

nefunkční fibrózou, kolagenní jizvou nebo granulomem (ohraňčením škodliviny obrovskými makrofágy a lymfocyty).

Optimální ukončení zánětu by znamenalo návrat k normálu – *restitutio ad integrum*. Toho ovšem, vzhledem ke složitosti celého procesu a případnému chybění či mutaci určitých obranných složek u některých jedinců, není často možné dosáhnout. Patogeny se neustále vyvíjejí a mění své strategie, a to mnohem rychleji, než se jim stačí přizpůsobovat složitý imunitní systém pomalu se reprodukcujícího hostitele. Mikroorganismy využívají mimikry z molekul hostitele, potlačují imunitní odpověď, stimuluji tvorbu protizáněťových cytokinů, inhibují tvorbu prozáněťových faktorů nebo šíří v systému obrany hostitele dezinformaci. Rychlou horizontální výměnou genů (např. pro rezistenci k antibiotikům) doplňují patogenní bakterie svůj genom využívajíce jeho plasticity a své rychlé reprodukce. Imunitní systém může naproti tomu svými stereotypními odpověďmi způ-

sobit velké škody vlastnímu organismu. Osudné chyby v regulaci vedou u akutního zánětu k chronicitě, v horším případě k cytokinové bouři (cytokine storm).

Cytokinová bouře

Jde o patologický rozvrat v regulaci mechanismů zánětu. Následkem nekontrolované pozitivní zpětné vazby nastane nadměrné zvýšení systémové koncentrace interleukinů 1, 6, 10, faktoru TNF alfa a desítek dalších mediátorů zánětu, což vede k poklesu krevního tlaku, poruchám srážlivosti a multiorgánovému selhání.

Syndrom cytokinové bouře bývá spojován s pandemií „španělské“ chřipky v r. 1918 (důkazy byly nalezeny v lidských tkáních uchovaných v permafrostu), s epidemií ptačí chřipky H5N1, krvácivými horečkami způsobenými filoviry či hantaviry nebo respiračním syndromem SARS a MERS. Může se vyskytnout u gramnegativní bakteriální sepsy, ale také u některých neinfekčních akutních zánětů.

Cytokinová bouře se objevila nešťastnou náhodou i u 6 dobrovolníků při prvním testování nového léku proti leukemii na lidech 13. března 2006 v londýnské nemocnici Northwick Hospital. Příčinou byla aplikace TGN1412, protilátky proti aktivací molekul CD28 na membráně T lymfocytů. Sérová koncentrace TNF alfa stoupla už za čtyři hodiny až 1 560krát, přestože muži dostali dávku léku 500krát menší než pokusná zvířata, jež neměla negativní reakci. Již za 90 minut po podání anti-CD28 nastal prudký pokles krevního tlaku a po 12 hodinách se objevilo poškození plic, selhávání ledvin a diseminovaná intravaskulární koagulace – tvorba sraženin v cévách důležitých orgánů. Jen zázrakem všichni přežili na jednotkách intenzivní péče. Malý německý výrobce TGN1412 společnost TeGenero poté zkrachovala. Tento dramatický příběh je mementem, že v pochopení zánětu jsme dosud na počátku obtížné a dlouhé cesty.

Helena Kupcová Skalníková, Hana Kovářová

Extracelulární váčky II. Exozomy a jejich význam u patofyziologických stavů člověka

Extracelulární váčky jsou útvary menší než jeden mikrometr obalené lipidovou membránou, uvolňované z buněk do vnějšího prostoru. Zprostředkovávají přenos látek mezi buňkami a účastní se tím mezibuněčné komunikace. Řadí se k nim zejména apoptotická tělíska, mikrovezikuly a exozomy, které se navzájem liší velikostí a způsobem vzniku. Blíže je o jednotlivých typech váček a jejich funkcích u bakterií, prvků, rostlin a živočichů pojednáno v předchozím dílu (Živa 2016, 6: 274–277). Druhý díl zaměříme na exozomy, které jsou nejlépe prozkoumané a u nichž se očekává praktické využití v diagnostice a léčbě patofyziologických stavů člověka. Názvosloví váček používané různými autory se poněkud liší. V našem článku používáme pojem exozom, pokud je jasné, že jde o tento typ váčky, v ostatních případech zůstaneme u obecného označení extracelulární váček.

