

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Lucie Vaníková

Role exozomů v progresi, diagnostice a léčbě mozkových nádorů
Role of Exosomes in the Progression, Diagnosis and Treatment of Brain Tumors

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

Mgr. Martina Zíková, CSc.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2022

Podpis

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Martině Zíkové, CSc. za její pomoc, cenné rady, doporučení a zároveň za trpělivost a ochotu poskytnuté při konzultacích.

Abstrakt

Nedávné studie potvrdily význam extracelulárních vezikulů, zejména exozomů, při vývoji mnoha vážných onemocnění. Značná pozornost byla věnována především vlivu exozomů na biologické děje v rámci nádorových onemocnění mozku. Exozomy zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci v mikroprostředí nádoru transportem biomolekul. Nejčastěji přenášejí různé druhy ribonukleových kyselin, konkrétně například microRNAs, které v cílových buňkách ovlivňují signální dráhy související s růstem nádoru. Exozomy hrají proto významnou roli v proliferaci a diferenciaci nádorových buněk, v tvorbě metastáz a v rezistenci nádoru vůči chemoterapii nebo záření. Vzhledem k jejich malé velikosti mohou exozomy procházet hematoencefalickou bariérou, a tak podporovat progresi nádoru. Předmětem bakalářské práce je shrnutí současných poznatků o roli exozomů v progresi, diagnostice a léčbě mozkových nádorů.

Klíčová slova: exozomy, rakovina, mozkové nádory, gliomy, medulloblastomy

Abstract

Recent studies have confirmed the importance of extracellular vesicles, particularly exosomes, in the development of brain tumors. Considerable attention has been paid mainly to the influence of exosomes on biological processes in brain tumors. Exosomes mediate intercellular communication in the tumor microenvironment by transporting biomolecules. Most often they transmit various types of ribonucleic acids, specifically microRNAs, which affect the signalling pathways related to tumour growth in target cells. Thus, exosomes play an important role in tumor cell proliferation and differentiation, metastasis, and tumor resistance to chemotherapy or radiation. Due to their small size, exosomes can cross the blood-brain barrier and thus promote tumor progression. The topic of the bachelor thesis is a summary of the current knowledge on the role of exosomes in brain tumor progression, diagnosis and treatment.

Key words: exosomes, cancer, brain tumors, gliomas, medulloblastoma

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 2 | Exozomy..... | 2 |
| 2.1 | Biogeneze | 2 |
| 2.2 | Funkce | 4 |
| 2.3 | Obsah..... | 5 |
| 2.4 | Metody izolace | 6 |
| 2.5 | Exozomy a onemocnění | 7 |
| 2.6 | Exozomy a nádorová onemocnění..... | 9 |
| 3 | Mozkové nádory..... | 11 |
| 3.1 | Benigní nádory | 11 |
| 3.1.1 | Meningiomy | 11 |
| 3.1.2 | Hypofyzární adenomy | 12 |
| 3.1.3 | Vestibulární schwannomy | 12 |
| 3.1.4 | Kraniofaryngeomy..... | 12 |
| 3.1.5 | Epidermoidní karcinomy | 12 |
| 3.1.6 | Koloidní cysty..... | 12 |
| 3.1.7 | Mozkové hemangioblastomy..... | 13 |
| 3.2 | Maligní nádory | 13 |
| 3.2.1 | Gliomy..... | 13 |
| 3.2.2 | Meduloblastomy | 13 |
| 3.2.3 | Primitivní neuroektodermální tumory | 14 |
| 3.2.4 | Nádory pineální oblasti..... | 15 |
| 3.2.5 | Primární lymfomy centrální nervové soustavy..... | 15 |
| 3.2.6 | Mozkové metastázy | 15 |
| 4 | Exozomy a mozkové nádory | 16 |
| 4.1 | Role exozomů v progresi nádorových onemocnění mozku..... | 16 |
| 4.2 | Role exozomů v diagnostice..... | 19 |
| 4.3 | Použití exozomů v rámci léčby mozkových nádorů..... | 21 |

| | | |
|---|------------------|----|
| 5 | Závěr..... | 27 |
| 6 | Literatura | 28 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|---------------|---|
| 3'UTR | 3' nepřekládaná oblast |
| 16K PRL | 16 kDa fragment prolaktinu |
| AAA ATPáza | ATPase associated with diverse cellular activities |
| AGO2 | Argonaut-2 |
| AKT | protein kinase B |
| ALIX | ALG-2-interacting protein X |
| B7-H3 | B7 homolog 3 |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BMDC | buňky odvozené od kostní dřeně |
| CADM1 | cell adhesion molecule 1 |
| CAV-1 | caveolin 1 |
| CD4+ | cluster of differentiation 4 |
| CD8+ | cluster of differentiation 8 |
| CD9 | cluster of differentiation 9 |
| CD25+ | cluster of differentiation 25 |
| CD63 | cluster of differentiation 63 |
| CD80 | cluster of differentiation 80 |
| CD81 | cluster of differentiation 81 |
| CD86 | cluster of differentiation 86 |
| circRNA | cirkulární RNA |
| CREBBP | cAMP-response element binding protein |
| CRT | kalretikulin |
| CT | výpočetní tomografie |
| <i>CYP2J2</i> | cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2 |
| DLD | deterministic lateral displacement |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| EGF | epidermal growth factor |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| EGFRvIII | EGFR variant III |
| ELISA | enzyme-linked immuno sorbent assay |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| ERM | eZRin, radixin a moetin proteiny |
| ESCRT | endozomální třídící komplexy vyžadované pro transport |
| EZH2 | enhancer of zeste homolog 2 |
| FAK | fokální adhezivní kináza |
| FasL | Fas ligand |
| FOXA2 | forkhead box protein A2 |
| GLUE | GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45 |
| GM1 | monosialotetrahexosylgangliosid |
| GM2 | disialotetrahexosylgangliosid |
| GM3 | monosialodihexosylgangliosid |
| GO | Gene Ontology |
| GPNMB | glycoprotein nonmetastatic B |
| GRP75 | glucose related protein 75 |
| GRP78 | glucose related protein 78 |
| GSK-3 β | glycogen synthase kinase 3 beta |
| <i>Hbp1</i> | HMG-box transcription factor |
| <i>Hes</i> | hairly and enhancer of split-1 |
| hnRNPA2B1 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HSC70 | heat shock cognate 71 kDa protein |
| HSP | heat shock proteiny |
| HSP27 | heat shock protein 27 |

| | |
|----------------|---|
| HSP60 | heat shock protein 60 |
| HSP70 | heat shock protein 70 |
| HSP90 | heat shock protein 90 |
| HspBP1 | hsp70-binding protein 1 |
| HRS | hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate |
| HIF1 α | hypoxia-inducible factor 1-alpha |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule 1 |
| IFN- γ | interferon gamma |
| IgG1 | imunoglobulin G1 |
| IgG2A | imunoglobulin G2A |
| IGSF8 | immunoglobulin superfamily member 8 |
| IL-2 | interleukin 2 |
| IL-10 | interleukin 10 |
| Jak-STAT | janus kinase and signal transducer and activator of transcription |
| KATNAL2 | katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2 |
| KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |
| KIT | tyrosine-protein kinase |
| LKB1 | liver kinase B1 |
| LMP1 | latent membrane protein 1 |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MFG-E8 | milk fat globule-EGF factor 8 protein |
| MHC | hlavní histokompatibilní komplex |
| miRNA | microRNA |
| MAP | mitogen-activated protein |
| MDR1 | multi-drug resistance 1 |
| MMP-1 | metaloproteináza 1 |
| MRI | magnetická rezonance |
| mRNA | messenger RNA |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| NF- κ B | jaderný faktor kappa B |
| NK | natural killer |
| NKG2D | natural-killer group 2, member D |
| NOTCH1 | neurogenic locus notch homolog protein 1 |
| NOTCH1/2 | neurogenic locus notch homolog protein 1/2 |
| nSMase2 | neutral sphingomyelinase 2 |
| NZF | Npl4 zinc finger |
| P-glykoprotein | permeabilní glykoprotein |
| PDCD4 | programmed cell death protein 4) |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| PDI | protein disulfid izomeráza |
| PEG | polyethylenglykol |
| PI3K | fosfatidylinositol-3-kináza |
| <i>Prkar1a</i> | protein kinase CAMP-dependent type I regulatory subunit alpha |
| PSMA7 | proteasome 20S subunit alpha 7 |
| PTEN | phosphatase and tensin homolog |
| PTGFRN | prostaglandin F2 receptor negative regulator |
| RAB7 | Ras-related protein 7 |
| RAB11 | Ras-related protein 11 |
| RAB27 | Ras-related protein 27 |
| RAB35 | Ras-related protein 35 |
| RACK1 | receptor of activated protein C kinase 1 |
| RECK | reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RNU6-1 | RNA, U6 Small Nuclear 1 |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |

| | |
|--------|--|
| rRNA | ribozomální RNA |
| SDF-1 | stromal cell-derived factor 1 |
| SHH | sonic hedgehog |
| SIK1 | salt-inducible kinase 1 |
| siRNA | small interfering RNA |
| SOX2 | sex-determining region Y-box 2 |
| STAT | signal transducer and activator of transcription |
| STAT3 | signal transducer and activator of transcription 3 |
| TCEAL7 | transcription elongation factor A like 7 |
| TGF-β1 | transforming growth factor beta 1 |
| TGF-B2 | transforming growth factor beta 2 |
| TMZ | temozolomid |
| TUBAL3 | tubulin alpha chain-like 3 |
| UBE2M | NEDD8-conjugating protein Ubc12 |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| Vn | venceremin |
| VSP4 | vesicle-fusing ATPase |
| VPS20 | vacuolar protein sorting-associated protein 20 |
| VPS23 | vacuolar protein sorting-associated protein 23 |
| VPS28 | vacuolar protein sorting-associated protein 28 |
| VPS36 | vacuolar protein sorting-associated protein 36 |
| VPS37 | vacuolar protein sorting-associated protein 37 |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |
| WNT | wingless/int-1 |

1 Úvod

Exozomy, jakožto typ extracelulárních vezikulů, jsou stále častěji podrobovány biologickým výzkumům. Důvodem je především fakt, že se prokázaly jako transportéry vícero typů molekul, které hrají roli v nejrůznějších signálních a metabolických drahách buněk. Většina typů buněk je uzpůsobena jak k vytváření, tak k přijímání exozomů, proto jsou tyto váčky nesmírně důležité pro mezibuněčnou komunikaci. Totožně jako buňky jejich původu oplývají exozomy dvojrstevnou lipidovou membránou, díky níž mohou přenášet látky jak lipidové, tak hydrofilní povahy. Přes různorodost transportovaných molekul od proteinů po lipidové sloučeniny bývají exozomy nejčastěji spojovány s obsahem různých typů RNA. Především microRNA bývají v rámci těchto extracelulárních vezikulů hojně zastoupeny a obvykle hrají roli v buněčných procesech u recipientních buněk.

Mozkových nádorů bylo již identifikováno mnoho typů, a to benigních i maligních. Pro jejich místo výskytu bývají následky vzniku těchto útvarů často fatální. Především zhoubné nádory bývají proto objektem pozornosti mnoha vědeckých výzkumů, kde odborníci hledají nové mechanismy pro jejich léčbu. Za mozkové nádory s nejhorší prognózou bývají považovány gliomy, konkrétně glioblastomy, a také meduloblastomy. Terapie bývají většinou založené na chirurgickém zákroku případně spojeným s využitím radioterapie anebo chemoterapie.

Bylo prokázáno, že exozomy se ve značném množství vyskytují také v nádorové tkáni v mozku. Rakovinné buňky mezi sebou komunikují prostřednictvím exozomů a mohou si takto předávat rozličné vlastnosti. Například schopnost rezistence vůči chemoterapeutické léčbě může být přenášena pomocí těchto vezikulů. Celkově se molekuly přinesené exozomy účastní dalších mechanismů vedoucích k progresi nádorového bujení, například angiogeneze, proliferace, zabránění apoptózy a potlačení imunitní odpovědi. Jejich výskyt ovšem může být i ku prospěchu, a to obzvlášť v případech diagnózy nádorových útvarů a určení stupně jejich progresu. Navíc experimenty *in vivo* i *in vitro* na myších modelech ukazují, že exozomy by našly využití i v léčbě mozkových nádorů. Jejich unikátní biologické vlastnosti z nich vytváří ideální přenašeče molekul s tumor supresorovými účinky. Zaprvé mohou transportovat sloučeniny stimulující imunitní systém, a tím podpořit imunitní odpověď pacienta proti nádorovému bujení. Dále jsou schopné přemístit do cílového místa určité miRNA/siRNA, které následně pomocí tzv. RNA interference potlačí procesy spojené s maligní transformací. Taktéž by exozomy mohly být použitelné pro dopravení již vyvinutých léčivých látek do nádorové tkáně, zejména pro jejich možnost překonávat hematoencefalickou bariéru a dostat se tak až k mozkové tkáni.

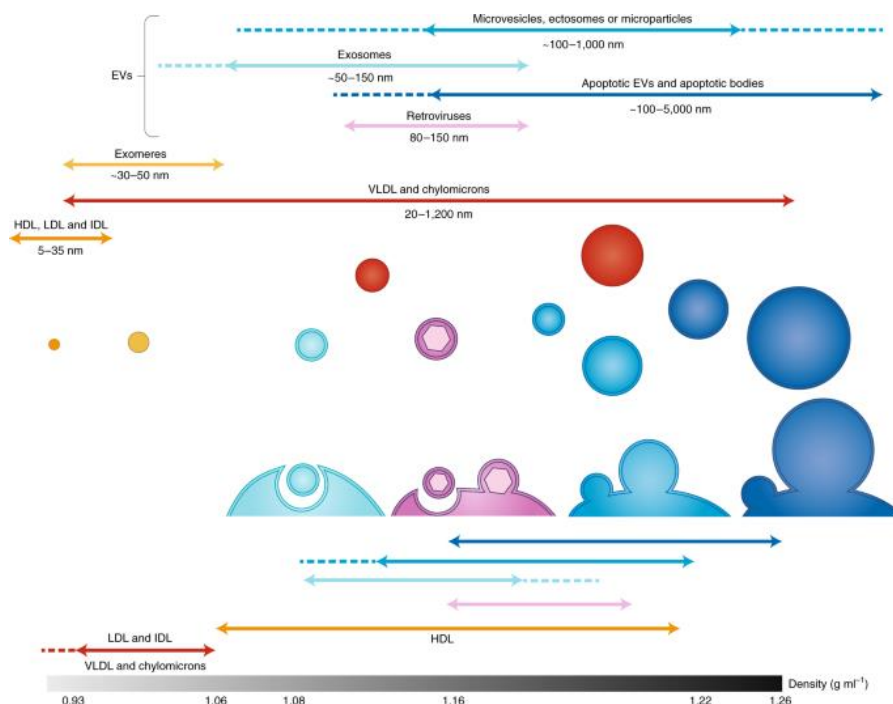
Cílem této bakalářské práce je vytvoření základního přehledu o exozomálních vezikulech, typech mozkových nádorů a především shrnutí dosavadních znalostí o působení exozomů na buňky mozkových nádorů.

2 Exozomy

Buňky mohou během svého života produkovat několik typů extracelulárních vezikulů, které by se obecně daly rozdělit do dvou kategorií - ektozomy a exozomy. Mezi ektozomy řadíme mikrovezikuly, mikropartikule a velké vezikuly, které mohou měřit až 1 μm v průměru. Zatímco ektozomy vznikají pučením z plazmatické membrány buňky, exozomy jsou endozomálního původu a mohou obsahovat lipidy, proteiny, nukleové kyseliny, metabolity nebo glykokonjugáty^{1,2}. Exozomy mohou nabývat velikosti o průměru 40 – 160 nm, jsou tedy menší než ektozomy³.

Odlišnosti ve velikosti, tvaru i hustotě exozomů jsou pravděpodobně způsobeny jejich rozdílným obsahem. Lze nalézt optické rozdíly zevnějšku mezi exozomy obsahujícími specifické proteiny, lipidy, nebo jiné látky. Nestejný vzhled exozomů by ale mohl vzniknout i na základě jejich nedostatečně pečlivé purifikace¹.

Většina typů buněk oplývá funkcí produkovat exozomy. Bylo potvrzeno, že je můžeme najít v buněčných populacích trombocytů, lymfocytů, adipocytů a zároveň u gliových, svalových, nádorových a kmenových buněk⁴.



