

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

©Коллектив авторов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

С.Н. Тамкович^{1,3,#}, Н.В. Юнусова^{2#}, М.Н. Стахеева², А.К. Сомов¹, А.Е. Фролова², Н.А. Кирюшина⁴, С.Г. Афанасьев², А.Е. Григорьева¹, П.П. Лактионов¹, И.В. Кондакова²*

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук,

630090 Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; эл. почта: s.tamk@niboch.nsc.ru

²НИИ онкологии Томского научно-исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск

⁴Новосибирский областной онкологический диспансер, Новосибирск

Предложен упрощенный способ выделения экзосом из плазмы крови, позволяющий получить высокоочищенные препараты микровезикул размером не более 100 нм. Установлено наличие различных субпопуляций экзосом как в плазме крови здоровых доноров, так и онкологических больных. Универсальные маркеры CD9, CD24 и CD81 могут быть использованы для рутинного типирования экзосом.

Ключевые слова: экзосомы, трансмиссионная электронная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, колоректальный рак, рак молочной железы

DOI 10.18097/PBMC20176302165

ВВЕДЕНИЕ

Экзосомы представляют собой микроскопические внеклеточные везикулы диаметром 30-100 нанометров, секретируемые различными клетками и детектируемые в различных биологических жидкостях человека (сыворотка крови, слеза, слюна, моча, грудное молоко), в том числе и патологических (асцитическая жидкость) [1]. В литературе представлены многочисленные доказательства высокой функциональной значимости экзосом, включая горизонтальный перенос сигнальных молекул, белков, РНК между различными клетками, иммуномодулирующее воздействие, индукцию ангиогенеза и ремоделирование стромы, влияние на клеточную подвижность, участие в процессах опухолевой инвазии и метастазирования [2-4]. Отсутствие в научной литературе общепринятых критериев выделения и идентификации экзосом [5-8] определило цель исследования как апробацию методики выделения экзосом из плазмы крови больных колоректальным раком и раком молочной железы с помощью ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования с последующей идентификацией экзосом методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и проточной цитофлуориметрии.

МЕТОДИКА

Экзосомы из плазмы крови 10 больных колоректальным раком T_{2-4a}N₀₋₂M₀ (6 мужчин и 4 женщины, средний возраст 58,9±2,2 лет), 10 больных раком молочной железы T₁₋₂N₀M₀ (женщины, средний возраст 56,2±1,6 лет) и 10 здоровых доноров (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 52,2±2,5 лет) выделяли методом ультрафильтрации с последующим

ультрацентрифугированием [9, 10] после получения информированного согласия от каждого обследованного. Форменные элементы крови (9 мл), собранной в вакутейнеры с КЗЭДТА, осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 290 g (бакет-ротор) и 4°C, супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 1200 g (бакет-ротор) и 4°C. Для удаления клеточного дебриса образцы плазмы центрифугировали при 17000 g (угловой ротор) и 4°C в течение 20 мин. Для удаления везикул более 100 нм, супернатант разводили в 5 раз фосфатно-солевым буфером (10 mM фосфатный буфер, 0,15 M NaCl, pH 7,5) (ФБ) и фильтровали через фильтр с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, "Sartorius", Германия). Экзосомы осаждали ультрацентрифугированием (100000 g (бакет-ротор), 90 мин, 4°C), осадок ресуспендировали в 10 мл ФБ и дважды ультрацентрифугировали при тех же условиях. Экзосомы ресуспендировали в 200 мкл ФБ, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Для негативного контрастирования образцы выделенных экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 с контрастировали 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Сетки изучали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Jem 1400 ("Jeol", Япония), снимки получали с помощью цифровой камеры Veleta ("Olympus Corporation", Япония).

Для оценки концентрации белка экзосом использовали коммерческий набор NanoOrange Protein Quantitation kit ("Invitrogen", США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Для проведения проточной цитометрии 10 мкл (6×10⁶ частиц) латексных частиц (4%, A37304, "Invitrogen") отмывали дважды по 100 мкл

