

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
Т. Г. Волова
подпись инициалы, фамилия
«__» _____ 2023 г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Разработка способа выделения фракции экзосом мочи человека
и их характеристика»

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	_____	<u>Л.А. Франк</u> инициалы, фамилия
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		<u>К.А Драндрова</u> инициалы, фамилия
	подпись, дата		
Рецензент	_____	_____	<u>Е.В. Еремеева</u> инициалы, фамилия
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Консультант	_____	_____	<u>В.В. Красицкая</u> инициалы, фамилия
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2023

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Внеклеточные везикулы	9
1.1.1 Внеклеточные везикулы виды.....	9
1.1.2 Внеклеточные везикулы, маркеры.....	10
1.1.3 Внеклеточные везикулы, как потенциальный источник биомаркеров заболеваний	10
1.2 Экзосомы, их биогенез, физиологические функции и диагностическая значимость.....	12
1.2.1 Биогенез и физиологические функции экзосом	12
1.2.2 Участие экзосом в развитии онкологических заболеваний	15
1.3 Методы выделения экзосом из биологических жидкостей и методы оценки выделенных везикул	18
1.3.1 Сравнительный обзор методологических подходов.....	18
1.3.2 Методы оценки выделенных экзосом	23
1.4 Получение экзосомальной фракции мочи человека	25
1.4.1 Экзосомы мочи в качестве биомаркера онкологии мочевой системы .	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1 Иммобилизация конканавалина А на магнитные наночастицы.....	29
2.2 Выделение экзосом из мочи человека ультрацентрифугированием.....	29
2.3 Выделение экзосом конканавалин А-активированными магнитными наночастицами (КонА-МНЧ)	30
2.4 Характеризация полученной фракции экзосом физическими методами.	

2.5	Твердофазный биолюминесцентный анализ CD63.....	31
2.6	Выделение миРНК и обратная транскрипция и ПЦР в режиме реального времени.....	31
2.7	Измерение концентрации общего экзосомального белка	32
2.8	Твердофазный биолюминесцентный анализ белковых маркеров HER2 и EpCAM на поверхности экзосом	33
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	34
3.1	Получение экзосомной фракции мочи человека.....	34
3.1.1	Иммобилизация конканавалина А на магнитные наночастицы.....	34
3.1.2	Выделение экзосом из мочи человека.....	34
3.2	Доказательство экзосомной природы полученного образца	36
3.2.1	Характеризация полученной фракции экзосом физическими методами.	36
3.2.2	Твердофазный биолюминесцентный анализ для выявления рецептора CD63 на поверхности экзосом.	39
3.3	Возможность использования выделенных разработанным методом экзосом в качестве «жидкой биопсии»	41
3.3.1	Выявление экзосомальной микроРНК21 с помощью обратной транскрипция и ПЦР в режиме реального времени.....	42
3.3.2.	Выявление экзосомальных поверхностных белков EpCAM и HER2 биолюминесцентным анализом на основе аптамерной сенсорики.....	44
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	53
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	54

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Разработка метода выделения фракции экзосом мочи человека и их характеристика» содержит 62 страницы текстового документа, 10 иллюстраций, 7 таблиц, 130 ссылок.

Ключевые слова: экзосомы, конканавалин А, внеклеточные везикулы, микроРНК, выделение экзосом, маркерные белки экзосом.

Цель научных исследований: Разработать метод аффинного выделения высокоочищенной фракции экзосом из мочи человека и охарактеризовать полученные экзосомы.

В задачи исследования входило:

1. Ковалентно иммобилизовать лектин конканавалина А на аминированных магнитных наночастицах магнетита.

2. Изолировать экзосомы из мочи здорового донора с помощью аффинной хроматографии с использованием MNP, активированных конканавалином А.

3. Охарактеризовать изолированные везикулы с помощью различных биофизических методов: динамического светорассеяния, сканирующего атомно-силового и электронной микроскопии.

4. Подтвердить «экзосомальную» природу полученных везикул путем выявления белкового маркера CD63 методом твердофазного биолюминесцентного анализа.

5. Проанализируйте характерную экзосомальную миРНК 21 с помощью ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени.

6. Выделить экзосомы из образцов мочи пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря и образцов здоровых доноров.

7. Проведите твердофазный биолюминесцентный анализ белковых маркеров HER2 и EpCAM на поверхности экзосом.

8. Оценить диагностический потенциал поверхностных экзосомальных маркеров HER2 и EpCAM для неинвазивной диагностики рака мочевого пузыря.

Настоящая работа посвящена разработке метода аффинного выделения высокоочищенной фракции экзосом из мочи человека на основе магнитных наночастиц магнетита с ковалентно иммобилизованным конканавалином А. Выделенные везикулы охарактеризованы различными биофизическими методами, подтвердив их «экзосомальную принадлежность». Показана природа и возможность их использования для анализа экзосомальных микроРНК и маркеров поверхностных белков. По сравнению с ультрацентрифугированием предлагаемый метод проще, экономичнее, не требует применения специального оборудования.

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы представляют собой связанные с липидами везикулы, секретлируемые клетками во внеклеточное пространство [1]. Тремя основными подтипами внеклеточных везикул являются микровезикулы, экзосомы и апоптотические тельца, которые дифференцируются на основе их биогенеза, путей высвобождения, размера, содержимого и функции [2, 3].

Экзосомы - это мембранные везикулы размером 30-150 нм, секретлируемые практически всеми типами клеток и несущие внутри себя белки, липиды и РНК, опосредуя межклеточную связь между различными типами клеток в организме и, таким образом, влияя на нормальное и патологические состояния [4, 5]. Исследования последних лет показали, что экзосомы опосредуют межклеточный обмен веществ и информации. Экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками, играют важную роль в различных аспектах прогрессии заболевания: локальной инвазии, подавлении противоопухолевых иммунных реакций, стимуляции неоангиогенеза и формировании отдаленных метастазов. Кроме того, биохимический состав экзосом сохраняет признаки секретлирующей их клетки [6, 7, 8]. В настоящее время достоверно показано, что они вовлечены в процессы транспорта белков и нуклеиновых кислот, регуляцию иммунного ответа (в том числе презентацию антигенов), транспорт инфекционных агентов и развитие патологических процессов [9]. Тем не менее, несмотря на активные исследования, до сих пор нет ясности о составе переносимых экзосомами сигнальных молекул и их роли в развитии опухолевого процесса. Кроме того, выявление маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток в составе экзосом циркулирующих в физиологических жидкостях, является перспективным направлением “жидкой биопсии” и позволит в дальнейшем разработать подходы к неинвазивной диагностике злокачественных новообразований и мониторингу терапии [10].

Удельный вес рака мочевого пузыря (РМП) составляет 3-5 % всех злокачественных новообразований и около 40 % опухолевых заболеваний мочеполовой системы [1]. Стандартные методы диагностики РМП — цистоскопия, а также цитологическое исследование мочи, являются либо инвазивными, либо дорогими и трудоемкими, требующими высокой квалификации цитопатолога и часто обладают недостаточной чувствительностью для обнаружения опухолей на стадии немышечно-инвазивной опухоли. В связи с этим актуальна разработка новых неинвазивных лабораторных методов диагностики РМП, способных прогнозировать тяжесть течения заболевания и вероятность рецидивирования.

Целью работы было разработать способ аффинного выделения высокоочищенной фракции экзосом из мочи человека и охарактеризовать полученные экзосомы.

Для реализации цели необходимо было **решить следующие задачи:**

1. Ковалентно иммобилизовать лектин конканавалинА на аминированные магнитные наночастицы магнетита.
2. Провести выделение экзосом из мочи здорового донора аффинной хроматографией с помощью конканавалин А-активированных МНЧ
3. Характеризовать выделенные везикулы разными биофизическими методами: методом динамического светорассеивания, сканирующей атомно-силовой и электронной микроскопией.
4. Подтвердить «экзосомную» природу полученных везикул выявлением белкового маркера CD63 твердофазным биолюминесцентным анализом.
5. Провести анализ характерной экзосомальной микроРНК21 методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени.
6. Выделить экзосомы из образцов мочи пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря и образцов здоровых доноров
7. Провести твердофазный биолюминесцентный анализ белковых маркеров HER2 и EpCAM на поверхности экзосом.

