

# Izvanstanične vezikule u terapiji neurodegenerativnih bolesti

## Extracellular Vesicles in Therapy of Neurodegenerative Diseases

Marin Tota\*

**Sažetak.** Potpuni gubitak ili disfunkcija neurona glavna su obilježja neurodegenerativnih bolesti, koje uključuju Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu, Huntingtonovu bolest i druge. Trenutačno ne postoje mogućnosti potpunog zaustavljanja ili preokretanja tijeka ovih bolesti te je postojeća terapija većinom simptomatska. No, u zadnje se vrijeme pojavljuju nove terapijske platforme bazirane na izvanstaničnim vezikulama. Izvanstanične vezikule su prirodne nanotvorenine svih stanica te su vrlo perspektivne u terapiji neurodegenerativnih bolesti zbog svoje male imunogenosti, ciljanih djelovanja na stanice te mogućnosti lakog prolaska tjelesnih barijera uključujući i krvno-moždanu barijeru. One transportiraju svoj teret izravno do neurona, astrocita ili glijanica, a to uključuje lijekove, proteine, mikroRNA i male interferirajuće RNA. Nadalje, njihova se površina može modificirati kako bi se poboljšala dostava u područja mozga zahvaćena neurodegeneracijom. Postojeća preklinička istraživanja pokazala su da tretmani putem izvanstaničnih vezikula utječu na preživljavanje neurona, smanjuju agregaciju proteina te moduliraju neuroinflamaciju. Međutim, u smislu kliničke translacije postavljaju se neka pitanja poput efikasnosti ubacivanja malih molekula u izvanstanične vezikule ili njihove dugoročne sigurnosti. Zaključno, izvanstanične vezikule predstavljaju novi, revolucionarni terapijski pristup u kompleksnoj patofiziologiji neurodegenerativnih bolesti.

**Ključne riječi:** ciljana terapija, dostava lijekova, izvanstanične vezikule, neurodegenerativne bolesti

**Abstract.** The complete loss or dysfunction of neurons is the main feature of neurodegenerative diseases, which include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, and some others. At present, there are no available options to completely stop or reverse the progression of these diseases, and current therapies are mainly symptomatic. However, recently new therapeutic platforms based on extracellular vesicles have emerged. Extracellular vesicles are natural nanovesicles produced by all cells and are very promising in the therapy of neurodegenerative diseases due to their low immunogenicity, targeted actions on cells, and the ability to easily cross bodily barriers, including the blood-brain barrier. They transport their cargo directly to neurons, astrocytes, and glial cells, which may include drugs, proteins, microRNAs, and small interfering RNAs. Furthermore, their surface can be modified to enhance the delivery to specific areas of the brain affected by neurodegeneration. Preclinical studies have demonstrated that treatments using extracellular vesicles enhance neuron survival, reduce protein aggregation, and modulate neuroinflammation. However, in terms of clinical translation, some questions arise regarding the efficacy of introducing small molecules into extracellular vesicles or their long-term safety. In conclusion, extracellular vesicles represent a new, revolutionary therapeutic approach within the complex pathophysiology of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** drug delivery systems; extracellular vesicles; molecular targeted therapy; neurodegenerative diseases

Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet,  
Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju i  
kliničku kemiju, Rijeka, Hrvatska

**\*Dopisni autor:**

Izv. prof. dr. sc. Marin Tota  
Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet,  
Zavod za medicinsku kemiju, biokemiju i  
kliničku kemiju  
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka, Hrvatska  
E-mail: marin\_tota@hotmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Izvanstanične vezikule (IV) sve se više promatraju u smjeru njihove moguće terapijske uloge. Uz to, neizostavna je njihova uloga u dijagnostici različitih bolesti<sup>1</sup> i u regenerativnoj medicini<sup>2</sup>. Radi se zapravo o tvorevinama okruženim lipidnim dvo-slojem koje se luče iz gotovo svih stanica, a mogu prenositi različite vrste molekula<sup>3</sup>. Izlučivanje IV-a putem stanica događa se u fiziološkim i patološkim stanjima te ih nalazimo u svim biološki važnim tekućinama poput krvi, likvora i urina, primjerice<sup>4</sup>.

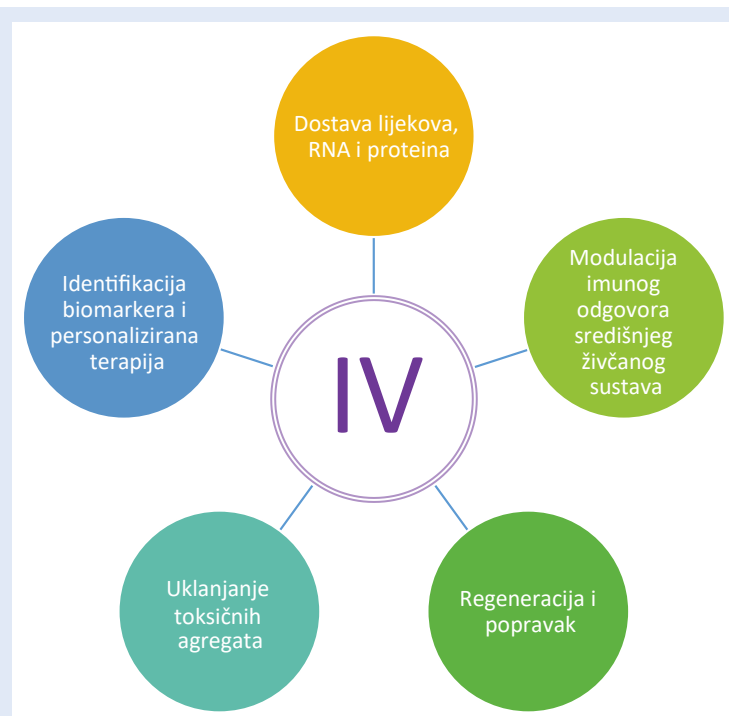
Fiziološki gledano, IV imaju neizostavnu ulogu u uklanjanju staničnog otpada te održavanju homeostaze tkiva jer se stanice na taj način rješavaju suvišnih proteina, ili pak toksina. Ova je činjenica posebno značajna u neurodegenerativnim bolestima (ND) gdje IV mogu ukloniti patološke agregate