* - адресат для переписки

- авторы внесли равный вклад в работу

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ

0,1 М MES-буфером pH 5,5 (3000 g, 15 мин) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. К 12,5 мкл частиц вносили по 3 мкг моноклональных антител против CD9 (“BD Bioscience”, США) либо против CD24 (“Abcam”, США), доводили объём до 50 мкл MES-буфером и инкубировали 14 ч при комнатной температуре на планшетном шейкере при 400 об/мин (дальнейшие инкубации на шейкере проводили при 400 об/мин). Покрытые антителами частицы отмывали трижды по 100 мкл ФБ и ресуспендировали в 25 мкл ФБ, содержащем 0,1% глицин. В 50 мкл экзосом (50 мкг белка) вносили 3 мкл латексных частиц, покрытых антителами и 100 мкл ФБ и инкубировали на шейкере не менее 10 ч при 4°C. Затем в пробирки вносили 300 мкл 0,2 М глицина и инкубировали 30 мин при 4°C. Комплексы частиц с антителами и экзосомами отмывали дважды по 100 мкл ФБ с 2% истощённой бычьей сывороткой (ФБ-БС), осаждали при 600 g в течение 10 мин при 4°C. В пробирки вносили иммуноглобулин G (“BD bioscience”) и инкубировали на шейкере 10 мин при комнатной температуре, затем отмывали дважды ФБ-БС. Для выявления связавшихся с антителами на поверхности частиц экзосом в пробирки вносили 20 мкл флуоресцентно-меченных антител против CD 63, CD 81, CD9 и CD24 (“BD Bioscience”), затем 80 мкл ФБ-БС и инкубировали 50 мин при 4°C. Комплексы дважды отмывали ФБ-БС. Цитофлуориметрия была выполнена на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (США). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции (MFI) в сравнении с изотипическим контролем (“BD Bioscience”) и отрицательными контролями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические характеристики везикул, включая их размер, могут быть важной диагностической характеристикой. Основная часть везикул, полученных из плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных, имела размеры 40-100 нм и морфологические характеристики экзосом (рис. 1А-В). На электронограммах экзосомы крови здоровых доноров и экзосомы крови онкологических больных в основном имеют чашеобразную форму, обусловленную сплющиванием пузырька при высушивании препаратов, гладкую поверхность и низкую или среднюю электронную плотность. Содержание микровезикул с повреждённой мембраной в препаратах не превышало 10% (рис. 1). Таким образом, сочетание ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования позволяет получить препараты экзосом без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [2, 5, 9, 11].

Для подтверждения экзосомальной природы выделенных везикул “Обществом по изучению внеклеточных везикул” рекомендовано выявление экзосомальных мембранных или цитозольных белков методами Вестерн блоттинга либо проточной цитофлуориметрии [2, 12]. Мы использовали антитела к рецепторам семейства тетраспанинов CD63, CD9 и CD81, которые являются обязательным структурным компонентом мембраны экзосом [13], а также антитела к рецептору CD24. Известно, что рецептор CD24 экспрессируется в гемопоэтических клетках, в частности В-лимфоцитах различной

