

Anžej Hladnik^{1*}, Ivana Sedej^{2*}, Vita Dolžan³, Miha Arno⁴, Metka Lenassi⁵

Zunajcelični vezikli v urinu kot vir novih bioloških označevalcev okvare presajene ledvice

Urinary Extracellular Vesicles as Novel Biomarkers of Kidney Allograft Injury

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: presaditev ledvic, biološki označevalci, zunajcelični vezikli, urin, okvara presajene ledvice, zavrnitev presadka, eksosomi, mikrovezikli

Presaditev ledvice je oblika nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi z najboljšimi kliničnimi rezultati. Dolgoročno preživetje presajene ledvice je med drugim odvisno od razvoja zavrnitvenih reakcij, ki jih glede na mehanizem nastanka delimo na T-celično in s protitelesi posredovano zavrnitev, in drugih dejavnikov, ki prispevajo k okvari presadka. Za odkrivanje okvare presadka in ustrezno zdravljenje bolnike spremljamo s pomočjo kliničnih in laboratorijskih meril (kot so serumski kreatinin, ocenjena glomerulna filtracija in proteinurija). Ker so ti nespecifični, dokončno diagnozo postavimo na podlagi histopatološkega izvida igelne ledvične biopsije, ki je invazivna in posledično težko ponovljiva preiskava. To diagnostično vrzel bi lahko zapolnili novi označevalci okvare, ki bi bili pridobljeni neinvazivno in bi tako omogočali rednejše spremljanje in hitrejšo odkrivanje okvare presadka. Kot vir tovrstnih označevalcev je najprimernejši urin, saj njegova sestava posredno odraža stanje ledvic, poleg tega pa je enostavno pridobiti velike količine vzorca v pogostejših intervalih. Kot urinski označevalci okvare ledvic so najboljše raziskane številne beljakovine, pa tudi različne nukleinske kisline. Med izjemno obetavne nove označevalce ledvične okvare se uvrščajo zunajcelični vezikli. Zunajcelični vezikli so heterogena populacija z membrano obdanih kroglastih delcev, ki se sproščajo iz vseh celic in kopičijo v telesnih tekočinah. S svojimi biofizikalnimi lastnostmi in značilno molekularno sestavo posredno odražajo lastnosti in stanje starševskih celic. Poleg tega na različne načine pomembno sodelujejo pri fizioloških ali patoloških procesih v tarčnih celicah, zaradi česar so prepoznani tudi kot možen vir sodobnih terapevtskih pristopov. V tem preglednem članku bomo predstavili zunajcelične vezikle v urinu kot nove neinvazivne biološke označevalce za odkrivanje okvare presajene ledvice.

*Avtorja si delita mesto prvega avtorja.

¹ Anžej Hladnik, dr. med., Osnovno zdravstvo Gorenjske, Zdravstveni dom Tržič, Blejska cesta 10, 4290 Tržič; Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

² Ivana Sedej, Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

³ Prof. dr. Vita Dolžan, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Miha Arno, Klinični oddelek za nefrologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; Katedra za interno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

⁵ Izr. prof. dr. Metka Lenassi, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; metka.lenassi@mfn.uni-lj.si

ABSTRACT

KEY WORDS: kidney transplantation, biomarkers, extracellular vesicles, urine, kidney injury, allograft rejection, exosomes, microvesicles

Kidney transplantation is the treatment of choice for end-stage kidney failure with the best clinical outcomes. Slovenia has been a member of Eurotransplant since 2000. The average number of kidneys transplanted annually is 26.4 per million. Among the various factors affecting long-term survival of a kidney transplant is allograft rejection, which can be classified as either T-cell or antibody-mediated, depending on etiopathological mechanisms. To detect allograft injury, clinical laboratory markers (i.e., serum creatinine, estimated glomerular filtration rate, and proteinuria) are monitored regularly. However, these are nonspecific and the final diagnosis is based on the histopathological features of the tissue obtained by needle biopsy, which is an invasive procedure and therefore not suitable for continuous monitoring. This diagnostic gap could be bridged with novel biomarkers obtained in a non-invasive way. Urine is the most suitable source for such biomarkers, as it is easy to obtain in large quantities and its composition indirectly reflects the (patho)physiological processes in the kidney. Proteins are the most studied urinary biomarkers of kidney injury, but various types of nucleic acids are also being investigated. Urinary extracellular vesicles are another promising new source of biomarkers. Extracellular vesicles are a heterogeneous population of membrane-bound particles that are secreted by all cells and accumulate in body fluids. Their biophysical properties and specific molecular composition indirectly reflect the properties and (patho)physiological processes of the parent cell. Moreover, they influence physiological or pathological processes in their target cells and are therefore being investigated as a source for new therapeutic strategies. In this review article, we present extracellular vesicles in urine as novel noninvasive biological markers for the detection of kidney transplant injury.

UVOD

Presaditev ledvice je oblika nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi z najboljšimi kliničnimi rezultati. Slovenija je od leta 2000 del mreže Eurotransplant, z dolgoletnim povprečjem števila presajenih ledvic 26,4 na milijon prebivalcev letno. V Sloveniji je za obdobje 2000–2016 enoletno preživetje presadka znašalo 94,3 %, petletno preživetje pa 87,5 % (povprečje za evropske države je 92,0 % in 84,4 %). Dolgoročno preživetje presajene ledvice je odvisno od ishemično-reperfuzijske poškodbe (IRP) zaradi prekinitve prekrvavitve ob odvzemu presadka darovalcu, operativnega posega, kakovosti oskrbe po presaditvi in razvoja ter zdravljenja zapletov, med katere v prvi vrsti sodijo zavrnitvene

reakcije. Glede na mehanizem nastanka jih delimo na T-celično (angl. *T-cell mediated rejection*, TCMR) in s protitelesi posredovano zavrnitev (angl. *antibody mediated rejection*, ABMR).

Ključni namen sledenja bolnikov po presaditvi je spremljanje delovanja in pravočasna zaznava okvare presajene ledvice, preden ta postane nepopravljiva, ter diagnozi ustrezna prilagoditev zdravljenja. Delovanje presajene ledvice spremljamo s pomočjo kliničnih in laboratorijskih meril, kot so serumski kreatinin, ocena glomerulne filtracije (oGF) in proteinurija. Omenjeni označevalci so nespecifični, zato dokončno diagnozo postavimo na podlagi histopatološkega izvida igelne ledvične biopsije. To je invaziven poseg z možnostjo zapletov, ki

kaže zgolj na stanje vzorčnega dela presadka, diagnoza pa je dodatno odvisna od subjektivne ocene patologa. To diagnostično vrzel bi lahko zapolnili novi označevalci okvare, ki bi bili pridobljeni neinvazivno in bi tako omogočali rednejše spremljanje in hitrejše odkrivanje okvare presadka.

Kot vir tovrstnih označevalcev je najprimernejši urin, saj njegova sestava posredno odraža stanje ledvic, poleg tega pa je enostavno pridobiti velike količine vzorca v pogostejših intervalih. Kot urinski označevalci okvare ledvic so najboljše raziskane številne beljakovine in različne nukleinske kisline. Med izjemno obetavne nove označevalce ledvične okvare se uvrščajo zunajcelični vezikli (ZV). ZV so heterogena populacija z membrano obdanih kroglastih delcev, ki se sproščajo iz vseh celic in kopičijo v telesnih tekočinah, tudi v urinu. Biofizikalne lastnosti in molekularna sestava ZV posredno odražajo lastnosti in fiziološko stanje starševskih celic. ZV pomembno sodelujejo pri fizioloških ali patoloških procesih v tarčnih celicah, zaradi česar so prepoznani tudi kot vir za sodobne terapevtske pristope. V tem preglednem članku bomo predstavili ZV v urinu kot nove neinvazivne biološke označevalce za odkrivanje okvare presajene ledvice. Opisali bomo trenutno poznano molekularno sestavo urinskih ZV, njihovo vlogo v uravnavanju fizioloških in patoloških procesov v ledvicah ter njihovo klinično uporabnost v diagnostiki in terapiji. Glede na izredno aktualnost ZV pri razumevanju, diagnostiki in terapiji bolezni bo poznavanje tega področja vse pomembnejše tudi za strokovnjake različnih medicinskih strok.

OZNAČEVALCI OKVARE PRESAJENE LEDVICE

Ledvice so pomemben parni organ, saj so ključne za izločanje toksičnih presnovkov, uravnavanje krvnega tlaka ter vzdrževanje elektrolitskega, vodnega in kislinsko-bazičnega ravnovesja v telesu. Imajo tudi

pomembno endokrino vlogo, saj z izločanjem eritropoetina v odgovor na hipoksijo povečajo hematopoezo. Delovanje ledvic je lahko okrnjeno zaradi različnih vzrokov, najpogostejša vzroka ledvične okvare sta arterijska hipertenzija in sladkorna bolezen. Omenjeni bolezni sta med prebivalstvom vse pogostejši, posledično pa narašča tudi pojavnost kronične ledvične bolezni (KLB) in njene končne stopnje – končne ledvične odpovedi. Ti bosta torej tudi v prihodnosti pomemben vzrok obolevnosti (1).

Presaditev ledvice

Presaditev ledvice je najboljši način nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi (2). Po uspešni presaditvi ledvice imajo bolniki daljšo pričakovano življenjsko dobo in boljšo kakovost življenja kot bolniki, ki ostanejo zdravljeni z dializo (3). V Evropski uniji večina presadkov izvira od umrlih darovalcev, lahko pa jih darujejo tudi zdravi živi darovalci, ki so najpogosteje sorodniki bolnika. Od leta 2000 je Slovenija del mreže Eurotransplant skupaj z Avstrijo, Belgijo, Hrvaško, Luksemburgom, Madžarsko, Nemčijo in Nizozemsko. V celotni mreži je bilo po podatkih iz leta 2020 opravljenih skupno 3.792 presaditev ledvic (27,5 presaditev ledvic na milijon prebivalcev), od tega 2.851 presaditev ledvic mrtvih darovalcev in 941 presaditev ledvic živih darovalcev. Leta 2020 je bilo kljub epidemiji koronavirusne bolezni 2019 (angl. *coronavirus disease 2019*, COVID-19) v Sloveniji presajenih 46 ledvic (22,4 na milijon prebivalcev), od tega ena s sočasno presaditvijo jeter in dve s sočasno presaditvijo trebušne slinavke; 45 presajenih ledvic je bilo pridobljenih od umrlih darovalcev, ena pa od živega darovalca (4).

Osnovni merili uspešnosti presaditev in kasnejšega zdravljenja sta eno- in petletno preživetje presadka ter bolnika. V Sloveniji je enoletno preživetje presadkov za obdobje 2000–2016 znašalo 94,3 %, petletno pa 87,5 %. V raziskavi CTS (Collaborative

Transplant Study) je bilo v letih 2006–2015 povprečje za 21 evropskih držav 92,0 % in 84,4 %. Za slovenske bolnike je preživetje v omenjenem obdobju znašalo 98,1 % in 93,8 % (5, 6). Preživetje presadka je odvisno od mnogih dejavnikov, med njimi IRP zaradi prekinitve prekrvavitve ob odvzemu presadka od darovalca, operativnega posega, kakovosti oskrbe po presaditvi in razvoja ter zdravljenja zapletov, med katere v prvi vrsti sodijo zavrnitvene reakcije presajene ledvice (2).

