

EGZOSOMI I PREEKLAMPSIJA

Damir Roje

Pregledni članak

Ključne riječi: egzozomi, preeklampsija, placentacija, posteljica

SAŽETAK. Egzozomi su oblik izvanstaničnih vezikula promjera 40–100nm. Stanice ih oslobađaju egzocitozom i omeđeni su fosfolipidnim dvoslojem. Osnovni zadatak im je prijenos informacija u međustaničnoj komunikaciji, pa igraju značajnu ulogu u fiziologiji i etiopatogenezi mnogih patoloških stanja i bolesti. Posteljica otpušta široku lepezu različitih egzozoma u cirkulaciju trudnice. Zbog veličine lako prolaze u njenu sistemsku cirkulaciju izazivajući različite biološke učinke. Potiču imunološke i ine procese koji spadaju u opseg „fiziološke adaptacije žene na trudnoću”. Uključeni su u patofiziološku podlogu preeklampsije, odstupanja fetalnog rasta, spontanog pobačaja, prijevremenog porođaja, gestacijskog dijabetesa i drugih poremećaja trudnoće. U ovom su pregledu predstavljene osnovne značajke egzozoma te utjecaj na fiziologiju i patologiju čovjeka, neovisno i u kontekstu trudnoće. Poseban naglasak je stavljen na moguću povezanost egzozoma s nastankom i razvojem preeklampsije. Rezultati istraživanja u ovom području su fascinantni i obećavajući, ali ujedno nedostatni i nekonzistentni da bi se za sada mogli primijeniti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Egzozomi su oblik izvanstaničnih vezikula. Stanice ih oslobađaju egzocitozom, promjer im je 40–100 nm i omeđeni su fosfolipidnim dvoslojem. Prvi su ih put opisali Pan BT i Johnstone RM 1983. godine (1,2). Temeljnu razliku od srodnih formi izvanstaničnih vezikula (mikrovezikule i apoptotska tijelešaca) predstavlja način njihova nastanka. Biogeneza im se odvija unutar endosomalnog sustava, preko multivezikularnog tijela (MVB, engl. *multivesicular body*) (1,2). Iz stanice se oslobađaju egzocitozom, bilo konstitutivno ili inducirano. Sadrže različite biološki aktivne molekule: proteine, lipide (kolesterol, digliceride, sfingolipide, fosfolipide i mnoge druge), fragmente DNA te glasničku ili druge forme RNA. Poseban značaj ima mikro RNA (miRNA), mala nekodirajuća molekula od oko 22 nukleotida, koja ima ulogu u prigušivanju funkcije RNA i poslije-transkripcijskom reguliranju genskog izražaja (1–6). Temeljni zadatak egzozoma je komunikacija između stanica i tkiva, što se ostvaruje međureakcijom proteina njihove i površine stanice domaćina, i/ili unosom sadržaja u ciljnu stanicu. Specifičnost građe vanjske membrane i sastav pojedine vrste egzozoma je određena vrstom i aktivnošću stanice koja ga formira i oslobađa. Egzozomi su precizno osmišljeni, pa je njihovo otpuštanje i očekivani učinak na okolne ili udaljenije stanice unaprijed definiran (3,7,8). Sraz s egzozomom rezultira promjenom metabolizma stanice, pa time i tkiva ili organa, sukladno informacijama koje im egzozomi donose: a) proteinima (direktni učinak), b) RNA ili DNA (posttranskripcijski efekt) (1,2,7,8). Lokalna hipoksija mijenja broj, sastav, dinamiku oslobađanja i učinak egzozoma, jednako kao i hipo/hiperglikemija (9,10). Zbog svojih svojstava egzozomi i ostale izvanstanične vezikule predstavljaju potencijalno velik izvor informacija o fiziološkim i patofiziološkim procesima u tijelu (2,3,6,9,10). Sudjeluju u diferencijaciji matičnih stanica. Dokazana im je ključna uloga u koordinaciji sastavnica imunološkog sustava (dendritičke stanice, T i B limfociti, makrofazi, prirodnoćelne NK stanice) gdje imaju imunomodulacijski i antiupalni učinak. Istražuje im se značaj u nastanku i razvoju kardiovaskularnih,

neurodegenerativnih, kroničnih upalnih i infektivnih bolesti. Poseban interes je usmjeren prema mogućem utjecaju na biologiju tumora, što objedinjuje njihov nastanak, invazivnost, angiogenezu i širenje (8,9,12). U posljednje vrijeme se pokušavaju iskoristiti u (ranoj) dijagnostici različitih bolesti ekstrakcijom iz seruma, sline, mlijeka, amnionske tekućine, cerebrospinalnog likvora, mokraće te drugih tjelesnih tekućina ili izlučevina (3,9). Posebno je intrigantna ideja o mogućem korištenju u ciljanom transportu različitih lijekova do specifičnih stanica s kojima određeni egzozom može stupiti u interakciju (9,13). U tijeku su istraživanja načina inhibicije ili poticanja lučenja pojedinih vrsta egzozoma te njihovog vezivanja na ciljne stanice, što bi moglo imati veliki značaj u razumijevanju, prevenciji i liječenju određenih patoloških stanja i bolesti (6,9).

