©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

Т.А. Штам[1,2,3,5]*, Р.Б. Самсонов[2,3], А.В. Волницкий[1], Р.А. Камышинский[4], Н.А. Верлов[1], М.С. Князева[5], Е.А. Коробкина[5], А.С. Орехов[4], А.Л. Васильев[4], А.Л. Коневега[1,5], А.В. Малек[2,3]

[1]Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ "Курчатовский институт", 188300 Санкт-Петербург, Гатчина; эл. почта: tatyana_shtam@mail.ru, shtam_ta@pnpi.nrcki.ru
[2]ООО "Онко-система", Москва, Сколково
[3]Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург
[4]НИЦ "Курчатовский институт", Москва
[5]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург

Внеклеточные микровезикулы (ВМВ) секретируются клетками многоклеточных организмов и обеспечивают "горизонтальный" межклеточный перенос веществ и информации. Этот феномен имеет важное биологическое значение и привлекает внимание тысяч исследователей. Большая часть исследований проводится в условиях *in vitro* экспериментов, позволяющих анализировать биогенез, структурные и функциональные особенности ВМВ. В лабораторной практике существует несколько методов выделения ВМВ из культуральной среды, причём выбор метода влияет на получаемые результаты. Оптимальный метод обычно определяется объёмом исследуемого материала и задачами исследования. В рамках данной работы проведен сравнительный анализ четырёх методов выделения ВМВ из культуральной среды: последовательное ультрацентрифугирование, ультрацентрифугирование с использованием "подушки" сахарозы, агглютинация ВМВ лектинами растительного происхождения и иммунопреципитация на латексных частицах. В исследовании был использован ряд глиальных клеточных линий человека. Проведена сравнительная оценка препаратов ВМВ, выделенных разными методами, по ряду параметров: размер, концентрация, морфология ВМВ, наличие примесей невезикулярной природы, содержание в мембране ВМВ экзосомальных тетраспанинов, содержание белка, тотальной РНК, и нескольких микроРНК, ассоциированных с развитием глиом. Использованы методы: анализ траекторий наночастиц, лазерная корреляционная спектроскопия, криоэлектронная микроскопия, проточная цитометрия, ОТ-ПЦР. По результатам работы сформулированы практические рекомендации относительно выбора оптимального метода с учетом возможных задач исследования.

Ключевые слова: внеклеточные микровезикулы, экзосомы, методы выделения, ультрацентрифугирование, лектины, иммунопреципитация

DOI: 10.18097/PBMC20186401023

ВВЕДЕНИЕ

Интеграция отдельных клеток в составе многоклеточного организма опосредуется рядом регуляторных систем (нервной, иммунной, эндокринной) с помощью молекулярных медиаторов (нейромедиаторов, цитокинов, гормонов). Исследования последних лет показали, что в "межклеточных коммуникациях" участвуют не только регуляторные молекулы. Клетки могут обмениваться многокомпонентными "письмами" в виде мембранных внеклеточных микровезикул (ВМВ) [1]. На основе размера и механизма секреции ВМВ принято разделять на три типа: апоптотические тельца (1 мкм – 5 мкм), эктосомы (100 нм – 1 мкм) и экзосомы (30 нм – 130 нм) [2]. Первые образуются в процессе программируемой клеточной гибели, вторые – "отпочковываются" от поверхностной мембраны клетки, третьи – формируются в составе так называемых мультивезикулярных телец (multivesicular bodies) в процессе эндоцитоза. В состав физиологических жидкостей, например, плазмы, входят ВМВ различного типа, клеточного происхождения, размера и состава [3, 4]. Возможность анализа или коррекции везикулярного состава плазмы имеет очевидные диагностические и терапевтические перспективы, достижение которых ещё требует решения ряда фундаментальных и технических задач [5].

В настоящее время основным подходом, предполагающим содержательный анализ ВМВ, являются исследования *in vitro*. Условия эксперимента *in vitro* позволяют оценить состав везикул, секретируемых однотипными клетками, и исследовать механизм секреции. В научной литературе происходит активное накопление данных о биогенезе, структуре и биологической роли различных классов ВМВ [6]. Систематизация этих знаний со временем позволит сформировать концепцию везикулярной системы межклеточных коммуникаций и разработать методы оценки и коррекции работы этой системы по аналогии с диагностическими и лечебными подходами таких медицинских дисциплин, как иммунология и эндокринология.

Несмотря на работу многих научных лабораторий, исследующих биологию ВМВ, и тысячи опубликованных научных статей по этой тематике, выделение ВМВ из культуральной среды остается нетривиальной задачей [7]. Сложность этой задачи определяется гетерогенностью ВМВ и отсутствием абсолютных признаков – физических или