Exozomy jsou velmi malé váčky o průměru 30–100 nm pozorovatelné pouze v elektronovém mikroskopu (obr. 1). Vznikají vylitím vnitřních váček multivezikulárních tělísek (MVB) ven z buňky (o vzniku exozomů blíže v předchozím dílu). Do exozomů je během jejich tvorby zabudována část proteinů a nukleových kyselin původní buňky. Mohou se tak stát zdrojem molekul (tzv. biomarkerů), jejichž přítomnost či množství jsou ovlivněny určitým patologickým procesem. Předpokládá se, že exozomy přítomné v tělních tekutinách člověka (např. v krvi nebo moči) bude možné využít v diagnostice chorobných stavů. Z těchto důvodů jsou možnosti izolace exozomů z různých tělesných tekutin

a složení těchto váček předmětem intenzivního výzkumu.

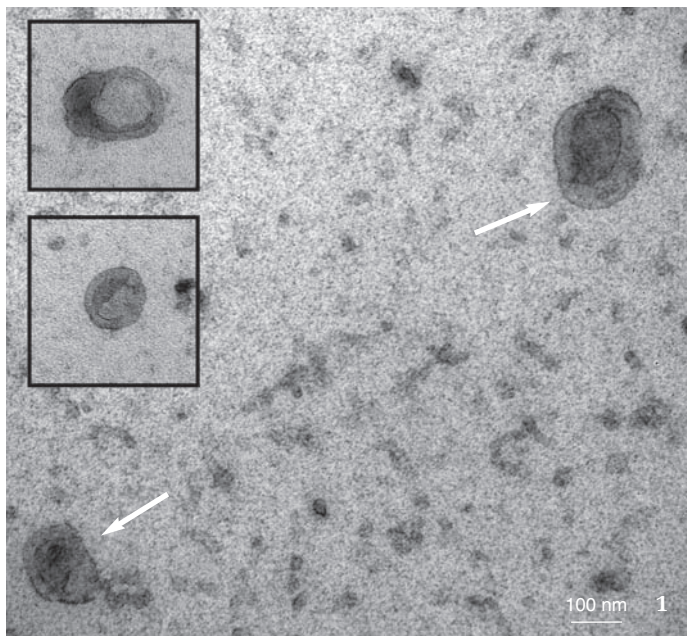
Izolace exozomů

Tento typ váček se nejčastěji získává z tělních tekutin (z krevní plazmy, moči, mozkomíšního moku, slin) nebo z živých médií po kultivaci buněk *in vitro* v buněčných a tkáňových kulturách. Z tekutin je lze izolovat pomocí tří základních technik – ultracentrifugací, protilátkami na magnetických kuličkách a gelovou filtrační chromatografií (anglicky size-exclusion chromatography). Uvedeným technikám může ještě předcházet filtrace vzorku přes filtr s velikostí pórů 0,45 nebo 0,22 μm k odstranění větších částic. Při izolaci exozomů musíme

brát v úvahu, že biologické tekutiny a kulturační média obsahují i další typy váček (menší mikrovezikuly a apoptotická tělíska) a různé částice (viry, agregáty proteinů, lipoproteiny), které mají podobnou velikost a mohou představovat obtížné odstranitelné kontaminace vzorků exozomů. Proto je nezbytné zvolit vhodnou techniku nebo kombinaci technik a důkladně ověřit nejen množství, ale také kvalitu a čistotu izolovaných exozomů. To platí zvláště pro následné studium jejich složení molekulárně-biologickými a proteomickými metodami nebo pro funkční studie jejich vlivu na cílové buňky.

K izolaci exozomů se nejčastěji používá diferenciální nebo gradientová ultracentrifugace. Diferenciální centrifugace v několika krocích s narůstajícím přetížením (g) odstraní buňky a další nežádoucí složky (obr. 3). V závěrečném kroku s přetížením 100 tisíc až 200 tisíc g se exozomy usadí na dně zkumavky. Pro získání čistých izolátů je vhodná ultracentrifugace v gradientu – k jeho tvorbě slouží roztoky sacharózy nebo iodixanolu o různé koncentraci, a tím i hustotě, které se navrství do ultracentrifugačních zkumavek. Vzorek obsahující exozomy nanášíme buď na povrch gradientu, nebo na dno zkumavky. Po mnohahodinové ultracentrifugaci se váčky a jiné částice v gradientu rozdělí podle své vzájemné hustoty. Exozomy se izolují z frakcí o hustotě 1,13–1,19 g/ml.

