METODY IZOLACJI PĘCHERZYKÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH – ZALETY I WADY

ISOLATION OF EXTRACELLULAR VESICLES – ADVANTAGES AND DISADVATAGES

Katarzyna POPIOŁEK, Małgorzata GRZESIAK

Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Streszczenie: Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe to nanometrowe struktury biologiczne uwalniane niemal ze wszystkich komórek w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych. Są nośnikami wielu aktywnych cząsteczek (białek, lipidów, materiału genetycznego w postaci RNA i DNA) i stanowią główny element komunikacji międzykomórkowej. Ze względu na ich potencjał funkcjonalny oraz możliwość praktycznego wykorzystania w diagnostyce wielu chorób, dość szybko stały się inspiracją dla środowiska naukowego. Ze względu na małe rozmiary oraz strukturę, problematyczne jest znalezienie uniwersalnej metody izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Brak standaryzacji metod pozyskiwania pęcherzyków skłania do poszukiwania nowych, uniwersalnych technik. Niniejszy artykuł stanowi przegląd dotychczas poznanych i powszechnie stosowanych metod izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z uwzględnieniem ich zalet oraz wad. Ponadto, zdefiniowano poszczególne typy pęcherzyków, wskazując na ich znaczenie biologiczne i zastosowanie diagnostyczne.

Słowa kluczowe: pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, egzosomy, metody izolacji

Summary: Extracellular vesicles are nanometer biological structures released from almost all cells in physiological and pathological conditions. They transport numerous active molecules (proteins, lipids, DNA and RNA) and represent a major mode of intercellular communication. Due to their functionality and the possibility of practical use as diagnostic markers of many diseases, they rapidly became an inspiration for the scientific community. Small size and structure of extracellular vesicles make difficult to find universal method of their isolation. Lack of standardization of present methods lead to explore new and universal techniques. This article is an overview of previously known and widely used methods of extracellular vesicles isolations, taking into account their advantages and disadvantages. In addition, individual types of vesicles were defined, indicating their biological importance and diagnostic application.

Key words: extracellular vesicles, exosomes, isolation methods

WSTĘP

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *Extracellular Vesicles,* EVs) to niewielkie struktury otoczone błoną komórkową, uwalniane zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Początkowo uważane były jedynie za fragmenty błon komórkowych (ang. *cell derbis*), które nie mają znaczenia biologicznego. Pogląd ten zdecydowanie się zmienił na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, a intensywny rozwój badań nad EVs nadał im ogromny potencjał biomedyczny. Pierwsze wzmianki na temat EVs datuje się już na koniec lat sześćdziesiątych XX wieku. Za pioniera w tej dziedzinie uważa się Petera Wolfa, który w 1967 roku zidentyfikował niewielkie cząsteczki uwalniane z aktywowanych płytek krwi. Osad, z którego badacz wyizolował pęcherzyki metodą ultrawirowania, nazwany „pyłem płytkowym" (ang. *platelet dust*), wykazywał właściwości prokoagulacyjne [34]. Obecnie intensywnie rozwijający się nurt badań nad EVs budzi wielkie nadzieje w środowisku naukowym. Te małe struktury biologiczne pochodzenia błonowego, wyposażone w wiele funkcjonalnych cząsteczek, stanowią podstawę komunikacji międzykomórkowej. Możliwość praktycznego wykorzystania EVs, m.in. w diagnostyce chorób cywilizacyjnych, skłania naukowców do prowadzenia badań nad ich funkcją w organizmie, a co za tym idzie poszukiwania optymalnej metody ich izolacji. Ze względu na małe rozmiary oraz strukturę, problematyczne jest znalezienie uniwersalnej metody izolacji EVs łączącej w sobie istotne zalety tj. prostą i tanią procedurę bez konieczności użycia drogiej aparatury oraz możliwość izolacji z dużej liczby próbek jednocześnie. Praca ta stanowi przegląd najpopularniejszych metod izolacji EVs z uwzględnieniem ich wad i zalet.

CHARAKTERYSTYKA EVs

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, zwane również mikropęcherzykami błonowymi, są grupą nano- oraz mikrometrowych struktur uwalnianych z komórek eukariotycznych i prokariotycznych, zarówno w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* [35]. Stanowią one dość heterogenną populację, jednak ich ogólna budowa jest podobna [9]. Przybierają kształt kulisty, bądź owalny i posiadają różnorodne, funkcjonalne biomolekuły, m.in. specyficzne białka, lipidy oraz materiał genetyczny w postaci RNA i DNA. Ich obecność została potwierdzona w płynach ustrojowych organizmów żywych, m.in. we krwi, ślinie, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie owodniowym, żółci, mleku czy nasieniu. Bezpośrednie źródło EVs mogą stanowić płytki krwi, limfocyty T, komórki hematopoetyczne, retikulocyty, komórki dendrytyczne, komórki tuczne, śródbłonek naczyniowy, komórki nabłonka endometrium, komórki nabłonka jelit, neurony, astrocyty, łożysko, a także komórki nowotworowe [18].