* - адресат для переписки

биохимических, на которых могли бы быть основаны принципы методов их выделения. В ряде исследований было показано, что даже клетками одного типа секретируются ВМВ, отличающиеся по физическим и биохимическим характеристикам [8], морфологии [9], составу поверхностной мембраны [10]. Этим определяется разнообразие существующих методов, применяемых для работы с относительно простым исходным материалом – культуральной средой. Множество применяемых методов осложняет сопоставление результатов, полученных разными лабораториями. С целью стандартизации протоколов Международным обществом по изучению внеклеточных везикул (The International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) в 2014 был утвержден перечень требований к проведению лабораторных исследований ВМВ, который ограничивает возможность публикации научных результатов, полученных без учёта этих требований [11]. В 2015 году это же общество провело анализ методов, используемых сотнями исследователей в лабораториях тридцати стран [12]. Как показали результаты анализа, в большинстве случаев используется метод ультрацентрифугирования, изолировано или в сочетании с другими подходами (фильтрация, хроматография, преципитация с помощью антител или позитивно заряженных полимеров и других реагентов). При этом выбор метода зависит от объёма исследуемой жидкости и конечных целей исследования (рис. 1) [12]. Авторы констатировали отсутствие “золотого стандарта” в выборе метода выделения ВМВ, что указывает на необходимость комплексного подхода к проблеме и важность разработки не жестких стандартов, а гибких методических рекомендаций.

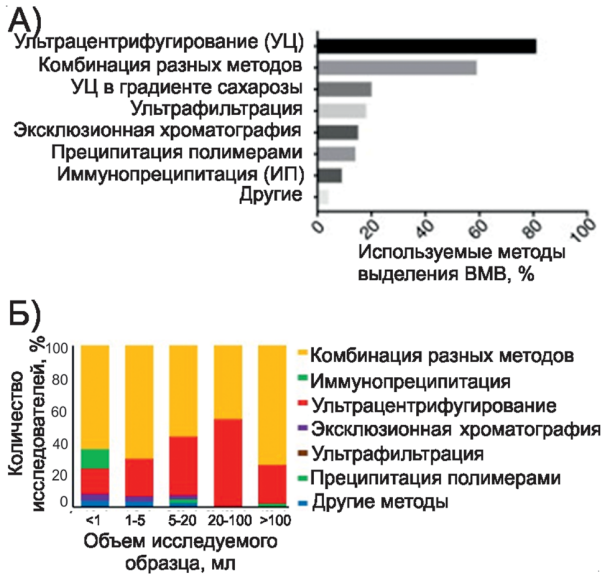

Рисунок 1. Результаты оценки практики работы с ВМВ 196 исследователей из 30 стран, проведённой Международным обществом по изучению внеклеточных везикул (The International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) (Модифицирован из [12]).
А) Соотношение используемых методов выделения ВМВ.
Б) Соотношение используемых методов в зависимости от объёма исследуемого образца.

С учётом собственного практического опыта [13-15] и известных данных о структуре ВМВ мы выбрали и сравнили несколько принципиально разных методов их выделения из культуральной среды. С учётом примененных методов и полученных результатов мы предполагаем, что анализируемая популяция ВМВ преимущественно была представлена ВМВ эндосомального происхождения – экзосомами. Мы использовали одинаковый стартовый материал, из которого ВМВ были выделены четырьмя способами: 1) ультрацентрифугирование, 2) ультрацентрифугирование в так называемую “подушку” сахарозы, 3) путём связывания углеводных или 4) белковых компонентов поверхностной мембраны. Оценка результатов была проведена с помощью методов анализа физических и биохимических характеристик выделенных везикул и сравнения эффективности последующего выделения отдельных биохимических компонентов (белков и РНК). По результатам сравнительного анализа сформулированы рекомендации по выбору оптимального метода выделения ВМВ в соответствии с задачами планируемых исследований.

МЕТОДИКА

Реагенты

Антитела к CD63, конъюгированные с красителем FITC (“Beckman Coulter”, США); среды для роста клеток DMEM/F12 (“Биолот”, Россия), эмбриональная сыворотка теленка (“Биолот”); культуральные флаконы Карреля (“Orange Scientific”, Бельгия), наборы для выделения экзосом из культуральной среды или определения наличия поверхностных экзосомальных маркеров CD9 методом проточной цитометрии (“HansaBioMed”, Эстония), реагент Брэдфорда (“BioRad”, США). Все другие используемые реагенты были получены от фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Клеточные культуры и условия культивирования

Работа проведена на перевиваемых культурах глиальных клеток человека, полученных из коллекции ИНЦ РАН (Санкт-Петербург): A172 и T98G. Кроме того, в исследовании были использованы первичные глиальные клеточные культуры, полученные в лаборатории клеточной биологии НИЦ “Курчатовский Институт” - ПИЯФ [16]. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в среде DMEM/F12, содержащей 5% эмбриональную бычью сыворотку, очищенную от экзосом с помощью ультрацентрифугирования при 110000 *g* в течение 18 ч. Кондиционированную культуральную среду (КС) собирали после 72 ч инкубации и роста в ней монослоя клеток. Аликвоты собранной КС хранили при 4°C в стеклянной посуде, объединяли, доводя до объёма 150 мл. Для дальнейшего выделения ВМВ использовали смесь КС, собранную с различных культивируемых клеточных линий глиального происхождения.

Выделение экзосом из кондиционированной культуральной среды (КС)

ВМВ выделяли из равных объёмов (150 мл) КС, после предварительного удаления клеточного детрита и крупных везикул путём центрифугирования (2000 g – 30 мин; затем 16000 g – 30 мин). В рамках исследования ВМВ выделяли четырьмя методами:

1) Последовательное ультрацентрифугирование (УЦ) проводили на основе метода, описанного ранее [17], на центрифуге Beckman Coulter (ротор 45Ti), при 110000 *g* в течение 2 ч. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) не менее 1 ч при 4°C, доводили объём до 5 мл и повторно центрифугировали при 110000 *g*, 2 ч (ротор SW 55Ti). Полученный осадок (препарат ВМВ) растворяли в 100 мкл ФСБ.