Jiná technika využívá magnetické mikrokuličky potažené protilátkou rozpoznávající určité povrchové proteiny exozomů. Touto metodou jsou vycytány váčky a částice bez ohledu na svou velikost. Mikrokuličky se smíchají se vzorkem tělní tekutiny nebo kulturačního média obsahujícího exozomy. Poté se pomocí magnetu vycytají kuličky s navázanými exozomy. K jejich izolaci se používají protilátky proti molekulám přítomným na většině exozomů – jako CD63 (bílkovina ukotvená v membráně exozomů i buněk; podle mezinárodní dohody se povrchové bílkoviny buněk označují jako CD – Cluster of Differentiation, a pořadovým číslem), nebo



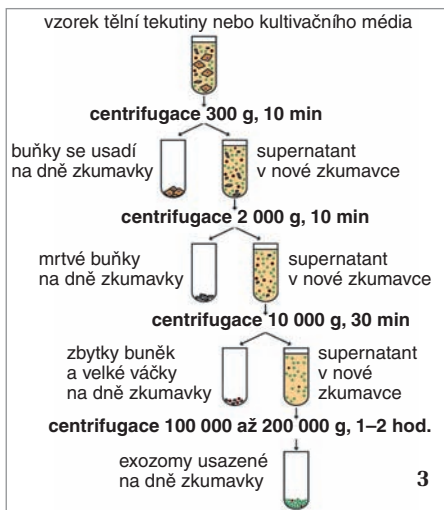
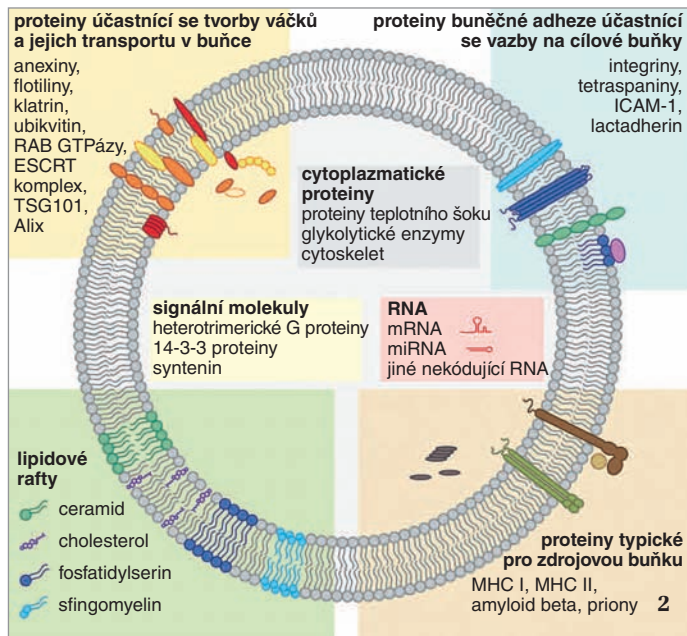
1 Exozomy produkované buňkami nádoru prsu během kultivace *in vitro*. V transmisním elektronovém mikroskopu mají typický miskovitý tvar (viz šipky a vložené výřezy). Zvětšení 100 000×. Foto H. Kupcová Skalníková

2 Složení exozomů. Tyto váčky jsou obaleny membránou z dvouvrstvy lipidů, částečně uspořádaných do lipidových raftů (blíže v textu). Součástí membrány tvoří proteiny účastnící se tvorby a transportu váčků a také proteiny zprostředkující vazbu na cílové buňky (adhezni molekuly). V membráně některých exozomů jsou zakotveny proteiny hlavního histokompatibilního komplexu I a II (MHC I a MHC II) vázající antigeny a umožňující jejich rozeznání imunitními buňkami. Uvnitř exozom obsahuje zejména cytoplazmatické proteiny a RNA.

ESCRT představuje hlavní proteinový komplex, který směřuje proteiny k zabudování do multivesikulárních tělísek, a tím i do budoucích exozomů.

3 Izolace exozomů diferenciální centrifugací využívá několik centrifugačních kroků při různém přetížení (g), tím se ze vzorku postupně odstraní různé kontaminující složky. V závěrečném ultracentrifugačním kroku se exozomy usadí na dně zkumavky. Spolu s nimi mohou zůstat i některé nežádoucí částice o blízké velikosti a hustotě.

Lze izolovat váčky pocházející jen z určité tkáně na základě povrchových molekul typických pro danou tkáň. Díky vysoké specifitě protilátek se ze vzorku odstraní většina kontaminujících složek, které se na danou protilátku nenavážou. Zároveň je ale nutné zvážit některá negativa. Přes intenzivní výzkum zatím není znám univerzální povrchový znak umožňující snadnou imunoafinitní izolaci všech exozomů. Často se používá transmembránový protein CD63, který ale nemusí být na povrchu exozomů vždy přítomen a část váčků se tak během izolace ztratí. Navíc je problematické exozomy z kuliček uvolnit, což může komplikovat některé následné analýzy. Přes všechna tato úskalí dosahují exozomy po imunoafinitní izolaci nejvyšší čistoty.