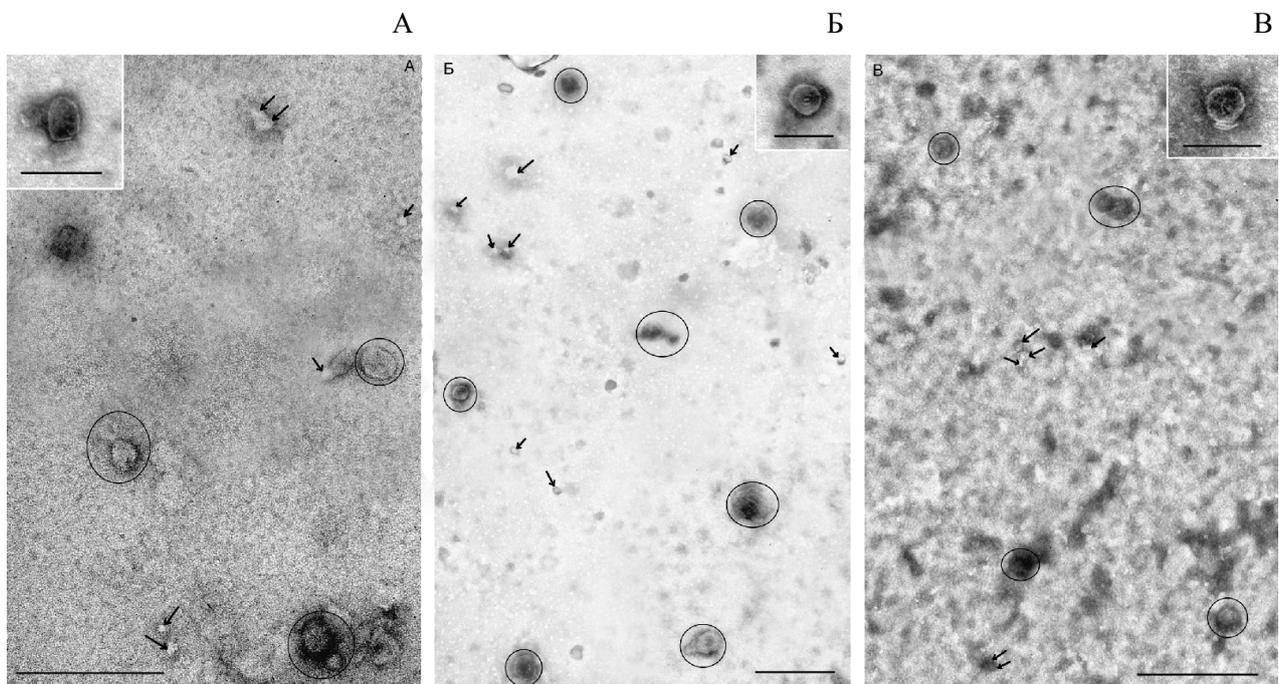


Рисунок 1. Препараты экзосом выделенные из плазмы крови: А - здоровых доноров, Б - больных раком молочной железы, В - больных колоректальным раком. Овалом выделены экзосомы, стрелками обозначены микрочастицы, на врезках - экзосомы. Длина масштабной линии соответствует 500 нм, на врезках - 100 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой.