8. Оценить диагностический потенциал поверхностных экзосомальных маркеров HER2 и EpCAM для неинвазивной диагностики РМП

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Внеклеточные везикулы

1.1.1 Внеклеточные везикулы виды

Внеклеточные везикулы (EVS) вызывают значительный интерес в научном сообществе из-за их роли в межклеточной коммуникации. Давно известно, что клетки высвобождают везикулы во внеклеточную среду во время апоптоза. Однако тот факт, что здоровые клетки также выделяют везикулы во внеклеточную среду, был понят лишь недавно. Для обозначения этих везикул, выделяемых здоровыми клетками, использовалось множество различных названий, включая эктосомы, микрочастицы, выделяющиеся микровезикулы – и это лишь некоторые из них. Для гармонизации в этой области исследователям теперь рекомендуется использовать термин внеклеточные везикулы (ВВ) в качестве общего термина для всех секретлируемых везикул. Хотя в литературе распространилась путаница в отношении номенклатуры ВВ: ВВ можно широко классифицировать на экзосомы, микровезикулы (MVS) и апоптотические тельца в соответствии с их клеточным происхождением, как показано в таблице 1. ниже:

Таблица 1 – Виды внеклеточных везикул

	Экзосомы	Микровезикулы	Апоптотические тельца
Происхождение	Эндоцитарный путь	Плазматическая мембрана	Плазматическая мембрана
Размер	30-150 нм	50-1000 нм	500-2000 нм
Функция	Межклеточная коммуникация	Межклеточная коммуникация	Способствуют фагоцитозу
Маркеры	Аликс, Tsg101, тетраспанины (CD81, CD63, CD9), флотилин	Интегрины, селектины, CD40	Аннексин V, фосфатидилсерин
Содержание	Белки и нуклеиновые	Белки и нуклеиновые	Ядерные фракции, клеточные

	кислоты (мРНК, микроРНК и другие некодирующие РНК)	кислоты (мРНК, микроРНК и другие некодирующие РНК)	органеллы
--	----------------------------------------------------	----------------------------------------------------	-----------

1.1.2 Внеклеточные везикулы, маркеры

Экзосомы и микровезикулы (MVS) высвобождаются здоровыми клетками, хотя они отличаются в нескольких аспектах. Экзосомы представляют собой везикулы эндоцитарного происхождения нанометрового размера, которые образуются путем почкования внутрь ограничивающей мембраны мультивезикулярных эндосом (MVE).

Таким образом, их размер эквивалентен размеру внутрипросветного пузырька в пределах мультивезикулярных эндосом (30-150 нм). Из-за их эндоцитарного происхождения экзосомы обычно обогащены белками, ассоциированными с эндосомами, такими как Rab GTPases, SNAREs, аннексины и флотилин. Некоторые из этих белков (например, Alix и Tsg101) обычно используются в качестве экзосомных маркеров. Тетраспанины (например, CD63, CD81, CD9) представляют собой семейство мембранных белков, которые, как известно, группируются в микродомены на плазматической мембране. Эти белки в избытке присутствуют в экзосомах и также считаются маркерами. Однако микровезикулы отпочковываются от поверхности клетки, и их размер может варьировать от 50 до 1000 нм. К сожалению, меньше известно о содержании белка в микровезикулах, хотя общими белковыми маркерами, используемыми для определения этих везикул, являются селектины, интегрины и лиганд CD40.

1.1.3 Внеклеточные везикулы, как потенциальный источник биомаркеров заболеваний

Известно, что как экзосомы, так и MVS облегчают процессы межклеточной коммуникации между клетками, находящимися как в

непосредственной близости, так и на расстоянии. Экзосомы высвобождаются иммунными клетками и могут действовать как антиген-представляющие везикулы, стимулировать противоопухолевые иммунные реакции или вызывать толерогенные эффекты для подавления воспаления. Также было показано, что опухолевые клетки используют внеклеточные везикулы для содействия их прогрессированию путем инактивации Т-лимфоцитов или естественных клеток-киллеров, а также способствуют дифференцировке регуляторных Т-лимфоцитов для подавления иммунных реакций. Предполагалось, что в нервной системе внеклеточные везикулы участвуют в образовании миелина, а также в разрастании нейритов и выживании нейронов. Кроме того, сообщалось также, что некоторые патогенные белки, такие как прионы и β -амилоидные пептиды, используют экзосомы для распространения в другие клетки. Микровезикулы были вовлечены в коагуляцию и воспаление. Микровезикулы, полученные из тромбоцитов и моноцитов, способны стимулировать сборку ферментных комплексов, действующих на каскад свертывания, что приводит к слиянию клеток, что может привести к образованию тромба. Кроме того, микровезикулы могут действовать как противовоспалительные, так и провоспалительные факторы в зависимости от раздражителя, который их генерирует, и клетки, из которой они высвобождаются. В обоих случаях взаимодействие микровезикулы с клеткой-мишенью приводит к секреции цитокинов, которые модулируют воспалительную реакцию. Это лишь некоторые из физиологических и патологических ролей, в которых, как наблюдалось, участвуют внеклеточные везикулы, число которых постоянно увеличивается.

Важным прорывом стало открытие нуклеиновых кислот во внеклеточных везикулах, таких как мРНК и микроРНК. Молекулы РНК, присутствующие во внеклеточных везикулах, по-видимому, следуют избирательному включению, что свидетельствует об их обогащении по сравнению с профилями РНК секретирующих клеток. Интересно, что несколько исследований показали, что экзосомо-ассоциированные мРНК и микроРНК могут функционально

переноситься в клетки-реципиенты. Уже сообщалось о физиологическом значении присутствия мРНК и микроРНК в EVs, включая иммунологические функции и функции васкуляризации, среди прочего.

Было обнаружено, что внеклеточные везикулы циркулируют во многих различных жидкостях организма, включая кровь и мочу. Из-за сходства состава внеклеточные везикулы с родительской клеткой циркулирующие внеклеточные везикулы вызвали значительный интерес как источник для открытия биомаркеров. Циркулирующие внеклеточные везикулы, вероятно, состоят из смеси экзосом и микровезикулы. Анализ внеклеточных везикул в крови и моче представляет собой средство уменьшения сложного состава жидкостей организма на несколько порядков. Таким образом, выделение EV может привести к значительному обогащению молекулами с низким содержанием, которые могут иметь особое патофизиологическое значение. Сигнатуры микроРНК представляют недавно идентифицированное семейство биомаркеров, которое характерно для типа опухоли и происхождения в процессе развития. микроРНК уже были связаны с внеклеточными везикулами, и, следовательно, циркулирующие внеклеточные везикулы опухолевого происхождения анализируются для поиска специфических сигнатур микроРНК [11-15].

1.2 Экзосомы, их биогенез, физиологические функции и диагностическая значимость

1.2.1 Биогенез и физиологические функции экзосом

Эксперимент Чаргаффа и Уэста с плазмой человека в 1946 г. определил, что удаление гранулированной фракции плазмы после высокоскоростного центрифугирования ингибирует свертывание плазмы [16]. Несколько лет спустя Питер Вольф обнаружил, что эти супрессоры свертывания крови представляют собой везикулы размером 20–50 нм, происходящие из тромбоцитов [17]. В 1983 году в двух статьях, опубликованных почти

одновременно в JCB и Cell, сообщалось, что рецепторы трансферрина на ретикулоцитах взаимодействуют с активными везикулами размером около 50 нм, которые образуются из созревающих ретикулоцитов овцы и секретируются во внеклеточную среду [18, 19]. Внеклеточные везикулы подразделяются на различные группы микровезикул, экзосом и апоптотических телец на основании морфологических особенностей и содержимого [20]. Экзосомы представляют собой экстрацеллюлярные везикулы диаметром 30–150 нм [18, 21]. Анализ высокого разрешения с помощью электронной микроскопии вместе с передовыми протеомными методами выявил состав экзосом, секретируемых разными клетками [18, 22].

Содержимое экзосом не только отражает состав донорской клетки, но также отражает регулируемый механизм сортировки [23]. Их содержимое составляет комплекс различных белков, включая рецепторы, транскрипционные факторы, ферменты, белки внеклеточного матрикса, липиды, нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК и микроРНК) внутри и на поверхности экзосом [24, 25]. Анализ белкового состава экзосом показал, что некоторые белки специфически возникают из клеток и тканей, а некоторые являются общими для всех экзосом [22]. Молекулы адгезии, такие как интегрины, тетраспанины, МНС класса I, II, представленные на В-лимфоцитах и дендритных клетках вместе с рецепторами трансферрина на поверхности ретикулоцитов, являются одними из типичных примеров специфических типов белков экзосом. С другой стороны, ряд белков слияния и переноса, таких как Rab2, Rab7, флотиллин и аннексин, белки теплового шока, такие как Hsc70 и Hsc90, белки цитоскелета, включая актин, миозин, тубулин, и белки, такие как Alix, которые опосредуют образование мультивезикулярных телец, относятся к неспецифическим белкам экзосом [22, 26].

Кроме того, содержание липидов в экзосомах является клеточно-специфическим или консервативным. Липиды играют важную роль не только в поддержании формы экзосом, но также принимают участие в биогенезе экзосом и регуляции гомеостаза в клетках-реципиентах [27, 28, 29]. Сфингомиелин,

фосфатидилхолин и костный морфогенетический белок (BMP) входят в число факторов, помогающих различать многочисленные типы везикул.

Различные типы микровезикул имеют одинаковое содержание сфингомиелина и фосфатидилхолина, тогда как в экзосомах концентрация сфингомиелина выше. Более того, исследования показали, что экзосомы, перенесенные в клетки-мишени, могут изменять липидный состав клеток-реципиентов, особенно холестерина и сфингомиелина, и, следовательно, влиять на клеточный гомеостаз [30]

Биогенез экзосом

Активация клеточно-специфических рецепторов и сигнальных путей, инициирующих биогенез экзосом, интенсивно регулируется [31]. Слияние первичных эндоцитарных везикул является первым этапом образования ранних эндосом (EE) [32]. Многие входящие эндоцитарные грузы разделяют свое содержимое и мембранный состав, объединяя ранние эндосомы в клатрин- или кавеолин-зависимые или независимые пути [33]. Ранние эндосомы проходят два пути: либо возвращая груз на плазматическую мембрану в виде «рециклирующих эндосом», либо превращаясь в «поздние эндосомы» (LE), также называемые мультивезикулярными тельцами (MVB). Rab5 с его эффектором VPS34/p150 функционирует как ключевой регулятор превращения EV в LE в плазматической мембране. В течение нескольких минут после рециркуляции их груза на клеточную мембрану в ранние эндосомы начинается образование внутрипросветных везикул путем отпочковывания внутрь мембраны, что приводит к изоляции груза и его распределению в везикулы [34].