2) Последовательное ультрацентрифугирование в "подушку" сахарозы (УЦ+Сах) проводили, как описано ранее [18]. Кратко – ВМВ концентрировали с помощью ультрацентрифугирования при 110000 *g* (ротор 45Ti), в течение 2 ч. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 4 мл ФСБ не менее 1 ч при 4°C. Полученную суспензию наносили на "подушку" сахарозы (30% сахароза/Tris/D_2O, pH 7,4) объёмом 1,5 мл и повторно центрифугировали при 110000 *g* в течение 2 ч (ротор SW 55Ti). Предполагается, что в процессе центрифугирования частицы относительно низкой плавучей плотности остаются на поверхности "подушки", имеющей плотность 1,21 г/см^3, а везикулы опускаются в объём раствора сахарозы. После центрифугирования 1 мл "подушки", содержащей чистую фракцию везикул, шприцем осторожно отбирали со дна пробирки. Далее ВМВ концентрировали, промывали и переводили в ФСБ, используя концентраторы Amicon-Ultra, 100 кДа ("Millipore", США). Конечный объём суспензии ВМВ составлял 100 мкл.

3) Выделение экзосом, основанное на седиментации их лектиновых агрегатов, проводили, следуя методике, описанной ранее [14, 19]. В качестве лектина, связывающего сахарные остатки на поверхности ВМВ использовали Конконавалин А (Кон-А). Этот метод выделения включал следующие этапы: а) инкубация супернатанта, в присутствии Кон-А (1,0 мкг/мл) в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании для образования агрегатов ВМВ; б) осаждение ВМВ агрегатов с помощью центрифугирования при 15000 *g* в течение 30 мин; в) промывка полученного осадка ВМВ раствором ФСБ и повторение предыдущего этапа; г) дезагрегация ВМВ в избытке моносахаров (40%-ный раствор глюкозы в ФСБ) в течение 4 часов; д) фильтрация полученной суспензии через фильтр с порами 0,22 мкм для удаления возможных остатков крупных лектиновых агрегатов; е) ультрафильтрация (Amicon-Ultra, 100 кДа, "Millipore") и промывка ФСБ для очистки выделенных ВМВ от Кон-А и концентрирования препаратов. Конечный объём выделенных препаратов ВМВ составлял 100 мкл.

4) Выделение ВМВ экзосомальной природы с помощью иммунопреципитации поверхностных белков (ИП). Очищенную от клеток и их обломков КС объёмом 150 мл концентрировали с помощью ультрафильтрации (Центрикон плюс-70, 100 кДа, "Millipore") до конечного объема 10 мл. Иммунопреципитация ВМВ из полученных препаратов концентрированной КС проводилась с помощью набора для выделения экзосом из КС ("HansaBioMed"), в соответствии с рекомендациями производителя. ВМВ экзосомальной природы, фиксированные на поверхности латексных частиц в результате иммуноаффинной преципитации, элюировали в 100 мкл ФСБ.

В итоге, были получены четыре препарата ВМВ (100 мкл), выделенные различными методами из идентичных образцов КС равного объёма (150 мл). Образцы ВМВ были аликвотированы, быстро заморожены в жидком азоте и хранились при -80°C до момента анализа.

Методы анализа выделенных внеклеточных микровезикул

Распределение ВМВ по размеру оценивали с помощью метода лазерной корреляционной спектроскопии (dynamic light scattering, DLS). Для анализа использовали установку Zetasizer Nano ZSP ("Malvern Instruments", Великобритания). Измерения проводили при +25°C. По результатам усреднения трёх измерений для каждого образца строили кривые распределения частиц по размерам. Анализ и визуализацию результатов проводили с помощью программного обеспечения Zetasizer Software.

Размер и концентрация ВМВ были определены методом анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, NTA). Был использован анализатор NTA NanoSight® LM10 ("Malvern Instruments"), оснащенный синим лазером (45 мВт при 488 нм) и камерой C11440-5B ("Hamamatsu photonics K.K.", Япония). Для записи и анализа полученных результатов использовали программное обеспечение NTA 2.3. При анализе записей длительностью 60 с оценивали следующие параметры: средний гидродинамический диаметр, мода распределения, стандартное отклонение и концентрация везикул в суспензии.

Морфологию выделенных ВМВ оценивали с помощью криоэлектронной микроскопии. Исследование проводилось на просвечивающем криоэлектронном микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM ("FEI", США), оснащённом высокочувствительным DED (Direct electron detector) детектором электронов Falcon II ("FEI") и корректором сферических аберраций ("CEOS", Германия). Электронно-микроскопические медные сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода, были обработаны в тлеющем разряде с использованием установки Pelcoeasi Glow для получения гидрофильной поверхности. Далее на сетки наносили 3 мкл препарата, и с помощью установки VitrobotMarkIV ("FEI"), проводили мгновенную заморозку образцов в жидком этане, охлаждённом до температуры

жидкого азота (-196°C). В результате образцы были зафиксированы в тонком слое аморфного льда, что позволило исследовать ВМВ в нативном состоянии. Для минимизации радиационных повреждений набор данных проводился с помощью программного обеспечения EPU (“FEI”) в режиме малых доз.

