

# Parkinsono liga ir egzomosos: nuo patogenezės iki diagnozės ir gydymo

**A. Mišeikaitė**  
**P. Vaitkienė**

*Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, Neuromokslų institutas, Molekulinės neurobiologijos laboratorija*

**Santrauka.** Parkinsono liga (PL) įvardijama kaip antroji pagal dažnumą neurodegeneracinė liga po Alzheimerio, pasireiškianti vyresniems žmonėms. Vidutinis PL pradžios amžius yra 55 metai. Nors šio neuropatologinio sutrikimo metu pasireiškiantys klinikiniai simptomai, nervinių ląstelių pokyčiai ir įvairūs molekuliniai mechanizmai tyrinėjami jau daugelį metų, ligos diagnostika ir gydymas vis dar kelia iššūkių. Didelio susidomėjimo sulaukė iš ląstelių endosominės sistemos išskiriamos tarpląstelinės pūslelės – egzomosos. Iširta, kad dauguma ląstelių, tarp jų ir nervinės, smegenyse gali išskirti šias 50–150 nm skersmens pūsleles, galinčias paveikti baltymų aktyvumą ir genų ekspresiją. Manoma, kad dėl savo vidaus turinio ir gebėjimo judėti tarpląstelinėje aplinkoje egzomosos gali atlikti svarbų vaidmenį kaupiant bei pernešant įvairius molekulinis žymenis, tokius kaip  $\alpha$ -sinukleino baltymas ar mikroRNR (miRNR), ir dalyvauti nervinių audinių uždegiminiuose procesuose. Kadangi egzomosos turinys priklauso nuo jų išskiriančios ląstelės ir gali keistis ligos metu, egzomosų tyrimai gali padėti suprasti patogenezę ir stebėti ligą. Vis daugėja įrodymų apie egzomosų svarbą ląstelių tarpusavio komunikacijai, tarpininkavimui, dalinantis biologine informacija ir medžiagomis, bei gebėjimą pereiti kraujo ir smegenų barjerą. Dėl savo gebėjimo pereiti kraujo ir smegenų barjerą egzomosos gali būti perspektyvios vaistų ar molekulių pernešimui ir padėti sukurti efektyvesnius gydymo metodus tiek PL, tiek kitoms nervų sistemos ligoms gydyti.

Šioje literatūros apžvalgoje aptariama egzomosų biogeneze ir galimas vaidmuo Parkinsono ligos diagnostikoje, gydyme bei ilgalaikių išiečių numatyme.

**Raktažodžiai:** Parkinsono liga, egzomosos,  $\alpha$ -sinukleinas, miRNR.

## ĮVADAS

Parkinsono liga (PL) įvardijama kaip antra pagal dažnumą neurodegeneracinė liga po Alzheimerio, kuri progresuoja senstant [1, 2]. Pirminė diagnozė dažniausiai remiasi klinikiniais motoriniais simptomais, tokiais kaip bradikinezija, rigidiškumas ar tremoras. Tačiau taip pat dažnai gali pasireikšti ir nemotoriniai simptomai, pavyzdžiui, depresija, apatija, miego sutrikimai, nuovargis [3] ir kt.

Tikimybė susirgti PL nuo šeštojo iki devintojo žmogaus gyvenimo dešimtmečio padidėja net 5–10 kartų. Liga

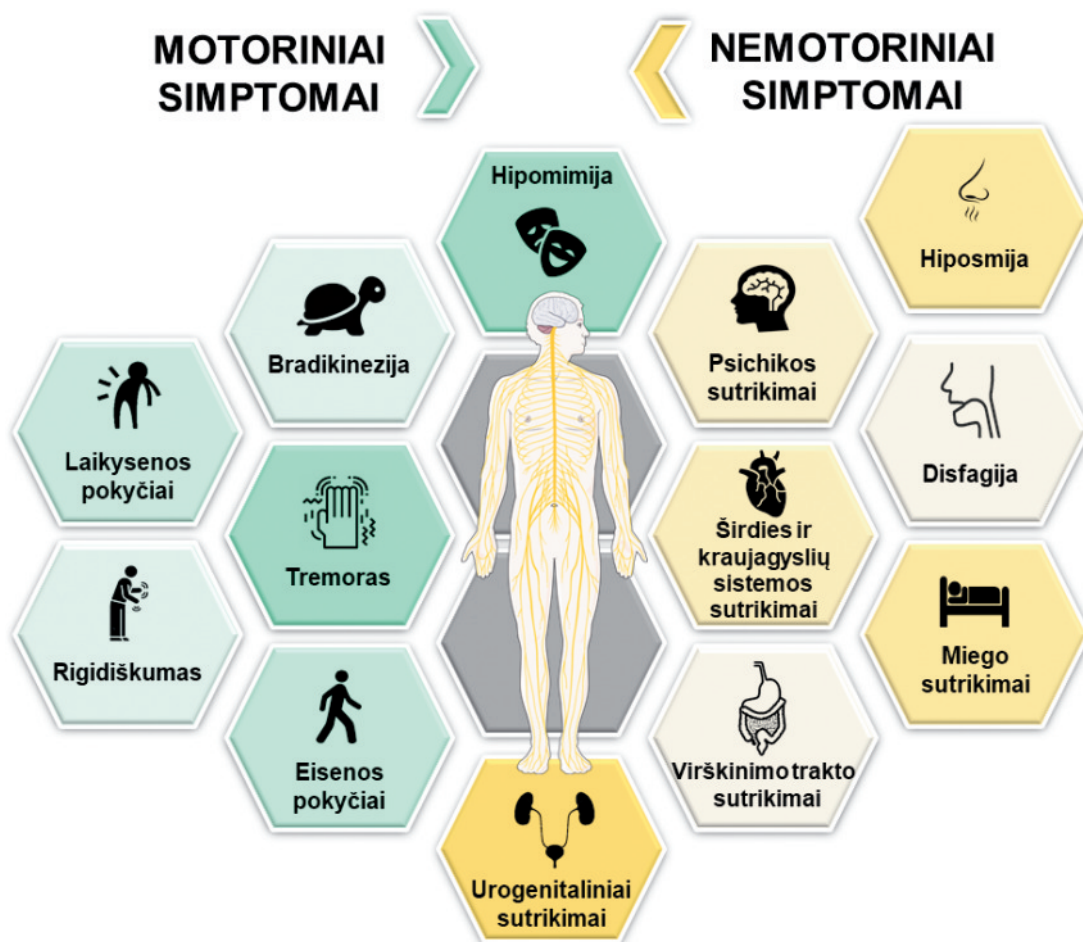
paprastai prasideda apie 55-tuosius gyvenimo metus [2, 4]. Pasaulyje nuo 2001 iki 2014 m. atliktų epidemiologinių PL tyrimų analizė rodo, kad 40 metų ir vyresnių moterų bendras susirgimų dažnis buvo 37,55, o vyrų – 61,21 atvejo 100 000 gyventojų. Su amžiumi tiek moterų, tiek vyrų sergamumas PL didėja. Pavyzdžiui, 40–49 metų amžiaus moterų grupėje PL paplitimas buvo 3,26 atvejo, o 80 metų ir vyresnių moterų grupėje – 103,48 atvejo 100 000 gyventojų. Vyrų grupėje sergamumas didėjo nuo 3,57 – 40–49 metų amžiaus grupėje iki 259,47 atvejo iš 100 000, sulaukus 80 ir daugiau metų [5]. Vyrų PL serga dažniau.

