



<https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-3-234-238>

Экстракция экзосом из плазмы крови пациентов с мультиформной глиобластомой

Гареев Ильгиз Фанилевич — аспирант кафедры нейрохирургии и медицинской реабилитации с курсом ИДПО, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, orcid.org/0000-0002-4965-0835

Бейлерли Озал Арзуман оглы — аспирант кафедры урологии с курсом ИДПО, e-mail: obeylerli@mail.ru, тел.: +79875980003, orcid.org/0000-0002-6149-5460

Shiguang Zhao — профессор, зав. кафедрой нейрохирургии, e-mail: guangsz@hotmail.com

Guang Yang — врач-нейрохирург, ассистент кафедры нейрохирургии, e-mail: alexshen1987@126.com

Jingxian Sun — аспирант кафедры нейрохирургии, e-mail: jingxiansun0725@gmail.com

Бейлерли Аферин Таги кызы — клинический ординатор 2 года обучения кафедры акушерства и гинекологии №1, e-mail: agamidli@mail.ru, orcid.org/0000-0002-3486-6246

Сафин Шамиль Махмутович — д.м.н., профессор, зав. кафедрой нейрохирургии и медицинской реабилитации с курсом ИДПО, e-mail: safinsh@mail.ru, orcid.org/0000-0002-0100-6100

И.Ф. Гареев^{1,2,3}, О.А. Бейлерли^{1,2,3}, Shiguang Zhao^{1,2}, Guang Yang^{1,2}, Jinxian Sun^{1,2}, А.Т. Бейлерли^{3,4}, Ш.М. Сафин³

¹Первый аффилированный госпиталь Харбинского медицинского университета, Китай, провинция Хэйлунцзян, 150081, Харбин, Баоцзянь-роуд, 157

²Институт мозга Харбинского медицинского университета,

Китай, провинция Хэйлунцзян, 150081, Харбин, Баоцзянь-роуд, 157

³Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

⁴Второй аффилированный госпиталь Харбинского медицинского университета,

Китай, провинция Хэйлунцзян, 150081, Харбин, Баоцзянь-роуд, 157

Контакты: Гареев Ильгиз Фанилевич, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, тел.: +7 9374952927

Резюме

Введение. Мультиформная глиобластома (GBM) является наиболее распространенной и агрессивной формой первичной злокачественной опухоли головного мозга у взрослых с плохим прогнозом. Было показано, что экзосомы являются полезными неинвазивными биомаркерами для диагностики и прогноза опухолей, включая GBM. Экзосомы играют роль в качестве биологических носителей, которые могут выполнять различные задачи через различные сигнальные пути канцерогенеза, такие как PI3K/AKT, SOX2, PTEN, ERK и STAT3.

Материалы и методы. Экзосомы были выделены из плазмы крови, отобранной у пациентов с диагнозом GBM до хирургической резекции.

Результаты и обсуждение. Экзосомы, полученные из плазмы крови больных с GBM, имели размеры 40–100 нм и сферическую форму, что соответствует морфологическим характеристикам экзосом. Сочетание ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования позволяет получить образцы экзосом из плазмы крови без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей.

Заключение. Описанный здесь экспериментальный протокол для экстракции экзосом из плазмы крови пациентов с GBM является эффективным методом обеспечения чистоты экзосом. Использование этого метода дает возможности для будущих исследований относительно роли экзосом в патогенезе GBM, и его можно было бы в равной степени использовать для исследований с другими патологиями человека.