Třetí nejčastější techniku izolace váčků představuje gelová filtrace, umožňující rozdělení částic podle velikosti, navíc je velmi snadná a nevyžaduje speciální vybavení. Zpravidla se používají komerčně dostupné kolony nebo sloupečkové separozy naplněné do injekčních stříkaček (10 ml). Po nanesení vzorku se jímá obvykle 10–20 frakcí. Exozomy procházejí kolonou rychleji a lze je jímát v prvních frakcích, bílkoviny naopak vytékají se zpožděním. Přesné určení frakcí obsahujících exozomy je možné pomocí imunoblotu, kdy se pomocí protilátek zjišťuje přítomnost známých exozomálních proteinů ve frakcích. Vzorek se při průchodu gelovou filtrační kolonou naředí, a proto je třeba nadbytečnou tekutinu odstranit ultrafiltrací nebo ultracentrifugací.

Protože izolace exozomů ultracentrifugací klade vysoké nároky na čas, přístrojové vybavení a vyžaduje větší množství vstupního materiálu, byly vyvinuty komerční sady, i když často na úkor čistoty izolátů. Jejich uplatnění se předpokládá mimo jiné pro rychlou a standardizovanou izolaci exozomů v diagnostice.

Po izolaci by měla následovat charakterizace k určení čistoty vzorku. Velikost a strukturu nanočástic lze posoudit v elektronovém mikroskopu. Kromě toho se dá velikost a počet nanočástic odhadnout pomocí optických technik (např. na základě

rozptylu světla při Brownově pohybu částic) a elektrických technik (např. měřením změny potenciálu při průchodu částice malým otvorem nebo měřením elektrických sil mezi částicemi v roztoku – tzv. zeta potenciál). Imunoblot napoví o přítomnosti exozomálních proteinů ve vzorku, ale může i vyloučit některé kontaminace (např. proteiny buněčného jádra nebo mitochondrií), a tím potvrdit úspěšnou izolaci exozomů. Použití průtokové cytometrie se u exozomů s velikostí okolo 100 nm omezuje na detekci fluorescenčně obarvených částic či exozomů navázaných na větší nosič (kuličky).

Složení exozomů

Znalost složení těchto váčků je nezbytným předpokladem pro jejich uplatnění v diagnostice a léčbě. Zkoumá se prostřednictvím molekulárněbiologických, proteomických a lipidomických metod. Exozomy jsou obaleny membránou tvořenou dvouvrstvou fosfolipidů a uvnitř nesou náklad zejména ve formě proteinů a nukleových kyselin (obr. 2).

● Povrchová membrána

Membrána exozomů obsahuje v porovnání se zdrojovými buňkami poměrně velké množství cholesterolu, sfingomyelinu a ceramidů, částečně uspořádaných do lipidových raftů (rafty jsou organizované oblasti v membráně sdružující určité molekuly pohromadě a např. usnadňující přenos informací přes membránu). Sfingomyelin a cholesterol zajišťují vysokou pevnost a stabilitu lipidové dvojvrstvy. Receptory a ligandy (vazebná místa) vystavené na povrchu exozomů zodpovídají za distribuci exozomů v organismu, vazbu na povrchy buněk nebo na extracelulární matrix. Následně mohou exozomy spouštět signální dráhy cílových buněk – navázáním na jejich receptory, či vstupem do buňky. Vstup exozomů probíhá nejčastěji fagocytózou a ke splynutí membrán exozomu a recipientní buňky dochází snáze při kyselém pH (kolem pH 5, které se vyskytuje např. uvnitř nádorů). Díky tomu lze využít exozomy k přenosu DNA a RNA do buněk (transfekci buněk) nebo přenosu léčivých prostředků k cílovým buňkám organismu, zejména nádorovým.

● Proteiny

Exozomy pocházejí z vnitřních váčků MVB, vznikajících vchlípením cytoplazmy do lumen endozomů. Proto v exozomech nacházíme cytoskeletální proteiny a proteiny teplotního šoku (heat-shock proteins, HSP – jsou-li váčky plné HSP, mohou být nebezpečnými strukturami schopnými vyvolat v příjemcích zánět), které jsou v cytoplazmě buněk přítomné v obrovském počtu kopií. Zároveň ale exozomy většinou neobsahují proteiny z buněčného jádra, endoplazmatického retikula nebo mitochondrií, čímž se odlišují od jiného typu extracelulárních váčků – apoptotických tělísek.