Mjesto egzozoma u perinatalnoj medicini još nije potpuno definirano. Sigurno je da imaju značajnu koordinacijsku ulogu u procesima implantacije, fiziološke pretvorbe spiralnih arterija tijekom placentacije, diferencijacije stanica, tkiva i organa ploda te u regulaciji apoptotske aktivnosti trofoblasta čime direktno moduliraju funkciju posteljice (4,10,14). Egzozomi koje posteljica (sinciotrofoblast, STB) preko interviloznog prostora otpuštaju u cirkulaciju majke posebno su zanimljiv dio ove priče. Vjerojatno predstavljaju onaj signal koji primjerice potiče koštanu srž trudnice na povećano stvaranje eritrocita. Poznato je da su posrednici imunomodulacije tijekom trudnoće na lokalnoj i sistemskoj razini, ali i da imaju mnogo drugih učinaka u sklopu „fiziološke adaptacije” žene na trudnoću (4,12,14). Fascinantna je i sama pomisao da bi posteljica preko egzozomskih glasnika i/ili posrednika mogla evolucijski osmišljeno, svjesno, planski i kontrolirano mijenjati metabolizam žene tijekom trudnoće. Dinamički progresivno i sinkronizirano s napredovanjem trudnoće egzozomima slati signale, poruke, napatke i direktive tkivima i organima majke mijenjajući njihovu funkciju prema novoj ravnoteži sklada koji pogoduje razvoju ploda (4,8,15). U tom bi konceptu posteljica putem

egzosoma *de facto* preuzela ulogu „dirigenta” promjena metabolizma žene u fiziologiji trudnoće.

Preeklampsija (PE), intrauterino usporenje rasta ploda (IUGR) i fetalna hipertrofija, abrupcija posteljice i prijevremeni porođaj (PP) se često u literaturi zajednički predstavljaju nazivom „veliki opstetrički sindromi”. Objedinjuje ih nepoznata etiopatogeneza, koja se kod nekih od njih djelomično, ali ne i nužno preklapa. Takva nomenklatura predstavlja priznanje struke, koja u nemoći prepoznavanja uzroka nije u stanju osmisliti učinkovitu prevenciju i metode uzročnog liječenja (16). Istraživanja uloge egzosoma u nastanku navedenih poremećaja trudnoće su iznjedrila prve i obećavajuće rezultate (4,14). Chamley LW i sur. su 2014. godine prema veličini podijelili čestice koje STB otpušta u cirkulaciju majke na sincicijske čvoriće, mikrovezikule i nanovezikule te pretpostavili njihovu moguću ulogu u nastanku poremećaja trudnoće, primarno preeklampsije (17). Time je postalo jasno da egzosomi, za razliku od znatno većih sincicijskih čvorića, mogu bez poteškoća izbjeći zasjedu makrosoma u kapilarnom sustavu plućnog krvotoka trudnice i nesmetano ući u sistemski krvotok. Posljedica može biti poticanje i održavanje proupalnog stanja, sistemske endotelne disfunkcije, spontanog pobačaja, prijevremenog prsnuća vodenjaka prije termina, spontanog prijevremenog porođaja, hipertenzije, disfunkcije bubrega, gestacijskog dijabetesa, i/ili mnogih drugih bioloških učinaka (4,14,15,18,19). Pillay P i sur. su usporednom studijom dokazali značajnu razliku u količini i sastavu egzosoma izoliranih u serumu žena kod fiziološke trudnoće te PE ranog i kasnog nastupa (20). Koncentracija izvanstaničnih vezikula iz seruma kod PE je pokazala pozitivnu korelaciju s težinom bolesti, a u kvalitativnom smislu egzosome PE obilježava: a) značajno manje sincitina-2 odgovornog za vezivanje egzosoma na membranu ciljane stanice, b) više cirkulirajućih topljivih receptora faktora rasta endotela krvnih žila tipa 1 (sFlt-1) i topljivih receptora endoglina (sENG), što mijenja učinkovitost proangiogenih čimbenika, c) smanjena količina galektina 13, d) promjena ekspresije Fas-liganda, važnog čimbenika apoptoze (4,8). Od ukupno četiristotinjak proteina izoliranih iz egzosoma trofoblasta, 25 se susreće isključivo u PE; uključujući integrine, aneksine i histone. Interesantno je otkriće da N-terminalni fragment prolaktina, protein povišen u PE, potiče lučenje egzosoma karakterističnog sastava miRNA čijom se transkripcijom umanjuje metabolička aktivnost kardiomiocita i potiče nastup peripartalne kardiomiopatije (18,19,21). Među ~200 lipida posteljinih egzosoma, u PE je dokazano značajno više fosfatidilserina i manje fosfatidilglicerola (18). Istraživanja opisuju više od 70 različitih formi miRNA u kontekstu PE. Za sada se ističu miR-126, miR17-92 i miRNA-210 kao mogući modulatori angiogeneze i placentacije. Poseban značaj ima povišena vrijednost forme miRNA-21, što je izraženo samo uz PE s patološkim nalazom doplera (18). Uloga slobodnih frakcija fetalne DNA (fDNA) u nastupu PE kroz poticanje sistemske prouplanog učinaka intrigantno je i