Lietuvoje PL serga 1 iš 280 gyventojų. Valstybinės ligonių kasos prie Sveikatos apsaugos ministerijos duomenimis, iš Privalomojo sveikatos draudimo fondo Parkinsono liga sergančių ligonių sveikatos priežiūros paslaugoms (procedūroms, reabilitacijai, tyrimams ir vaistams) 2017 m. skirta 4,17 mln. eurų, 2018 m. – 4,8 mln. eurų, t. y. 14 % daugiau lėšų [6]. Visame pasaulyje auganti PL susirgimų skaičių gali lemti ilgėjanti žmogaus gyvenimo truk-

### Adresas:

*Augustina Mišeikaitė  
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija,  
Neuromokslų institutas, Molekulinės neurobiologijos laboratorija  
Eivenių g. 4, LT-50161 Kaunas  
El. paštas augustina.miseikaite@lsmu.lt*

© Neurologijos seminarai, 2021. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License CC-BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.



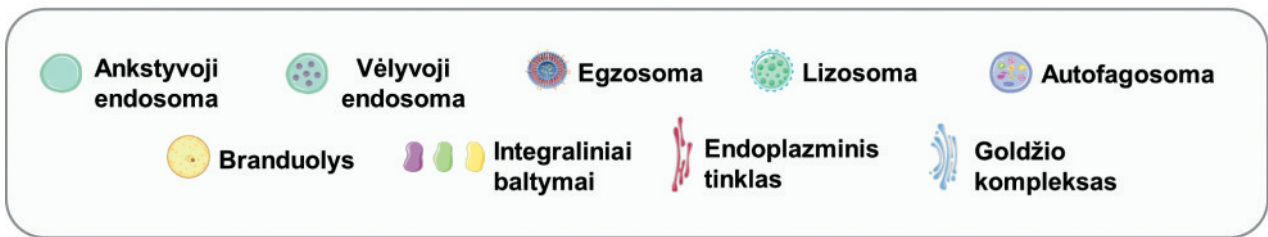
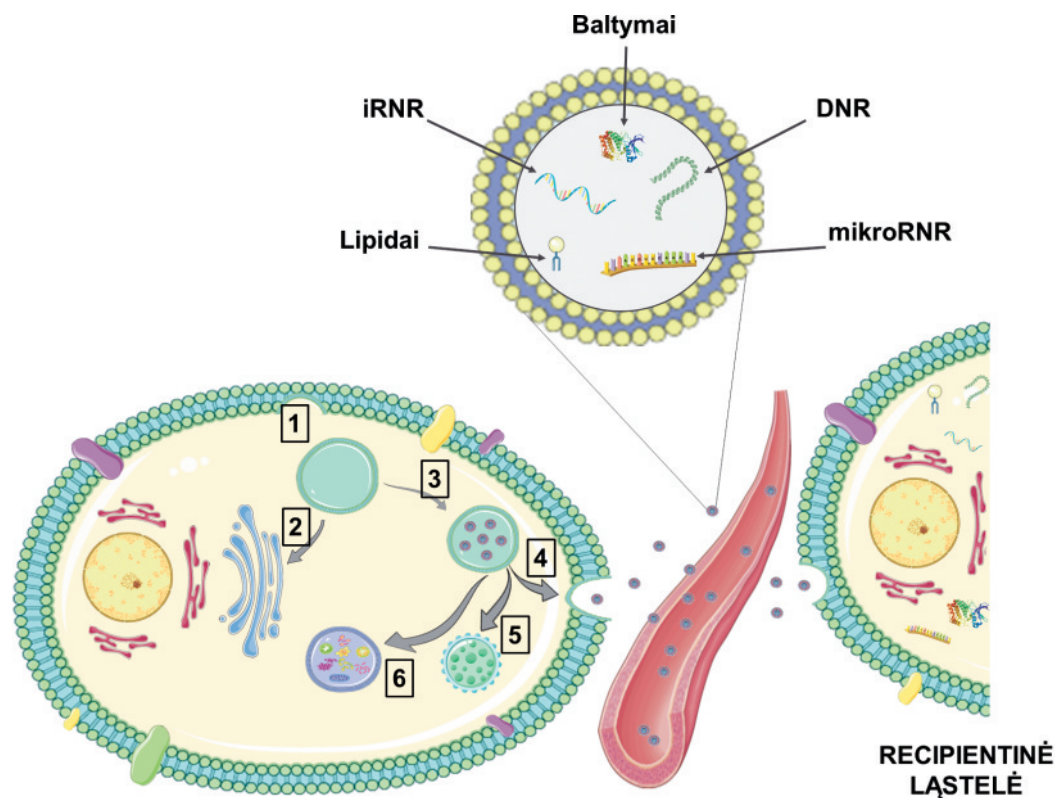
1 pav. Parkinsono ligai būdingi sutrikimai.

Ligos metu pasireiškiantys simptomai yra skirstomi į motorinius ir nemotorinius.

mė ir aplinka [7]. Daugelis susirgusiųjų po diagnozės išgyvena nuo 10 iki 20 metų, tačiau tam įtakos turi bendra sveikatos būklė [8]. Manoma, kad šie demografiniai veiksniai (žmogaus gyvenimo trukmė, aplinka, genetinis polinkis) ateityje sukels PL sunkumų [7].