Zato jsou exozomy oproti cytoplazmě původních buněk obohaceny o určité typy proteinů, a to díky selektivnímu transportu transmembránových i rozpustných cytoplazmatických proteinů do vnitřních váčků MVB. Část proteinů vnitřních váčků MVB pravděpodobně pochází i z *trans*-Golgiho aparátu, případně z jiných membránových útvarů uvnitř buňky. Proteiny cíleně zabudované do exozomů pak shodně nalézáme u váčků různého původu. Mezi typické patří proteiny účastnící se transportu váčků a tvorby MVB (např. klatrin, Alix, TSG101, některé RAB proteiny), proteiny buněčné adheze (integriny, molekuly mezibuněčné adheze ICAM) nebo tetraspaniny (integrální membránové proteiny se čtyřmi transmembránovými doménami – např. CD9, CD63, CD81; obr. 2). I když je proteinové složení exozomů pocházejících z různých buněk do určité míry podobné, bohužel není znám univerzální marker, který by byl přítomen na všech typech exozomů a umožňoval jejich snadnou izolaci a charakterizaci.

● Nukleové kyseliny

Exozomy obsahují dlouhé i krátké molekuly RNA, hlavně ve formě mediátorové (mRNA) a mikroRNA (miRNA). Experimentálně bylo prokázáno, že mRNA jsou funkční a po přenosu většího množství exozomální mRNA do buněk jsou přepisovány do proteinů. Podobně exozomální miRNA po přenosu do buněk dokážou tlumit expresi cílových genů. Exozomy by se tak daly využít k přenosu miRNA do buněk pro léčbu mnoha patologických stavů. Z dalších typů RNA byly v exozomech pozorovány virové RNA, fragmenty transferové RNA (tRNA), malé jaderné RNA, malé jadérové RNA a dlouhé nekódující RNA. Zastoupení RNA částečně odpovídá typu zdrojových buněk.

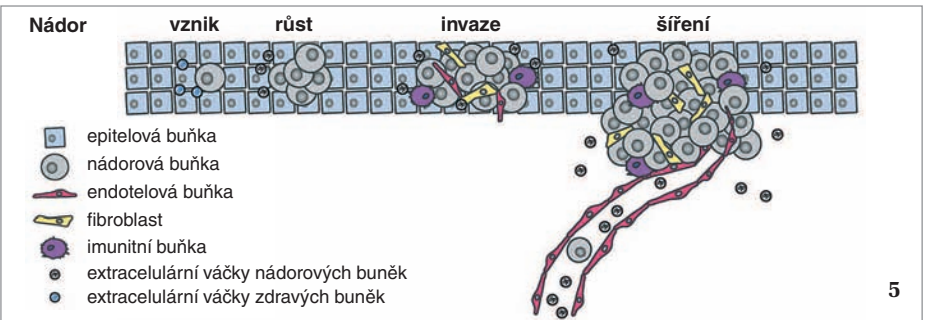
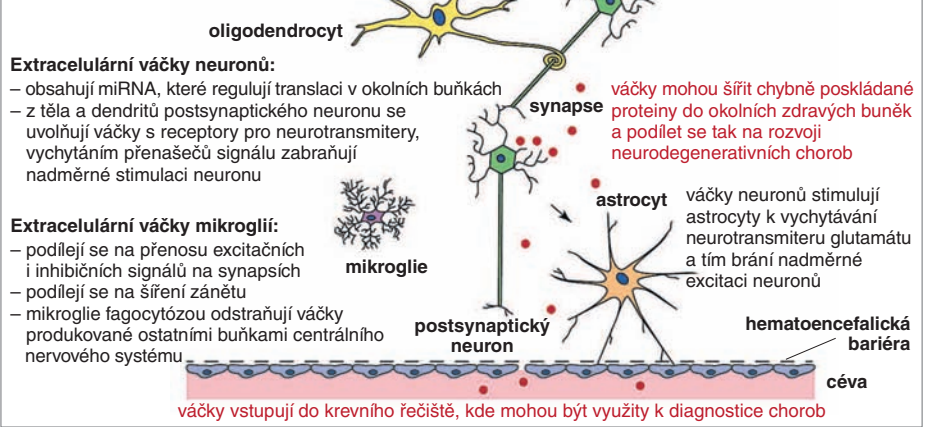
V některých studiích se v exozomech nachází i DNA, většinou ve formě dvouřetězcových fragmentů genomové DNA. Proces začlenění DNA do exozomů zatím neznáme a není ani zcela vyloučeno, že by DNA mohla pocházet z jiných váčků nebo apoptotických tělísek izolovaných společně s exozomy. Ve váčcích produkovaných nádorovými buňkami bylo možné pozorovat přítomnost DNA původních buněk, včetně mutovaných a amplifikovaných onkogenů. Exozomální DNA by se zřejmě dala využít ke sledování původního nádoru a typu mutací, které se vyskytují v DNA jeho buněk.

