uslijed same pohrane uzorka (Bode i sur., 1991; Rubin i sur., 2010).

U svrhu analize izoliranih vanstaničnih vezikula najčešće se koriste TEM, imunobojanje i TEM, AFM, DLS, protočna citometrija, fluorescentna mikroskopija, western blot i masena spektrometrija (Lötvall i sur., 2014). U svrhu određivanja veličine vezikula najpogodnije je koristiti protočnu citometriju kada je to moguće, ali treba imati na umu kako ova tehnika ima moć razlučivanja 200 nm te sve vezikule manje od toga ne mogu se razaznati od pozadinskog šuma aparata. Stoga je dobro koristiti i druge metode kao što je TEM, koja uvijek ostaje najbolja opcija za određivanje veličine vezikula, i AFM (György i sur., 2011a). Niti oni nisu bez mana pa postoje dokazi kako priprema vezikula za TEM utječe na njihovu morfologiju (Thery i sur., 2006), a kako šiljak AFM-a može dovesti do deformiranja membrane vezikule tijekom snimanja (Yuana i sur., 2010). Veličina vezikula također se može ustvrditi koristeći se dinamičkim raspršenjem svjetlosti, ali kojemu problem stvaraju uzorci koji su veoma neravnomjerno raspršeni (György i sur., 2011a). Slike dobivene ovim tehnikama analiziraju se kompjuterskim programima i dobiveni rezultati obrade se statistički.

Protokole za izolaciju mikrovezikula, TEM, imunobojanje i TEM, AFM, DLS, protočnu citometriju i fluorescentnu mikroskopiju opisali su György i sur. (2011b). Oni su u svom radu otkrili kako u otkrivanju mikrovezikula probleme stvaraju netopljivi imunokompleksi koji, zbog činjenice da mogu izazvati raznolike biološke odgovore, mogu dati krive rezultate i navesti na krive zaključke. Također su otkrili kako je moguće razlikovati imunokomplekse od mikrovezikula primjenom male koncentracije detergenta – u slučaju primjene detergenta vezikule se raspadaju dok imunokompleksi ostaju čitavi. Primjeri nekih slika koje daju ove tehnike prikazane su na Slici 6. U svrhu karakterizacije proteina i nukleinskih kiselina, prije svega RNA molekula, koje vanstanične vezikule sadrže koriste se standardne metode kao što

su western blot, DNA mikročip (engl. *microarray assay*), masena spektrometrija, ELISA, RT-PCR i sekvenciranje itd (György i sur., 2011a; György i sur., 2011b; Akers i sur., 2013).



Slika 6.: Prikaz slika dobivenih TEM-om, AFM-om i fluorescencijskim mikroskopom. (A) EM snimka fuzije membrane multivezikularnog tijela i stanične membrane u ovčjeg retikulocita te oslobađanje egzosoma. Prilikom imunobojanja korištena su monoklonalna antitijela specifična za transferinski receptor obilježena zlatom. Povećanje je 98.625 puta. Preuzeto iz Pan i sur. (1985). (B) i (C) EM snimka mikrovezikula iz krvi zdravih pojedinaca (B) i iz sinovijalne tekućine oboljelih od reumatoidnog artritisa (C) nakon pozitivnog kontrastiranja. Povećanje 50.000 puta, skala iznosi 500 nm. Preuzeto iz György i sur. (2011a). (D) Ulazak egzosoma iz B stanica inficiranih s Epstein-Barrovim virusom u dendritičke stanice snimljen fluorescencijskom mikroskopijom. Zelenom fluorescencijom obilježeni su egzosomi, a crvenom aktin kao dio citoskeleta. Preuzeto iz van Dongen i sur. (2016). (E) i (F) Snimke mikrovezikula iz krvi zdravih pojedinaca (E) i iz sinovijalne tekućine oboljelih od reumatoidnog artritisa (F) snimljene mikroskopijom atomskih sila (AFM). Skala iznosi 500 nm. Preuzeto iz György i sur. (2011a).