Obrázek 1: Porovnání různých typů extracelulárních vezikulů s jinými izolovanými částicemi⁵

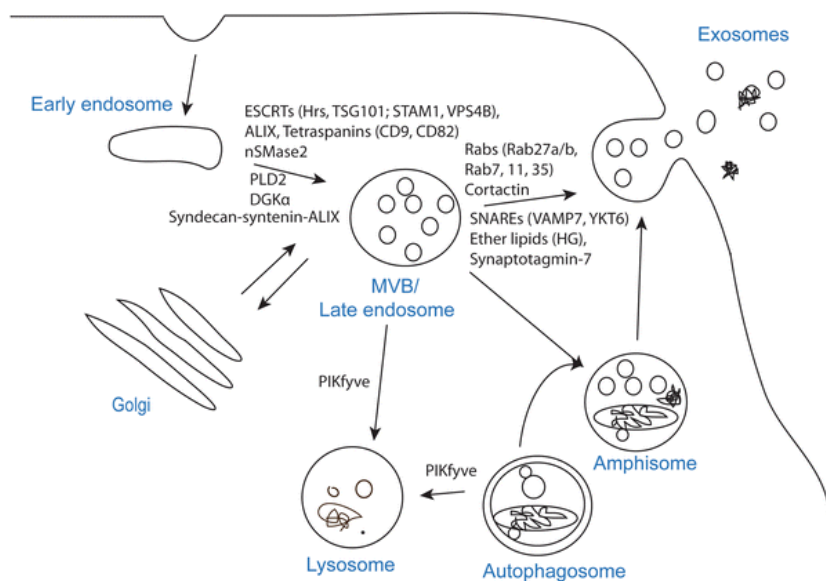
2.1 Biogeneze

Exozomy mohou vznikat vícero způsoby, nejčastěji mají původ v endocytických kompartmentech⁶. Časné endozomy se objevují po invaginaci cytoplazmatické membrány a následné fúzi prvotních

endozomů⁷. Tyto váčky mohou být na základě nákladu, který obsahují, dále procesovány pomocí endozomálních třídících komplexů vyžadovaných pro transport (ESCRT). Pokud obsahují ubiquitinylované molekuly, nemohou se navrátit k cytoplazmatické membráně a splynout s ní. Dále může být pozměněna struktura membrány endozomu, aby mohl být náklad invagován do dalších endozomů. Poslední možností je vznik intraluminálních váček obsahujících vybraný náklad, které jsou tvořeny pučením endozomální membrány směrem do lumen endozomu⁸.

Tato multivezikulární tělíska jsou známa také jako pozdní endozomy⁹. Pokud pozdní endozomy podstoupí fúzi s lysozomy, je jejich obsah degradován¹⁰. Mohou ale rovněž fúzovat s cytoplazmatickou membránou a vypustit svůj obsah, tj. intraluminální váčky, do extracelulárního prostoru. Tyto intraluminální váčky jsou po tomto procesu nazývány exozomy^{11,12}. Bylo prokázáno, že v membránách exozomů se cholesterol vyskytuje více než v běžných okřscích cytoplazmatické membrány. Takto četné zastoupení je zřejmě pro vznik exozomů podstatné¹³. Před svým vypuštěním bývají vezikuly obohaceny o tetraspaniny, následně se k tomuto procesu přidávají proteiny ESCRT komplexu^{14,15}. Rozeznáváme čtyři proteinové komplexy tvořící dráhu ESCRT, a totiž ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III. K nim řadíme rovněž AAA ATPázu (ATPase associated with diverse cellular activities) VSP4 (vesicle-fusing ATPase)¹⁶. ESCRT-0 obsahuje ubiquitin-vazebné domény, které jsou schopny rozeznávat ubiquitiny na membránách endozomů. Komplex ESCRT-I se následně váže k podjednotce ESCRT-0, kterou je HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate)^{17,18}. Základní struktura ESCRT-I se skládá z heterotrimeru VPS23, VPS28 a VPS37 (vacuolar protein sorting associated proteins 23, 28 a 37). U ESCRT-II bychom našli část VPS 36 (vacuolar protein sorting associated protein 36), která obsahuje GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45) doménu. Na této doméně se nachází N-koncový NZF (Npl4 zinc finger) zprostředkující vazbu k ESCRT-I. S komplexem ESCRT-II pak ESCRT-III interaguje pomocí své VPS20 (vacuolar protein sorting associated protein 20) podjednotky. Skupiny proteinů ESCRT jsou tak podstatné pro třídění lipidů, proteinů, a hlavně tvorbu vezikulů¹⁹. Bylo ovšem prokázáno, že multivezikulární tělíska jsou schopna vzniknout i bez komplexů ESCRT²⁰.

Pro sekreci exozomů jsou nezbytné ionty vápníku a dále proteiny schopné hydrolyzovat GTP - RAB35, RAB11, RAB27a a RAB27b (Ras-related proteins 35, 11, 27a a 27b)²¹⁻²⁴. Nádorové buňky jsou schopné k vypuštění exozomů používat GTPázu RAB7 (Ras-related protein 7) a tento mechanismus tak může přispívat k progresi rakovinného onemocnění. Exozomy zahrnuté v tomto procesu bývají obohaceny o proteiny ALIX (ALG-2-interacting protein X) a syntenin^{25,26}.



Obrázek 2: Molekuly ovlivňující biogenezi exozomů²⁷

2.2 Funkce

Exozomy jsou užitečným nástrojem mezibuněčné komunikace. Mohou obsahovat ligandy, které interagují s buněčnými receptory, čímž je dosaženo signalizace, aniž by muselo dojít ke kontaktu dvou buněk. Některé exozomy by mohly měnit vlastnosti cytoplazmatické membrány buňky a její adhezenci tím, že k ní přilnou. Pokud by exozomy s membránou buňky fúzovaly, mohly by jí předat transmembránové proteiny a svůj cytosolický obsah²⁸.

Funkce těchto extracelulárních váčků se liší jednak podle toho, ze kterých buněčných typů pocházejí, jednak podle jejich složení. Účinkují rozdílně na základě obsahu proteinů, lipidů, nebo sacharidů²⁹.

Exozomy bývají k nalezení ve tkáních zasažených různými onemocněními, například rakovinou, infekcemi nebo onemocněními autoimunitními a neurodegenerativními. V těchto místech mohou díky svým schopnostem přenášet různé signální molekuly a účastnit se tak angiogeneze, apoptózy, koagulace, regulace buněčné homeostázy, zánětu a prezentace antigenů³⁰.

Významnou funkci mají exozomy v rozličných mechanismech imunitního systému. Prezentaci antigenů mohou provozovat extracelulární váčky s původem v dendritických buňkách. Tyto vezikuly jsou obohaceny o MHC (hlavní histokompatibilní komplex) třídy I i II na svém povrchu, čímž jsou schopny aktivovat CD8+ (cluster of differentiation 8) lymfocyty. Cytotoxické lymfocyty dále hrají důležitou roli například při potlačení rakovinného bujení. V tomto procesu jsou důležité i NK (natural killer) buňky, které mohou být taktéž aktivovány pomocí exozomů z dendritických buněk^{31,32}. Další typ antigen-prezentujících buněk, totiž B lymfocyty, rovněž produkuje exozomy s MHC II. třídy a přispívá tak ke stimulaci T lymfocytů³³. Bylo zjištěno, že i exozomy žírných buněk se mohou účastnit imunitní odpovědi. Obsahují

heat shock proteiny HSC70 (heat shock cognate 71 kDa protein) a HSP60 (heat shock protein 60), které v tomto procesu fungují jako adjuvanty. Navíc mohou tyto mikrovezikuly pomoci vyvolat specifickou imunitní odpověď protilátkami IgG1 (imunoglobulin G1) a IgG2A (imunoglobulin G2A). Podstatná je bezpochyby i role exozomů žírných buněk v maturaci dendritických buněk. Mohou toho dosáhnout za využití zkřížené prezentace antigenů³⁴. Bhatnagar et al. prokázali, že exozomy dokážou mít vliv na tvorbu prozánětlivé odpovědi. Konkrétně se jedná o exozomy produkované buňkami napadenými patogeny³⁵.

Pomocí mikrovezikulů mohou být přenášeny i faktory nezbytné pro zachování pluripotentního stavu buněk³⁶.

2.3 Obsah

Exozomy mohou obsahovat řadu jak transmembránových, tak cytosolických proteinů. Mezi ty známější bychom mohli zařadit transmembránové tetraspaniny (například CD9, CD63 a CD81, tj. cluster of differentiation 9, 63 a 81), EGFR (epidermal growth factor receptor), ESCRT proteiny, HSP, ERM (ezrin, radixin a moetin proteiny), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), IGSF8 (immunoglobulin superfamily member 8), MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8 protein), prionové proteiny, PTGFRN (prostaglandin F2 receptor negative regulator) a WNT (wingless/int-1) proteiny. Dále je signifikantní i výskyt proteinů účastnících se vzniku a uvolňování exozomů, kterými jsou například některé z proteinů rodiny RAB³⁷⁻⁴⁵.

Náklad exozomů však nemusí tvořit jen molekuly proteinů, ale i molekuly lipidové. Bylo prokázáno, že váčky mohou obsahovat zejména sfingomyelin, cholesterol, fosfatidylcholin, fosfatidylserin, fosfatidylethanolamin, diacylglycerol, fosfatidylinositol, ceramid a gangliosidy GM1, GM2 i GM3⁴⁶. Exozomy nemusí svým lipidovým složením zcela odpovídat své mateřské buňce. Ačkoli obsahem glycerofosfocholínu, sfingomyelinu a glycerofosfoethanolaminu se buňkám, ze kterých pocházejí, podobají, obsahem polynenasyceného glycerofosferinu a fosfatidylserinu se zpravidla liší. Molekula glycerofosferinu byla v mikrovezikulech nacházena ve větším množství než v buňkách⁴⁷. Membrány exozomů bývají také bohatší na fosfatidylserin než cytoplazmatické membrány⁴⁸.

Dalším možným nákladem extracelulárních váček mohou být nukleové kyseliny. V exozomech byla nalezena nejen genomová DNA (deoxyribonukleová kyselina), ale i ta mitochondriální a RNA (ribonukleová kyselina)^{49,50}. RNA je v exozomech celkem běžně zastoupena. Bylo zde nalezeno velké množství typů této kyseliny, z těch známějších je to mRNA (messenger RNA), ribozomální RNA, konkrétně 18S rRNA a 28S rRNA, miRNA (microRNA) a transferová RNA. Z těch méně běžných jsou v exozomech k nalezení dlouhá nekódující RNA, piwi-interagující RNA, malá jaderná RNA a malá jadéřková RNA⁵¹. Vysoké zastoupení molekul miRNA by mohlo poukazovat na funkci exozomů. Tyto RNA se totiž mohou účastnit procesů přispívajících k přežití buněk, nádorovému růstu a angiogenezi⁵².

Molekuly RNA ve váčcích typicky nebývají delší než 200 nukleotidů, což poukazuje na fakt, že jsou fragmentované⁵³. Jinak tomu ovšem bývá u cirkulárních RNA, které v exozomálním prostředí zůstávají neporušené a stabilní⁵⁴. Pravděpodobnou funkcí mikrovezikulů by mohlo být chránit RNA ve svém interním prostředí před prostředím extracelulárním, které je bohaté na degradační RNázy⁵⁵.

Při výběru miRNA, jež by měla být umístěna ve vnitřním prostředí exozomu, se ukázala být důležitá sekvence GGAG lokalizovaná v této miRNA. Tento čtyrnukleotidový motiv je schopen interagovat s ribonukleoproteinem hnRNPA2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1), který se účastní příjmu nákladu do vezikulů⁵⁶. Osud miRNAs může být rovněž určen na základě jejich posttranskripčních modifikací. Zatímco miRNA se 3' koncovou uridylicí se stávají součástí exozomů, ty se 3' koncovou adenylací mají tendenci zůstat součástí cytosolu⁵⁷. Dalším prvkem, který ovlivňuje uložení miRNA, je protein nSMase2 (neutral sphingomyelinase 2). Tato sfingomyelináza je důležitá pro tvorbu ceramidu a pučení exozomů. Pokud dojde k navýšení její exprese, je též docíleno přírůstku miRNA v extracelulárním prostředí⁵⁸. V neposlední řadě zde figuruje protein Argonaut-2 (AGO2). Bylo prokázáno, že pokud dojde k utlumení tohoto proteinu, pak se sníží exprese miRNA určených k exportu z buněčného prostředí⁵⁹.

U mRNA hrají pravděpodobně velkou roli v určení jejich umístění motivy uložené ve 3' nepřekládané oblasti. Jedním takovým motivem je například dvaceti pěti nukleotidová sekvence, jejíž hlavní část tvoří sekvence CUGCC na smyčkové struktuře (tzv. stem-loop structure) a vazebné místo pro miRNA. Se zvýšeným množstvím miRNA se ve vezikulech tedy úměrně zvyšuje i množství mRNA^{60,61}.

2.4 Metody izolace

Existuje již řada metod vhodných k izolaci mikrovezikulů, avšak pro budoucí studie by bylo vhodné dát těmto metodám uniformní řád, aby mohla být data z výzkumů dobře srovnávána.

Mnoho výzkumných týmů již po více než desetiletí užívá pro purifikaci exozomů ultracentrifugaci. Nevýhodami této metody jsou dozajista vysoké časové nároky a složitá příprava. Navíc maximální počet vzorků se odvíjí od velikosti centrifugačního rotoru a výtěžek obvykle nebývá příliš vysoký. Na druhou stranu, za předpokladu využití sacharózového gradientu, mohou být purifikovány exozomy v podstatě bez znečištění. Na izolaci extracelulárních vezikulů je ideální preparativní ultracentrifugace, která se používá pro oddělování biologických komponent^{30,62}.

Další izolační metodou je filtrace, která odděluje exozomy na základě jejich velikosti. Oproti centrifugaci je v tomto případě filtrace méně časově náročná a nevyžaduje zároveň natolik složité a drahé laboratorní vybavení. Dokáže přitom být stejně efektivní jako předchozí metoda. Kromě toho pro filtraci není obtížné vypořádat se s malými objemy vzorků^{62,63}. Za pomoci složitější aparatury lze izolovat exozomy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Nevýhodou metod, které závisí na velikosti exozomů, je fakt, že ve vzorku mohou být obsaženy nanočástice o stejném průměru. Celkově tedy nejsou příliš vhodné pro oddělení mikrovezikulů bez nečistot^{62,64}. K purifikaci exozomů lze

však následně využít rozměrově vylučovací chromatografii. Při procesu chromatografie dochází k frakcionaci, díky čemuž je možné dosáhnout větší čistoty izolátu^{65,66}.

Polyethylenglykol (PEG) je polymer, jenž je schopen usnadnit precipitaci exozomů na základě pozměnění jejich rozpustnosti a rozptylu. Následně je možné pro dokončení úkonu použít centrifugaci při nízké rychlosti nebo filtraci. Již nejedna společnost uvedla na trh činidla pro izolaci exozomů. Tyto reagenty fungují na podobném principu jako PEG, totiž že za předpokladu sloučení molekul vody dohromady mohou méně rozpustné částice (exozomy) oddělit od zbytku vzorku. Po tomto kroku je opět vhodné izolovat vezikuly pomocí centrifugace při nízké rychlosti. Reagenty jsou navíc uzpůsobené pro širokou škálu vzorků, svým složením se mírně liší podle toho, zda jsou určeny pro vzorek ze slin, mléka či například plodové vody^{30,62,67}.

Z imunologických metod je pro izolaci exozomů použitelná afinitní chromatografie. Její princip spočívá v zachycení exozomů pomocí specifických protilátek navázaných na vhodné médium, čímž mohou být například magnetické částice nebo mikrofluidní matrice. Charakteristickými protilátkami bývají tetraspaniny CD9, CD63 a CD81. Namísto protilátek však mohou být použity též lektiny vázající se na sacharidové, konkrétně manózové, zbytky vyčnívající z exozomální membrány. Pro purifikaci ovšem není aplikace lektinů příliš vyhovující, neboť nemalé množství buněk obsahuje monosacharid manózu na svém povrchu. V neposlední řadě se nabízí možnost vazby exozomů na Vn (venceremin) peptidy. Metoda pracující s Vn-96 peptidy se prokázala jako efektivní při izolaci extracelulárních vezikulů zahrnujících exozomy^{62,68-71}.

Významnou imunologickou metodou, která se rovněž prokázala jako účinná pro izolaci exozomů, je ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). Jejími výhodami jsou jednoznačně spolehlivost, nenáročnost a cenová dostupnost. Metodu ELISA je možno přizpůsobit pro různé biologické vzorky, konkrétně například pro lidskou plazmu, krevní sérum a moč⁷².

Mezi novější izolační metody patří ty používající mikrofluidní systémy. Dokážou třídít exozomy nejen na základě velikosti, hustoty nebo imunoafinity, ale i pomocí akustiky, elektroforézy, DLD (deterministic lateral displacement), zachycení na nanodrátky a dále kupříkladu pomocí viskoelastického průtokového třídění. Výhody těchto metod spočívají v časové i finanční nenáročnosti, jsou také snadno automatizovatelné. Nevýhodou však v jejich případě zůstává nedostatečná standardizace a malé množství proběhlých studií na klinických vzorcích⁷³⁻⁷⁵.