PL sergančio paciento galvos vidurinėse smegenyse esančioje juodojoje medžiagoje (lot. *substantia nigra*) vyksta negrįžtami pokyčiai [1] – neuronai, sintetinantys ir išskiriantys dopaminą, dar vadinami dopaminerginiais neuronais [9], laipsniškai degeneruoja ir nyksta [1]. Šių dopaminerginių neuronų degradacija laikoma pagrindiniu neuropatologiniu PL požymiu. Ligos patogenezėje dalyvauja  $\alpha$ -sinukleino baltymų agregatai, kurie dėl nenormalaus fosforilinimo sudaro sancaupas, dar vadinamas Lewy kūneliais [10]. Jie randami PL sergančių pacientų nervinėse ląstelėse [11].  $\alpha$ -sinukleino baltymas smegenyse aptinkamas įvairiomis formomis: netirpios  $\alpha$ -klostės turinčios fibrilės, mono-, oligo-, polimerinės formos [12]. Progresuojant ligai, jų kaupimasis spartėja [13] ir sukelia neuronų žūtį [14]. Vykstant patologiniams PL procesams, smegenyse prarandamas neuromediatorius dopaminas, reikalingas perduoti nerviniams impulsams [9]. Sumažėjus jo kiekiui, sutrinka normalus smegenų aktyvumas. Dėl to pasireiškia motorikos sutrikimai [2] ir gali atsirasti kitų Parkinsono ligai būdingų simptomų (1 pav.).

Nors daroma reikšminga pažanga PL tyrimuose, vis dar susiduriama su sunkumais apibūdinant [15] šią ligą ir vykdant diagnostiką ar gydymą. Šiuo metu, siekiant išaiškinti ligos patogenezę, yra siūlomi įvairūs  $\alpha$ -sinukleino perdavimo būdai tarp ląstelių – endocitozė, egzocitozė, tuneliniai nanovamzdeliai ir tarpląstelinės pūslelės [16]. Vystantis patologijai, ląstelėse vyksta įvairūs pakitimai, jos siunčia viena kitai signalus ir dalinasi biologine informacija [17]. Todėl yra svarbu atrasti tinkamus žymenis, galinčius suteikti naudingą informaciją apie pokyčius organizme. Didelį susidomėjimą kelia tarpląstelinės pūslelės – mikropūslelės, apoptoziniai kūneliai, ypač egzozomos [18, 19]. Egzozoma – tai 50–150 nm skersmens pūslelė, kurią į tarpląstelinę aplinką išskiria citoplazminė membrana [20]. Ištirta, kad dauguma ląstelių, tarp jų ir neuronai, mikroglijos ir astrocitai, smegenyse išskiria egzozomas, galinčias daryti įtaką baltymų aktyvumui ir genų ekspresijai [19]. Šios pūslelės yra apgaubtos išoriniu lipofiliniu apvalkalu, kuris dengia viduje esančias įvairias biomolekules: metabolitus, mitochondrinę ir genomine DNR, mikroRNR (miRNR), informacinę RNR (iRNR), lipidus, baltymus [21]. Viduje esančių baltymų sudėtis priklauso nuo ląstelės, išskiriančios egzozomą [22]. Šios tarpląstelinės pūslelės gali būti izoliuojamos iš tokių biologinių skysčių: kraujo plazmos, serumo, seilių, likvoro, vaisiaus van-



2 pav. Egzosomų biogenezė ir išskyrimas.

1 – endocitozės metu iš plazminės membranos susiformuoja ankstyvoji endosoma ir prasideda egzosomų biogenezė; 2 – dalis ankstyvųjų endosomų yra perdirbamos Goldžio komplekse; 3 – didžioji dauguma ankstyvųjų endosomų virsta vėlyvosiomis endosomomis, kuriose yra intraluminių pūslelių; 4 – vėlyvoji endosoma, susilieję su ląstelės plazmine membrana, egzocitozės būdu išskiria intralumines pūsleles (egzosomas) į tarpląstelinę aplinką; 5 – dalis vėlyvųjų endosomų gali būti suardomos citoplazmoje esančių lizosomų; 6 – arba gali būti suardomos autofagosomų. Išskirtų egzosomų viduje yra lipidai, baltymai, DNR, mikroRNR ir informacinė RNR. Egzosomos sklinda tarpląstelinėje aplinkoje ir gali būti aptinkamos kraujyje bei kituose biologiniuose skysčiuose.

denų, motinos pieno, šlapimo, ascitinio skysčio ar spermos [23].

Kadangi egzosomos turinys priklauso nuo jų išskiriančios ląstelės ir gali keistis ligos metu, jų vaidmuo tampa gana svarbus, norint įvertinti patogenezę ir stebėti ligos eigą. Šia literatūros apžvalga norima aptarti egzosomų biogenezę ir galimus vaidmenis Parkinsono ligos diagnozėje, gydyme bei prognozėje.

### BIOGENEZĖ

Egzosomų biogenezė prasideda endosominėje sistemoje. Jos metu ląstelės plazminė membrana pirmiausia susiformuoja į linkius, primenančius taurės formą, kurie įtraukia

tirpius ir paviršiuje esančius baltymus. Citoplazmoje esantis endoplazminis tinklas ir Goldžio kompleksas gali paveikti ankstyvųjų endosomų formavimąsi ir jų turinį [24]. Dalis ankstyvųjų endosomų yra perdirbamos Goldžio komplekse, o kitos virsta vėlyvosiomis endosomomis, kitaip vadinamomis daugialypiais kūneliais (angl. *multivesicular bodies*, MVBs), kuriose yra intralumines pūslelės (angl. *intraluminal vesicles*, ILVs) [25]. MVBs gali būti suardomi autofagosomų arba suliejami su citoplazmoje esančiomis lizosomomis ar plazmine membrana [24]. Susilieję su plazmine membrana, egzocitozės būdu vėlyvosiose endosomose esančios ILVs išsiskiria į tarpląstelinę aplinką kaip egzosomos [26]. Ant jų paviršiaus esančių baltymų ir receptorių kompleksas – tetraspaninas-integrinas – suriša egzosomas su tikslinėmis ląstelėmis [27] (2 pav.).