4. Uloga vanstaničnih vezikula u bolestima i njihova primjena u medicini

Zbog već prethodno spomenute očuvanosti procesa otpuštanja vanstaničnih vezikula, kliničari ih mogu iskoristiti u svrhu dijagnostike čitavog niza bolesti. Najviše se koriste egzosomi, pogotovo kao tumorski biljezi, i mikrovezikule koje dobivaju na popularnosti zbog svoje veličine i dostupnosti u biološkim uzorcima. Najčešće se istražuju mikrovezikule porijeklom iz endotelnih stanica (eMV, od engl. *endothelial-derived MV*) i mikrovezikule porijeklom iz trombocita (pMV, od engl. *platelet-derived MV*), ali se sve više istražuju vanstanične vezikule tumorskog porijekla (György i sur., 2011a).

Endotelne stanice mogu otpuštati egzosome, mikrovezikule (eMV) i apoptotska tijela. Otpuštanje endotelnih mikrovezikula može se *in vitro* inducirati lipopolisaharidima, reaktivnim kisikovim skupinama (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) i različitim citokininima, a kao biljezi za otkrivanje protočnom citometrijom koriste se CD31, CD54, CD62E, CD62P, CD105, CD106, CD144 i CD146, koji se inače koriste kao biljezi endotelnih stanica (Dignat-George & Boulanger, 2011). Dosadašnja istraživanja opisuju endotelne mikrovezikule kao biljege upala, endotelnih ozljeda i disfunkcija (Amabile i sur., 2005; Esposito i sur., 2006) što bi značilo da se mogu iskoristiti za predviđanje kardiovaskularnog zdravlja, odnosno bolesti, za koje se zna da je povezano s disfunkcijom endotela (Lin i sur., 2017). Povišene vrijednosti endotelnih mikrovezikula pronađene su u plazmi pacijenata koji boluju od kardiovaskularnih oboljenja kao što su akutni infarkt miokarda (Mallat i sur., 2000; Nozaki i sur., 2009), teška hipertenzija (Preston i sur., 2003), duboka venska tromboza (Chirinos i sur., 2005; Bal i sur., 2010) i plućna hipertenzija (Amabile i sur., 2008; Diehl i sur., 2011), pacijenata koji boluju od autoimunih bolesti kao što su sistemski eritemski lupus (Pereira i sur., 2006; Sellam i sur., 2009), *dijabetes mellitus* tipa 1 (Sabatier i sur., 2002), multipla skleroza (Sheremata i sur., 2008) i vaskulitis (Erdbruegger i sur., 2008), te pacijenata koji boluju od zadnje faze zatajenja bubrega (Amabile i sur., 2005), sepse (Mostefai i sur., 2008) i preeklampsije (Goswami i sur., 2006). Same endotelne mikrovezikule doprinose razvoju kardiovaskularnih ozljeda i skrućivanju arterija aktivacijom endotelnih stanica i indukcijom pro-upalnih procesa zbog čega dolazi do smanjene mogućnosti vazorelaksacije arterija (Brodsky i sur., 2004; Ridger i sur., 2017). Endotelne mikrovezikule također mogu potaknuti koagulaciju i trombozu (Dignat-George & Boulanger, 2011). Unatoč ovim negativnim karakteristikama, endotelne mikrovezikule mogle bi imati ulogu u indukciji angiogeneze, iako većina istraživanja ukazuje kako ju inhibiraju (Ridger i sur., 2017), i poticanju preživljenja endotelnih stanica (György i sur., 2011a).