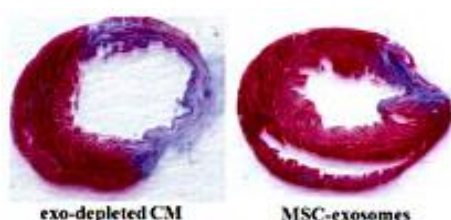
2.5 Exozomy a onemocnění

Počet exozomů v buňce a jejich náklad není přesně daný, může být ovlivněn různými mechanismy. Na exozomy mohou působit environmentální vlivy i syntetická léčiva. Bylo rovněž prokázáno, že pokud je buněčné prostředí zasaženo onemocněním, mohou přítomné buňky reagovat na tuto situaci sekrecí pozměněných exozomů⁷⁶⁻⁷⁸.

Exozomy mohou hrát roli ve fyziologii srdce, a to jak v patofyziologii, tak v přenášení molekul, které mohou přispívat ke správné funkci srdečního svalu. Bylo prokázáno, že exozomy z různých kmenových buněk nebo ze tkání, které podstoupily tzv. ischemický preconditioning, by mohly být užitečné v léčbě kardiovaskulárních onemocnění^{79,80}. Ischemický preconditioning bývá totiž používán pro léčbu ischemicko-reperfuzního poškození⁸¹. Na druhou stranu, dle Bang et al. se exozomy účastní přenosu miR-21* a touto molekulou bývají obohaceny především v profibrotickém a prohypertrofickém prostředí. Jako miR-21* byla označena RNA miR-21-3p izolovaná z fibroblastických exozomů. Tento fakt naznačuje, že mikrovezikuly souvisí se šířením patologického stavu hypertrofie, tedy zvětšováním kardiomyocytů^{79,80}.

Další patologické jevy srdečního svalu mohou vyplývat ze septického stavu. V tomto případě jsou patologie rovněž ovlivňovány exozomy. Jsou produkovány krevními destičkami a hrají roli v poškození endotelu (i v okolí srdce). Naopak, exozomy původem z mezenchymálních kmenových buněk obsahují miR-223, totiž miRNA, která přispívá k ochraně srdečního svalu. Počet těchto exozomů je ovšem v krvi pacientů se sepsí snížen. Ochrany kardiomyocytů se mohou účastnit také exozomy ze srdečních progenitorových buněk^{80,82}.

V případě infarktu jsou nápomocné exozomy z mezenchymálních kmenových buněk. Tyto mikrovezikuly přispívají k angiogenezi, čímž uchovávají správný systolický a diastolický tlak. *In vitro* bylo také prokázáno, že zamezují proliferaci slezinných lymfocytů. Pokud je počet těchto buněk snížen, pak nedochází k šíření zánětu. Obě tyto skutečnosti se tedy významně podílí na regeneraci myokardu po mrtvici⁸³.



Obrázek 3: Obrázek srdeční tkáně po 4 týdnech od infarktu vytvořený pomocí Massonova trichromového barvení. Modrá barva znázorňuje fibrotizovanou tkáň myokardu, červená barva znázorňuje běžnou (zdravou) tkáň myokardu. Na obrázku vlevo je zachycen myokard bez ošetření exozomy, napravo pak obrázek myokardu s využitím exozomální léčby⁸³.

Mimo srdeční sval se exozomy uplatňují v řadě jiných tkání. V rozvoji neurodegenerativních onemocnění mohou hrát podstatnou roli proteiny s patologickou konformací. Exozomy v mozkových buňkách pak ovlivňují proliferaci těchto proteinových agregátů, čímž významně ovlivňují výskyt neurodegenerativních onemocnění. Membrána exozomu ohraničuje prostředí bohaté na gangliosidy, jež napomáhají proteinům vytvářet β -skládané listy. Pokud se β -skládané listy dále spojují, dávají vzniknout patologickému agregátu. U jednotlivých onemocnění působí patologicky odlišné proteiny, ale obecně byla souvislost exozomů s chorobnými stavy prokázána například u Creutzfeld-Jakobovy, Parkinsonovy nebo Alzheimerovy choroby⁸⁴⁻⁸⁶.

Výskyt exozomů se specifickým nákladem prokazatelně souvisí rovněž s výskytem zánětlivých onemocnění střev. Jak mikrovezikuly v traktu trávicí soustavy, tak ty slinné vznikají sekrecí orálních buněk, jejich složení by tedy mělo být totožné. Ve slinách myši trpících Crohnovou chorobou či ulcerózní kolitidou byly nalezeny exozomy s vyšší hladinou proteinu PSMA7 (proteasome 20S subunit alpha 7), než obsahovaly exozomy kontrolní skupiny. Vzhledem k poznatku, že PSMA7 nalezneme i u lidí, mohl by tento protein sloužit pro indikaci zánětlivých onemocnění střev⁸⁷.

2.6 Exozomy a nádorová onemocnění

Velká pozornost je ve vědeckém poli věnována úloze exozomů v nádorových onemocněních. Exozomy nalezené ve tkáni zasažené rakovinným bujením obvykle obsahují zvýšené množství specifických miRNA. Například u nádoru prsu a jícnu bychom našli miR-21⁸⁸⁻⁹⁰.

U nasofaryngeálního karcinomu dokáže protein LMP1 (latent membrane protein 1) zvýšit hladinu proteinu HIF1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha). Nasofaryngeální buňky spolu komunikují prostřednictvím exozomů bohatých na LMP1, a tudíž HIF1 α , který u recipientních buněk souvisí s epitelo-mezenchymální tranzicí. Tímto bylo prokázáno, že exozomy jsou schopné přispívat k progresi tumoru. Tuto jejich schopnost potvrdil i výzkum Liao et al. z roku 2016, kde exozomy obsahující molekuly miR-21 podporovaly migraci recipientních buněk. Navíc bylo zjištěno, že zvýšené množství miR-21 korelovalo s pravděpodobnějším výskytem nádorového onemocnění^{90,91}.

Dalším procesem, který v tkáni s metastázemi mohou exozomy ovlivňovat, je přeměna fibroblastů v myofibroblasty. V takovém prostředí pak dochází k rozvoji angiogeneze a růstu nádoru. Patologická transformace je spojená s mikrovezikuly obsahujícími protein TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1). Nádorové fibroblasty navíc mohou produkovat exozomy, které způsobují rezistenci vůči chemoterapii a zvyšují počet nádorových kmenových buněk⁹²⁻⁹⁴.

V gastrointestinálních stromálních tumorech figurují exozomy obsahující protoonkogen KIT (tyrosine-protein kinase), jež jsou schopné ovlivňovat downstream KIT signalizační dráhy a přispívat tak k progresi nádorového bujení. Exozomy z nádorové tkáně mohou podpořit buněčnou invazivitu pomocí pozměnění sekretomu, proteomu i transkriptomu buněk hladké svaloviny. Dochází tak ke zvýšené expresi intersticiální kolagenázy. Tento enzym, taktéž zvaný matrixová metaloproteináza 1 (MMP-1), se uplatňuje v remodelaci extracelulární matrix, čímž usnadňuje migraci buněk^{95,96}.

Pro rozvoj nádoru je nezbytné vhodné prostředí složené z několika typů buněk, z nichž každá plní určitou roli. Ke stvoření této premetastatické tkáně jsou zapotřebí buňky odvozené od kostní dřeně (BMDC), a totiž ty mesenchymální, hematopoetické a endoteliální progenitorové. Právě exozomy z buněk nádorového bujení udávají těmto buňkám schopnost tvorby nových cév a šíření metastáz⁹⁷⁻⁹⁹.

Při vývoji tumoru je důležité zásobit tkáň dostatečným množstvím kyslíku a vhodných živin. Zároveň musí být z onoho místa odváděny odpadní produkty, aby se mohly nádorové buňky efektivně množit a nedocházelo k jejich nekróze. Exozomy se prokázaly jako přenašeči molekul zajišťujících tvorbu

nových cév, které poté k nádoru přivádějí potřebné nutrienty a odvádějí metabolity. Tato tzv. angiogeneze je tedy zajištěna především pomocí cytokinů SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), VEGF (vascular endothelial growth factor) a TGF β .¹⁰⁰⁻¹⁰² Angiogeneze je podporována nejen cytokiny, nýbrž i nukleovými kyselinami, konkrétně to může být EGFR-mRNA u glioblastomů, nebo mRNA ovlivňující buněčný cyklus u kolorektálního karcinomu. Tyto ribonukleové kyseliny jsou též transportovány uvnitř exozomálních vezikulů^{103,104}.

Exozomy z nádorové tkáně mohou působit na imunologickou odpověď pacienta. Jsou schopné ovlivňovat především prezentaci antigenů, samotnou aktivaci imunitního systému, ale i jeho potlačení a pochopitelně zároveň komunikaci buněk vedenou přes extracelulární prostor¹⁰⁵. Progresi tumoru dokážou exozomy přispět například tím, že zabrání diferenciaci dendritických buněk. *In vitro* bylo na myších buňkách prokázáno, že přítomnost nádorových exozomů způsobuje hromadění myeloidních progenitorových buněk neschopných se dále vyvíjet ve slezině. Později byla tato skutečnost potvrzena výzkumem využívajícím lidské buňky i nádorové exozomy¹⁰⁶.

Další schopností nádorových exozomů je navození dlouhodobé imunologické tolerance. Aktivace T-buněk probíhá prostřednictvím proteinů CD80 a CD86 exprimovaných na povrchu antigen-prezentujících buněk. Pokud jsou ovšem myeloidní progenitorové buňky ovlivněny přítomností nádorových exozomů, ztrácí pak svou schopnost akumulovat kostimulační proteiny CD80 a CD86. Následně tak neprobíhá vývoj cytotoxických T buněk. Místo nich se hromadí regulační CD4+ CD25+ T buňky, díky nimž je nádorovému bujení umožněno se rozrůstat. Antiproliferativní účinky na cytotoxické buňky má i molekula TGF β ₁, která je přenášena pomocí exozomů. Zatímco tyto buňky se tedy nemohou účastnit obrany organismu proti nádorovému onemocnění, regulačním T lymfocytům ve vývinu opět zabráněno není^{106,107}.

Dalším typem buněk účastnících se imunitních procesů, které jsou pod vlivem nádorových exozomů, jsou NK buňky. V tomto případě exozomy zabráňují expresi markeru NKG2D (natural-killer group 2, member D) na povrchu buněk. Následně nedochází k aktivaci NK buněk, jelikož pro tento biologický děj je výskyt NKG2D klíčový¹⁰⁸.

Šíření metastáz může unikat pozornosti imunitního systému navozením apoptózy u lymfocytů. V tomto případě exprimují exozomy z nádorového prostředí na svém povrchu molekulu FasL (Fas ligand), jež po interakci s molekulou Fas na povrchu T buňky způsobí její apoptózu. Následně tedy není v nádorovém mikroprostředí dostatek T buněk pro boj proti šíření metastáz¹⁰⁹.

Celkově tedy oplývají nádorové exozomy mnoha mechanismy, které mohou vyústit například v přeměnu benigních epiteliálních buněk v buňky maligní, přetvoření extracelulární matrix, aby se mohly metastatické buňky snadněji šířit, nebo například ve vytvoření pronádorového prostředí^{110,111}.

Na druhou stranu, exozomy dokážou, co se týče nádorových onemocnění, působit i léčebnými, totiž tumor supresorovými, efekty. V takovém případě přenášejí do zasažené tkáně specifické miRNA, které se

tam jinak vyskytují v malém zastoupení. Například byl prokázán pozitivní účinek miR-143 na potlačení šíření metastáz v plicích. Je proto nezpochybnitelné, že by se tyto ribonukleové kyseliny, společně s další léčbou zahrnující chemoterapii nebo protilátky, mohly stát důležitým prvkem v klinickém boji proti rakovině¹¹².

V rámci léčby by se dalo využít metody zablokování horizontálního transferu exozomů mezi buňkami. Jelikož jsou tyto vezikuly schopny nejrůznějšími mechanismy přispívat k proliferaci nádorových buněk, pak zabránění jejich přenosu tuto proliferaci znemožní¹¹³. Exozomům může nejenom být zabráněno v šíření, ale mohou být i zcela eliminovány ze tkáně speciálním filtračním systémem¹¹⁴. Jejich vlastnost putovat mezi buňkami a transportovat k cílovým buňkám určité molekuly může být využita i ve prospěch pacientů. Exozomy by mohly fungovat jako nanovezikuly přenášející do zhoubné tkáně tumor supresorové miRNA. Jsou taktéž vhodnější pro tento účel než například liposomy, protože jsou více biokompatibilní. Kromě určitých účinných miRNA je nutno k exozomům přikládat ještě molekuly, jež je zacílí do místa působení¹¹⁵.

3 Mozkové nádory

Mozkové nádory se stejně jako nádory ostatních tkání rozdělují na dvě hlavní skupiny – benigní a maligní. Benigní nádory v mozku mohou však, na rozdíl od většiny benigních nádorů v odlišných částech lidského těla, být životu nebezpečné. Chirurgické odstranění patologické tkáně v tomto případě není možné, jelikož nádory mohou být navázané na část hypotalamu či jiné struktury. Obecně diagnostika nádorů začíná zobrazením přes CT (výpočetní tomografii), MRI (magnetickou rezonanci) či odběrem vzorku kvůli histologickému vyšetření. Pro určení následné vhodné terapie pacientů je pak potřeba pečlivé spolupráce neurologů, neurochirurgů, neuropatologů, radiačních terapeutů, onkologů a neuroradiologů^{116,117}.

3.1 Benigní nádory

3.1.1 Meningiomy

Jedním z typů nezhoubných nádorů je meningiom. Tento tumor metastázuje v mozkovém obalu, konkrétně v dura mater. Zvětšování nádoru v tomto případě probíhá celkem pomalu a karcinom není identifikován jako infiltrující. U pacientů obvykle vyvolává neurologické deficity, záchvaty, zmatení, změny osobnosti a celkově snižuje jejich kvalitu života. Meningiomy bývají léčeny endovaskulární embolizací, po níž následuje chirurgické vyjmutí. Pokud nádory není možné zcela odstranit, využívá se metody stereotaktické radiochirurgie nebo zevní radioterapie^{117,118}.

3.1.2 Hypofyzární adenomy

Jelikož je hypofýza endokrinním orgánem, projevují se zde umístěná nádorová onemocnění sníženou či zvýšenou hormonální produkcí. Obvykle lze u hypofyzárních adenomů identifikovat i neurologické projevy způsobené masivně se zvětšující sekreční žlázou. Umístění těchto adenomů determinuje, že při jejich léčbě někdy nelze využít chirurgickou excizi. Pomocí chemoterapie je však možno s pravděpodobností přes 90 % zastavit zvětšování karcinomu a normalizovat hodnoty biochemických parametrů u přibližně poloviny pacientů. Následně je vhodné přistoupit také ke specifické medikaci, čímž se hormonální hladiny vyrovnají ještě lépe^{119,120}.

3.1.3 Vestibulární schwannomy

Vestibulární schwannom, často známý pod označením akustický neurom, je taktéž nezhoubným mozkovým nádorem utvářejícím se v cerebelopontinním úhlu nebo ve vnitřním zvukovodu. Příznaky tohoto onemocnění mohou být ztráta sluchu a ušní šelest. Někteří pacienti také pociťují závrať, jelikož nádor utlačuje okolní cévy a nervy. Léčba spočívá v pečlivém chirurgickém odstranění v případě větších útvarů či ve stereotaktické radioterapii. Často se také přistupuje k podávání léku bevacizumab^{121–123}.

3.1.4 Kraniofaryngeomy

Nádory zvané kraniofaryngeomy vyrůstají z epiteliálních zbytků Rathkeho výchlípků. Obvykle se vyskytují jako kombinace solidních a cystických částí. Vzhledem ke svému výskytu v blízkosti chiasma opticum mohou způsobovat ztrátu zraku. Dále bývají v některých případech zodpovědné za rozvoj diabetes insipidus, růstovou i sexuální zaostalost u dětí nebo sekundární poruchu gonád u dospělých. U starších pacientů mohou vyústit v kognitivní dysfunkci. Péče o pacienty s cystickými typy nádorů spočívá v stereotaktické radioterapii. Pokud už se u pacientů objevují vážné symptomy, je lepší zasáhnout chirurgicky. K léčbě seniorů se často využívá alespoň částečné odstranění nádoru s následnou radiační terapií¹²⁴.

3.1.5 Epidermoidní karcinomy

Epidermoidní karcinomy se nejčastěji nachází v cerebelopontinním úhlu nebo v parapituitární oblasti. Mohou se však nacházet i v jiných částech centrální nervové soustavy, například ve střední jámě lebeční nebo v páteřním kanálu. Pacienti s touto diagnózou mohou dlouhodobě trpět na bolesti hlavy. Řešením bývá v tomto případě kompletní chirurgická excize. Její nevýhody nicméně mohou být postoperační neurologické či ischemické deficity^{125–127}.

3.1.6 Koloidní cysty

Koloidní cysty nebývají běžné, ale mohou způsobit vznik životu nebezpečného akutního hydrocefalu. Bylo například zjištěno, že u pacientky s koloidní cystou třetí mozkové komory se vyskytl otok dolních končetin, zhoršení psychického stavu i neurologických funkcí a ztuhlost šíje. Tato žena ovšem trpěla na řadu jiných onemocnění, která mohla přispět ke zmíněným příznakům. K vyléčení se využívá

precizní chirurgické odstranění, které by mělo zabránit i výskytu hydrocefalu. Pokud se ale nádor neodstraní úplně, hrozí jeho znovuobjevení^{128,129}.