Okvara presajene ledvice Ishemično-reperfuzijska poškodba

V času med odstranitvijo darovalčevega organa oz. smrtjo darovalca in ponovno vzpostavitev prekrvavitve ob presaditvi je tkivo presadka brez prekrvavitve, kar vodi v IRP tkiva. Daljši je čas hladne ishemije, hujša je okvara tkiva, zato mora biti ta čim krajši, najbolje krajši od 12 ur. IRP se lahko kaže v zakasnelem delovanju presajene ledvice (angl. *delayed graft function*, DGF), ko se ne vzpostavi ustrezno delovanje presadka neposredno po presaditvi. Bolniki zato potrebujejo premostitveno zdravljenje s hemodializo. Ob IRP se izražajo s poškodbo povezani molekularni vzorci (angl. *damage associated molecular patterns*, DAMP), ki so podobni s patogeni povezanim molekulskim vzorcem (angl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP). Te molekulske vzorce prepoznavajo vzorčno prepoznavni receptorji (angl. *pattern recognition receptors*, PRR), ki so ključni za aktivacijo imunskega odziva. Poleg omenjenega se ob IRP sproščajo tudi kemokini, proinflammatory citokini in druge v imunski odziv vpletene spojine, zato IRP predstavlja pomemben dejavnik tveganja za razvoj zgodnje akutne zavrnitvene reakcije presajene ledvice (7).

Zavrnitev presadka

Presajena ledvica je razen v primeru enojajčnih dvojčkov genetsko različna od tkiva prejemnika – predstavlja tuje tkivo, zato se

pri vseh presaditvah do neke mere razvije odziv gostiteljevega imunskega sistema na neskladne človeške levkocitne antigene (angl. *human leukocyte antigen*, HLA) presajene ledvice. Da bi omejili oz. preprečili aloimunski odziv, vse prejemnike dosmrtno zdravimo z imunosupresivnimi zdravili v skladu z aktualnimi smernicami (8).

Glede na časovni potek zavrnitvene reakcije lahko govorimo o hiperakutni, akutni in kronični zavrnitvi. Prva lahko nastane v nekaj minutah do urah oz. kmalu po vzpostavitvi krvnega pretoka skozi presadek zaradi predhodno nastalih protiteles proti neskladnim HLA darovalca, prisotnih na endoteliju kapilar presadka. Danes je hiperakutna zavrnitev presadka zaradi temeljite genotipizacije darovalca in prejemnika ter boljšega ujemanja v antigenih HLA zaradi vključenosti v program Eurotransplant izjemno redka (9). Akutna zavrnitev se zgodi v kratkem časovnem obdobju (tedni do meseci) s hitrim upadom delovanja presadka. Verjetnost njenega pojava je največja v prvih treh mesecih po presaditvi, a se lahko pojavi tudi kasneje, pojavnost pa se zmanjšuje s časom od presaditve (10). V obdobju 2000–2016 se je v prvem letu po presaditvi pojavila pri 13,7 % slovenskih bolnikov s presajeno ledvico (5). Prenizki vzdrževalni odmerki imunosupresivnih zdravil, njihovo ukinjanje ali neredno jemanje dolgoročno lahko vodijo v kronično zavrnitveno reakcijo, ki povzroča postopen upad delovanja presadka od več mesecev do let po presaditvi (11).

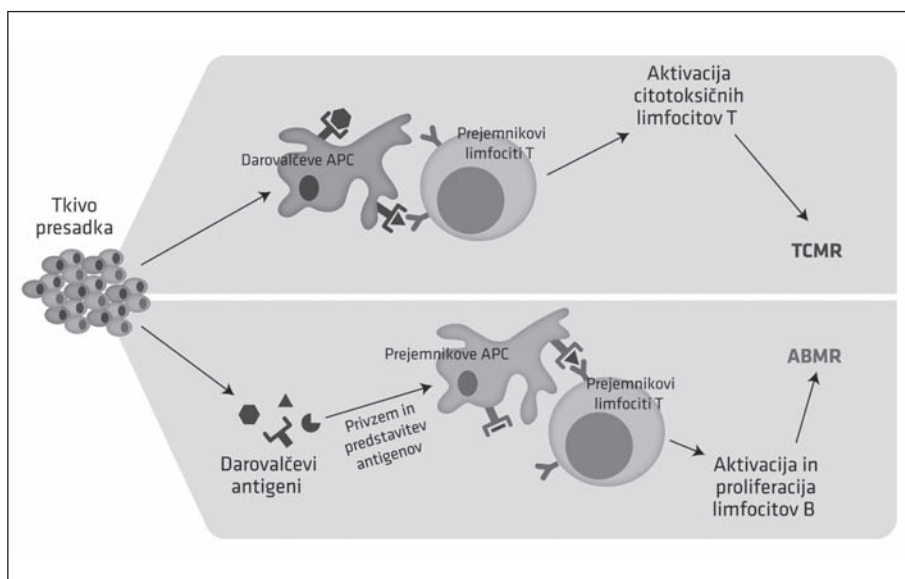
Etiopatološki mehanizem zavrnitve presadka v osnovi delimo na TCMR in ABMR, lahko pa se pojavijo tudi mešane oblike (slika 1). Prva omenjena reakcija predstavlja odziv prirojenega imunskega sistema na antigene, ki jih predstavljajo darovalčeve antigen predstavitvene celice (APC). Slednje predstavijo antigene gostiteljevim citotoksičnim limfocitom T CD (angl. *cluster of differentiation*) 8, ti pa neposredno poškodujejo celice presadka. Druga oblika je ABMR,

ki je posledica humoralnega odziva imunskega sistema, pri katerem prejemnikove APC predstavijo darovalčeve antigene HLA limfocitom T-pomagalkam. Te aktivirajo ustrezne limfocite B, ki se namnožijo in diferencirajo. Tako nastanejo plazmatke, ki tvorijo za darovalca specifična protitelesa (angl. *donor-specific antibodies*, DSA), usmerjena proti predstavljenim neskladnim darovalčevim antigenom HLA. DSA se vežejo na tarčne antigene in sprožijo uničenje tarčnih celic (10).

Zdravljenje zavrnitvenih reakcij se razlikuje glede na etiopatološki mehanizem. Tako TCMR zdravimo z imunosupresivnimi zdravili, pri čemer so ključni kortikosteroidi. Pri težjih oblikah uporabljamo protilimfocitna protitelesa (npr. antitimocitni globulin). Zdravljenje ABMR je zahtevnejše; ključno je odstranjevanje protiteles s plazmaferezo, dodatno zdravljenje pa lahko predstavljajo tudi intravenski imunoglobulini in biološka zdravila (npr. anti-CD20 protitelo – rituksimab) (8).

Kronične spremembe presadka

V presadku poleg že opisanih sprememb lahko nastanejo tudi kronične spremembe, ki so jih zgodovinsko opisovali kot kronično nefropatijo presadka, v modernejši literaturi pa je ta izraz zaradi njegove nespecifičnosti nadomestil krovni opisni izraz intersticijska fibroza s tubulno atrofijo (IFTA) (13). IFTA je neizbežna progresivna posledica imunoloških in neimunoloških vzrokov ter se v dveh letih po presaditvi razvije pri do 60 % presadkov (14, 15). Med imunološke vzroke IFTA spadajo že opisane zavrnitvene reakcije. Med njimi je najpogostejša kronična ABMR, ki je povezana z nezadostno imunosupresijo, največkrat zaradi nesodelovanja bolnikov pri zdravljenju. Med neimunološke vzroke uvrščamo nefrotoksičnost zaviralcev kalcinevrina (ciklosporin, takrolimus), ponovitev osnovne bolezni, virusne okužbe presadka in druge (15). IFTA je pomemben vzrok dolgoročne odpovedi presadka; poročano desetletno preživetje presadkov z normalno histološko



Slika 1. Shematski prikaz etiopatoloških mehanizmov različnih oblik zavrnitvene reakcije presajene ledvice (12). APC – antigen predstavitvene celice, TCMR – T-celično posredovana zavrnitev (angl. *T-cell mediated rejection*), ABMR – s protitelesi posredovana zavrnitev (angl. *antibody mediated rejection*).

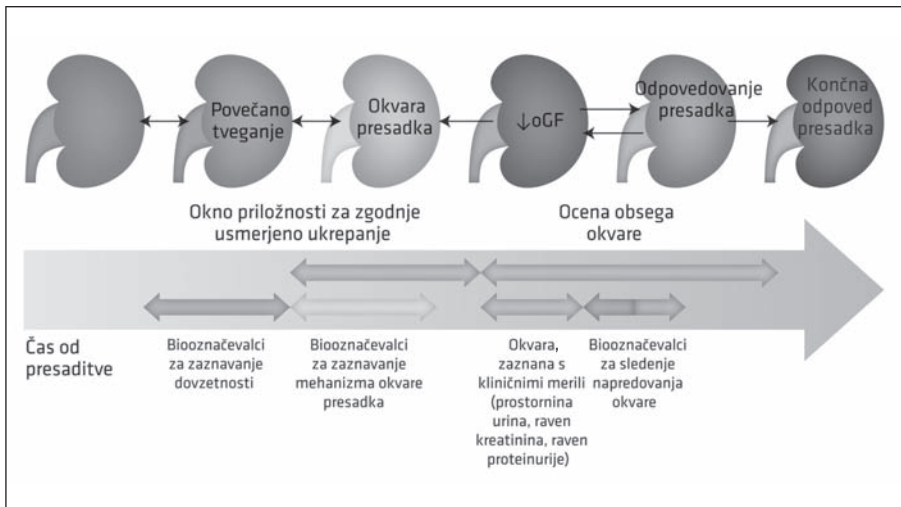
sliko je večje od 95 %, ta delež se zmanjša na 82 % pri bolnikih z IFTA brez pridružene okvare žilja in na 41 % pri IFTA s pridruženo okvaro ledvičnega žilja (16).

Spremljanje delovanja in okvare presajene ledvice

Ključni namen sledenja bolnikov po presaditvi je spremljanje delovanja in pravočasna zaznava okvare presajene ledvice, preden ta postane nepopravljiva, ter diagnozi ustrezna prilagoditev zdravljenja (slika 2). Protokol spremljanja delovanja presadka se razlikuje med centri za presaditev organov, predvsem pa se prilagaja času po presaditvi in kliničnemu stanju vsakega bolnika. Najpogosteje uporabljene metode za oceno delovanja ledvic v vsakdanji klinični praksi so raven kreatinina v serumu in na podlagi te oGF, poleg tega pa še raven proteinurije (8). Omenjeni parametri so nezadostni označevalci za ugotavljanje zavrnitvenih reakcij in drugih vzrokov okvare presadka, njihova največja pomanjkljivost je majhna občutljivost. Merjeni parametri porastejo pozno, ko je lahko okvara presadka že obsežna in nepopravljiva. Poleg tega

obstaja tudi možnost subklinične okvare presadka, pri kateri je prisotna poškodba oz. patološki procesi, ki jih lahko zaznamo z biopsijo, a še ne kažejo kliničnih znakov okvare. Omenjeni označevalci so poleg tega nespecifični, saj se pojavijo pri vseh procesih, ki okvarijo presajeno ledvico, in poslabšajo njeno delovanje (17, 18).