Trombociti u plazmu otpuštaju trombocitne mikrovezikule (pMV) koje čine većinu mikrovezikula u krvnoj plazmi. Otpuštanje trombocitnih mikrovezikula *in vivo* događa se tijekom aktivacije trombocita ili iz megakariocita, dok se *in vitro* otpuštanje trombocitnih mikrovezikula stimulira kolagenom, trombinom, ADP-om (adenozin difosfat), ali i stresom i agitacijom što predstavlja problem pri njihovom korištenju u dijagnostičke svrhe kao što je prethodno spomenuto. Trombocitne mikrovezikule mogu se otkriti protočnom citometrijom koristeći se biljezima CD41, CD42, CD61 i CD62 (György i sur., 2011a). Kao što endotelne mikrovezikule sudjeluju u aktivaciji endotelnih stanica, vjeruje se da i trombocitne igraju ulogu u aktivaciji trombocita stoga je povećana količina trombocitnih mikrovezikula prisutna u mnogim bolestima. Povećane vrijednosti trombocitnih mikrovezikula pronađene su u pacijenata koji boluju od prethodno spomenutih autoimunih bolesti i oboljelih od reumatoidnog artritisa (Sellam i sur., 2009; Boilard i sur., 2010), pacijenata koji boluju od gore spomenutih kardiovaskularnih bolesti, pacijenata koji boluju od raka želuca (Kim i sur., 2003), te kod pacijenata koji boluju od Alzheimerove bolesti (Matsubara i sur., 2002), *dijabetesa mellitusa* tipa 2 (Tan i sur., 2005), prethodno spomenute preeklampsije, i sepse (Mostefai i sur., 2008). Kao i endotelne mikrovezikule, trombocitne mikrovezikule bi mogle imati utjecaj na razvoj kardiovaskularnih bolesti zbog svog potencijala da uzrokuju trombozu (György i sur., 2011a; Ridger i sur., 2017). Zbog svoje velike adhezivne površine, mogućnosti vezanja na endotelne stanice, leukocite i molekule matriksa (Li & Cong, 2009) te mogućnosti da aktiviraju stanice imunosnog sustava trombocitne mikrovezikule bi mogle biti važni igrači u procesima upale i autoimunosti (György i sur., 2011a).

Tumorske stanice konstitutivno ispuštaju vanstanične vezikule među kojima su egzosomi, mikrovezikule i apoptotska tijela (György i sur., 2011a). Kao i kod endotelnih i trombocitnih mikrovezikula, vanstanične vezikule tumorskih stanica također nose površinske biljege koji su specifični za stanice iz kojih su vezikule nastale. Osim specifičnih površinskih molekula, vanstanične vezikule nastale iz tumorskih stanica mogu sadržavati i RNA molekule karakteristične za stanice iz kojih su nastale, od kojih su posebno zanimljive miRNA molekule. miRNA molekule dio su sustava regulacije ekspresije gena koje ne bi mogle preživjeti nezaštićene izvan stanica, no tom problemu doskaču upravo vanstanične vezikule. Okruživanjem miRNA, ali i drugih RNA, molekula štite ih od razaranja te takve lipidima okružene miRNA molekule omogućavaju regulaciju ekspresije gena između stanica. Takve zaštićene miRNA molekule pronađene su u serumu, plazmi, slini i majčinom mlijeku (Kosaka i sur., 2010), a pošto su specifične za tumorske stanice iz kojih su nastale, vanstanične vezikule koje ih sadrže mogu poslužiti kao nova vrsta bioloških biljega za otkrivanje i karakterizaciju

tumora (Kosaka i sur., 2010). Na temelju tih saznanja razvijene su metode za dijagnosticiranje tumora prostate (Kuslich i sur., 2010) i kolorektalnog tumora (Spetzler i sur., 2010) na temelju vanstaničnih vezikula iz plazme pacijenata. Osim velikog dijagnostičkog potencijala kojeg imaju vanstanične vezikule, predložena je i mogućnost korištenja vanstaničnih vezikula kao novih terapeutskih pripravaka protiv tumora kao i mogućnost korištenja vanstaničnih vezikula kao vektora za gensku terapiju (György i sur., 2011a).