Ключевые слова: глиобластома, новообразования, экзосомы, плазма, экстракция, центрифугирование, биомаркеры

Для цитирования: Гареев И.Ф., Бейлерли О.А., Shiguang Zhao, Guang Yang, Jinxian Sun, Бейлерли А.Т., Сафин Ш.М. Экстракция экзосом из плазмы крови пациентов с мультиформной глиобластомой. Креативная хирургия и онкология. 2019;9(3):234–238. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-3-234-238>

Extraction of Exosomes from Glioblastoma Multiforme Patients' Blood Plasma

Ilgiz F. Gareev^{1,2,3}, Ozal A. Beylerli^{1,2,3}, Shiguang Zhao^{1,2}, Guang Yang^{1,2}, Jinxian Sun^{1,2}, Aferin T. Beilerli^{3,4}, Shamil M. Safin³

¹The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 157 Baojian str., Harbin, 150081, Heilongjiang Province, China

²Institute of Brain Science, Harbin Medical University, 157 Baojian str., Harbin, 150081, Heilongjiang Province, China

³Bashkir State Medical University, 3 Lenin str., Ufa, 450008, Russian Federation

⁴The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 157 Baojian str., Harbin, 150081, Heilongjiang Province, China

Contacts: Gareev Ilgiz Fanilevich, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru

Summary

Introduction. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive form of primary malignant brain tumour in adults associated with a poor prognosis. Exosomes have been shown to be useful non-invasive biomarkers for the diagnosis and prognosis of tumours, GBM included. Exosomes play a role of biological carriers which can perform various tasks through various signalling pathways of carcinogenesis, such as PI3K/AKT, SOX2, PTEN, ERK and STAT3.

Materials and methods. Exosomes were isolated from blood plasma taken from patients diagnosed with GBM prior to surgical resection.

Results and discussion. Plasma exosomes from patients with GBM had spherical shape and varied in size from 40 to 100 nm matching the exosomes' morphological characteristics. The combination of ultrafiltration and double ultracentrifugation makes it possible to extract exosome examples from plasma without the presence of contaminating particles over 100 nm in size; the shape and size of these vesicles match the characteristics of exosomes isolated from other biological fluids.

Conclusion. The experimental protocol for the extraction of exosomes from GBM patients' plasma described here proves effective as a method used to ensure the purity of exosomes. Applying this method offers further opportunities for research into the role of exosomes in GBM pathogenesis. Equally this method can be used in research involving other human pathologies.

Keywords: glioblastoma, neoplasms, exosomes, plasma, extraction, centrifugation, biomarkers

For citation: Gareev I.F., Beylerli O.A., Shiguang Zhao, Guang Yang, Jinxian Sun, Beilerli A.T., Safin Sh.M. Extraction of Exosomes from Glioblastoma Multiforme Patients' Blood Plasma. *Creative Surgery and Oncology*. 2019;9(3):234–238. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2019-9-3-234-238>

Gareev Ilgiz Fanilevich — Post-graduate student of the Department of Neurosurgery and Medical Rehabilitation with the Course of Additional Professional Education, e-mail: ilgiz_gareev@mail.ru, orcid.org/0000-0002-4965-0835

Beylerli Ozal Arzuman — Post-graduate student of the Department of Urology with the Course of Additional Professional Education, e-mail: obeylerli@mail.ru, [мен.: +79875980003](tel:+79875980003), orcid.org/0000-0002-6149-5460

Shiguang Zhao — Professor, Head of the Department of Neurosurgery, e-mail: guangsz@hotmail.com

Guang Yang — Neurosurgeon, Assistant lecturer of the Department of Neurosurgery, e-mail: alexshen1987@126.com

Jingxian Sun — Post-graduate student of the Department of Neurosurgery, e-mail: jingxiansun0725@gmail.com

Beylerli Aferin Tagi kyzy — Resident of the Department of Obstetrics and Gynecology No.1, e-mail: agamidli@mail.ru, orcid.org/0000-0002-3486-6246

Safin Shamil Mahmutovich — Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Neurosurgery and Medical Rehabilitation with the Course of Additional Professional Education, e-mail: safinsh@mail.ru, orcid.org/0000-0002-0100-6100