kontroverzno područje (6). Koncentracija fDNA više-struko je veća u trudnica s PE već nekoliko tjedana prije nastupa bolesti (22). Poveznicu s etiopatogenom PE pod znak pitanja postavljaju dokazi o lokalnoj enzimskoj inaktivaciji fDNA putem nukleaza. Na pitanje mogu li egzosomi, kao nosioci „upakirane” posteljicne/fetalne DNA, izbjeći enzimsku zaštitu, i imaju li direktan utjecaj na nastup PE literatura za sada nema konkretan odgovor (6). Slične analize egzosoma u PE su provedene na uzorcima urina i amnionske tekućine s rezultatima koji su istovjetni serumskim testovima (4,8,18). Temeljem dosadašnjih saznanja egzosomi i njihove sastavnice se kao biomarkeri intenzivno pokušavaju uključiti u kombinirane testove rane detekcije PE (14,23,24). Najnovija su istraživanja usmjerena prema učinku acetil salicilne kiseline (ASK) na biologiju egzosoma posteljice. Prvi su rezultati ohrabrujući i u perspektivi bi mogli značajno utjecati na naše razumijevanje PE, prevenciju, ranu detekciju i liječenje (25).

Veliki problem objektivnosti istraživanja u ovom području predstavljaju objektivne limitirajuće odlike dostupnih metoda. Samo odvajanje egzosoma od ostalih formi vanstaničnih mikrovezikula još uvijek nije usavršeno. Protočna citometrija, kao standardni analitički postupak, uspješno prepoznaje egzosome trofoblasta preko specifičnog biljega antiposteljicne alkalne fosfataze (PLAP), ali metoda ne može detektirati čestice manje od 300 nm pa istraživači intenzivno pokušavaju modificiranjem postupka dobiti preciznije rezultate (10,14,18). Pomnom pripremom uzorka u analizi sastava egzosoma posteljice Burkova EE. i sur. su 2019. dokazali samo 11–13 različitih proteina. Svojim su radom postavili opravdanu sumnju u vjerodostojnost rezultata prethodnih istraživanja prema kojima je pretpostavljena znatno složenija građa i raznolikiji sastav egzosoma (26).

Zaključak

Otkriće egzosoma je otvorilo mnoge perspektive razumijevanja fiziologije i patologije čovjeka, neovisno i u kontekstu trudnoće. Rezultati u području perinatalne medicine su fascinantni i obećavajući, ali ujedno nedostatni i nekonzistentni da bi se za sada mogli primijeniti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Literatura

1. Edgar JR. Q&A: What are exosomes, exactly? BMC Biology. 2016. doi:10.1186/s12915-016-0268-z.
2. Isola AL, Chen S. Exosomes: The messengers of Health and Disease. Curr Neuropharmacol. 2017;15:157–65.
3. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. Cell Biosci. 2019. doi:10.1186/s13578-019-0282-2.
4. Ynag C, Sing G, Lim W. Effects of extracellular vesicles on placentation and pregnancy disorders. Reproduction. 2019;158:189–96.
5. Ouyang Y, Mouillet JF, Coyne CB, Sadovsky Y. Placenta-specific microRNAs in exosomes – good things come in nanopackages. Placenta. 2014;35:69–73.