Количественный анализ экзосомальных маркеров (тетраспанинов CD9, CD63) на поверхности выделенных ВМВ был проведён с помощью наборов для проточной цитометрии (Exo-FACS) на цитофлуориметре CytoFLEX (“Beckman Coulter”) в соответствии с инструкцией производителя (“HansaBioMed”).

Оценка содержания белка в полученных препаратах ВМВ была проведена с помощью колориметрического метода (Бредфорда), при этом лизис экзосом проводили в буфере, содержащем мочевину (7 М мочевина, 2 М тиомочевина, 4% CHAPS, 1% ДТТ).

РНК из ВМВ выделяли с помощью набора для выделения (“BioSilica”, Россия). Концентрацию и качество общей РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (“Thermo Scientific”, США). Для определения уровня экспрессии специфических молекул миРНК синтезировали кДНК с использованием miRCURY LNA Universal RT microRNA Polyadenylation and cDNA synthesis Kit (“Exiqon”, Дания). ПЦР в реальном времени (quantitative PCR) проводили с использованием ExiLENT SYBR Green master mix и миРНК-специфических праймеров (“Exiqon”) на CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (“BioRad”). Данные ПЦР (Ct) были нормализованы относительно значений, полученных для малой ядерной РНК (U6), с использованием стандартного подхода ($2^{(Ct\ reference-Ct\ miR)}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение физических параметров

Количественная оценка ВМВ в образцах, выделенных разными способами, была проведена методом анализа траекторий наночастиц. Результаты представлены на рисунке 2 и в таблице. Наибольшее число везикул выделялось методом последовательного ультрацентрифугирования (УЦ) ($14{,}2\times10^{11}$ шт/мл). Дополнение этого метода использованием “подушки” сахарозы (УЦ+Сах) несколько снижало выход ($12{,}8\times10^{11}$), вероятно, за счет удаления белковых конгломератов и повышения “чистоты” препарата. Это предположение подтверждается результатами корреляционной спектроскопии (рис. 3): в образце, полученном методом УЦ, наблюдаются дополнительные “пики”, характерные для частиц размером около 10 нм (белковые комплексы и/или липопротеины) и для крупных конгломератов размером 4-5 мкм. В препарате, полученном методом УЦ+Сах, наблюдается один “пик”, что характерно для относительно монодисперсной смеси везикул. Эти данные подтверждают эффективность метода “очистки” препарата ВМВ от белковых комплексов или липопротеинов с помощью “подушки” сахарозы. Количество везикул в образцах, выделенных методом Кон-А (агглютинация Конконавалином-А), оказалось меньше ($9{,}1\times10^{11}$ шт/мл) по сравнению с образцами, полученными с помощью УЦ или УЦ+Сах (рис. 2В; таблица). Образец, полученный методом Кон-А, содержал примесь частиц малого размера (рис. 3В), вероятно, белковых комплексов или комплексов, образованных избытком Кон-А. Количество ВМВ, выделенных методом иммунопреципитации (ИП) на латексных

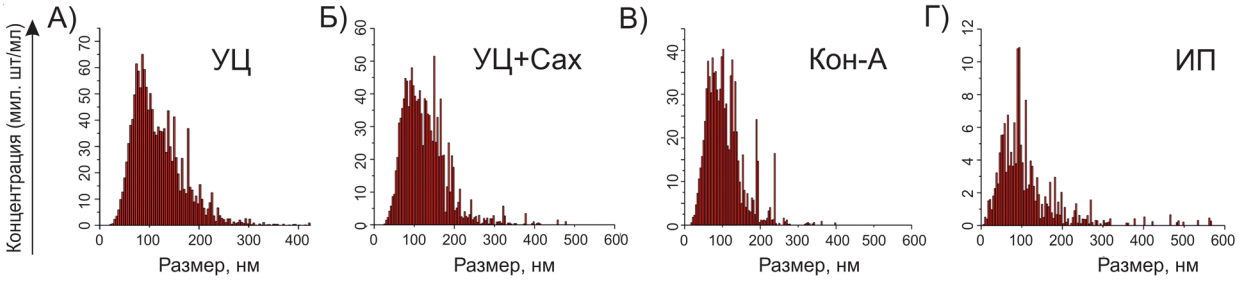

Рисунок 2. Анализ траекторий наночастиц (NTA): распределение по размерам (нм) и концентрации частиц ($\times10^6$ шт/мл) в препаратах внеклеточных микровезикул. Здесь и на рисунках 3-6 обозначения методов выделения: А) Ультрацентрифугирование - УЦ, Б) ультрацентрифугирование в “подушку” 30% сахарозы - УЦ+Сах, В) осаждение лектиновых агрегатов - Кон-А, Г) иммунопреципитация - ИП.