Izvanstanične vezikule donose veliku nadu u liječenju neurodegenerativnih bolesti isporukom lijekova preko krvno-moždane barijere u zahvaćene dijelove živčanog sustava.

proteina poput amiloid-beta ( $A\beta$ ) i alfa-sinukleina (aSyn)<sup>5</sup>. Nadalje, izvanstanične vezikule važne su u razvoju živčanog tkiva jer prenose proteine i RNA molekule ključne za pravilan rad sinapsi, a posljedično i pamćenja, učenja, odnosno cjelokupnog odgovora na vanjske podražaje. Ono što je fascinantno, jest da IV mogu prelaziti različite barijere, uključujući krvno-moždanu barijeru (BBB), omogućujući tako prijenos signalnih molekula kroz cijeli organizam<sup>6</sup>. Signalne molekule unutar IV-a omogućavaju komunikaciju središnjeg živčanog sustava i periferije, što je ključno za postizanje neurološke homeostaze<sup>7</sup>. Tako primjerice molekule tipa mikroRNA (miRNA) mogu regulirati genski izražaj u ciljnim stanicama<sup>8</sup>. S druge strane, IV imaju imunomodulatornu ulogu<sup>9</sup>. Izvanstanične vezikule nastale iz T-stanica pospješuju imunološki odgovor, dok one koje luče tumorske stanice mogu djelovati imunosupresivno. Izvanstanične vezikule odgovorne su i u procesu angiogeneze<sup>10</sup> jer prenose molekule poput vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF)<sup>11</sup>.

Osim u neurodegenerativnim bolestima<sup>12-14</sup>, neizostavna je njihova uloga u razvoju tumora<sup>15</sup>, kardiovaskularnim<sup>16</sup>, infektivnim<sup>17</sup> i kroničnim upalnim bolestima<sup>18</sup>. Kod tumora se IV zapravo smatraju „onkosomima“ jer prenose onkogene proteine i RNA molekule te olakšavaju metastaziranje stvaranjem premetastatskih niša<sup>19</sup>. Prenošenjem integrina i različitih proteaza promoviraju adheziju i invaziju tumorskih stanica na sekundarne lokacije. Pri razvoju kardiovaskularnih bolesti pridonose aterosklerozi, trombozi i općenitoj disfunkciji endotela. Nadalje, IV mogu pogodovati napredovanju zaraznih bolesti jer mogu prenositi virusne proteine ili RNA, no i spojeve poput lipopolisaharida (LPS) koji aktiviraju imunostni sustav. Kod kroničnih upalnih bolesti prenose proupalne citokine i enzime, čime se pojačava kronična upala.

Zaključno, IV su ključni dijelovi međustanične komunikacije i homeostaze, ali i kaskade brojnih patoloških procesa. Razumijevanje njihove uloge u ovim procesima neizmjerljivo je važno kako bi se razvile nove terapijske strategije koje će ciljati samo stvaranje IV-a, koristiti njihove intrinzične prednosti ili će ih koristiti u smislu dostave određenih ljekovitih/signalnih tvari. Na Slici 1 vidljive su najvažnije uloge IV-a u terapijskom pristupu neurodegenerativnim bolestima.



**Slika 1.** Ključne uloge izvanstaničnih vezikula (IV) u terapiji neurodegenerativnih bolesti

## IZVANSTANIČNE VEZIKULE U TERAPIJI NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI

Broj ljudi oboljelih od ND-a mjeri se u milijunima. Takva stanja povezana su sa stalnim propadanjem neurona, ali i cijele neuralne mreže. Rezultat ovakvih stanja su problemi s kretanjem, mentalnom funkcijom i pamćenjem te govorom i disanjem. Zajednička crta ND-a je kompleksna patofiziologija koja uključuje neuroinflamaciju, oksidativni stres i agregaciju toksičnih proteina. Dva su najčešća tipa, i to Alzheimerova bolest (AD) i Parkinsonova bolest (PD), a možemo tu još priključiti Huntingtonovu bolest (HD), amiotrofičnu lateralnu sklerozu (ALS) i neke druge. Također se u sličnom kontekstu može razmatrati i glioblastom (GBM), jedna od najagresivnijih vrsta tumora središnjeg živčanog sustava. Ipak, usprkos brojnim istraživanjima, ne postoje odgovarajući oblici učinkovite terapije ovih bolesti. Također, liječenje je većinom simptomatsko, tj. za sada ne zadire u same mehanizme bolesti. No, u zadnje vrijeme sve više pažnje posvećuje izvanstaničnim vezikulama kao mogućim kandidatima za nove terapijske opcije neurodegenerativnih poremećaja<sup>1</sup>.

Izvanstanične vezikule sudjeluju u staničnoj komunikaciji te su važne u neurološkoj homeostazi, ali poznato je i da imaju ulogu u nastanku neurodegenerativnih poremećaja. Vrlo su stabilne te mogu promovirati ili inhibirati razvoj ND-a ovisno o teretu koje nose, čime postaju vrlo interesantan terapijski alat. U cilju dostave lijekova mogu se koristiti nativni egzozomi, jedna od najčešće korištenih klasa IV-a u istraživanjima općenito, ili se pak njihova površina može modificirati različitim molekulama u svrhu ciljane dostave na točno određeno mjesto terapije.