Введение

Экзосомы представляют собой мембранные везикулы размером с вирусы, секретируемые как нормальными, так и патологическими клетками, и они присутствуют во всех жидкостях организма, включая кровь [1, 2]. Образование и высвобождение экзосом являются АТФ-зависимыми, и, таким образом, экзосомы являются продуктами живых клеток. Экзосомы отличаются от других внеклеточных везикул не только небольшими размерами и определенным биогеолизом, но также и другими характерными свойствами, такими как морфология, плавучая плотность на градиентах сахарозы и наличием профиля специфических поверхностных белков [3]. Молекулярный «груз» экзосом представляет особый интерес, поскольку он обогащен компонентами, полученными из плазматической мембраны родительской клетки. Везикулярное содержимое экзосом включает нуклеиновые кислоты, ферменты, цитокины, а также различные растворимые компоненты, которые отражают цитоплазматическое содержание родительской клетки [4, 5]. Экзосомные мембраны обогащены тетраспанинами, которые организованы в обогащенные тетраспанином мембранные домены (TEMs) и, как полагают, играют ключевую роль в биогеолизе экзосом [6]. Тетраспанины, такие как CD81, CD83, CD9, CD63, CD37, CD53 и CD151, широко используются в качестве маркеров экзосом, хотя экзосомы, полученные из разных типов клеток, могут нести только некоторые, но не все из этих тетраспанинов. Экзосомы также несут компоненты эндосомного сортировочного комплекса, ответственного за транспорт (ESCRT), и различные вспомогательные молекулы, такие как ALIX и TSG101 [7]. Они также часто используются в качестве экзосомальных маркеров [8]. Комплекс ESCRT участвует в сортировке клеточных компонентов в экзосомы и в выделении экзосом из родительских клеток. Этот процесс биогеолиза состоит из скоординированной серии этапов, включающих множество молекул, и выполняется всеми клетками, секретирующими экзосомы [9].

Существует значительный интерес к изучению физических и молекулярных характеристик экзосом с целью их использования в диагностических или терапевтических целях. Такие анализы сначала требуют, чтобы экзосомы были обогащены и изолированы от окружающего биологического материала, который представляет собой сложную смесь клеток и клеточного дегриса, белка, нуклеиновых кислот и липидов [10]. Кроме того, возможность агрегации экзосом в более крупные везикулы или, наоборот, расщепление везикул в более мелкие микровезикулы делает экстракцию экзосом и их функциональную характеристику сложной и проблематичной. Тем не менее, учитывая, что биосинтез экзосом включает в себя активную, а не пассивную секрецию из клеток, представляется разумным рассматривать экзосомы в качестве особых «представителей» клеточного фенотипа и генотипа родительской клетки. Исходя из этих предпосылок, циркулирующие экзосомы становятся биомаркерами, которые несут потенциально полезную информацию о состоянии родительской клетки, в частности клеток GBM.

Успех исследований экзосом в качестве биомаркеров зависит от методов качественной экстракции. В данной работе мы описываем в общих чертах экстракцию экзосом из плазмы больных GBM, что позволит проводить дальнейшие этапы, такие как использование просвечивающей электронной микроскопии (размер и морфология), анализа отслеживания мелких частиц (размер и концентрация) и вестерн-блоттинга (наличие экзосомных маркеров) в качестве стандартных методов для характеристики экзосом [11].

Материалы и методы

Материалы

1. Стерильные наконечники для дозаторов.
2. Стерильные пробирки Эппендорфа 1,5 и 2 мл.
3. Охлаждаемая, высокоскоростная бенчтоп-центрифуга.
4. Напольная ультрацентрифуга Optima™ XPN-90.
5. Пробирки для ультрацентрифуги 25 мл.
6. Абсолютный этиловый спирт.
7. Фосфатно-солевой буфер (PBS).
8. Дистиллированная вода.
9. Аналитические весы Sartorius.

Методы

Для выбора пациентов следует отметить, что несколько факторов, таких как возраст, пол, текущие схемы лечения и многие другие, могут влиять на состав экзосом в крови и, следовательно, должны быть приняты во внимание до сбора образцов.