Praktický význam exozomů u patologických stavů člověka

Za fyziologických podmínek se exozomy podílejí především na mezibuněčné signalizaci, imunitních reakcích, srážení krve,

Oligodendrocyty produkují váčky s neuroprotektivním účinkem:

- podporují přežívání neuronů a chrání je proti stresu
- stimulují obnovu axonů při poranění



rozmnožování a vývoji embrya nebo kalcifikaci kostí. Účastní se komunikace mezi buňkami nervového systému (obr. 4) a mohou sloužit i k odstraňování nepotřebných molekul (blíže viz první díl). U člověka zejména souvisejí s rozvojem neurodegenerativních chorob a nádorových onemocnění.

● Přenos prionových a virových infekcí

V posledních pěti letech přibývají informace o účasti exozomů při šíření chybne poskládaných proteinů a složek virů mezi buňkami. Priony jsou infekční bílkoviny s pozmeněnou prostorovou strukturou (chybně poskládané, misfolded proteins) zodpovědné za vznik některých neurodegenerativních onemocnění, jako Creutzfeldtova-Jakobovy nemoci člověka a bovinní spongiformní encefalopatie (nemoci šílených krav; Živa 2002, 2: 50–52). Při prionové infekci se chybne poskládané priony dostávají i do extracelulárních váčků vylučovaných z infikovaných buněk. Váčky mohou vstupovat do okolních zdravých buněk a podílet se tak na šíření prionové infekce. Ke vzniku proteinů s pozmeněnou strukturou a jejich hromadění v buňkách dochází nejen u prionových infekcí, ale i u jiných neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova či Huntingtonova choroba (Živa 2014, 6: 262–265) nebo amyotrofická laterální skleróza. Také u nich byla pozorována tvorba exozomů nesoucích chybne poskládané proteiny (obr. 4). Má se tedy za to, že extracelulární váčky by se mohly podílet na šíření chybne poskládaných proteinů mezi buňkami i u dalších chorob.

Podobný způsob přenosu infekce exozomy se předpokládá také u některých virových infekcí. Aby se virus mohl takto šířit, je nutné překonat dva kroky. Nejprve se virové nukleové kyseliny a proteiny musejí dostat do vnitřních váčků v MVB. Přítom-

nost virové RNA a proteinů uvnitř váčků MVB byla prokázána u virů čeledi *Flaviviridae*, konkrétně u viru hepatitidy C (HCV) a viru horečky Dengue. V dalším kroku exozomy vstoupí do zdravé buňky a uvolní infekční obsah do cytoplazmy. Tato schopnost byla pozorována mimo jiné opět u viru HCV, kde exozomy vytvořené infikovanými jaterními buňkami, obsahující celou

4 Funkce extracelulárních váčků v centrálním nervovém systému. Všechny typy buněk CNS produkují extracelulární váčky, které jsou pak přijímány okolními buňkami nebo vstupují do krve či mozkomíšního moku. Váčky mohou přenášet chybne poskládané proteiny do zdravých buněk a podílet se na rozvoji neurodegenerativních onemocnění. Kromě funkcí uvedených na obr. se podílejí na horizontálním přenosu mediátorové RNA (mRNA) a mikroRNA (miRNA) mezi buňkami.

5 Extracelulární váčky u nádorového bujení se účastní všech fází vývoje nádoru. Při jeho vzniku okolní zdravé buňky sekretují váčky obsahující miRNA, které potlačují růst nádoru. Nádorové buňky mohou této inhibiči růstu uniknout a dále se množit. Váčky pocházející z nádorových buněk mohou také do okolních buněk šířit poškozené geny podporující množení buněk. Váčky nádorových buněk působí na fibroblasty, které sekrecí cytokinů podporují další množení nádorových buněk a zároveň odbouráváním okolní mezibuněčné hmoty vytvářejí prostor pro růst nádoru. Pokud je okolní prostředí hypoxické, váčky nádorových buněk a fibroblastů podporují dělení buněk endotelu (cévní výstelky) a růst nových cév. To umožňuje další šíření nádoru a tvorbu metastáz.

Všechny orig. H. Kupcová Skalníková

nost virové RNA a proteinů uvnitř váčků MVB byla prokázána u virů čeledi *Flaviviridae*, konkrétně u viru hepatitidy C (HCV) a viru horečky Dengue. V dalším kroku exozomy vstoupí do zdravé buňky a uvolní infekční obsah do cytoplazmy. Tato schopnost byla pozorována mimo jiné opět u viru HCV, kde exozomy vytvořené infikovanými jaterními buňkami, obsahující celou

délku virové RNA a proteiny virové dřeně (nukleoidu) a virových obalů (kapsidy), po vstupu do zdravých buněk vyvolaly infekci, i když se v nich nenacházel kompletní sestavený virus. Exozomy s HCV jsou odolnější proti neutralizaci protilátkami, a proto přenos viru pomocí exozomů může fungovat jako způsob úniku viru imunitnímu systému hostitele.