Nezaznana in posledično nezdravljena okvara presadka na dolgi rok pomembno prispeva k razvoju kroničnih sprememb in slabšanju njegovega delovanja. Za oceno stanja zato po presaditvi tudi pri navidezno stabilno in dobro delujoči ledvici opravljamo nadzorne igelne biopsije, navadno v prvem letu po presaditvi (8, 17, 18). V primeru, ko se delovanje presadka glede na zgoraj omenjene klinične parametre slabša in se ne odziva na podporno zdravljenje, opravimo indikacijsko ledvično biopsijo. Ta je zlati standard za končno diagnostiko vzroka okvare, saj poda informacije o histološki sliki tkiva presajene ledvice. To ocenimo glede na klasifikacijo po Banffskih merilih, ki temeljijo na prisotnosti in obsegu 15 različnih histopatoloških sprememb biopтата, iz te ocene pa lahko sklepamo



Slika 2. Shematski prikaz možnosti uporabe različnih bioznačevalcev in pomen zaznavanja okvar ledvičnega presadka pri različnih kliničnih stopnjah (20). oGF – ocenjena glomerulna funkcija.

o mehanizmu in klinični pomembnosti sprememb, ki se odvijajo v presadku (19).

Biopsija kljub svojim prednostim ni idealna preiskava. Je invaziven poseg, pri katerem lahko pride do zapletov, predvsem krvavitve. Razlaga patohistološke slike je odvisna od subjektivne ocene patologa, poleg tega ni nujno, da odvzeti vzorec predstavlja dejansko stanje presadka, saj je proces v vzorčenem delu lahko manj izražen. Povezana je tudi z visokimi stroški in je obremenjujoča za center za presaditev organov ter bolnike. Za rednejše spremljanje stanja presajene ledvice in s tem ustreznejše vodenje in zdravljenje bolnikov potrebujemo nadomestne neinvazivne označevalce okvare presajene ledvice (17).

Novi urinski biološki označevalci za odkrivanje okvare presadka

Za nove označevalce okvare presadka je ključno, da bi pokazali prisotnost, vrsto in mehanizem okvare v zgodnejših stopnjah kot trenutni klinični parametri in igelna biopsija ter tako omogočili hitrejšo ukrepanje (slika 2). Pomembno je tudi, da bi tovrstne označevalce lahko pridobili na neinvaziven način iz telesnih tekočin. Izmed telesnih tekočin je pri ledvicah kot vir novih označevalcev najprimernejši urin (17, 18).

Kot biološki označevalci okvare ledvic so trenutno najboljše raziskane številne beljakovine v urinu. Te se sproščajo v urin neposredno iz okvarjenih celic nefrona ali pa iz vnetnih celic, ki posredujejo poškodbo. V prvo skupino spadajo beljakovine, kot so z ledvično poškodbo povezana molekula 1 (angl. *kidney injury molecule-1*, KIM-1), z nevtrofilno gelatinazo povezan lipokalin (angl. *neutrophil gelatinase associated lipocalin*, NGAL) in cistatin C (21). Čeprav so nekatere izmed beljakovin te skupine značilne za posamezne dele nefrona, pa so kot označevalke ledvične poškodbe nespecifične – povišane so namreč pri širokem naboru različnih patoloških stanj (22). Za bolj specifično zaznavanje akutnih zavrnitvenih

reakcij so zanimive predvsem beljakovine iz druge skupine. Mednje spadata proznetna citokina kemokinski ligand z vzorcem C-X-C (angl. *chemokine C-X-C motif ligand*, CXCL) 9 in 10, ki sta vpletena v zbiranje in aktivacijo limfocitov T (23, 24). V multicentrični raziskavi so povečano raven CXCL9 v urinu pri bolnikih z akutno zavrnitvijo presadka opazili že do 30 dni pred biopsijo (25). V drugi raziskavi pa so pokazali, da je urinski CXCL9 napovedni dejavnik TCMR, medtem ko je bil CXCL10 povezan z razvojem ABMR. Že en mesec po presaditvi je kljub stabilnemu delovanju presadka zvišana raven urinskega CXCL10 napovedovala kasnejšo akutno zavrnitveno reakcijo (26).

Poleg beljakovinskih označevalcev so raziskovalci v urinu prepoznali tudi nukleinsko-kislinske označevalce okvare, a je to področje slabše raziskano. S pomočjo transkriptomike, ki omogoča hkratno analizo prepisovanja velikega števila različnih genov, so prepoznali spremembe, značilne za posamezno obliko okvare presadka. Med njimi je najbolj zanimiv profil izražanja dveh različnih molekul informacijske RNA (angl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) (CD3ε mRNA, mRNA interferon-γ sprožilna beljakovina 10 (angl. *interferon-inducible protein 10*, IP-10)) in ene molekule ribosomalne RNA (angl. *ribosomal ribonucleic acid*, rRNA) (18S rRNA), izoliranih iz urinskih celic, ki je omogočil razlikovanje med bolniki z akutno zavrnitveno reakcijo in brez nje, ob tem pa tudi razlikovanje med TCMR in ABMR (27).

Obetaven vir novih bioloških označevalcev so tudi nekodirajoče molekule RNA, izmed katerih so dobro raziskane predvsem mikro RNA (angl. *micro ribonucleic acid*, miRNA). Raziskave so se osredotočale predvsem na povezanost izražanja miRNA v biopsijskih vzorcih ledvičnega tkiva, mononuklearnih celicah periferne krvi (angl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) ali v urinu prisotnih celicah ter klinično ali histopatološko sliko okvare presadka. Na

vzorcih ledvičnih biopsij so tako pokazali povečano izražanje sedmih miRNA pri DGF, med njimi sta najbolj izstopali miR-182-5p in miR-21-3p (28, 29). Za akutno zavrnitveno reakcijo je bilo značilno povečano izražanje miR-142-5p, miR-155, miR-223, miR-10b in miR-30a-3p, pri čemer je imela kombinacija prvih treh miRNA > 90 % občutljivost in specifičnost za napoved akutne zavrnitve (30). Glede na profile izražanja miR-142-3p, miR-142-5p, miR-155 in miR-223 v biopsijskem vzorcu ali že samo miR-142-3p in miR-223 v PBMC so lahko ločili med biopsijskimi vzorci z izraženo TCMR in biopsijskimi vzorci z normalnim histopatološkim izvidom (31). Med najobetavnejšimi miRNA je miR-155, saj je njeno izražanje odzivno na zdravljenje akutne zavrnitve, pri katerem se ob uspešnem zdravljenju raven miR-155 zniža (32). Spremembe v izražanju miRNA so opazili tudi pri kronični okvari delovanja presadka, ki je posledica IFTA. Najbolj izstopajo miRNA-21, katere izražanje je povečano v urinskih celicah, PBMC in biopsijskih vzorcih, ter že omenjeni miR-142-3p in miR-155, katerih izražanje je povečano v PBMC in urinskih celicah (33, 34).

Kot obetaven biološki označevalec poškodbe presadka se v transplantacijski medicini vse bolj uveljavlja darovalčeva prostocelična DNA (angl. *donor-derived cell-free deoxyribonucleic acid*, dd-cfDNA), ki se sprošča iz poškodovanih celic presadka in jo najdemo v urinu in krvi. Raven dd-cfDNA, izražena kot delež skupne prostocelične DNA (angl. *cell-free deoxyribonucleic acid*, cfDNA), odraža stopnjo okvare celic, ki vsebujejo darovalčevo DNA, in je zato nespecifičen znak. Raven dd-cfDNA v krvi bolnikov s presajeno ledvico je navadno < 1 %, a se značilno poveča ob akutni zavrnitvi (35). V eni izmed raziskav je bil delež dd-cfDNA v krvi ob akutni zavrnitvi 1,6 %, v primerjalni skupini pa 0,3 %, raven dd-cfDNA pa se je razlikovala tudi med različnimi tipi zavrnitve in je bila višja pri

ABMR kot pri TCMR (36, 37). Prednost uporabe dd-cfDNA pred klasičnimi označevalci okvare presadka je predvsem njena občutljivost, saj so povišane ravni dd-cfDNA opazili tudi do 31 tednov pred klinično diagnozo akutne zavrnitve (35, 38). Hkrati nizek delež dd-cfDNA (< 0,5 %) z veliko verjetnostjo izključuje klinično pomembno okvaro presadka.

Trenutno se kot izjemno obetavni biološki označevalci številnih bolezni, tudi na področju transplantacijske medicine, uveljavljajo ZV.

ZUNAJCELIČNI VEZIKLI IZ URINA

ZV so heterogena populacija z membrano obdanih kroglastih delcev, ki se sproščajo iz celic tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. ZV imajo pomembno vlogo pri sporazumevanju med celicami organizma ter med posameznimi organizmi, na kar nakazuje tudi evolucijska ohranjenost vloge ZV (39). Pri sesalcih so jih izolirali iz raznolikih telesnih tekočin, kot so kri, urin, bronhoalveolarni izpirek, sinovialna tekočina, plodovnica, sperma, mleko, slina, dokazali pa so tudi prisotnost veziklov, izvirajočih iz črevesne mikrobiote, in njihovo pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema (40–42). ZV lahko le z vezavo ali vstopom in s sproščanjem svojega tovora vplivajo na delovanje sosednjih tarčnih celic (parakrino) ali na bolj oddaljene celice (endokrino) (43, 44).

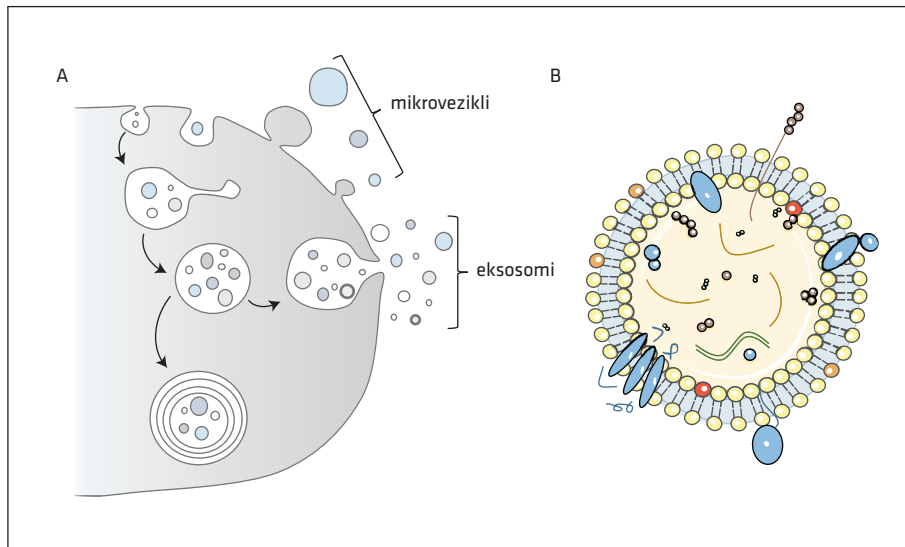
ZV se med seboj razlikujejo po nastanku, celičnem izvoru, velikosti, molekularni sestavi ter biološki vlogi. Glede na nastanek in velikost ZV razlikujemo (slika 3A): vezikle endocitotskega izvora, imenovane eksosomi (premer 30–100 nm), mikrovezikle, ki nastanejo z brstenjem plazmaleme (premer 100–1.000 nm), in apoptotska telesca, ki nastanejo med programirano celično smrtjo (premer 1.000–5.000 nm). Različni mehanizmi nastanka ZV so podrobneje opisani v predhodnih objavah (46). Raziskovalci se v svojih raziskavah osredotočajo

predvsem na preučevanje eksosomov in mikroveziklov, saj se ti sproščajo tako v fizioloških kot tudi patoloških pogojih, do nastanka apoptotskih telesc pa prihaja le v času programirane celične smrti. Znotraj celic lahko hkrati prihaja do nastajanja več tipov ZV, za katere pa je z obstoječimi raziskovalnimi metodami težko nedvoumno določiti mehanizem nastanka, ki je ključen za pravilno poimenovanje npr. eksosomov ali mikroveziklov. Zato je mednarodno društvo za zunajcelične vezikle ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) v svojih smernicah za raziskave zunajceličnih veziklov namesto izrazov eksosom/mikrovezikel predlagalo poimenovanje glede na velikost na majhne (< 200 nm) in velike (> 200 nm) ZV (47).