Veliki broj dosad objavljenih radova pokazao je značajnu ulogu egzozoma u tretmanu ND-a. Primjerice, nativni egzozomi mogu se koristiti za dostavu kurkumina koji posjeduje protuupalno, antimikrobno, ali i neuroprotektivno djelovanje<sup>20</sup>. Čest je problem otežano ubacivanje lijekova u IV nakon postupka njihove izolacije te se u tom smislu razmatrala metoda korištenja vezanja hidrofilnih liganada na membranski kolesterol ili njihova direktna adsorpcija ako su hidrofobne građe. Kurkumin se agregirao na IV u gustoći molekula

$10^6$ – $10^7$  direktnom adsorpcijom, dok se kod druge metode vezao na IV u gustoći molekula  $10^4$ – $10^5$ . Obje su metode uspješno inkorporirale kurkumin u IV, ali se moralo paziti na stabilnost i koncentraciju potencijalnog inkorporiranog spoja unutar izvanstaničnih vezikula kako bi one bile terapijski učinkovite<sup>21</sup>. Autori su zaključili da su potrebne dodatne optimizacije za uvjete *in vivo*.

Za uspješnu dopremu IV-a do mikroglia-stanica mogu se koristiti egzozomi koji nose kurkumin (*Exo-cur*) putem intranazalne, neinvazivne administracije. U modelima upale mozga inducirane lipopolisaharidom, eksperimentalnog encefalomijelitisa i GL26 tumorskog modela koji prezentira glioblastom, *Exo-cur* je inducirao apoptozu na mikroglia-stanicama uz smanjenje upale, odnosno pridonio je terapijskom učinku<sup>22</sup>.

Tijekom ubacivanja lijekova u IV javlja se problem potencijalnog oštećenja njihove membrane. U svrhu nalaženja optimalne metode ubacivanja doksorubicina u IV istraživano je šest različitih postupaka: koinkubacija, elektroporacija, ekstruzija, smrzanje, sonifikacija te metoda koja koristi površinski aktivne tvari<sup>23</sup>. Metode koinkubacije i elektroporacije imale su najveću koncentraciju doksorubicina po IV-u te su bile i najviše funkcionalne izazvajući jaču apoptozu u odnosu na ostale. Metode ekstruzije i sonifikacije negativno su utjecale na integritet membrane te posljedično i na terapijsku učinkovitost<sup>24</sup>.

## IV U TERAPIJI ALZHEIMEROVE BOLESTI

U studiji koja je istraživala prekid međudjelovanja proteina prekursora amiloida-beta (APP) i proteina Fe65 korištene su HT22 hipokampalne živčane stanice miševa za stvaranje egzozoma koji bi se ciljano dopremali u živčane stanice s povećanim izražajem APP-a. Inače se pretjerana ekspresija APP-a te njegovo međudjelovanje s proteinom Fe65 povezuje s patogeneom Alzheimerove bolesti (AD). Navedeni egzozomi stanica HT22 modificirani su da imaju povišen sadržaj proteina Fe65 te je u njih ubačen i korinoksin-B za koji je poznato da potiče autofagiju. Autofagijom se razgrađuju brojni proteini skloni agregaciji, pa se u tom smislu i razmatra metodom terapije za AD. Ovako pripremljeni Fe65-modificirani egzozomi donose korinoksin-B do neurona koji imaju povećan izražaj

APP-a te posljedično smanjuju kognitivnu degradaciju i razvoj AD-a u miševa<sup>25, 26</sup>. Različite vrste egzozoma nastalih iz matičnih stanica mogu se koristiti u terapiji AD-a, a dio je već u fazi kliničkih istraživanja<sup>27</sup>. Primjerice, mezenhimalne matične stanice imaju protuupalni i imunomodulatorni učinak, u principu uključuju interakciju s amiloidom-beta (Ab) smanjujući njegov izražaj<sup>28</sup>.

U studiji koja je koristila IV iz ljudske plazme (pIV) istražen je potencijal IV-a za prijenos lijekova koji imaju protuupalna i antioksidativna svojstva. Konkretno se ovdje koristio donepezil (DNZ). Izvanstanične vezikule iz ljudske plazme specifično su odlazile u moždano tkivo, i to bez toksičnih učinaka. Znatno su smanjile razinu slobodnih radikala te omogućile kombinirani neuroprotektivni i protuupalni učinak DNZ-a. Također, studija napominje da su potrebna dodatna istraživanja i klinička ispitivanja te skaliranje sustava za širu terapijsku uporabu za AD<sup>29</sup>.

Sljedeća studija po prvi je put pokazala da izvanstanične vezikule nastale iz živčanih stanica (hiPSC-NSC-IV) mogu modificirati tijekom AD-a. Navedene izvanstanične vezikule inkorporiraju se u mikrogliju, smanjuju izražaj gena povezanih s aktivacijom NLRP3 inflammasoma i IFN-1. Mikroglija je zadržala fagocitnu funkciju. Također je došlo do smanjenog izražaja gena vezanih za IFN-1 i interleukin-6 (IL-6) te smanjene hipertrofije astrocita u hipokampusu. Neuropatološki gledano, smanjeno je stvaranje amiloidnih plakova te je smanjena fosforilacija proteina tau u hipokampusu. Izvanstanične vezikule nastale iz živčanih stanica bile su primijenjene intranazalno, odnosno nude novu, neinvazivnu metodu terapije AD-a koja ima za cilj modulaciju transkriptoma astrocita i mikroglije<sup>30</sup>.

Umjetno stvorene ili modificirane vezikule mogu prenositi male interferirajuće molekule RNA (siRNA), lijekove, imunomodulatore, mogu lako prolaziti različite barijere u organizmu te ne izazivaju imunološki odgovor. Na taj način postaju odlični kandidati za terapiju ND-a.