● Exozomy a nádorová onemocnění

Nádorové exozomy nesou signály, které mohou působit na různých úrovních – podporovat růst nádoru, tvorbu nových cév (angiogenezi), invazivitu nádoru, únik imunitního systému a rezistenci k protinádorovému léčivům, čímž se ve výsledku podílejí na růstu nádoru a tvorbě metastáz (obr. 5). Zároveň váčky mohou přispívat k vyšší srážlivosti krve u onkologicky nemocných osob.

Nádor je tvořen nejen vlastními nádorovými buňkami, ale i dalšími podpůrnými buňkami, např. fibroblasty, imunitními a endotelovými buňkami, které vytvářejí jakousi kostru novotvaru (nádorové stroma). Nádorové fibroblasty představují jedny z nejčtenějších buněk v nádoru. Vlastní rakovinné buňky i stromální fibroblasty jsou bohatým zdrojem exozomů. Nedostatek kyslíku uvnitř rychle rostoucích nádorů vede k tvorbě exozomů, které působí na buňky endotelu (cévní výstelky) a podílejí se na angiogenezi. U různých typů nádorů bylo potvrzeno, že nádorové exozomy obsahují klíčové faktory podporující migraci endotelových buněk a tvorbu nových cév, jako např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) nebo určité druhy miRNA (např. miR-296 a miR-214), které také spouštějí angiogenezi.

Extracelulární váčky tvořené nádorem mohou působit i na imunitní systém. Příjem těchto váček imunitními buňkami vede často k úniku nádoru před imunitní odpovědí nebo k potlačení imunity. Nádorem sekretované váčky působí např. na monocytů – lákají je do nádorové tkáně, kde mohou diferencovat v nádorové makrofágy a účastnit se angiogeneze, růstu a šíření nádoru.

U extracelulárních váček tvořených nádory se předpokládá i podíl na horizontálním přenosu genů (případně proteinů) mezi nádorovými a zdravými buňkami. Váčky tak mohou přenášet mutované geny způsobující nadměrnou proliferaci (množení) do dalších buněk. Zajímavou úlohu zřejmě hrají též v přenosu rezistence k protinádorovým léčivům, a to buď prostřednictvím přenosu genů či proteinů způsobujících rezistenci, nebo odstraňováním toxického léčiva z buněk a jeho zabudováním do exozomů. Studují se také miRNA – jako možné regulátory proliferace nádorových buněk a potenciální diagnostické a prognostické biomarkery. Vzhledem k usilovnému výzkumu exozomů vytvářených nádory očekáváme v následujících letech rychlý nárůst nových poznatků.

Exozomy v diagnostice

Exozomy a jejich složení odráží stav buněk, z nichž váčky pocházejí. Proto se zkoumají možnosti jejich využití jako diagnostického prostředku ke zjištění časných patologických změn v organismu, např. výše zmíněného nádorového bujení nebo neurodege-

nerativních chorob. Díky tomu, že jsou exozomy vylučovány do tělních tekutin, jsou lehce přístupné a umožňují „na dálku“ sledovat procesy v jinak těžko dosažitelných orgánech. Protože ale krev proudí celým organismem a unáší váčky rozličného původu, může být vhodné váčky požadovaného typu nejprve selektivně izolovat. K tomu se využívají specifické povrchové proteiny přítomné na exozomech pocházejících z určitých typů buněk. Např. pro sledování exozomů sekretovaných buňkami kolorektálního karcinomu může být výhodné izolovat tyto váčky z krevní plazmy pomocí magnetických kuliček s navázanou protilátkou proti adhezivní molekule epiteliálních buněk EpCAM.

Podle posledních výzkumů jsou exozomy schopné prostupovat hematoencefalickou bariéru. Ta odděluje centrální nervovou soustavu od cévního systému v těle obratlovců a zabraňuje pasivní výměně látek rozpustných ve vodě mezi krví a mozkiem. Exozomy produkované buňkami mozku tak pravděpodobně mohou vstupovat do krevního řečiště a lze je zjistit v krevní plazmě. Pro izolaci specifických exozomů nervové tkáně z krevní plazmy můžeme využít protilátky rozpoznávající některé povrchové molekuly na nervových buňkách, např. NCAM-1 (adhezivní molekula nervových buněk 1, přítomná na neuronech a gliích) nebo L1-CAM (adhezivní molekula neuronů). Tak se podařilo u pacientů s Alzheimerovou chorobou identifikovat proteiny tau a amyloid beta (hromadí se v nervových buňkách a účastní se rozvoje této choroby) v krevních exozomech odvozených od nervových buněk. Hladina těchto látek v exozomech v krvi souvisí se závažností nemoci a v jedné studii umožňovala dokonce předpovědět Alzheimerovu chorobu s předstihem až 10 let před nástupem prvních příznaků.