Biofizikalne lastnosti ZV so pomembne, saj odražajo izvor ZV, poleg tega pa vplivajo na njihovo biološko vlogo. Mednje uvrščamo velikost, koncentracijo, gostoto in optične lastnosti ZV ter mehanske lastnosti membran, kot sta elastičnost in naboj (ζ -potencial). Z analizo koncentracije in velikosti sproščenih veziklov lahko spremljamo dogajanje v telesu. Spremembe koncentracije ZV v krvi v povezavi z bolezenskimi spremembami so opisali pri več vrstah raka (48, 49), srčno-žilnih in avtoimunskih boleznih (50, 51), pri tem pa naj bi bili ključni procesi hipoksija, avtofagija in stres. Pri številnih vrstah raka so opisali tudi spremembe v velikosti veziklov (52–55). Podtipi ZV imajo zelo podobno gostoto. Za eksosome je značilna gostota 1,13–1,19 g/ml, medtem ko je za apoptotska telesa značilna gostota 1,16–1,28 g/ml, oboje pa se prekriva z gostoto lipoproteinov z visoko gostoto (angl. *high density lipoprotein*, HDL), kar lahko oteži izolacijo ZV iz krvi (56). Mehanske lastnosti ZV, kot sta elastičnost in naboj, vplivajo na kroženje ZV po telesu, privzem v celice in sproščanje tovara. Elastične membrane ZV se po stresu povrnejo v prvotno obliko, medtem ko plastične membrane ZV ostanejo spremenjene.

ζ -elektrokemijski potencial je pokazatelj koloidne stabilnosti ZV, ko se ti gibljejo v tekočem mediju, in določa stabilnost medsebojnega učinkovanja med posameznimi vezikli, vezikli s tekočino, vključno s težnjo veziklov k tvorbi skupkov (57). Mehansko togost oz. stabilnost ZV določata tudi njihova velikost in geometrija. Raziskave so že pokazale statistično značilne razlike v spremembi oblike veziklov, izvirajočih iz rakavih ter nerakavih celičnih linij (58).

Molekularni tovor ZV (slika 3B) predstavljajo različne beljakovine, lipidi, nukleinske kisline in ogljikovi hidrati (59, 60). Molekularna sestava je značilna za posamezni tip ZV, kot tudi tip starševske celice. Izsledki obsežnih raziskav glede prisotnosti omenjenih molekularnih zvrsti v ZV so objavljeni v javno dostopnih podatkovnih bazah: Vesiclepedia, ExoCarta in EVpedia (61–63). V ZV so najpogosteje zastopane beljakovine, ki so vključene v nastanek in sproščanje veziklov, tetraspanini, beljakovine v signalnih poteh, beljakovine, vključene v predstavitev antigenov in transmembranske beljakovine (59–61). Razvrščanje beljakovinskega tovara v vezikle lahko poteka odvisno od endosomskega razvrščevalnega kompleksa, potrebnega za prenos (angl. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT) ali od vključevanja v membranske domene, pri čemer so ključne številne posttranslacijske spremembe beljakovin (64–66). Beljakovinska sestava ZV posredno vpliva na fiziološke in patološke učinke v njihovih tarčnih celicah (41). Beljakovine in lipidi na površini ZV so lahko glikozilirani, pri čemer so za ZV iz različnih vrst tkiv in organizmov značilni različni glikozilacijski vzorci (66). Ti uravnavajo privzem ZV v tarčne celice in s tem pomembno vplivajo na (pato)fiziologijo ZV (39). Glede lipidne sestave so membrane eksosomov obogatene s holesterolom, sfingomielinom, glikosfingolipidi in fosfatidilserinom, podobno



Slika 3. Shematski prikaz biogeneze (A) in značilne molekularne sestave (B) zunajceličnih veziklov. Podrobnejši opis je podan v besedilu (45).

kot lipidni rafti (67, 68). *In vitro* so pokazali, da ZV iz tumorskih in metastatskih celic vsebujejo več sterolov, sfingolipidov in glicerofosfolipidov (69, 70). Metabolom je najmanj raziskana molekulska zvrst ZV. Eksosomi naj bi vsebovali različne tipe molekul z nizko molekulsko maso, kot npr. organske kisline, aminokisline, sladkorje in njihove konjugate, nukleotide in nukleozide, ciklične alkohole, karnitine, aromatske spojine in vitamine (70).

ZV vsebujejo raznolike molekule RNA, kot npr. mRNA, rRNA, prenašalne (angl. *transfer ribonucleic acid*, tRNA), najbolj preučevane miRNA, dolge nekodirajoče (angl. *long non-coding ribonucleic acid*, lncRNA), interakcijske («piwi») in krožne RNA (59, 71). Razvrščanje miRNA v ZV naj bi potekalo s pomočjo katalitične komponente argonavtske beljakovine z RNA sproženega utiševalnega kompleksa 2 (angl. *argonaute ribonucleic acid induced silencing complex catalytic component 2*, AGO2) in GW182 ali možno tudi v ceramidni poti, odvisno pa je tudi od same strukture in zaporedja RNA (72–74). Molekule RNA v tarčnih celicah

uravnavaajo izražanje genov ali prenesejo informacijo za izgradnjo funkcionalne beljakovine (71, 75–77). Raziskave so dokazale prisotnost mitohondrijske in genomske DNA v ZV, vendar je ta tip molekul manj raziskan (78). Žive celice aktivno izločajo DNA preko ZV, vendar mehanizem še ni pojasnjen. DNA, ki je lahko eno- ali dvovertična, ima povprečno dolžino 200 baznih parov (bp) v manjših ZV in do 2.000.000 bp v velikih ZV. Lahko se nahaja na površini ali pa v notranjosti ZV, kjer je še dodatno zaščiten z lipidnim dvoslojem (79). Z analizo vezikularne DNA lahko pridobimo informacijo o celotnem genomu starševskega organizma, ponuja pa tudi vpogled v stanje somatskih mutacij v starševski celici (80–82). Prenos vezikularne DNA v tarčne celice lahko preko prepisa v mRNA in beljakovine vpliva na funkcijo celic (83, 84).

Zunajcelični vezikli v urinu

Urin vsebuje pester nabor anorganskih soli, presnovkov, organskih spojin (npr. beljakovine, hormone) in tudi ZV. Je lahko dostopna telesna tekočina z veliko pro-

stornino in je zato odličen vir neinvazivnih bioloških označevalcev okvare ledvic. Prisotnost ZV v urinu so opisali že leta 1990, prvič pa so ZV izolirali iz urina Pisitkun in sodelavci, ki so s proteomsko analizo prepoznali 295 različnih vezikularnih beljakovin (85, 86). Urin vsebuje tudi visoke koncentracije uromodulina (drugo ime Tamm-Horsfallova beljakovina (angl. *Tamm-Horsfall protein*, THP)), ki se sprošča iz Henlejeve zanke in lahko tvori obsežne polimere, ter kristalov kalcijevega oksalata, ki otežujejo izolacijo ZV iz urina (87).

Vir ZV v urinu so celice vsakega posameznega odseka nefrona, tj. celice epitelijske, glomerulni podociti, celice proksimalnega tubula, Henlejeve zanke, distalnega tubula in zbiralc ter epitelne celice urogenitalnega trakta (88). Raziskave so nakazale na razliko v urinskih ZV pri živih darovalcih ledvic različnega spola, pri čemer so opazili višjo vsebnost ZV v urinu prejemnikov darovalk ženskega spola. V urinu so zaznali tudi povišane ravni ZV iz mezangijskih in parietalnih epitelijskih celic. Sproščanje eksosomov, zlasti iz jukstaklomerularnih celic in podocitov, naj bi se s starostjo zmanjševalo (89).

Vezikularne beljakovine predstavljajo 3 % mase beljakovin, ki jih najdemo v urinu (90, 91). Z uporabo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (angl. *liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, LC/MS/MS), so prepoznali kar 1.412 edinstvenih beljakovin v urinu zdravih ljudi, celokupno pa naj bi proteom urinskih ZV obsegal že več kot 3.000 beljakovin (90, 92). V ZV iz urina so pravzaprav zaznali vse prevladujoče apikalne ionske in vodne prenašalne beljakovine (90). Najpogostejše beljakovine glede na izsledke proteomskih raziskav ZV iz urina so aneksini (angl. *annexins*, ANX) A1, A4 in A5, znotrajcelični kloridni kanal 1 (angl. *chloride intracellular channel 1*, CLIC1), gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (angl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*,

GAPDH), laktat dehidrogenaza B (LDHB), z Ras povezan substrat botulinuskega toksina C3 1 (angl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, RAC1) in stomatin (STOM) (93). ANX so membransko vezane beljakovine, ki imajo pomembno vlogo pri eksocitozi ter pri uravnavanju koagulacije ter imunskega odziva. CLIC1, RAC1 in STOM pa so integralne membranske beljakovine ali z membrano povezane beljakovine, ki lahko vplivajo na prenos ionov in s tem na membranski potencial, bodisi neposredno z uravnavanjem prenosa klorida (CLIC1) bodisi posredno z uravnavanjem beljakovin, ki prenašajo natrij (STOM) ali vodikov ion (RAC1). GAPDH in LDHB imata oksidoreduktivno aktivnost, ki lahko vpliva na lokalni pH in redoks potencial ter prispeva k ohranjanju aktivacijsko-inaktivacijskega stanja ZV v urinu med celično difuzijo.

Raziskav glikozilacije ZV iz urina je razmeroma malo. Gerlach in sodelavci so z uporabo pretočne citometrije in lektinskih mikromrež raziskovali profil glikozilacije na površini ZV iz urina zdravih posameznikov (94). Prepoznali so širok nabor različnih oligosaharidov, pri čemer so bile razširjene bolj razvejane O-vezane strukture, manj pogosti pa O-vezani glikani mucinskega tipa. Sami glikozilacijski profili ZV se med posamezniki niso bistveno razlikovali, so se pa razlikovali od glikozilirane THP. Z uporabo masne spektrometrije v povezavi z lektinskimi mikromrežami so pokazali, da je površina urinskih ZV obogatena s kompleksnimi N-glikani ter s terminalnimi spremembami manoznih in fukoznih ostankov (95). Beljakovine na površini urinskih ZV naj bi sovpadale z glikozilacijskim profilom ledvičnih epitelijskih celic, ta pa je odvisen od translacije, zvijanja, razvrščanja ter izločanja beljakovin. Spremembe površinske glikozilacije omenjenih ZV lahko neposredno odražajo patološka stanja (94).

Pri ZV iz urina so zaznali različno vsebnost holesterola, sfingolipidov in fosfatidilserina

v primerjavi s celično membrano, pri čemer je bila vsebnost holesterola v ZV kar 63 %. Na podlagi lipidne sestave so uspeli razlikovati med ZV obolelih za rakom prostate in zdravih posameznikov (69).