5. Zaključci

Sveprisutne vanstanične vezikule u posljednje vrijeme postale su bitna tema stanične biologije, ali i medicine, zbog velikog potencijala u dijagnostici te čak i u terapijskom liječenju. Njihovo otpuštanje je proces koji je konzerviran u svim domenama života, a odvija se kako u fiziološkim, tako i u patološkim uvjetima što govori o njihovoj važnosti. Općeprihvaćena podjela vanstaničnih vezikula na temelju njihove biogeneze razlikuje egzosome, koji nastaju fuzijom multivezikularnih tijela i stanične membrane, mikrovezikule, koje nastaju pupanjem stanične membrane, i apoptotska tijela, koja nastaju iz stanice koje umiru apoptozom.

Same karakteristike vanstaničnih vezikula ovise o tipu vezikula i njihovom porijeklu. Otpuštaju ih sve stanice – normalne, aktivirane i tumorske, ali stopa kojom ih otpuštaju aktivirane i tumorske stanice je povećana. Osim po stopi otpuštanja, vezikule se razlikuju i po svojem proteinskom i nukleinskom sastavu koji ovisi o tipu stanice iz koje je vezikula nastala. Važnost vanstaničnih vezikula proizlazi iz činjenice da omogućavaju komunikaciju između stanica bilo međudjelovanjem proteina koji se nalaze na površini vezikule s proteinima koji se nalaze na površini stanične membrane, bilo unosom sadržaja u recipijentnu stanicu. Međudjelovanjem površinskih proteina može doći do stanične signalizacije, dok unosom nukleinskih kiselina, poglavito mRNA i miRNA, može doći do kontrole ekspresije gena recipijentne stanice na posttranskripcijskoj razini.

U svrhu otkrivanja i karakterizacije vanstaničnih vezikula koriste se transmisijski elektronski mikroskop (TEM), imunobojanje i TEM, mikroskopija atomskih sila (AFM), dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS), protočna citometrija (FC) i fluorescencijska mikroskopija. Dotične metode se usavršavaju kako na vidjelo izlazi povezanost vanstaničnih vezikula s fiziološkim, a pogotovo patološkim procesima. Daljnje usavršavanje tehnologije i znanja o vanstaničnim vezikulama te činjenica da vanstanične vezikule reflektiraju svojstva stanica iz kojih nastaju mogli bi omogućiti razvoj i primjenu novih metoda otkrivanja i karakterizacije tumorskih, ali i drugih oboljenja. Osim dijagnostike, vanstanične vezikule

mogle bi jednog dana igrati ključnu ulogu u ciljanoj dostavi lijekova među kojima se nalazi i genska terapija. Stoga, može se zaključiti kako je budućnost svijetla za područje vanstaničnih vezikula.

6. Literatura

Akers J.C., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C. 2013. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. J Neurooncol 113(1):1-11

Al-Nedawi K., Meehan B., Micallef J., Lhotak V., May L., Guha A., Rak J. 2008. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nat Cell Biol 10(5):619–624

Amabile N., Guerin A.P., Leroyer A., Mallat Z., Nguyen C., Boddaert J., London G.M., Tedgui A., Boulanger C.M. 2005. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. J Am Soc Nephrol 16(11):3381–3388

Amabile N., Heiss C., Real W.M., Minasi P., McGlothlin D., Rame E.J., Grossman W., De Marco T., Yeghiazarians Y. 2008. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. Am J Respir Crit Care Med 177(11):1268–1275

Bal L., Ederhy S., Di Angelantonio E., Toti F., Zobairi F., Dufaitre G., Meuleman C., Mallat Z., Boccara F., Tedgui A., Freyssinet J.M., Cohen A. 2010. Circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism: a case-control study. Int J Cardiol 145(2):321–322