## EGZOSOMŲ VAIDMUO PARKINSONO LIGOS PATOGENEZĖJE

PL pradžia yra lėta, tačiau palaipsniui progresuoja. Šiai ligai būdinga  $\alpha$ -sinukleino baltymų agregatų sankaupos galvos smegenyse [11], dar vadinamos Lewy kūneliais, ir dopaminerginių neuronų nykimas [1]. Dėl degeneruojančių ir nykstančių neuronų sutrinka nervinio impulso perdavimas ir sklidimas, dėl ko sutrikdoma kūno motorika [2]. Vienas pirmųjų simptomų dažnai yra tremoras, tačiau vėliau gali pasireikšti ir kiti motoriniai sutrikimai: bradikinezija, eisenos sutrikimai, hipomimija, laikysenos nestabilumas, mikrografija ar rigidiškumas. Ligai pasiekus vėlesnę stadiją, laikysena tampa nestabili ir gyvenimo kokybė pradeda prastėti – ligoniui gali prireikti slaugos priežiūros visą parą. Sutrikus kūno motorikai, taip pat dažnai pasireiškia ir nemotoriniai simptomai. Ligoniu gali išsivystyti demencija, psichikos, miego, virškinimo trakto, sensoriniai, urogenitaliniai ar kraujo sistemos sutrikimai, kurie skirtingai paveikia paciento gyvenimą [28, 29]. Kadangi vis dar kyla abejonų ir neaiškumų dėl PL patogenezės, manoma, kad dėl savo vidaus turinio ir gebėjimo judėti tarpląstelinėje aplinkoje egzozomos gali atlikti svarbų vaidmenį kaupiant ir pernešant  $\alpha$ -sinukleiną, genetinę medžiagą ir dalyvaujant nervinių audinių uždegime.

### $\alpha$ -sinukleino kaupimasis ir sklidimas tarpininkaujant egzozomoms

Tarpląstelinio  $\alpha$ -sinukleino plitimas laikomas PL progresavimo priežastimi. Kadangi vis dar kyla įvairių klausimų dėl galimų patogeninių mechanizmų, atliekami tyrimai, nagrinėjantys egzozomų ir  $\alpha$ -sinukleino ryšį. Naujausi tyrimai rodo, kad, nors egzozomose randamo  $\alpha$ -sinukleino lygis gali būti mažas, jos gali sudaryti idealias sąlygas šio baltymo kaupimuisi bei pernešimui tarpląstelinėje aplinkoje. Gray ir kt. [30] iš neuroblastomos ląstelių išskyrė egzozomas ir ištyrė, kaip jos veikia  $\alpha$ -sinukleino kaupimąsi, kuris siejamas su PL patogenezė. Naudojant elektroninę mikroskopiją, buvo rasta sferinių unilamelinių pūslelių, turinčių reikšmingą kiekį baltymų. Atlikus Western bloto analizę, paaiškėjo, kad tai baltymai Flotillin-1 ir Alix. Kaupimosi kinetikai stebėti buvo taikoma tioflavino T fluorescencija. Nustatyta, kad egzozomos gali katalizuoti procesą taip pat, kaip ir jau susiformavusi nedidelė  $\alpha$ -sinukleino fibrilių sankaupa. Šios tarpląstelinės pūslelės, sumažindamos vėlavimo laiką, sukuria katalizinę aplinką branduoliui. Ląstelės, per daug išskiriančios  $\alpha$ -sinukleiną, ir egzozomos, išskiriamos iš naivių ląstelių, nesiskiria kataliziniu poveikiu. Iš ekstrahuotų egzozomų lipidų paruoštos pūslelės greitina kaupimąsi. Tai įrodo, kad jose esančio lipidų kiekio pakanka kataliziniui poveikiui atsirasti. Šio baltymo sąveika su biologinėmis membranomis gali paskatinti neurologinę ligą, tad šios sąveikos supratimas gali padėti nustatyti naujus terapinius tikslus [30].

Patologinis  $\alpha$ -sinukleino kaupimasis PL pacientu galvos smegenyse prasideda anksčiau, nei liga būna diagno-

zuota. Tačiau, nors padidėjusią  $\alpha$ -sinukleino koncentraciją kraujyje galima laikyti ankstyvosios ligos stadijos biožymeniu, visgi šio baltymo koncentracijos pokyčius gali būti sudėtinga aptikti, nes jį gamina ir išskiria skirtingos ląstelės. Pagal specifinius paviršiaus baltymus atskirtų neuronų kilmės egzozomų tyrimai parodė, kad neuronų egzozomose supakuotas  $\alpha$ -sinukleinas gali būti išlaisvintas. Plazmos neuronų egzozomos buvo išskirtos iš 4 skirtingų asmenų grupių: iš 36 pacientų, sergančių ankstyvąja PL stadija, 17 – pažengusia PL stadija, 20 – turinčių greito akių judesio miego sutrikimą, ir 21 asmens, priklausančio kontrolinei grupei. Aptikta egzozominio  $\alpha$ -sinukleino koncentracija buvo didesnė sergančiųjų PL nei kontrolinės grupės. Palyginus duomenis, buvo rastas skirtumas ir tarp sergančiųjų ankstyvąja, ir pažengusiąja stadija: jautrumas – 100 %, specifiskumas – 57,1 %. Rastas koncentracijų skirtumas taip pat koreliavo ir su motoriniais bei nemotoriniais pacientų simptomais bei jų progresavimu. Pacientai, turintys ankstyvąją PL stadiją, toliau dalyvavo tyrime ir, atlikus vidutiniškai 22 mėnesių stebėjimą nuo pirmojo mėginio surinkimo, vėl pakartotinai buvo paimtas kraujas ir matuojama egzozominio  $\alpha$ -sinukleino koncentracija. Ji buvo padidėjusi, kas buvo siejama ir su motorinių simptomų paūmėjimu tuo metu [31].

### Nervinio audinio uždegimas, tarpininkaujant egzozomoms

Audinio uždegimas gali būti palaikomas dėl daugybės ląstelių sąveikos. Egzozomų vaidmuo šiame procese gali pasireikšti nevienodai skirtinguose uždegimo etapuose: aktyvacijos metu per neuronų ir glijos tarpusavio ryšį ar plintant uždegimui atsakui tarp glijų. Nors moksliniuose tyrimuose buvo nagrinėjamas  $\alpha$ -sinukleino patogeninis perdavimas tarp neuronų bei neuronų-glijos ląstelių, iki šios dienos egzozomų tarpininkavimo vaidmuo nervinio audinio uždegiminiams procesams ir neurodegeneracinių ligų progresui dar nėra iki galo aiškus. Užsitęsęs ar per didelis uždegiminis atsakas audiniuose gali sulėtinti ir pasunkinti visą uždegiminį procesą – tai paveiks ligos progresavimą. Tačiau, norint audiniui atsistatyti, vis tik reikalingas tinkamai reguliuojamas uždegiminis procesas [32].