6. Konečna B, Tathova L, Repiska G. Exosomes-Associated DNA – New Marker in Pregnancy Complications? *Int. J. Mol. Sci.* 2019. doi:10.3390/ijms20122890.
7. Pettersen Hessvik N, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:193–208.
8. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72:440–57.
9. Rashed MH, Bayraktar E, Helal GK, Abd-Ellah MF, Mero P, Chavez-Reyes A, i sur. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2017. doi:10.3390/ijms18030538.
10. Salomon C, Yee SW, Mitchell MD, Rice GE. The possible role of extravillous trophoblast-derived exosomes on the uterine spiral arterial remodeling under both normal and pathological conditions. *Biomed Res Int.* 2014. doi:10.1155/2014/693157.
11. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterisation, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cell* 2019. doi:10.3390/cells8040307.
12. Ksirshagar SK, Alam SM, Jasti S, Hodes H, Nauser T, Gilliam M, i sur. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. *Placenta.* 2012;33:982–90.
13. Bungglawa EJ, Wang W, Yin T, Wang N, Durkan C, Wang Y, i sur. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J Nanobiotechnol.* 2018. doi:10.1186/s12951-018-0403-9.
14. Jin J, Menon R. Placental exosomes: A proxy to understand pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol.* 2018. doi:10.1111/aji.12788.
15. Jayabalan N, Nair S, Nuzhat Z, Rice GE, Zuniga FA, Sobrevia L, i sur. Cross Talk between Adipose Tissue and Placenta in Obese and Gestational Mellitus Pregnancies via Exosomes. *Front. Endocrinol.* 2017. doi:10.3389/fendo.2017.00239.
16. Di Renzo GC. The Great Obstetrical Syndromes. *J Maternal Fetal Med.* 2009;22:633–5.
17. Chamley LW, Holland OJ, Chen Q, Viall CA, Stone PR, Abumaree M. Review: Where is the maternofetal interface? *Placenta.* 2014;28:74–80.
18. Escudero CA, Herlitz K, Troncoso F, Acurio J, Aguayo C, Roberts JM, i sur. Role of Extracellular Vesicles and microRNA on Dysfunctional Angiogenesis during Preeclamptic Pregnancies. *Front. Physiol.* 2016. doi:10.3389/fphys.2016.00098.
19. Chang X, Yao J, He Q, Liu M, Duan T, Wnag K. Exosomes From Women With Preeclampsia Induced Vascular Dysfunction by Delivering sFlt (Soluble FmsLike Tyrosin Kinase)-1 and eEng (Soluble Endoglin) to Endotelial Cells. *Hypertension.* 2018;72:1381–90.
20. Pillay P, Maharaj N, Moodley J, Mackraj I. Placental exosomes and pre-eclampsia: maternal circulating levels in normal pregnancies, and early and late onset pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 2016;46:18–25.
21. Halkein J, Tabruyn SP, Ricke-Hoch M, Haghikia A, Nguyen NQ, Scherr M, i sur. MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2013;123:2143–54.
22. Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA. Cell-free DNA and pregnancy-related complications (Review). *Mol Med Rep.* 2015;11:2367–72.
23. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, i sur. Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Accros Gestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:3182–94.
24. Berezin EA. Are Placental Cell-Derived Exosomes a Predictive Biomarker of Preeclampsia? *Med Chem* 2017;7:186–7.
25. Dutta S, Kumar S, Hyett J, Salomon C. Molecular Target of Aspirin and Prevention of Preeclampsia and Their Potential Association with Circulating Extracellular Vesicles during Pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. doi:10.3390/ijms20184370.
26. Burkova EE, Grigor'eva AE, Bulgakov DV, Dmitrenok PS, Vlassov VV, Ryabchikova EI, i sur. Extra purified Exosomes from Human Placenta Contain an Unpredictable Small Number of Different Major Proteins. *Int J Mol Sci.* 2019. doi:10.3390/ijms20102434.

Adresa autora: Izv. prof. prim. dr. sc. Damir Roje, dr. med., Klinika za ženske bolesti i porode KBC Split, Spinčičeva 1, 21000 Split; *e-mail:* damir@kbsplit.h

Department of Obstetrics and Gynecology,
University Hospital Center Split, School of Medicine University of Split

EXOSOMES AND PREECLAMPSIA

Damir Roje

Review article

Key words: exosomes, preeclampsia, placentation, placenta

SUMMARY. Exosomes are extracellular small vesicles comprised of a lipid bilayer containing various proteins, RNAs, DNAs and bioactive lipids. Released by healthy cells, both constitutively and upon cell activation, exosomes are implicated in cell–cell communication and play an important role in immune system function, physiology and etipathogenesis of many diseases. Several studies have linked placental exosomes change (quyntity and cargo) reflecting physiology of pregnancy and placental dysfunctions associated with adverse pregnancy events. However, important aspects of their biology remain unknown. This mini-review outlines the basic exosomes features with special reference to preeclampsia and related disorders of pregnancy.