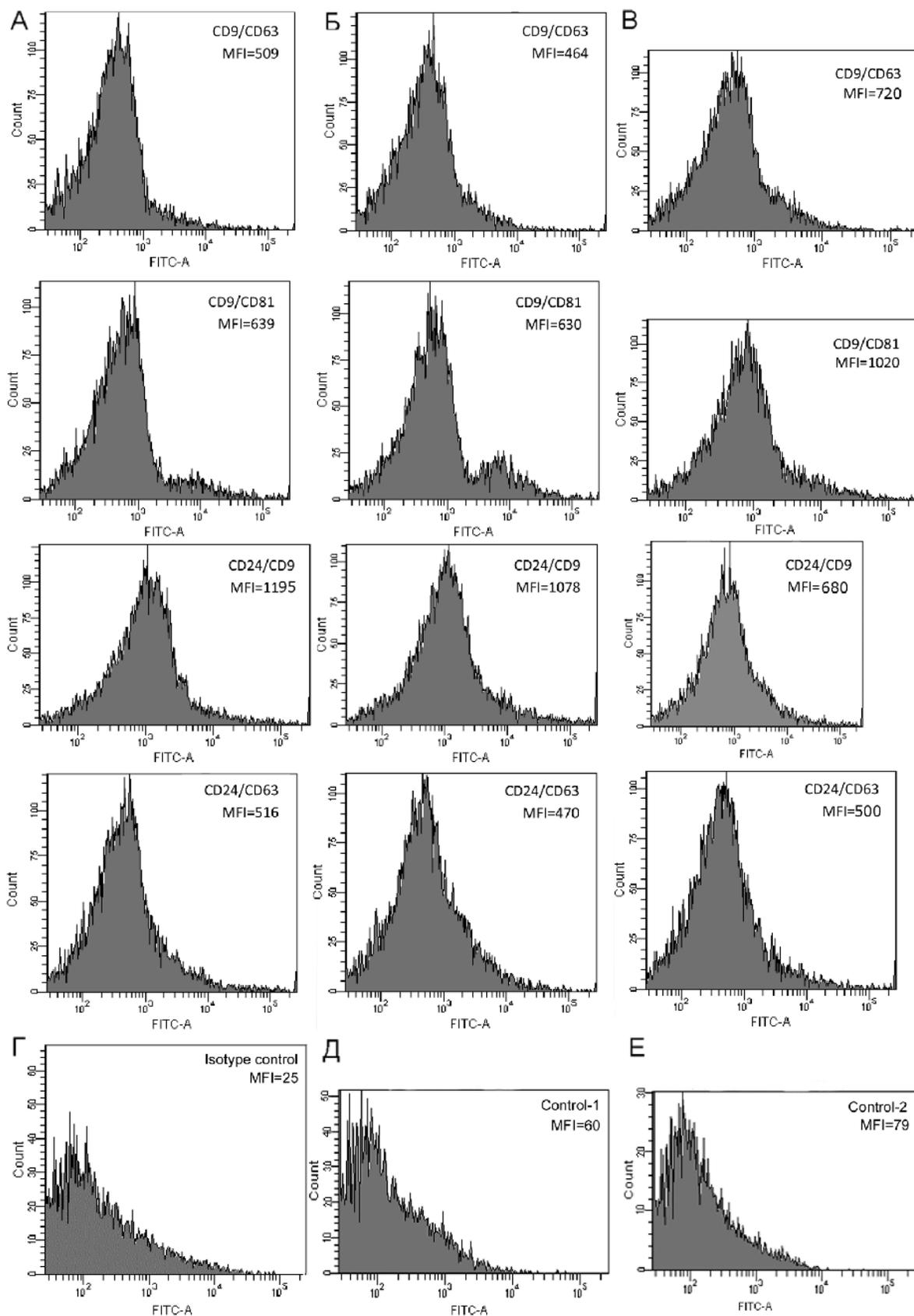


Рисунок 2. Экспрессия CD63 и CD81 на CD9-позитивных экзосомах и экспрессия CD9 и CD63 на CD24-позитивных экзосомах плазмы крови здоровых доноров (А), больных раком молочной железы (Б) и больных колоректальным раком (В). Изотипический контроль (Г) и отрицательные контроли (покрытые немечеными антителами латексные частицы с FITC-мечеными антителами (Д) и латексные частицы с FITC-мечеными антителами (Е)). Приведены средние значения MFI.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Таблица. Экспрессия CD24, CD63 и CD81 на поверхности экзосом плазмы крови здоровых доноров и онкологических больных

	CD9-позитивные экзосомы		CD24-позитивные экзосомы	
	Экспрессия CD63	Экспрессия CD81	Экспрессия CD9	Экспрессия CD63
Норма	509±75	639±96	1195±180	516±75
Рак молочной железы	464±45	630±62	1078±129	470±52
Колоректальный рак	720±100	1020±133	680±101	500±65

Примечание: приведены средние значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI) ± ошибка средней.

степени зрелости, на гранулоцитах, а также эндотелиоцитах [14]. Рецептор CD9 представлен на многих гематопозитических и эпителиальных клетках, рецептор CD63 также экспрессируется в гематопозитических клетках и в тканевых макрофагах, а рецептор CD81 экспрессируется гематопозитическими, эндотелиальными и эпителиальными клетками, при этом не экспрессируется эритроцитами, тромбоцитами и нейтрофилами [15, 16]. Сорбированные на покрытых антителами к тетраспанинам латексных гранулах экзосомы были окрашены конъюгированными с флуорохромом (ФИТЦ) антителами к специфическим экзосомальным белкам. Предложенная модификация метода оценки экспрессии экзосомальных мембранных протеинов путём комбинирования неконоъюгированных и конъюгированных антител позволяет охарактеризовать различные субпопуляции экзосом. По убыванию интенсивности MFI в крови здоровых доноров и больных раком молочной железы были идентифицированы следующие субпопуляции экзосом: CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD9/CD63 = CD24/CD63 (рис. 2А,Б, таблица), в крови больных колоректальным раком – CD9/CD81 > CD9/CD63 > CD24/CD9 > CD24/CD63 (рис. 2В, таблица). Таким образом, наиболее часто в крови здоровых доноров и больных раком молочной железы встречаются экзосомы, экспрессирующие рецепторы CD9 и CD24, которые, по-видимому, были секретированы эндотелиоцитами и клетками крови. Рецептор CD63 удаётся обнаружить на поверхности наименьшего количества экзосом, причём эти экзосомы экспонируют одновременно и другие рецепторы (CD9, CD24). При развитии колоректального рака происходит перераспределение представленности субпопуляций экзосом – возрастает доля везикул, секретированных эндотелиальными клетками и тканевыми макрофагами (CD9, CD81, CD63) и снижается доля экзосом, секретированных гематопозитическими клетками (CD24) (таблица).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в плазме крови в норме и при развитии онкологических заболеваний циркулируют различные типы экзосом, а поверхностные белки, наиболее представленные из которых CD9, CD24 и CD81, являются их универсальными маркерами, что может быть использовано для рутинного типирования экзосом. Способность тетраспанинов