3.1.7 Mozkové hemangioblastomy

Mozkový hemangioblastom byl ve studii z roku 1973 identifikován u pacienta trpícího bolestmi hlavy, které měly zhoršující se tendence při námaze. Postupně byla u tohoto muže pozorována i zhoršená motorika chůze a problémy při psaní. Po odstranění nádoru pomocí subokcipitální kraniektomie muž neprojevoval žádné příznaky neurologických deficitů¹³⁰. Stereotaktická radiochirurgie nabízí řešení v případě menších nádorů či u pacientů, u kterých se operace nedoporučuje¹³¹.

3.2 Maligní nádory

3.2.1 Gliomy

Nádory gliových buněk neboli gliomy jsou v centrální nervové soustavě jedny z nejčastějších a nejnáročnějších. Tyto tumory vznikají z podpůrných buněk neuronů. Heterogenní skupinu gliomů můžeme na základě jejich biogeneze rozdělit do základních skupin na anaplastické astrocytomy, anaplastické oligodendrogliomy, glioblastoma multiforme, anaplastické oligoastrocytomy nebo ependymomy^{132,133}. Světová zdravotnická organizace (WHO) rozděluje gliomy do čtyř stupňů dle dosažené malignity. V rámci histologického třídění nádorů se tak bere v úvahu atypický vzhled jádra, hustota buněk, nekróza a zvýšená rychlost mitózy. Nádory I. stupně vykazují jen minimální znaky malignity. Pacienti s nádorem II. stupně mohou žít v průměru ještě pět až patnáct let. Ti s nádorem III. stupně obvykle nepřežijí déle než tři roky a ti s nádorem IV. stupně (glioblastomem) se stěží dožijí jednoho roku¹³⁴.

Nádory tohoto typu mohou u mladších lidí způsobit záchvaty, u starších pak vyúsťují spíše v kognitivní poruchy. S výskytem kognitivních poruch pozitivně koreluje kromě věku i stupeň nádoru. Celkově projevy symptomů závisí na anatomickém umístění nádorů. Poněkud překvapivé bylo zjištění studie z roku 2014, že žádný z vlivů zahrnující kouření, pohlaví a předešlé zdravotní problémy nijak s příznaky gliomů nesouvisel¹³⁵.

Pro co nejlepší prognózu u pacientů je důležité tumor včas odhalit pomocí vhodné zobrazovací metody, nejčastěji MRI. Následně obvykle přichází na řadu chirurgická extrakce a histologické vyšetření kvůli určení dalších léčebných kroků. Terapie ozařováním se využívá zejména postoperačně či v případě starších pacientů¹³².

3.2.2 Meduloblastomy

Jako meduloblastomy jsou označovány nádory nacházející se v mozečku, které postihují zejména dětské pacienty. Jedná se o velmi závažnou diagnózu, jejíž prognóza se zhoršuje se snižujícím se věkem nemocných. Dívky tvoří menší část pacientů a mají zároveň vyšší šance na uzdravení. Na základě odlišné transkriptomiky, demografie, genetiky a klinických znaků se tyto tumory rozdělují do čtyř molekulárních skupin – WNT, SHH (sonic hedgehog), skupina C a skupina D^{136–138}. Dle histologických rozdílů se

meduloblastomy též řadí mezi čtyři skupiny – klasické, desmoplastické, meduloblastomy s rozsáhlou nodularitou a meduloblastomy velkobuněčné (anaplastické)¹³⁹.

Typické symptomy pro meduloblastomy se mohou objevit již pár týdnů po počátku nádorového bujení, jelikož je celý proces velmi rychlý. Konkrétní příznaky onemocnění se liší na základě anatomického umístění tumoru. Pokud se nachází v mozečkových hemisférách, pak pacienti často trpí apendikulární ataxií, což může způsobit problémy s rychlými změnami pohybů. Pokud se ovšem nalézá ve středové oblasti mozečku, tak jsou pacienti náchylní spíše na trupovou ataxii, která se může projevit vykazováním potíží při tzv. tandemové chůzi (chůze stylem „pata-špička“). Také hmota samotného nádoru způsobuje intrakraniální tlak vedoucí ke zvracení, anorexii, bolestem hlavy, změnám chování, letargii a podrážděnosti¹³⁶.

Před chirurgickým vyjmutím nádoru je vhodné přistoupit k několika opatřením kvůli zvýšenému intrakraniálnímu tlaku. Pacientovi bývají podávány kortikosteroidy, případně je provedena drenáž mozkomíšního moku. V rozmezí 24 až 72 hodin po zákroku se používá k zobrazení mozkové tkáně MRI, aby se zhodnotil výskyt reziduálního nádoru. Následně se u pacienta ozařuje jak oblast mozku, tak míchy. Dávka záření je zvolena na základě věku pacienta a rozsahu meduloblastomu. Od určitého věku tak mají nemocné děti poměrně nadějnou prognózu na přežití a následný plnohodnotný život. Část jich nicméně i po залечení může trpět různými postiženími, které vznikají i následkem vývinu hydrocefalu. Naděje na přežití po operaci se zvyšuje i s uplatněním chemoterapie^{138,140}.

3.2.3 Primitivní neuroektodermální tumory

Pojem primitivní neuroektodermální nádor zahrnuje jak útvary nediferenciované, tak ty vykazující lokální či rozptýlená ložiska neuronální i gliální diferenciace. Sjednocené pod stejným názvem jsou nádory z této skupiny vzhledem k jejich mikroskopickým a klinickým podobnostem. Celkově se ale mohou neuroektodermální tumory lišit svým přesným umístěním a vzhledem. Jsou k nalezení v různých částech těla, v mozku pak byly objeveny například v laloku čelním, temporálním, parietálním, okcipitálním, corpus callosum i bilaterálně v hemisférách. Jeví se často jako cystické, ovšem mohou být i laločnaté, měkké a zcela oddělené od okolní tkáně¹⁴¹. Neuroektodermální maligní útvary mají zřejmě původ v přetrvávajících buňkách neurální lišty¹⁴².

Pacienti v souvislosti s těmito nádory mohou trpět bolestmi hlavy a problémy spojenými s konkrétním místem výskytu, například postižením zraku. Terapeutický zásah by měl začít použitím zobrazovací metody – MRI nebo CT. Poté přichází na řadu chirurgický zásah, v rámci něhož se vybere vzorek pro histologické vyšetření. Dalším krokem léčby bývá adjuvantní chemoterapie a případně též aktinoterapie. Naneštěstí, i přes dodržení konkrétních léčebných kroků se nádory často objevují znovu a pro pacienty s tímto onemocněním nebývá prognóza příliš příznivá^{142,143}.

3.2.4 Nádory pineální oblasti

Útvary v pineální oblasti mozku jsou poměrně heterogenní skupinou nádorů. Zahrnují tumory ze zárodečných buněk, parenchymální tumory, pineální gliomy a k tomu pár typů nádorů smíšených (například pineální cysty či meningeomy).

Navzdory rozdílné cytologii vykazují tyto nádory totožné symptomy na základě jejich pineálního umístění. Pacienti tak trpívají na bolesti hlavy, nevolnost, zvracení a závratě. Dochází také často ke vzniku hydrocefalu a intrakraniálního tlaku. Lékaři zprvu vyhotovují snímky mozku a páteře pomocí MRI a provádějí analýzu mozkomíšního moku pro identifikaci nádorového bujení. S pomocí mikrochirurgie se při excizi nádorů z pineální oblasti mozku dosahuje skvělých výsledků, a to zejména u benigních útvarů. V případě nádorů s vysokou malignitou bývá dále užíváno výhod postoperačního ozařování. Navíc se též přistupuje k léčbě pomocí chemoterapie, která efektivně umožňuje snížit dávku potřebného záření^{144,145}.

3.2.5 Primární lymfomy centrální nervové soustavy

Primární lymfomy centrální nervové soustavy, konkrétněji zvané primární mozkové lymfomy, postihují spíše starší pacienty kolem šedesáti let věku. Bylo zjištěno, že nádory vznikají především z metastazujících B-lymfocytů. Útvary se nejčastěji nachází v mozkových hemisférách, dále v mozečku, bazálních gangliích a také v corpus callosum^{146,147}.

U pacientů byly pozorovány příznaky zahrnující duševní poruchy, motorické i senzorické deficity, řidčeji pak bolesti hlavy i záchvaty. V rámci léčby se obvykle přistupuje k chirurgickému odstranění alespoň části zhoubného útvaru. Nicméně i poté v nemalém množství případů dochází ke znovuobjevení nádorů a prognóza nebývá pro pacienty dobrá. Kromě operace bývá aplikováno ozařování a taktéž chemoterapie, která umožňuje zvýšit dobu přežití nemocných^{147,148}.

3.2.6 Mozkové metastázy

Zhoubné nádory z jiných částí lidského těla mohou někdy metastázovat až do mozkové tkáně a zhoršovat tak celkové vyhlídky na zlepšení zdravotního stavu pacientů. Primárním místem výskytu nádoru bývají plíce, kůže, prsní tkáň, varlata a ledviny^{149,150}.

Pokud se tedy metastázy rozšíří až do mozku, mohou nemocní lidé trpět na různé neurologické problémy. Konkrétně se jedná o deficity v motorické i senzorické funkci, zvýšený intrakraniální tlak, afázii, mozečkový syndrom, záchvaty a změny chování¹⁵¹. Lidé s výskytem pouze jedné metastázy v mozku jsou vhodnými kandidáty na její chirurgickou resekci. Pokud ovšem není možné nádor operačně vyjmout, léčí se pacienti pomocí stereotaktické radioterapie a chemoterapie. V poslední řadě lze užít pouze kortikosteroidy, obzvláště pokud jsou nemocní lidé ve velmi vážném stavu a jiné terapeutické postupy by podstoupit nevládli. Jedná se pak spíše o paliativní péči^{149,152}.

4 Exozomy a mozkové nádory

4.1 Role exozomů v progresi nádorových onemocnění mozku

Exozomy nacházející se ve tkáních v kraniálních i okolních oblastech byly podrobeny řadě výzkumů, obzvláště co se jejich úlohy v nádorových onemocněních týče. Jednou z hlavních oblastí zájmu byla otázka, zda exozomy mohou pozitivně či negativně ovlivňovat zvolenou léčbu rakoviny. Dle Abramowicz et al. exozomy z nádorových buněk hlavy a krku mění svůj obsah působením ozařování. Konkrétně byly schopné navyšovat nebo snižovat hladinu některých proteinů. V drtivé většině případů bylo po radioterapii pozorováno vyšší množství proteinů než před ní. Jednalo se zejména o proteiny účinkující v metabolismu a opravě DNA, dělení organel, transportu zprostředkovaném vezikuly, mitotickém dělení jádra, buněčném vývoji, růstu a proliferaci a v buněčném cyklu^{153,154}. Pozoruhodné bylo zjištění, že pokud byly exozomy z meduloblastomů obohaceny o protein B7-H3 (B7 homolog 3), pak dokázaly nabýt na své velikosti a pojmout tak větší množství proteinů. Navíc onen protein též zvyšoval množství sekretovaných exozomů¹⁵⁵.

Rozborem proteinového obsahu exozomů v mozkových nádorech se zabývali Graner et al. Ačkoliv pracovali s exozomy izolovanými z myších nádorů, analyzovali následně některé výsledky s mikrovezikuly pocházejícími z lidských gliomů a meduloblastomů a dospěli k podobným závěrům. Uvnitř váček našli proteiny vázající kovy, chaperony PDI (protein disulfid izomeráza) a CRT (kalretikulin) a také transferin. Zároveň prokázali výskyt GPNMB (glycoprotein nonmetastatic B) a EGFRvIII (EGFR variant III), které mají roli nádorových antigenů. Dále byl nalezen cytokin účastnící se dějů souvisejících s imunitou, a totiž TGFβ1¹⁵⁶. Jako proteiny, jejichž hladina po ozařování vzrostla, byly identifikovány STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), NOTCH1/2 (neurogenic locus notch homolog protein 1/2), Cullin1, TGF-B2 (transforming growth factor 2) a CREBBP (cAMP-response element binding protein). Všechny z nich jsou řazeny do skupiny onkoproteinů. Dále se při použití radioterapie zvýšilo množství proteinů plnících důležitou roli při Jak-STAT (janus kinase and signal transducer and activator of transcription) signalizační dráze a proteazomové dráze¹⁵⁴. Uvnitř exozomů z meduloblastomů byly objeveny proteiny související s cytokinovými a chemokinovými signalizačními dráhami, angiogenezí a také signální molekuly přítomné v glykolýze, PDGF (platelet derived growth factor) a PI3K (fosfatidylinositol-3-kináza) dráze. Na druhou stranu, v poměrně malém množství zde byly nalezeny proteiny účinkující v obranných a imunitních mechanismech¹⁵⁵.

Přítomnost proteinů vázajících kovy, v tomto případě železo, v mikrovezikulech se prokázala jako důležitá pro růst nádorové tkáně u meduloblastomů. Pokud totiž byly použity chelátory železa, které ho vychytávaly a neumožňovaly tak buňkám jej využít, významně to snížilo tvorbu nádorových sfér¹⁵⁷.

Již dříve byly u exozomů objeveny chaperony z rodiny HSP – HSP27, HSP70, HSP90, HSC70, GRP78, GRP75 (glucose related proteins) a HSPBP1 (hsp70-binding protein 1). Přítomnost vysokého množství chaperonů v nádorové tkáni přispívá k jejímu růstu. Špatně sbalené proteiny jsou patologickým

stavem, který bývá rozpoznáván imunitním systémem a s jeho pomocí pak dochází k potlačení nádorového bujení. Pokud ovšem tkáň oplývá dostatečným množstvím chaperonů, které jsou schopné dát špatně sbaleným či nesbaleným proteinům šanci napravit svůj stav, pak může progrese tumoru pokračovat^{158,159}.

Kromě proteinové složky exozomů byla zkoumána i ta ribonukleová. Gliomy ze tkáně rezistentní vůči ozáření produkovaly extracelulární vezikuly obohacené o vysoké množství cirkulárních RNA (tzv. circRNA). Dle encyklopedií GO (Gene Ontology) a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) se hojně zastoupené circRNA účastní vazby proteinů, regulace apoptózy u žírných buněk, taktéž mohou negativně ovlivňovat úpravu 3' konců mRNA a pravděpodobně hrají roli v buněčném cyklu. Oproti tomu u miRNA byla pozorována mírně opačná tendence. Po ozáření docházelo spíše k jejich poklesu, i když necelá polovina ze zkoumaných miRNA byla ve svém počtu také navýšena. Funkce miRNAs, jejichž počet se po radiační terapii snížil, byla identifikována jako regulace buněčné odpovědi na rentgenové záření nebo související se signální dráhou p53¹⁶⁰. Jako miRNA spojená s progresí nádorového onemocnění byla identifikována miR-889, jejíž hladina se po ozáření tkáně zvýšila. Naopak počet miRNA, které způsobují potlačení rakovinného bujení (miR-516 a miR-365), po ozáření klesl¹⁵⁴.

V buňkách glioblastomů byla prokázána vysoká exprese miRNA zvané miR-1238. Ukázalo se, že hladina této RNA souvisí s rezistencí proti léku temozolomidu (TMZ)¹⁶¹. Stejnou funkci, totiž vyvolání rezistence proti TMZ, zastává u glioblastomů také miR-9¹⁶². TMZ bývá užíván u pacientů s gliomy, pokud standardní léčba nepřinese očekávané výsledky zastavení šíření nádoru či pokud se nádor po zásahu objeví znovu¹⁶³. *In vitro* bylo zjištěno, že exozomy nesoucí uvnitř molekuly miR-1238, jsou schopné způsobit u recipientních buněk rezistenci vůči tomuto léku. Mechanismus působení těchto miRNA spočívá v ovlivnění funkce jejich cílových molekul, jimiž je protein caveolin-1 (CAV-1)¹⁶¹. Již dříve bylo prokázáno, že CAV-1 funguje jako nádorový supresor¹⁶⁴. Pokud dojde k redukcii jeho množství prostřednictvím miR-1238, pak bývají nádorové buňky rezistentní vůči chemoterapeutické léčbě. CAV-1 totiž interaguje s proteinem EGFR, čímž negativně ovlivňuje jeho aktivaci¹⁶¹. Neaktivnímu EGFR posléze není umožněno spustit signalizaci přes PI3K-AKT (protein kinase B) -mTOR (mammalian target of rapamycin) dráhu, která se prokázala jako zodpovědná za rezistenci k použitým léčivům. Nakonec byla exozomy zprostředkovaná rezistence vůči temozolomidu prokázána dokonce *in vivo* na myších modelech^{165,166}.