Per didelis  $\alpha$ -sinukleino kiekis neuroglijos ląstelėse sukelia uždegimą. Šio baltymo kaupimasis aktyvina mikrogliją, stiprinančią dopaminerginį neurotoksiškumą. Siekiant iširti šį mechanizmą, t. y. kaip gali būti paveikiami neuronai, buvo tiriamos egzozomos, išskirtos iš pelių mikroglijos ląstelių linijos BV-2 ląstelių. Mikroglijos ląstelės buvo veikiamos  $\alpha$ -sinukleinu, taikant diferencinę centrifugaciją ir ultracentrifugaciją. Tyrimo rezultatai parodė, kad šis baltymas geba padidinti mikroglijos egzozomų išskyrimą, kas daro šias tarpląstelines pūsleles gerais ir svarbiais  $\alpha$ -sinukleino sukeltos neurodegeneracijos tarpininkais, esant PL. Tokios aktyvuotos egzozomos parodė aukštą TNF- $\alpha$  ir MHC II klasės molekulinį lygį. Padidėjęs tarpląstelinis pūslelių aktyvumas sukėlė dažnesnę apoptozę [33]. Kitų tyrimų metu iš PL sergančių pa-

cientų plazmos išskirtos egzozomos, kuriose rasta monomerinio ir oligomerinio  $\alpha$ -sinukleino formos, buvo suleidžiamos į pelių smegenų dryžuotąjį kūną (lot. *striatum*). Pelių mikroglijos pasižymėjo dideliu egzozomų, išskirtų iš PL sergančių pacientų, pasisavinimo potencialu, kuris gali būti suaktyvinamas egzogeninėmis egzozomomis *in vitro* ir *in vivo*. Taikytas dvigubas imunofluorescuojantis dažymas patvirtino, kad  $\alpha$ -sinukleinas iš žmogaus egzozomos buvo perkeltas į neuronus. Naudojant BV-2 pelės mikroglijos ląstelių liniją, buvo nustatyta, kad šios egzogeninės pūslelės reguliuoja ląstelių autofagiją, padidėjusį intraląstelinio  $\alpha$ -sinukleino kaupimąsi ir pagreitintą jo sklidimą tarpląstelinėje aplinkoje [34]. Tai įrodo, kad egzozomos gali atlikti svarbų vaidmenį  $\alpha$ -sinukleino sklidime ir nervinio audinio uždegimo procese bei PL progresavime.

### Egzozomose esančios miRNR siejamos su Parkinsono ligos patogenezė

Pakitusi mikroRNR išraiška biologiniuose skysčiuose (kraujyje, šlapime) daro jas perspektyviais patologijų molekuliniais žymenimis, galinčiais atrasti naujus terapinius taikinius neurologinėms ligoms gydyti [35]. miRNR sudaro 21–24 nekoduojančios RNR nukleotidai [36]. Pagrindinė miRNR funkcija yra reguliuoti genų ekspresiją po transkripcijos [37]. Žinoma, kad egzozomos, išskirtos iš mikroglijų, neuronų, oligodendrocitų, astrocitų, gali pernešti mikroRNR [38, 39].

Egzozomos, išskirtos iš kraujagyslių endotelio ar kraujo ląstelių, yra siejamos su neurologinėmis ligomis ir sutrikimais [40]. Tyrimai įrodo, kad, diagnozuojant PL, miRNR yra laikomos perspektyviomis dėl jų gebėjimo pereiti kraujo ir smegenų barjerą bei buvimo smegenų skystyje, periferinėje cirkuliacijoje ir egzozomose. Mokslinių tyrimų metu buvo tiriama smegenų skystyje esančios miRNR ekspresija, naudojant naujos kartos sekoskaitą, sergantiesiems ankstyvąja PL stadija ir sveikiems žmonėms. Tyrimo rezultatai parodė aukštą prognozuojamą vertę, esant 90 % diagnostiniam jautrumui [41]. Oliveira ir kt. [42] ištyrė miRNR, dalyvaujančias ląstelių mirties ir uždegimo proceso metu, lyginami PL sergančių pacientų ( $n = 20$ ) serumą su kontroline grupe ( $n = 20$ ). Taikant tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos (TL-PGR) metodą, buvo nustatyta, kad miR-146a, miR-335-3p, miR-335-5p raiška yra sumažėjusi pas PL pacientus, o miR-155 – padidėjusi, lyginant su kontroline grupe [42]. Neseniai PL sergantiems pacientams buvo nustatyta, kad yra išskiriamas sumažėjęs 31 miRNR ir padidėjęs 19 miRNR kiekis. Tarp jų buvo žymiai padidėjusi miR-4693-5p. Svarbu tai, kad ši miRNR neturi sąsajų su lytimi, amžiumi, ligos simptomų sunkumu ar L-Dopa gydymu. Dėl šios priežasties miR-4693-5p yra laikoma potencialiu ikiklinikinės diagnozės molekulinio žymeniu [43]. Kitų mokslininkų grupės taip pat patvirtino, kad miRNR gali būti naudojama kaip molekulinis žymuo ankstyvajai neurodegeneracinės ligos diagnozei [44].

### EGZOSOMŲ VAIDMUO, DIAGNOZUOJANT PARKINSONO LIGĄ

Ligos metu pakinta įvairūs žmogaus organizmo biologiniai žymenys, todėl aptiktas pokytis gali būti svarbus diagnozuojant ligą. Egzozomos gali būti išskiriamos iš įvairių ląstelių, įskaitant ir neuronus, mikroglijas, astroцитus [19]. Į kraują išskirtos egzozomos pagal savo viduje esančius biožymenis, tokius kaip specifiniai baltymai, mikroRNR, iRNR [21], leidžia atsekti, iš kurios ląstelės jos buvo išskirtos [22]. Taip egzozomos tampa tinkamu ir patraukliu diagnostiniu įrankiu.

