

Pia Siljander, Sami Valkonen, Saara Laitinen ja Erja Kerkelä

## Verisolujen solunulkoiset vesikkelit

Solunulkoiset vesikkelit (extracellular vesicles, EV:t) välittävät solujenvälistä vuoropuhelua molekyylisisältönsä avulla. Nanokokoisia EV:itä voidaan eristää kaikista kehon nesteistä, mutta veressä niitä on erityisen runsaasti. Plasman EV:t ovat pääosin peräisin punasoluista ja verihiutaleista. Näiden lisäksi valkosolujen ja endoteelisolujen EV:t sekä muualta kuten syöpäsoluista peräisin olevat EV:t muodostavat mahdollisen lähteen plasman diagnostisille biomarkkereille. Aktiivinen tutkimus kohdistuu nykyään eri EV-välitteisten mekanismien ymmärtämiseen fysiologiassa ja sairauksissa sekä EV:iden rikastamiseen ja karakterisoimiseen vaadittavien teknologioiden kehittämiseen, mikä on edellytys niiden diagnostiselle hyödyntämiselle. Tutkimustiedon lisääntyminen ja teknologiset edistysaskeleet luovat pohjaa myös tulevaisuuden EV-pohjaisille hoitosovelluksille.

Solunulkoiset vesikkelit (extracellular vesicles, EV:t) ovat soluperäisiä lipidikaksoiskalvon peittämiä nanokokoisia molekyylisen kuljettimia, joiden merkitys solukommunikaatiossa on alkanut hahmottua vasta kymmenen viime vuoden aikana. EV:itä muodostuu kaikista eläinsoluista, mutta myös bakteerit ja kasvit käyttävät tätä evoluutiossa säilyntä viestintäjärjestelmää (1,2). Heterogeenista EV-populaatiota on pyritty jaottelemaan muun muassa koon, muodostumistavan sekä solu- ja soluelinäkuperän perusteella. EV:t jaoteltiin pitkään eksosomeihin (< 150 nm), mikrovesikkeleihin (< 1 000 nm; pääkokoluokka < 300 nm) ja apoptoottisiin kappaleisiin (> 1 µm), mutta eristysmenetelmien ja mittaus-tekniologioiden kehittyessä jaottelu on tarkentunut ja uusia EV-alaluokkia löydetään ja nimetään (1,2). Vuonna 2011 perustettu International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) suosittelikin käytettäväksi EV-termiä, ellei EV-populaation puhtautta ja alaluokkaa kyettä osoittamaan tarkasti. **TAULUKKON 1** on koottu ISEV:n uudet suositukset siitä, miten EV:itä ja niiden molekyylisisältöä tulisi karakterisoida EV-tutkimuksessa (3).

EV:itä voidaan eristää kaikista kehon nesteistä, ja veri on erityisen monipuolinen EV-lähde (**TAULUKKO 2**) (1). Verisolujen EV:t osallistuvat

fysiologisten tapahtumien kuten veren hyytymisen, punasolujen kypsymisen, endoteelin homeostaasin ja tulehdusreaktioiden säätelyyn (1). EV:iden määrä ja molekyylisisältö muuttuvat dynaamisesti muun muassa soluaktivaatiossa ja sairauksien yhteydessä, mikä on lisännyt kiinnostusta verisolu-EV:ihin myös sairauksien mekaanisina välittäjinä. Plasmassa voidaan kuljettaa myös muiden kudosten tai solujen, esimerkiksi syöpäsolujen tuottamia EV:itä. Koska EV:iden molekyylisisältö kattaa kaikki biomolekyyliluokat (proteiinit, nukleiinihapot, lipidit, aineenvaihduntatuotteet, sokerit) ja sisältää lisäksi tiedon emosolusta, EV:t ovat myös houkutteleva lähde etsittäessä uusia biomarkkereita (2).

### Plasman EV:t

**Historiaa.** Verihiutaleperäiset mikropartikkelit ja retikulosityttiperäiset eksosomit ovat varhaisimpia todettuja EV:itä yhdessä luu-EV:iden kanssa (1). Mikropartikkelien veren hyytymistä edistävä vaikutus havaittiin jo 70 vuotta sitten, jolloin tämä ultrasentrifugoinnilla eliminoituva, fosfolipidejä sisältävä ”hyytymistekijä” ristittiin verihiutalepölyksi (platelet dust) ja myöhemmin mikropartikkeleiksi (4,5).

**TAULUKKO 1.** International Society of Extracellular Vesicles -tutkijakonsortion (ISEV) suosittelemat ”minimivaatimukset” solunulkoisten vesikkelien (EV:t) karakterisoimiseksi näiden tutkimuksessa (3).