Сортировка белков внутрипросветных везикул является строго регулируемым механизмом, который зависит от механизма эндосомно-сортирующего комплекса, необходимого для транспорта (ESCRT). ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II и ESCRT-III представляют собой четыре комплекса, которые составляют аппарат ESCRT. В начале ESCRT-

зависимого пути находится перекресток для доставки грузов, который определяется контрольной точкой белка убиквитина (ub). В убиквинтин-зависимом пути участвуют все субъединицы ESCRT [22, 35, 36].

Как уже упоминалось, Alix является маркерным белком экзосом, играющим важную роль в их биогенезе. Alix связывается с ESCRT-III и доставляет неубиквитинированные грузы к внутрипросветным везикулам путем прямого связывания с грузом, таким как PAR1, или непрямым переносом синдекана и тетраспанина CD63 [37].

После этих первичных шагов мультивезикулярные тельца достигают своего конечного внутриклеточного назначения. Мультивезикулярные тела могут быть вынуждены сливаться с лизосомами и деградировать из-за содержащегося в них убиквитинированного груза, или они могут двигаться к плазматической мембране и высвобождать свои внутрипросветные везикулы во внеклеточную среду [38, 39].

1.2.2 Участие экзосом в развитии онкологических заболеваний

Фибробласты, эндотелиальные клетки и инфильтрирующие иммунные клетки являются основными типами клеток в микроокружении опухоли, которые взаимодействуют с опухолевыми клетками посредством экзосомной передачи сигналов. Последствия этих взаимодействий зависят от происхождения экзосом, определяющего экзосомальный груз [40, 41].

Стрессовые состояния, такие как гипоксия, голодание и ацидоз, увеличивают высвобождение экзосом из злокачественных клеток, что приводит к изменению и расширению микроокружения опухоли, что впоследствии приводит к прогрессированию опухоли [42, 43]. Таким образом, анализ содержимого экзосом покажет их роль в прогрессировании онкологий при злокачественных новообразованиях, что в дальнейшем приведет к разработке более эффективных стратегий прогнозирования и терапии рака на основе микровезикул [44].

Экзосомы опухолевого происхождения способны модулировать микроокружение опухоли и внеклеточный матрикс путем стимуляции передачи сигналов внеклеточных рецепторов и нарушения формирования клеточной адгезии [45, 46, 50, 51].

Сообщалось, что многие типы интегринов и лигандов интегринов переносят экзосомы опухолевого происхождения. Экзосомальные интегрины участвуют в инициации колонизации раковых клеток и формировании преметастатической ниши [52]. В клетках рака молочной железы опосредованный экзосомами перенос миРНК-105 из метастатических клеток рака молочной железы вызывает метастазирование и сосудистую проницаемость в отдаленных органах путем подавления и нацеливания на белок плотных контактов ZO-1 и разрушения барьерной функции эндотелиальных монослоев [53]. Экзосомальная миРНК25-3р из клеток колоректального рака регулирует экспрессию VEGFR2, ZO-1, окклюдина и клаудина5 в эндотелиальных клетках посредством нацеливания на KLF2 и KLF4. МиРНК25-3р дополнительно способствует проницаемости сосудов и подготавливает преметастатические ниши в отдаленных участках, включая печень и легкие [54]. Кроме того, экзосомы раковых клеток индуцируют дифференцировку многих типов клеток микроокружения опухоли в ассоциированные с раком фибробласты (CAF), которые являются доминирующей клеточной популяцией микроокружения опухоли при большинстве видов рака, таким образом, экзосомы играют решающую роль в ремоделировании и перепрограммировании микроокружения опухоли [55, 56].

Экзосомы опухолевого происхождения играют важные функции на разных стадиях каскада инвазии и метастазирования, включая ангиогенез, инвазию, миграцию и установление преметастатической ниши [56, 57].

Ангиогенез, многоэтапный процесс, посредством которого в опухолях развивается новая сосудистая сеть, необходим для роста опухоли и метастазирования [57].

Анализ *in vitro* глиобластомы как остро ангиогенного типа опухоли показал, что экзосомы, полученные из глиобластомы, содержат высокие уровни миРНК221, протеогликанов глипикан-1 и синдекан-4, которые усиливают реваскуляризацию за счет усиления пролиферации и образования эндотелиальных клеток и канальцев. Растущая информация о роли экзосом в ангиогенезе указывает на то, что микровезикулы являются функциональными инструментами для подавления миграции эндотелиальных клеток, изменения их фенотипа и прорастания сосудов в солидных опухолях [58].

Экзосомы могут быть функциональным средством доставки лекарств при лечении рака именно потому, что они нетоксичны и неиммуногенны. Экзосомный подход к доставке адриамицина и паклитаксела использовался для таргетной терапии рака и приводил к минимальной иммуногенности и токсичности [59, 60]. Кроме того, множество различных типов клеток могут генерировать экзосомы. Более того, экзосомы могут проникать через опухолевые клетки с большей скоростью, чем липосомы. Еще одним преимуществом экзосом является то, что они могут нацеливаться на определенные клетки и ткани с помощью определенных белков, следовательно, они могут доставлять лекарства, нацеленные на раковые клетки. Кроме того, экзосомы имеют небольшие размеры, поэтому они могут легко проходить через различные барьеры, такие как гематоэнцефалический [61]. Появляется все больше доказательств того, что экзосомальная РНК, полученная из крови и других жидкостей организма, может использоваться в качестве биомаркеров при скрининге и диагностике рака [62].

Экзосомам уделяется большое внимание из-за их роли в патобиологических процессах, и они изучаются как инструмент для диагностики и лечения заболеваний. Следовательно, для выделения экзосом были разработаны различные методы выделения, основанные на разных принципах.

Экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации и способны модулировать поведение клетки-реципиента с помощью

аутокринного [63], паракринного [64, 65], эндокринного и/или юкстракринного [66] способов передачи клеточных сигналов. В последнее время они привлекли значительное внимание из-за раскрытия их различных новых ролей в прогрессии рака, ангиогенезе, формировании метастатических ниш, органоспецифических метастазах, ремоделировании микроокружения опухоли, подавлении иммунитета и т. д. [67, 68, 69]. Кроме того, экзосомы в жидкостях организма пациента стали перспективным источником для разработки биомаркеров. Они могут быть выделены из небольшого количества биологических жидкостей и клинических образцов, а их груз, который представляет собой тканеспецифические молекулы с более высокой стабильностью, может служить биомаркером, специфичным для заболевания [70, 71]. Кроме того, поскольку их высвобождение и состав могут модулироваться факторами окружающей среды, они также могут служить маркерами статуса заболевания и результатов лечения [72, 73]. Более того, будучи естественным носителем биомолекул, были предприняты попытки потенциально использовать экзосомы в качестве стабильной и направленной системы доставки лекарств [70, 74, 75].

1.3 Методы выделения экзосом из биологических жидкостей и методы оценки выделенных везикул

1.3.1 Сравнительный обзор методологических подходов

С ростом потенциала клинического использования экзосом стало необходимо оптимизировать их метод выделения для максимального выхода, чистоты и воспроизводимости анализа. Помимо классического метода ультрацентрифугирования, в настоящее время на рынке доступно несколько коммерческих наборов для выделения экзосом, разработанных на основе различных принципов, таких как преципитация на основе нейтрализации заряда, гель-фильтрация, аффинная очистка с использованием магнитных гранул и т.д.

Если рассматривать вопрос в целом, классические методы выделения экзосом основаны на тех или иных характеристиках этих везикул. Для примера, на основе размера и их плотности основаны такие методы как ультрацентрифугирование [76], микрофльтрация [77] и гель-фльтрация [78]. Образцы выделенных такими методами часто загрязнены компонентами неэкзосомного происхождения, которые присутствуют в биологических жидкостях и схожи по размеру и плотности с экзосомами.

Существуют также альтернативные методы изоляции экзосом, которые основаны на их способности к агглютинации в присутствии натуральных [80] или синтетических [79] полимеров. Но при использовании этих методов также возникает проблема контаминации другими везикулами и белками с близкими особенностями взаимодействия с этими веществами.

Выделяют в особую группу методы, которые основываются на реакциях аффинного взаимодействия антител и белка экзосомальной мембраны, специфических экзосомальных маркеров. Но в этом случае возникает проблема, так как методы основаны на предположениях о том, что эти специфические для экзосом маркеры есть на всех других экзосомах и в одинаковом количестве, что не совсем является истиной [81].

1.3.1.1 Метод ультрацентрифугирования

Ультрацентрифугирование является золотым стандартом выделения экзосом. Основное преимущество этого современного метода заключается в том, что он производит высокообогащенные фракции экстрацеллюлярных везикул, который образуется после высокоскоростного вращения. Недостатки ультрацентрифугирования заключаются в низкой производительности (в зависимости от используемого материала), возможной контаминации образца везикулами неэкзосомального происхождения и в том, что для его правильного выполнения требуется дорогостоящее оборудование и высокая квалификация сотрудника.

