

Urinski zunajcelični vezikli kot potencialni biološki označevalci za odkrivanje okvare presajene ledvice

Urinary extracellular vesicles as potential biomarkers for detecting kidney allograft injury

Maja Vodusek^{1,2}, Metka Lenassi², Miha Arnol^{1,3}

¹Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za nefrologijo

²Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

³Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino

Avtor za korespondenco:

Maja Vodusek, mag. mikrobiol.

Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Klinični oddelek za nefrologijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

e-pošta: maja.vodusek@kclj.si

POVZETEK

Presaditev ledvice je najuspešnejša oblika zdravljenja končne ledvične odpovedi, saj zagotavlja boljšo kakovost življenja in daljše preživetje bolnikov kot dializa. Kljub napredku ostaja zgodnje odkrivanje okvare presadka zahtevno, saj je biopsija – trenutni diagnostični standard – invazivna, podvržena subjektivni presoji histopatoloških sprememb in pogosto nereprezentativna za stanje celotnega presajenega organa. Zato obstaja potreba po zanesljivih, neinvazivnih bioloških označevalcih, ki bi omogočili pravočasno odkrivanje okvare in učinkovitejše spremljanje delovanja presadka. Zunajcelični vezikli (ZV), majhne membranske strukture, ki jih celice sproščajo za medcelično komunikacijo, izkazujejo velik potencial kot biološki označevalci. Njihova sestava odraža stanje starševskih celic, nahajajo pa se v različnih telesnih tekočinah, tudi v urinu, ki je enostavno dostopen in neinvaziven za zbiranje. Urinski ZV (uZV) tako predstavljajo obetavno diagnostično orod-

je za neinvazivno spremljanje presajenih ledvic. V tem prispevku predstavljamo pomen uZV pri presaditvi ledvice, s poudarkom na njihovi biogenezi, metodah izolacije, lastnostih in možnosti uporabe pri zgodnjem odkrivanju zavrnitve presadka.

Ključne besede: zunajcelični vezikli, biološki označevalci, urin, presaditev ledvice

ABSTRACT

Kidney transplantation remains the most effective treatment for end-stage kidney disease and offers better quality of life and longer survival compared to dialysis. Despite advances in transplantation medicine, early detection of allograft injury remains a challenge. The current diagnostic gold standard—biopsy—is invasive, subject to variability in the interpretation of histologic changes and often not »

representative of the entire graft status. This underscores the growing need for reliable, non-invasive biomarkers that enable timely detection of rejection and more effective monitoring of allograft function. Extracellular vesicles (EVs), small membrane-bound particles released by cells to mediate intercellular communication, are emerging as promising biomarkers. Their molecular cargo reflects the physiological state and origin of the parent cells, and they are present in various body fluids, including urine - a readily available and non-invasive sample. Urinary extracellular vesicles (uEVs) therefore offer a compelling opportunity for real-time insight into the status of the transplanted kidney. This review highlights the diagnostic potential of uEVs in kidney transplantation, focusing on their biogenesis, isolation methods, molecular characteristics, and their emerging role in the early detection of allograft rejection.

Keywords: extracellular vesicles, biomarkers, urine, kidney transplantation

UVOD

Presaditev ledvice je najboljša oblika nadomestnega zdravljenja končne ledvične odpovedi, saj omogoča daljše preživetje in boljšo kakovost življenja kot dializa (1). Slovenija je od leta 2000 članica organizacije Eurotransplant (ET). ET je mednarodna neprofitna organizacija, ki povezuje transplantacijske centre iz osmih evropskih držav, vključno s Slovenijo. Skrbi za pravično in optimalno dodelitev darovanih organov s pomočjo centralne baze podatkov in algoritma, ki upošteva medicinska in etična merila, kot so tkivno ujemanje, krvna skupina, nujnost in pričakovani izid. ET omogoča izmenjavo ledvic, jeter, srca, pljuč, trebušne slinavke in črevesja ter zagotavlja, da organi pravočasno dosežejo ustrezne prejemnike (2). Leta 2024 je bilo v okviru ET opravljenih 7.150 presaditev organov, med njimi 3.222 presaditev ledvic. Kljub temu je konec leta na čakalni listi ostalo še 13.570 bolnikov (3). V letu 2023 je v Sloveniji na novo ledvico čakalo 76 bolnikov, s povprečno čakalno dobo 274 dni oziroma približno devet mesecev. V UKC Ljubljana, edinem slovenskem centru za presaditev ledvic, so v tem obdobju izvedli 51 presaditev (4). ET in Slovenija se soočata z istim izzivom – povpraševanje po organih bistveno presega njihovo razpoložljivost. Pri slovenskih bolnikih po presaditvi ledvice je petletno preživetje bolnikov približno 94 %, preživetje presadka pa okoli 87 %.

Po desetih letih se preživetje bolnikov zmanjša na 82 %, preživetje presadka pa na 71 % (5). Vsak organ je zato izjemno dragocen, natančno spremljanje njegovega delovanja pa ključnega pomena.

Zgodnje prepoznavanje in pravočasno ukrepanje ob okvari presadka ostajata izziv. Na preživetje presajene ledvice vpliva več imunoloških in neimunoloških dejavnikov, med drugim stopnja neskladja v HLA (angl. *human leukocyte antigen*), vrsta darovalca, starost darovalca in prejemnika, trajanje ishemije, osnovna bolezen in ponovitev osnovne bolezni, oportunistične okužbe s poliomavirusom BK in citomegalovirusom (CMV), vrsta imunosupresije, prisotnost arterijske hipertenzije ali sladkorne bolezni ter izkušnje in kakovost oskrbe v transplantacijskem centru (6). Uspešnost presaditve omejujejo imunski odziv prejemnika, učinkovitost imunosupresije in pomanjkljiv nadzor delovanja presadka. Okvara presadka, pogost zaplet po transplantaciji, je lahko posledica imunskih (zavrnitvev) ali neimunskih dejavnikov (npr. okužbe, toksičnost imunosupresivnih zdravil) (7). Za boljše izide so nujno potrebne natančnejše in neinvazivne diagnostične metode ter novi terapevtski pristopi (8).

ZAVRNITEV IN DRUGI VZROKI OKVARE PRESAJENE LEDVICE

Okvara in zmanjšanje delovanja presadka je posledica neravnovesja med imunsko in neimunsko posredovano okvaro ter omejene sposobnosti regeneracije (1). Dolgotrajno preživetje presadka ostaja velik izziv, predvsem zaradi akutne in kronične zavrnitve (9). Zavrnitve delimo na humoralne, ki so posledica prisotnosti protiteles proti darovalcu (angl. *antibody-mediated rejection*, ABMR) (10), in celične, pri katerih v medceličnino vdrejo T-celice in makrofagi (angl. *T cell-mediated rejection*, TCMR) (11).