Posebom pripremom, odnosno modifikacijom IV mogu postati platforme za dostavu lijekova. Takve modificirane izvanstanične vezikule smanjuju rizik od imunog odgovora domaćina, lako prolaze BBB te dostavljaju lijek direktno u CNS. Mjesto dostave može se i dodatno prilagoditi modificira-

njem površine izvanstaničnih vezikula kako bi one za metu imale točno određene stanice. Modificirane izvanstanične vezikule prenose lijekove, molekule RNA i DNA i peptide. Primjerice, IV nastali iz M2 mikroglije (M2-IV) imaju funkcionaliziranu površinu putem peptida RVG29 baziranog na polidopaminu (PDA) koji cilja neurone. Također, dodatak fluorescentnih boja, radioaktivnog joda,<sup>125I</sup> te superparamagnetičnog željezovog oksida omogućavao je vizualizaciju IV-a u realnom vremenu i na nivou cijelog organizma. Na ovaj način stvorena je platforma za dodatak različitih funkcionalnih jedinica na površinu IV-a te njihovo korištenje u kliničkom, odnosno terapijskom smislu. Modificirane izvanstanične vezikule ciljano su dolazile u mozak miševa zahvaćen moždanim udarom, a sve se moglo lako pratiti metodama dinamičke vizualizacije. U istoj studiji vidjelo se da se IV arterijskim putem nakupljaju u mozgu, a sami M2-IV pokazali su neuroprotektivni učinak putem miR-221-3p i miR-423-3p preko p38/ERK apoptotskog puta<sup>31</sup>. Slično je pokazano i u studijama gdje je pokazana neuroprotektivna uloga miR-423-3p i miR-532-5p prilikom apoptoze inducirane hipoksijom. Još je jedan sličan primjer RVG-om modificirana površina malih IV-a korištenih za dostavu siRNA kod miševa. Ovako modificirane izvanstanične vezikule nakupljale su se u mozgovima AG6 miševa i sprječavale vertikalnu transmisiju virusa zika. Modificirane izvanstanične vezikule prolazile su placentarnu i BBB barijeru i smanjile infekciju u mozgu fetusa. Također, iste izvanstanične vezikule smanjile su upalu i neurološko oštećenje miševa<sup>32</sup>. Jedan od pionirskih radova koji je koristio peptid RVG po prvi je put pokazao mogućnost uporabe IV-a za dostavu lijekova. U tom su se radu koristili nedozreli dendriti za izolaciju IV-a zbog smanjene imunogenosti. Dendriti su modificirani da pokazuju izražaj Lamp2b membranskog proteina koji je vezan na RVG kako bi se ciljalo dostava prema neuronima. Izvanstanične vezikule nosile su molekulu siRNA koja se ubacila metodom elektroporacije. Molekula GAPDH siRNA inaktivirala je specifične gene u neuronima, mikrogliji i dendritima. Također je značajno smanjen izražaj glasnčkog RNA (mRNA) i proteina koristeći BACE siRNA. Smanjen izražaj BACE1 potencijalno će smanjiti koncentraciju Ab kod AD-a<sup>33</sup>.

Modifikacija IV-a RVG-om koristi se i za dostavu mikro-RNA (miRNA), mRNA, kružnog RNA i proteina.

#### IV U TERAPIJI PARKINSONOVE BOLESTI

Ako pogledamo mogućnosti IV-a za dostavu lijekova kod Parkinsonove bolesti, dolazimo do sličnih saznanja. U radu koji je koristio IV mezenhimalnih matičnih stanica (MSC) s kurkuminom, ispitivana je mogućnost nove vrste terapije za PD. U tu se svrhu koristio poseban nanonosač koji se koristio intranazalno. Korištenjem ovog nosača smanjeno je nastajanje agregata alfa-sinukleina (aSyn). Također se poboljšala funkcija i preživljavanje neurona. Kurkumin i MSC pridonijeli su smanjenju neuroinflamacije karakteristične za PD. Ovo se postiglo djelovanjem kurkumina na proupalne citokine i slobodne radikale te samim izvanstaničnim vezikulama koje promoviraju protuupalnu sredinu u mozgu. U mišjem je modelu isti nosač značajno poboljšao kretanje i koordinaciju dajući dobre osnove funkcionalnih prednosti ovakve terapije<sup>34</sup>.

Važno je reći da se izvanstanične vezikule iz mezenhimalnih matičnih stanica (MSC-IV) mogu koristiti kod različitih vrsta patologija mozga. Mogu se koristiti kod moždanog udara, autizma te kod AD-a i PD-a. Perets i suradnici istraživali su MSC-IV obilježene nanočesticama zlata u cilju njihova boljeg praćenja metodom računalne tomografije (CT). Same izvanstanične vezikule bile su davane intranazalno kako bi se zaobišla BBB barijera, a praćene su tijekom 96 sati nakon administracije u patološkim i zdravim mišjim modelima. MSC-IV nakupljale su se u patološki relevantnim područjima mozga te je njihovo zadržavanje bilo značajno 96 sati nakon primjene. Također su se unosile pretežno u neurone, a zanemarivo u mikrogilju i astrocite. Kod zdrave, kontrolne skupine miševa MSC-IV uklanjale su se već nakon 24 sata pokazujući minimalno zadržavanje u mozgu u odsustvu patoloških signala. Kod PD-a su se MSC-IV nakupljale u regiji *substantia nigra* u kojoj se događa karakterističan gubitak dopaminergičkih neurona. Slično je i kod AD-a gdje se one nakupljaju u hipokampusu i korteksu, tj. područjima nakupljanja amiloidnih plakova te izraženije neuroinflamacije<sup>35</sup>. Općenito je ova studija potvrdila

uporabu izvanstaničnih vezikula iz mezenhimalnih matičnih stanica kod bolesti gdje se traži njihova dostava u područje neuroinflamacije. Svakako bi bilo dobro probati koristiti modificirane izvanstanične vezikule za ciljano nakupljanje, proširiti modele koristeći veće životinje te probati dići razinu cijelog modela za korištenje u kliničkim istraživanjima. Kombinacijom s CT metodom dobiva se uvid u njihovu raspodjelu i učinkovitost u realnom vremenu.