Exozomy v léčbě

Schopnost váček přenášet proteiny, mRNA a miRNA do vzdálených buněk by se dala využít v léčbě chorob. Molekuly opouzdřené uvnitř váčky jsou odolné proti působení degradačních enzymů v tělních tekutinách. Tento způsob využití exozomů předpokládá následující dva hlavní směry.

● Využití vlastních exozomů

V posledních letech se vkládají velké naděje do léčby mnoha onemocnění nebo poškození pomocí kmenových buněk, především mezenchymových kmenových buněk (MSCs) izolovaných z vlastní kostní dřeně či tukové tkáně pacienta. Tyto buňky jsou samy o sobě málo imunogenní a vylučují některé faktory potlačující nadměrnou imunitní reakci u příjemce. Nedávno bylo pozorováno, že regenerační potenciál nenesou jen samotné kmenové buňky, ale také jimi produkované faktory (včetně extracelulárních váček) uvolňované do vnějšího prostředí, tj. i sekretované do kultivačního média v případě pěstování buněk *in vitro* v tkáňových kulturách. Využití exozomů v léčbě vzbuzuje značná očekávání. Na rozdíl od transplantací kmenových buněk nabízí přenos váček spoustu výhod, zejména nižší riziko imunitní reakce příjemce oproti přeneseným buňkám dárce, menší nebezpečí přenosu infekce apod.

Zabráněním přenosu celých buněk se zároveň minimalizuje riziko zvrhnutí přenesených buněk a tvorby nádoru. Při izolaci exozomů k transplantačním terapiím je výhodná jejich malá velikost. Ze živých roztoků po kultivaci kmenových buněk se dají získat filtrací přes bakteriální filtr, čímž se jednoduše připraví sterilní a bezbuněčná suspenze exozomů.

V regenerativní medicíně se předpokládá využití váček tvořených mezenchymovými kmenovými buňkami hlavně k podpoře tvorby nových buněk po mozkové mrtvici nebo infarktu, hojení povrchových defektů kůže, podpoře angiogeneze u ischemické choroby dolních končetin či k ochraně buněk Langerhansových ostrůvků před odumíráním u cukrovky. Další potenciální uplatnění se týká modulací imunitního systému. Váčky mezenchymových kmenových buněk nebo imunitních buněk lze využít k potlačení imunity u autoimunitních chorob a při transplantačních komplikacích (např. při léčbě reakce štěpu proti hostiteli). Naopak ke stimulaci imunitního systému by mohly sloužit váčky produkované nádorovými buňkami nebo imunitními buňkami prezentujícími antigen, a to ve formě vakcín pro podpůrnou léčbu nádorových a infekčních onemocnění.

● Exozomy jako vektory pro přenos léčebných molekul

Díky schopnosti vnášet svůj vnitřní náklad do buněk procesem splynutí povrchových membrán exozomu a buňky by se daly exozomy využít podobně jako třeba lipozomy k přenosu terapeutických molekul do buněk. Geneticky upravené váčky, např. nesoucí určité krátké RNA (miRNA nebo krátké interferující RNA – siRNA), by mohly tlumit růst buněk nádorů, potlačovat zánětlivé reakce nebo i oddálit nástup některých neurodegenerativních onemocnění. Úpravou povrchových proteinů v membráně exozomu lze zacylit přenos léčebných molekul do určité tkáně nebo typu buněk, což by zvýšilo účinnost terapie, která by zároveň měla méně vedlejších účinků.

Nicméně pro účinné a bezpečné použití váček jako léčebných prostředků je třeba vyřešit ještě mnoho otázek. Týkají se zejména zdroje váček (vhodný typ buněk – nejlépe pacientovy autologní buňky), zajištění dostatečné produkce váček, standardizace metod jejich izolace, zabránění rizika přenosu infekce váčky pocházejícími z biologických materiálů, způsob podání a mnoho dalších.

Shrnutí závěrem

I když je studium extracelulárních váček teprve v začátcích, byly objeveny zajímavé role váček v přenosu proteinů a RNA mezi buňkami. S přibývajícím poznatky o exozomech se otevírají nové možnosti jejich budoucího využití v diagnostice a léčbě lidských chorob, zejména v regenerativní medicíně, protinádorové léčbě a k modulacím imunitního systému.

Publikace vznikla za podpory projektu LO1609 Národního programu udržitelnosti Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy.

Doporučená literatura na webu Živa.