Další molekulou miRNA s prokazatelně vyšší hladinou mezi glioblastomy oproti kontrolním vzorkům byla miR-148a. Tato RNA byla schopna podporovat proliferaci nádorových buněk, čímž byla zvýšena jejich schopnost metastázovat¹⁶⁷. Cíl působení miR-148a byl identifikován jako gen CADM1 (cell adhesion molecule 1), známý antionkogen^{167,168}. Vazbou miR-148a do 3'UTR (3' nepřekládané oblasti) CADM1 dochází ke snížení jeho množství jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinové. Následně není proteinu CADM1 umožněno nepřímo negativně regulovat STAT3 dráhu¹⁶⁷. Pozitivní účinky CADM1 proto spočívají v zablokování této signalizační dráhy, která posléze nemůže přispět k šíření nádorového bujení¹⁶⁹.

Nejen že ozáření má vliv na obsah uvnitř exozomů, ale taktéž působí i na jejich celkový počet. Po použití radioterapie na nádorovou tkáň gliomů byl pozorován zvýšený výskyt extracelulárních váčků schopných předávat určité molekuly buňkám, které ozářeny nebyly. Navíc se rovněž potvrdilo, že exozomy pocházející z ozářených buněk jsou recipientními buňkami přijímány ve větším množství než ty z buněk neozařených. U populace buněk nově obohacených o exozomy je posléze díky těmto změnám podpořena migrace, nedochází u ní k nekróze v takové míře jako v kontrolní skupině bez působení exozomů a zároveň dokáže být rezistentní vůči radioterapii. V rámci indukce rezistence buněčné populace jsou zřejmě podstatné molekuly cirkulární RNA^{154,160,170}.

Dalším typem účinku exozomů z ozářených nádorových buněk na buňky neozařené je podpora FAK (fokální adhezivní kináza) signalizace. FAK se účastní událostí umožňující maligní růst. Konkrétně dokáže posílit proliferativní a antiapoptotické děje v nádorové tkáni. Později bylo skutečně prokázáno, že výskyt exozomů z ozářené tkáně pozitivně ovlivňuje proliferaci radiací nezasažených nádorových buněk^{154,170,171}.

V rámci šíření nádorového bujení hraje důležitou roli stav hypoxie. Za takové situace je snížena nejen hladina kyslíku, ale též pH a glukózy. Při pozměněných podmínkách se musí buňky novému prostředí vhodně přizpůsobit, a to metabolicky a změnou genové exprese. Obvykle tak dochází k rozvoji malignity a nádorová tkáň posléze bývá rezistentní vůči léčbě^{172,173}. Konkrétně bylo zjištěno, že na buňky v hypoxické tkáni nelze účinně použít terapii ozářením, ale ani chemoterapii¹⁷⁴. Za hypoxických podmínek byla pozorována zvýšená exozomální sekrece u buněk glioblastomů. Tyto nádorové buňky produkují molekuly miR-301a, které negativně ovlivňují expresi TCEAL7 (transcription elongation factor A like 7)¹⁷⁵. Ve studii z roku 2010 byly zkoumány účinky proteinu TCEAL7. Způsoboval snížení hladiny proteinů NF-κB (jaderný faktor kappa B) dráhy, která jinak vyústovala v proliferaci, zánětlivé, angiogenetické a antiapoptotické děje. Jelikož všechny tyto procesy jsou využity během nádorového bujení, schopnost jejich potlačení vytváří z TCEAL7 účinný tumor supresorový protein¹⁷⁶. Pokud jsou tedy exozomy obsahující specifickou miRNA schopny potlačit produkci proteinu TCEAL7, a tudíž jeho vliv, pak maligním nádorům není zabráněno v rychlejším šíření. Navíc exozomy z hypoxicky uložených gliomů dokážou působit rovněž na signalizační dráhu Wnt/β-katenin a to opět prostřednictvím úbytku exprese proteinu TCEAL7. Tato exozomální vlastnost je významná z hlediska vývinu radiorezistence u recipientních buněk¹⁷⁵.

Gliomy uložené v hypoxické tkáni produkují nejen exozomy obsahující miR-301a, ale taktéž ty obsahující microRNA zvané miR-29a a miR-92a. U těchto exozomů byl zjištěn pozitivní vliv na proliferaci myeloidních supresorových buněk¹⁷⁷. Myeloidní supresorové buňky jsou schopny potlačit jak vrozenou, tak adaptivní složku imunity. Tímto procesem mohou usnadnit transformaci premaligních buněk a podpořit růst nádoru. Navíc mohou komplikovat léčbu rakoviny, jelikož léky bývají založené na aktivní imunitní odpovědi pacientů¹⁷⁸. Jejich proliferace je zajištěna pomocí interakce miR-29a s *Hbp1* (HMG-box transcription factor 1) a miR-92a s *Prkar1a* (protein kinase CAMP-dependent type I regulatory subunit

alpha). Molekuly miRNA takto zablokují funkci *Hbp1* i *Prkar1a*, již je potlačení nádorového růstu^{177,179,180}. Ukázalo se rovněž, že miR-92a má další funkci, a totiž zvýšení produkce faktorů potlačujících imunitu myeloidními supresorovými buňkami. Při výzkumu byly pozorovány zvýšené hodnoty supresorových molekul IL-10 (interleukin-10), TGF- β i reaktivních forem kyslíku (ROS)¹⁷⁷.

V roce 2020 Sharma et al. zaznamenali fenomén zvyšování počtu astrocytů v mozku na úkor oligodendrocytů, se kterým byl spojován výskyt kognitivních poruch. Za tento proces byly zodpovědné exozomy s původem v nádorové tkáni, konkrétně v gliomech. Ve tkáni mesenchymálních kmenových buněk obohacených o tyto extracelulární vezikuly docházelo ke zvýšené expresi genů spojovaných s diferenciací astrocytů. Tyto geny jsou součástí drah STAT3, NOTCH1 a zároveň dráhy tvořené dvěma geny z rodiny *Hes* (hairy and enhancer of split-1). Nicméně ne u všech genových složek těchto drah se potvrdila zvýšená exprese, ba naopak u menšiny genů byla exprese snížena. Navíc přibližně polovina vzniklých astrocytů byla obohacena o markery gliomových buněk. Bylo tak jednoznačně prokázáno, že exozomy mají schopnost určovat osud nervových kmenových buněk, aby tím vytvořily prostředí vhodnější pro šíření nádorového bujení¹⁸¹.

4.2 Role exozomů v diagnostice

Klasickými diagnostickými metodami nádorových onemocnění jsou radiografie či neurozobrazování. Nicméně s jejich využitím není zcela možné vyhodnotit progresi nádoru nebo jeho případný návrat. Poněkud lepší výsledky přináší vyšetření pomocí biopsie, avšak odebraný vzorek nereprezentuje celou histologii nádoru. Navíc je zde potřeba chirurgického zásahu, který by se pro aktuální výsledky musel opakovat, což není pro pacienta nijak příznivé. Bylo by proto ideální používat méně invazivní metody, které by však ohledně nádorového onemocnění poskytl co nejpřesnější poznatky a zároveň nebyly tak časově náročné. Nedávno uveřejněná metoda zvaná tekutá biopsie by mohla splnit tato kritéria a pomoci tak k časně diagnóze, než se u pacientů stihnou projevit vážné příznaky^{182,183}. Její postup spočívá v neinvazivním odebrání vzorku tekutiny z pacienta a jejím následném rozboru. U nádorových onemocnění se nejčastěji jedná o vzorek krve či mozkomíšního moku^{184,185}.

Přes jejich nepříliš snadnou izolaci ze vzorku bývají exozomy považovány za důležité markery při diagnóze řady onemocnění. Nádorové choroby v tomto případě nejsou výjimkou a včasná detekce za pomoci exozomů by mohla v mnoha případech ulehčit průběh následující léčby. Značnou výhodou použití nádorových extracelulárních vezikulů při diagnostice je fakt, že jsou obsaženy v mozkomíšním moku či krvi pacientů a odebrání vzorku proto není příliš náročným zákrokem. Bylo prokázáno, že extracelulární vezikuly obsahují řadu proteinů a RNA, které ovlivňují různé děje v nádorové tkáni. Zejména miRNA byly u nádorů identifikovány jako často se vyskytující exozomální biomarkery^{186,187}. Výhody jejich použití spočívají ve zjištění konkrétního typu nádoru a jeho stupně¹⁸³.

Jelikož glioblastomy mají v porovnání s ostatními nádory spíše nepříznivou prognózu a často bývá jejich léčba velmi komplikovaná, mnoho výzkumů se zaměřilo na identifikaci markerů s nimi spojenými. Tyto molekuly byly zahrnuty v důležitých buněčných procesech, jednalo se například o signalizační dráhy AKT, ERK (extracellular signal-regulated kinase), STAT (signal transducer and activator of transcription), PTEN (phosphatase and tensin homolog) a SOX2 (sex-determining region Y-box 2)¹⁸⁶. Z mozkomíšního moku pacientů zasažených glioblastomy byly izolovány vyšší hodnoty miR-21 než z moku zdravých pacientů. Množství této miRNA posléze pokleslo po chirurgickém vyjmutí nádoru¹⁸⁸. Jako nejvhodnější postup se jeví rozbor exozomů před případnou operací, kvůli zjištění stupně nádoru¹⁸⁹. Celkově bylo u mikrovezikulů a nejčastěji exozomů z glioblastomů nalezeno více typů miRNA zastoupených ve větším množství. Mezi nejčastější se řadily například miR-451a, miR-4301, miR-5096, miR-3676, miR-9, miR-10a, miR-222, miR-124-3p a miR-301a. Zajímavé bylo zjištění, že v mikrovezikulech se též vyskytovaly malé RNA a krátké fragmenty RNA pocházející z transkriptů repetitivních elementů, nejčastěji z retrotranspozonů^{189–193}. Výzkum z roku 2018 potvrdil skutečnost, že hladina jisté microRNA (v tomto případě miR-301a) korelovala se stupněm nádoru. Vyšší množství miR-301a bylo pozorováno u gliomů s vysokým stupněm malignity oproti těm se stupněm nižším. Míra exprese této RNA také souvisela s patologickou klasifikací nádoru a přežitím pacientů. Na druhou stranu, věk ani pohlaví pacienta kvantitu miR-301a nijak neovlivňovaly¹⁹⁰. Různé studie přišly s odlišnými microRNA nalezenými uvnitř exozomů z nádorové tkáně. Molekuly RNA se zajisté liší dle typu nádoru, avšak mohou být rozdílné i na základě zvolené metody izolace a detekce. Zároveň určité microRNA odráží také zvolenou léčbu pacientů. Nejvhodnější by proto bylo sjednotit ony metody a v rámci výzkumu přistupovat k pacientům totožným způsobem¹⁹⁴.

Kromě microRNA by mohl jako biomarker pro identifikaci glioblastomů sloužit protein EGFRvIII. Ve studii z roku 2011 byla zaznamenána jeho přítomnost v exozomech u sedmi pacientů z pětadvaceti¹⁰³. Také malé jaderné RNA zvané RNU6-1 (RNA, U6 Small Nuclear 1) byly vyhodnoceny jako vhodné určovací parametry u pacientů s podezřením na nádorové onemocnění. U lidí s glioblastomy bylo množství této kyseliny v exozomech značně zvýšeno¹⁹⁴. Kupodivu v exozomech nebyly k nalezení dlouhé mRNA, ale jen jejich fragmenty kratší než 1000 nukleotidů. Obecně se mRNA nacházely spíše v jiných mikrovezikulech než v exozomech. Naopak miRNA se vyskytovaly především v exozomech¹⁹⁵.

U meduloblastomů by jako biomarkery mohly být užitečné také exozomální microRNA i proteiny. Meduloblastomové buňky nejčastěji produkovaly extracelulární vezikuly obsahující proteiny z ERKs/MAP (mitogen-activated protein) kinázové rodiny a také ty tvořící součást EGF (epidermal growth factor)/EGFR, ERK, WNT a PI3K/AKT/mTOR signalizačních drah. Jednalo se například o KATNAL2 (katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2), TUBAL3 (tubulin alpha chain-like 3), UBE2M (NEDD8-conjugating protein Ubc12) a RACK1 (receptor of activated protein C kinase 1). Některé z nich navíc byly nalezeny úplně poprvé co se výzkumu obsahu nádorových mikrovezikulů týče. Dále se zde v hojném množství vyskytovaly molekuly let-7a, miR-208, miR-182, miR-1248 a miR-6087¹⁸⁷.

Další výhodou využití exozomů pro určení následné terapie je fakt, že ve svém složení odrážejí účinky zvolené léčby. Tato vlastnost byla též zjištěna u buněk tvořících glioblastomy¹⁹⁶. Bylo například pozorováno, že použití radioterapie ovlivní množství komponentů exozomů, konkrétně určitých microRNA. Zatímco hladiny miR-6731-5p a miR-208b-3p se po ozáření navýšily, počet molekul miR-2116-3p poklesl. Zkoumané miRNA interagovaly s molekulami, které se účastní buněčných dějů týkajících se gliomů, a to například metabolických a nádorových progresivních procesů a p53 signální dráhy. Byly proto vhodnými kandidáty pro pozorování účinnosti léčby ozařováním¹⁹⁷. Efekt chemoterapie pomocí léku temozolomidu byl zkoumán pomocí měření hladin molekul miR-1238. Tato microRNA byla transportována uvnitř exozomů pocházejících z glioblastomových buněk¹⁶¹.

Uplatnění exozomů jakožto vezikulů obsahujících důležité biomarkery je tedy značně přínosné, nicméně i tento postup není zatím zcela neomylný. Pro lepší výsledky by bylo ideální vylepšit metodu extrakce exozomů natolik, aby vzorek odebraný od pacienta mohl být co nejméně objemný, a přitom obsahoval dostatek potřebných molekul. Navíc se v rámci různých studií metody izolace mikrovezikulů mohou lišit, a tím pádem dohromady neposkytují zcela srovnatelná data. Budoucí výzkumy by se proto měly zaměřit na určení jednotného standardu pro práci s exozomy. Dále připadá v úvahu navýšit počet známých molekul, které by mohly sloužit jako biomarkery pro konkrétní nádorová onemocnění¹⁹⁸.

4.3 Použití exozomů v rámci léčby mozkových nádorů

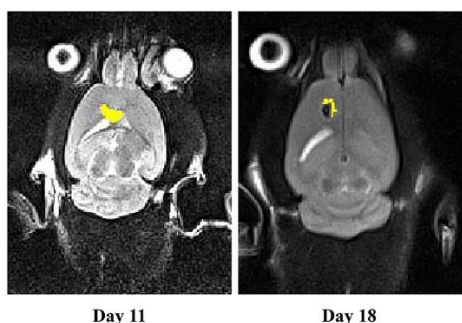
Použití exozomů v rámci léčby mozkových nádorů se věnuje posledních letech řada výzkumů, a to především proto, že tyto extracelulární vezikuly přináší řadu unikátních výhod. Zprvce jsou recipientní buňky ve většině případů kompetentní v příjmu exozomů, které v novém prostředí dále mohou ovlivňovat rozličné buněčné děje jako například apoptózu, imunitní procesy a proliferaci a diferenciaci buněk^{106,199}. Dále se ukázalo, že RNA umístěna uvnitř exozomů je stabilnější než ta buněčná²⁰⁰. Pokud by byly při terapii použity exozomy přímo ze tkání pacienta, pak nejsou po aplikaci do cílového místa odmítnuty imunitním systémem. Při nádorovém bujení se obvykle v rámci buněčného metabolismu spouští více patologických signálních drah najednou. Exozomy v tomto případě přinášejí efektivní řešení v podobě možnosti nést více druhů léčiv a ovlivnit tak vícero těchto drah²⁰¹. V neposlední řadě lze také modifikovat jak obsah, tak membránové složení exozomů, díky čemuž jsou vhodnými kandidáty pro léčbu různých onemocnění²⁰².

Na základě již proběhlých výzkumů je v mnohých případech známo, jaké molekuly přenášené uvnitř exozomů přispívají k šíření nádorů a rozvoji malignity. Cílem účinné léčby by tak mohly být látky působící proti exozomům či přímo proti těmto molekulám.

Použití léčiv heparinu či simvastatinu se prokázalo jako účinné při zablokování rezistence vůči radioterapii gliomů, která byla způsobena molekulami transportovanými pomocí exozomů. Buňky, které za normálních okolností reagovaly na obsah exozomů původem z ozářených buněk proliferací a zablokováním apoptózy, nebyly nadále schopné tyto procesy vykonávat. Oproti kontrolním vzorkům

bez léčiv podléhaly medicínsky ošetřené nádorové buňky častěji apoptóze. Heparin i simvastatin se proto prokázaly jako efektivní blokátory příjmu exozomů. Úspěšná léčba byla nadále potvrzena i na živých myších modelech. Proběhl také pokus zabránit exozomům kontaktovat recipientní buňky pomocí protilátky proti tetraspaninu CD81, avšak tento způsob terapie nebyl natolik účinný¹⁵⁴.