	MISEV2018-suositus	Esimerkki
EV-näytevalmistus	EV-lähteen kuvaus  EV-eristyksen saanto	EV:iden eristykseen käytetyn lähtömateriaalin määrä (esim. solumäärä tai kehonneeseen tilavuus), soluviljelyolosuhteiden kuvaus, antikoagulantti  EV:iden kvantifoiminen lipidi-, proteiini- tai partikkelimäärän avulla ja näiden suhdeluku puhtauden arvioimiseksi
EV-joukon karakterisointi	Osoitettava vähintään yksi proteiini ryhmistä 1–3 ja lisäksi EV-alaluokkia tutkittaessa myös ryhmistä 4 ja 5	Ryhmä 1: kalvoproteiinit (tetraspaniinit) Ryhmä 2: soluliman proteiinit, jotka pystyvät sitoutumaan lipideihin tai solukalvon proteiineihin (TSG101, HSP70) Ryhmä 3: epäpuhtaudet (negatiivinen kontrolli: lipoproteiinit, albumiini, Tamm–Horsfallin proteiini) Ryhmä 4: solurakenteisiin, kuten tumaan, mitokondrioon, endoplastiseen kalvostoon, Golgin laitteeseen, autofagosomiin ja peroksisomeihin (pois lukien solukalvo ja endosomit) kohdentuvat proteiinit (histonit, sytokromi c) Ryhmä 5: liukoiset proteiinit, jotka voivat sitoutua EV:iden pinnalla oleviin reseptoreihin (sytokiinit, kasvutekijät), tai vastaavien reseptoreiden osoitus
Yksittäisten EV:iden karakterisointi	EV:iden karakterisointi kahdella metodiikaltaan toisiaan täydentävällä tavalla	Yksittäisiä EV:itä kuvantavat menetelmät (esim. elektroni- tai atomivoimamikroskopia)  EV:iden biofyysisiä ominaisuuksia (koko, valon siroaminen, fluoresenssi, kemiallinen koostumus) mittaavat menetelmät, kuten nanopartikkelianalyysi, virtausytometria tai Ramanin spektroskopia
Muu karakterisointi	Molekyylien paikantaminen	Molekyylien paikantaminen EV:iden sisälle, kalvolle tai ulkopuolelle proteaasi-, nukleasi- tai detergenttikäsittelyn tai vasta-aineiden avulla

Mikropartikkelit tai -vesikkelit muodostuvat solukalvosta kuroutuvista membraanikuplista (blebbing) ja eroavat siten endosomaalisista monivesikkelirakenteista (multivesicular body) vapautuvista eksosomeista (2). Apoptoottiset EV:t muodostuvat solun fragmentoituessa ohjelmoidun solukuoleman yhteydessä, mutta niiden fysiologisia vaikutuksia on tutkittu vasta vähän (2). Tutkimuskentän eksponentiaalinen laajentuminen alkoi vuonna 2007, kun EV:iden osoitettiin voivan siirtää proteiinituotokelpoista RNA:ta solusta toiseen (6).

**Analytiikan haasteet.** Monet preanalyttiset tekijät vaikuttavat plasman EV:iden tutkimiseen: antikoagulantti, sentrifugointi sekä verihäntäleiden aktivoituminen ja keinotekoinen vesikulaatio näytteiden keräyksen, kuljetuksen ja säilytyksen yhteydessä voivat tuottaa artefakteja (7). Plasman EV:iden diagnostinen käyttö eli ”liukoinen biopsia” edellyttää paitsi näiden vaikutusten kartoittamista, myös EV-mittausanalytiikan kehittämistä ja standardoimista (7). Esimerkiksi tavanomaisilla soluvirtausytometreillä ei voida mitata plasman EV-pitoisuuksia,

koska valtaosa EV:istä on näiden sytometrien detektioalarajaa pienempiä. Siksi aiemmat menetelmät plasman EV-määristä eri sairauksien yhteydessä ovat perustuneet vain noin 1 %:n analyysiin kokonaismäärästä (8,9). EV-kentällä tehdäänkin runsaasti aktiivista yhteistyötä näiden ongelmien ratkaisemiseksi niin tutkijoiden kuin kansainvälisten yhdistysten ja metrologia-instituuttienkin välillä.

**Hemostaasi.** Plasman EV:iden tärkeimpänä tehtävänä on pidetty osallistumista veren hyytymiseen, koska niiden pinnalla on usein runsaasti fosfatidyyliiseriiniä (PS) ja fosfatidyylietanoliamiinia (PE), jotka toimivat hyytymiskompleksien, kuten hyytymiskelijä Xa- ja protrombinaasikompleksin, katalyyttisinä sitoutumispaikkoina (1). Lisäksi verihäntäle EV:issä kulkee hyytymisjärjestelmään ja sen säätelyyn kuuluvia proteiineja ja monosyytti EV:issä kudostekijää (8). Koska kaikissa EV:issä ei ole PS- tai PE-pintaa (TAULUKKO 1) ja koska hyytymisen käynnistämiseksi tarvitaan perivaskulaarista kudostekijää tai kudostekijän ilmentymistä, kuten tapahtuu esimerkiksi

**TAULUKKO 2.** Veren solunulkoisten vesikkelien (EV:t) tyypit sekä niiden tärkeimmät fysiologiset tehtävät ja tunnistemolekyylit. Prosenttiosuustiedot on koottu julkaisuista, joissa menetelmänä on käytetty EV:ille soveltuvaa uuden polven virtausytometriaa<sup>1</sup> (10), fluoresenssiaktivoitua virtausytometriaa<sup>2</sup> (11) tai immunoelektronimikroskopiaa<sup>3</sup> (9). Uusilla menetelmillä havaitaan verrattain samankaltaiset prosenttiosuudet, ja merkittävää on verihitale-EV:iden osuuden pienentyminen aiempaan tietoon verrattuna sekä se, ettei kaikissa EV:issä ole fosfatidyyliiseriiniä.

EV-tyyppi	Osuus veren EV:istä (%)	Tärkeimmät fysiologiset tehtävät	Tärkeimmät tunnistemolekyylit
Punasolu-EV	11/20 <sup>3/2</sup> –38 <sup>1</sup>	Punasolun kehitys ja ikääntyminen	CD235a
Verihiutale-EV	24 <sup>1</sup> –26/30 <sup>3/2</sup>	Veren hyytyminen, vuoropuhelu immuunisolujen kanssa	CD41/61, CD42, CD62P
Valkosolu-EV	12 <sup>1</sup>	Veressä: immuunisolujen vuoropuhelu, tulehdus, veren hyytyminen Kudoksessa: antigeenin esittely, immunologinen synapsi	CD45, CD11b, CD14, CD62L, CD66b, CD3
Endoteeli-EV	7 <sup>1</sup>	Endoteelin homeostaasi	CD31, CD105, CD144
PS- tai PE-positiiviset EV:t	15 <sup>2</sup> –50 <sup>3</sup>	Veren hyytyminen, puhtaanapito	Anneksiini V- ja laktadheriinisitoutuminen

CD = erilaistumisklusteri, PS = fosfatidyyliiseriini, PE = fosfatidyylietanoliamiini

tulehduksessa tai syövässä, PS- tai PE-pinnan merkitystä hyytymisessä (ja yleisenä EV-tunnistemolekyylinä) arvioidaan uudelleen (8).