KLASYFIKACJA, BUDOWA I BIOGENEZA EVs

Intensywny rozwój badań nad EVs dostarcza stale nowych informacji, dlatego używana nomenklatura staje się niejednoznaczna i może generować trudności związane z odpowiednim rozpoznaniem poszczególnych struktur. Niemniej jednak, głównym kryterium podziału EVs jest ich wielkość. Według niego EVs dzielimy na egzosomy (30-100 nm), większe ektosomy (100-1000 nm), zwane również mikropęcherzykami lub mikrocząstkami błonowymi oraz ciałka apoptotyczne (1000-4000 nm) [25]. W niektórych opracowaniach literaturowych wyróżnia się pęcherzyki egzosomopodobne o wielkości od 30 do 90 nm, które podejrzewa się m.in. o rolę w interakcji pasożyt-żywiciel poprzez transport zjadliwego białka tego pasożyta [6, 35]. Zakres wielkości EVs przedstawiany w źródłach literaturowych może być nieco odmienny, stąd dalsza ich klasyfikacja opiera się na kolejnych kryteriach, m.in. pochodzeniu, sposobie powstawania, niesionym ładunku (ang. *cargo*), markerach na powierzchni oraz sposobie ich izolacji (tab 1).

Biorąc pod uwagę biogenezę EVs, wyróżnia się pęcherzki powstające wewnątrz komórki, w przedziałach komórkowych, na drodze endosomalnej, czyli egzosomy. Uwalniane są one do przestrzeni międzykomórkowej poprzez fuzję błony pęcherzyka wewnątrzkomórkowego z błoną komórkową. Mechanizm powstawania ektosomów jest odmienny i polega na „pączkowaniu" błony komórkowej, w wyniku którego powstają mikropęcherzyki bogate w cząsteczki znajdujące się na komórce macierzystej. W procesie tym uczestniczą m.in. białka cytoszkieletu, a także jony wapnia [25]**.** Ciałka apoptotyczne powstają w podobny sposób, jednak czynnikiem stymulującym ten proces jest inicjacja apoptozy [24]. Podział EVs ze względu na pochodzenie może dotyczyć również konkretnej podgrupy pęcherzyków błonowych. Można zauważyć to wśród populacji ektosomów, które w zależności od typu komórki z jakiego są uwalniane dzielą się na osobne grupy. Przykładem mogą być mikropęcherzyki uwalniane z powierzchni komórek nowotworowych (ang. *Tumour-derived Microvesicles,* TMV), czy mikrocząstki pochodzenia śródbłonkowego (ang. *Endothelial Microparticles,* EMP), a także dość obszernie opisywane mikrocząstki pochodzenia płytkowego (ang. *Platelet--derived Microvesicles,* PMV) [25, 35].

Ładunek, który niosą EVs jest dość różnorodny zarówno dla egzosomów, jak i ektosomów. Na ogół jest on zdeterminowany pochodzeniem – odzwierciedla skład komórek z których EVs zostają uwolnione. W Tabeli 1 zaprezentowano skład molekularny poszczególnych rodzajów EVs. Egzosomy są bogate głównie w białka z rodziny tetraspanin (CD9, CD63, CD81, CD82), kompleks MHC klasy I oraz II, białka związane z apoptozą (ALG-2, TPxII, galantyna 3) oraz białko powierzchniowe wiążące lipidy (MFGE8). Zawierają również peptydazy powierzchniowe (CD13, CD26), białka uczestniczące w ich powstawaniu (TSG101, ESCRT, białka z rodziny Rab) i wiele innych białek, m.in. aneksyny, klatryny,

białka szoku cieplnego (HSP), białka budujące cytoszkielet (aktyna, miozyna), enzymy (aldolazy, enolazy, kinaza fosfoglicerynianowa, dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa – GAPDH) oraz czynniki związane z translacją (eIF4, eEF1) [39].

TABELA 1. Klasyfikacja i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (wg. [26])
TABLE 1. Classification and characterization of extracellular vesicles [26]

	Typy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych		
	Egzosomy	**Ektosomy (mikrocząstki)**	**Ciałka apoptotyczne**
Rozmiar	30-100 nm	100-1000 nm	1000-4000 nm
Struktura	Homogenne	Heterogenne	Heterogenne
Miejsce powstawania	Ciałka wielopęcherzykowe (endosomy późne)	Błona komórkowa	Komórki apoptotyczne
Sposób powstawania	Konstytutywny	Regulowany	Regulowany
Mechanizm powstawania	Egzocytoza	„Pączkowanie”	Apoptoza
Mechanizm sortowania	Ceramido-zależny	Nieznany	Brak
Przechowywanie wewnątrzkomórkowe	Tak	Nie	Nie
Podstawowe markery białkowe	Tetraspaniny, HSP70, HSP90, Alix, Rab5a/b	Integryny, selektyny, CD40, kolagenazy (MMP), ezryna	Histony
Skład lipidowy	Cholesterol, ceramidy	Fosfatydyloseryna, cholesterol	Fosfatydyloseryna
Materiał genetyczny	miRNA, niekodujące RNA	mRNA, miRNA	mRNA, miRNA, DNA
Wiązanie z aneksyną V	Słabe	Silne	Silne