V rámci mezibuněčné komunikace pomocí exozomů hrají často důležitou roli microRNA. Terapie by proto mohly být zaměřené proti vlivu těchto kyselin. Ke znemožnění jejich funkce byly vyvinuty speciální konstrukty, totiž RNA transkripty, které jsou svou sekvencí komplementární k určitým miRNA. Vazbou k dané sekvenci miRNA jsou následně navržené transkripty schopny zablokovat jejich funkci²⁰³. U glioblastomů byla miR-21 identifikována jako podstatná pro navození dějů podporujících růst nádoru²⁰⁴. Výzkum z roku 2019 se zaměřil na vytvoření konstruktu, který by zablokoval funkci miR-21. Pro dopravení do cílové oblasti k molekulám miR-21 byly taktéž použity exozomy. Výsledný efekt snížení počtu funkčních miR-21 se ve větší míře dostavil čtyřicet osm hodin po aplikaci extracelulárních vezikulů. Pomocí kontrolního měření bylo zjištěno, že skutečně nebylo zabráněno účinku cílových molekul miR-21, kterými jsou PDCD4 (programmed cell death protein 4) a RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs). Celkově tak bylo na základě použitého mechanismu docíleno apoptózy značného množství nádorových buněk a zároveň omezení jejich životaschopnosti. *In vivo* pokus na krysím mozku s buněčnou linií glioblastomů prokázal po aplikaci konstruktů nejen zastavení růstu nádoru, nýbrž i jeho nekrózu, a tudíž zmenšení jeho objemu. Použití sekrečních exozomů obsahujících vhodné RNA transkripty se proto představilo jako účinná tumor supresorová metoda²⁰⁵.



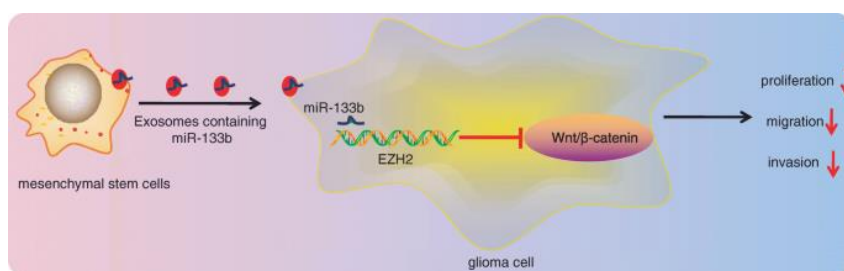
Obrázek 4: Úbytek nádorové tkáně v krysím mozku po ošetření pomocí specifických RNA transkriptů²⁰⁵

Jelikož miR-9 dokáže způsobit rezistenci proti léku temozolomidu, pak se zablokování její funkce jeví jako potenciální terapeutická metoda. Pro tento účel byly zvoleny molekuly anti-miR-9 transportované do cílového místa působení v exozomech z mezenchymálních kmenových buněk. Poté, co molekuly anti-miR-9 doputovaly do glioblastomové tkáně obsahující vysoké hladiny miR-9, dokázaly způsobit snížení rezistence proti TMZ. Docházelo také ke snížení exprese proteinu P-glykoproteinu (permeabilního glykoproteinu), který je kódován genem *MDR1* (multi-drug resistance 1), významným transportérem léčiv. Obecně bývá *MDR1* často dáván do souvislosti s chemorezistencí u nádorových buněk. U nádorových buněk byla po terapii výraznější kaspázová aktivita, což naznačovalo častější apoptotické děje, a tedy úbytek nádorové hmoty¹⁶²

Léčba mozkových nádorů by kromě zablokování funkce určitých microRNA mohla spočívat také ve využití jiných microRNA pro terapeutické účely. U molekul miR-146b byl již dříve pozorován tumor supresorový efekt. V rámci glioblastomových buněk způsobovaly miR-146b pokles jejich invazivity i migrace²⁰⁶. Pro aplikaci této miRNA do ideálního místa působení byly využity stromální buňky kostní dřene.²⁰⁷ Tento typ buněk totiž produkuje dostatečné množství exozomů vhodných pro transport miRNA²⁰⁸. Do kultury stromálních buněk byl vpraven plazmid kódující miR-146b a po čtyřiceti osmi hodinách již byly z média izolovatelné exozomy obsahující tuto RNA. Dále bylo potvrzeno, že exozomy byly *in vitro* schopny přenést potřebné molekuly k buňkám glioblastomů. Recipientní nádorová tkáň následně reagovala na jejich příjem zpomalením svého růstu. V neposlední řadě bylo dokonce *in vivo* na krysím mozku dokázáno, že exozomy obsahující miR-146b mají protinádorové účinky. Na druhou stranu, stále by mělo být bráno v úvahu, že ostatní komponenty exozomů ze stromálních buněk kostní dřene by mohly pozměnit účinky miR-146b. Z tohoto důvodu by se měl představený způsob léčby podrobit dalšímu zkoumání²⁰⁷.

Byly identifikovány i jiné microRNA, které dokážou působit proti nádorovému růstu. Například molekuly miR-124 snižovaly životaschopnost akceptorových glioblastomů. Mechanismus jejich účinku spočíval v negativní regulaci FOXA2 (forkhead box protein A2). Následně tento onkogenní transkripční faktor nebyl schopen zlepšit životaschopnost gliomových buněk a nepůsobil tedy pronádorově. Při tomto způsobu terapie byly mesenchymální kmenové buňky transdukovány lentivirálními částicemi konstitutivně exprimujícími zelený fluorescenční protein a miR-124. Po čtyřiceti osmi hodinách bylo možné z média izolovat exozomy obsahující danou miRNA za pomoci diferenciální centrifugace. Po ošetření gliomové tkáně pomocí těchto exozomů byl pozorován více než poloviční pokles v proliferaci cílových buněk *in vitro*. *In vivo* byla touto terapií podstatně prodloužena doba dožití myších modelů. Žili v průměru o více než šedesát dní déle než myši z kontrolní skupiny bez léčby. Exozomy byly podávány jak intraperitoneálně, tak intraarteriálně. U čtyř myší dokonce došlo k úplnému uzdravení, tedy vymizení nádoru²⁰⁹.

Proti proliferaci, migraci a invazivitě glioblastomových buněk účinkovala též miR-133b. V detailu tato microRNA negativně ovlivňovala působení proteinu EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), který by jinak podporoval signalizaci přes Wnt/ β -kateninovou dráhu. Celkově tak docházelo k regresi nádorového bujení. Navíc bylo zjištěno navýšené množství proteinu GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta), který byl v jiném výzkumu definován jako tumor supresorový^{210,211}. Obdobně jako v předchozím výzkumu byly použity exozomy z mezenchymálních kmenových buněk, tentokrát však obsahovaly miR-133b. Pokusy byly provedeny *in vitro* na liniích lidských buněk z glioblastomů a následně rovněž *in vivo* na myších modelech. Myši byly usmrceny třicet dní po aplikaci exozomů s miRNA a následná pitva poukázala na úbytek nádorového objemu i hmotnosti²¹¹.



Obrázek 5: Schématické znázornění působení exozomů obsahujících miR-133b na gliomové buňky²¹¹

Další identifikovanou tumor supresorovou microRNA byla miR-584. Místo jejího působení bylo gen *CYP2J2* (cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2), se kterým byla schopna interagovat. Následně tak docházelo k zablokování exprese tohoto genu, což způsobilo sníženou proliferaci a invazivitu nádorových buněk. Jednalo se opět o gliomové buňky, ke kterým byly vneseny exozomy z mezenchymálních kmenových buněk obohacené o miR-584. Po tomto procesu byla *in vitro* zaznamenána apoptóza lidských nádorových buněk. Navíc se potvrdilo snížení jejich proliferace a migrace. Princip působení miR-584 se zakládal na úbytku fosforylovaných molekul AKT a MAPK (mitogen-activated protein kinase)²¹². Signální dráhy spojené s AKT a MAPK se prokázaly jako podstatné pro rozvoj nádorového bujení, jejich potlačení tak přispívá k účinné léčbě²¹³. Taktéž v rámci tohoto výzkumu byl zkoumán účinek miRNA *in vivo* na myších modelech. Zatímco v kontrolních skupinách myši bez aplikace exozomů docházelo k masivnímu růstu nádorových útvarů, hmotnost mozkových nádorů myši s exozomální miR-584 signifikantně poklesla²¹².

V glioblastomové tkáni byla oproti okolním mozkovým částem pozorována snížená hladina miR-1, což poukazuje na její tumor supresorovou roli. U této miRNA bylo dále prokázáno, že je schopna se k buňkám glioblastomů dopravit uvnitř extracelulárních vezikulů. Jelikož miR-1 působila na nádorové buňky antiproliferativně a zároveň zamezovala angiogenezi a buněčné invazivitě, mohla by být použita v rámci léčby. K dopravě do cílového místa by bylo možné použít extracelulární vezikuly²¹⁴.

U buněk meduloblastomů byl nalezen poněkud odlišný fenomén, kdy microRNA sice rovněž působila tumor supresorově, avšak tentokrát byla k nalezení i přímo u nádorových buněk. Buněčná kultura meduloblastomů byla schopna vyprodukovat větší množství exozomů obsahujících miR-130b-3p než kontrolní plasma. Na druhou stranu, hladina exprese této miRNA byla vyšší u okolních nezhoubných tkání než u těch meduloblastomových. Pro pokus byly ale použity exozomy vygenerované makrofágy, které sloužily jako vezikuly pro transport dané miRNA. Po transfekci meduloblastomových buněk pomocí miR-130b-3p došlo k zastavení jejich proliferace, migrace a invazivity. Cílem působení microRNA byla mRNA zvaná *SIK1* (salt-inducible kinase 1). Gen *SIK1* se podílí na signalizační dráze LKB1 (liver kinase B1), která hraje roli v buněčné proliferaci a migraci. Konkrétně při potlačení vlivu *SIK1* docházelo ke snížení životaschopnosti a potlačení pohyblivosti meduloblastomových buněk. V rámci signalizační dráhy LKB1 se uplatňuje i dráha p53, která souvisí s apoptózou. Snížením hladiny *SIK1* pomocí miR-130b-3p se dráha p53 aktivuje a způsobí buněčnou smrt nádorových buněk. Nakonec se přešlo k pokusům *in vivo* a i zde se

prokázal terapeutický význam této miRNA. Meduloblastomy u myši byly po ošetření lehčí a méně objemnější²¹⁵.

Meduloblastomy byly také podrobeny vlivu exozomů z mesenchymálních kmenových buněk izolovaných z pupeční krve. Kvůli jejich působení docházelo u meduloblastomových buněk k zamezení proliferace a vytváření sfér. Navíc se potvrdila zvýšená exprese proteinu kaspázy 3 a snížená exprese proteinů antiapoptotických (BCL-2, B-cell lymphoma 2) i těch souvisejících s buněčným cyklem (cyklin D1), což poukázalo na schopnost exozomů vyvolávat apoptózu u recipientních nádorových buněk²¹⁶.

Exozomy by se daly využít jako extracelulární vezikuly pro transport léčiv především proto, že jsou ohraničeny dvojrstevnou lipidovou membránou, která ukrývá vodné prostředí. Účinné látky přenášené exozomy by tedy mohly být jak lipofilní, tak hydrofilní povahy²¹⁷.

Jedinečnou schopností exozomů vhodnou pro použití při léčebných zákrocích je překonávání hematoencefalické bariéry. Tato vlastnost byla prokázána v rámci pokusu s exozomy přenášejícími chemickou sloučeninu rhodamine 123. Výzkum probíhal *in vivo* na rybách *Danio rerio*. Dále byl vyzkoušen efekt exozomů z epiteliální a glioblastomové linie na životaschopnost nádorových buněk glioblastomů. Samy o sobě se exozomy neprokázaly jako účinné tumor supresory, nicméně při využití těchto vezikulů pro transport léčiv doxorubicinu a paclitaxelu byly již výsledky signifikantní. Překonání hematoencefalické bariéry byly ovšem schopny jen exozomy pocházející z epiteliálních buněk. V detailu byly do kardinální žíly rybek vpraveny epiteliální exozomy s léčivem a následně byl pozorovatelný úbytek nádorové hmoty. Navíc docházelo ke snížení množství RNA pro VEGF, což je významný proangiogenetický cytokin, který umožňuje zásobovat nádor důležitými komponentami pro jeho přežití^{218,219}. Samotná léčiva nebyla schopna hematoencefalickou bariéru překonat, exozomy tak při tomto způsobu terapie hrají zásadní roli²¹⁹.

Do exozomů lze vnést i další složky než miRNA a již prokázaná léčiva. Například u siRNA (small interfering RNA) byla jako u miRNA prokázána funkce tzv. RNA interference, kdy tyto molekuly dokážou posttranskripčně umlčet určité komplementární RNA^{220,221}. Rozdílem mezi použitím miRNA a siRNA je fakt, že buňky produkující exozomy nepřijmou siRNA samy jako u miRNA, ale musí k tomu být přizpůsobeny elektroporací²²². Pro zkoumání potenciálních účinků léčby byla vybrána VEGF siRNA, která je schopna zablokovat expresi VEGF proteinu, a jako vezikuly pro její transport pak epiteliální exozomy. I v tomto případě byly exozomy úspěšné při překonávání hematoencefalické bariéry a transportovaly siRNA až k cílovému místu – k nádorovým buňkám glioblastomů. Dále se pokus ukázal úspěšný také *in vivo* na rybkách druhu *Danio rerio*, u nichž epiteliální exozomy dokázaly přenést siRNA do jejich mozkové tkáně s linií lidských nádorových buněk. Zde poté siRNA znemožnila proteinu VEGF podpořit angiogenezi pro zajištění růstu nádorového útvaru^{218,223}.

Exozomy často ovlivňují rozličné imunitní procesy organismu, mohly by proto modulovat jeho imunitní odpověď v rámci léčby nádorových onemocnění. Výzkum z roku 2015 se zaměřil na vliv dendritických buněk a jejich exozomů na nádorové bujení. Dopodrobna se zde jednalo o transport exozomů

získaných z dendritických buněk obsahujících buněčný lyzát obohacený o chaperony. Tyto dendritické buňky pocházely z gliomové buněčné linie. Konečným cílem vpravení těchto exozomů byly obyčejné dendritické buňky, které se následně používaly pro výzkum. Ukázalo se, že *in vitro* pozitivně regulují proliferaci T lymfocytů, a to jak CD4⁺, tak i CD8⁺ buněk. *In vivo* se na myších s injikovanými gliomovými buněčnými liniemi došlo k závěru, že jsou poupravené dendritické buňky schopny významně prodloužit dobu přežití myší. Navíc způsobovaly úbytek nádorové hmoty a snižovaly rychlost růstu nádoru. Jejich další tumor supresorové mechanismy spočívaly ve zvýšení infiltrace T buněk, zvýšení aktivity cytotoxických T lymfocytů a jejich specifikaci na buňky gliomů. U T lymfocytů též docházelo ke zvýšené produkci cytokinů IL-2 (interleukin 2) s IFN- γ (interferon gamma), které prokazatelně souvisí s utlumením nádorového bujení^{224,225}. Terapie spojená s modulací imunitního systému pacientů s mozkovými nádory ještě není natolik rozšířená, avšak použití exozomů se v rámci tohoto způsobu léčby jeví jako slibné²¹⁷.

5 Závěr

Tato práce představuje aktuální poznatky o vzhledu, funkci a obsahu exozomů a dále se detailně zaměřuje na buněčné mechanismy probíhající v mozkových nádorech, které tyto extracelulární vezikuly ovlivňují. Exozomy vytvářejí v extracelulárním prostředí stabilní prostředí pro transportované molekuly a jsou tedy klíčové pro mezibuněčnou komunikaci. Recipientní tkáň je následně schopná na příjem exozomů reagovat buněčnou proliferací, angiogenezí, zachováním pluripotence, ale i modulací imunitní odpovědi či apoptózou.

Komunikovat prostřednictvím exozomů mohou i buňky nádorové. V tomto případě exozomy obvykle přenášejí molekuly přispívající k progresi rakovinného onemocnění. Nejčastěji byla tato funkce přisuzována různým druhům microRNA, které zaručovaly přenesení schopnosti rezistence vůči chemoterapeutické léčbě na recipientní buňky. Dále bylo prokázáno, že exozomy z ozářených nádorových buněk dokážou u buněk neozářených zajistit rezistenci vůči radioterapii. Též se ukázalo, že uvnitř exozomů určených pro nádorové buňky jsou molekuly, které mohou v cílových buňkách působit na jejich signální dráhy a následně vyvolat jejich proliferaci nebo zabránění apoptózy. Rozvoji malignity napomáhá i exozomální přenos chaperonů. Neméně důležitým dějem určujícím šíření nádorového bujení je potlačení ochranných imunitních procesů pomocí molekul nacházejících se v exozomech.