EV:iden tarjoama katalyyttisen pinnan lisääntyminen voi olla merkittävää esimerkiksi kudosaaurion yhteydessä. Tuoreessa tutkimuksessa PS-pinnan peittäminen verenkiertoon ruiskutetulla laktadheriinilla edisti merkittävästi hiirien toipumista kokeellisesta traumaattisesta aivovauriosta (12). Hyytymistasapainon osalta kannattaa huomioida, että plasman EV:t, erityisesti endoteeli- ja valkosolu-EV:t, ovat myös fibrinolyttisesti aktiivisia (13).

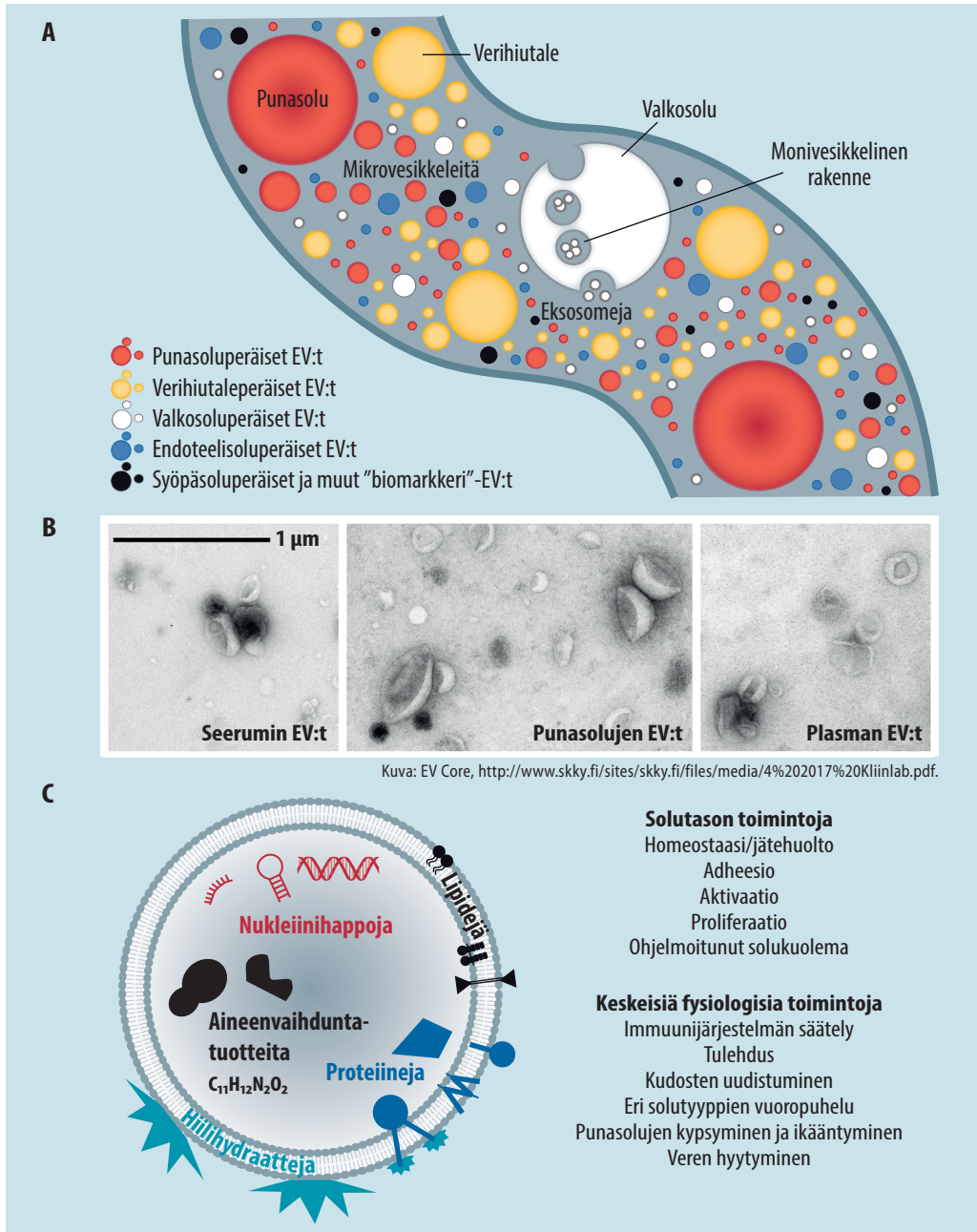
## Verisoluperäiset EV:t

**Punasolujen EV:t.** Nykymenetelmien perusteella plasman EV:istä noin 10–40 % on punasolu- ja retikulosityttiperäisiä (**TAULUKKO 2**). Kypsyessään happea kuljettaviksi punasoluiksi retikulositytit poistavat tarpeettomaksi käyneitä proteiineja, esimerkiksi transferriniinireseptoria, vapauttamalla EV:itä (1). Punasolut vesikuloivat ikääntyessään in vivo ja in vitro (punasoluvalmiste), ja ne menettävät elinaikanaan noin 20 % tilavuudestaan. Vesikulaatio saattaa olla homeostaattinen mekanismi, jonka avulla vanheneva punasolu poistaa haitallisia molekyylejä pidentääkseen elinikänsä (14). Lopulta EV:issä poistuu myös pintaproteiineja

(esimerkiksi CD47), joiden avulla solu tunnistetaan omaksi, mikä puolestaan edesauttaa vanhojen punasolujen poistamista verenkierrosta fagosytoosin avulla.