Bellone M., Iezzi G., Rovere P., Galati G., Ronchetti A., Protti M.P., Davoust J., Rugarli C., Manfredi A.A. 1997. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. J Immunol 159(11):5391–5399

Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M.J., Spetz A.L., Holmgren L. 2001. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. Proc Natl Acad Sci USA 98(11):6407–6411

Bode A.P., Orton S.M., Frye M.J., Udis B.J. 1991. Vesiculation of platelets during in vitro aging. Blood 77(4):887–895

Boilard E., Nigrovic P.A., Larabee K., Watts G.F., Coblyn J.S., Weinblatt M.E., Massarotti E.M., Remold-O'Donnell E., Farndale R.W., Ware J., Lee D.M. 2010. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. Science 327(5965):580–583

Brodsky S.V., Zhang F., Nasjletti A., Goligorsky M.S. 2004. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol 286(5):H1910–H1915

Chargaff E., West R. 1946. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. J Biol Chem 166(1):189–197

Chirinos J.A., Heresi G.A., Velasquez H., Jy W., Jimenez J.J., Ahn E., Horstman L.L., Soriano A.O., Zambrano J.P., Ahn Y.S. 2005. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. J Am Coll Cardiol 45(9):1467–1471

Connor D.E., Exner T., Ma D.D., Joseph J.E. 2010. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. Thromb Haemost 103(5):1044–1052

Diehl P., Aleker M., Helbing T., Sossong V., Germann M., Sorichter S., Bode C., Moser M. 2011. Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. J Thromb Thrombolysis 31(2):173-9

Dignat-George F., Boulanger C.M. 2011. The many faces of endothelial microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31(1):27–33

Erdbruegger U., Grossheim M., Hertel B., Wyss K., Kirsch T., Woywodt A., Haller H., Haubitz M. 2008. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. Rheumatology (Oxford) 47(12):1820–1825

Esposito K., Ciotola M., Schisano B., Gualdiero R., Sardelli L., Misso L., Giannetti G., Giugliano D. 2006. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. J Clin Endocrinol Metab 91(9):3676–3679

Fixsen W., Sternberg P., Ellis H., Horvitz R. 1985. Genes that affect cell fates during the development of Caenorhabditis elegans. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 50:99–104

Goswami D., Tannetta D.S., Magee L.A., Fuchisawa A., Redman C.W., Sargent I.L., von Dadelszen P. 2006. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset preeclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. Placenta 27(1):56–61

György B., Módos K., Pállinger E., Pálóczi K., Pásztói M., Misják P., Deli M.A., Sipos A., Szalai A., Voszka I., Polgár A., Tóth K., Csete M., Nagy G., Gay S., Falus A., Kittel A., Buzás E.I. 2011b. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. Blood. 117(4):e39-48

György B., Szabó T.G., Pásztói M., Pál Z., Misják P., Aradi B., László V., Pállinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzás E.I. 2011a. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci 68(16):2667-88

Harding C., Heuser J., Stahl P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. J Cell Biol 97(2):329–339

Holmgren L., Szeles A., Rajnavolgyi E., Folkman J., Klein G., Ernberg I., Falk K.I. 1999. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. Blood 93(11):3956–3963

Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J Biol Chem 262(19):9412-20.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26(4):239–257

Kim H.K., Song K.S., Park Y.S., Kang Y.H., Lee Y.J., Lee K.R., Ryu K.W., Bae J.M., Kim S. 2003. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in

patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. Eur J Cancer 39(2):184–191

Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. Cancer Sci 101(10):2087–2092

Kuslich C., Pawlowski T., Kimbrough J., Deng T., Tinder T., Kim J., Spetzler D. 2010. Plasma exosomes are a robust biosignature for prostate cancer. In: Paper presented at the American Academy of Cancer Research, Washington D.C

Li X., Cong H. 2009. Platelet-derived microparticles and the potential of glycoprotein IIb/IIIa antagonists in treating acute coronary syndrome. Tex Heart Inst J 36(2):134–139