Jedna jako interesantna nova metoda terapije PD-a povezuje uporabu IV-a s epigenetskom regulacijom pomoću platforme CRISPR (engl. *Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats*). Ključni protein u razvoju PD-a jest aSyn koji kodira gen SNCA. Promjena u metilaciji SNCA primijećena je u patologiji PD-a te se ispituje njezina potencijalna uloga u smislu terapije PD-a. U tu su svrhu korišteni modificirani egzosomi koji nose peptid RVG, sgRNA te dCas9-DNMT3A fuzijski protein, sve skupa u RVG-CRISPRi-IV vezikulama. Pomoću peptida RVG izvanstanične vezikule vežu se na neurone preko acetilkolinških receptora, a sgRNA je posebno dizajniran da veže CpG mjesta na genu SNCA. Fuzijski protein omogućava metilaciju DNA bez cijepanja te precizno epigenetsko editiranje SNCA. RVG-CRISPRi-IV značajno su pridonijele motoričkim sposobnostima i koordinaciji te smanjile količine transkripata SNCA i aSyn u mozgu te usporile razvoj PD-a<sup>36</sup>. Ova metoda prikaz je mogućnosti fino reguliranog genskog izražaja putem epigenetike, a bez rizika permanentne genetske modifikacije. Također, direktno se utječe na stvaranje aSyn, tj. na razvoj bolesti za razliku od simptomatske terapije. CRISPRi-IV mogu se u tom smislu razmatrati i u drugim neurodegenerativnim poremećajima poput AD-a ili HD-a.

Još jedna nova mogućnost predstavlja hibridnu metodu nanonosača koja povezuje IV s nanoliposomima (NLP). Nanoliposomi mogu enkapsulirati hidrofobne tvari. U sljedećem radu ispitivane su hibridne vezikule koje nose baicalein, IV-NLP-Ba te one koje nose oleuropein, IV-NLP-Ole. Same izvanstanične vezikule potjecale su od mezenhimalnih matičnih stanica ljudske pupčane vrpce (hUC-MSC) zbog biokompatibilnosti i niske imunogenosti. Baicalein se koristio za sprječavanje agregacije aSyn, a oleuropein uz to promovira di-

sagregaciju toksičnih proteinskih jedinki. Obje vrste IV-a pokazale su smanjenu agregaciju aSyn, smanjile su propagaciju toksičnih oligomera te su olakšavale razgradnju postojećih fibrila aSyn. Ponaše nije bilo moguće samo korištenjem NLP nanonosača<sup>37</sup>. I ova hibridna platforma može se koristiti za ostale neurodegenerativne bolesti svoje biokompatibilnosti, ciljane dostave te direktne terapije.

#### IV U TERAPIJI OSTALIH NEURODEGENERATIVNIH BOLESTI

I kod ostalih neurodegenerativnih bolesti koristi se IV kao nova terapijska platforma. Kod Huntingtonove bolesti radi se o abnormalnom povećanju CAG trinukleotidnih ponavljanja u genu za protein huntingtin (HTT) pri čemu se stvara mutirani oblik (mHTT) koji postupno oštećuje moždane stanice<sup>38</sup>. Simptomi se očituju promjenom mentalnih sposobnosti, manjkom koordinacije te problemima s kretanjem, a sve se to vremenom pogoršava. Bolest ima i kompleksniju patogenezu koja uključuje više čimbenika unutar staničnih puteva čime se mogućnosti terapije dodatno smanjuju. No, i ovdje se može koristiti metoda CRISPR koja ima za metu mHTT alele da bi se smanjio broj CAG ponavljanja. Sam CRISPR-Cas9 sustav sastoji se od Cas9 nukleaze koja uvodi lomove (DSB) na dvolančanom DNA i sgRNA koji usmjerava Cas9 na određeno mjesto na DNA. Razlikujemo dva tipa mehanizama popravka DSB-a: nehomologno spajanje krajeva (engl. *non-homologous end joining; NHEJ*) i homologijom usmjeren popravak (engl. *homology directed repair; HDR*). Editori baza (primjerice deaminaze fuzirane na dCas9) omogućavaju zamjenu pojedinačnih nukleotida bez stvaranja DSB-a, što se može koristiti za popravak patoloških CAG ekspanzija. NHEJ je mehanizam sklon pogreškama i često rezultira točkastim mutacijama, dok HDR omogućuje ubacivanje cjelovitih gena na mjesto loma, pa se koristi u uređivanju genoma<sup>39</sup>. Kako je divlji tip Cas9 iz bakterije *Streptococcus pyogenes* (WT-SpCas9) zapravo ovisan o NGG PAM motivu pri prepoznavanju ciljane sekvencije, grupa autora razvila je posebnu varijantu SpCas9-NG koja će prepoznati upravo te motive. SpCas9-NG se zatim koristi za smanjivanje patoloških CAG ekspanzija u ma-

tičnim stanicama miševa s HD-om. Nakon djelovanja SpCas9-NG uočen je popravak fenotipskih abnormalnosti u diferenciranim neuronima<sup>40</sup>.

Izvanstanične vezikule također se mogu koristiti u terapiji HD-a. Joshi i suradnici pokazali su da male izvanstanične vezikule (sIV) nastale iz živčanih matičnih stanica mogu prenositi DNAJB6 šaperon te spriječiti nakupljanje mHTT u mozgu miševa i odgoditi početak bolesti<sup>41</sup>.