Kuten muidenkin solujen, myös punasolujen vesikulaatioon liittyy muutos solukalvon fosfolipidien epäsymmetriassa. Epäsymmetrialla ylläpitävien entsyymien toimintaa heikentävät esimerkiksi adenosiniitrifosfaatin väheneminen, solunsisäisen kalsiumpitoisuuden suureneminen ja kaliumin vuoto solusta esimerkiksi soluvaurion, metabolisen stressin ja vanhenemisen (tai varastoinnin) seurauksena. Seurauksena ovat PS:n ja PE:n siirtyminen solun pinnalle ja solun tukirankaan vaikuttavien entsyymien aktivoituminen, jotka edistävät vesikulaatiota (15). Energiavarastojen väheneminen ja oksidatiivinen stressi kerryttävät muutoksia lipideihin ja proteiineihin, ja muuttuneet punasoluproteiinit rikastuvat EV:ihin (esimerkiksi band 3, IgG, komplementtiproteiinit).

Punasolu-EV:t kuljettavat voimakkaita prooksidantteja, hemiä ja rautaa, joilla on monia patofysiologisia vaikutuksia. Hemolyyssissä vapautuva hemoglobiini voikin olla sitoutuneena EV:ihin tavanomaisten sitojaproteiinien rinnalla (16). ”Terveet” punasolu-EV:t voivat sisältää inerttiä hemoglobiinia, patologiset EV:t puolestaan voivat sisältää suuria määriä reaktiivista hemiä ja lisätä endoteelisolujen reaktiivisten happiradikaalien tuotantoa (17).



Kuva: EV Core, <http://www.skky.fi/sites/skky.fi/files/media/4%2020217%20Kliinlab.pdf>.

**KUVA.** A) Veren solunulkoiset vesikkelit (EV:t). Mikrovesikkelit muodostuvat solukalvosta kuroutuvista membraanikuplista ja eksosomit vapautuvat endosomaalisista monivesikkeli-rakenteista solukalvofuusion yhteydessä. Terveen ihmisen plasmassa on nykyisten analyysitekniikoiden perusteella eniten verihiutale- ja punasoluperäisiä EV:itä ja vähemmän valkosolu- ja endoteeliperäisiä EV:itä. Plasmasta voidaan eristää myös muiden solujen tuottamia EV:itä, joiden määrää tai molekyyllisisältöä voidaan hyödyntää esimerkiksi syöpäbiomarkkerien löytämiseksi.

B) Elektronimikroskooppikuvia seerumin, punasoluvalmisteen ja plasman EV:istä. Valtaosa EV:istä on halkaisijaltaan pienempiä kuin 300 nm, vaikka niiden kokojakaumaksi yleensä ilmoitetaan 50–1000 nm. EV-morfologian niin sanottu

kuppimuoto tiedetään nykyisin elektronimikroskopiakäsittelyn aiheuttamaksi artefaktiksi.

C) EV:t välittävät veressä solujen välisiä vuorovaikutuksia sisältämiensä proteiinien, nukleiinihappojen (mikro-RNA, lähetti-RNA, ei-koodaavat RNA:t, DNA), lipidien, sokerien ja aineenvaihduntatuotteiden avulla. Solutasolla EV:t vaikuttavat esimerkiksi vastaanottajasolujen aktivoitumiseen, jakautumiseen ja ohjelmoituneeseen solukuolemaan. Verisolu-EV:t säätelevät fysiologisia toimintoja, muun muassa veren hyytymistä, immuuni- ja tulehdusreaktioita ja kudosten uusitumista. Haitallisen molekyyllisisällön poistaminen EV:iden välityksellä on myös emosolun keino säädellä omaa homeostaasiaan (esimerkiksi punasolujen kypsyminen, ikääntyminen tai suojautuminen komplementilta).

Punasolu-EV:t vaikuttavat muun muassa immuunisoluihin ja endoteeliin sekä aktivoivat hyytymisjärjestelmää (15). Vanhentuvaan punasoluvalmisteeseen kerääntyvät EV:t voivat muuntaa immuunivastetta verensiirroissa ja lisätä runsaasti verensiirtoja tarvitsevien potilaiden alloimmunisaatiota. Punasolusairauksissa, esimerkiksi sirppisoluanemiassa, talassemiaassa ja malariassa, punasolu-EV:iden määrä plasmassa lisääntyy, ja niiden merkitystä erityisesti sirppisoluanemian patofysiologiassa on tutkittu paljon (18,19). Malariassa infektoituneiden punasolujen on osoitettu kommunikoivan malarialoisten kanssa EV:iden välityksellä (20) (TAULUKKO 3).

**Verihiutaleiden EV:t.** Nyky menetelmien mukaan vain 24–30 % kaikista plasman EV:istä sisältää verihiiutale-tunnistemoлекуулеjä (TAULUKKO 2) (8). Koska verihiiutale-integriinejä (CD41 ja CD61) sisältäviä EV:itä voi syntyä myös megakaryosyyteistä, on vielä epäselvää, mikä osuus terveen ihmisen plasman EV:istä in vivo syntyy aktivoituneista verihiiutaleista (5,8). Kuitenkin sairauksissa, joiden patologiaan liittyy verihiiutaleaktivaatiota, kuten aterotromboosi tai nivelreuma, potilaiden plasmassa on aktivoituneista verihiiutaleista peräisin olevia EV:itä (5,8).