Baltymas  $\alpha$ -sinukleinas laikomas vienu iš pagrindinių PL patologijos priežasčių. Jis gali būti aptinkamas anksčiau, nei pasireiškia klinikiniai ligos simptomai, ir yra laikomas potencialiu žymeniu diagnozėje. Cerri ir kt. [45] ištyrė kraujo plazmos bei  $\alpha$ -sinukleino, susijusio su egzozomomis, pokyčius, kurie gali būti siejami su paciento būkle ir klinikiniais požymiais. Tyrimo dalyvavo 39 PL pacientai ir 33 asmenys, priklausantys sveikų asmenų kontrolinei grupei. Gauti statistiškai reikšmingi rezultatai ( $p < 0,001$ ) parodė, kad sergančiųjų PL egzozomose buvo rastas didesnis  $\alpha$ -sinukleino kiekis (25,2 pg/ml), lyginant su kontroline grupe (12,3 pg/ml). Be to, buvo pastebėtas reikšmingas ( $p < 0,001$ ) tiek egzozomų, tiek bendro  $\alpha$ -sinukleino kiekio padidėjimas pas PL sergančius pacientus [45].

Cao ir kt. [46] tyrė egzozominės miRNR raišką ir vertino diagnostinę vertę PL sergantiems pacientams. Kraujo serumo mėginiai buvo surinkti iš 109 PL sergančių pacientų ir 40 kontrolinės pagal amžių ir lytį suderintos sveikų tiriamųjų grupės. Iš serumo mėginiuose esančių egzozomų išskyrus miRNR, jų raiška buvo tiriama atliekant TL-PGR. Didžiausią susidomėjimą sukėlė miR-19b, miR-24, miR-195, kurių raiškos lygis gali būti naudingas, norint diagnozuoti PL [46]. Kitus miRNR raiškos tyrimus atliko Barbagallo ir kt. [47], kurių metu PL pacientų ( $n = 30$ ) ir sveikų asmenų ( $n = 30$ ) kraujo serume buvo tiriamos egzozominės let-7d, miR-22, miR-23a, miR-24, miR-142-3p, miR-22. Tirtų miRNR raiška buvo reikšmingai padidėjusi pas PL sergančius asmenis, lyginant su sveikais asmenimis. Taip pat, atlikus ROC kreivės analizę, buvo nustatyta, kad šios šešios miRNR gali būti idealiais biožymenimis, diagnozuojant PL [47]. Tačiau svarbu tęsti ir atlikti tolimesnius miRNR raiškos tyrimus, kurių metu dalyvautų daugiau asmenų, ir siekti labiau išgryninti egzozomas, padidinant jų vertę ir vaidmenį PL diagnozėje.

### EGZOSOMŲ VAIDMUO, GYDANT PARKINSONO LIGĄ

Iš pradžių galvota, kad egzozomomis iš ląstelės yra pašalinami apykaitos produktai, liekanos ir jos veikia kaip ląstelės nereikalingų atliekų pašalinimo sistema. Tačiau po atliktų tyrimų galiausiai buvo išsiaiškinta ir pripažinta, kad tarpląstelinės pūslelės yra svarbios biologinės informacijos perdavimui, signalų siuntimui ir tarpusavio bendravi-

mui [17]. Kadangi neurodegeneracinės ligos yra sunkiau gydamos, nes kraujo ir smegenų barjeras blokuoja vaistų patekimą ir įsisavinimą, egzozomų judėjimo vaidmuo sulaukė ypatingo dėmesio. Qu ir kt. [48] išskyrė iš kraujo egzozomas, kurios, kaip buvo pastebėta, geba pereiti smegenų barjerą. Tai siejama su transferino ir transferino receptorių sąveika. Sukūrus biologiškai suderinamą aplinką egzozomoms pereiti kraujo ir smegenų barjerą, į jas buvo perkeliama dopaminas, taikant sočiųjų tirpalų inkubacijos metodą. Atliktų *in vitro* ir *in vivo* tyrimų rezultatai parodė, kad šiomis tarpląstelinėmis pūslelėmis dopaminas buvo sėkmingai perneštas į smegenyse esantį dryžuotąjį kūną (lot. *striatum*) ir juodąją medžiagą (lot. *substantia nigra*) – jo pasiskirstymas smegenų srityje padidėjo >15 kartų. Tai turėjo pastebimai geresnį terapinį efektą, nei dopaminą leidžiant intraveniškai [48].

Haney ir kt. [49] teigia, kad iš monocitų ir makrofagų išskirtos egzozomos gali pagerinti terapinių vaistų tiekimą tikslinėms ląstelėms ir taip padidinti jų efektyvumą. Jie sukūrė naują stiprų antioksidantą, katalazę, PL gydyti. Taikydami skirtingus metodus, tokius kaip inkubacija kambario temperatūroje, užšaldymo ir atšildymo pakartojimai, ultragarsas, ekstruzija, pralaidumas saponinu, autoriai sugebėjo perkelti katalazę į egzozomas *ex vivo*. Egzozomų, pakrautų katalaze, dydis siekė 100–200 nm. Po ultragarso ir ekstruzijos arba pralaidumo saponinu pritaikymo egzozomos pasižymėjo aukštu apkrovos efektyvumu ir gera katalazės apsauga nuo proteazių degradacijos. Neuronų ląstelės, esančios *in vitro*, greitai pasisavino egzozomas. Tęsiant tyrimą, pelės smegenyse buvo aptiktas nemažas egzozomų kiekis. Katalazė, esanti egzozomose, PL *in vitro* ir *in vivo* modeliuose pasižymėjo reikšmingu neuroprotektiniu poveikiu [49].

Egzozomos gali būti universalios ir perspektyvios gydančios neurodegeneracines ligas. Dėl savo gebėjimo pereiti kraujo ir smegenų barjerą jos gali būti perspektyvios vaistų pernešime, sergant ne tik PL, bet ir kitomis centrinės nervų sistemos ligomis.