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) progresivna je bolest koja zahvaća motoričke neurone, a kao i ostale neurodegenerativne bolesti ima limitirane mogućnosti terapije. Iako su terapije matičnim stanicama dale određene rezultate<sup>42, 43</sup>, trenutačno se razvijaju terapije putem IV-a. U radu koji je koristio MSC-IV, pokušala se modulirati neurotoksičnost astrocита. U tu su svrhu korišteni astrociti iz leđne moždine ALS miševa (SOD1G93A) i humani astrociti iz stanica pacijenata s ALS-om. Pokazano je da MSC-IV smanjuju neurotoksičnost mišjih i humanih astrocита. Kod ljudskih astrocита MSC-IV povećale su antioksidacijski čimbenik Nrf2 i smanjile ukupno stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), dok se u SOD1G93A astrocítima smanjila neuroinflamacija i patološka aktivacija. Ovakvi terapijski učinci pripisani su specifičnim miRNA koji prenose IV. Supresiju upalnog puta omogućile su miR-466q i miR-467f djelujući na Mapk11, dok su miR-466m-5p i miR-466i-3p promovirale antioksidativni odgovor povećanjem aktivnosti Nrf2. U konačnici, MSC-IV modulirale su patološku aktivaciju astrocита, smanjile upalu i pojačale antioksidativnu obranu<sup>43</sup>.

U ovom kontekstu možemo sagledati i vrlo agresivnu vrstu tumora živčanog sustava nazvanu GBM. Postoje brojne sličnosti GBM-a i ND-a, a uključuju nakupljanje mutiranih proteina, oksidativni stres te neuroinflamaciju i poremećaj BBB-a. U terapiji GBM-a također se koriste egzozomi čija je površina modificirana specifičnim ligandima. Kao nova strategija u terapiji GBM-a može se koristiti dostava antisensnog miRNA oligonukleotida za miR-21 (AMO-21) čime se postiže njegova inhibicija. Smanjena koncentracija miR-21 ima terapijski učinak kod GBM-a. Za dostavu AMO-21 korišteni su egzozomi čija je površina modificirana peptidom T7 koji veže receptore za transferin. Kod GBM-a dolazi do pretjerane ekspresije receptora transferina, čime ovako modificirani egzozo-

mi postaju odlično sredstvo za ciljanu dostavu u stanice GBM-a. U uvjetima *in vitro* ovakvi egzozomi T7 pokazali su se učinkovitijim od nemodificiranih egzozoma ili od kontrolnih egzozoma RVG. Ova nova strategija mogla bi biti vrlo učinkovita u liječenju GBM-a u smislu snižavanja koncentracije miR-21<sup>44</sup>.

I ovdje se pokazuje nezamjenjiva uloga IV-a kod dostave biomolekula, utjecaja na neuroinflamaciju i oksidativni stres te gensku modulaciju.

#### IZAZOVI I BUDUĆI SMJER TERAPIJE PUTEM IV-a

Iako se IV terapijska platforma za neurodegenerativne bolesti čini jako obećavajućom i moćnom, ipak treba uzeti u obzir i prevladati moguće zapreke kako bi se ona translatirala u klinička istraživanja. Jednu takvu zapreku čini sama kompleksnost patologije neurodegenerativnih bolesti koja uključuje više čimbenika poput agregacije proteina, neuroinflamacije te oksidativnog stresa. Ovo pokazuje potrebu za razvojem multimodalne vrste IV terapije. S druge strane treba poraditi i na tome kolika se količina nekog terapeutika može ubaciti i prenijeti putem izvanstaničnih vezikula, a da one ne izgube svoj integritet. Svakako se i ovdje može poraditi na optimizacijama tehnika poput elektroporacije ili sonifikacije, odnosno i na vrsti stanica od kojih potječu izvanstanične vezikule.

Sljedeća zapreka svakako je i ciljana dostava na mjesto degeneracije, a to se može poboljšati razvojem novih vrsta liganada i peptida koji će optimizirati dostavu u određena područja mozga, odnosno određene stanične vrste.

Ostale zapreke koje treba uzeti u obzir, tiču se optimizacije i povećanja opsega procesa stvaranja IV-a dostatne kvalitete i čistoće, pronalaženja načina da se smanji njihova imunogenost i brzog izlučivanja izvan cirkulacije te provjere njihovih mogućih protutumorskih učinaka.

Ipak, budućnost terapije ND-a putem IV-a čvrsto je utemeljena uz bazična i klinička istraživanja usmjerena prevladavanju opisanih zapreka. Modifikacija IV-a revolucionalizirat će dostavu lijekova, omogućiti precizno ciljanje dijelova organizma pomoću površinskih liganada i/ili peptida. Skaliranje cijelog procesa izolacije, dobivanja i funkcio-

nalizacije površine te novih metoda ubacivanja lijekova u IV povećat će njihovu učinkovitost i raniju kliničku translaciju. Nove metode ubacivanja lijekova uključivat će procese mikrofluidne tehnologije te kombinaciju IV-a s ostalim nanočesticama kako bi se stvorili hibridni sustavi za dostavu lijekova. Ovakvi hibridni sustavi omogućit će dostavu lijekova uz molekule RNA i proteina čime će se odjednom djelovati na više čimbenika odgovornih za nastajanje i razvoj ND-a. Nadalje, personalizirane terapije koristit će stanice dobivene od samog pacijenta za ovakvu vrstu autologne dostave. Koristeći sve navedene mehanizme, izvanstanične vezikule imaju mogućnost značajno prilagoditi krajolik terapije neurodegenerativnih bolesti zadirući duboko u sam njihov nastanak.

Modifikacija površine izvanstaničnih vezikula utječe na biokompatibilnost te omogućuje još precizniju isporuku lijekova s molekulama RNA i proteina čime će se odjednom djelovati na više čimbenika odgovornih za nastajanje i razvoj neurodegenerativnih bolesti.