взаимодействовать с широким классом различных молекул и формировать надмолекулярные комплексы позволяет им участвовать в широком спектре биологических и патологических процессов: биогенезе экзосом, сортировке экзосомальных белков и микроРНК, связывании и поглощении экзосом клетками-реципиентами, способности экзосом презентовать антигены в контексте последующего иммунного ответа [4].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Комплексной программы СО РАН №П.2П/VI.62-3 (0309-2015-0021) “Биохимия внеклеточных нуклеиновых кислот и новые ген-направленные биологически активные вещества” и ПФНИ ГАН №VI.62.1.3 (0309-2016-0005) “Терапевтические нуклеиновые кислоты”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Properzi F., Logozzi M., Fais S. (2013) *Biomarkers Med.*, **7**, 769-778.
2. Lässer C., Alikhani V.S., Ekström K., Eldh M., Paredes P.T., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötvall J., Valadi H. (2011) *J. Transl. Med.*, **9**, 9.
3. Yoon Y.J., Kim O.Y., Gho Y.S. (2014) *BMB Rep.*, **47**, 531-539.
4. Чевкина Е.М., Щербаков А.М., Журавская А.Ю., Семин С.Е., Комельков А.В., Красильников М.А. (2015) *Успехи молекулярной онкологии*, **2**, 8-20.
5. Théry C., Amigorena S., Raposo G. (2006) *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **3.22**, 3.22.1-3.22.29.
6. Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-’t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H., Hochberg F. (2013) *J. Extracell. Vesicles*, **2**, 10.3402/jev.v2i0.20360.
7. Zeringer E., Barta T., Li M., Vlassov A.V. (2015) *Cold Spring Harb. Protoc.*, **4**, 319-323.
8. Филатов М.В., Ланда С.Б., Пантина П.А., Гармай Ю.П. (2010) *Клин. лаб. диагн.*, **12**, 35-43.
9. Григорьева А.Е., Тамкович С.Н., Еремина А.В., Тутикин А.Е., Кабилов М.Р., Черных В.В., Власов В.В., Лактионов П.П., Рябчикова Е.И. (2016) *Биомед. химия*, **62**, 99-106. DOI: 10.1134/S1990750816020049
10. Тамкович С.Н., Лактионов П.П., Тутанов О.С., Рябчикова Е.И., Григорьева А.Е., Власов В.В. (2015) *Способ получения экзосом из крови. Патент РФ 2556825 от 18.06.2015.*
11. Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A. (2016) *Prostate*, **76**, 68-79.

12. Lötvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzás E.I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y.S., Kurochkin I.V., Mathivanan S., Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M.H., Witwer K.W., Théry C. (2014) *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 26913.
13. Andreu Z., Yanez-Mo M. (2014) *Front. Immunol.*, **5**, 442.
14. King J.B., von Furstenberg R.J., Smith B.J., McNaughton K.K., Galanko J.A., Henning C.J. (2012) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **303**, G443-452.
15. Levy S. (2014) *Immunol Res.*, **58**, 179-185.
16. Shen L., Diao Z., Sun H.X., Yan G.J., Wang Z., Li R.T., Dai Y., Wang J., Li J., Ding H., Zhao G., Zheng M., Xue P., Liu M., Zhou Y., Hu Y. (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1940-1945.

Поступила: 19. 12. 2016.
Принята к печати: 31. 01. 2017.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXOSOMES FROM BLOOD PLASMA OF BREAST CANCER AND COLORECTAL CANCER PATIENTS

S.N. Tamkovich^{1,3}, N.V. Yunusova², M.N. Stakheeva², A.K. Somov¹, A.Y. Frolova², N.A. Kirushina⁴, S.G. Afanasyev², A.E. Grigoryeva¹, P.P. Laktionov¹, I.V. Kondakova²

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 8 Lavrentieva av., Novosibirsk, 630090 Russia; e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

²Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk, Russia

³Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

⁴Novosibirsk Regional Oncological Dispensary, Novosibirsk, Russia

A simple approach for isolation of exosomes from the blood plasma, which allows to obtain highly purified preparations of microvesicles no larger than 100 nm has been proposed. The presence of different subpopulations of exosomes in the blood plasma of healthy donors and cancer patients has been recognized. We found the presence of the universal markers CD9, CD24 and CD81 on exosomes isolated from blood plasma that can be used to their routine typing.

Key words: exosomes, transmission electron microscopy, flow cytometry, colorectal cancer, breast cancer