W przypadku ektosomów ich profil białkowy może być różny w zależności od tego z jakiego typu komórek pochodzą. Mikropęcherzyki uwalniane z płytek krwi posiadają marker CD41, z powierzchni erytrocytów zawierają CD235a, natomiast z komórek dendrytycznych CD11c. Oprócz białek, ektosomy niosą na swojej powierzchni również lipidy (głównie fosfolipidy). Ich zawartość nie jest jednakowa dla wszystkich mikrocząstek, jednak na ogół również odzwierciedla skład lipidowy komórek z których pochodzą. Wyjątkiem są ektosomy uwalniane z limfocytów

B, komórek dendrytycznych oraz linii komórkowej czerniaka, które zawierają sfingomielinę zamiast cholesterolu charakterystycznego dla ich komórek macierzystych. Mimo pewnych różnic w składzie molekularnym pomiędzy mikrocząstkami a egzosomami, oba typy pęcherzyków mogą zawierać materiał genetyczny w postaci RNA oraz DNA (tab. 1), który może pełnić istotne funkcje w przenoszeniu informacji genetycznej z komórki rodzicielskiej do odbiorczej [39].

FUNKCJA BIOLOGICZNA I POTENCJALNE ZASTOSOWANIE EVs

Funkcja biologiczna EVs w dużej mierze wynika z obecności bogatego zestawu molekuł znajdujących się w ich wnętrzu oraz na powierzchni. Podstawową funkcją biologiczną wszystkich EVs jest komunikacja międzykomórkowa oraz transport informacji biologicznej [21]. W związku z tym, że struktury te mają niewielkie rozmiary, mogą one przemieszczać się wraz z płynami ustrojowymi przekazując lokalnie lub na dłuższe dystanse cząsteczki zawarte w swoim wnętrzu. Na tej drodze może dochodzić do pobudzania komórki docelowej do produkcji różnych czynników, np. cytokin, czynników wzrostu, a także do transportowania receptorów powierzchniowych. Zachodzić może również transformacja komórki docelowej dzięki przenoszonym przez EVs mRNA, białkom i czynnikom transkrypcyjnym [35]. Dowiedziono, że mikrocząstki pochodzenia płytkowego mają wpływ na tworzenie zakrzepów naczyniowych w procesie krzepnięcia. Ich obecność potwierdzono w miejscach objętych stanami zapalnymi, gdzie mogą oddziaływać na komórki układu odpornościowego (limfocyty T i B, monocyty, komórki NK) [3]. Wiele ich funkcji pokrywa się także z funkcjami mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego, które odpowiedzialne są za regulację procesów zapalnych, apoptozę, krzepnięcie i fibrynolizę, a także za kurczenie się naczyń kapilarnych oraz angiogenezę [25]. Pojawiają się również badania na temat wpływu EVs na komórki rozrodcze żeńskie i męskie w czasie zapłodnienia oraz na dalszy rozwój ciąży poprzez oddziaływania z układem odpornościowym matki [28]. Opisuje się też udział EVs w procesie komunikacji pomiędzy nabłonkiem endometrium, a komórkami trofektodermy, co sprzyja implantacji zarodka [18].

EVs produkowane są nie tylko przez zdrowe komórki, ale również przez komórki nowotworowe. Poprzez wpływ na proliferację i migrację komórek, a także działanie proangigenne, EVs są zaangażowane w proces wzrostu nowotworu oraz powstawanie przerzutów [20]. Coraz częściej zwraca się uwagę na wpływ miRNA pochodzenia egzosomalnego na tworzenie naczyń krwionośnych, niezbędnych do wzrostu guzów nowotworowych. Przykład stanowi miRNA egzosomów uwalnianych z komórek raka nerki CD105+ [7]. EVs wpływają również na modulację układu odpornościowego skierowanego przeciw komórkom nowotworowym, co znacznie utrudnia walkę z tym schorzeniem [38]. Cząsteczki miRNA zawarte w egzosomach są często charakterystyczne dla danego typu nowotworu, np. rak piersi: miR-21, miR-1246 (egzosomy z osocza), rak prostaty: miR-141

(egzosomy z surowicy) [32]. EVs dzięki temu uznawane są za dobre markery diagnostyczne pozwalające wykrywać nowotwory w sposób mało inwazyjny we wczesnych stadiach ich rozwoju.