#### ZAKLJUČAK

Izvanstanične vezikule nude novu i vrlo prilagodljivu terapijsku platformu za liječenje neurodegenerativnih bolesti. Takva platforma nadilazi trenutačne terapijske limite u smislu ciljanja samog uzroka bolesti. Izvanstanične vezikule posjeduju intrinzičku biokompatibilnost, prolaze barijere organizma uključujući i BBB te mogu prenijeti različite vrste terapeutika na ciljana mjesta. Ciljano djelovanje posebice je važno u kompleksnoj patofiziologiji Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, ali i u drugim neurodegenerativnim bolestima. Posebnim metodama modifikacije izvanstanične vezikule lako se dopremaju točno na mjesta zahvaćena neurodegeneracijom i vrlo su efikasne u dostavi terapeutika čime omogućavaju modifikaciju bolesti za razliku od drugih, većinom simptomatskih tretmana. Također, zadnje se vrijeme sve više koristi i CRISPR metoda gdje se tijekom bolesti može usporiti zamjenom oštećenih gena. Ipak, postojeće metode treba skalirati na veće razmjere, održati kvalitetu te proizvesti izvanstanične vezikule koje su sigurne i učinkovite za du-

gotrajno korištenje. Ovakva translacija terapije bazirane na IV-u u kliničku praksu zahtijevat će poboljšane metode izolacije, napredovanja u bioinženjerskom smislu te vrlo rigorozna i detaljna klinička ispitivanja. Također je vrlo bitno da se ovakva IV platforma može prilagoditi specifičnim zahtjevima pojedinih pacijenata, odnosno vrlo su važne u smislu razvoja personalizirane i precizne medicine.

Konačno, terapija bazirana na IV-u nalazi se u svojim začetcima, ali se već sada vidi njezin ogroman potencijal u borbi protiv neurodegenerativnih poremećaja. Buduća inovativna istraživanja te biotehničke modifikacije dalje će razviti ovu platformu što će u konačnici omogućiti učinkovitu vrstu terapije koja zadire u sam nastanak i tijekom ovakvih vrsta poremećaja.

**Izjava o sukobu interesa:** Autor izjavljuje kako ne postoji sukob interesa.

#### LITERATURA

- Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, Marzooqi SAI, Jerobin J, Altemani FH et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9:27.
- Lopes D, Lopes J, Pereira-Silva M, Peixoto D, Rabiee N, Veiga F et al. Bioengineered exosomal-membrane-camouflaged abiotic nanocarriers: neurodegenerative diseases, tissue engineering and regenerative medicine. *Mil Med Res* 2023;10:19.
- Yates AG, Pink RC, Erdbrügger U, Siljander PRM, Dellar ER, Pantazi P et al. In sickness and in health: The functional role of extracellular vesicles in physiology and pathology in vivo. *J Extracell Vesicles* 2022;11(1):e12190.
- Malhotra S, Miras MCM, Pappolla A, Montalban X, Comabella M. Liquid Biopsy in Neurological Diseases. *Cells* 2023;12(14):1911.
- Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, Mäger I, Talbot K, Andaloussi SE et al. Extracellular vesicles in neurodegenerative disease — pathogenesis to biomarkers. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(6):346–57.
- Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweere S, Pottiez G, Karamanos Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020;9(4):851.
- Schnatz A, Müller C, Brahmer A, Krämer-Albers E. Extracellular Vesicles in neural cell interaction and CNS homeostasis. *FASEB BioAdvances* 2021;3(8):577–92.
- Sheng Y, Zhou X, Wang J, Shen H, Wu S, Guo W et al. MSC derived EV loaded with miRNA-22 inhibits the inflammatory response and nerve function recovery after spinal cord injury in rats. *J Cell Mol Med* 2021 ;25(21):10268–78.
- Zhao R, Wang L, Wang T, Xian P, Wang H, Long Q. Inhalation of MSC-EVs is a noninvasive strategy for ameliorating acute lung injury. *J Controlled Release* 2022 ;345:214–30.
- Zhang L, Wei W, Ai X, Kilic E, Hermann DM, Venkataramani V et al. Extracellular vesicles from hypoxia-preconditioned microglia promote angiogenesis and repress apoptosis in stroke mice via the TGF- $\beta$ /Smad2/3 pathway. *Cell Death Dis* 2021;12(11):1068.
- Lu S, Lu L, Liu Y, Li Z, Fang Y, Chen Z et al. Native and engineered extracellular vesicles for wound healing. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:1053217.
- Garcia-Contreras M, Thakor AS. Extracellular vesicles in Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Neural Regen Res* 2023;18(1):18.
- Liu W, Bai X, Zhang A, Huang J, Xu S, Zhang J. Role of Exosomes in Central Nervous System Diseases. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Mar 8];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00240>
- Ramaswamy P, Yadav R, Pal PK, Christopher R. Clinical Application of Circulating MicroRNAs in Parkinson's Disease: The Challenges and Opportunities as Diagnostic Biomarker. *Ann Indian Acad Neurol* 2020;23(1):84–97.
- Casanova-Salas I, Aguilar D, Cordoba-Terreros S, Agundez L, Brandariz J, Herranz N et al. Circulating tumor extracellular vesicles to monitor metastatic prostate cancer genomics and transcriptomic evolution. *Cancer Cell* 2024;42(7):1301-1312.e7.
- Davidson SM, Boulanger CM, Aikawa E, Badimon L, Barile L, Binder CJ et al. Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies: from exosomes to microvesicles. *Cardiovasc Res* 2022;119(1):45–63.
- Hambo S, Harb H. Extracellular Vesicles and Their Role in Lung Infections. *Int J Mol Sci* 2023;24(22):16139.
- Dong L, Wang Y, Zheng T, Pu Y, Ma Y, Qi X et al. Hypoxic hUCMSC-derived extracellular vesicles attenuate allergic airway inflammation and airway remodeling in chronic asthma mice. *Stem Cell Res Ther* 2021;12:4.
- Salomon C, Das S, Erdbrügger U, Kalluri R, Kiang Lim S, Olefsky JM et al. Extracellular Vesicles and Their Emerging Roles as Cellular Messengers in Endocrinology: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 2022; 43(3):441–68.
- Rahmani AH, Alsahli MA, Aly SM, Khan MA, Aldebasi YH. Role of Curcumin in Disease Prevention and Treatment. *Adv Biomed Res* 2018;7:38.
- Tréton G, Sayer C, Schürz M, Jaritsch M, Müller A, Matea CT et al. Quantitative and functional characterisation of extracellular vesicles after passive loading with hydrophobic or cholesterol-tagged small molecules. *J Controlled Release* 2023;361:694–716.
- Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC et al. Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol Ther* 2011; 19(10):1769–79.
- Joshi BS, Ortiz D, Zuhorn IS. Converting extracellular vesicles into nanomedicine: loading and unloading of cargo. *Mater Today Nano* 2021;16:100148.
- Chen C, Li Y, Wang Q, Cai N, Wu L, Yan X. Single-particle assessment of six different drug-loading strategies for incorporating doxorubicin into small extracellular vesicles. *Anal Bioanal Chem* 2023;415(7):1287–98.
- Iyaswamy A, Thakur A, Guan XJ, Krishnamoorthi S, Fung TY, Lu K et al. Fe65-engineered neuronal exosomes encapsulating corynoxine-B ameliorate cognition and pathology of Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):1–14.