Kronična ABMR poteka počasi in postopno, od nastanka protiteles proti neskladnim HLA darovalca (angl. *donor specific antibodies*, DSA), poškodb kapilar do razvoja transplantacijske glomerulopatije (12). Protitelesa povzročajo poškodbo presadka predvsem z aktivacijo endotelij-skih celic (EC), sistema komplementa in aktivacijo levkocitov. Aktivacija in poškodba EC je ključni mehanizem pri

»

ABMR: DSA se vežejo na HLA ali ne-HLA molekule na površini EC, kar sproži signalne poti, ki vodijo do povečane izraženosti kemokinov, ki privabljajo naravne celice ubijalke (celice NK), nevtrofilce in makrofage, kar povzroča vnetje, kapilaritis in poškodbo tkiva (6, 13). Za akutno ABMR so značilni tudi agregacija trombocitov, trombotična mikroangiopatija in kopičenje nevtrofilcev, kar povzroči zgodnjo celično nekrozo in hitro slabšanje delovanja presadka (13). TCMR je oblika aloimunskega odziva, kjer imunski sistem prejemnika prepozna presadek kot tujek in sproži vnetje predvsem v tubulih in intersticiju presajene ledvice. Povzročata jo tako prirojeni kot pridobljeni imunski odziv. Molekulski vzorci poškodbe (angl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) aktivirajo fagocite, ki sproščajo vnetne citokine, medtem ko neujemajoči epitopi HLA sprožijo T-celični imunski odziv. Aktivirani limfociti T sproščajo vnetne mediatorje, kar povzroča nadaljnjo okvaro presadka (14, 15).

Pogostost ponovitve osnovne ledvične bolezni po transplantaciji je bila dolgo podcenjena. Čeprav je ponovitev bolezni pogosto manj izpostavljena kot zavrnitev presadka, nedavni podatki kažejo, da je pri nekaterih primarnih ledvičnih boleznih (npr. membranoproliferacijski glomerulonefritis, nefropatija IgA, primarna fokalna segmentna glomeruloskleroza in membranska nefropatija) ponovitev bolezni v približno 60 % primerov glavni vzrok za izgubo presadka (16).

DIAGNOSTIČNI IZZIVI PRI SPREMLJANJU OKVARE PRESAJENE LEDVICE

Trenutno se številne bolezni ledvic in sečil diagnosticirajo s slabo občutljivimi in nespecifičnimi biološkimi označevalci (17). Spremembe delovanja presadka se še vedno ocenjujejo na podlagi koncentracije serumskega kreatinina in ocene hitrosti glomerulne filtracije, ki sta pozna in nespecifična pokazatelja ledvične okvare (18). DSA lahko nakazuje tveganje za prihodnjo zavrnitev, vendar ne zaznajo njenega dejanskega začetka, zato niso primerna za zgodnje odkrivanje zavrnitve (19). Ledvična biopsija, zlati standard za diagnozo zavrnitve presadka, je invazivna, draga in povezana s tveganjem za krvavitve ter subjektivno in-

terpretacijo (20). Njena natančnost je omejena zaradi naključnega vzorčenja in možnosti lažno negativnih izvidov, saj odsotnost histoloških sprememb ne izključuje prisotnosti lezije v presadku (21). Protokolne (nadzorne ali časovno določene) biopsije omogočajo odkrivanje subkliničnih bolezenskih sprememb, ki jih z določanjem serumskega kreatinina ne zaznamo. Indikacijske biopsije, opravljene ob kliničnih znakih okvare, ostajajo ključne za diagnozo zavrnitve in drugih vzrokov okvare presadka (22–24). Standardizirana histološka klasifikacija zavrnitve presadka je bila prvič oblikovana leta 1991 na srečanju strokovnjakov v Banffu v Kanadi; od tu ime klasifikacija po Banffu (25). Smernice se posodablajo približno na dve leti, in sicer kot rezultat rednih srečanj, kjer strokovnjaki uskladijo nova priporočila glede diagnostike zavrnitve presadka (26, 27). Molekularne tehnologije, kot je transkriptomsko profiliranje, dopolnjujejo klasično histološko oceno biopsij in ponujajo nove vpoglede v mehanizme okvare. Enako kot pri biopsiji tudi tukaj ostaja težava naključnega vzorčenja (21). Molekularni mikroskop (angl. *molecular microscope diagnostic system*, MMDx) uporablja dvostopenjski pristop: najprej mikromreže izmerijo izražanje približno 50.000 mRNA v biopsiji, nato pa algoritmi strojnega učenja rezultate primerjajo z referenčnimi vzorci za diagnozo (28, 29).

Eden najnovejših označevalcev okvare presadka je prosto-celična DNA (angl. *cell free DNA*, cfDNA), vključno z donor-specifično cf-DNA (angl. *donor derived cell-free DNA*, dd-cfDNA) (30), ki je lahko vezana na zunajcelične vezikle (ZV), kar podaljša njeno stabilnost in življenjsko dobo v telesnih tekočinah. Raven dd-cfDNA, višja od 1 % v plazmi prejemnika, nakazuje zavrnitev ledvičnega presadka (19, 31).

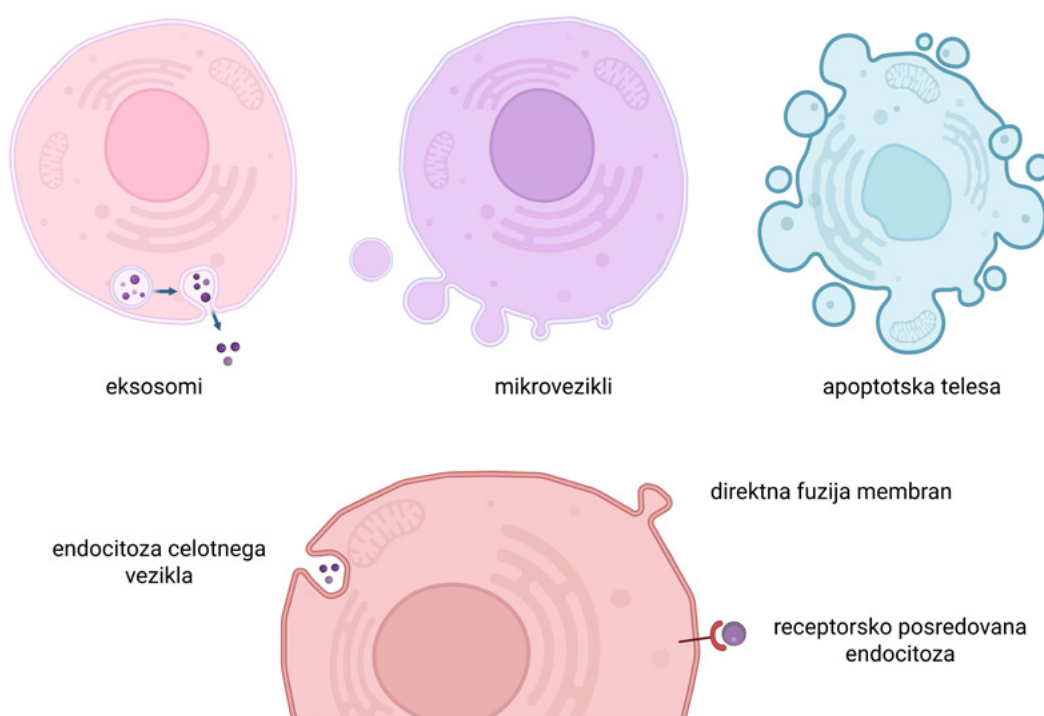
Po presaditvi se delovanje presadka običajno spremlja s kombinacijo kliničnih, laboratorijskih, slikovnih in histoloških preiskav. Takšen zapleten pristop odraža dejstvo, da še vedno nimamo zanesljive neinvazivne metode za zaznavanje in opredelitev procesov, ki povzročajo okvaro presadka. Zaradi tega vse več raziskav posveča pozornost zunajceličnim veziklom kot novim biološkim označevalcem (32).