Lin Z.-B., Ci H.-B., Li Y., Cheng T.-P., Liu D.-H., Wang Y.-S., Xu J., Yuan H.-X., Li H.-M., Chen J., Zhou L., Wang Z.-P., Zhang X., Ou Z.-J., Ou J.-S. 2017. Endothelial microparticles are increased in congenital heart diseases and contribute to endothelial dysfunction. J Transl Med. 15: 4

Lötvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzás E.I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y.S., Kurochkin I.V., Mathivanan S., Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M.H., Witwer K.W., Théry C. 2014. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. J Extracell Vesicles. 3:26913

Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg P.G., Freyssinet J.M., Tedgui A. 2000. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. Circulation 101(8):841–843

Matsubara E., Shoji M., Murakami T., Abe K., Frangione B., Ghiso J. 2002. Platelet microparticles as carriers of soluble Alzheimer's amyloid beta (sAbeta). Ann NY Acad Sci 977: 340–348

Miyazaki Y., Nomura S., Miyake T., Kagawa H., Kitada C., Taniguchi H., Komiyama Y., Fujimura Y., Ikeda Y., Fukuhara S. 1996. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. Blood 88(9):3456–3464

Mostefai H.A., Meziani F., Mastronardi M.L., Agouni A., Heymes C., Sargentini C., Asfar P., Martinez M.C., Andriantsitohaina R. 2008. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. Am J Respir Crit Care Med 178(11):1148–1155

Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., D'Souza-Schorey C. 2009. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. Curr Biol. 19(22):1875-85

Nozaki T., Sugiyama S., Koga H., Sugamura K., Ohba K., Matsuzawa Y., Sumida H., Matsui K., Jinnouchi H., Ogawa H. 2009. Significance of a multiple biomarkers strategy including endothelial dysfunction to improve risk stratification for cardiovascular events in patients at high risk for coronary heart disease. J Am Coll Cardiol 54(7):601–608

Pan B.T., Teng K., Wu C., Adam M., Johnstone R.M., 1985, Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes, J Cell Biol 101(3): 942–948

Pereira J., Alfaro G., Goycoolea M., Quiroga T., Ocqueteau M., Massardo L., Perez C., Saez C., Panes O., Matus V., Mezzano D. 2006. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. Thromb Haemost 95(1):94–99

Preston R.A., Jy W., Jimenez J.J., Mauro L.M., Horstman L.L., Valle M., Aime G., Ahn Y.S. 2003. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. Hypertension 41(2): 211–217

Ridger V.C., Boulanger C.M., Angelillo-Scherrer A., Badimon L., Blanc-Brude O., Bochaton-Piallat M.L., Boilard E., Buzas E.I., Caporali A., Dignat-George F., Evans P.C., Lacroix R., Lutgens E., Ketelhuth D.F.J., Nieuwland R., Toti F., Tunon J., Weber C. 2017. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. Thromb Haemost 117(7):1296-1316

Rubin O., Crettaz D., Tissot J.D., Lion N. 2010. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics. Talanta 82(1):1–8

Sabatier F., Darmon P., Hugel B., Combes V., Sanmarco M., Velut J.G., Arnoux D., Charpiot P., Freyssinet J.M., Oliver C., Sampol J., Dignat-George F. 2002. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. Diabetes 51(9):2840–2845

Savill J., Dransfield I., Gregory C., Haslett C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. Nat Rev Immunol 2(12):965–975

Sebbagh M., Renvoizé C., Hamelin J., Riché N., Bertoglio J., Bréard J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. Nat Cell Biol 3(4):346-52

Sellam J., Proulle V., Jüngel A., Ittah M., Miceli Richard C., Gottenberg J.E., Toti F., Benessiano J., Gay S., Freyssinet J.M., Mariette X. 2009. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. Arthritis Res Ther 11(5):R156