Uwalnianie EVs z tkanek patologicznych ma swoje ogromne zalety w aspekcie diagnostycznym. Dzięki temu możliwe jest monitorowanie ilości pęcherzyków w próbkach biologicznych pochodzących z płynów ustrojowych pacjentów w celu wczesnej diagnostyki lub określenia stadia rozwoju choroby. Znalazło to zastosowanie w diagnozowaniu chorób układu krążenia oraz chorób o podłożu zapalnym (zawał serca, reumatoidalnym zapaleniu stawów) poprzez identyfikację egzosomów o określonym profilu antygenów oraz niesionej informacji genetycznej [25]. Ponadto zdolność EVs do przenoszenia różnych cząsteczek może zostać wykorzystana w medycynie w rozwoju terapii celowanej. Trwają prace nad stworzeniem sztucznych egzosomów, które mogłyby dostarczać określone molekuły do śródbłonka naczyniowego, co mogłoby być wykorzystane w leczeniu powikłań cukrzycowych.

METODY IZOLACJI EVs

Proces izolacji stanowi zasadniczy etap analizy EVs pod względem strukturalnym i funkcjonalnym. Na przestrzeni ostatniej dekady opisano wiele metod pozyskiwania EVs, które ulegają ciągłym modyfikacjom. Powodem tego jest poszukiwanie niezawodnej metody izolacji EVs, która będzie łączyła wszystkie niezbędne aspekty z punktu widzenia badacza. Niestety dotychczas poznane metody nie są w pełni wystandaryzowane, dlatego naukowcy muszą stawać przed dylematem, jakimi kategoriami się kierować realizując swój cel badawczy. Przykładem mogą być kryteria tj. czystość i liczba otrzymanych pęcherzyków, które w zasadzie zawsze ze sobą konkurują [27]. Brakuje metody izolacji, w której te dwa parametry nie wykluczałyby się wzajemnie. Ten i wiele innych problemów skłania naukowców do opracowywania coraz lepszych metod izolacji EVs. Wady i zalety najczęściej stosowanych metod izolacji EVs przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Wady i zalety głównych metod izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs) (wg. [12])
TABLE 2. Advantages and disadvantages of predominant methods of extracellular vesicles (EVs) isolation [12]

Metoda izolacji	Czas izolacji	Zalety	Wady
Wirowanie różnicujące, ultrawirowanie	140-600 min	Niski koszt procesu, brak dodatkowych odczynników chemicznych	Wyspecjalizowany sprzęt, złożoność procesu, zanieczyszczenia, niska wydajność RNA, zdegradowane EVs, wydajność zależna od rodzaju rotora, siły wirowania i lepkości próbki

Metoda izolacji	Czas izolacji	Zalety	Wady
Wirowanie w gradiencie gęstości	250 min-2 dni	Czystość próbki, niska degradacja EVs, brak dodatkowych odczynników chemicznych	Złożoność procesu, straty próbki, problem z rozdziałem dużych cząstek o podobnym współczynniku sedymentacji
Filtracja sekwencyjna, ultrafiltracja	130 min	Prosta procedura, możliwość przetwarzania wielu próbek, czystość preparatów, brak ograniczenia objętością próbki	Zatykanie filtra, straty próbki, zanieczyszczenia białkami, mała ilość egzosomalnego białka
Hydrostatyczna filtracja dializacyjna (HFD, ang. *hydrostatic filtration dialysis*)	30 min-1 h / 75 ml	Odpowiednia dla wysoko rozcieńczonych próbek (np. mocz), niski koszt procesu, brak dodatkowych odczynników, niski stopień degradacji EVs, odpowiednia dla dużych objętości	Konieczność dodatkowego czyszczenia moczu z zanieczyszczeń bakteriami, straty próbki
Chromatografia wykluczenia (SEC, ang. *size-exclusion chromatography*)	1 ml/min + czyszczenie kolumny	Brak zanieczyszczeń białkowych, duża wydajność w połączeniu z ultrawirowaniem, powtarzalność, zachowana integralność EVs, wysoka czułość, brak strat próbki, brak dodatkowych odczynników chemicznych, duża ilość białka egzosomalnego, odpowiednia dla próbek o wysokiej lepkości	Problem z rozdziałem próbek o podobnej wielkości, ograniczona objętość próbki, specjalistyczny sprzęt, wysokie koszty, tworzenie agregatów lipoproteinowych
Powinowactwo immunologiczne (kulki magnetyczne, nano-kanały)	ok. 240 min	Czystość, wysoka selektywność	Wysokie koszty, ograniczona dostępność przeciwciał, trudności z wymyciem EVs z matrycy, degradacja EVs poprzez wymywanie buforem, niespecyficzne wiązania, straty próbki
Precypitacja preparatem typu Exoquick™	45-65 min (czasem nocna inkubacja)	Prosta procedura, zachowanie integralności EVs, niepotrzebny wyspecjalizowany sprzęt, pH zbliżone do fizjologicznego, wysokie stężenie jonów	Wysoki koszt (zwłaszcza dla rozcieńczonych próbek np. mocz), niska zawartość białka egzosomalnego, zanieczyszczenia
Wodny układ dwufazowy (ATPS, ang. *aqueous two phase system*)	75-195 min	Niski koszt, prosta procedura, czystość preparatu, wydajność procesu, niezdegradowane EVs	Obecność polimeru, konieczność wymiany fazy glikolu polietylowego
Precypitacja rozpuszczalnikami organicznymi (PROSPR, ang. *protein organic solvent precipitation*)	105 min	Niski koszt, prosta procedura	Tworzenie agregatów z białkami