Kvůli jejich působení v řadě biologických dějů v rámci nádorové transformace jsou exozomy důležitým biomarkerem onkologických onemocnění. Metoda tekuté biopsie, díky níž lze exozomy ze séra pacienta izolovat, poskytuje i přes svou šetnost vhodné výsledky pro případné klinické testy. Nevýhodou by nicméně mohla být skutečnost, že izolace exozomů ze vzorku dosud není jasně standardizována a probíhá různými způsoby, které mohou přinášet odlišné výsledky.

Exozomy lze v laboratoři upravit tak, aby obsahovaly určitý náklad a zároveň ve tkáni doputovaly do požadované oblasti. *In vivo* bylo na myších modelech dokázáno, že takto pozměněné exozomy jsou schopné překonat hematoencefalickou bariéru a dopravit tumor supresorové léky k nádorovým buňkám v mozku. Proti nádorovému bujení mohou působit i molekuly siRNA a miRNA. Pokud jsou pomocí exozomů transportovány do zhoubné tkáně, pak zde mohou zablokovat expresi určitých genů podílejících se na proliferaci, invazivitě a migraci nádorových buněk. Působením specifických exozomů dále může být ovlivněna proliferace T lymfocytů. Tyto imunitní buňky posléze zabraňují tumoru v progresi. Léčba by nemusela spočívat jen ve využití exozomálních vezikulů, nýbrž může být zaměřena i proti jejich přirozenému účinku podporujícímu růst nádoru. Když došlo k zabránění jejich příjmu u cílových buněk, tak nemohly svým obsahem regulovat jejich signální dráhy vedoucí k proliferaci. Exozomy celkově nabízí pestré spektrum možností pro terapeutické využití v rámci léčby mozkových nádorů. Jejich kompletní působení by však mělo do budoucna projít četnými výzkumy, aby se prokázalo, že neovlivňují i další buněčné mechanismy, které by mohly zhoršit zdravotní stav pacientů.

6 Literatura

1. Pegtel, D. M. & Gould, S. J. Annual Review of Biochemistry Exosomes. (2019) doi:10.1146/annurev-biochem-013118.
2. Kalluri, R. & LeBleu, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* vol. 367 (2020).
3. Fang, Y. *et al.* Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV Gag to exosomes. *PLoS Biology* **5**, 1267–1283 (2007).
4. Davis, M. E. Exosomes. *Circulation Research* vol. 119 1280–1282 (2016).
5. Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G. & Théry, C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology* **21:1** 21, 9–17 (2019).
6. McGough, I. J. & Vincent, J. P. Exosomes in developmental signalling. *Development (Cambridge)* **143**, 2482–2493 (2016).
7. Mills, I. G., Jones, A. T. & Clague, M. J. Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Current Biology* **8**, 881–884 (1998).
8. Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* vol. 458 445–452 (2009).
9. Piper, R. C. & Luzio, J. P. Late Endosomes: Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies Characterization and Formation of Late Endosomes. *Traffic* **2**, 612–621 (2001).
10. Luzio, J. P. *et al.* Molecular Membrane Biology Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes (Review) Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes (Review). doi:10.1080/0968768031000089546.
11. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammonds, J. R., Orro, L. & Turbide, C. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation ASSOCIATION OF PLASMA MEMBRANE ACTIVITIES WITH RELEASED VESICLES (EXOSOMES)*. **262**, 9412–9420 (1987).
12. Pan, B.-T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron Microscopic Evidence for Externalization of the Transferrin Receptor in Vesicular Form in Sheep Reticulocytes. (1985).
13. Möbius, W. *et al.* Immunoelectron Microscopic Localization of Cholesterol Using Biotinylated and Non-cytolytic Perfringolysin O. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **50**, 43–55 (2002).
14. Escola, J. M. *et al.* Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes *. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20121–20127 (1998).
15. Colombo, M. *et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science* **126**, 5553–5565 (2013).
16. Hurley, J. H. The ESCRT complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **45**, 463–487 (2010).
17. Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A. & Stenmark, H. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *Journal of Cell Biology* **162**, 435–442 (2003).
18. Mayers, J. R. *et al.* ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitylated cargoes simultaneously. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 9636–9645 (2011).
19. Teo, H. *et al.* ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell* **125**, 99–111 (2006).

20. Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H. & Brech, A. Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* **10**, 925–937 (2009).
21. Hsu, C. *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *Journal of Cell Biology* **189**, 223–232 (2010).
22. Ostrowski, M. *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology* 2010 12:1 **12**, 19–30 (2009).
23. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. & Colombo, M. I. Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic* **6**, 131–143 (2005).
24. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 20083–20090 (2003).
25. Guerra, F. & Bucci, C. Role of the RAB7 Protein in Tumor Progression and Cisplatin Chemoresistance. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 1096 **11**, 1096 (2019).
26. Baietti, M. F. *et al.* Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology* 2012 14:7 **14**, 677–685 (2012).
27. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017 75:2 **75**, 193–208 (2017).
28. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2002 2:8 **2**, 569–579 (2002).
29. Schorey, J. S. & Bhatnagar, S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* **9**, 871–881 (2008).
30. Gurunathan, S., Kang, M.-H., Jeyaraj, M., Qasim, M. & Kim, J.-H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 307 **8**, 307 (2019).
31. Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W. J., Beer-Stolz, D. & Vujanovic, N. L. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. <https://doi.org/10.4161/onci.20897> **1**, 1074–1083 (2012).
32. Zitvogel, L. *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature Medicine* 1998 4:5 **4**, 594–600 (1998).
33. Tlajoso, G. *et al.* B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. (1996).
34. Robbins, P. D. & Morelli, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology* 2014 14:3 **14**, 195–208 (2014).
35. Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J. & Schorey, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **110**, 3234–3244 (2007).
36. Ratajczak, J. *et al.* Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006 20:5 **20**, 847–856 (2006).
37. Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. & Boutros, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology* 2012 14:10 **14**, 1036–1045 (2012).
38. Robertson, C. *et al.* Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* **107**, 3907–3911 (2006).
39. Théry, C. *et al.* Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology* **166**, 7309–7318 (2001).

40. Luga, V. *et al.* Exosomes Mediate Stromal Mobilization of Autocrine Wnt-PCP Signaling in Breast Cancer Cell Migration. *Cell* **151**, 1542–1556 (2012).
41. Segura, E. *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* **106**, 216–223 (2005).
42. Véron, P., Segura, E., Sugano, G., Amigorena, S. & Théry, C. Accumulation of MFG-E8/lactadherin on exosomes from immature dendritic cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**, 81–88 (2005).
43. Jeppesen, D. K. *et al.* Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **177**, 428–445.e18 (2019).
44. Pegtel, D. M. & Gould, S. J. Exosomes. *Annual Review of Biochemistry* **88**, 487–514 (2019).
45. Shen, B., Fang, Y., Wu, N. & Gould, S. J. Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 44162–44176 (2011).
46. Llorente, A. *et al.* Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1831**, 1302–1309 (2013).
47. Bicalho, B., Holovati, J. L. & Acker, J. P. Phospholipidomics reveals differences in glycerophosphoserine profiles of hypothermally stored red blood cells and microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 317–326 (2013).
48. Abels, E. R. & Breakefield, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology 2016 36:3* **36**, 301–312 (2016).
49. Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V. & Agnati, L. F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission* **117**, 1–4 (2010).
50. Waldenström, A., Genneback, N., Hellman, U. & Ronquist, G. Cardiomyocyte Microvesicles Contain DNA/RNA and Convey Biological Messages to Target Cells. *PLOS ONE* **7**, e34653 (2012).
51. Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M. & Yanoshita, R. Small RNA Transcriptomes of Two Types of Exosomes in Human Whole Saliva Determined by Next Generation Sequencing. *Biol. Pharm. Bull* **36**, 66–75 (2013).
52. Lee, D. Y., Deng, Z., Wang, C. H. & Yang, B. B. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20350–20355 (2007).
53. Palanisamy, V. *et al.* Nanostructural and Transcriptomic Analyses of Human Saliva Derived Exosomes. *PLOS ONE* **5**, e8577 (2010).
54. Li, Y. *et al.* Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Research* **25**:8 **25**, 981–984 (2015).
55. Koga, Y. *et al.* Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *Journal of Gastrointestinal Oncology* **2**, 215 (2011).
56. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* **2013 4:1** **4**, 1–10 (2013).
57. Koppers-Lalic, D. *et al.* Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Reports* **8**, 1649–1658 (2014).
58. Kosaka, N. *et al.* Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 17442–17452 (2010).
59. Guduric-Fuchs, J. *et al.* Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* **13**, 1–14 (2012).

60. Batagov, A. O. & Kurochkin, I. v. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology Direct* **8**, 1–8 (2013).
61. Bolukbasi, M. F. *et al.* miR-1289 and “Zipcode”-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **1**, e10 (2012).
62. Zeringer, E., Barta, T., Li, M. & Vlassov, A. v. Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols* **2015**, pdb.top074476 (2015).
63. Cheruvanky, A. *et al.* Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **292**, 1657–1661 (2007).
64. Lai, R. C. *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research* **4**, 214–222 (2010).
65. Sabapatha, A., Gercel-taylor, C. & Taylor, D. D. Specific isolation of placenta-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *American Journal of Reproductive Immunology* **56**, 345–355 (2006).
66. Barth, H. G., Jackson, C. & Boyes, B. E. Size Exclusion Chromatography. *Analytical Chemistry* **66**, 595–620 (1994).
67. Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L. & Treiber, G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* **40**, 734–744 (1970).
68. Erozenci, L. A., Böttger, F., Bijnsdorp, I. v. & Jimenez, C. R. Urinary exosomal proteins as (pan-)cancer biomarkers: insights from the proteome. *FEBS Letters* **593**, 1580–1597 (2019).
69. Malmstadt, N., Yager, P., Hoffman, A. S. & Stayton, P. S. A smart microfluidic affinity chromatography matrix composed of poly(N-isopropylacrylamide)-coated beads. *Analytical Chemistry* **75**, 2943–2949 (2003).
70. Chen, C. *et al.* Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab on a Chip* **10**, 505–511 (2010).
71. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* **30**, (2006).
72. Zarovni, N. *et al.* Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods* **87**, 46–58 (2015).
73. Lee, K., Shao, H., Weissleder, R. & Lee, H. Acoustic purification of extracellular microvesicles. *ACS Nano* **9**, 2321–2327 (2015).
74. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* **7**, 789 (2017).
75. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H. J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a Chip* **17**, 3558–3577 (2017).
76. Ludwig, N., Yerneni, S. S., Razzo, B. M. & Whiteside, T. L. Exosomes from HNSCC promote angiogenesis through reprogramming of endothelial cells. *Molecular Cancer Research* **16**, 1798–1808 (2018).
77. Ludwig, N., Whiteside, T. L. & Reichert, T. E. Challenges in Exosome Isolation and Analysis in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 4684* **20**, 4684 (2019).
78. Kucharzewska, P. *et al.* Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7312–7317 (2013).

79. Bang, C. *et al.* Cardiac fibroblast–derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation* **124**, 2136–2146 (2014).
80. Ailawadi, S., Wang, X., Gu, H. & Fan, G. C. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1852**, 1–11 (2015).
81. Ishida, T., Yarimizu, K., Gute, D. C. & Korhuis, R. J. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* **8**, 86–94 (1997).
82. Monteiro, V. V. S., Reis, J. F., de Souza Gomes, R., Navegantes, K. C. & Monteiro, M. C. Dual behavior of exosomes in septic cardiomyopathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **998**, 101–112 (2017).
83. Teng, X. *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improve the Microenvironment of Infarcted Myocardium Contributing to Angiogenesis and Anti-Inflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry* **37**, 2415–2424 (2015).
84. Howitt, J. & Hill, A. F. Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 26589–26597 (2016).
85. Wu, X., Zheng, T. & Zhang, B. Exosomes in Parkinson’s Disease. *Neuroscience Bulletin* **33**, 331–338 (2017).
86. Malm, T., Loppi, S. & Kanninen, K. M. Exosomes in Alzheimer’s disease. *Neurochemistry International* **97**, 193–199 (2016).
87. Zheng, X. *et al.* Salivary exosomal PSMA7: a promising biomarker of inflammatory bowel disease. *Protein and Cell* **8**, 686–695 (2017).
88. Melo, S. A. *et al.* Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–721 (2014).
89. Hannafon, B. N. *et al.* Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Research* **18**, 1–14 (2016).
90. Liao, J., Liu, R., Shi, Y. J., Yin, L. H. & Pu, Y. P. Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer. *International Journal of Oncology* **48**, 2567–2579 (2016).
91. Aga, M. *et al.* Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* **33**, 4613–4622 (2014).
92. Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z. & Clayton, A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Research* **70**, 9621–9630 (2010).
93. Webber, J. P. *et al.* Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* **34**, 290–302 (2014).
94. Hu, Y. *et al.* Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLOS ONE* **10**, e0125625 (2015).
95. Atay, S. *et al.* Oncogenic KIT-containing exosomes increase gastrointestinal stromal tumor cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 711–716 (2014).
96. Vincenti, M. P., White, L. A., Schroen, D. J., Benbow, U. & Brinckerhoff, C. E. Regulating Expression of the Gene for Matrix Metalloproteinase-1 (Collagenase): Mechanisms that Control Enzyme Activity, Transcription, and mRNA Stability. *Critical Reviews & Trade; in Eukaryotic Gene Expression* **6**, 391–411 (1996).
97. Psaila, B. & Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews Cancer* **9**, 285–293 (2009).
98. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* **18**, 883–891 (2012).

99. Charles, N. & Holland, E. C. The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.15.12710> **9**, 3084–3093 (2010).
100. Cho, J. A., Park, H., Lim, E. H. & Lee, K. W. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *International Journal of Oncology* **40**, 130–138 (2012).
101. Plate, K. H., Breier, G. & Risau, W. Molecular Mechanisms of Developmental and Tumor Angiogenesis. *Brain Pathology* **4**, 207–218 (1994).
102. Folkman, J. & Kalluri, R. Cancer without disease. *Nature* 2004 427:6977 **427**, 787–787 (2004).
103. Skog, J. *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology* 2008 10:12 **10**, 1470–1476 (2008).
104. Hong, B. S. *et al.* Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* **10**, 1–13 (2009).
105. Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J. & Chen, W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **40**, 72–81 (2015).
106. Yu, S. *et al.* Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **178**, 6867–6875 (2007).
107. Clayton, A., Mitchell, J. P., Court, J., Mason, M. D. & Tabi, Z. Human Tumor-Derived Exosomes Selectively Impair Lymphocyte Responses to Interleukin-2. *Cancer Research* **67**, 7458–7466 (2007).
108. Linnane, M. D. *et al.* Down-Modulate NKG2D Expression Human Tumor-Derived Exosomes. *J Immunol References* **180**, 7249–7258 (2022).
109. Andreola, G. *et al.* Induction of Lymphocyte Apoptosis by Tumor Cell Secretion of FasL-bearing Microvesicles. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 1303–1316 (2002).
110. Kalluri, R. The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **126**, 1208–1215 (2016).
111. Zomer, A. *et al.* In Vivo Imaging Reveals Extracellular Vesicle-Mediated Phenocopying of Metastatic Behavior. *Cell* **161**, 1046–1057 (2015).
112. Kosaka, N. *et al.* Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: “Exocure” is another choice for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 376–382 (2013).
113. Kosaka, N. *et al.* Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrnas regulate cancer cell metastasis. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 10849–10859 (2013).
114. Ichim, T. E. *et al.* Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *Journal of Translational Medicine* 2008 6:1 **6**, 1–7 (2008).
115. Ohno, S. I. *et al.* Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Molecular Therapy* **21**, 185–191 (2013).
116. Black, P. McL. Brain Tumors. *New England Journal of Medicine* **324**, 1555–1564 (1991).
117. Whittle, I. R., Smith, C., Navoo, P. & Collie, D. Meningiomas. *The Lancet* **363**, 1535–1543 (2004).
118. Buerki, R. A. *et al.* An overview of meningiomas. *Future Oncology* **14**, 2161–2177 (2018).
119. Loeffler, J. S. & Shih, H. A. Radiation Therapy in the Management of Pituitary Adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**, 1992–2003 (2011).
120. Lake, M. G. Pituitary Adenomas: An Overview. **88**, (2013).
121. Theodosopoulos, P. v. & Pensak, M. L. Contemporary management of acoustic neuromas. *Laryngoscope* **121**, 1133–1137 (2011).