ZUNAJCELIČNI VEZIKLI

ZV so membranski vezikli, obdani z lipidnim dvoslojem in nezmožni samostojnega razmnoževanja (33). Tovor, sestava membrane in velikost ZV so zelo raznoliki in se neneh- »

no spreminjajo, kar je odvisno od celičnega izvora, njene pato-fiziološke stanja ter okoljskih pogojev (34, 35). V povprečju so ZV veliki med 30 in 1000 nm (36). ZV služijo kot prenašalci informacij pri medcelični komunikaciji, celicam tudi omogočajo odstranjevanje neželenih snovi (35). Poznamo tri glavne skupine ZV: eksosomi, celični mikrodcelci/mikrovezikli/ektosomi in apoptotska telesa. Najmanjši ZV, imenovani eksosomi, nastanejo z zlitjem multivezikularnih teles s celično membrano. Mikrovezikli se odcepijo neposredno iz membrane, medtem ko apoptot-

ska telesa nastanejo pri programirani celični smrti (34, 35) (Slika 1). ZV lahko vplivajo na tarčne celice preko vezave ligandov na celične receptorje, z neposredno fuzijo svoje membrane s plazemsko membrano tarčne celice ali z endocitozo, pri čemer njihova vsebina uide razgradnji v lizosomih (35) (Slika 1). ZV so zaznali v krvi, urinu in drugih telesnih tekočinah, kot so semenska tekočina, likvor, slina, mleko, žolč, ascites, amnijska tekočina in plevralna tekočina (35, 37).



Slika 1: Nastanek in prevzem zunajceličnih veziklov (ZV). Shema prikazuje nastanek treh glavnih vrst ZV: eksosomov, ki nastajajo z izločanjem iz multivezikularnih teles, mikroveziklov, ki brstijo neposredno iz plazemske membrane, ter apoptotskih teles, ki nastanejo med programirano celično smrtjo. Prikazani so tudi glavni mehanizmi prevzema ZV v tarčne celice. Shema je bila pripravljena z uporabo orodja BioRender.

Figure 1: Biogenesis and uptake of extracellular vesicles (EVs). The schematic illustrates the formation of the three main types of EVs: exosomes, released from multivesicular bodies; microvesicles, which bud directly from the plasma membrane; and apoptotic bodies, formed during programmed cell death. The main mechanisms of EV uptake by target cells are also depicted. The figure was created using BioRender.

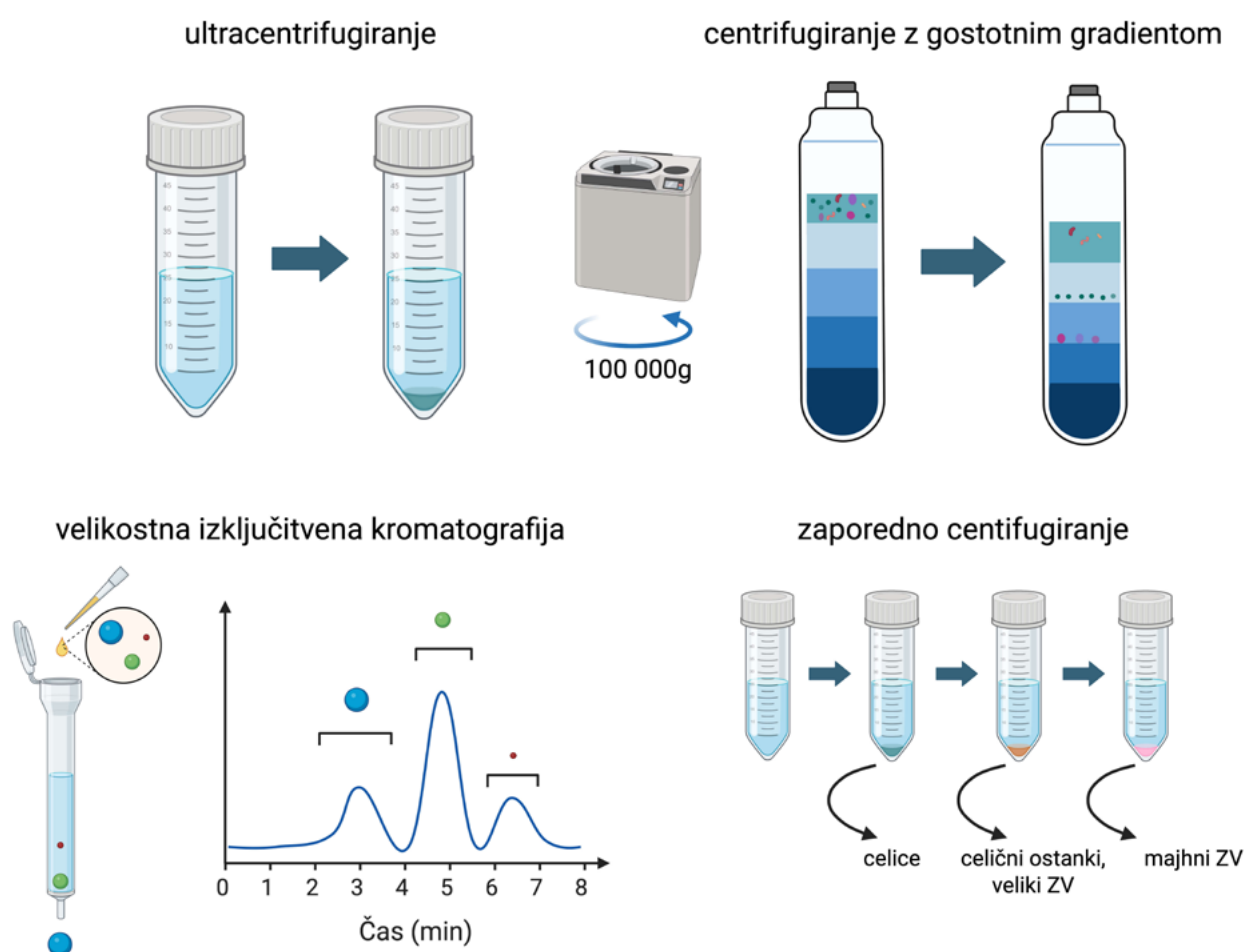
ZV lahko prenašajo molekule v notranjosti ali v na membrani (35). Ker imajo podobno molekularno sestavo kot celice, iz katerih izvirajo, ZV vsebujejo različne molekule, vključno s proteini, nukleinskimi kislinami, lipidi in metaboliti (18). Nabor vseh trenutno identificiranih vezikularnih

biomolekul je dostopen v bazah podatkov, kot so Vesiclepedia (38, 39), ExoCarta (40, 41) in EVpedia (42, 43).