Raziskave RNA tovora ZV v urinu so pokazale, da v njih prevladujejo nekodirajoče RNA, v največjem obsegu rRNA. V primerjavi z drugimi telesnimi tekočinami so urinski ZV najbolj obogateni z zaporedji, ki kodirajo beljakovine. Odkrili so namreč več kot 13.000 mRNA (96). Analiza slednjih je pokazala, da se znotraj veziklov nahajajo zaporedja genov, značilnih za vse odseke nefrona, sečevoda ter mehurja in prostate, torej kodirajoča zaporedja, ki pokrivajo celoten urogenitalni trakt. Nekodirajoči del RNA tovora ZV pa vpliva na prepisovanje genov in posttranskripcijske spremembe (97, 98). Pri urinskih ZV so najbolj preučevane mRNA in miRNA, njihovo pakiranje v ZV pa je zelo selektiven proces (93). Dokazali so, da je v fizioloških pogojih vsebnost miRNA v veziklih višja v primerjavi z miRNA v urinu in celicah iz urina, kar nakazuje, da so molekule RNA v veziklih zaščitene pred razgradnjo in zato bolj stabilne (99). Urinski ZV so tudi dober vir novih, redkejših vrst RNA, kot so krožne RNA. Vezikularne zvrsti RNA zato predstavljajo dober vir neinvazivnih bioloških označevalcev.

DNA je najmanj raziskan tovor urinskih ZV (100). Lee in sodelavci so preučevali vezikularno DNA iz urina bolnikov z rakom sečnega mehurja in pokazali, da vezikularna DNA neposredno odraža genomski profil tumorja (somatske mutacije, variacije v številu kopij) (101). Tudi na Kliničnem oddelku za nefrologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana v povezavi z Inštitutom za biokemijo in molekularno genetiko Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani raziskujemo uporabo vezikularne DNA iz urina kot neinvazivnega biološkega označevalca okvare presajene ledvice.

VLOGA ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV V URAVNAVANJU FIZIOLOŠKIH IN PATOLOŠKIH PROCESOV V LEDVICAH

Fiziološka vloga zunajceličnih veziklov v ledvicah

Sprva so raziskovalci menili, da je vloga ZV predvsem izločanje celici nepotrebnih celičnih gradnikov. Kmalu se je izkazalo, da imajo številne druge, pomembnejše vloge za vzdrževanje fiziološkega stanja v ledvicah. Te so povezane predvsem z vpletenostjo ZV v medcelično sporazumevanje, saj so pomembni prenašalci različnih molekul v notranjosti in na membrani vezikla, ki so vpletene tudi v patološke procese. ZV se lahko vežejo na površino oz. receptorje tarčnih celic in aktivirajo signalne poti, tarčne celice pa lahko tudi privzamejo ZV, v celice sproščena vsebina pa nato vpliva na različne procese v tarčni celici. Pri tem je pomembno, da so ZV v primerjavi z drugimi načini medceličnega sporazumevanja (avtokrino, parakrino, endokrino) bolj dinamični, saj je njihov učinek na tarčne celice odvisen od njihove sestave, ta pa od stanja starševske celice (102).

Med pomembnejše vloge ledvičnih ZV spada sporazumevanje med različnimi celicami znotraj organa. V tem oziru so ledvični ZV posebni, saj nepoškodovana glomerulna bazalna membrana preprečuje prehod velike večine ZV iz plazme v filtrat – ledvični ZV izvirajo torej predvsem iz celic, prisotnih v ledvičnem tkivu (celice nefrona, imunske celice). ZV v filtrat sproščajo večinoma celice proksimalnih delov nefrona (podociti, celice proksimalnega tubula), nato pa ti s filtratom potujejo do distalnejših celic nefrona (celice distalnega tubula in zbiralca) (86, 103). Te jih privzamejo, s tem pa je omogočeno medcelično sporazumevanje proksimalnega in distalnega dela nefrona. *In vitro* so pokazali, da ZV, sproščeni iz proksimalnih tubulnih celic, gojenih v prisotnosti agonista dopaminskih receptorjev, zmanjšujejo nastajanje reaktivnih

kisikovih spojin in bi tako lahko delovali protivnetno (104).

ZV lahko prenašajo molekule, vpletene v vzdrževanje homeostaze vode in elektrolitov v telesu. Primer tega je prenos akvaporina (angl. *aquaporin*, AQP) 2 z ZV med celicami zbiralca, ki v tarčnih celicah povzroči povečanje prenosa vode (105). ZV proksimalnih tubulnih celic prenašajo tudi aktiven GAPDH, ki zniža aktivnost epiteljskih natrijevih kanalčkov (angl. *epithelial sodium channels*, ENaC) v celicah distalnih tubulov in zbiralca (106).

Pomembno vlogo ZV igrajo tudi pri razvoju in samoobnovi ledvičnega tkiva. Posredujejo medcelično sporazumevanje med mezenhimskimi in epiteljskimi celicami ledvice. Z njihovo pomočjo lahko tubularne epiteljske celice sprožijo diferenciacijo mezenhimskih stromalnih celic v epiteljske celice, kar je pomemben korak embrionalnega razvoja ledvic (107).

Vloga zunajceličnih veziklov pri ledvičnih boleznih

ZV so bili opredeljeni kot pomemben del etiopatogenetskih mehanizmov pri kopici patoloških stanj, od KLB do raka. Obširno raziskana je vloga ZV pri KLB, posebej pri diabetični nefropatiji (DN). V urinu prisotni ZV imajo pomembno vlogo v vseh organih urogenitalnega trakta, a smo se pri pregledu literature osredotočili le na ledvice. ZV iz glomerulnih epiteljskih celic, gojenih v prisotnosti visokih koncentracij glukoze, prispevajo k aktivaciji epiteljsko-mezenhimskega prehoda in fibrotičnim spremembam podocitov in mezangijskih celic pri DN (108). Visoke ravni glukoze v urinu prispevajo tudi k povečanemu sproščanju ZV iz makrofagov, kar nadalje povzroči proliferacijo mezangijskih celic in aktivira vnetno reakcijo, ki vodi v ledvično fibrozo (109).

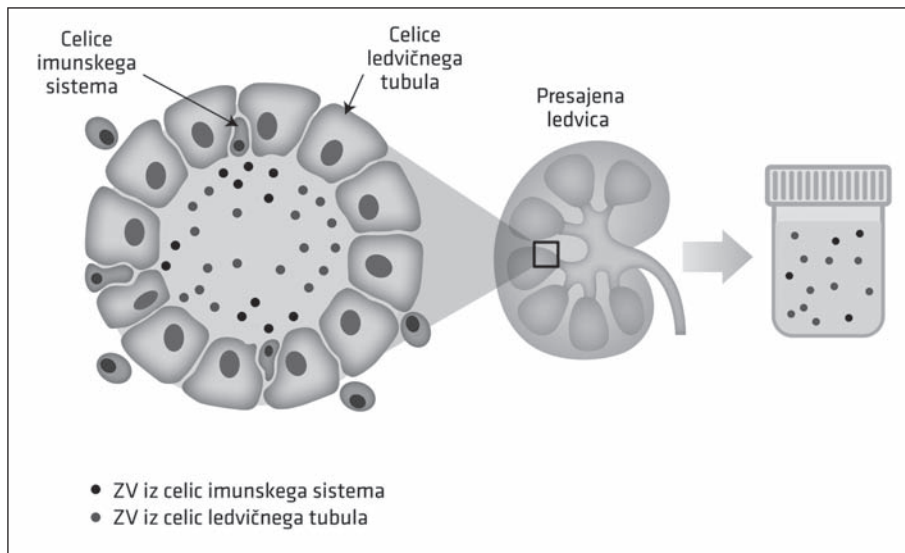
Poleg KLB so glede na patološka stanja v ledvici najboljše raziskane vloge ZV pri karcinomu ledvičnih celic (KLC). Tumorsko

tkivo vzpostavi lastno mikrookolje, ki vzpodbuja rast in razvoj tumorja. Zato ni presenetljivo, da imajo ZV pomembno vlogo pri tumorogenezi in napredovanju KLC. Ena izmed raziskav je pokazala, da so ZV iz primarnih celic pri svetloceličnem KLC bogati s spreminjajočim rastnim dejavnikom $\beta 1$ (angl. *transforming growth factor $\beta 1$* , TGF- $\beta 1$) in znižajo odziv citotoksičnih limfocitov T na rakave celice (110). V drugi raziskavi pa so pokazali, da ZV, sproščeni iz rakavih zarodnih celic bolnikov s KLC, spodbujajo razmnoževanje in epiteljsko-mezenhimski prehod, ki sta pomembna za napredovanje KLC (111).

Številne raziskave se osredotočajo tudi na zaščitni učinek ZV pri IRP. Tovrstna vloga ZV ima pomembne implikacije za preživetje presajenih ledvic preko zmanjšanja IRP. V ospredju raziskav so ZV, sproščeni iz mezenhimskih stromalnih celic. Povezani so z zmanjšano okvaro in hitrejšim izboljšanjem ledvičnega delovanja po IRP pri podganah (112). Podoben učinek je imel tudi intravenski vnos ZV iz podganjih in človeških ledvičnih tubulnih celic (113, 114). Poleg omenjenega so ZV pomembni posredniki vnetnega odziva. Pri miših so pokazali, da visoko izražanje receptorja za kemokinski ligand z vzorcem C-C 2 (angl. *C-C motif chemokine ligand 2*) na ZV lahko prispeva k zmanjšanemu učinku CCL2 na makrofage in s tem zmanjšanemu vnetnemu odzivu po IRP (115).

KLINIČNA UPORABNOST ZUNAJCELIČNIH VEZIKLOV IZ URINA

Nabor lipidov, membranskih in citosolnih beljakovin ter nukleinskih kislin v ZV odseva molekularno sestavo starševske celice, bodisi v navadnih fizioloških pogojih ali spremenjene zaradi patoloških procesov. Značilno stanje celice se lahko odraža tudi v količini ali velikosti izločenih ZV. Raziskave so pokazale, da je pogostost sproščanja ZV odvisna od okolja, v katerem se



Slika 4. Zunajcelični vezikli v urinu so pomemben vir novih, neinvazivnih bioloških označevalcev okvare presajene ledvice (123). ZV – zunajcelični vezikli.

celica nahaja, npr. koncentracije raztopljenega kisika v tekočini, pH in tipa same starševske celice, pri čemer rakave celice izločajo znatno višje število ZV (116–118). Molekule DNA in RNA so v sproščenih ZV zaščitene pred razgradnjo z DN-azami in RN-azami v urinu (119). Podobno pa bi lahko ZV zaščitili molekule pred ostalimi encimi, prisotnimi v urinu, kot so oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze in liaze (120). Zaradi vseh naštetih lastnosti so ZV pomemben neinvaziven vir bioloških označevalcev bolezni urogenitalnega trakta, kar se kaže tudi v vedno večjem številu raziskav (121, 122) (slika 4).

Zunajcelični vezikli kot biološki označevalci okvare presajene ledvice

ZV s površinskim označevalcem CD133 bi lahko služili kot biološki označevalci ledvične funkcije ter potenciala za samobnovo. Raziskave so namreč pokazale, da se ZV CD133 nahajajo v urinu zdravih posameznikov, odsotni pa so v urinu bolnikov s končno ledvično odpovedjo. Že prvi

dan po presaditvi ledvic omenjenim bolnikom so v urinu zaznali ZV CD133, njihova koncentracija pa se je s časom višala (124). Poročali so tudi o razlikah v vsebnosti prostih beljakovin NGAL in interlekvina-18 in njunih mRNA v eksosomih iz urina po presaditvi ledvic (22). Dodatno so ugotovili, da je povišana raven vezikularnega NGAL v urinu bolnikov, ki so jim presadili ledvice, povezana z zakasnjanim delovanjem presadka. NGAL v ZV je tudi bolj občutljiv zgodnji biološki označevalec kot NGAL iz celične frakcije urina (125).