Verihiiutaleiden sisäinen solukalvosto ja molekyyllisällöltään runsas varastorakkulasto tekevät niistä monipuolisen EV-lähteen (4). Morfologialtaan heterogeeniseen EV-populaatioon kuuluu mikrovesikkelien lisäksi muun muassa eksosomien kaltaisia vesikkeleitä ja putkiloita (5,8). Verihiiutaleet voivat aktivoitua useiden reseptorivälitteisten signaalireittien kautta tai esimerkiksi valtimovirtausvoimien vaikutuksesta, mikä mahdollistaa erilaisten EV:iden muodostumisen. Niiden aktiivisiin molekyyliin voi kuulua lipidejä, mikro-RNA:ita ja proteiineja, kuten hyytymis- ja komplementtitekijöitä, transkriptio- ja kasvutekijöitä, sytokiinejä ja adheesiomolekyyliä (4,5,8). Niissä voi myös olla soluelimiä, kuten proteasomeja ja mitokondrioita. Hyytymisen lisäksi näyttöä on verihiiutale-EV:iden osallistumisesta immuunireaktioihin, kudosten kehittymiseen ja paranemiseen sekä sairauksien, kuten reuman ja syövän, patogeneesin säätelyyn (16,21) (TAULUKKO 3).

## Ydinasiat

- ▶ Solujen tuottamat pienikokoiset solunulkoiset vesikkelit (extracellular vesicles, EV:t) toimivat molekyylien kuljettimina solujen välisessä kommunikaatiossa.
- ▶ Veren EV:t ovat pääosin peräisin punasoluista ja verihiiutaleista.
- ▶ EV:iden välittämä soluviestintä voi perustua mihin tahansa biomolekyyli-ryhmään.
- ▶ EV:iden biomarkerit tarjoavat mahdollisuuden uudenlaiseen diagnostiikkaan plasmanäytteistä, esimerkiksi liukoiseen biopsiaan.

Sydän- ja verisuonitaudeissa verihiiutale-EV:iden on ajateltu tehostavan muun muassa verihiiutaleiden ja fibriinin kerääntymistä ateroskleroottiseen suonenseinämään (22). Suurentuneita verihiiutale-EV-pitoisuuksia on mitattu akuutin sepelvaltimo-oireyhtymän, ohimenevien aivoverenkiertohäiriöiden (TIA), aivoinfarktin, diabetekseen liittyvien valtimotromboositapahtumien ja perifeerisen valtimotaudin yhteydessä (16,22). Myös muiden tromboottisten sairauksien kuten hepariinin aiheuttaman trombosytopenian ja hemoglobiнопатииiden yhteydessä verihiiutale-EV:iden määrät plasmassa kasvavat. Verihiiutale-EV:iden on ajateltu olevan yksi tekijä syöpään liittyvän suurentuneen tromboosiriskin taustalla (23) (TAULUKKO 3).

Uudet tutkimushavainnot osoittavat, että verihiiutalevaikutukset kudosten kehittymisessä, haavan paranemisessa ja immuunivasteen muuntamisessa voivat myös olla osaksi EV-välitteisiä. Verihiiutale-EV:iden kuljettamat sytokiinit, esimerkiksi interleukiinit 1 alfa ja beeta, sekä kasvutekijät, kuten endoteelikasvutekijä, vaikuttavat immuunisoluihin ja kudossoluihin, kuten fibroblasteihin (16,21). Havainnot verihiiutale-EV:istä sekä imu- että nivelnestessä viittaavat osaltaan immuunivastetta muuntaviin vaikutuksiin (5). Verihiiutaleet, neutrofiilit ja monosyytit ovat aktiivisessa vuorovaikutuksessa keskenään EV-välitteisesti esimerkiksi lipidi-

**TAULUKKO 3.** Esimerkkejä sairauksista ja tiloista, joissa solunulkoisilla vesikkeleillä (EV:t) voi olla diagnostista tai patogeneettistä merkitystä. Esimerkit on koottu tekstissä mainituista viitteistä.

Sairaus	EV-tyyppi
<b>Sydän- ja verisuonitaudit</b>	
Kohonnut verenpaine	Verihiutale, endoteelisolu
Ateroskleroosi, aterotromboosi	Valkosolu, verihiutale, lymfosyytti, endoteelisolu
Sepelvaltimotauti	Endoteelisolu, verihiutale, monosyytti
<b>Tulehdukselliset sairaudet</b>	
Virusinfektiot	Lymfosyytti
Keskushermoston tulehdussairaudet	Endoteeli, punasolu
<b>Autoimmuunitaudit</b>	
Systeeminen lupus erythematosus (SLE)	Verihiutale
Nivelreuma	Verihiutale, valkosolu
<b>Hematologiset sairaudet</b>	
Fosfolipidivasta-aineoireyhtymä	Endoteeli, valkosolu
Sirppisoluanemia	Punasolu
Beetatalassemia	Punasolu
Hemolyyttiset anemiat	Punasolu
Kohtauksittainen (yöllinen) verenpunavirtsaisuus (PNH)	Punasolu, verihiutale
Hepariinin aiheuttama trombosytopenia	Verihiutale
Hemoglobinopatia	Verihiutale
<b>Hematologiset syövät</b>	
Multippeli myelooma	Valkosolu, punasolu
Akuutti myeloinen leukemia	Verihiutale
Krooninen lymfaattinen leukemia	Verihiutale
<b>Kiinteät syövät</b>	
Useita	Syöpäspesifiset EV:t, verihiutale
<b>Syöpähoidot</b>	
Kemoterapia	Verihiutale
Sädehoito	Endoteelisolu
<b>Muut poiminnat</b>	
Munuaissairaudet	Endoteeli, verihiutale, punasolu
Malaria	Endoteeli, punasolu
Raskausmyrkytys	Verihiutale, endoteeli, valkosolu

mediaattoreiden ja -aineenvaihdunnan säätelyn kautta (5,16).