Сбор и обработка крови

1. Производим забор 10 мл периферической крови с помощью венопункции в пробирки для сбора крови с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) и осторожно смешиваем.
2. Центрифугируем данные пробирки для сбора крови при 1000 × g в течение 20 мин при комнатной температуре, чтобы осадить клетки крови. Используя дозатор со стерильными наконечниками, переносим плазменную фракцию (4–5 мл) в коническую пробирку на 25 мл. Разводим плазму с 10 мл 1 × фосфатно-солевого буфера (PBS). Удаляем клетки крови (эритроциты и лейкоциты, также известные как мононуклеарные клетки периферической крови (PBMNC)) надлежащим образом в маркированные контейнеры для биологически опасных отходов.
3. Храним образцы плазмы при 4 °C в течение короткого срока (2–3 дня) или при -80 °C для длительного хранения.

Примечание. Перед дальнейшей обработкой доводим образцы замороженной плазмы до 4 °C.

Экстракция экзосом из плазмы крови

1. Переносим 700 мкл размороженного образца плазмы в подходящую 2 мл пробирку Эппендорфа для центрифугирования. Заполняем пробирку равным объемом 700 мкл PBS, чтобы разбавить образец и предотвратить коллапс тонкостенных пробирок во время процедуры центрифугирования.

2. Центрифугируем данный образец при $3000 \times g$ в течение 10 мин при $4^\circ C$, чтобы удалить криопреципитат.
 3. Переносим верхний слой образца без осадка в новые 2 мл пробирки Эппендорфа и центрифугируем при $10\,000 \times g$ в течение 30 мин при $4^\circ C$, чтобы удалить клеточный мусор.
 4. Проводим очистку 25 мл пробирок для ультрацентрифугирования с помощью абсолютного этилового спирта и дистиллированной воды, далее просушив пробирки.
 5. Переносим верхний слой образца без осадка в объеме 1 мл в 25 мл пробирки.
 6. Проводим проверку массы каждого образца на аналитических весах, добавляя PBS для выравнивания массы.
- Примечание.* Максимальное количество образцов для ультрацентрифугирования 6. Каждый образец должен соответствовать массе противоположно стоящего образца в роторе для исключения ошибок и поломки техники.
7. Ультрацентрифугируем очищенную плазму при $100\,000 \times g$ в течение 70 минут при $4^\circ C$ для удаления крупных везикул. После тщательно удаляем супернатант. Ресуспенсируем полученные гранулы в 1 мл PBS в данной пробирке.
 8. Повторяем шаг 6.
 9. Ультрацентрифугируем при $100\,000 \times g$ в течение 70 мин при $4^\circ C$.
 10. Удаляем супернатант и ресуспенсируем гранулы экзосом в 100 мкл PBS в пробирках для ультрацентрифугирования и переносим с помощью дозатора в новые 1,5 мл пробирки Эппендорфа.

Примечание. Если невозможно перейти непосредственно к следующему этапу, сохраняем осадок, содержащий экзосомы, при $4^\circ C$ в течение 1–2 дней.

Результаты и обсуждение

Экзосомы — это небольшие мембранные везикулы эндосомального происхождения диаметром от 30 до 100 нм. Они секретируются различными типами клеток, нормальными или патологическими. В свое время экзосомы для клетки рассматривали как способ избавиться от ненужного «мусора», например «устаревших» белков. Однако теперь доказано, что эти везикулы больше, чем просто «мусорные ящики», и играют важную роль в межклеточной коммуникации. Экзосомы, таким образом, используются для передачи информации (микроРНК, вирусы) и других материалов, таких как белки, из одной клетки в другую. Опухолевые клетки играют особую важную роль в производстве экзосом. Экзосомы опухолевых клеток способны дистанционно участвовать в образовании предметастатических «ниш». Тем самым экзосомы являются ценным источником информации GBM, раскрывая стадию и прогрессирование опухоли и, следовательно, могут стать потенциальными биомаркерами при данном онкологическом заболевании человека. К тому же, поскольку экзосомы являются основным средством межклеточной коммуникации,