Ob IRP ledvic pride do značilnega zmanjšanja ravni AQP1 v ZV iz urina. Ob primerjavi stanja ishemije-reperfuzije na podganjem modelu nefrotičnega sindroma ter bolnikov s proteinurijo pri slednjih niso zaznali sprememb v vezikularnem AQP1. Pri presaditvi organov prav tako pride do IRP, tako so tudi pri analizi ZV iz urina bolnika s presajeno ledvico opazili znižano raven AQP1. To nakazuje, da je vsebnost AQP1 v ZV označevalec IRP (126).

Raziskava na področju bioloških označevalcev okvare presajene ledvice je pre-

poznala nabor vezikularne mRNA za zaznavanje okvare presajene ledvice in mRNA za razlikovanje med akutno TCMR ter ABMR (127). V ZV iz urina bolnikov s presajeno ledvico, pri katerih je prišlo do TCMR, so dodatno dokazali zvišane ravni vezikularnega tetraspanina 1 in hemopeksina in ju predlagali kot diagnostična označevalca za TCMR (128). Pri bolnikih z zavrnitveno reakcijo so poročali tudi o povišani ravni urinskih ZV s površinskim označevalcem CD3 (123). Sigdel in sodelavci so z uporabo masne spektrometrije pri bolnikih z akutno okvaro presajene ledvice odkrili enajst beljakovin, ki so bile funkcionalno udeležene v vnetni in stresni odziv, ter tako dokazali, da vsebnost beljakovin v ZV iz urina odraža stanje presadka (129).

Zunajcelični vezikli kot biološki označevalci ostalih ledvičnih bolezni

Pri osebah s centralnim diabetesom insipidusom so pokazali, da je v urinu prišlo do povišanega izločanja AQP2 z ZV kot odziv na antidiuretik vazopresin, v primerjavi z bolniki z nefrogenim diabetesom insipidusom (130). Analiza ZV z vsebujočim AQP2 lahko tako razlikuje med centralnim in nefrogenim diabetesom insipidusom.

DN predstavlja resen zaplet pri sladkorni bolezni in je povezana s povečano obolevnostjo in smrtnostjo v primerjavi z drugimi vzroki bolezni ledvic. Spremlja jo proteinurija, ki je posledica napredujoče poškodbe in posledičnega propada glomerulnih podocitov. Pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 1 so ugotovili močno povišano količino urinskih ZV, izvirajočih iz podocitov, ki je bila vidna že pred spremembami drugih bioloških označevalcev (albuminurija, nefrin). ZV iz podocitov bi tako lahko predstavljali zgodnji označevalci glomerulne okvare pri sladkorni bolezni tipa 1 (131). Barutta in sodelavci so pokazali, da med bolniki s sladkorno boleznijo tipa 1, ki imajo oz. nimajo DN, pride do razlik

v izražanju nekaterih miRNA v urinskih ZV (miRNA-130a, miRNA-145, miRNA-155 in miRNA-424), pri čemer so vlogo vezikularne miRNA-145 izpostavili kot pomembno pri razvoju bolezni (132). Nadalje so Zubiri in sodelavci (133, 134) v urinskih ZV odkrili nabor treh spremenjenih beljakovin (alfa-1 mikroglobulinski/bikuninski prekursor (AMBP), histonska metiltransferazna levkemična beljakovina mešanega porekla 3 (angl. *histone methyltransferase mixed-lineage leukemia protein 3*, MLL3) in napetostno odvisni anionsko selektivni kanal 1 (angl. *voltage-dependent anion-selective channel 1*, VDAC1)), povezanih s prisotnostjo DN. Z analizo ZV-podocitov so avtorji ugotovili, da povišana raven mRNA z zapisom za onkoprotein Wilmsovega tumorja 1 (WT1) odraža poškodbo glomerulov pri bolnikih z DN v primerjavi z bolniki z najmanjšimi spremembami nefrotskega sindroma. Spremljanje ravni vezikularnega WT1 omogoča razločevanje bolnikov glede na tveganje za pojav zapletov (135). Prisotnost vezikularnega WT1 v urinu so povezali tudi z okvaro podocitov (134).

V ZV iz urina bolnikov z akutno ledvično okvaro so v primerjavi z zdravimi preiskovanci odkrili povišano vsebnost Na^+/H^+ izmenjevalnega prenašalca 3 (angl. *sodium-hydrogen exchanger 3*, NHE3), še posebej v primeru akutne tubulne nekroze. Vezikularni NHE3 so predlagali kot označevalce tubulne okvare in za razlikovanje med akutno tubulno nekrozo in drugimi vzroki okvare ledvic (136). Zhou in sodelavci so poročali o glikozirani beljakovini fetuin A, za katerega se je izkazalo, da se v večjem obsegu nahaja v ZV pri akutni ledvični okvari kot pri zdravih ljudeh (137). V sklopu akutne okvare ledvic so kot označevalca poškodb tubulnih celic opisali še vezikularni aktivacijski transkripcijski dejavnik 3 (angl. *activating transcription factor 3*, ATF3) (138).

Na ZV iz urina so izvedli kvantitativno proteomsko analizo in prepoznali 83 različno izraženih beljakovin pri bolnikih

z avtosomno dominantno policistično boleznijo ledvic (ADPBL). Za to bolezen je značilna okvara v genih *PKD1* ali *PKD2*, ki zapisujeta beljakovini policistin 1 (PC1) in policistin 2 (PC2). Veliko zaznanih beljakovin je izviralo iz apikalne membrane in so bili vpleteni v signalne poti primarnih cilij (npr. PC1 in PC2), celični cikel, diferenciacija celic in signalizacijo preko ionov Ca^{2+} . Povečano izražene beljakovine so bile vpletene tudi v organizacijo citoskeleta in vzdrževanje polarnosti celic, kar sovпада z nastankom cist zaradi spremenjene zgradbe celic. Zaznali so nižjo vsebnost beljakovine AQP2 in jo povezali z razredčenim urinom pri teh bolnikih (139). Nadalje so primerjali proteome ZV iz urina bolnikov z ADPBL, bolnikov z drugimi cističnimi boleznimi ledvic in zdravih posameznikov. Prepoznali so 30 beljakovin, ki so bile vsaj dvakrat bolj zastopane pri obolelih z ADPBL, pri čemer je izstopalo 5 beljakovin; citoskeletne beljakovine vilin 1, periplakin, envoplakin in beljakovini sistema komplementa C3 ter C9. Avtorji so povečane vsebnosti beljakovin komplementa povezali z zgodnjim potekom, povečanje citoskeletnih beljakovin pa s kasnejšimi stopnjami poteka bolezni (140). Pokazali so tudi, da je v primeru okvare gena *PKD1* vsebnost beljakovin PC1 in PC2 v ZV nižja, vsebnost transmembranske beljakovine 2 (TMEM2) pa povišana, in da bi lahko s pomočjo razmerja PC1/TMEM2 razlikovali med posamezniki z okvaro gena *PKD1* in brez nje (141). S proteomiko ZV iz urina lahko učinkoviteje spremljamo patološko stanje ledvic, saj je izplen redkih beljakovin z možno patofiziološko in diagnostično vrednostjo tudi do 30-krat večji v primerjavi z izplenom iz ledvičnega tkiva (91).

Tudi pri preučevanju bolnikov s cistinurijo so se Bourderioux in sodelavci poslužili proteomske analize ZV iz urina (142). Izsledki so razkrili nabor 38 povišano izraženih beljakovin, med drugimi tudi beljakovino lipokalin 2. Ta je značilna za nevtrofilce, prisotna pa je tudi v ledvicah

in služi kot biološki označevalec poškodb proksimalnih tubulov in akutne poškodbe ledvic. Nabor beljakovin je omogočil razlikovanje med zdravimi in obolelimi ter med zmernimi in hudimi oblikami cistinurije. Pri glomerulonefritisu raven fibroblastno specifične beljakovine 1 (angl. *fibroblast-specific protein 1*, FSP1), ki se iz podocitov sprošča z ZV, odraža aktivno in stalno poškodbo glomerulov (143). Omenjena odkritja nakazujejo, da so ZV iz urina zelo pomemben vir bioloških označevalcev strukturnih bolezni ledvic (44).

Terapevtski potencial zunajceličnih veziklov

ZV s prenašanjem beljakovin, nukleinskih kislin in drugih presnovkov sodelujejo pri spreminjanju fizioloških ali patoloških procesov v tarčnih celicah. Lastnosti ZV pa lahko tudi priredimo in jih usmerimo do značilnih tarčnih celic. Natančneje, celice lahko genetsko spremenimo, da proizvedejo in na površino ZV vgradijo določeno površinsko molekulo, ki jo prepoznajo značilne tarčne celice in privzamejo ZV (60). V ZV lahko tudi vgradimo terapevtska sredstva ali genetski material, ki so nato pred razgradnjo z DN-azami in RN-azami v telesnih tekočinah zaščiteni s fosfolipidnim dvo-slojem. Na osnovi omenjenih pristopov se razvijajo različni inovativni terapevtski pristopi, ob tem pa ostajajo izzivi v proizvodnji, izolaciji in kvantifikaciji ZV za terapevtske namene (144).

Mehanizmi delovanja ZV so bili analizirani na različnih modelih *in vitro*, med drugim tudi na modelu ledvičnih tubulnih epitelijskih in endotelnih celicah. V omenjenih celicah so dokazali, da iz njih sproščeni vezikli oz. njihov tovor zmanjšuje izražanje vnetnih molekul, spodbuja celično proliferacijo in zavira apoptozo (145). Na primeru raka mehurja so odkrili, da rakave celice mnogo pogosteje privzemajo ZV v primerjavi z nespremenjenimi oz. zdravimi celicami urotelija (144). V primeru led-

vične fibroze so zasnovali ZV iz mezenhimske matične celice s prekomerno izraženo miRNA let-7c, ki so po prevzemu v tarčne celice omilili ledvično poškodbo (146). Na modelu miši z akutno okvaro ledvic so dokazali proregerativne lastnosti urinskih ZV, in sicer je vnos slednjih omilil stopnjo poškodbe tkiv, spodbudil proliferacijo tubulnih celic ter preprečil aktivacijo provnetnih citokinov. Poročali so o močno zmanjšani vsebnosti dejavnika klotho v obolenih miših, nasprotno pa so po dodajanju urinskih ZV opazili izgradnjo dejavnika *de novo* in povrnitev njegove fiziološke ravni. Gre za dejavnik, ki ima v topni obliki dokazano protivnetno, antioksidativno in antifibrotično delovanje v ledvičnem tkivu (147). Vnos človeških eksosomov iz urina v podgane z DN je zavrl apoptozo podocitov in pospešil obnovo žil ter izboljšal preživetje celic (148). Pokazali so še, da vezikli iz ledvičnih mezenhimske matične celice vsebujejo mRNA-zapise žilnega endotelialnega rastnega dejavnika A (angl. *vascular endothelial growth factor A*, VEGF-A), inzulinu podobnega rastnega dejavnika 1 (angl. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1) in fibroblastnega rastnega dejavnika (angl. *fibroblast growth factor*, FGF), ki spodbujajo endotelne celice in tvorbo novih žil pri ishemičnih poškodbah ledvičnega tkiva (149). *In vitro* so pokazali, da vnos eksosomov regulatornih celic T povzroči zavoro proliferacije celic, *in vivo* pa ome-

njeni eksosomi zakasnjajo zavrnitveno reakcijo in s tem podaljšajo čas preživetja presadka v podganjem modelu presajene ledvice (150). ZV bi lahko tako v prihodnosti služili za zdravljenje raznolikih ledvičnih bolezni, vključno okvare presajene ledvice.