WIROWANIE RÓŻNICUJĄCE

Najpopularniejszą i najczęściej stosowaną metodą izolacji EVs jest wirowanie różnicujące, które wykorzystuje serię wirowań we wzrastających przyspieszeniach [16]. Im większe przyspieszenie, tym mniejsze EVs są izolowane. Jej celem jest kolejno usunięcie większych komórek i ich fragmentów, które znajdują się w materiale poddanym izolacji oraz uzyskanie docelowej populacji pęcherzyków w postaci osadu na dnie probówki [10]. Zjawisko sedymentacji cząstek podczas wirowania jest możliwe dzięki różnorodnej ich gęstości oraz odmiennym rozkładzie wielkości [13]. Dlatego przy większych przyspieszeniach (ultrawirowanie) możliwy jest rozdział pęcherzyków na podgrupy. W pierwszym etapie wirowania (300 × *g*, 10 min.) pozbywamy się dużych zanieczyszczeń, tj. komórek i ich większych fragmentów, a także bakterii. W kolejnym cyklu, zwiększając przyspieszenie (2 000 × *g*, 10 min.), eliminuje się mniejsze zanieczyszczenia komórkowe. Zwiększenie przyspieszenia do kilkunastu tysięcy *g* (10 000 – 20 000 × *g*, 30 min.) pozwala na wyizolowanie frakcji ektosomów, a przy zastosowaniu przyspieszenia rzędu kilkuset tysięcy *g* można pozyskać najmniejsze pęcherzyki – egzosomy. Ze względu na koprecypitację agregatów białek lub fragmentów komórek dochodzi do zanieczyszczenia frakcji EVs. Stosuje się dodatkowe płukanie uzyskanego osadu roztworem buforu fosforanowego w celu uzyskania czystego preparatu bogatego w egzosomy. Całość procedury przeprowadza się w temperaturze 4°C, aby zminimalizować proces degradacji EVs [29]. Schemat postępowania jest często modyfikowany, poprzez zmianę czasu i prędkości wirowania, jednak sama idea metody jest niezmienna. Ograniczeniem tej metody jest niewątpliwie długi czas procedury, który może powodować rozpad EVs oraz wydłużać czas całego doświadczenia. Uzyskane pęcherzyki często agregują z białkami i innymi strukturami komórkowymi, których ciężko jest się pozbyć. Ponadto wydajność metody jest ograniczona poprzez możliwość ultrawirowania jedynie małych objętości próbki.

WIROWANIE W GRADIENCIE GĘSTOŚCI

Metoda wirowania różnicującego dosyć często ulega modyfikacji poprzez zastosowanie rozdziału próbki w gradiencie gęstości określonej cieczy, np. roztworu sacharozy, iodiksanolu, czy ioheksolu, w celu uzyskania czystej próbki zawierającej EVs [2]. Jest to możliwe dzięki różnicom gęstości zanieczyszczających struktur oraz EVs, które akumulują się w odpowiednich frakcjach cieczy odpowiadających ich gęstości [1]. Przykładowo, dla populacji egzosomów gęstość ta mieści się w zakresie od 1.10 do 1.21 g/ml [13]. Analiza próbek bogatych w EVs pochodzące z surowicy ludzkiej krwi, wykonana w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (ang. *Transmission Electron Microscopy,* TEM) wykazała, że wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy pozwala na uzyskanie pę-

cherzyków o mniejszym zanieczyszczeniu białkowymi agregatami w porównaniu do konwencjonalnej metody wirowania różnicującego [16]. Kolejną zaletą tej metody jest utrzymanie prawidłowej morfologii EVs, co jest niezwykle istotne w dalszych analizach materiału [33]. Metoda niesie jednak ze sobą ograniczenia polegające na izolowaniu struktur o gęstości podobnej do badanej populacji EVs, np. zanieczyszczenie lipoproteinami (ang. *High-Density Lipoproteins,* HDL) uzyskane podczas wirowania w gradiencie gęstości sacharozy i bromku potasu, co znacznie utrudnia interpretację wyników [36].