26. Djajadikerta A, Keshri S, Pavel M, Prestil R, Ryan L, Rubinsztein DC. Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *J Mol Biol* 2020;432(8): 2799–821.
27. Jeyaraman M, Rajendran RL, Muthu S, Jeyaraman N, Sharma S, Jha SK et al. An update on stem cell and stem cell-derived extracellular vesicle-based therapy in the management of Alzheimer's disease. *Heliyon* 2023;9(7): e17808.
28. Yin T, Liu Y, Ji W, Zhuang J, Chen X, Gong B et al. Engineered mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: A state-of-the-art multifunctional weapon against Alzheimer's disease. *Theranostics* 2023;13(4):1264–85.
29. Silva RO, Haddad M, Counil H, Zaouter C, Patten SA, Fulop T et al. Exploring the potential of plasma and adipose mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as novel platforms for neuroinflammation therapy. *J Controlled Release* 2025;377:880–98.
30. Madhu LN, Kodali M, Upadhya R, Rao S, Somayaji Y, Ataluri S et al. Extracellular vesicles from human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells alleviate proinflammatory cascades within disease-associated microglia in Alzheimer's disease. *J Extracell Vesicles* 2024; 13(11):e12519.
31. Shi X, Zhang L, Wu S, Zhang C, Mamtilahun M, Li Y et al. A simple polydopamine-based platform for engineering extracellular vesicles with brain-targeting peptide and imaging probes to improve stroke outcome. *J Extracell Vesicles* 2025;14(1):e70031.
32. Zhang R, Fu Y, Cheng M, Ma W, Zheng N, Wang Y et al. sEVsRVG selectively delivers antiviral siRNA to fetus brain, inhibits ZIKV infection and mitigates ZIKV-induced microcephaly in mouse model. *Mol Ther* 2022;30(5): 2078–91.
33. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011;29(4):341–5.
34. Peng H, Li Y, Ji W, Zhao R, Lu Z, Shen J et al. Intranasal Administration of Self-Oriented Nanocarriers Based on Therapeutic Exosomes for Synergistic Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Nano* 2022 ;16(1):869–84.
35. Perets N, Betzer O, Shapira R, Brenstein S, Angel A, Sadan T et al. Golden Exosomes Selectively Target Brain Pathologies in Neurodegenerative and Neurodevelopmental Disorders. *Nano Lett* 2019;19(6):3422–31.
36. Kong W, Li X, Guo X, Sun Y, Chai W, Chang Y et al. Ultrasound-Assisted CRISPRi-Exosome for Epigenetic Modification of  $\alpha$ -Synuclein Gene in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *ACS Nano* 2024;18(11):7837–51.
37. Aliakbari F, Marzookian K, Parsafar S, Hourfar H, Nayeri Z, Fattahi A et al. The impact of hUC MSC-derived exosome-nanoliposome hybrids on  $\alpha$ -synuclein fibrillation and neurotoxicity. *Sci Adv* 10(14):eadl3406.
38. Leavitt BR, Kordasiewicz HB, Schobel SA. Huntingtin-Lowering Therapies for Huntington Disease: A Review of the Evidence of Potential Benefits and Risks. *JAMA Neurol* 2020;77(6):764–72.
39. Qin Y, Li S, Li XJ, Yang S. CRISPR-Based Genome-Editing Tools for Huntington's Disease Research and Therapy. *Neurosci Bull* 2022;38(11):1397–408.
40. Oura S, Noda T, Morimura N, Hitoshi S, Nishimasu H, Nagai Y et al. Precise CAG repeat contraction in a Huntington's Disease mouse model is enabled by gene editing with SpCas9-NG. *Commun Biol* 2021;4(1):1–13.
41. Joshi BS, Youssef SA, Bron R, de Bruin A, Kampinga HH, Zuhorn IS. DNAJB6b-enriched small extracellular vesicles decrease polyglutamine aggregation in *in vitro* and *in vivo* models of Huntington disease. *iScience* 2021;24(11): 103282.
42. Ferraiuolo L, Maragakis NJ. Mini-Review: Induced pluripotent stem cells and the search for new cell-specific ALS therapeutic targets. *Neurosci Lett* 2021;755:135911.
43. Provenzano F, Nyberg S, Giunti D, Torazza C, Parodi B, Bonifacino T et al. Micro-RNAs Shuttled by Extracellular Vesicles Secreted from Mesenchymal Stem Cells Dampen Astrocyte Pathological Activation and Support Neuroprotection in In-Vitro Models of ALS. *Cells* 2022; 11(23):3923.
44. Kim G, Kim M, Lee Y, Byun JW, Hwang DW, Lee M. Systemic delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides to the brain using T7-peptide decorated exosomes. *J Controlled Release* 2020;317:273–81.