Процедура осаждения экзосом этим методом предполагает несколько раундов предварительного центрифугирования для удаления клеточного дебриса из образца с последующим увеличением скорости до 150.000xG в ультрацентрифуге в течение 1-6 часов [76].

1.3.1.2 Метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности

Этот метод является усовершенствованием метода ультрацентрифугирования с целью изоляции более чистой фракции экзосом. При данной методике образец экзосом наслаивают на буферный раствор и в процессе центрифугирования частицы, содержащиеся в образце мигрируют сквозь буфер. И в зависимости от плотности осуществляют это с разной скоростью. Наименее плотные везикулы седиментируют быстрее всех и прежде, чем более плотные начнут на них наслаиваться, процесс останавливают, и прокалыванием дна пробирки последовательно забирают фракции препарата с различными показателями плотности (от наименее плотных до наиболее). Для метода ультрацентрифугирования в градиенте плотности применяют растворы углеводов или коллоидного силикагеля в качестве буфера, концентрация которых возрастает сверху вниз. Также для облегчения выполнения методики существуют уже готовые коммерческие пробирки, в которых создан необходимый градиент плотности [82].

1.3.1.3 Ультрафильтрация

Этот метод выделения везикул из биологических жидкостей, основанный на их размерах. В основе метода - фильтрация образца через фильтр с порами определенного размера. Проводится последовательная фильтрация через фильтры с разными размерами пор (0.8, 0.45, 0.22 мкм) [83]. Таким образом размер частиц в фильтрате постепенно уменьшается и после последнего раунда фильтрации образец содержит везикулы с размером не больше размера пор последнего фильтра. К недостаткам этого метода можно отнести тот факт, что

образцы биологических жидкостей могут содержать частицы аналогичные по размеру экзосомам, но не экзосомального происхождения [84, 85, 86].

1.3.1.4 Гидростатический фильтрационный диализ

Этот метод также основан на принципе разделения частиц по их размеру. Суть метода – использование диализной мембраны, пропускающей частицы размером не больше 1000 кДа. Диализ частиц таких параметров происходит под действием гидростатического давления, также под действием осмоса: через мембрану из образца уходит вода, концентрируя при этом везикулы. Преимущество метода – минимализация потерь везикул, так как в этом методе сводится к минимуму воздействие на везикулы избыточного давления [87]

1.3.1.5 Преципитация экзосом

Этот комплекс методов основан на возможности везикул преципитировать в растворах очень гидрофильных полимеров с образованием агрегатов, которые в дальнейшем могут быть осаждены центрифугированием. Преимуществом данного метода является простота его проведения, достаточно высокая эффективность, но в то же время чистота полученных везикул невысокая. Также в случае образования больших и плотных агрегатов, затрудняется ресуспензирование полученных везикул и при этом затрудняется использование экзосом в некоторых исследованиях [88, 89, 90].

1.3.1.6 Двухфазные водные растворы

Использование двухфазных водных растворов для выделения экзосом было предложено недавно. Эта технология основана на принципе разделения или образования двух фаз в растворе двух полимеров, например, полиэтиленгликоля (ПЭГ) и декстрана. Из-за физико-химических особенностей белки из образца переходят в ПЭГ, а экзосомы концентрируются в декстрановой фазе. При использовании данного метода необходимо учитывать особенности подбора оптимальных условий проведения и также нужно

учитывать тот факт, что экзосомы будут находиться в растворе декстрана, что может ограничить последующие анализы, например, ПЦР [91, 92].

1.3.1.7 Неспецифичное связывание мембранных компонентов

Мембрана экзосом имеет способность к аффинному взаимодействию с некоторыми биологическими молекулами. Одними из таких молекул являются лектины [93, 94], гепарин [95], белки - лиганды фосфотидилсерина [96]. При добавлении таких веществ в раствор с экзосомами, происходит агрегация экзосом и выпадение их в осадок. Это взаимодействие неспецифично, поэтому учитывая этот факт, необходимо перед проведением удалить из образца крупные везикулы и клетки. Если это сделать, то чистота полученных везикул значительно повышается [97].

1.3.1.8 Специфичное связывание мембранных компонентов

На поверхности экзосом экспонируются некоторые специфичные белки, такие как CD81, CD9, CD63, эти белки считаются маркерными белками, которые присущи экзосомам. Антитела к этим белкам могут быть использованы для иммунной преципитации экзосом. При этом антитела могут быть зафиксированы на различных носителях таких, как микрочастицы, спин-колонки, модифицированных наконечниках для пипеток или дно 96-луночного планшета. Взаимодействие антитело-антиген на поверхности экзосом является достаточно сильным, чтобы была возможность отмыть везикулы от ненужных компонентов среды.

Главным плюсом этого метода является специфичность связывания антиген-антитело, что определяет чистоту полученного образца экзосом.

К недостаткам метода стоит отнести тот факт, что нет оснований полагать, что все экзосомы имеют идентичный, качественный и количественный, состав экзосомальных маркеров на поверхности. Поэтому методика иммунной преципитации неизбежно приводит к получению фракции везикул, поверхностная мембрана которых обогащена определенным маркером.

К минусам технологии также относится ограниченная продуктивность, высокая стоимость и трудность (невозможность) отделения везикул от антител при необходимости их дальнейшего использования [98].

1.3.2 Методы оценки выделенных экзосом

1.3.2.1 Морфология

Для оценки морфологии внеклеточных везикул используют такие методы, как сканирующая атомно-силовая микроскопия (АСМ) и электронная микроскопия (СЭМ). При этом везикулы фиксируются на подложке и поверхность образца сканируется. В случае СЭМ сканирующим зондом является узкий интенсивный пучок электронов, а в случае АСМ кантилевер с площадью острия размером в несколько атомов. Далее специальная компьютерная программа анализирует полученные данные и формирует изображение поверхности подложки, которое содержит такие данные, как размер, форма и однородность анализируемых везикул.

Просвечивающая(трансмиссионная) электронная микроскопия (ТЭМ) – метод визуализации ультраструктуры тонких биологических образцов при помощи пучка электронов, проходящих через или взаимодействующих с ними.

Широко используемым методом исследования морфологии везикул является криоэлектронная микроскопия, когда исследование образца происходит при криогенных температурах, что позволяет изучать образец в естественных условиях без фиксации и компьютерной обработки [99, 100].

1.3.2.2 Размер и количество

Метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) или динамического светорассеяния (ДСР) используются для оценки размера частиц в суспензии.

Используя лазеры, ДСР может анализировать распределение скоростей движения частиц, вызванное броуновским движением, путем измерения флуктуаций интенсивности рассеянного света и может рассчитывать размер

частиц с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна. Поскольку ДСР является неинвазивным и высокочувствительным, его можно использовать для одновременного исследования большого количества везикул и, кроме того, метод требует очень небольшого объема образца. Метод также имеет ряд ограничений: размер частиц в суспензии должен быть того же порядка, что и длина волны рассеивающего света, а также частицы должны быть одинаковы по размеру.

Недавно разработанный метод анализа траекторий наночастиц (НТА) предполагает детекцию отраженного излучения с помощью ультрамикроскопа и анализа характеристик движения отдельной частицы. Этот метод позволяет оценить размер частиц и их концентрацию [101, 102].

1.3.2.3 Биохимический состав

Анализ биохимического состава экзосом предполагает получение усредненной информации для всего пула везикул в образце. Изучение качественного состава белков или нуклеиновых кислот может быть проведено с помощью масс-спектрометрии в случае белков или методами секвенирования нового поколения в случае нуклеиновых кислот. Анализ отдельных молекул экзосом может быть проведен с помощью Вестерн-блоттинга или ОТ-ПЦР. Технология проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченых антител позволяет провести количественную оценку уровня экспрессии белков, одного или несколько. Но малые размеры экзосом ограничивают проведение этой технологии. Проблему можно решить фиксированием везикул к латексным или силиконовым микрочастицам, при этом экзосомы не разрушаются, но полученный результат является усредненным для образца [103, 104].

Актуальной проблемой является разработка методов оценки биохимического состава экзосом, которые бы позволяли с сохранением их целостности провести оценку отдельных везикул, а не всей популяции.

1.4 Получение экзосомальной фракции мочи человека

1.4.1 Экзосомы мочи в качестве биомаркера онкологии мочевого системы

Биопсия ткани в настоящее время является стандартным методом патологоанатомической диагностики урологического рака. Тем не менее, биопсия ограничена в точном отражении полного геномного ландшафта рака и не подходит для раннего скрининга опухоли [105]. Обнаружение бесклеточных биомаркеров (таких как циркулирующие нуклеиновые кислоты, циркулирующие опухолевые клетки и циркулирующие экзосомы) в жидкости организма, также называемое «жидкой биопсией», недавно показало свою ценность в клиническом применении [106]. Сбор циркулирующего гена, связанного с опухолью, может обеспечить молекулярную характеристику первичной или метастатической опухоли, и эти бесклеточные биомаркеры могут быть использованы для управления процессом опухоли после лечения [107].