METODY OPARTE NA KRYTERIUM WIELKOŚCI

Spośród technik stosowanych do izolacji EVs wykorzystujących różnice w rozmiarze cząstek, wyróżnić możemy filtrację oraz chromatografię. Głównym założeniem filtracji jest wychwytywanie EVs przez filtry o odpowiednich rozmiarach porów oraz usuwanie niepożądanych cząstek o różnej wielkości w stosunku do EVs, które przepływają przez dany materiał porowaty [11]. Metoda ta często stanowi wstępny etap oczyszczania próbek przed izolacją, np. zastosowanie filtracji przed ultrawirowaniem, a także jest modyfikowana poprzez zastosowanie ciśnienia hydrostatycznego. Do większych objętości materiału badanego (> 400 ml) zalecane jest stosowanie ciśnienia, natomiast do mniejszych objętości wykorzystuje sie ultrawirowanie [14]. Przykładem techniki opartej na filtracji stosowanej w pozyskiwaniu egzosomów z medium hodowlanego jest filtracja sekwencyjna. W pierwszym etapie filtrowania usuwane zostają niepotrzebne komórki i inne duże fragmenty. Następnie wykorzystuje się filtrację w układzie stycznym, gdzie cząstki rozróżnia się na podstawie ich molekularnej wagi. Ostatnim etapem jest ultrafiltracja na materiale porowatym, którego rozmiar porów wynosi 0,1 μm, dzięki czemu większe zanieczyszczenia zostają na filtrze, a mniejsze egzosomy mogą przez niego się przedostać. Uzyskane tą metodą EVs charakteryzują się wysoką czystością, a technika ta także nie wpływa w znaczny sposób na ich morfologię [8].

Warto również wspomnieć o technice nazywanej hydrostatyczną filtracją dializacyjną (ang. *Hydrostatic Filtration Dialysis,* HFD), która znalazła swoje zastosowanie w izolacji EVs pochodzących z ludzkiego moczu (ang. *Urinary Extracellular Vesicles,* UEVs). Metoda ta jest odpowiednia dla większych objętości próbek, co nie jest możliwe w przypadku ultrawirowania. Technika wykorzystuje niskie ciśnienie hydrostatyczne do przepływu badanej cieczy przez tubę dializacyjną, gdzie EVs zatrzymują się na jej powierzchni i mogą być pobrane do dalszych analiz [17]. Zastosowana filtracja wspomagana ciśnieniem zagęszcza próbkę bez konieczności korzystania z wyspecjalizowanego sprzętu laboratoryjnego, co znacznie redukuje koszty. Ponadto niskie ciśnienie minimalizuje stopień degradacji EVs, przekładając się na wysoką jakość uzyskanych próbek. Niestety często stosowane do filtracji membrany zatrzymują część EVs, przez co wydajność może być nieco mniejsza.

Inną metodą, która wykorzystuje różnice wielkości cząstek jest chromatografia wykluczania (ang. *Size-Exclusion Chromatography,* SEC). Dzięki kolumnie wypełnionej specjalnym porowatym tworzywem, pęcherzyki osadzają się w nim, natomiast większe cząstki przepływają szybciej i są usuwane. Otrzymane EVs zazwyczaj nie są zanieczyszczone białkowymi agregatami, jednak metoda ta ma wadę w postaci nierozróżniania charakteru cząstek, a jedynie ich wielkości. To może generować trudności z właściwą identyfikacją odpowiednich struktur [11,19]. Dokonując porównania izolacji mikrocząstek pochodzących z moczu, dowiedziono, że połączenie metody SEC z ultrawirowaniem znacznie bardziej wzbogaca próbkę w ektosomy, niż ultrawirowanie czy ultrafiltracja stosowane osobno [22].

POWINOWACTWO IMMUNOLOGICZNE

Obecność specyficznych białek na powierzchni EVs oraz ich zdolność do wiązania się z przeciwciałami pozwala na wykorzystanie powinowactwa immunologicznego w izolacji EVs. Dzięki ogromniej ilości markerów występujących na powierzchni EVs, możliwa jest identyfikacja konkretnych podtypów EVs poprzez dobór odpowiednich przeciwciał rozpoznających specyficzne antygeny. Możemy wyróżnić wiele sposobów izolacji wykorzystujących powinowactwo immunologiczne. Wykorzystują one przeciwciała immobilizowane na różnych nośnikach, m.in. na kulkach magnetycznych, matrycach chromatograficznych, płytkach oraz urządzeniach do przepływu mikropłynów (ang. *microfluidics devices*) [37].

W przypadku kulek magnetycznych, przeciwciała powlekają ich powierzchnię, dzięki czemu po dodaniu próbki zawierającej EVs wiążą się one z odpowiednim antygenem na powierzchni pęcherzyka, a następnie zostają odseparowane od reszty roztworu. Jest to możliwe poprzez przyłożenie siły magnetycznej do układu (np. naczynia, kolumny), w którym znajdują się kulki. W wyniku takiego postępowania, w naczyniu pozostają agregaty związane z EVs, które następnie mogą zostać odseparowane poprzez zastosowanie odpowiednich zabiegów płuczących. Niestety takie oczyszczanie jest często problematyczne, a uzyskane EVs mogą nie nadawać się do dalszych analiz ze względu na zniszczoną strukturę. Warto również pamiętać, że wykorzystywane w metodzie kulki magnetyczne mają ograniczoną powierzchnię i część pęcherzyków może pozostać niezwiązana w roztworze, a następnie usunięta. Jednak mimo opisanych niedogodności metoda pozwala na wykrycie określonej populacji EVs w oparciu o specyficzne markery, nie wprowadzając ograniczenia wielkością, co jest jej dużym atutem [27].