**Valkosolujen EV:t.** Kudoksissa makrofagit erittävät sytokiineja EV:iden välityksellä, ja EV:illä ajatellaan olevan keskeinen tehtävä dendriittisolujen antigenein esittelyssä ja T-solusynapsin toiminnassa (1). Dendriittisolujen EV:itä käytetäänkin jo hyväksi muun muassa uusien syöpähoitojen kehittämisessä (24). Plasmassa puolestaan on valkosolujen EV:itä vähemmän kuin muita verisolu-EV:itä (**TAULUKKO 2**), ja valkosolujen EV:iden toimintaa on

tutkittu niukemmin. Valkosolujen EV:itä siirtyy runsaasti tulehtuneesta kudoksesta myös verenkiertoon, jossa ne osallistuvat immuuni- ja tulehdusreaktioiden säätelyyn. EV:t toimivat synergisesti liukoisten tulehdusta lisäävien tekijöiden, kuten sytokiinien kanssa (1,25). Valkosolujen EV:t sisältävät muun muassa inflammasomikoneiston proteiineja, jotka vaaratilanteessa aktivoivat interleukiineja (16).

Plasman valkosolujen EV:t ovat pääosin peräisin neutrofiileista, monosyyteistä tai lymfosyyteistä. Ne osallistuvat immuunireaktioiden

lisäksi verisuoniston toimintaan ja säätelyyn. Aktivoituessaan neutrofiilit erittävät runsaasti EV:itä. Neutrofiili-EV:t aktivoivat complementin klassista aktivaatioreittiä ja saattavat osallistua punasolujen poistoon. Lisäksi ne voivat aktivoida tulehdusreaktiossa endoteelisoluja ja verihiutaleita edistämällä tromboosia. Neutrofiili-EV:t ovat myös antimikrobiaalisesti aktiivisia (1,25). Tulehdustilanteessa aktivoituvien monosyyttien tuottamissa EV:issä eritetään sytokiinin lisäksi kudostekijää, joka puolestaan on kriittinen hyytymisjärjestelmän aktivoimisessa (16). Valkosolu-EV:istä on tutkittu eniten T-solujen EV:itä, jotka säätelevät immuunireaktioita esimerkiksi aktivoimalla monosyyttejä (26). Lisäksi niiden on havaittu muun muassa estävän endoteelin toimintaa ja angiogeneesiä (27).

Valkosolu-EV:iden määrän on havaittu lisääntyvän esimerkiksi hematologisten syöpien, vammojen, sepsiksen ja autoimmuunitautien yhteydessä (1,16). Lisäksi potilastutkimukset ovat osoittaneet valkosolu-EV:iden lisääntyvän verenkierrossa sydän- ja verisuonitautien yhteydessä, ja ateroskleroottisesta plakista on löydetty runsaasti eri valkosolujen EV:itä (22) (TAULUKKO 3). Valkosolu-EV:iden analysoiminen vaikuttaakin lupaavalta erityisesti sydän- ja verisuonitautien diagnosoinnissa ja riskin enustamisessa.

**Endoteelisolujen EV:t.** Plasman endoteelisoluperäisten EV:iden määrä lisääntyy endoteelin homeostaasin häiriintyessä esimerkiksi infektion tai ateroskleroosin yhteydessä (16). Endoteelisolujen EV:itä syntyy useiden eri aktivaatioreittien (trombiini, endotoksiini, sytokiinit) ja olosuhteiden (suuret virtausvoimat, tupakointi) vaikutuksesta, ja ne vaikuttavat esimerkiksi monosyyttien toimintaan. Koska endoteeli-EV:t ovat tämän verisolu-EV-katsauksen aihepiirin ulkopuolella, viittaamme tuoreisiin katsauksiin (16,21).

## Plasma-EV:iden diagnostinen ja terapeuttinen hyödyntäminen

Vuorokaudenajan, aterioinnin, kuukautiskierron ja iän ajatellaan vaikuttavan terveen henkilön EV-määrään, mutta systemaattista ja luotettavaa tutkimustietoa aiheesta on vielä vähän.

EV:iden tutkiminen liikunnan puutteen, tupakoinnin ja ylipainon edistämien patologisten mekanismien yhteydessä on kiinnostavaa, sillä esimerkiksi ylipainolla ja liikkumattomuudella on havaittu yhteisvaikutus plasman endoteeli-EV-määrään (1,16,28,29). Koska plasman EV-määrässä on havaittu muutoksia, niiden avulla ajatellaan saatavan tietoa myös sairauksien etenemisestä tai syntymekanismeista.

Eniten tutkimustuloksia EV:iden patologiasta merkityksestä on sydän- ja verisuonitaudeista ja syöivistä (16,21,30,31). Verisolujen EV-välitteinen signaalointi vaikuttanee muun muassa endoteelin toimintahäiriön ja ateroskleroottisen vaurion kehittymiseen. EV:t välittävät tulehdusreaktiota edistämällä muun muassa plakin lipidikertymää, verisuonittumista ja kalkkiutumista, mikä johtaa plakin haurastumiseen ja hyytymisepätasapainoon aina tromboosiin asti (22). Antitromboottisten ja verenpainelääkkeiden sekä diabetes- ja lipidilääkkeiden on osoitettu vähentävän eri solulähteistä peräisin olevien EV:iden määrää veressä (22).

Plasmasta voidaan mitata myös muista kuin verisoluista peräisin olevia EV:itä. Syöpäsolut tuottavat runsaasti EV:itä ja hyödyntävät niitä muun muassa suojautumisessa immuunipuolustusta vastaan (32). Syöpäperäisiä EV:itä ja niiden molekyyllisöllön diagnostisia mahdollisuuksia tutkitaan aktiivisesti. Syöpä-EV:iden havaitsemista haittaa plasman muiden EV:iden suuri määrä, ja joidenkin syöpien yhteydessä myös verisoluperäisten EV:iden määrä lisääntyy (33). Esimerkiksi kemoterapian ja sädehoidon yhteydessä tukosriskin lisääntymisen on esitetty liittyvän endoteelivaurioon ja verihiutaleaktivaatioon ja siten endoteeli- ja verihiutale-EV:iden määrien lisääntymiseen plasmassa (16,30).