Один из основных видов жидких биоптатов, циркулирующих экзосом, представляет собой внеклеточные везикулы, окруженные липидной бислоемной мембраной размером от 30 до 150 нм. Экзосомы содержат сложный груз содержимого исходной клетки, включая нуклеиновые кислоты, липиды и белки [108]. Было показано, что экзосома, высвобождаемая опухолевыми клетками, играет важную роль в микроокружении, иммунной регуляции и других злокачественных процессах [109]. По сравнению с другими опухолями, урологические опухоли могут непосредственно выделять экзосомы в мочу, поэтому экзосомы мочи могут быть более чувствительными и специфичными объектами для отражения состояния урологических опухолей [110].

Экзосомы в моче человека происходят исключительно из каждого типа клеток мочевыводящих путей, начиная с гломерулярных подоцитов и почек [105, 106, 107]. На самом деле аппарат клубочковой фильтрации, по-видимому, предотвращает попадание кровяных везикул в нефрон [108]. Экзосомы в

мочевыводящих путях могут играть клеточную сигнальную роль. Например, экзосомы, высвобождаемые клетками собирательных протоков, индуцируют экспрессию аквапорина в клетках-реципиентах [109] и стимулируют нефрогенез [110]. Экзосомы также могут пересекать мочевыводящие пути и в конечном итоге обнаруживаться в моче. Поскольку экзосомы мочи специфичны для определенного типа клеток, они являются источником биомаркеров для диагностики рака [106, 111], а также при заболеваниях мочевыводящих путей [112]. Содержание белка в экзосомах, попадающих в мочу, является специфичным [113], даже репрезентативным для уровней экспрессии [114] в исходной клетке.

Таким образом, анализ литературных данных показывает перспективность изучения экзосом и их содержимого в целях эффективной диагностики онкозаболевания и мониторинга проводимой терапии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы: ЭДТА-натриевая соль, кальций хлорид, диметилсуберимидат дигидрохлорид (DMS) (Sigma – Aldrich), диметилсульфоксид (PanReac AppliChem), конканавалин А (КонА) (ООО НПП «ПанЭко»), таблетки PBS (VWR Amresco Life Science, USA), TWEEN20 (Sigma - Aldrich), фуримазин (Promega).

Состав и название используемых в работе буферов представлен в Таблице 2.

Таблица 2 Состав используемых буферов

Название	Состав
PBS	0.1 М К/Na фосфатный буфер pH 7.0, 0.15 М NaCl
Буфер для промывки планшета	PBS (VWR Amresco Life Science, USA), 0.15 М NaCl, 0.1% TWEEN20, 5 мМ ЭДТА
Буфер для промывки магнитных частиц	0.1 М К/Na фосфатный буфер pH 7.0, 0.15 М NaCl, 0.1% TWEEN 20, 0.5 мМ ЭДТА
Элюирующий буфер	0.1 М PBS pH 7.0, 0.5 М NaCl, 0.5 М мальтоза
Кальциевый буфер	0.1 М CaCl ₂ , 0.1 М Трис-HCl pH 8.8
Буфер для связывания	PBS pH 7.4, 2.0 мМ MgCl ₂ , 0.02% TWEEN20
Раствор фуримазина	20 нМ Трис pH 8.0, 0,15 М NaCl, 1 мкМ фуримазин

Аминированные наночастицы магнетита (МНЧ) предоставлены Международным научным центром исследований экстремальных состояний организма ФИЦ КНЦ СО РАН. Стрептавидин, конъюгат Ca²⁺-регулируемого фотопротейна обелина с конканавалином А, а также конъюгат люциферазы NanoLuc с антителами к CD81 были получены и предоставлены с.н.с. лабораторией биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН Красицкой В.В.

Биолюминесцентный сигнал фотопротейна обелина-КонА измеряли с помощью кюветного люминометра, калиброванного по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера. Сигнал регистрировали с помощью самописца (модель 2210, LKB, Швейцария). Измерения проводили в 0.1 М Трис- HCl pH

8.8, содержащем 10 мМ ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера. Измерение биолюминесцентной активности конъюгата NanoLuc-антитело к CD81 проводили в планшетном люминометре Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия) при впрыскивании 50 мкл раствора фуримазина в лунки планшета.

ДНК аптамеры, использованные в работе, были получены ранее An Y. и др. [115] и синтезированы в лаборатории синтетической биологии Института химической биологии и фундаментальной медицины (г. Новосибирск). Последовательности представлены в Таблице 3.

Таблица 3 Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность 5'-3'
bioApt CD63	Bio- ТААСАСGACAGACGTTCCGGAGGTCGAACCCTGACAGCGT GGGC
stem-loop	СТСAACTGGTGTCTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAA CATC
miR21-F	АСАСТССAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGA
miR21-R	GTGTCGTGGAGTCGGCAATTC
ApEpCAM	Bio- САСТАСAGAGGTTGCGTCTGTCCCACGTTGTCATGGGGGG TTGGCCTGTTTGCAAAGCTTACGGCATACTG
ApHER2	Bio- TTTGGGCCGTCGAACACGAGCATGGTGCCTGGACCTAGGA TGACCTGAGTACTGTCC

Образцы мочи от больных получены от КБУЗ «КККОД имени А.И. Крыжановского». Исследование одобрено Локальным Этическим комитетом КККОД (протокол заседания No 27 от 02.07.2020 г.). От всех пациентов, принявших участие в исследовании, получено информированное согласие.

В ходе исследования проанализировано 8 образцов от пациентов с диагнозом РМП. Пациенты были обследованы с учетом современных клинических рекомендаций. Оценивались основные клинико-морфологические параметры: стадия и степень дифференцировки опухоли.

Контрольную группу составляли 9 доноров без заболеваний мочевыделительной системы. Образцы мочи центрифугировали при 14 000 g 10 минут при температуре +4°C, супернатант использовали для выделения экзосом. До использования образцы супернатанта хранили при -80 °C.

Оборудование используемое в работе: центрифуга Eppendorf 5430R, центрифуга Eppendorf MiniSpin, термошейкер BIOSAN PST-100HL, вортекс BIOSAN Bio Vortex V1, мультиротатор BIOSAN Multi Bio RS-24, кюветный люминометр (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск), планшетный люминометр Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), промыватель планшетов автоматический АКВАМАРИН, спектрофотометр NanoDrop Lite (Thermo SCIENTIFIC), спектрофотометр Varian Cary Eclipse (Agilent, США).

2.1 Имобилизация конканавалина А на магнитные наночастицы

К аминированным магнитным наночастицам (9,5 мг) в PBS буфере добавляли 0.03 г диметила суберимидата дигидрохлорида (в 200 мкл диметила сульфоксиде) и 2 мг КонА, инкубировали ночь при температуре +4°C при перемешивании. Далее частицы промывали буфером для промывки магнитных частиц, затем буфером PBS. Полученные МНЧ с КонА (КонА-МНЧ) хранили в PBS буфере, содержащем 0,05% азиды натрия.

2.2 Выделение экзосом из мочи человека ультрацентрифугированием

Образец мочи здорового донора (50 мл) центрифугировали при 5 000 g 30 минут при температуре +4°C, затем супернатант центрифугировали при 14 000 g 10 минут при температуре +4°C для удаления клеточного дебриса. Супернатант фильтровали через стерильный 0.22 мкм шприцевый фильтр (MILLEX-GS, Millipore, Германия Sigma-Aldrich, Supelco). Далее фильтрат центрифугировали 75 минут при 100 000 g при температуре +4°C на

ультрацентрифуге BECKMAN COULTER Optima XPN-80 (ЦКП «Молекулярные и клеточные технологии» КрасГМУ). Полученный осадок разбавляли стерильным PBS буфером и снова центрифугировали (100 000 g, 75 мин, +4°C). Осадок разбавляли 1 мл PBS и хранили при при -80 °C

2.3 Выделение экзосом конканавалин А-активированными магнитными наночастицами (КонА-МНЧ)

Выделение экзосом из мочи здоровых и больных доноров проводили по одинаковому протоколу.

Образец мочи донора центрифугировали при 5 000 g 30 минут при температуре +4°C, затем супернатант центрифугировали при 14 000 g 10 минут при температуре +4°C для удаления клеточного дебриса. Супернатант фильтровали через стерильный 0.22 мкм шприцевый фильтр (MILLEX-GS, Millipore, Германия Sigma-Aldrich, Supelco). К фильтрату добавили КонА-МНЧ из пропорции 3 мг частиц на 50 мл мочи, инкубировали при +4°C в течение ночи при перемешивании, затем центрифугировали (6000 g, 10 мин при +4°C). Магнитные наночастицы промывали буфером PBS pH 7.0. Элюцию экзосом проводили из пропорции 1 мл элюирующего буфера на 3 мг частиц (Таблица 2) дважды. Полученные фракции экзосом хранили при -80 °C.

2.4 Характеризация полученной фракции экзосом физическими методами.

Для первичной оценки распределения выделенных из мочи везикул по размеру и их относительной «чистоты» использовали метод динамического светорассеивания (ДСР). Измерение проводил Воробьев С.А. в Институте химии и химической технологии СО РАН. Размер везикул (гидродинамический радиус) рассчитывался на основе данных о коэффициенте диффузии при установленных параметрах вязкости и температуры.