ZAKLJUČEK

S pričujočim preglednim prispevkom smo bralcem na primeru problematike zaznavanja okvare presajene ledvice želeli predstaviti ZV in njihovo možno klinično uporabo. V zadnjih letih je vse več raziskav, ki raziskujejo lastnosti ZV in njihovo patofiziološko vlogo pri različnih boleznih. Hkrati hitro narašča tudi število raziskav, v katerih že uveljavljene ugotovitve poskušajo prenesti v klinično prakso, kjer ZV obetajo kot možni biološki označevalci različnih bolezni, kot tarče za preprečevanje razvoja bolezni in celo kot dostavni sistem za zdravilne učinkovine. Zaradi širokega nabora možnih uporab ZV in vse več dokazov o njihovem pomenu pri etiopatogenezi različnih bolezni bo v prihodnje poznavanje tega področja vse pomembnejše tudi za strokovnjake različnih medicinskih strok.

ZAHVALA

Avtorji se lepo zahvaljujemo Maruši Puschner in asist. dr. Mariji Holcar za pomoč pri pripravi slik. Zahvaljujemo se tudi Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS za pomoč pri financiranju (P3-0323, P1-0170).

LITERATURA

1. Thomas R, Kanso A, Sedor JR. Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care*. 2008; 35 (2): 329–44.
2. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331 (6): 365–76.
3. Fiebiger W, Mitterbauer C, Oberbauer R. Health-related quality of life outcomes after kidney transplantation. *Health Qual Life Outcomes*. 2004; 2: 2.
4. Kidney transplants in 2020, by country, by donor type, by organ combination [internet]. Eurotransplant statistics library; c2021 [citirano 2021 Nov 8]. Dosegljivo na: <https://statistics.eurotransplant.org>
5. Kandus A, Ponikvar Buturovič J, Mlinšek G, et al. Kidney transplantation in Slovenia from 1970 to 2015. *Therap Aph Dia*. 2016; 20 (3): 229–33.
6. Coemans M, Süsal C, Döhler B, et al. Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int*. 2018; 94 (5): 964–73.
7. Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Pischke SE, Berger SP, et al. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: Relevant mechanisms in injury and repair. *J Clin Med*. 2020; 9 (1): 253.
8. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009; 9 Suppl 3: S1–155.
9. Rifle G, Mousson C, Martin L, et al. Donor-specific antibodies in allograft rejection: Clinical and experimental data. *Transplantation*. 2005; 79 Suppl 3: S14–8.
10. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: Current perspectives. *Transplantation*. 2012; 93 (1): 1–10.
11. Riella LV, Djarnali A, Pascual J. Chronic allograft injury: Mechanisms and potential treatment targets. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017; 31 (1): 1–9.
12. Barra JM, Tse HM. Redox-dependent inflammation in islet transplantation rejection. *Front Endocrinol*. 2018; 9: 175.
13. Haas M. Chronic allograft nephropathy or interstitial fibrosis and tubular atrophy: What is in a name? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014; 23 (3): 245–50.
14. Isoniemi HM, Krogerus L, von Willebrand E, et al. Histopathological findings in well-functioning, long-term renal allografts. *Kidney Int*. 1992; 41 (1): 155–60.
15. Granata S, Benedetti C, Gambaro G, et al. Kidney allograft fibrosis: What we learned from latest translational research studies. *J Nephrol*. 2020.
16. Serón D, Moreso F, Ramón JM, et al. Protocol renal allograft biopsies and the design of clinical trials aimed to prevent or treat chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2000; 69 (9): 1849–55.
17. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, et al. Establishing biomarkers in transplant medicine: A critical review of current approaches. *Transplantation*. 2016; 100 (10): 2024–38.
18. Menon MC, Murphy B, Heeger PS. Moving biomarkers toward clinical implementation in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (3): 735–47.
19. Roufousse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, et al. A 2018 reference guide to the banff classification of renal allograft pathology. *Transplantation*. 2018; 102 (11): 1795–814.
20. Murray PT, Mehta RL, Shaw A, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: Report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int*. 2014; 85 (3): 513–21.
21. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: A critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*. 2014; 51 Suppl 3: 335–51.
22. Peake PW, Pianta TJ, Succar L, et al. A comparison of the ability of levels of urinary biomarker proteins and exosomal mRNA to predict outcomes after renal transplantation. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e98644.
23. Hirt-Minkowski P, De Serres SA, Ho J. Developing renal allograft surveillance strategies – urinary biomarkers of cellular rejection. *Can J Kidney Health Dis*. 2015; 2: 28.
24. Hirt-Minkowski P, Amico P, Ho J, et al. Detection of clinical and subclinical tubulo-interstitial inflammation by the urinary CXCL10 chemokine in a real-life setting. *Am J Transplant*. 2012; 12 (7): 1811–23.
25. Hricik DE, Nickerson P, Formica RN, et al. Multicenter validation of urinary CXCL9 as a risk-stratifying biomarker for kidney transplant injury. *Am J Transplant*. 2013; 13 (10): 2634–44.
26. Rabant M, Amrouche L, Morin L, et al. Early low urinary CXCL9 and CXCL10 might predict immunological quiescence in clinically and histologically stable kidney recipients. *Am J Transplant*. 2016; 16 (6): 1868–81.
27. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, et al. Urinary-cell mRNA profile and acute cellular rejection in kidney allografts. *N Engl J Med*. 2013; 369 (1): 20–31.

28. Wilflingseder J, Regele H, Perco P, et al. MiRNA profiling discriminates types of rejection and injury in human renal allografts. *Transplantation*. 2013; 95 (6): 835–41.
29. Wilflingseder J, Sunzenauer J, Toronyi E, et al. Molecular pathogenesis of post-transplant acute kidney injury: Assessment of whole-genome mRNA and miRNA profiles. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e104164.
30. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (13): 5330–5.
31. Soltaninejad E, Nicknam MH, Nafar M, et al. Differential expression of microRNAs in renal transplant patients with acute t-cell mediated rejection. *Transpl Immunol*. 2015; 33 (1): 1–6.
32. Millán O, Budde K, Sommerer C, et al. Urinary miR-155-5p and CXCL10 as prognostic and predictive biomarkers of rejection, graft outcome and treatment response in kidney transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2017; 83 (12): 2636–50.
33. Zununi Vahed S, Omid Y, Ardalan M, et al. Dysregulation of urinary miR-21 and miR-200b associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA) in renal transplant recipients. *Clin Biochem*. 2017; 50 (1–2): 32–9.
34. Ben-Dov IZ, Muthukumar T, Morozov P, et al. MicroRNA sequence profiles of human kidney allografts with or without tubulointerstitial fibrosis. *Transplantation*. 2012; 94 (11): 1086–94.
35. Knight SR, Thorne A, Lo Faro ML. Donor-specific cell-free DNA as a biomarker in solid organ transplantation. A systematic review. *Transplantation*. 2019; 103 (2): 273–83.
36. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (7): 2221–32.
37. Whitlam JB, Ling L, Skene A, et al. Diagnostic application of kidney allograft-derived absolute cell-free DNA levels during transplant dysfunction. *Am J Transplant*. 2019; 19 (4): 1037–49.
38. García Moreira V, Prieto García B, Baltar Martín JM, et al. Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem*. 2009; 55 (11): 1958–66.
39. Deatherage BL, Cookson BT. Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun*. 2012; 80 (6): 1948–57.
40. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6 (3): 267–83.
41. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015; 4: 27066.
42. Macía L, Nanan R, Hosseini-Beheshti E, et al. Host- and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development. *Int J Mol Sci*. 2019; 21 (1): 107.
43. Simons M, Raposo G. Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21 (4): 575–81.
44. González E, Falcón-Pérez JM. Cell-derived extracellular vesicles as a platform to identify low-invasive disease biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015; 15 (7): 907–23.
45. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30 (1): 255–89.
46. Ferdin J, Lenassi M. Zunanajcelični vezikli in njihov klinični potencial. *Med Razgl*. 2016; 55 (1): 63–82.
47. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7 (1): 1535750.
48. Matsumoto Y, Kano M, Akutsu Y, et al. Quantification of plasma exosome is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2016; 36 (5): 2535–43.
49. Fang S, Tian H, Li X, et al. Clinical application of a microfluidic chip for immunocapture and quantification of circulating exosomes to assist breast cancer diagnosis and molecular classification. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0175050.
50. Sinning JM, Losch J, Walenta K, et al. Circulating CD31+/annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*. 2011; 32 (16): 2034–41.
51. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost*. 2006; 95 (1): 94–9.
52. Zhang W, Peng P, Kuang Y, et al. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. *Tumour Biol*. 2016; 37 (3): 4213–21.

53. Yang JS, Lee JC, Byeon SK, et al. Size dependent lipidomic analysis of urinary exosomes from patients with prostate cancer by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2017; 89 (4): 2488–96.
54. Navarro-Tableros V, Gomez Y, Camussi G, et al. Extracellular vesicles: New players in lymphomas. *Int J Mol Sci.* 2018; 20 (1): 41.
55. Badovinac D, Goričar K, Zavrtnik H, et al. Plasma extracellular vesicle characteristics correlate with tumor differentiation and predict overall survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma undergoing surgery with curative intent. *J Pers Med.* 2021; 11 (2): 77.
56. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, et al. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012; 64 (3): 676–705.
57. Midekessa G, Godakumara K, Ord J, et al. Zeta potential of extracellular vesicles: Toward understanding the attributes that determine colloidal stability. *ACS Omega.* 2020; 5 (27): 16701–10.
58. Yokota S, Kuramochi H, Okubo K, et al. Extracellular vesicles nanoarray technology: Immobilization of individual extracellular vesicles on nanopatterned polyethylene glycol-lipid conjugate brushes. *PLoS One.* 2019; 14 (10): e0224091.
59. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: Biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36 (3): 301–12.
60. Ståhl AL, Johansson K, Mossberg M, et al. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 2019; 34 (1): 11–30.
61. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, et al. Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10 (12): e1001450.
62. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016; 428 (4): 688–92.
63. Kim DK, Kang B, Kim OY, et al. EVpedia: An integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2.
64. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19 (4): 213–28.
65. Vasconcelos MH, Caires HR, Âbols A, et al. Extracellular vesicles as a novel source of biomarkers in liquid biopsies for monitoring cancer progression and drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2019; 47: 100647.
66. Ageta H, Tsuchida K. Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs. *Cell Mol Life Sci.* 2019; 76 (24): 4829–48.
67. Skotland T, Sagini K, Sandvig K, et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020; 159: 308–21.
68. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Böttcher A, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion.* 2015; 55 (3): 507–21.
69. Skotland T, Krokos K, Kauhanen D, et al. Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *Eur J Cancer.* 2017; 70: 122–32.
70. Zebrowska A, Skowronek A, Wojakowska A, et al. Metabolome of exosomes: Focus on vesicles released by cancer cells and present in human body fluids. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (14): 3461.
71. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9 (6): 654–9.
72. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009; 11 (9): 1143–9.
73. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008; 319 (5867): 1244–7.
74. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep.* 2014; 8 (6): 1649–58.
75. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol.* 2012; 14 (3): 249–56.
76. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood.* 2012; 119 (3): 756–66.
77. Kim KM, Abdelmohsen K, Mustapic M, et al. RNA in extracellular vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2017; 8 (4): 10.
78. Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, et al. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. *Front Immunol.* 2016; 7: 335.