## EGZOSOMŲ VAIDMUO PARKINSONO LIGOS PROGNOZĖJE

Egzozomų vaidmuo yra svarbus ne tik diagnozuojant ar pritaikant gydymą. Jos gali būti naudojamos kaip biožymenys, padedantys tiksliau nustatyti PL diagnozę ir įvertinti gydymo atsaką. Athaudos ir kt. [50] vykdytame tyrime dalyvavo 60 PL sergančių pacientų, iš kurių 31 pacientas gavo 2 mg ekstenatido, o likusieji 29 buvo gydomi placebo. Tyrimo dalyviams 48 savaites kartą per savaitę buvo duodama paskirto preparato (ekstenatido arba placebo) dozė. Praėjus 48 savaitėms, buvo daroma 12 savaičių pertrauka. Kraujo mėginiai iš pacientų buvo surenkami prieš tyrimą, tyrimo 24, 48 ir 60 savaitę. Iš surinkto kraujo buvo izoliuojamos neuroninės kilmės egzozomos su L1CAM, norint įvertinti insulino signalinių baltymų kiekį. Gauti 48 ir 60 savaičių laikotarpio PL pacientų kraujo mėginių rezul-

tatai parodė, kad pacientams, kurie vartojo ekstenatidą, tuo metu buvo padidėjęs insulino receptoriaus substrato IRS-1 fosforilinimas ir sustiprėję insulino signalai smegenyse, lyginant su kontroline grupe, kuriai buvo taikytas placebo gydymas. Taip pat sergantiesiems buvo nustatyti ir kiti tarpląstelinio pūslelių biožymenų reikšmingi pokyčiai, kurie siejami su PL metu progresuojančiais judėjimo sutrikimais [50]. Tai įrodo, kad pagal egzozomas galima stebėti gydymo efektyvumą ir prognozuoti ligos eigą.

## APIBENDRINIMAS

Parkinsono ligos patogenezėje svarbų vaidmenį atlieka tarpląstelinės pūslelės, t. y. egzozomos, kurios gali būti išskiriamos iš nervinių ląstelių, dalyvaujančių šios neurodegeneracinės ligos vystymesi. Atliktų tyrimų rezultatai įrodo egzozomų dalyvavimą ląstelių tarpusavio komunikacijoje, tarpininkavimą dalinantis biologine informacija ir medžiagomis, vaistų pernešimą į galvos smegenis bei gebėjimą pereiti kraujo ir smegenų barjerą. Dėl šių ypatybių, tiriant pacientų kraujo serumą ar plazmą, įmanoma gauti naudingą informaciją apie ligą. Gavus specifinę informaciją, galima atitinkamai diagnozuoti, gydyti ir prognozuoti ligos eigą, įvertinant organizmo atsaką į taikytą gydymą.

Nors šiuo metu PL simptomų kontrolei taikomi medikamentinis ir chirurginis metodai, vis dar išlieka poreikis ieškoti naujų, saugesnių, efektyvesnių ir mažiau invazinių gydymo būdų. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų instituto, Neurochirurgijos klinikos ir Kauno technologijos universiteto tyrėjų komandos glaudžiai bendradarbiauja įgyvendinant bendrą Lietuvos mokslų tarybos finansuojamą projektą Nr. S-SEN-20-15 „Neurochirurginio Parkinsono ligos gydymo galimybių plėtra pritaikant molekulinis žymenis, gama peilio technologiją ir individualizuotą dozimetriją“. Šiuo projektu siekiama prisidėti prie gilesnio PL supratimo ir gydymo alternatyvų plėtos tiek analizuojant jau pripažintų chirurginio PL gydymo būdų efektyvumą, tiek tiriant naujus potencialius gama peilio radiochirurgijos taikinius, analizuojant kraujo egzozomose vykstančius miRNR raiškos pokyčius ir neuropsichologinius žymenis. Tikimasi, kad intensyvūs viso pasaulio mokslininkų tyrimai padės pritaikyti pacientui tinkamiausią gydymo strategiją ir sumažins komplikacijų riziką.

## Literatūra

1. Mhyre TR, Boyd JT, Hamill RW, Maguire-Zeiss KA. Parkinson's disease. *Subcell Biochem* 2012; 65: 289–455. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_16)
2. Samii A, Nutt JG, Ransom BR. Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 363(9423): 1783–93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16305-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16305-8)
3. Sung VW, Nicholas AP. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. *Neurol Clin* 2013; 31: S1–16.



4. Twelves D, Perkins KS, Councell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18: 19–31. <https://doi.org/10.1002/mds.10305>
5. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 2016; 46: 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>
6. Valstybinė ligonių kasa prie Sveikatos apsaugos ministerijos 2019. Prieiga per internetą: <http://old.vlk.lt/naujienos/Puslapiai/Kova-su-Parkinsono-liga-pernai-tam-prireik%C4%97-beveik-5-mln-eur%C5%B3.aspx>
7. GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 2016; 17(11): 939–53.
8. Videnovic A. How long can a person live with Parkinson's disease? [Internet] *AgingCare*. 2020. Available from: <https://www.agingcare.com/articles/parkinsons-disease-how-long-can-a-person-live-after-diagnosis-123302.htm>
9. Jučaitė A. Dopaminerginė galvos smegenų veiklos moduliacija ir kognityvios funkcijos (literatūros apžvalga). *Medicina* 2020; 38(4): 357–62.
10. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M.  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *PNAS USA* 1998; 95: 6469–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
11. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3: 17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
12. Mor DE, Ugras SR, Daniels MJ, Ischiropoulos H. Dynamic structural flexibility of  $\alpha$ -synuclein. *Neurobiol Dis* 2016; 88: 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.12.018>
13. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24(2): 197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
14. Stefanis L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(2): a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
15. Hipp G, Vaillant M, Diederich NJ, Roomp K, Satagopam VP, Banda P, et al. The Luxembourg Parkinson's Study: a comprehensive approach for stratification and early diagnosis. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 326. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00326>
16. Pérez M, Avila J, Hernandez F. Propagation of tau via extracellular vesicles. *Front Neurosci* 2019; 13: 698. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00698>
17. Raposo G, Stahl PD. Extracellular vesicles: a new communication paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2019; 20: 509–10. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0158-7>
18. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 255–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
19. Chistiakov DA, Chistiakov AA.  $\alpha$ -Synuclein-carrying extracellular vesicles in Parkinson's disease: deadly transmitters. *Acta Neurol Belg* 2017; 117: 43–51. <https://doi.org/10.1007/s13760-016-0679-1>
20. Yu H, Sun T, An J, Wen L, Liu F, Bu Z, et al. Potential roles of exosomes in Parkinson's disease: from pathogenesis, diagnosis, and treatment to prognosis. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 86. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00086>
21. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2011; 12(12): 1659–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>
22. Chaput N, Flament C, Viaud S, Taieb J, Roux S, Spatz A, et al. Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations. *J Leukoc Biol* 2006; 80(3): 471–8. <https://doi.org/10.1189/jlb.0206094>
23. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; 30: 3.22.1–9.
24. Niel G, D'Eangelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 213–28. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
25. Klumperman J, Raposo G. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(10): a016857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016857>
26. Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2002; 3(5): 321–30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x>
27. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(9): 1574–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.018>
28. Berardelli A, Wenning GK, Antonini A, Berg D, Bloem BR, Bonifati V, et al. EFNS/MDS-ES recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2013; 20(1): b16–34.
29. Zafar S, Yaddanapudi SS. Parkinson Disease. [Updated 2020 Aug 10]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470193/>
30. Gray M, Dunning C, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, et al. Acceleration of  $\alpha$ -synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem* 2015; 290(5): 2969–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585703>
31. Niu M, Li Y, Li G, Zhou L, Luo N, Yao M, et al. A longitudinal study on  $\alpha$ -synuclein in plasma neuronal exosomes as a biomarker for Parkinson's disease development and progression. *Eur J Neurol* 2020; 27(6): 967–74. <https://doi.org/10.1111/ene.14208>
32. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol* 2008; 29(8): 357–65. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.05.002>
33. Chang C, Lang H, Geng N, Wang J, Li N, Wang X. Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: important mediator of neurodegeneration in PD. *Neurosci Lett* 2013; 548: 190–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.009>
34. Xia Y, Zhang G, Han C, Ma K, Guo X, Wan F, et al. Microglia as modulators of exosomal alpha-synuclein transmission. *Cell Death Dis* 2019; 10: 174. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1404-9>
35. Grasso M, Piscopo P, Confaloni A, Denti MA. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. *Molecules* 2014; 19(5): 6891–910. <https://doi.org/10.3390/molecules19056891>
36. Emamzadeh FN, Surguchov A. Parkinson's disease: biomarkers, treatment, and risk factors. *Front Neurosci* 2018; 12: 612. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00612>