Таблица. Сравнительная характеристика миковезикул, выделенных из кондиционированной культуральной среды различными способами

Метод анализа / Метод выделения	Анализ траекторий наночастиц (NTA)	Анализ траекторий наночастиц (NTA)	Лазерная корреляционная спектроскопия (DLS)	Колориметрия (Bradford assay)	УФ-спектроскопия (UV-spectroscopy)
	Концентрация, шт/мл	Средний размер, нм	Средний размер, нм	Концентрация белка, мкг/мкл	Концентрация РНК, нг/мкл
УЦ	$14{,}2\times10^{11}$	82±10	130±25	0,25±0,10	2,3
УЦ+Сах	$12{,}8\times10^{11}$	93±7	138±12	0,15±0,07	2,2
Кон-А	$9{,}1\times10^{11}$	75±19	102±18	0,40±0,15	0,9
ИП	$1{,}6\times10^{11}$	91±12	-	0,05±0,01	0,3

частицах, оказалось существенно ниже по сравнению с тремя другими методами (рис. 2Г; таблица). Причиной такого результата, вероятно, является принцип метода: специфическое связывание экзосомальных маркеров – поверхностных тетраспанинов, представленных на мембране лишь одного класса ВМВ – экзосомах. Можно предположить, что препарат, выделенный таким способом, является наиболее “чистым”, но провести объективный анализ методом корреляционной спектроскопии не удалось в силу очень низкой концентрации везикул. В ходе анализа методом корреляционной спектроскопии (рис. 3Г) мажорная фракция детектируемых частиц, представленная, вероятно, латексными частицами, затрудняла анализ частиц меньшего размера. Таким образом, количество (концентрация) везикул, выделенных из равного объема среды разными методами, падает в ряду: УЦ > УЦ+Сах > Кон-А > ИП.

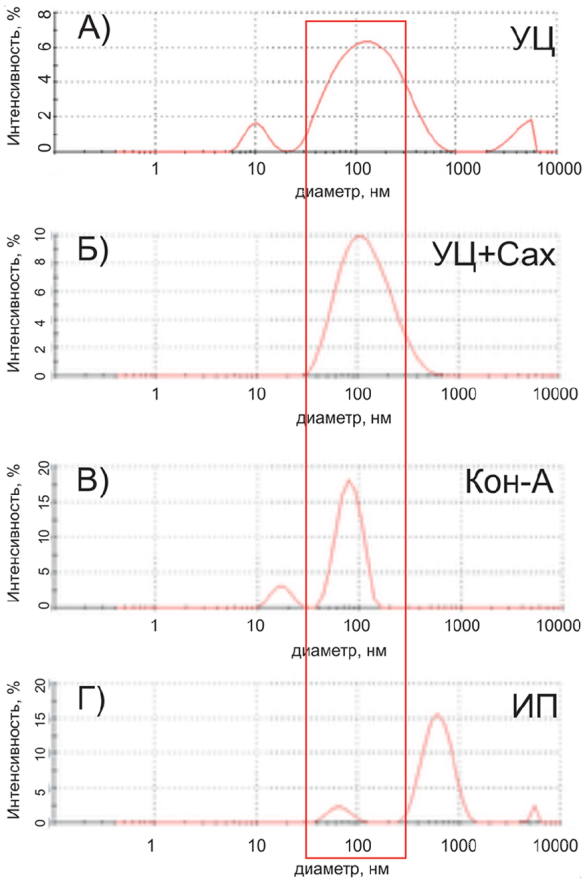

Рисунок 3. Оценка распределения внеклеточных микровезикул (ВМВ) по размеру методом лазерной корреляционной спектроскопии (DLS). Рамкой выделена область размеров, характерных для ВМВ экзосомального происхождения.

Результаты оценки размеров ВМВ, сделанной методом анализа траекторий наночастиц и методом корреляционной спектроскопии (таблица), отражают тенденцию уменьшения диаметра везикул, выделенных методами УЦ+Сах > УЦ > Кон-А. При этом размеры, определенные первым методом, воспроизводимо меньше размеров, определённых вторым методом. Это отражает особенности двух технологий измерения, обсуждение которых находится за рамками данной работы. Размер ВМВ, выделенных методом ИП, оценить не удалось в силу их низкой концентрации (таблица).

Анализ морфологии и поверхностных маркеров

Для оценки структуры ВМВ выделенные разными методами везикулы были визуализированы с помощью криоэлектронной микроскопии. На всех четырёх репрезентативных фрагментах изображений (рис. 4) отчётливо видны везикулы (обозначены стрелками), ограниченные двухслойной биологической мембраной, размер везикул около 100 нм, что соответствует размеру ВМВ экзосомального происхождения. Кроме этого на изображении видны более крупные поры в поддерживающей углеродной плёнке. Анализ изображений большой площади (не представлены) выявил присутствие частиц малого размера (10-30 нм) и невезикулярной природы в препаратах, полученных методами УЦ и Кон-А. В препарате, полученном методом УЦ-Сах, отмечено существенно меньшее количество невезикулярных образований, а метод ИП позволял получать препарат ВМВ практически чистый от каких-либо контаминаций. Эти наблюдения косвенно подтверждаются методом проточной цитометрии с использованием латексных частиц и антител к экзосомальному тетраспанину CD9 (рис. 5). Интенсивность флуоресцентного сигнала, отражающая относительное содержание экзосом в препарате ВМВ, была максимальна при анализе препаратов, полученных методами УЦ-Сах и ИП.