Velik izziv pri raziskovanju ZV predstavljata njihova heterogenost in pomanjkanje enotne metode za izolacijo. »

Izbor izolacijske metode je namreč odvisen od sestave preučevane biološke tekočine in od nadaljnjega analitičnega pristopa, saj ta vpliva na čistost ZV pripravka in učinkovitost izolacije ZV (8). Najpogostejše uporabljene metode izolacije ZV so ultracentrifugiranje, zaporedno centrifugiranje, velikostna izključitvena kromatografija (angl. *size exclusion chromatography*, SEC) in ločevanje na gostotnem gradientu (Slika 2). Pri ultracentrifugiranju se za ločevanje ZV od ostalih komponent vzorca uporablja zelo visoka centrifugalna sila (okoli $100.000 \times g$), ki ločuje delce glede na njihovo velikost in gostoto – manjši ali manj

gosti delci se zato slabše posedajo. Zaporedno centrifugiranje lahko zmanjša kontaminacijo z ne-ZV delci, vendar hkrati poveča tveganje za poškodbe veziklov in zmanjšanje izplena. SEC ločuje delce glede na velikost, pri čemer manjši delci in proteini počasneje prehajajo skozi kolono, medtem ko se ZV izločijo v zgodnjih frakcijah. Centrifugiranje z gostotnim gradientom uporablja gostotni medij (npr. iodixanol) za ločevanje delcev glede na njihovo plovno gostoto, kar omogoča boljšo čistost ZV, vendar je postopek dolgotrajen (33,37,44).



Slika 2: Shematski prikaz pogosto uporabljenih metod za izolacijo zunajceličnih veziklov, vključno z ultracentrifugiranjem, centrifugiranjem z gostotnim gradientom, velikostno izključitveno kromatografijo (SEC) in zaporednim centrifugiranjem. Shema je bila pripravljena z orodjem BioRender.

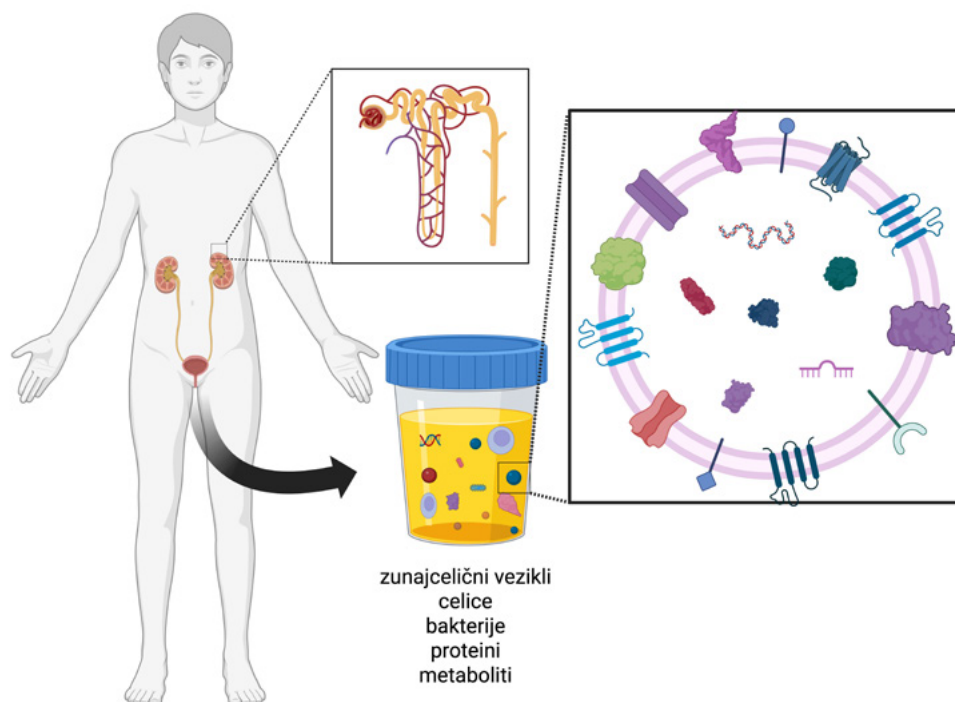
Figure 2: Schematic representation of commonly used methods for extracellular vesicle isolation, including ultracentrifugation, density gradient centrifugation, size exclusion chromatography (SEC), and sequential centrifugation. The illustration was created with BioRender.

»

ZUNAJCELIČNI VEZIKLI KOT BIOLOŠKI OZNAČEVALCI

Minimalno invazivni odvzem telesnih tekočin, t. i. tekočinska biopsija, je obetavna alternativa invazivnim biopsijam pri diagnostiki po presaditvah organov (9). Urin je druga najpogostejše analizirana telesna tekočina, saj ga lahko neinvazivno in ponavljajoče zbiramo v večjih količinah. Večina urinskih ZV (uZV) izvira iz različnih delov urogenitalnega trakta, predvsem iz ledvic, sečnih vodil in pri moških tudi iz prostate. Zaradi tega so uZV in njihova vsebina obetavni biološki označevalci za neinvazivno odkrivanje bolezni teh organov (18, 33) (Slika 3). Nekateri viri poročajo, da lahko del uZV izvira iz krvnega obtoka in vsebuje ZV imunskih celic (18). Mehanizem prehoda teh ZV v urin ni povsem jassen, vendar v bolezenskih stanjih lahko pride do poškodbe glomerulne filtracijske bariere, kar lahko omogoči prehod večjih delcev, kot so majhni ZV (18, 45, 46).

Prvi jutranji urin je običajno najbolj koncentriran, kar lahko pomeni višjo koncentracijo uZV, vendar so študije pokazale le manjše razlike v vsebnosti uZV med prvim in drugim jutranjim urinom (18). Težavo pri izolaciji uZV predstavlja prisotnost Tamm-Horsfallovega proteina (THP), ki lahko ujame uZV, vendar dodatek fosfatnega pufru in etilendiamintetraoetne kisline (EDTA) lahko pomaga sprostiti vezikle iz kompleksa zamreženih THP (47). Za urin je značilna tudi variabilnost v koncentriranosti, ki je posledica več faktorjev, kot npr. stopnja hidracije, prehrana in razlike v delovanju ledvic med posamezniki (18). Za primerjavo uZV bioloških označevalcev med posamezniki je zato nujna normalizacija podatkov (33). Najpogostejše se za normalizacijo uporablja koncentracijo kreatinina v urinu, kar je že uveljavljen pristop v kliniki za urinske biološke označevalce, vendar ob zavedanju, da ima tudi ta pristop nekatere slabosti (48). Nekatere študije kažejo tudi na vpliv starosti, spola in telesne aktivnosti na sproščanje uZV, zato je ob odvzemu urina pomembno zbrati čim več demografskih in kliničnih podatkov, da lahko upoštevamo oziroma izključimo njihov morebitni vpliv na preučevane uZV biološke označevalce (18).