Powinowactwo immunologiczne jest wykorzystywane również coraz częściej w metodzie izolacji EVs opartej na strumieniowym przepływie cieczy. Stosowane

w niej urządzenia indukują przepływ substancji przez specjalne kanały, w których dochodzi do wiązania EVs, jeśli zostaną zastosowane przeciwciała skierowane przeciwko markerom na pęcherzykach. Taki sposób pozyskiwania EVs charakteryzuje się wysoką specyficznością w stosunku do różnych ich rodzajów, a sam proces twa dość krótko w porównaniu z innymi metodami izolacji [11].

Urządzenia do przepływu mikropłynów, oprócz powinowactwa immunologicznego mogą wykorzystywać także filtry, przez które EVs zostają „przesiewane" lub specjalne porowate struktury, w których pęcherzyki mogą się zatrzymywać. W przypadków układów z filtrami, zostaje do nich przyłożone napięcie elektryczne, przez co ujemnie naładowane EVs poruszają się wzdłuż filtra do elektrody dodatniej, dzięki czemu mogą zostać odseparowane od reszty roztworu [11]. Inna metoda wykorzystywana do izolacji egzosomów opiera się na przepływie próbki przez nano-kanały na mikro-kolumnach (ang. *ciliated nanowire-on-micropillars*). Większe fragmenty komórek, białka oraz inne EVs zostają usunięte, a egzosomy o średnicy od 40 do 100 nm są zatrzymywane w strukturze porów. Ich odzyskanie następuje poprzez przepłukanie nano-kanałów buforem fosforanowym [31].

PRECYPITACJA

Nową podejściem do izolacji EVs jest wykorzystanie precypitacji, której główną zaletą jest łatwość wykonania oraz skrócenie czasu procesu, przy zachowaniu dobrej czystości preparatu. Polega ona na wytrącaniu EVs dzięki ich specyficznym właściwościom powierzchniowym. Wyróżnić można precypitację wykorzystującą związki polimerowe, np. preparat Exoquick™ (System Biosciences, USA), wodny układ dwufazowy ATPS (ang. *Aqueous Two Phase System*), a także tą, która opiera się na rozpuszczalnikach organicznych, np. PROSPR (ang. *Protein Organic Solvent Precipitation*). Preparat Exoquick™ zawiera specyficzną mieszankę polimerów, dzięki którym po inkubacji z badaną próbką i łagodnym wirowaniu możliwa jest skuteczna izolacja EVs. Metoda ATPS opiera się na zastosowaniu dwóch wodnych roztworów glikolu polietylowego (PEG) oraz dekstranu (DEX). Cząsteczki znajdujące się w takim układzie w krótkim czasie przemieszczają się i zajmują określone miejsca w danej fazie, dzięki czemu w łatwy sposób mogą zostać pobrane i wykorzystane do dalszych badań [23]. Z kolei PROSPR wykorzystuje rozpuszczalniki organiczne, tj. aceton, chloroform czy kwas trichlorooctowy, które przyciągają reszty aminokwasowe, dzięki czemu możliwa jest agregacja białek zanieczyszczających próbkę. Wyizolowane EVs charakteryzują się dużą czystością, a ich struktura zostaje niemal nienaruszona dzięki łagodnym warunkom procesu, co w porównaniu z ultrawirowaniem jest trudne do uzyskania (wysoka prędkości wirowania wpływa na morfologię EVs) [4,30].

PODSUMOWANIE

Badanie funkcji EVs nieodłącznie wiąże się z wyborem odpowiedniej metody ich izolacji. Pomimo obecności różnorodnych technik, wciąż nie opracowano „złotej metody", która utrzymywałaby na wysokim poziomie zarówno ilościowe, jak i jakościowe parametry procesu izolacji EVs [15]. W 2016 roku w *Journal of Extracellular Vesicles* opublikowano raport, wg. którego ultrawirowanie pozostaje najpopularniejszą metodą izolacji EVs – aż 81% ankietowanych stosuje tę technikę (dla izolacji EVs z pożywki hodowlanej liczba osób stosujących tę metodę wzrasta do 85%). Drugie miejsce zajmuje kombinacja różnych metod (59%). Następnie ankietowani wybierają wirowanie w gradiencie gęstości (20%), filtrację (18%), SEC (15%) oraz precypitację (14%) [5]. Duże znaczenie biologiczne i diagnostyczne EVs sprawia, że niezbędne są dalsze poszukiwania uniwersalnej metody ich izolacji.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z dotacji przyznanej przez MNiSW na działalność statutową (DS-3243/KFiEZ)

LITERATURA

[1] Cantin R, Diou J, Bélanger D, Tremblay AM, Gilbert C. Discrimination between exosomes and HIV-1: purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J Immunol Methods* 2008; **338**: 21-30.

[2] Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**: 23111.

[3] Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatol* 2005; **52**: 3337-3348.

[4] Gallart-Palau X, Serra A, Wong AS, Sandin S, Lai MK, Chen CP, Kon OL, Sze SK. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PRotein Organic Solvent PRecipitation (PROSPR). *Sci Rep* 2015; **5**: 14664.