они, вероятно, также могут участвовать в лечении при различных заболеваниях, включая GBM. Экзосомы имеют низкую токсичность, высокую стабильность в кровообращении и высокую эффективность доставки в клетки-мишени. В недавних исследованиях указывается применение экзосом в качестве персонализированных целевых транспортных средств для доставки лекарств [12, 13]. Морфологические характеристики везикул, включая их размер, могут быть важной диагностической характеристикой. Основная часть везикул, полученных из плазмы крови больных с GBM, имела размеры 40–100 нм и сферическую форму, что соответствует морфологическим характеристикам экзосом (рис. 1).

Таким образом, сочетание ультрафильтрации и двойного ультрацентрифугирования позволяет получить образцы экзосом из плазмы крови без примесей частиц более 100 нм, а форма и размер этих везикул соответствуют характеристикам экзосом, выделенных из других биологических жидкостей [14–17].

Заключение

Исследования экзосом с их внутренним содержимым, таким как микроРНК или длинные некодирующие РНК (lncRNAs), при онкологии, сердечно-сосудистых заболеваниях, иммунных заболеваниях представляют новые возможности для новых открытий с целью понимания патогенеза, разработки генной терапии и потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров. Анализ микроРНК или lncRNAs при раковых заболеваниях имеет свои уникальные особенности, такие как идентификация определенных некодирующих РНК, идентификация мишени(-ей) и изучение взаимодействия между микроРНК или lncRNAs и их мишенями. Другим прорывом, который мы сейчас видим, является исследование микроРНК и lncRNAs в циркулирующих экзосомах, которые в настоящее

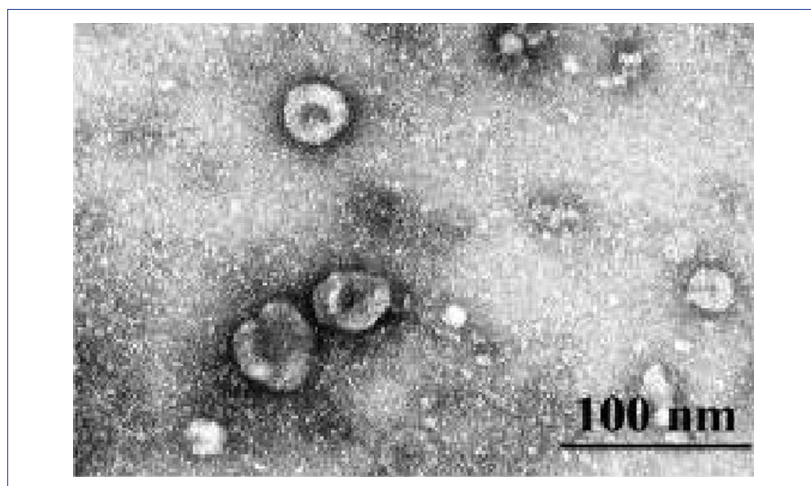


Рисунок 1. Экзосомы, выделенные из плазмы крови больных с GBM. Изображение показывает микровезикулы диаметром 60 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия, негативное контрастирование 2 % водным раствором уранилацетата
Figure 1. Exosomes isolated from GBM patients' blood plasma. 60nm-diameter microvesicles. Transmission electron microscopy, negative contrast with 2% aqueous solution of uranyl acetate

время благодаря различным методам изоляции доступны и позволяют изучать их в качестве биомаркеров при ГВМ. Описанный здесь экспериментальный протокол для экстракции экзосом из плазмы пациентов с ГВМ является эффективным методом обеспечения чистоты экзосом. Использование этого метода дает возможности для будущих исследований относительно роли экзосом в патогенезе ГВМ, и его можно было бы в равной степени использовать для исследований с другими патологиями человека.