Slika 3: Izvor urinskih zunajceličnih veziklov v urinu. Shema je bila pripravljena z orodjem BioRender.

Figure 3: Origin of urinary extracellular vesicles in urine. The illustration was created using BioRender.



Urinski zunajcelični vezikli kot biološki označevalci pri presaditvi ledvice

Spremljanje imunskega dogajanja in razvoj neinvazivnih bioloških označevalcev za zgodnje odkrivanje zavrnitve presadka predstavljata pomemben izziv na področju presaditve ledvice. Profiliranje ZV v bioloških tekočinah ponuja obetavno neinvazivno diagnostično orodje, zlasti, če omogoča zaznavo zavrnitve še pred pojavom nepopravljive okvare presadka (8).

uZV posredujejo pri komunikaciji znotraj nefrona, med glomeruli in tubuli ter med različnimi deli tubula (45, 49), medtem ko krvni ZV omogočajo komunikacijo med organi. Oboji lahko prispevajo k okvari ledvic in vnetju (23, 45). Ker molekularni profil odraža starševsko celico in njeno pato-fiziološko stanje, imajo potencialno diagnostično vrednost (36).

V zadnjih letih je več raziskav potrdilo diagnostični potencial raznolike vsebine uZV pri zaznavanju ledvične okvare po presaditvi. S pomočjo TaqMan OpenArray panela s 586 vnetnimi geni so identificirali 15-genski podpis (*CXCL11*, *CD74*, *IL32*, *STAT1*, *CXCL14*, *SERPINA1*, *B2M*, *C3*, *PYCARD*, *BMP7*, *TBP*, *NAMPT*, *IFNGR1*, *IRAK2* in *IL18BP*), ki je z veliko natančnostjo ločil zavrnitve od nezavrnitve (AUC 0,93), medtem ko je podsklop petih genov (*CD74*, *C3*, *CXCL11*, *CD44*, *IFNAR2*) razlikoval med TCMR in ABMR (AUC 0,87) (50). Poleg tega se je pokazalo, da DNA, vezana na uZV (evDNA), ki je večinoma vezana na površino uZV in predstavlja do 29 % celotne proste DNA v urinu, omogoča razlikovanje med zavrnitveno in nezavrnitveno poškodbo presadka na podlagi normalizirane količine in izkoristka DNA ter velikosti veziklov (9). mRNA označevalci T-celic (PRF1, OX40, CD3e) in B-celic (CD20, CXCL3, CD46, C3), pridobljeni iz uZV, so uspešno ločili bolnike z okvaro presadka od zdravih kontrol, pri čemer je bila diagnostična natančnost zelo visoka (AUC do 0,98) (7). Površinski fenotip uZV, analiziran s kompletom MACSplex (37 antigenov), je razkril povečano izražanje tetraspaninov (CD9, CD63, CD81) in desetih drugih označevalcev (npr. CD105, CD1c, CD209, CD42a, CD86), povezanih z imunskim odzivom in endotelijem, pri bolnikih z zavrnitvijo (1). Zgodnjo poškodbo je bilo mogoče zaznati tudi z zvišanimi ravnmi uZV-povezanih proteinov akvaporin 2 (angl. *aquaporin-2*, AQP2) in podokaliksina (angl. *podocalyxin*, PODXL), ki sta učinkovito ločevala akutno zavrnitev od akutne tubularne nekroze (51, 52). Proteomske analize uEV so identifi-

cirale več kot 300 proteinov, od katerih so bili številni (npr. DEFA5, CD5L, APOM, FGA) specifično povezani z akutno zavrnitvijo (53). uZV, ki izražajo CD3, so bili pri akutni TCMR znatno povišani (54). Poleg tega je proteomska analiza uZV izpostavila TSPAN1 in HPX kot obetavna biološka označevalca za TCMR z AUC 0,744 (55). Pri kronični aktivni ABMR so bili proteini, kot so APOA1, HPX, C3 in C4a, povišani, medtem ko sta bila PODXL in MUC1 znižana, kar omogoča razlikovanje bolnikov z zavrnitvijo od tistih brez znakov zavrnitve (12). Poleg tega so bile ravnine proteina SYT17 v uZV povišane pri bolnikih s kronično aktivno ABMR (56). Ti rezultati poudarjajo širok diagnostični potencial urinskih ZV pri zaznavanju sprememb na ravni transkriptoma, proteoma in površinskih označevalcev različnih fenotipov okvar ledvičnega presadka.

Analitske metode za analizo zunajceličnih veziklov

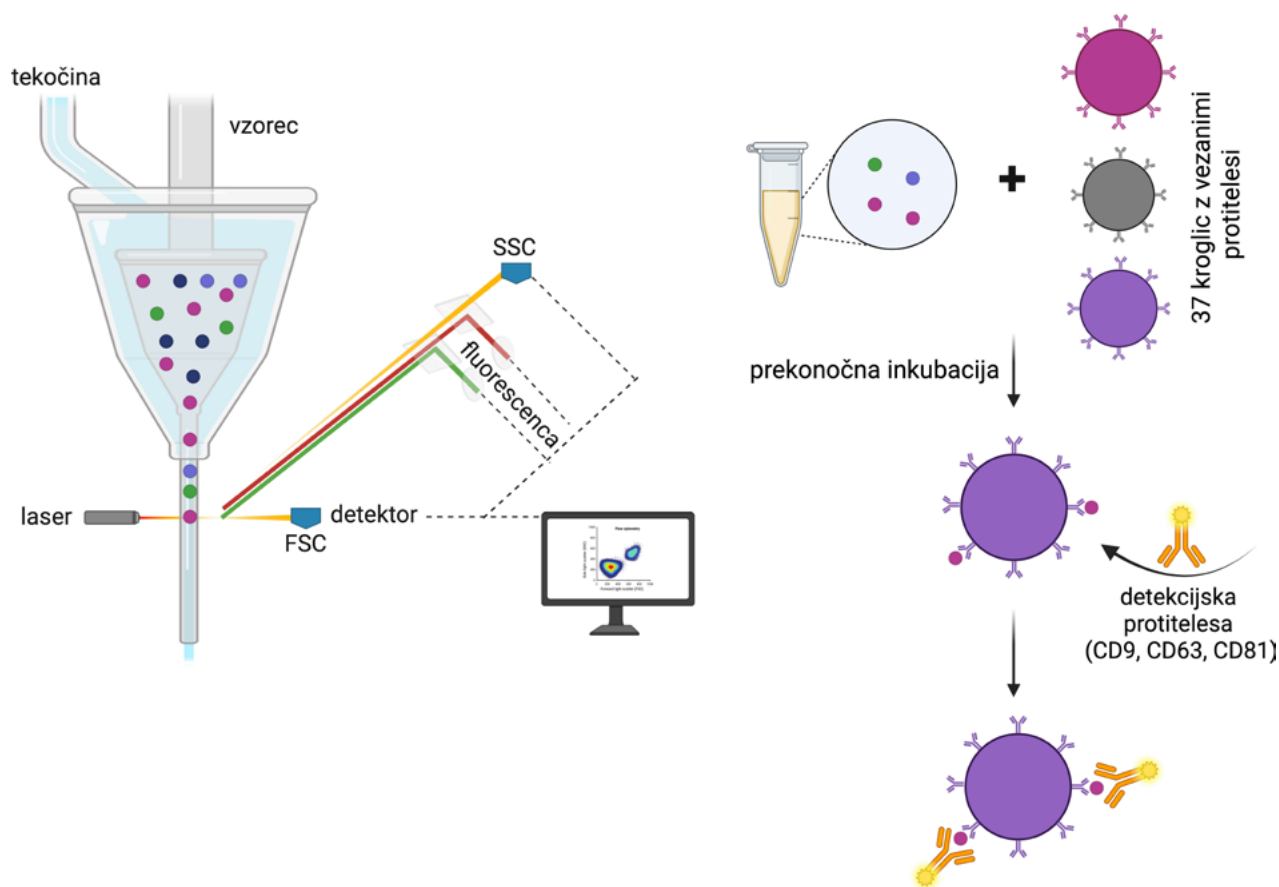
Karakterizacija ZV je otežena zaradi majhnosti veziklov in posledično nizkih količin molekularnega tovora, njihove izjemne heterogenosti ter omejene razpoložljivosti analitskih metod z zadostno občutljivostjo (49). Najpogosteje opredelimo njihovo morfologijo, koncentracijo, velikost in vsebino (proteini, nukleinske kisline, lipidi) (49). Nabor analitskih metod je širok in je podrobneje predstavljen v preglednem članku Welsh in sod. (2024) (33), spodaj pa sta na kratko predstavljeni metodi z velikim potencialom za raziskave uZV, in sicer pretočna citometrija in superresolucijska mikroskopija.