37. Bartel DP. Metazoan microRNAs. *Cell* 2018; 172(1): 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
38. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* 2011; 46(2): 409–18. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>
39. Russo I, Bubacco L, Greggio E. Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis* 2012; 1(3): 217–25.
40. Soreq L, Salomonis N, Bronstein M, Greenberg DS, Israel Z, Bergman H, et al. Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes. *Front Mol Neurosci* 2013; 6: 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00010>
41. Dos Santos MCT, Barreto-Sanz MA, Correia BRS, Bell R, Widnall C, Perez LT, et al. miRNA-based signatures in cerebrospinal fluid as potential diagnostic tools for early stage Parkinson's disease. *Oncotarget* 2018; 9(25): 17455–65. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24736>
42. Oliveira SR, Dionisio PA, Guedes LC, Goncalves N, Coelho M, Rosa MM, et al. Parkinson's disease pathophysiology. *Biomolecules* 2020; 10(6): 945. <https://doi.org/10.3390/biom10060945>
43. Chen Y, Gao C, Sun Q, Pan H, Huang P, Ding J, et al. MicroRNA-4693 is a regulator of DJ-1 expression and a potential early diagnostic marker for Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 2018; 9: 232. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00232>
44. Arshad AR, Sulaiman SA, Saperi AA, Jamal R, Mohamed Ibrahim N, Abdul Murad NA. Review microRNAs and target genes as biomarkers for the diagnosis of early onset of Parkinson disease. *Front Mol Neurosci* 2017; 10: 352. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00352>
45. Cerri S, Ghezzi C, Sampieri M, Siani F, Avenali M, Dornini G, et al. The exosomal/total  $\alpha$ -synuclein ratio in plasma is associated with glucocerebrosidase activity and correlates with measures of disease severity in PD patients. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 125. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00125>
46. Cao XY, Lu JM, Zhao ZQ, Li MC, Lu T, An XS, et al. MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci Lett* 2017; 644: 94–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.045>
47. Barbagallo C, Mostile G, Baglieri G, Giunta F, Luca A, Raciti L, et al. Specific signatures of serum miRNAs as potential biomarkers to discriminate clinically similar neurodegenerative and vascular-related diseases. *Cell Mol Neurobiol* 2020; 40(4): 531–46. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00751-y>
48. Qu M, Lin Q, Fu Y, Wang L, He S, Fu Y, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease. *J Control Release* 2018; 287: 156–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.08.035>
49. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release* 2015; 207: 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>
50. Athauda D, Gulyani S, Karnati HK, Li Y, Tweedie D, Mustapic M, et al. Utility of neuronal-derived exosomes to examine molecular mechanisms that affect motor function in patients with Parkinson's disease: a secondary analysis of the Exenatide-PD Trial. *JAMA Neurol* 2019; 76(4): 420–9. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.4304>

A. Mišeikaitė, P. Vaitkienė

## PARKINSON'S DISEASE AND EXOSOMES: FROM PATHOGENESIS TO DIAGNOSIS AND TREATMENT

### Summary

Parkinson's disease (PD) is considered the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease, with a mean onset age of 55 years. Although the clinical symptoms, neuronal changes, and various molecular mechanisms involved in this neuropathological disorder have been studied for many years, the diagnosis and treatment of the disease remain challenging. Of great interest are exosomes, extracellular vesicles isolated from the cellular endosomal system. It has been investigated that most cells, including nerve cells, in the brain can secrete these 50–150 nm diameter vesicles which can affect protein activity and gene expression. Due to their internal content and ability to move in an intercellular environment, exosomes are considered to play an important role in the accumulation and transportation of various molecular markers, such as  $\alpha$ -synuclein protein or microRNA (miRNA), and to take a part in inflammatory processes in nervous tissue. Since the content of the exosomes depends on the cell that secretes them and can change during the progression of the disease, exosome studies can help to understand the pathogenesis and control the course of the disease. There is growing evidence of the importance of exosomes for cell-to-cell communication, mediating the exchange of biological information and substances, and the ability to cross the blood-brain barrier. Due to their ability to cross the blood-brain barrier, exosomes may be promising for drug or molecular transportation and help in the development of more effective treatments for PD and other diseases of the nervous system.

The article reviews the biogenesis of exosomes and their potential roles in the diagnosis, treatment, and long-term outcome of Parkinson's disease.

**Keywords:** Parkinson's disease, exosomes,  $\alpha$ -synuclein, miRNA.

Gauta:  
2021 03 23

Priimta spaudai:  
2021 05 12