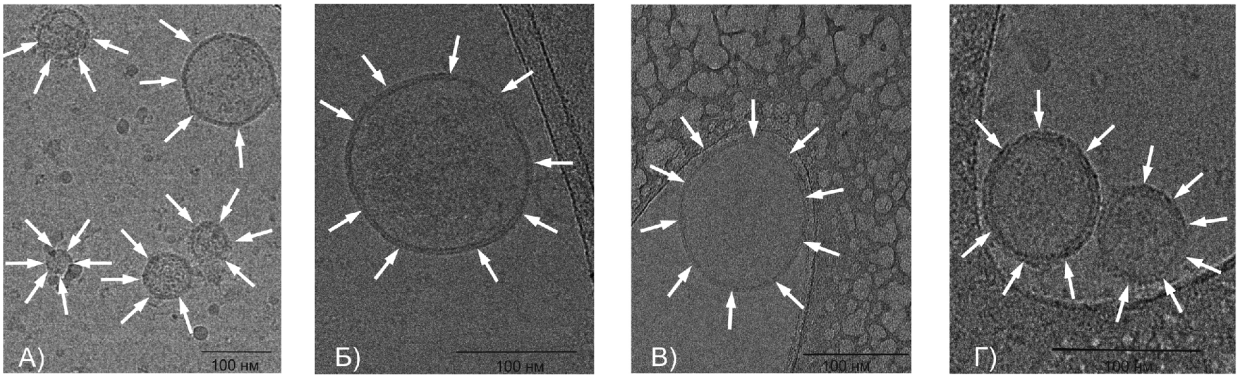

Рисунок 4. Криоэлектронные микрофотографии внеклеточных микровезикул, полученных из кондиционированной культуральной среды. Стрелками обозначены везикулы, ограниченные двухслойной биологической мембраной.

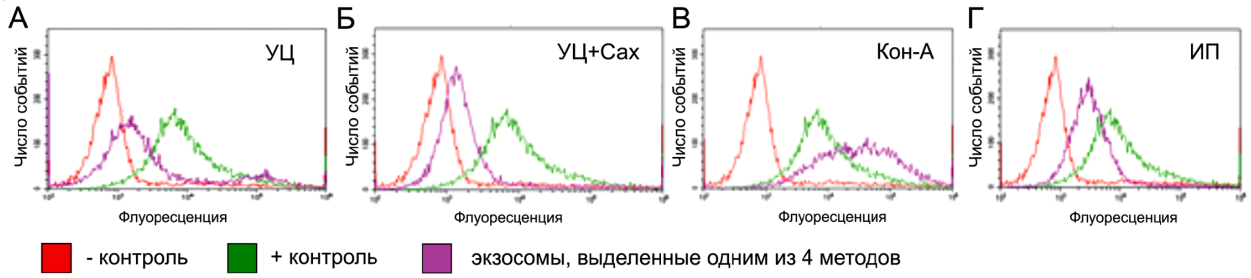

Рисунок 5. Цитометрический анализ экспрессии экзосомального маркера CD9 на поверхности внеклеточных микровезикул (ВМВ), выделенных из кондиционированной среды культивируемых глиальных клеток. В качестве негативного контроля (-контроль) использовались иммуногранулы, в процессе подготовки которых исключался этап инкубации с ВМВ. В качестве позитивного контроля (+контроль) использовали экзосомальный стандарт, входящий в набор для цитометрического анализа экзосом HansaBioMed.

Оценка состава белков и РНК

В заключение был проведен анализ концентрации общего белка и РНК в анализируемых препаратах (таблица). Эти данные согласуются с количественной оценкой ВМВ в препаратах – концентрация РНК падает в ряду УЦ > УЦ-Сах > Кон-А > ИП. Аналогичная тенденция наблюдается при анализе концентрации протеинов. Исключение составляет образец, полученный методом Кон-А, высокое содержание общего белка в котором, вероятно, определяется наличием остаточного Кон-А.

С целью оценки профиля микроРНК, выделяемой из ВМВ, было выбрано несколько молекул, участвующих в развитии глиомы: миРНК-20а [20, 21], миРНК-21 [22, 23], миРНК-210 [24, 25] и молекула миРНК-191, экспрессия которой наблюдается в клетках большинства тканей. Эта молекула часто используется в качестве нормализатора (“house-keeping miRNA”) [26], но данные о её участии в развитии глиомы носят ограниченный характер. На рисунке 6 представлен профиль концентрации выбранных молекул миРНК в препаратах ВМВ, выделенных разными методами. Наиболее полно охарактеризован канцерогенный характер миРНК-21, максимальное содержание этой молекулы наблюдалось в образце, полученном методом ИП. Эта молекула определяется как “key player” в патогенезе глиобластомы [27], а полученные данные свидетельствуют о секреции миРНК-21 культивируемыми клетками глиом в составе ВМВ, преимущественно экзосомальной природы. При этом концентрация миРНК-191 оказалась наибольшей в образцах, максимально контаминированных невезикулярными частицами (УЦ и Кон-А), что косвенно указывает на возможность секреции миРНК-191 клетками глиомы в составе компонентов белкового комплекса RISC или в составе липопротеинов.