Proteinska karakterizacija uZV s pretočno citometrijo ima velik potencial v diagnostiki urinarnega trakta, saj uZV izvirajo pretežno (99,96 %) iz ledvic in sečnih izvodil (30). Kvantifikacija in karakterizacija ZV je otežena zaradi njihove majhnosti, nizkega števila epitopov, raznolikosti proteinskih označevalcev glede na celični izvor ter prisotnosti nekaterih označevalcev le na luminalni strani veziklov (57). Pretočna citometrija omogoča detekcijo fluorescenčnih signalov, pridobljenih z označevanjem površinskih proteinov s protitelesi, ter analizo sipanja svetlobe posameznih delcev v hidrodinamično usmerjenem toku (58). Zaradi majhnosti ZV je za zanesljivo zaznavanje potreben zelo nizek pretok, s čimer se zmanjša tveganje sočasnega zaznavanja več delcev. Ob osvetlitvi z laserjem ZV sipajo svetlobo naprej (angl. *forward scatter*, FSC) in vstran (angl. *side scatter*, SSC), kar omogoča določanje njihovih fizikalnih lastnosti. Poleg tega metoda omogo-



ča sočasno detekcijo več fluoroforjev, običajno vezanih na protitelesa, specifičnih za površinske označevalce ZV. Ker ZV izražajo le malo tarčnih antigenov, sta ključni uporaba svetlih fluoroforjev in skrbna izbira kombinacij, da se prepreči spektralno prekrivanje (59, 60). Namesto analize posameznih ZV, kjer so lahko zaradi majhnosti ZV težave s senzitivnostjo pretočnega citometra, lahko ZV vežemo na kroglice, obdane s protitelesi za semi-kvantitativno detekcijo vezikularnih površinskih označevalcev. Multipleks

pristop z mešanico kroglic s protitelesi proti različnim površinskim proteinom (npr. MACSPlex kit – 39 različnih kroglic) omogoča hkratno razločevanje ZV glede na njihov celični izvor (61, 62) (Slika 4). Ta pristop je že bil uporabljen pri raziskavah uZV kot bioloških označevalcev za napovedovanje izida ledvičnega presadka (1). S pretočno citometrijo lahko ocenimo tudi velikost ZV, medtem ko posebna membranska barvila omogočajo vpogled v njihovo lipidno sestavo.



Slika 4: Shematski prikaz metode za karakterizacijo proteinov zunajceličnih veziklov, pretočna citometrija in metoda MACSPlex. Shema je bila pripravljena z orodjem BioRender.

Figure 4: Schematic representation of method used for extracellular vesicle protein characterization, flow cytometry and the MACSPlex assay. The illustration was created using BioRender.

>>

Novejši pristop za analizo posameznih ZV je superresolucijska mikroskopija (SRM), ki so jo že uporabili za raziskavo vnetja in poškodb ledvic (63). SRM je skupina tehnik, ki omogočajo opazovanje bioloških struktur z ločljivostjo pod mejo difrakcije svetlobe (200–300 nm) in tako prese-gajo zmogljivosti klasične fluorescenčne mikroskopije. V raziskavah ZV se pogosto uporablja mikroskopija lokalizacije posameznih molekul (angl. *single-molecule localization microscopy*, SMLM). Ta metoda izkorišča lastnost fluoroforov, da naključno prehajajo med aktivnim (svetlečim) in neaktivnim stanjem. V vsakem trenutku je aktiviran le majhen delež fluoroforov, zato so prostorsko ločeni in jih je mogoče natančno lokalizirati z računalniško analizo. Postopek se ponovi več sto- ali tisočkrat, koordinati posameznih molekul pa se zabeležita z visoko natančnostjo. Združitev vseh teh lokalizacij tvori superresolucijsko sliko z ločljivostjo v območju nekaj nanometrov (64). Krio-elektronska mikroskopija (cryo-EM) je metoda elektronske mikroskopije, pri kateri se vzorci brez barvanja ali kemične fiksacije hitro zamrznejo (vitricirajo), s čimer se voda pretvori v steklu podoben amorfen led brez kristalov. Tako ohranjeni vzorci omogočajo opazovanje bioloških struktur v skoraj naravnem stanju z visoko ločljivostjo, pri čemer je mogoče zajeti tudi 3D-tomografske podatke za prikaz kompleksnejših struktur (65). Metoda je bila že uporabljena v raziskavah, ki so preučevale donorsko specifične uZV kot biološke označevalce za oceno stanja ledvičnega presadka pri prejemnikih (66).

KLINIČNA PERSPEKTIVA IN PRIHODNOST

uZV imajo velik potencial kot biološki označevalci, saj jih lahko neinvazivno pridobimo v večjih količinah in omogočajo pogosto vzorčenje (18, 45). Spremembe v količini in sestavi uZV lahko napovedo okvaro ledvic še pred spremembami klasičnih serumskih označevalcev (serumski kreatinin in ocena hitrosti glomerulne filtracije), kar omogoča zgodnejšo neinvazivno diagnostiko. Njihovo klinično uporabo pa omejujejo neenotni postopki zbiranja, shranjevanja, izolacije ter pomanjkanje standardiziranih metod za kvantifikacijo in normalizacijo (45). Idealno bi nove diagnostične metode omogočile prilagojeno zdravljenje, ki bi lahko zmanjšalo prekomerno imunosupresijo, obenem pa omogočilo zgodnje odkrivanje okvare presadka in pravo-

časno ukrepanje. Tak pristop t. i. natančne personalizirane medicine bi lahko zmanjšal obolevnost bolnikov in izboljšal dolgoročno preživetje presadka (21).