Sheremata W.A., Jy W., Horstman L.L., Ahn Y.S., Alexander J.S., Minagar A. 2008. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. J Neuroinflamm 5:27

Simpson R.J., Mathivanan S. 2012. Extracellular microvesicles: the need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria. J Proteomics Bioinform 5:ii–ii

Spetzler D., Pawlowski T., Kimbrough J., Deng T., Tinder T., Kim J., Kuslich C. 2010. Plasma exosome-based biosignatures: a novel method for early diagnosis of colorectal cancer. Proceedings: AACR 101st Annual Meeting 2010

Tan K.T., Tayebjee M.H., Lim H.S., Lip G.Y. 2005. Clinically apparent atherosclerotic disease in diabetes is associated with an increase in platelet microparticle levels. Diabet Med 22(12): 1657–1662

Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol (Chapter 3:Unit 3) 22

Thery C., Ostrowski M., Segura E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. Nat Rev Immunol 9(8):581–593

Trams E.G., Lauter C.J., Salem N. Jr, Heine U. 1981. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochim Biophys Acta 645(1):63–70

Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J.J., Lotvall J.O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 9(6):654–659

van Dongen H.M., Masoumi N., Witwer K.W., Pegtel D.M. 2016. Extracellular Vesicles Exploit Viral Entry Routes for Cargo Delivery. Microbiol Mol Biol Rev. 80(2):369-86

Wolf P. 1967. The nature and significance of platelet products in human plasma. Br J Haematol 13(3):269–288

Yuana Y., Bertina R.M., Osanto S. 2011. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. Thromb Haemost 105(3):396-408

Yuana Y., Oosterkamp T.H., Bahatyrova S., Ashcroft B., Garcia Rodriguez P., Bertina R.M., Osanto S. 2010. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. J Thromb Haemost 8(2):315–323

7. Sažetak

Vanstanične vezikule, čiji je proces otpuštanja konzerviran u svim domenama života, dio su relativno novootkrivenog vanstaničnog vezikularnog odjeljka koji se sastoji od egzosoma, mikrovezikula i apoptotskih tijela. Zbog svojih mogućnosti da prenose makromolekule između stanica i time omoguće staničnu komunikaciju te zbog njihove uključenosti u niz fizioloških i patoloških procesa, vanstanične vezikule postale su vruća tema stanične biologije i medicine.

U ovom radu iznesen je kratak pregled glavnih karakteristika tri glavne skupine vanstaničnih vezikula, metoda i problema povezanih s njihovim otkrivanjem te ulogom vanstaničnih vezikula u bolestima i njihovoj dijagnostici. Vanstanične vezikule predstavljaju obećavajući izvor informacija o mnogim bolestima među kojima su najznačajnije kardiovaskularne, autoimune i tumorske bolesti. Osim u dijagnostici, vanstanične vezikule imaju potencijalnu primjenu u ciljanom liječenju bolesti, od tumorskih bolesti pa sve do genske terapije, što ih čini interesantnima za daljnja istraživanja.

8. Summary

Extracellular vesicles, whose release is a conserved process in all domains of life, are a part of a relatively new-found extracellular vesicular compartment that is made up of exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies. Because of their abilities to transfer macromolecules between cells and thus allow cell-to-cell communication, and because of their known involvement in a number of physiological and pathological processes, extracellular vesicles have become a hot topic in cell biology and medicine.

This paper covers a short review of the main characteristics of three main groups of extracellular vesicles, methods and problems related to their detection, and roles of extracellular vesicles in diseases and their diagnostics. Extracellular vesicles present themselves as a promising source of information about a variety of diseases among which the most significant are cardiovascular, autoimmune and cancer diseases. Except in diagnostics, extracellular vesicles have a potential in targeted therapy, from cancer diseases to gene therapy, thus making extracellular vesicles an interesting subject for research.