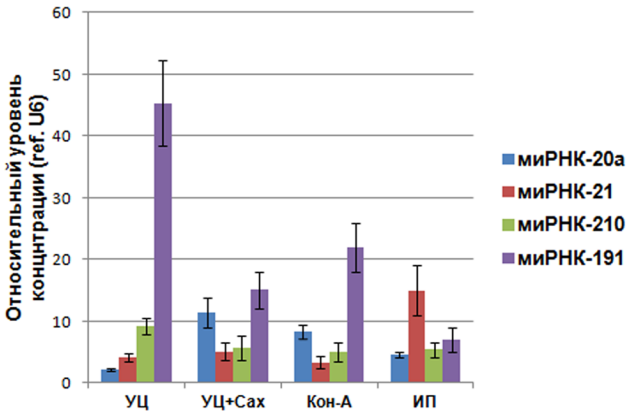

Рисунок 6. Содержание глиома-специфичных миРНК в микровезикулах, выделенных четырьмя рассматриваемыми способами из кондиционированной среды культур клеток глиом А172, T98G и первичных глиальных клеточных линий. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам трёх реакций ПЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Все четыре метода, протестированные в рамках исследования, позволяют выделить ВМВ из культуральной среды. Наибольший выход ВМВ достигается при использовании УЦ, но при этом наблюдается максимальная контаминация препарата частицами невезикулярной природы. Наиболее чистый препарат ВМВ экзосомальной природы может быть получен путём ИП, однако, при этом наблюдается минимальный выход целевого продукта. Дополнение метода ультрацентрифугирования использованием “подушки” сахарозы позволяет снизить уровень “невезикулярной” контаминации, но при этом снижается и количество выделяемых везикул. Основной особенностью метода Кон-А является техническая простота и относительно низкая стоимость.

Полученные результаты позволяют сформулировать следующие рекомендации относительно выбора метода выделения ВМВ из кондиционированной культуральной среды:

1. С целью исследования физических характеристик спектра ВМВ, присутствующих в культуральной среде, с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA) или электронной микроскопии оптимальным методом выделения можно считать метод последовательного ультрацентрифугирования (УЦ). Этот метод обеспечивает высокую эффективность выделения, при этом контаминация частицами невезикулярной природы не является критичным фактором.

2. С целью протеомного анализа ВМВ могут быть выделены путём ультрацентрифугирования с использованием “подушки” сахарозы (УЦ-Сах) или с помощью агглютинации ВМВ лектинами. Оба метода достаточно эффективны и обеспечивают удаление белковых молекул и белковых комплексов невезикулярной природы. В случае использования метода Кон-А, белок растительного происхождения Конконавалин-А может быть удален из препарата без влияния на результаты последующих 2D электрофореза и масспектрометрии [19].

3. С целью анализа профиля микроРНК, характерного для определенного типа ВМВ, при помощи ОТ-ПЦР оптимальным методом выделения представляется иммунопреципитация. Метод обеспечивает максимальную специфичность изоляции везикул, а низкая эффективность выделения компенсируется высокой чувствительностью ПЦР.