[5] Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, The C, Witwer KW, Wauben M, Hill AF. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles* 2016; **1**: 1-6.

[6] Gatkowska J, Długońska H. Rola zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych w interakcji pasożyt-żywiciel. *Postepy Hig Med Dosw* 2016; **70**: 951-958.

[7] Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastic niche. *Cancer Res* 2011; **71**: 5346-5356.

[8] Heinemann ML, Ilmer M, Silva LP, Hawke DH, Recio A, Vorontsova MA, Vykoukal J. Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J Chromato A* 2014; **1371**: 125-135.

[9] Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiol* 2005; **20**: 22-27.

[10] Ismail N, Wang Y, Dakhlallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG, Marsh CB. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 2013; **121** (6): 984-995.
[11] Kang H, Kim J, Park J. Methods to isolate extracellular vesicles for diagnosis. *Micro and Nano Syst Lett* 2017; **5**: 15.
[12] Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *Biomed Res Int* 2018; **2018:** 8545347.
[13] Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics* 2017; **7** (3): 789-804.
[14] Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegmans AP, Leimgruber A, Möller A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles* 2015; **4**: 27031.
[15] Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**: 26913.
[16] Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, Soria CE, Oquin S, Bonebreak CM, Saracoglu E, Skog J, Kuo WP. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* 2013; **394** (10): 1253-1262.
[17] Musante L, Tataruch-Weinert D, Kerjaschki D, Henry M, Meleady P, Holthofer H. Residual urinary extracellular vesicles in ultracentrifugation supernatants after hydrostatic filtration dialysis enrichment. *J Extracell Vesicles* 2017; **6**: 1267896.
[18] Nguyen HP, Simpson RJ, Salamonsen LA, Greening DW. Extracellular vesicles in the intrauterine environment: challenges and potential functions. *Biol Reprod* 2016; **95**: 109.
[19] Nordin JZ, Lee Y, Vader P, Mäger I, Johansson HJ, Heusermann W, Wiklander OP, Hällbrink M, Seow Y, Bultema JJ, Gilthorpe J, Davies T, Fairchild PJ, Gabrielsson S, Meisner-Kober NC, Lehtiö J, Smith CI, Wood MJ, El Andaloussi S. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine* 2015; **11** (4): 879-883.
[20] Rajagopal C, Harikumar KB. The origin and functions of exosomes in cancer. *Front Oncol* 2018; **20**: 8:66.
[21] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; **200**: 373-383.
[22] Rood IM, Deegens JK, Merchant ML, Tamboer WP, Wilkey DW, Wetzels JF, Klein JB. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2010; **78** (8): 810-816.
[23] Shin H, Han C, Labuz JM, Kim J, Kim J, Cho S, Gho US, Takayama S, Park J. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. *Sci Rep* 2015; **5**: 13103.
[24] Sikora E. Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. *Postepy Biochem* 1996; **42**: 108-113.
[25] Stępień E, Targosz-Korecka M. Mikrocząstki w regulacji funkcji śródbłonka. *Postepy Biochem* 2013; **59**: 395-404.
[26] Surman M, Stępień E, Hoja-Łukowicz D, Przybyło M. Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome. *Clin Exp Metastasis* 2017; **34**: 273-289.
[27] Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach. *Int J Mol Med* 2015; **36**: 11-17.
[28] Tannetta D, Dragovic R, Alyahyaei Z, Southcombe J. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. *Cell Mol Immunol* 2014; **11**: 548-563.
[29] Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; 3.22.1-3.22.29.
[30] Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, Bracke M, De Wever O, Hendrix A. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell Vesicles* 2014; **18**: 3.

[31] Wang Z, Wu H, Fine D, Schmulen J, Hu Y, Godin B, Zhang JXJ, Liu X. Ciliated micropillars for the microfluidic-based isolation of nanoscale lipid vesicles. *Lab Chip* 2013; **13**: 2879-2882.
[32] Wesołowska A, Piwocka K. Egzosomalne mikroRNA jako element komunikacji międzykomórkowej w nowotworach. *Postepy Biochem* 2017; **63** (2): 110-118.
[33] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-'T Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013; **2**: 20360.
[34] Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; **13**: 269288.
[35] Wójtowicz A, Baj-Krzyworzeka M, Baran J. Charakterystyka i znaczenie biologiczne mikropęcherzyków błonowych. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; **68**: 1421-1432.
[36] Yuana Y, Levels J, Grootemaat A, Sturk A, Nieuwland R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**: 23262.
[37] Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* 2015; **2015**: 319-323.
[38] Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 959-964.
[39] Żmigrodzka M, Guzera M, Miśkiewicz A, Jagielski D, Winnicka A. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumour Biol* 2016; **37**: 14391-14401.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 08.05.2018
Przyjęto: 20.05.2018
Małgorzata Grzesiak
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
ul. Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
e-mail: malgorzata.grzesiak@urk.edu.pl
tel.: 12 662 40 43
fax: 12 633 33 07