Для проведения сканирующей атомно-силовой микроскопии образец экзосом сорбировали на поверхность лунки белого иммунологического планшета (Corning, США) в течение ночи, в PBS буфере. Пред измерением поверхность лунки промывали промывочным буфером. Измерения проводила Лукьяненко А.В. в Институте физики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

Для проведения сканирующей электронной микроскопии образец экзосом фиксировали в парах 1% тетраоксида осмия в течение 5-15 мин. Измерения проводил Немцев И.В. в центре коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

2.5 Твердофазный биолюминесцентный анализ CD63

В лунки иммунологического планшета сорбировали по 100 мкл 10 мкг/мл стрептавидин (в PBS буфере pH 7.0) в течение ночи при +4°C). После промывки (4 раза, промывочным буфером, Таблица 1) в лунки вносили по 50 мкл 50 нМ биотинилированного аптамера BioApt CD63 (в буфере для связывания, Таблица 2) после процедуры рефолдинга (инкубировали 10 мин при 95°C, затем 10 мин при +4°C), инкубировали 30 мин при комнатной температуре (КТ) и снова промывали. Далее в лунки вносили по 50 мкл раствора экзосом разных фракций после элюции с КонА-МНЧ (элюирующий буфер), инкубировали 1 час при КТ и перемешивании. После промывки лунок вносили по 50 мкл конъюгата Ca²⁺-регулируемого фотопротейна с КонА, с биолюминесцентной активностью 100 отн.ед. (в PBS буфере pH 7.0), инкубировали 40 мин при КТ и перемешивании и лунки промывали. Биолюминесценцию связавшегося на поверхности комплекса измеряли 5 сек с помощью планшетного люминометра сразу после впрыска 60 мкл кальциевого буфера (Таблица 1). От усредненных сигналов рабочих лунок вычитали усредненные сигналы, полученные от контрольных лунок.

2.6 Выделение миРНК и обратная транскрипция и ПЦР в режиме реального времени

Выделение миРНК

Выделение миРНК из фракции экзосом проводили с помощью коммерческого набора для выделения микроРНК (LRU-100-50, Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя.

Концентрацию выделенного пула миРНК определяли спектрофотометрически при помощи спектрофотометра NanoDrop Lite (Thermo Scientific, США).

Обратная транскрипция и ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР)

Реакция обратной транскрипции с последующей полимеразной реакцией в режиме реального времени (одношаговым методом) осуществляли с использованием набора БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия) согласно инструкции производителя.

Реакционная смесь (50 мкл) содержала: 1x смесь для ОТ-ПЦР с SYBR, 2 мкл БиоМастер-микс, 50 нМ stemloop праймер, 200 нМ прямого праймера miR21-F, 200 нМ обратного праймера miR21-R, 23.2 нг образца миРНК.

Реакцию ОТ-ПЦР проводили по следующему температурно-временному режиму:

Обратная транскрипция – 45 ° C, 30 мин.

Предварительная денатурация – 95 ° C, 5 мин.

Денатурация – 95 ° C, 50 мин.

Отжиг – 55 ° C, 50 мин.

Элонгация – 72 ° C, 50 мин.

2.7 Измерение концентрации общего экзосомального белка

Измерение концентрации общего экзосомального белка полученных фракций экзосом проводили с помощью коммерческого набора ProteOrange Protein Quantification Kit (Lumiprobe, Россия) согласно протоколу производителя. Флюоресценцию образцов измеряли на спектрофлюориметре Varian Cary Eclipse (Agilent, США). В качестве калибровочного белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

2.8 Твердофазный биолюминесцентный анализ белковых маркеров HER2 и EpCAM на поверхности экзосом

В лунки иммунологического планшета вносили по 100 мкл раствора стрептавидина в PBS буфере рН 7.0 10 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при +4°C. После промывки (4 раза, промывочным буфером, (Таблица 2) в лунки вносили по 50 мкл 50 нМ биотинилированного аптамера ApEpCAM или ApHER2 (в буфере для связывания, (Таблица 2) после процедуры рефолдинга (10 мин инкубирование при 95°C, затем 10 мин при +4°C), инкубировали 30 мин при КТ и снова промывали. Далее в лунки вносили по 50 мкл раствора экзосом 1 фракции после элюции с КонаА-МНЧ, инкубировали 1 час при КТ и перемешивании. После промывки лунок, вносили по 50 мкл конъюгата люциферазы NanoLuc с антителом к CD-81 (активностью 100 отн.ед, в растворе фуримазина) инкубировали 1 час при КТ и перемешивании и далее лунки промывали. Биолюминесценцию связавшегося на поверхности комплекса измеряли 5 сек с помощью планшетного люминометра сразу после впрыска 60 мкл буфера с фуримазином (Таблица 1).

Данные обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 8.1, программы MedCalc и статистического программного обеспечения STATISTICA 12 (Statsoft, Россия). U-тест Манна-Уитни использовали для сравнения количественных данных.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Страницы 34-50 изъяты в связи с авторским правом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экзосомы – это потенциальные неинвазивные биомаркеры ранней диагностики онкологических заболеваний. Экзосомные мРНК и белки ассоциированы с различными патофизиологическими процессами, включая онкологию.

В настоящее время активно ведутся разработки методов быстрого и простого выделения везикул из образцов, для внедрения в клиническую диагностику методов, основанных на исследовании качественного и количественного состава экзосом.

Представленная работа посвящена разработке способа аффинного выделения высокоочищенной фракции экзосом из мочи человека на основе магнитных наночастиц магнетита с ковалентно иммобилизированным конканавалином А. По сравнению с ультра-центрифугированием предложенный метод проще, экономичнее, и не требует использования специального оборудования. Полученные везикулы были охарактеризованы разными биофизическими методами, подтверждающими их экзосомальную природу. Показана возможность их использования для анализа экзосомальных мРНК и поверхностных белковых маркеров.

Исходя из поставленных задач, были получены следующие результаты:

1. Получены конканавалинА-активированные магнитные наночастицы магнетита и показано успешное их использование для аффинного выделения экзосом из мочи человека.
2. По данным ДСР, АСМ и САМ, выделенные разработанным нами методом везикулы имеют размер порядка 90-200нм, что соответствует размерам экзосом. Специально разработанным твердофазным биолюминесцентным анализом, на поверхности полученных везикул выявлен характерный белковый маркер CD63, что подтверждает «экзосомную» природу полученных везикул.

3. Используя разработанный способ аффинного выделения экзосом, получены фракции экзосом из мочи 9 здоровых доноров и 8 пациентов с диагнозом РМП.
4. Методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени среди пула микроРНК выделенных из экзосом, показано наличие характерной экзосомальной микроРНК21.
5. Проведен твердофазный биолюминесцентный анализ белкового рецептора HER2 на поверхности экзосом. По удельному уровню биолюминесцентных сигналов исследуемая группы пациентов с диагнозом РМП статистически достоверно отличается от контрольной группы ($p=0.005$).
6. Проведен твердофазный биолюминесцентный анализ белкового рецептора EpCAM на поверхности экзосом. По удельному уровню биолюминесцентных сигналов исследуемая группы пациентов с диагнозом РМП не отличается от контрольной группы ($p=0.112$).
7. Рецептор HER2 является перспективным маркером для неинвазивной диагностики РМП, однако требуются дополнительные исследования на больших выборках образцов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BMP	Костный морфогенетический белок
CAF	Фибробласты, ассоциированные с раком
EE	Ранние экзосомы
ESCRT	Эндосомно-сортировочный комплекс
EV	Экстрацеллюлярные везикулы
ILV	Внутрипросветные везикулы
LE	Поздние экзосомы
MVB	Мультивезикулярные тела
TDE	Экзосомы опухолевого происхождения
TME	Микроокружение опухоли
Ub	Убиквитин
АСМ	Атомно-силовая микроскопия
ВНВ	Внеклеточные нановезикулы
ДСР	Динамическое светорассеяние
КонА	Конканавалин А
миРНК	Короткая регуляторная молекула
мРНК	Матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
ОТ-ПЦР	Обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
РМП	Рак мочевого пузыря

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zaborowski M. Ł. P. et al. Extracellular vesicles: composition, biological relevance, and methods of study //Bioscience. – 2015. – Т. 65. – №. 8. – С. 783-797.
2. Yáñez-Mó M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions //Journal of extracellular vesicles. – 2015. – Т. 4. – №. 1. – С. 27066.
3. Borges F. T., Reis L. A., Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases //Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2013. – Т. 46. – С. 824-830.
4. Bebelman M. P. et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer //Pharmacology & therapeutics. – 2018. – Т. 188. – С. 1-11.
5. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends //Journal of Cell Biology. – 2013. – Т. 200. – №. 4. – С. 373-383.
6. Cai H., Reinisch K., Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle //Developmental cell. – 2007. – Т. 12. – №. 5. – С. 671-682.
7. Wickman G., Julian L., Olson M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies //Cell Death & Differentiation. – 2012. – Т. 19. – №. 5. – С. 735-742.
8. Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles //Annual review of cell and developmental biology. – 2014. – Т. 30. – С. 255-289.
9. Lai R.C., Arslan F., Lee M.M., Sze N.S., Choo A., Chen T.S., Salto—Tellez M., Timmers L., Lee C.N., El Oakley R.M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P., Lim S.K. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. // Stem. Cell Res. — 2010. — V. 4 — № 3. — P. 214-222.
10. Poulet G., Massias J., Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts // Acta Cytol — 2019 — V.63 — № 6 — P. 449-455 — Available at: doi: 10.1159/000499337
11. Zarovni N. et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches //Methods. – 2015. – Т. 87. – С. 46-58.
12. Yamamoto M. et al. Application of high-mannose-type glycan-specific lectin from *Oscillatoria Agardhii* for affinity isolation of tumor-derived extracellular vesicles //Analytical biochemistry. – 2019. – Т. 580. – С. 21-29.
13. Patel G. K. et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications //Scientific reports. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-10.
14. Ludwig N., Whiteside T. L., Reichert T. E. Challenges in exosome isolation and analysis in health and disease //International journal of molecular sciences. – 2019. – Т. 20. – №. 19. – С. 4684.