Информация о конфликте интересов.

Конфликт интересов отсутствует.

Информация о спонсорстве.

Научная работа и процесс публикации выполнены при финансовой поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 5 февраля 2019 № УГ-28.

Список литературы / References

- 1 Tian W, Liu S, Li B. Potential role of exosomes in cancer metastasis. *Biomed Res Int.* 2019;2019:4649705. DOI: 10.1155/2019/4649705
- 2 Osaki M, Okada F. Exosomes and their role in cancer progression. *Yonago Acta Med.* 2019;62(2):182–90. DOI: 10.33160/yam.2019.06.002
- 3 Zhang H, Wang L, Li C, Yu Y, Yi Y, Wang J, et al. Exosome-induced regulation in inflammatory bowel disease. *Front Immunol.* 2019;10:1464. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01464
- 4 Lema D.A., Burlingham W.J. Role of exosomes in tumour and transplant immune regulation. *Scand J Immunol.* 2019 Jul 8:e12807. DOI: 10.1111/sji.12807
- 5 Kelemen E., Danis J., Göblös A., Bata-Csörgő Z., Széll M. Exosomal long non-coding RNAs as biomarkers in human diseases. *EJIFCC.* 2019;30(2):224–36. PMID: 31263395
- 6 Wang X., Zhong W., Bu J., Li Y., Li R., Nie R., et al. Exosomal protein CD82 as a diagnostic biomarker for precision medicine for breast cancer. *Mol Carcinog.* 2019;58(5):674–85. DOI: 10.1002/mc.22960
- 7 Laidlaw K.M.E., MacDonald C. Endosomal trafficking of yeast membrane proteins. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(6):1551–58. DOI: 10.1042/BST20180258
- 8 Chutipongtanate S., Greis K.D. Multiplex biomarker screening assay for urinary extracellular vesicles study: a targeted label-free proteomic approach. *Sci Rep.* 2018;8(1):15039. DOI: 10.1038/s41598-018-33280-7
- 9 Bowers K. RNA interference-mediated inhibition of ESCRT in mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 2019;1998:305–18. DOI: 10.1007/978-1-4939-9492-2_22
- 10 Sharma S., Scholz-Romero K., Rice G.E., Salomon C. Methods to enrich exosomes from conditioned media and biological fluids. *Methods Mol Biol.* 2018;1710:103–15. DOI: 10.1007/978-1-4939-7498-6_8
- 11 Koritzinsky E.H., Street J.M., Star R.A., Yuen P.S. Quantification of exosomes. *J Cell Physiol.* 2017;232(7):1587–90. DOI: 10.1002/jcp.25387
- 12 Luarte A., Bátiz L.F., Wyneken U., Lafourcade C. Potential therapies by stem cell-derived exosomes in CNS diseases: focusing on the neurogenic niche. *Stem Cells Int.* 2016;2016:5736059. DOI: 10.1155/2016/5736059
- 13 Moon J.M., Xu L., Giffard R.G. Inhibition of microRNA-181 reduces forebrain ischemia-induced neuronal loss. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(12):1976–82. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.157
- 14 Elsharkawi F., Elsabah M., Shabayek M., Khaled H. Urine and serum exosomes as novel biomarkers in detection of bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(7):2219–24. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2219
- 15 Zhou N., Li C., Zhou Y., Liu J., Su X., Qin H., et al. Potential markers from serum-purified exosomes for detecting oral squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019 Jul 26;pii: cebp.1122.2018. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-1122
- 16 Doyle L.M., Wang M.Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells.* 2019;8(7):E727. DOI: 10.3390/cells8070727
- 17 Malla B., Aebbersold D.M., Dal Pra A. Protocol for serum exosomal miRNAs analysis in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *J Transl Med.* 2018;16(1):223. DOI: 10.1186/s12967-018-1592-6