EV:istä arvellaan olevan hyötyä myös autoimmuunitautien diagnosoinnissa. Eniten asiaa on tutkittu nivelreuman ja systeemisen lupus erythematosuksen (SLE) osalta. Molemmissa taudeissa verihiutale-EV-määrän on osoitettu korreloivan sairauden vakavuuteen, joskin myös vastakkaisia tuloksia on saatu (1,13). Vaikka näyttöä onkin jo paljon muun muassa valkosolu-EV-määrien lisääntymisestä nivel-

nesteessä, suora osoitus plasman EV-määrien suhteesta taudin vakavuuteen puuttuu toistaiseksi (32). Verisolujen EV:iden yhteyttä muun muassa malariaan, raskausmyrkytyksiin ja erilaisiin munuaissairauksiin ja -komplikaatioihin on tutkittu runsaasti (19,33,34). Monissa sairauksissa on havaittu suurentuneita veren EV-pitoisuuksia tai EV:iden välittämiksi arvioituja mekanismeja (**TAULUKKO 3**).

## Tulevaisuus

Veren EV-biomarkkerit voivat tarjota uusia keinoja sairauksien diagnosoimiseksi. Esimerkiksi tästä on palkittu menetelmäkehityksellinen tutkimus haimasyövän varhaisesta toteamisesta EV-teknologiaa hyödyntämällä (35). Tuore julkaisu puolestaan osoittaa veren punasolu-EV-määrän ja proteiiniukuorman kykenevän erottamaan lievää ja keskivaikeaa Parkinsonin tautia sairastavat potilaat (36). EV:t voisivat myös auttaa esimerkiksi verivalmisteiden soveltuvuuden arvioimisessa ja kohdentamisessa eri klinisiin käyttötarkoituksiin. Verivalmisteperäisen mutta soluttoman EV-komponentin käyttö saattaisi tulevaisuudessa mahdollistaa uusia hoitomuotoja aina lääkekuljetuksesta kudostorjaukseen (37). Esimerkiksi dendriittisolu- ja mesenkymaalisten stroomakantasolu-EV:iden luontaisia toimintamekanismeja solujen välisessä viestinnässä hyödynnetään jo uusien syöpähoitojen kehittämisessä (24). RNA:n kuljettaminen punasolu-EV:issä ja koh-

dentaminen syöpään on jo onnistunut prekliinisisissä kokeissa (38).

Koska EV-pohjaisiin hoitoihin liittyy toistaiseksi enemmän kysymyksiä kuin vastauksia niiden tehosta, turvallisuudesta ja mekanismeista, tarvitaan lisää tutkimusta. EV:iden käsittelyyn ja tutkimiseen liittyviä menetelmiä on kehitettävä. Luotettavan tutkimustiedon lisäämiseksi kansainvälinen EV-tutkimusyhteisö onkin alkanut ohjeistaa tutkijoita muun muassa näyttöiden keruussa ja koejärjestelyissä huomioitava seikoista tutkimuksen yhdenmukaistamiseksi ja vertailukelpoisuuden lisäämiseksi (3). Lisäksi EV-Track-tietokantaan voidaan kirjata tutkimusten keskeiset tekniset tiedot laadun ja vertailtavuuden parantamiseksi (39).

## Lopuksi

Suomeenkin on reilun viiden viime vuoden aikana kehittynyt vahva, kansainvälisesti verkostoitunut ja osaava EV-tiedeyhteisö. Biolääketiedettä kehittävät tiedeyhteisön lisäksi niin suuret kuin pienetkin yritykset, ja myös laitevalmistajat ovat vahvasti heränneet tämän osaamisen mahdollisuuksiin. Hyvä esimerkki tästä on Suomen Akatemian ja Business Finlandin rahoituksen avulla Helsingin yliopistoon vuonna 2016 perustettu maailman ensimmäinen EV-mittausteknologinen laboratorion palvelu, EV Core, jonka tarkoituksena on auttaa laajenevalle EV-tutkimuslalle lähteviä tutkijoita (40). ■

### **PIA SILJANDER, dosentti, FT, yliopistonlehtori**

Molekulaaristen ja integratiivisten biotieteiden tutkimusohjelma, bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta sekä EV Core, Helsingin yliopisto

### **SAMI VALKONEN, FM, tohtorikoulutettava, projektitutkija**

Molekulaaristen ja integratiivisten biotieteiden tutkimusohjelma, bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta Tutkimusosasto, Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu, Helsinki

