

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

© 2021 г. А. Н. Горшков^{1, *}, Л. В. Пурвиньш^{1, 2}, А. В. Протасов^{1, 2}, П. А. Некрасов¹,
А. А. Шалджян¹, А. В. Васин^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197376 Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербург, 195251 Россия

*E-mail: angorsh@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.11.2020 г.

После доработки 10.12.2020 г.

Принята к публикации 10.12.2020 г.

Экзосомы представляют собой внеклеточные мембранные везикулы диаметром 40–100 нм и являются ключевым средством межклеточной коммуникации. С их помощью происходит перенос широкого спектра биологически активных молекул, включая липиды, белки, мРНК и микроРНК. Передача этих молекул клеткам-реципиентам регулирует их функции в норме и вносит вклад в патогенез множества заболеваний. Уникальные особенности молекулярного состава экзосом делают их потенциально важнейшим диагностическим и прогностическим маркером в медицине. К настоящему времени предложен ряд методов выделения и очистки экзосом. Тем не менее, стандартный подход, позволяющий получать чистые препараты, полностью пригодные для последующего применения высокочувствительных методов анализа, в настоящее время отсутствует. В настоящей работе мы провели сравнение эффективности выделения экзосом из культуральной клеточной среды с помощью трех методов: 1) ультрацентрифугирования, 2) концентрирования тангенциальной потоковой фильтрацией с последующей гель-фильтрацией, 3) осаждения с помощью коммерческого реагента Total exosome isolation reagent (Thermo Fisher, США). Оценка качества проб экзосом включала просвечивающую электронную микроскопию, динамическое светорассеяние и детекцию маркерного экзосомального белка аннексина А2 Вестерн-блоттингом. Результаты показали, что наибольшая чистота препарата экзосом достигается при их концентрировании тангенциальной потоковой фильтрацией с последующей гель-фильтрацией.

Ключевые слова: экзосомы, ультрацентрифугирование, гель-фильтрация

DOI: 10.31857/S0041377121020048

Экзосомы – везикулы диаметром 40–100 нм, секретируемые клетками во внеклеточное пространство (Purushothaman et al., 2016). Биогенез экзосом в клетке связан с эндосомальным компартментом. Наблюдается вторичное впячивание мембраны поздней эндосомы и образование мультивезикулярного тела с интралюминальными везикулами внутри него (Stoorvogel et al., 2002). При слиянии мультивезикулярного тела с плазматической мембраной происходит выход содержащихся в нем везикул во внеклеточное пространство – секреция экзосом из клетки (Colombo et al., 2014). Экзосомы секретируются клетками всех типов и обнаруживаются во множестве различных биологических жидкостей: моче (Conde-Vancells et al., 2010), крови (Caby et al., 2005), слюне (Michael et al., 2010), грудном молоке (Admyre et al.,

2007), бронхоальвеолярной (Prado et al., 2008), амниотической (Keller et al., 2007) и других жидкостях, доставляя свое содержимое клеткам-реципиентам.

По современным представлениям, экзосомы являются компонентом внеклеточного микроокружения, обеспечивающим межклеточную коммуникацию. Благодаря специфической доставке функциональных белков и нуклеиновых кислот к клеткам-реципиентам, экзосомы выступают посредниками регуляторных сигналов между клетками (Vlassov et al., 2012). Секретируемые экзосомы могут локально влиять на функции соседних клеток, а также переноситься на значительные расстояния биологическими жидкостями. С накоплением данных о составе экзосом и способах их взаимодействия с клетками-мишенями открывается все больше физиологических процессов, регулируемых этими везикулами.

Так как экзосомы широко представлены в биологических жидкостях и содержат специфические бел-

Принятые сокращения: ПААГ – полиакриламидный гель; FBS – эмбриональная бычья сыворотка (fetal bovine serum).