ZAKLJUČEK

Presaditev ledvice ostaja zlati standard zdravljenja končne ledvične odpovedi, vendar uspešnost dolgotrajnega preživetja presadka omejujejo zapleti, kot so zavrnitev in drugi vzroki okvare. ZV predstavljajo obetaven, neinvaziven biološki označevalec, ki omogoča zgodnje odkrivanje imunskih in neimunskih poškodb presadka, še preden se pojavijo klinični znaki ali histološke spremembe. Njihova molekulska vsebina omogoča vpogled v stanje izvornih celic in pato-fiziološke procese v presadku, kar lahko prispeva k natančnejšemu neinvazivnemu spremljanju in individualizaciji zdravljenja. Kljub trenutnim izzivom, kot so heterogenost veziklov ter tehnične omejitve pri njihovi izolaciji in analizi, tehnologije za karakterizacijo ZV hitro napredujejo. Nadaljnje raziskave in standardizacija metod bodo omogočili njihovo vključitev v klinično prakso, kar bo prispevalo k izboljšanju zgodnjega odkrivanja zavrnitve presadka, personalizaciji zdravljenja ter s tem daljšemu preživetju presadka in prejemnikov. Raziskave uZV so sofinancirane s strani Agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) v okviru projektov J3-50117 in P1-0170.

LITERATURA

1. Burrello J, Monticone S, Burrello A, Bolis S, Cristalli CP, Comai G, et al. Identification of a serum and urine extracellular vesicle signature predicting renal outcome after kidney transplant. *Nephrol Dial Transplant*. 2023;38(3):764–777.
2. Slovenija – Eurotransplant [Internet]. [accessed on 11. 6. 2025]. Available from: <https://www.eurotransplant.org/region/slovenija/>
3. Eurotransplant. Eurotransplant Factsheet 2024 [Internet]. [accessed on 11. 6. 2025]. Available from: <https://www.eurotransplant.org/statistics/factsheet/>
4. Slovenija-transplant. Darovanje in transplantacije organov in tkiv v Sloveniji 2023 [Internet]. [accessed on 11. 6. 2025]. Available from: <https://www.slovenija-transplant.si/wp-content/uploads/2024/06/e-brosura-slo-web.pdf>
5. Darovanje ledvice – kaj povedo številke. Postani darovalec [Internet]. [accessed on 11. 6. 2025]. Available from: <https://postanidarovalec.si/novice/darovanje-ledvice-kaj-povedo-stevilke/>



6. Valavoor S, Anand M, Govil A. Antibody-mediated rejection in kidney transplant: An unmastered area. *Indian J Transplant.* 2024;18(2):101–8.
7. Singh AD, Nagalla B, Patnam S, Satyanaryana G, Andrews R, Panigrahi AK, et al. Exploring urinary extracellular vesicles for organ transplant monitoring: A comprehensive study for detection of allograft dysfunction using immune-specific markers. *Clin Chim Acta.* 2023;548:117525.
8. Ashcroft J, Leighton P, Elliott TR, Hosgood SA, Nicholson ML, Kosmoliaptis V. Extracellular vesicles in kidney transplantation: a state-of-the-art review. *Kidney Int.* 2022;101(3):485–97.
9. Sedej I, Štalekar M, Tušek Žnidarič M, Goričar K, Kojc N, Kogovšek P, et al. Extracellular vesicle-bound DNA in urine is indicative of kidney allograft injury. *J Extracell Vesicles.* 2022;11(9):e12268.
10. Novotny M, Kment M, Viklicky O. Antibody-mediated rejection of renal allografts: diagnostic pitfalls and challenges. *Physiol Res.* 2021;70(Suppl 4):S551–65.
11. Nissaisorakarn V, Lee JR, Lubetzky M, Suthanthiran M. Urine biomarkers informative of human kidney allograft rejection and tolerance. *Hum Immunol.* 2018;79(5):343–55.
12. Jung HY, Lee CH, Choi JY, Cho JH, Park SH, Kim YL, et al. Potential urinary extracellular vesicle protein biomarkers of chronic active antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1138:121958.
13. Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, Zhong W, Matas A, Samaniego M. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant.* 2014;14(2):255–71.
14. Chancharoenthana W, Traitanon O, Leelahavanichkul A, Tasanarong A. Molecular immune monitoring in kidney transplant rejection: a state-of-the-art review. *Front Immunol.* 2023;14:1206929.
15. Wiebe C, Nickerson PW, Kosmoliaptis V. Molecular mismatch and the risk for T cell-mediated rejection. *Am J Kidney Dis.* 2022;80(6):704–6.
16. Yamamoto I, Yamakawa T, Katsuma A, Kawabe M, Katsumata H, Hamada AM, et al. Recurrence of native kidney disease after kidney transplantation. *Nephrology (Carlton).* 2018;23 Suppl 2:27–30.
17. Gupta A, Sontakke T, Acharya S, Kumar S. A comprehensive review of biomarkers for chronic kidney disease in older individuals: current perspectives and future directions. *Cureus.* 2024;16(9):e70262.
18. Erdbrügger U, Blijdorp CJ, Bijnsdorp IV, Borràs FE, Burger D, Bussolati B, et al. Urinary extracellular vesicles: A position paper by the Urine Task Force of the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(7):e12093.
19. Bromberg JS, Bunnapradist S, Samaniego-Picota M, Anand S, Stites E, Gauthier P, et al. Elevation of donor-derived cell-free DNA before biopsy-proven rejection in kidney transplant. *Transplantation.* 2024;108(9):1994–2004.
20. Jin PH, Sarwal RD, Sarwal MM. Urinary biomarkers for kidney allograft injury. *Transplantation.* 2022;106(7):1330–8.
21. Anglicheau D, Naesens M, Essig M, Gwinner W, Marquet P. Establishing biomarkers in transplant medicine: A critical review of current approaches. *Transplantation.* 2016;100(10):2024–38.
22. Josephson MA. Monitoring and managing graft health in the kidney transplant recipient. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(7):1774–80.
23. Ng MSY, Burger D, Svenningsen P, Martens E, Erdbrügger U, Braun F. Unlocking the potential of extracellular vesicles in nephrology: what does MISEV2023 add? *Kidney Int.* 2025;107(1):44–50.
24. Naesens M, Friedewald J, Mas V, Kaplan B, Abecassis MM. A practical guide to the clinical implementation of biomarkers for subclinical rejection following kidney transplantation. *Transplantation.* 2020;104(4):700–7.
25. Jeong HJ. Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond. *Kidney Res Clin Pract.* 2020;39(1):17–31.
26. Naesens M, Roufosse C, Haas M, Lefaucheur C, Mannon RB, Adam BA, et al. The Banff 2022 Kidney Meeting Report: Reappraisal of microvascular inflammation and the role of biopsy-based transcript diagnostics. *Am J Transplant.* 2024;24(3):338–49.
27. Reference Guide to the Banff Classification - BANFF. [Internet]. [accessed on 10. 6. 2025]. Available from: <https://banfffoundation.org/central-repository-for-banff-classification-resources-3/>
28. Halloran PF, Madill-Thomsen KS, Reeve J. The molecular phenotype of kidney transplants: Insights from the MMDx project. *Transplantation.* 2024;108(1):45–71.
29. Madill-Thomsen KS, Halloran PF. Precision diagnostics in transplanted organs using microarray-assessed gene expression: concepts and technical methods of the Molecular Microscope® Diagnostic System (MMDx). *Clin Sci (Lond).* 2024;138(11):663–85.
30. Wu L, Boer K, Woud WW, Udomkarnjananon S, Hesselink DA, Baan CC. Urinary extracellular vesicles are a novel tool to monitor allograft function in kidney transplantation: A systematic review. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10499.
31. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(7):2221–2232.
32. Abinti M, Favi E, Alfieri CM, Zanoni F, Armelloni S, Ferraresso M, et al. Update on current and potential application of extracellular vesicles in kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2023;23(11):1673–93.
33. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024;13(2):e12404.
34. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27066.
35. Karpman D, Ståhl AL, Arvidsson I. Extracellular vesicles in renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(9):545–62.
36. Brennan K, Martin K, FitzGerald SP, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci Rep.* 2020;10(1):1039.
37. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2:20360.
38. Vesiclepedia: Home - Extracellular vesicles database [Internet]. [accessed on 8. 6. 2025]. Available from: <http://www.microvesicles.org/>
39. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012;10(12):e1001450.
40. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. Exocarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles.* 2012;1:18374.

41. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Saffar HA, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: a web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016;428(4):688–92.
42. EVpedia - Extracellular vesicle database for high-throughput data and publications [Internet]. [accessed on 8. 6. 2025]. Available from: https://evpedia.info/evpedia2_xc/
43. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013;2:20384.
44. Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):6466.
45. Grange C, Bussolati B. Extracellular vesicles in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(8):499–513.
46. Kwon SH. Extracellular vesicles in renal physiology and clinical applications for renal disease. *Korean J Intern Med.* 2019;34(3):470–9.
47. Sedej I, Žnidarič MT, Dolžan V, Lenassi M, Arnol M. Optimization of isolation protocol and characterization of urinary extracellular vesicles as biomarkers of kidney allograft injury. *Clin Nephrol.* 2021;96(1):S107–13.
48. Blijdorp CJ, Tutakhel OAZ, Hartjes TA, van den Bosch TPP, van Heugten MH, Rigalli JP, et al. Comparing approaches to normalize, quantify, and characterize urinary extracellular vesicles. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(5):1210–26.
49. Erdbrügger U, Hoorn EJ, Le TH, Blijdorp CJ, Burger D. Extracellular vesicles in kidney diseases: Moving forward. *Kidney360.* 2022;4(2):245–57.
50. Fekih REl, Hurley J, Tadigotla V, Alghamdi A, Srivastava A, Coticchia C, 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(4):994–1004.
51. Svenningsen P, Maslauskienė R, Palarasah Y, Bumblyte IA, Tepel M. Urinary extracellular vesicles for non-invasive quantification of principal cell damage in kidney transplant recipients. *Biomolecules.* 2024;14(9):1124.
52. Wu L, Baan CC, Reijerkerk D, Nieboer D, van den Bosch TPP, Hesselink DA, et al. Kidney-derived urinary extracellular vesicles are increased during acute rejection after kidney transplantation: A pilot study. *Transplant Direct.* 2025;11(5):e1796.
53. Sigdel TK, Ng YW, Lee S, Nicora CD, Qian WJ, Smith RD, et al. Perturbations in the urinary exosome in transplant rejection. *Front Med (Lausanne).* 2015;1:57.
54. Park J, Lin HY, Assaker JP, Jeong S, Huang CH, Kurdi A, et al. Integrated kidney exosome analysis for the detection of kidney transplant rejection. *ACS Nano.* 2017;11(11):11041–6.
55. Lim JH, Lee CH, Kim KY, Jung HY, Choi JY, Cho JH, 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.
56. Takada Y, Kamimura D, Jiang JJ, Higuchi H, Iwami D, Hotta K, et al. Increased urinary exosomal SYT17 levels in chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation via the IL-6 amplifier. *Int Immunol.* 2020;32(10):653–62.
57. Woud WW, van der Pol E, Mul E, Hoogduijn MJ, Baan CC, Boer K, et al. An imaging flow cytometry-based methodology for the analysis of single extracellular vesicles in unprocessed human plasma. *Commun Biol.* 2022;5(1):663.
58. van der Pol E, Welsh JA, Nieuwland R. Minimum information to report about a flow cytometry experiment on extracellular vesicles: Communication from the ISTH SSC subcommittee on vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2022;20(1):245–51.
59. Kuiper M, van de Nes A, Nieuwland R, Varga Z, van der Pol E. Reliable measurements of extracellular vesicles by clinical flow cytometry. *Am J Reprod Immunol.* 2021;85(2):e13350.
60. Welsh JA, Arkesteijn GJA, Bremer M, Cimorelli M, Dignat-George F, Giebel B, et al. A compendium of single extracellular vesicle flow cytometry. *J Extracell Vesicles.* 2023;12(2):e12299.
61. Wiklander OPB, Bostancioglu RB, Welsh JA, Zickler AM, Murke F, Corso G, et al. Systematic methodological evaluation of a multiplex bead-based flow cytometry assay for detection of extracellular vesicle surface signatures. *Front Immunol.* 2018;9:1326.
62. MACSPlex EV Kit IO, human | Miltenyi Biotec [Internet]. [accessed on 10. 6. 2025]. Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/products/macsplex-ev-kit-io-human.html#130-108-813>
63. Grange C, Chetty VK, Zhu X, Liu X, Gelléri M, Barthel L, et al. Single molecule localization microscopy for studying small extracellular vesicles. *Small.* 2023;19(12):e2205030.
64. Ghanam J, Chetty VK, Zhu X, Liu X, Gelléri M, Barthel L, et al. Single molecule localization microscopy for studying small extracellular vesicles. *Small.* 2023;19(12):e2205030.
65. Yuana Y, Koning RI, Kuil ME, Rensen PCN, Koster AJ, Bertina RM, et al. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J Extracell Vesicles.* 2013;2(1):10.3402/jev.v2i0.21494.
66. Wu L, van Heugten MH, van den Bosch TPP, Duimel H, López-Iglesias C, Hesselink DA, et al. Polarized HLA class I expression on renal tubules hinders the detection of donor-specific urinary extracellular vesicles. *Int J Nanomedicine.* 2024;12:19:3497–3511.