4. Для функциональных исследований в условиях *in vitro* количество ВМВ является критичным фактором, при этом достаточный выход везикул может быть обеспечен методом УЦ. В экспериментах *in vivo* значимость приобретает фактор чистоты препарата, поэтому оптимальным представляется УЦ+Сах. Присутствие растительного белка в препарате и низкая концентрация ВМВ, характерные для методов Кон-А и ИП, ограничивают возможности применения этих методов в рамках функциональных исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты по Крио-ЭМ выполнены при поддержке РНФ (проект 17-14-01416), по количественной оценке белковых маркеров экзосом и анализу РНК-состава везикул – РФФИ (проект 15-54-12380). Все остальные эксперименты поддержаны РНФ (проект 17-75-20159).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Rothman J.E., Schekman R.W., Südhof T.C.* (2013) The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2013, Press Release.
2. *Colombo M., Raposo G., Thery C.* (2014) Ann. Rev. Cell Develop. Biol., **30**, 255-289.
3. *Пупышев А.Б.* (2015) Цитология, **57**(8), 551-562.
4. *Tkach M., Thery C.* (2016) Cell, **164**, 1226-1232.
5. *Lener T., Gimona M., Aigner L., Borger V., Buzas E., Camussi G., Chaput N., Chatterjee D., Court F.A. et al.* (2015) J. Extracellular Vesicles, **4**, 30087.
6. *Cocucci E., Meldolesi J.* (2015) Trends Cell Biology, **25**, 364-372.
7. *Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е., Тамкович С.Н., Челобанов Б.П., Рябчикова Е.И.* (2017) Биомед. химия, **63**, 91-96. DOI: 10.18097/PBMC20176301091
8. *Willms E., Johansson H.J., Mager I., Lee Y., Blomberg K.E., Sadik M., Alaarg A., Smith C.I., Lehtio J., El Andaloussi S., Wood M.J., Vader P.* (2016) Sci. Rep., **6**, 22519.
9. *Zabeo D., Cvjetkovic A., Lasser C., Schorb M., Lotvall J., Hoog J.L.* (2016) bioRxiv.
10. *Smith Z.J., Lee C., Rojalin T., Carney R.P., Hazari S., Knudson A., Lam K., Saari H., Ibanez E.L., Viitala T., Laaksonen T., Yliperttula M., Wachsmann-Hogiu S.* (2015) J. Extracellular Vesicles, **4**, 28533.
11. *Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzas 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., Thery C.* (2014) J. Extracellular Vesicles, **3**, 26913.
12. *Gardiner C., Di Vizio D., Sahoo S., Thery C., Witwer K.W., Wauben M., Hill A.F.* (2016) J. Extracellular Vesicles, **5**, 32945.
13. *Samsonov R., Burdakov V., Shtam T., Radzhabova C.Z., Vasilyev D., Tsyrlina E., Titov S., Ivanov M., Berstein L., Filatov M., Kolesnikov N., Gil-Henn H., Malek A.* (2016) Tumour Biology, **37**, 12011-12021.
14. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A.* (2016) The Prostate, **76**, 68-79.
15. *Shtam T., Samsonov R., Kamyshinsky R., Pantina R., Verlov N., Vasiliev A., Konevega A.L., Malek A.V.* (2017) AIP Conference Proceedings, **1882**, 020066; doi:10.1063/1.5001645.
16. *Volnitskiy A.V., Semenova E.V., Shtam T.A. Kovalev R.A., Filatov M.V.* (2014) Cell Tissue Biol., **8**(5), 368-373.
17. *Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A.* (2006) Curr. Protocols Cell Biol., chapter 3, unit 3 22, DOI: 101002/0471143030.cbo32s30.
18. *Zhang Z, Wang C., Li T., Liu Z., Li L.* (2014) Oncology Letts., **8**, 1701-1706.
19. *Shtam T.A., Burdakov V.S., Landa S.B., Naryzhny S.N., Bairamukov V.Y., Malek A.V., Orlov Y.N., Filatov M.V.* (2017) Cell Tissue Biol., **11**, 172-179.
20. *Zhou D., Wan Y., Xie D., Wang Y, Wei J., Yan Q., Lu P., Mo L., Xie J., Yang S., Qi X.* (2015) Exper. Molec. Med., **47**, 182.
21. *Wei J., Qi X., Zhan Q., Zhou D., Yan Q., Wang Y., Mo L., Wan Y., Xie D., Xie J., Yang S.* (2015) Biomed. Pharmacother., **71**, 112-118.
22. *Gabriely G., Wurdinger T., Kesari S., Esau C.C., Burchard J., Linsley P.S., Krichevsky A.M.* (2008) Molecular Cellular Biol., **28**, 5369-5380.
23. *Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S.* (2005) Cancer Res., **65**, 6029-6033.
24. *Zhang S., Lai N., Liao K., Sun J., Lin Y.* (2015) Folia Neuropathologica, **53**, 236-244.
25. *Lai N.S., Dong Q.S., Ding H., Miao Z.L., Lin Y.C.* (2014) J. Clinical Neurosci., **21**, 755-760.
26. *Peltier H.J., Latham G.J.* (2008) RNA, **14**, 844-852.
27. *Sadegh Masoudi M., Mehrabian E., Mirzaei H.* (2017) J. Cellular Biochem., **119**, 1285-1290.

Поступила: 11. 10. 2017.
Принята к печати: 26. 12. 2017.

ISOLATION OF EXTRACELLULAR MICRO-VESICLES FROM CELL CULTURE MEDIUM: COMPARATIVE EVALUATION OF METHODS

T.A. Shtam[1,2,3,5], R.A. Samsonov[2,3], A.V. Volnitskiy[1], R.A. Kamyshinsky[4], N.A. Verlov[1], M.S. Kniazeva[5], E.A. Korobkina[5], A.S. Orehov[4], A.L. Vasiliev[4], A.L. Konevega[1,5], A.V. Malek[2,3]

[1]Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre "Kurchatov Institute", Saint-Petersburg, Gatchina, 188300 Russia; e-mail: tatyana_shtam@mail.ru, shtam_ta@pnpi.nrcki.ru
[2]"Oncosystem" Ltd., Skolkovo, 143026 Russia
[3]N.N.Petrov National Medical Research center of Oncology, Saint-Petersburg, 197758 Russia
[4]National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia
[5]Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia

Extracellular vesicles (EV) are secreted by cells of multicellular organisms. EV mediate specific mode of intercellular communication by "horizontal" exchange of substances and information. This phenomenon seems to have an essential biological significance and became a subject of intensive research. Biogenesis, structural and functional features of the EV is being commonly studies in *in vitro* condition. Several methods of EV isolation from cell culture medium are established, however selection of method might influence on obtained results. The choice of the optimal method depends usually from the amount of medium and the aims of the research while is still challenging issue. We performed a comparative analysis of four different methods of EV isolation from cell culture medium: differential ultracentrifugation, ultracentrifugation with a 30% sucrose/D_2O "cushion", precipitation with plant proteins and immune-affinity capturing. EV isolated by different approaches were compared in terms of following parameters: size, concentration, morphology of EV, contamination by non-vesicular particles, content of exosomal tetraspanins on the EV surface, content of total proteins, RNA, and several glioma-associated miRNAs. Applied methods included nano-patricle tracking analysis (NTA), dynamic light scattering (DLS), cryo-electron microscopy, flow cytometry and RT-qPCR. On the base of obtained results, we developed practical recommendations that may help researchers to make a best choice of EV isolation method.

Key words: extracellular vesicles, exsosomes, methods of isolation, ultracentrifugation, lectines, immunoprecipitation