122. Briggs, R. J. S., Fabinyi, G. & Kaye, A. H. Current management of acoustic neuromas: review of surgical approaches and outcomes. *Journal of Clinical Neuroscience* **7**, 521–526 (2000).
123. Morrison, G. A. J. & Sterkers, J. M. Unusual presentations of acoustic tumours. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* **21**, 80–83 (1996).
124. Jane, J. A. & Laws, E. R. Craniopharyngioma. *Pituitary* **9**, 323–326 (2006).
125. Iaconetta, G., Carvalho, G. A., Vorkapic, P. & Samii, M. Intracerebral epidermoid tumor: a case report and review of the literature. *Surgical Neurology* **55**, 218–222 (2001).
126. Ahmed, I. *et al.* Neurosurgical management of intracranial epidermoid tumors in children: Clinical article. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* **4**, 91–96 (2009).
127. Netsky, M. G. Epidermoid tumors: Review of the literature. *Surgical Neurology* **29**, 477–483 (1988).
128. Desai, K. I., Nadkarni, T. D., Muzumdar, D. P. & Goel, A. H. Surgical management of colloid cyst of the third ventricle—a study of 105 cases. *Surgical Neurology* **57**, 295–302 (2002).
129. Armao, D., Castillo, M., Chen, H. & Kwock, L. Colloid Cyst of the Third Ventricle: Imaging-pathologic Correlation. *AJNR Am J Neuroradiol* **21**, 1470–1477 (2000).
130. Chaudhry, A. P., Montes, M. & Cohn, G. A. ULTRASTRUCTURE OF CEREBELLAR HEMANGIOBLASTOMA. (1978) doi:10.1002/1097-0142.
131. Jawahar, A. *et al.* Stereotactic radiosurgery for hemangioblastomas of the brain. *Acta Neurochirurgica* **142**, 641–645 (2000).
132. Burton, E. C. & Prados, M. D. Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol* **1**, 459–468 (2000).
133. Kleihues, P. *et al.* The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **61**, 215–225 (2002).
134. Louis, D. N. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual Review of Pathology* **1**, 97–117 (2006).
135. Posti, J. P. *et al.* Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta Neurologica Scandinavica* **131**, 88–93 (2015).
136. Millard, N. E. & de Braganca, K. C. Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology* **31**, 1341–1353 (2016).
137. Northcott, P. A. *et al.* Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 1408 (2011).
138. Bloom, H. J. G., Wallace, E. N. K., Henk, J. M. & London, F. F. R. THE TREATMENT AND PROGNOSIS OF MEDULLOBLASTOMA IN CHILDREN. <http://dx.doi.org/10.2214/ajr.105.1.43> **105**, 43–62 (2012).
139. Massimino, M. *et al.* Histological variants of medulloblastoma are the most powerful clinical prognostic indicators. *Pediatric Blood and Cancer* **60**, 210–216 (2013).
140. von Hoff, K. & Rutkowski, S. Medulloblastoma. *Current Treatment Options in Neurology* **14**, 416–426 (2012).
141. Hart, N. & Earle, K. M. *PRIMITIVE NEUROECTODERMAL TUMORS OF THE BRAIN IN CHILDREN.* (1973).
142. Ne, C. S. VÝSKYT PERIFERNÍHO PRIMITIVNÍHO NEUROEKTODERMÁLNÍHO NÁDORU V PRŮBĚHU SPINÁLNÍHO KOŘENE □ KAZUISTIKA. *N* **78**, 344–347 (2015).
143. Windfuhr, J. P. Primitive neuroectodermal tumor of the head and neck: Incidence, diagnosis, and management. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology* **113**, 533–543 (2004).

144. Blakeley, J. O. & Grossman, S. A. Management of pineal region tumors. *Current Treatment Options in Oncology* **7**, 505–516 (2006).
145. Bruce, J. N. & Stein, B. M. Surgical management of pineal region tumors. *Acta Neurochirurgica* **134**, 130–135 (1995).
146. Geddes, J. F., Bhattacharjee, M. B., Savage, K., Scaravilli, F. & McLaughlin, J. E. Primary cerebral lymphoma: a study of 47 probed for Epstein-Barr virus genome. *Jf Clin Pathol* **45**, 587–590 (1992).
147. Caroli, E., Acqui, M. & Ferrante, L. Primary cerebral lymphoma: A retrospective study in 22 immunocompetent patients. *Tumori* **90**, 294–298 (2004).
148. Parekh, H. C., Sharma, R. R., Lynch, P. G., Keogh, A. J. & Prabhu, S. S. Primary cerebral lymphoma: Report of 24 patients and review of the literature. *British Journal of Neurosurgery* **6**, 563–573 (1992).
149. Thompson, J. F. *et al.* Determinants of Outcome in Melanoma Patients With Cerebral Metastases. *Article in Journal of Clinical Oncology* **22**, 1293–1300 (2004).
150. Young, D. F., Posner, J. B., Chu, F. & Nisce, L. RAPID-COURSE RADIATION THERAPY OF CEREBRAL METASTASES: RESULTS AND COMPLICATIONS. doi:10.1002/1097-0142.
151. Chevalier, T. le, Frederick Smith, -t P, Caille, Ph., Paul Constans, J. & Rouesse, J. G. Sites of Primary Malignancies in Patients Presenting With Cerebral Metastases A Review of 120 Cases. (1984) doi:10.1002/1097-0142.
152. Harwood, A. R. & John Simpson, W. Radiation therapy of cerebral metastases: a randomized prospective clinical trial. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* **2**, 1091–1094 (1977).
153. Abramowicz, A. *et al.* Ionizing radiation affects the composition of the proteome of extracellular vesicles released by head-and-neck cancer cells in vitro. *Journal of Radiation Research* **60**, 289–297 (2019).
154. Mrowczynski, O. D. *et al.* Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer. *Oncotarget* **9**, 36083 (2018).
155. Purvis, I. J. *et al.* B7-H3 in Medulloblastoma-Derived Exosomes; A Novel Tumorigenic Role. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 7050 **21**, 7050 (2020).
156. Graner, M. W. *et al.* Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *The FASEB Journal* **23**, 1541–1557 (2009).
157. Bisaro, B. *et al.* Proteomic analysis of extracellular vesicles from medullospheres reveals a role for iron in the cancer progression of medulloblastoma. *Molecular and Cellular Therapies* 2015 3:1 **3**, 1–12 (2015).
158. Vanacker, H. *et al.* Emerging Role of the Unfolded Protein Response in Tumor Immunosurveillance. *Trends in Cancer* **3**, 491–505 (2017).
159. Graner, M. W., Cumming, R. I. & Bigner, D. D. Neurobiology of Disease The Heat Shock Response and Chaperones/Heat Shock Proteins in Brain Tumors: Surface Expression, Release, and Possible Immune Consequences. (2007) doi:10.1523/JNEUROSCI.3588-07.2007.
160. Zhao, M. *et al.* Expression profiles and potential functions of circular RNAs in extracellular vesicles isolated from radioresistant glioma cells. *Oncology Reports* **41**, 1893–1900 (2019).
161. Yin, J. *et al.* Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine* **42**, 238–251 (2019).
162. Munoz, J. L. *et al.* Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **2**, e126 (2013).

163. Friedman, H. S., Kerby, T. & Calvert, H. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma 1. (2000).
164. Wiechen, K. *et al.* Caveolin-1 Is Down-Regulated in Human Ovarian Carcinoma and Acts as a Candidate Tumor Suppressor Gene. *The American Journal of Pathology* **159**, 1635–1643 (2001).
165. Wu, S. H., Bi, J. F., Cloughesy, T., Cavenee, W. K. & Mischel, P. S. Emerging function of mTORC2 as a core regulator in glioblastoma: metabolic reprogramming and drug resistance. *Cancer Biology & Medicine* **11**, 255 (2014).
166. Freudlsperger, C. *et al.* EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: Attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **15**, 63–74 (2011).
167. Cai, Q., Zhu, A. & Gong, L. Exosomes of glioma cells deliver miR-148a to promote proliferation and metastasis of glioblastoma via targeting CADM1. *Bulletin du Cancer* **105**, 643–651 (2018).
168. Sakurai-Yageta, M., Masuda, M., Tsuboi, Y., Ito, A. & Murakami, Y. Tumor suppressor CADM1 is involved in epithelial cell structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **390**, 977–982 (2009).
169. Geiger, J. L., Grandis, J. R. & Bauman, J. E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncology* **56**, 84–92 (2016).
170. Arscott, W. T. *et al.* Ionizing Radiation and Glioblastoma Exosomes: Implications in Tumor Biology and Cell Migration. *Translational Oncology* **6**, 638-IN6 (2013).
171. Sulzmaier, F. J., Jean, C. & Schlaepfer, D. D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature Reviews Cancer* 2014 14:9 **14**, 598–610 (2014).
172. Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H. & Hiraoka, M. Tumor hypoxia: A target for selective cancer therapy. *Cancer Science* **94**, 1021–1028 (2003).
173. Vaupel, P. & Med, M. A. The Role of Hypoxia-Induced Factors in Tumor Progression. *The Oncologist* **9**, 10–17 (2004).
174. Moulder, J. E. & Rockwell, S. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* **5**, 313–341 (1987).
175. Yue, X., Lan, F. & Xia, T. Hypoxic Glioma Cell-Secreted Exosomal miR-301a Activates Wnt/ β -catenin Signaling and Promotes Radiation Resistance by Targeting TCEAL7. *Molecular Therapy* **27**, 1939–1949 (2019).
176. Rattan, R. *et al.* TCEAL7, a putative tumor suppressor gene, negatively regulates NF- κ B pathway. *Oncogene* 2010 29:9 **29**, 1362–1373 (2009).
177. Guo, X. *et al.* Glioma exosomes mediate the expansion and function of myeloid-derived suppressor cells through microRNA-29a/Hbp1 and microRNA-92a/Prkar1a pathways. *International Journal of Cancer* **144**, 3111–3126 (2019).
178. Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P. Inflammation and Cancer Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking. *J Immunol References* **182**, 4499–4506 (2022).
179. Bollaert, E., de Rocca Serra, A. & Demoulin, J. B. The HMG box transcription factor HBP1: a cell cycle inhibitor at the crossroads of cancer signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences* **76**, 1529–1539 (2019).
180. Sandrini, F. *et al.* Regulatory subunit type I- α of protein kinase A (PRKARIA): A tumor-suppressor gene for sporadic thyroid cancer. *Genes Chromosomes and Cancer* **35**, 182–192 (2002).
181. Sharma, K. D. *et al.* Glioma-derived exosomes drive the differentiation of neural stem cells to astrocytes. *PLOS ONE* **15**, e0234614 (2020).
182. Ghaemmaghami, A. B. *et al.* Role of exosomes in malignant glioma: MicroRNAs and proteins in pathogenesis and diagnosis. *Cell Communication and Signaling* **18**, 1–19 (2020).

183. Ebrahimkhani, S. *et al.* Deep sequencing of circulating exosomal microRNA allows non-invasive glioblastoma diagnosis. *npj Precision Oncology* 2018 2:1 **2**, 1–9 (2018).
184. Escudero, L., Martínez-Ricarte, F. & Seoane, J. ctDNA-Based Liquid Biopsy of Cerebrospinal Fluid in Brain Cancer. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 1989 **13**, 1989 (2021).
185. Ilić, M. & Hofman, P. Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Translational Lung Cancer Research* **5**, 420 (2016).
186. Saadatpour, L. *et al.* Glioblastoma: exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. *Cancer Gene Therapy* 2016 23:12 **23**, 415–418 (2016).
187. Kaid, C. *et al.* Proteome and miRNome profiling of microvesicles derived from medulloblastoma cell lines with stem-like properties reveals biomarkers of poor prognosis. *Brain Research* **1730**, 146646 (2020).
188. Akers, J. C. *et al.* miR-21 in the Extracellular Vesicles (EVs) of Cerebrospinal Fluid (CSF): A Platform for Glioblastoma Biomarker Development. *PLOS ONE* **8**, e78115 (2013).
189. Santangelo, A. *et al.* A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker. *Journal of Neuro-Oncology* **136**, 51–62 (2018).
190. Lan, F. *et al.* Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *Cellular Oncology* 2017 41:1 **41**, 25–33 (2017).
191. Guo, X. *et al.* Immunosuppressive effects of hypoxia-induced glioma exosomes through myeloid-derived suppressor cells via the miR-10a/Rora and miR-21/Pten Pathways. *Oncogene* 2018 37:31 **37**, 4239–4259 (2018).
192. Chen, X. *et al.* MiR-9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **38**, 1–16 (2019).
193. Li, C. C. Y. *et al.* Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and noncoding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biology* **10**, 1333–1344 (2013).
194. Manterola, L. *et al.* A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. *Neuro-Oncology* **16**, 520–527 (2014).
195. Wei, Z. *et al.* Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nature Communications* 2017 8:1 **8**, 1–15 (2017).
196. Shao, H. *et al.* Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nature Medicine* 2012 18:12 **18**, 1835–1840 (2012).
197. Li, Z. *et al.* Identification of miRNA signatures in serum exosomes as a potential biomarker after radiotherapy treatment in glioma patients. *Annals of Diagnostic Pathology* **44**, 151436 (2020).
198. Zhou, B. *et al.* Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1 **5**, 1–14 (2020).
199. Abusamra, A. J. *et al.* Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8⁺ T-cell apoptosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**, 169–173 (2005).
200. Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A. K., Janssen, J. W. G. & Altevogt, P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *Journal of Translational Medicine* **9**, 1–9 (2011).
201. Sun, D. *et al.* A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. *Molecular Therapy* **18**, 1606–1614 (2010).
202. Xin, H., Li, Y. & Chopp, M. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, 377 (2014).
203. Barta, T., Peskova, L. & Hampl, A. miRNAsong: a web-based tool for generation and testing of miRNA sponge constructs in silico. *Scientific Reports* 2016 6:1 **6**, 1–8 (2016).

204. Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 Targets a Network of Key Tumor-Suppressive Pathways in Glioblastoma Cells. *Cancer Research* **68**, 8164–8172 (2008).
205. Monfared, H., Jahangard, Y., Nikkhah, M., Mirnajafi-Zadeh, J. & Mowla, S. J. Potential therapeutic effects of exosomes packed with a miR-21-sponge construct in a rat model of glioblastoma. *Frontiers in Oncology* **9**, 782 (2019).
206. Xia, H. *et al.* microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Research* **1269**, 158–165 (2009).
207. Katakowski, M. *et al.* Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Letters* **335**, 201–204 (2013).
208. Xin, H. *et al.* Exosome-Mediated Transfer of miR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth. *Stem Cells* **30**, 1556–1564 (2012).
209. Lang, F. M. *et al.* Mesenchymal stem cells as natural biofactories for exosomes carrying miR-124a in the treatment of gliomas. *Neuro-Oncology* **20**, 380–390 (2018).
210. Lin, J., Song, T., Li, C. & Mao, W. GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1867**, 118659 (2020).
211. Xu, H. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-133b suppresses glioma progression via Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting EZH2. *Stem Cell Research and Therapy* **10**, 1–14 (2019).
212. Kim, R. *et al.* Exosomes derived from microRNA-584 transfected mesenchymal stem cells: novel alternative therapeutic vehicles for cancer therapy. *BMB Reports* **51**, 406 (2018).
213. Ding, D. *et al.* Ding et al.: The Anti-Cancer Mechanism of Osthole on Rat Glioma Cells Osthole Exhibits Anti-Cancer Property in Rat Glioma Cells Through Inhibiting PI3K/ Akt and MAPK Signaling Pathways Ding et al.: The Anti-Cancer Mechanism of Osthole on Rat Glioma Cells. *Cell Physiol Biochem* **32**, 1751–1760 (2013).
214. Bronisz, A. *et al.* Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Research* **74**, 738–750 (2014).
215. Huang, S. *et al.* Exosomal miR-130b-3p targets SIK1 to inhibit medulloblastoma tumorigenesis. *Cell Death & Disease* **2020 11:6 11**, 1–16 (2020).
216. Zhishuang, Y., Zhihai, W., Ming, L., Qingan, Z. & Baosheng, Y. Exosomes from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells suppress the proliferation and promote the apoptosis of medulloblastoma Daoy cells. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research* **25**, 4945 (2021).
217. Katakowski, M. & Chopp, M. Exosomes as Tools to Suppress Primary Brain Tumor. *Cellular and Molecular Neurobiology* **36**, 343–352 (2016).
218. Hicklin, D. J. & Ellis, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 1011–1027 (2005).
219. Yang, T. *et al.* Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research* **32**, 2003–2014 (2015).
220. Wang, J., Lu, Z., Wientjes, M. G. & Au, J. L. S. Delivery of siRNA therapeutics: Barriers and carriers. *AAPS Journal* **12**, 492–503 (2010).
221. Yang, M. & Mattes, J. Discovery, biology and therapeutic potential of RNA interference, microRNA and antagomirs. *Pharmacology & Therapeutics* **117**, 94–104 (2008).
222. Kooijmans, S. A. A. *et al.* Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. *Journal of Controlled Release* **172**, 229–238 (2013).

223. Yang, T. *et al.* Delivery of Small Interfering RNA to Inhibit Vascular Endothelial Growth Factor in Zebrafish Using Natural Brain Endothelia Cell-Secreted Exosome Nanovesicles for the Treatment of Brain Cancer. *AAPS Journal* **19**, 475–486 (2017).
224. Bu, N. *et al.* Exosomes from Dendritic Cells Loaded with Chaperone-Rich Cell Lysates Elicit a Potent T Cell Immune Response Against Intracranial Glioma in Mice. *Journal of Molecular Neuroscience* **56**, 631–643 (2015).
225. Tjuvajev, J. *et al.* RG-2 Glioma Growth Attenuation and Severe Brain Edema Caused By Local Production of Interleukin-2 and Interferon- γ . *ICANCER RESEARCH* **55**, (1995).