15. Borges F. T., Reis L. A., Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases //Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2013. – T. 46. – C. 824-830.
16. Gould S. J., Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles //Journal of extracellular vesicles. – 2013. – T. 2. – №. 1. – C. 20389.
17. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends //Journal of Cell Biology. – 2013. – T. 200. – №. 4. – C. 373-383.
18. Yáñez-Mó M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions //Journal of extracellular vesicles. – 2015. – T. 4. – №. 1. – C. 27066.
19. Chargaff E., West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood //J Biol Chem. – 1946. – T. 166. – №. 1. – C. 189-197.
20. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma //British journal of haematology. – 1967. – T. 13. – №. 3. – C. 269-288.
21. Azmi A. S., Bao B., Sarkar F. H. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review //Cancer and Metastasis Reviews. – 2013. – T. 32. – №. 3. – C. 623-642.
22. Harding C. V., Heuser J. E., Stahl P. D. Exosomes: looking back three decades and into the future //The Journal of cell biology. – 2013. – T. 200. – №. 4. – C. 367.
23. György B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles //Cellular and molecular life sciences. – 2011. – T. 68. – №. 16. – C. 2667-2688.
24. Camussi G. et al. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells //American journal of cancer research. – 2011. – T. 1. – №. 1. – C. 98.
25. Van Niel G. et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function //Journal of biochemistry. – 2006. – T. 140. – №. 1. – C. 13-21.
26. Valadi H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells //Nature cell biology. – 2007. – T. 9. – №. 6. – C. 654-659.
27. Mathivanan S., Ji H., Simpson R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication //Journal of proteomics. – 2010. – T. 73. – №. 10. – C. 1907-1920.
28. D'Asti E. et al. Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression //Frontiers in physiology. – 2012. – T. 3. – C. 294.
29. Poliakov A. et al. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen //The Prostate. – 2009. – T. 69. – №. 2. – C. 159-167.
30. Vidal M. et al. Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for “aminophospholipid translocase” //Journal of cellular physiology. – 1989. – T. 140. – №. 3. – C. 455-462.

31. Chu Z., Witte D. P., Qi X. Saposin C–LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes // *Experimental cell research*. – 2005. – T. 303. – №. 2. – C. 300-307.
32. Minciocchi V. R., Freeman M. R., Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2015. – T. 40. – C. 41-51.
33. Mathivanan S. et al. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids // *Nucleic acids research*. – 2012. – T. 40. – №. D1. – C. D1241-D1244.
34. Keller S. et al. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function // *Immunology letters*. – 2006. – T. 107. – №. 2. – C. 102-108.
35. Huotari J., Helenius A. Endosome maturation // *The EMBO journal*. – 2011. – T. 30. – №. 17. – C. 3481-3500.
36. Ren X., Hurley J. H. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo // *The EMBO journal*. – 2010. – T. 29. – №. 6. – C. 1045-1054.
37. Kobayashi H. et al. Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transducing adaptor molecule 1 and 2 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – T. 280. – №. 11. – C. 10468-10477.
38. McGough I. J., Vincent J. P. Exosomes in developmental signalling // *Development*. – 2016. – T. 143. – №. 14. – C. 2482-2493.
39. Baietti M. F. et al. Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes // *Nature cell biology*. – 2012. – T. 14. – №. 7. – C. 677-685.
40. Kumar B. et al. Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2016. – T. 1863. – №. 3. – C. 464-470.
41. Record M. et al. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors // *Biochemical pharmacology*. – 2011. – T. 81. – №. 10. – C. 1171-1182.
42. Kohlhapp F. J. et al. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment // *Oncogene*. – 2015. – T. 34. – №. 48. – C. 5857-5868.
43. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // *cell*. – 2011. – T. 144. – №. 5. – C. 646-674.
44. Roma-Rodrigues C. et al. Smuggling gold nanoparticles across cell types—a new role for exosomes in gene silencing // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2017. – T. 13. – №. 4. – C. 1389-1398.
45. Simpson R. J. et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential // *Expert review of proteomics*. – 2009. – T. 6. – №. 3. – C. 267-283.
46. Sung B. H. et al. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion // *Nature communications*. – 2015. – T. 6. – №. 1. – C. 1-14.
47. Koumangoye R. B. et al. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading // *PloS one*. – 2011. – T. 6. – №. 9. – C. e24234.

48. Mu W., Rana S., Zöller M. Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness // *Neoplasia*. – 2013. – T. 15. – №. 8. – C. 875-884.
49. Luga V. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration // *Cell*. – 2012. – T. 151. – №. 7. – C. 1542-1556.
50. Paolillo M., Schinelli S. Integrins and exosomes, a dangerous liaison in cancer progression // *Cancers*. – 2017. – T. 9. – №. 8. – C. 95.
51. Zhou W. et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis // *Cancer cell*. – 2014. – T. 25. – №. 4. – C. 501-515.
52. Zeng Z. et al. Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis // *Nature communications*. – 2018. – T. 9. – №. 1. – C. 1-14.
53. Webber J. et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation // *Cancer research*. – 2010. – T. 70. – №. 23. – C. 9621-9630.
54. Zhang Q., Peng C. Cancer-associated fibroblasts regulate the biological behavior of cancer cells and stroma in gastric cancer // *Oncology Letters*. – 2018. – T. 15. – №. 1. – C. 691-698.
55. Syn N. et al. Exosome-mediated metastasis: from epithelial–mesenchymal transition to escape from immunosurveillance // *Trends in pharmacological sciences*. – 2016. – T. 37. – №. 7. – C. 606-617.
56. Becker A. et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis // *Cancer cell*. – 2016. – T. 30. – №. 6. – C. 836-848.
57. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis
58. Monteforte A. et al. Glioblastoma exosomes for therapeutic angiogenesis in peripheral ischemia // *Tissue engineering part A*. – 2017. – T. 23. – №. 21-22. – C. 1251-1261.
59. Tian Y. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy // *Biomaterials*. – 2014. – T. 35. – №. 7. – C. 2383-2390.
60. Yang T. et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio* // *Pharmaceutical research*. – 2015. – T. 32. – №. 6. – C. 2003-2014.
61. Alvarez-Erviti L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes // *Nature biotechnology*. – 2011. – T. 29. – №. 4. – C. 341-345.
62. Bach D. H. et al. The role of exosomes and miRNAs in drug-resistance of cancer cells // *International journal of cancer*. – 2017. – T. 141. – №. 2. – C. 220-230.
63. Luga V. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration // *Cell*. – 2012. – T. 151. – №. 7. – C. 1542-1556.

64. Soekmadji C. et al. Modulation of paracrine signaling by CD9 positive small extracellular vesicles mediates cellular growth of androgen deprived prostate cancer // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8. – №. 32. – C. 52237.
65. Lobb R. J., Lima L. G., Möller A. Exosomes: Key mediators of metastasis and pre-metastatic niche formation // *Seminars in cell & developmental biology*. – Academic Press, 2017. – T. 67. – C. 3-10.
66. Segura E. et al. CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo // *The Journal of Immunology*. – 2007. – T. 179. – №. 3. – C. 1489-1496.
67. Liu C. et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function // *The Journal of Immunology*. – 2006. – T. 176. – №. 3. – C. 1375-1385.
68. Costa-Silva B. et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver // *Nature cell biology*. – 2015. – T. 17. – №. 6. – C. 816-826.
69. Hoshino A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis // *Nature*. – 2015. – T. 527. – №. 7578. – C. 329-335.
70. Fais S. et al. Evidence-based clinical use of nanoscale extracellular vesicles in nanomedicine. – 2016.
71. Roberson C. D. et al. Tumor-derived exosomes as mediators of disease and potential diagnostic biomarkers // *Cancer Biomarkers*. – 2011. – T. 8. – №. 4-5. – C. 281-291.
72. Bracht J. W. P. et al. The present and future of liquid biopsies in non-small cell lung cancer: combining four biosources for diagnosis, prognosis, prediction, and disease monitoring // *Current Oncology Reports*. – 2018. – T. 20. – №. 9. – C. 1-10.
73. Palmirotta R. et al. Liquid biopsy of cancer: a multimodal diagnostic tool in clinical oncology // *Therapeutic advances in medical oncology*. – 2018. – T. 10. – C. 1758835918794630.
74. Bunggulawa E. J. et al. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2018. – T. 16. – №. 1. – C. 1-13.
75. Kanchanapally R. et al. Drug-loaded exosomal preparations from different cell types exhibit distinctive loading capability, yield, and antitumor efficacies: a comparative analysis // *International journal of nanomedicine*. – 2019. – T. 14. – C. 531.
76. Théry C. et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids // *Current protocols in cell biology*. – 2006. – T. 30. – №. 1. – C. 3.22. 1-3.22. 29.
77. Taylor D. D., Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes // *Methods*. – 2015. – T. 87. – C. 3-10.
78. Taylor D. D., Zacharias W., Gercel-Taylor C. Exosome isolation for proteomic analyses and RNA profiling // *Serum/plasma proteomics*. – Humana Press, 2011. – C. 235-246.