### **SAARA LAITINEN, FT, tuotekehityspäällikkö**

### **ERJA KERKELÄ, dosentti, FT, tuotekehitysasiantuntija**

Tutkimusosasto, Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu, Helsinki

### **SIDONNAISUUDET**

**Pia Siljander:** Apuraha (Salwe Oy), luento-/asiantuntijapalkkio (Suomen Punaisen Ristin Veripalvelu)

**Sami Valkonen:** Ei sidonnaisuuksia

**Saara Laitinen:** Ei sidonnaisuuksia

**Erja Kerkelä:** Ei sidonnaisuuksia

### **VASTUUTOIMITTAJA**

Seppo Meri



## KIRJALLISUUTTA

1. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, ym. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015;4:27066. DOI: 10.3402/jev.vy.27066.
2. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:213.
3. Théry C, Witwer KW, Board I, ym. 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* 2018. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
4. Aatonen M, Grönholm M, Siljander PR. Platelet-derived microvesicles: multitalented participants in intercellular communication. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:102–13.
5. Melki I, Tessandier N, Zufferey A, ym. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* 2017;28:214–21.
6. Valadi H, Ekström K, Bossios A, ym. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654–9.
7. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, ym. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res* 2017;120:1632–48.
8. Gasecka A, Nieuwland R, Siljander P. Platelet-derived extracellular vesicles. Kirjassa: Michelson AD, Cattaneo M, Frelinger III AL, Newman PJ, toim. Platelets. 4. painos. Cambridge (MA): Elsevier/Academic Press 2019, s. 401–6.
9. Arraud N, Linares R, Tan S, ym. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 2014;12:614–27.
10. Headland SE, Jones HR, D'Sa ASV, ym. Cutting-edge analysis of extracellular microparticles using imagestreamx imaging flow cytometry. *Sci Rep* 2014;4:1–10.
11. Arraud N, Gounou C, Turpin D, ym. Fluorescence triggering: a general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry A* 2015;89:184–95.
12. Zhou Y, Cai W, Zhao Z, ym. Lactadherin promotes microvesicle clearance to prevent coagulopathy and improves survival of severe TBI mice. *Blood* 2018;131:563–72.
13. Lacroix R, Plawinski L, Robert S, ym. Leukocyte- and endothelial-derived microparticles: a circulating source for fibrinolysis. *Haematologica* 2012;97:1864–72.
14. Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Döpp YAM, ym. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol* 2008;141:549–56.
15. Rubin O, Canellini G, Delobel J, ym. Red blood cell microparticles: clinical relevance. *Transfus Med Hemotherapy* 2012;39:342–7.
16. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, ym. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. *Thromb Haemost* 2017;117:1296–316.
17. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, ym. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood* 2015;125:3805–14.
18. Van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, ym. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica* 2009;94:1513–9.
19. Couper KN, Barnes T, Hafalla JCR, ym. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS Pathog* 2010;6. DOI 10.1371/journal.ppat.1000744.
20. Regev-Rudzki N, Wilson DW, Carvalho TG, ym. Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* 2013;153:1120–33.
21. Badimon L, Suades R, Fuentes E, ym. Role of platelet-derived microvesicles as cross-talk mediators in atherothrombosis and future pharmacology targets: a link between inflammation, atherosclerosis, and thrombosis. *Front Pharmacol* 2016;7:293.
22. Badimon L, Suades R, Arderiu G, ym. Microvesicles in atherosclerosis and angiogenesis: from bench to bedside and reverse. *Front Cardiovasc Med* 2017;4:77.
23. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood* 2015;126:582–8.
24. Gilligan KE, Dwyer RM. Engineering exosomes for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2017;18. DOI: 10.3390/ijms18061122.
25. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res* 2012;110:356–69.
26. Scanu A, Molnarfi N, Brandt KJ, ym. Stimulated T cells generate microparticles, which mimic cellular contact activation of human monocytes: differential regulation of pro- and anti-inflammatory cytokine production by high-density lipoproteins. *J Leukoc Biol* 2008;83:921–7.
27. Martin S, Tesse A, Hugel B, ym. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* 2004;109:1653–9.
28. Mobarrez F, Antoniewicz L, Bosson JA, ym. The effects of smoking on levels of endothelial progenitor cells and microparticles in the blood of healthy volunteers. *PLoS One* 2014;9. DOI: 10.1371/journal.pone.0090314.
29. Navasiolava NM, Dignat-George F, Sabatier F, ym. Enforced physical inactivity increases endothelial microparticle levels in healthy volunteers. *AJP Hear Circ Physiol* 2010;299:H248–56.
30. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016;126:1208–15.
31. Caivano A, La Rocca F, Laurenzana I, ym. Extracellular vesicles in hematological malignancies: from biology to therapy. *Int J Mol Sci* 2017;18:1–23.
32. Buzas EI, Györy B, Nagy G, ym. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:356–64.
33. Gilani SI, Weissgerber TL, Garovic VD, ym. Preeclampsia and extracellular vesicles. *Curr Hypertens Rep* 2016;18:68.
34. Helmke A, von Vietinghoff S. Extracellular vesicles as mediators of vascular inflammation in kidney disease. *World J Nephrol* 2016;5:125–38.
35. Liang K, Liu F, Fan J, ym. Nanoplasmonic quantification of tumor-derived extracellular vesicles in plasma microsomes for diagnosis and treatment monitoring. *Nat Biomed Eng* 2017. DOI: 10.1038/s41551-016-0021.
36. Lamontagne-Proulx J, St-Amour I, Labib R, ym. Portrait of blood-derived extracellular vesicles in patients with Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2019;124:163–75.
37. Tao SC, Guo SC, Zhang CQ. Platelet-derived extracellular vesicles: an emerging therapeutic approach. *Int J Biol Sci* 2017;13:828–34.
38. Usman WM, Pham TC, Kwok YY, ym. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nat Commun* 2018;9:2359.
39. EV-Core [verkkosivu]. Helsingin yliopisto 2019. [www.helsinki.fi/en/researchgroups/extracellular-vesicles/ev-core](http://www.helsinki.fi/en/researchgroups/extracellular-vesicles/ev-core).
40. EV-Track platform [verkkosivu]. <http://www.evtrack.org/>.

## SUMMARY

### Blood cell-derived extracellular vesicles

Cell-derived extracellular vesicles (EVs) mediate intercellular communication by their molecular content. Nanosized EVs can be isolated from all body fluids, but blood is an especially rich source of EVs, where erythrocytes and platelets are the main sources of blood cell-derived EVs. In addition to erythrocyte- and platelet-derived EVs, plasma EVs from leukocytes, endothelial cells and tumor cells constitute a novel source for potential diagnostic biomarkers. Current research on EVs is focused on unravelling the role of EV-mediated mechanisms in (patho)physiological settings and on developing technologies to enrich and characterize EVs, which is a prerequisite for their exploitation in diagnostics. Fast evolving basic research and technological advancements will also establish the grounds for the development of EV-based therapeutic applications in the future.