79. Malkin EZ, Bratman SV. Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. *Cell Death Dis.* 2020; 11 (7): 584.
80. Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, et al. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem.* 2014; 289 (7): 3869–75.
81. Vagner T, Spinelli C, Minciacci VR, et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *J Extracell Vesicles.* 2018; 7 (1): 1505403.
82. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014; 24 (6): 766–9.
83. Holmgren L, Szeles A, Rajnavölgyi E, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood.* 1999; 93 (11): 3956–63.
84. Cai J, Han Y, Ren H, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol.* 2013; 5 (4): 227–38.
85. Sato S, Zhu XL, Sly WS. Carbonic anhydrase isozymes IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87 (16): 6073–6.
86. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101 (36): 13368–73.
87. Fernández-Llama P, Khositseth S, Gonzales PA, et al. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* 2010; 77 (8): 736–42.
88. Pomatto MAC, Gai C, Bussolati B, et al. Extracellular vesicles in renal pathophysiology. *Front Mol Biosci.* 2017; 4: 37.
89. Turco AE, Lam W, Rule AD, et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. *J Extracell Vesicles.* 2016; 5: 29642.
90. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, et al. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20 (2): 363–79.
91. Dimov I, Jankovic Velickovic L, Stefanovic V. Urinary exosomes. *ScientificWorldJournal.* 2009; 9: 1107–18.
92. Bijnsdorp IV, Maxouri O, Kardar A, et al. Feasibility of urinary extracellular vesicle proteome profiling using a robust and simple, clinically applicable isolation method. *J Extracell Vesicles.* 2017; 6 (1): 1313091.
93. Merchant ML, Rood IM, Deegens JKJ, et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13 (12): 731–49.
94. Gerlach JQ, Krüger A, Gallogly S, et al. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e74801.
95. Saraswat M, Joenväära S, Musante L, et al. N-linked (N-) glycoproteomics of urinary exosomes. [Corrected]. *Mol Cell Proteomics.* 2015; 14 (2): 263–76.
96. Everaert C, Helmoortel H, Decock A, et al. Performance assessment of total RNA sequencing of human biofluids and extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 17574.
97. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, et al. Non-coding RNAs: Regulators of disease. *J Pathol.* 2010; 220 (2): 126–39.
98. Miranda KC, Bond DT, Levin JZ, et al. Massively parallel sequencing of human urinary exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e96094.
99. Cheng L, Sun X, Scicluna BJ, et al. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int.* 2014; 86 (2): 433–44.
100. Elzanowska J, Semira C, Costa-Silva B. DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects. *Mol Oncol.* 2021; 15 (6): 1701–14.
101. Lee DH, Yoon H, Park S, et al. Urinary exosomal and cell-free DNA detects somatic mutation and copy number alteration in urothelial carcinoma of bladder. *Sci Rep.* 2018; 8 (1): 14707.
102. Rigalli JP, Barros ER, Sommers V, et al. Novel aspects of extracellular vesicles in the regulation of renal physiological and pathophysiological processes. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 244.
103. Gildea JJ, Seaton JE, Victor KG, et al. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells. *Clin Biochem.* 2014; 47 (15): 89–94.
104. Bruno S, Porta S, Bussolati B. Extracellular vesicles in renal tissue damage and regeneration. *Eur J Pharmacol.* 2016; 790: 83–91.
105. Street JM, Birkhoff W, Menzies RI, et al. Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells. *J Physiol.* 2011; 589 (24): 6119–27.
106. Jella KK, Yu L, Yue Q, et al. Exosomal GAPDH from proximal tubule cells regulate ENaC activity. *PLoS One.* 2016; 11 (11): e0165763.

107. Chiabotto G, Bruno S, Collino F, et al. Mesenchymal stromal cells epithelial transition induced by renal tubular cells-derived extracellular vesicles. *PLoS One*. 2016; 11 (7): e0159163.
108. Wu XM, Gao YB, Cui FQ, et al. Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells to promote renal fibrosis. *Biol Open*. 2016; 5 (4): 484–91.
109. Zhu QJ, Zhu M, Xu XX, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate glomerular mesangial cells via TGF- β 1/Smad3 pathway *in vivo* and *in vitro*. *Faseb J*. 2019; 33 (8): 9279–90.
110. Xia Y, Zhang Q, Zhen Q, et al. Negative regulation of tumor-infiltrating NK cell in clear cell renal cell carcinoma patients through the exosomal pathway. *Oncotarget*. 2017; 8 (23): 37783–95.
111. Wang L, Yang G, Zhao D, et al. CD103-positive CSC exosome promotes EMT of clear cell renal cell carcinoma: Role of remote MiR-19b-3p. *Mol Cancer*. 2019; 18 (1): 86.
112. Zhang G, Zou X, Huang Y, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles protect against acute kidney injury through anti-oxidation by enhancing Nrf2/ARE activation in rats. *Kidney Blood Press Res*. 2016; 41 (2): 119–28.
113. Dominguez JH, Liu Y, Gao H, et al. Renal tubular cell-derived extracellular vesicles accelerate the recovery of established renal ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (12): 3533–44.
114. Dominguez JM 2nd, Dominguez JH, Xie D, et al. Human extracellular microvesicles from renal tubules reverse kidney ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS One*. 2018; 13 (8): e0202550.
115. Shen B, Liu J, Zhang F, et al. CCR2 positive exosome released by mesenchymal stem cells suppresses macrophage functions and alleviates ischemia/reperfusion-induced renal injury. *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 1240301.
116. King HW, Michael MZ, Gleadle JM. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012; 12: 421.
117. Kucharzewska P, Belting M. Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumor cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles*. 2013; 2.
118. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, et al. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407 (12): 3285–301.
119. Bryzgunova OE, Laktionov PP. Extracellular nucleic acids in urine: Sources, structure, diagnostic potential. *Acta Naturae*. 2015; 7 (3): 48–54.
120. Raab WP. Enzymes and isoenzymes in urine. *Curr Probl Clin Biochem*. 1968; 2: 17–83.
121. Roy S, Hochberg FH, Jones PS. Extracellular vesicles: The growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *J Extracell Vesicles*. 2018; 7 (1): 1438720.
122. Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016; 5: 32945.
123. Park J, Lin HY, Assaker JP, et al. Integrated kidney exosome analysis for the detection of kidney transplant rejection. *ACS Nano*. 2017; 11 (11): 11041–6.
124. Dimuccio V, Ranghino A, Praticò Barbato L, et al. Urinary CD133+ extracellular vesicles are decreased in kidney transplanted patients with slow graft function and vascular damage. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e104490.
125. Alvarez S, Suazo C, Boltansky A, et al. Urinary exosomes as a source of kidney dysfunction biomarker in renal transplantation. *Transplant Proc*. 2013; 45 (10): 3719–23.
126. Sonoda H, Yokota-Ikeda N, Oshikawa S, et al. Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297 (4): F1006–16.
127. El Fekih R, Hurley J, Tadigotla V, et al. Discovery and validation of a urinary exosome mRNA signature for the diagnosis of human kidney transplant rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2021; 32 (2): 994–1004.
128. Lim JH, Lee CH, Kim KY, et al. Novel urinary exosomal biomarkers of acute T cell-mediated rejection in kidney transplant recipients: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2018; 13 (9): e0204204.
129. Sigdel T, Dinh V, Vitalone M, et al. Identification of transplant injury specific metabolites in the kidney transplant urine by metabolomics.: Abstract# A497. *Transplantation*. 2014; 98: 884–5.
130. Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, et al. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med*. 1995; 332 (23): 1540–5.
131. Lytvyn Y, Xiao F, Kennedy CR, et al. Assessment of urinary microparticles in normotensive patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017; 60 (3): 581–4.
132. Barutta F, Tricarico M, Corbelli A, et al. Urinary exosomal microRNAs in incipient diabetic nephropathy. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e73798.
133. Zubiri I, Posada-Ayala M, Sanz-Maroto A, et al. Diabetic nephropathy induces changes in the proteome of human urinary exosomes as revealed by label-free comparative analysis. *J Proteomics*. 2014; 96: 92–102.

134. Zhou H, Kajiyama H, Tsuji T, et al. Urinary exosomal Wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305 (4): F553–9.
135. Abe H, Sakurai A, Ono H, et al. Urinary exosomal mRNA of WT1 as diagnostic and prognostic biomarker for diabetic nephropathy. *J Med Invest*. 2018; 65 (3.4): 208–15.
136. du Cheyron D, Daubin C, Poggioli J, et al. Urinary measurement of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubule injury in critically ill patients with ARF. *Am J Kidney Dis*. 2003; 42 (3): 497–506.
137. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A, et al. Exosomal fetuin-a identified by proteomics: A novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int*. 2006; 70 (10): 1847–57.
138. Zhou H, Cheruvanky A, Hu X, et al. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. *Kidney Int*. 2008; 74 (5): 613–21.
139. Pocsfalvi G, Raj DAA, Fiume I, et al. Urinary extracellular vesicles as reservoirs of altered proteins during the pathogenesis of polycystic kidney disease. *Proteomics Clin Appl*. 2015; 9 (5–6): 552–67.
140. Salih M, Demmers JA, Bezstarosti K, et al. Proteomics of urinary vesicles links plakins and complement to polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27 (10): 3079–92.
141. Hogan MC, Bakeberg JL, Gainullin VG, et al. Identification of biomarkers for PKD1 using urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26 (7): 1661–70.
142. Bourderioux M, Nguyen-Khoa T, Chhuon C, et al. A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. *J Proteome Res*. 2015; 14 (1): 567–77.
143. Morikawa Y, Takahashi N, Kamiyama K, et al. Elevated levels of urinary extracellular vesicle fibroblast-specific protein 1 in patients with active crescentic glomerulonephritis. *Nephron*. 2019; 141 (3): 177–87.
144. Lv LL, Wu WJ, Feng Y, et al. Therapeutic application of extracellular vesicles in kidney disease: Promises and challenges. *J Cell Mol Med*. 2018; 22 (2): 728–37.
145. Rovira J, Diekmann F, Campistol JM, et al. Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. *Nefrologia*. 2017; 37 (2): 126–37.
146. Greco KA, Franzen CA, Foreman KE, et al. PLK-1 silencing in bladder cancer by siRNA delivered with exosomes. *Urology*. 2016; 91: 241.e1–7.
147. Wang B, Yao K, Huuskos BM, et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous microRNA-let7c via exosomes to attenuate renal fibrosis. *Mol Ther*. 2016; 24 (7): 1290–301.
148. Grange C, Papadimitriou E, Dimuccio V, et al. Urinary extracellular vesicles carrying klotho improve the recovery of renal function in an acute tubular injury model. *Mol Ther*. 2020; 28 (2): 490–502.
149. Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type 1 diabetes in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: 24.
150. Yu X, Huang C, Song B, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells-derived exosomes prolonged kidney allograft survival in a rat model. *Cell Immunol*. 2013; 285 (1–2): 62–8.