79. Samsonov R. et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: application for prostate cancer diagnostic // *The Prostate*. – 2016. – T. 76. – №. 1. – C. 68-79.
80. Colombet J. et al. Virioplankton ‘pegylation’: use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems // *Journal of microbiological methods*. – 2007. – T. 71. – №. 3. – C. 212-219.
81. Tkach M., Kowal J., Théry C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2018. – T. 373. – №. 1737. – C. 20160479.
82. Witwer K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research // *Journal of extracellular vesicles*. – 2013. – T. 2. – №. 1. – C. 20360.
83. Merchant M. L. et al. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS // *PROTEOMICS–Clinical Applications*. – 2010. – T. 4. – №. 1. – C. 84-96.
84. Cheruvanky A. et al. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. – 2007. – T. 292. – №. 5. – C. F1657-F1661.
85. Xu R. et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application // *The Journal of clinical investigation*. – 2016. – T. 126. – №. 4. – C. 1152-1162.
86. Campoy I. et al. Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols // *Journal of translational medicine*. – 2016. – T. 14. – №. 1. – C. 1-12.
87. Musante L., Tataruch D. E., Holthofer H. Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy // *Frontiers in endocrinology*. – 2014. – T. 5. – C. 149.
88. Brownlee Z. et al. A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes // *Journal of immunological methods*. – 2014. – T. 407. – C. 120-126.
89. Gallart-Palau X., Serra A., Sze S. K. Enrichment of extracellular vesicles from tissues of the central nervous system by PROSPR // *Molecular neurodegeneration*. – 2016. – T. 11. – №. 1. – C. 1-13.
90. Gallart-Palau X. et al. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by Protein Organic Solvent Precipitation (PROSPR) // *Scientific reports*. – 2015. – T. 5. – №. 1. – C. 1-12.
91. Musante L. et al. A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications and sample banking // *Scientific reports*. – 2014. – T. 4. – №. 1. – C. 1-11.
92. Shin H. et al. Aqueous two-phase system to isolate extracellular vesicles from urine for prostate cancer diagnosis // *PLoS One*. – 2018. – T. 13. – №. 3. – C. e0194818.

93. Yamamoto M. et al. Application of high-mannose-type glycan-specific lectin from *Oscillatoria Agardhii* for affinity isolation of tumor-derived extracellular vesicles // *Analytical biochemistry*. – 2019. – T. 580. – C. 21-29.
94. Muller L. et al. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma // *Journal of immunological methods*. – 2014. – T. 411. – C. 55-65.
95. Balaj L. et al. Heparin affinity purification of extracellular vesicles // *Scientific reports*. – 2015. – T. 5. – №. 1. – C. 1-15.
96. Shih C. L. et al. Development of a magnetic bead-based method for the collection of circulating extracellular vesicles // *New biotechnology*. – 2016. – T. 33. – №. 1. – C. 116-122.
97. Zabeo D. et al. Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology // *Journal of extracellular vesicles*. – 2017. – T. 6. – №. 1. – C. 1329476.
98. Wu Y., Deng W., Klinke II D. J. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers // *Analyst*. – 2015. – T. 140. – №. 19. – C. 6631-6642.
99. Cheng J., Nonaka T., Wong D. T. W. Salivary exosomes as nanocarriers for cancer biomarker delivery // *Materials*. – 2019. – T. 12. – №. 4. – C. 654.
100. Palmieri V. et al. Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool // *Journal of nanoparticle research*. – 2014. – T. 16. – №. 9. – C. 1-8.
101. Kesimer M., Gupta R. Physical characterization and profiling of airway epithelial derived exosomes using light scattering // *Methods*. – 2015. – T. 87. – C. 59-63.
102. Iliescu F. S. et al. Microfluidic technology for clinical applications of exosomes // *Micromachines*. – 2019. – T. 10. – №. 6. – C. 392.
103. Rojalin T. et al. Nanoplasmonic approaches for sensitive detection and molecular characterization of extracellular vesicles // *Frontiers in chemistry*. – 2019. – T. 7. – C. 279.
104. Gerlinger M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // *N Engl j Med*. – 2012. – T. 366. – C. 883-892.
105. Bardelli A., Pantel K. Liquid biopsies, what we do not know (yet) // *Cancer cell*. – 2017. – T. 31. – №. 2. – C. 172-179.
106. Adalsteinsson V. A. et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors // *Nature communications*. – 2017. – T. 8. – №. 1. – C. 1-13.
107. Franzen C. A. et al. Urinary exosomes: the potential for biomarker utility, intercellular signaling and therapeutics in urological malignancy // *The Journal of urology*. – 2016. – T. 195. – №. 5. – C. 1331-1339.
108. Wortzel I. et al. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance // *Developmental cell*. – 2019. – T. 49. – №. 3. – C. 347-360.

109. Merchant M. L. et al. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery //Nature Reviews Nephrology. – 2017. – Т. 13. – №. 12. – С. 731-749.
110. Dhondt B. et al. Urinary extracellular vesicle biomarkers in urological cancers: From discovery towards clinical implementation //The international journal of biochemistry & cell biology. – 2018. – Т. 99. – С. 236-256.
111. Liberati A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration //Journal of clinical epidemiology. – 2009. – Т. 62. – №. 10. – С. e1-e34.
112. Whiting P. F. et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies //Annals of internal medicine. – 2011. – Т. 155. – №. 8. – С. 529-536.
113. Zhan Y. et al. Expression signatures of exosomal long non-coding RNAs in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer //Molecular cancer. – 2018. – Т. 17. – №. 1. – С. 1-5.
114. Song Z. et al. Development of a CD63 aptamer for efficient cancer immunochemistry and immunoaffinity-based exosome isolation //Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 23. – С. 5585.
115. An Y. et al. Magneto-mediated electrochemical sensor for simultaneous analysis of breast cancer exosomal proteins //Analytical chemistry. – 2020. – Т. 92. – №. 7. – С. 5404-5410.
116. Bhardwaj A. et al. Exosomal Markers (CD63 and CD9) expression pattern using immunohistochemistry in resected malignant and non-malignant pancreatic specimens //Pancreas. – 2017. – Т. 46. – №. 6. – С. 782.
117. Bashmakova E. E. et al. N-extended photoprotein obelin to competitively detect small protein tumor markers //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2022. – Т. 598. – С. 69-73.
118. Geng H. et al. Exosomes in bladder cancer: novel biomarkers and targets //Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. – 2021. – Т. 22. – №. 5. – С. 341-347.
119. Sun L. H. et al. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4 //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-8.
120. HER2 [электронный ресурс] – режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537134/> (Дата обращения 11.05.2023)
121. Piccart-Gebhart M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer //New England Journal of Medicine. – 2005. – Т. 353. – №. 16. – С. 1659-1672.

122. Chae H. K. et al. Identification of New Prognostic Markers and Therapeutic Targets for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: HER2 as a Potential Target Antigen //Frontiers in Immunology. – 2022. – C. 2394.
123. Litvinov S. V. et al. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule //The Journal of cell biology. – 1994. – T. 125. – №. 2. – C. 437-446.
124. Maetzel D. et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM //Nature cell biology. – 2009. – T. 11. – №. 2. – C. 162-171.
125. Osta W. A. et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy //Cancer research. – 2004. – T. 64. – №. 16. – C. 5818-5824.
126. Litvinov S. V. et al. Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation //The American journal of pathology. – 1996. – T. 148. – №. 3. – C. 865.
127. Münz M. et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation //Oncogene. – 2004. – T. 23. – №. 34. – C. 5748-5758.
128. Went P. T. H. et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas //Human pathology. – 2004. – T. 35. – №. 1. – C. 122-128.
129. Sankpal N. V. et al. A double-negative feedback loop between EpCAM and ERK contributes to the regulation of epithelial–mesenchymal transition in cancer //Oncogene. – 2017. – T. 36. – №. 26. – C. 3706-3717.
130. England C. G., Ehlerding E. B., Cai W. NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence //Bioconjugate chemistry. – 2016. – T. 27. – №. 5. – C. 1175-1187.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

подпись

инициалы, фамилия

«26» июня 2023 г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

«Разработка способа выделения фракции экзосом мочи человека
и их характеристика»

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

19.06.2023

подпись, дата

Л.А. Франк
должность, ученая степень

Л.А. Франк

инициалы, фамилия

Выпускник

19.06.2023

подпись, дата

К.А. Драндрова

должность, ученая степень

К.А. Драндрова

инициалы, фамилия

Рецензент

19.06.2023

подпись, дата

Е.В. Еремеева
должность, ученая степень

Е.В. Еремеева

инициалы, фамилия

Консультант

19.06.2023

подпись, дата

В.В. Красицкая
должность, ученая степень

В.В. Красицкая

инициалы, фамилия

Красноярск 2023