



Vérplazma eredetű exoszóma izolálás optimalizálása in vivo kísérletekhez

Onódi Zs., Makkos A.

Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet

Előadó: Onódi Zsófia, Általános Orvostudományi Kar, IV.

E-mail: zsofia.onodi@gmail.com

Kulcsszavak: exoszóma, extracelluláris vezikula, izolálás, tárolás, vérplazma

Bevezetés: Az exoszómák (ES) 30-100 nm átmérőjű, RNS-t, fehérjét és lipideket tartalmazó extracelluláris vezikulák, melyek szerepet játszanak fiziológiás és patológias folyamatokban is. Az ES-k vérplazmából történő izolálásának jelenleg nincs elfogadott, standard technikája. Az alkalmazott elválasztási módszerek legfőbb problémája a bioinkompatibilis anyagok használata, melyek az in vivo kutatásokban és terápiában mellékhatásokhoz vezethetnek.

Cél: Olyan módszer kidolgozása, mely során vérplazmából tiszta és élő szervezetre ártalmatlan formában izoláljuk az ES-kat, valamint az izolátumok tárolási paramétereinek meghatározása.

Módszerek: Wistar patkány és normál humán vérplazmából differenciáló centrifugálások és szűrések segítségével ES-kat izoláltunk. Az izolálás során 1, 3, 6 és 14 órás ultracentrifugálást (UC) alkalmaztunk, majd 0, 4 vagy 8 hétig 4°C vagy -80°C-on tároltuk a mintákat. Az izolátumok fizikai tulajdonságait transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) és dinamikus fényszórás (DLS) méréssel vizsgáltuk. A minták fehérjekoncentrációját meghatároztuk, az exoszóma-specifikus markereket (CD63, flotillin-1) immunoblottal detektáltuk. Eredményeinket t-próbával vagy egyutas ANOVA-val értékeltük, a $p < 0,05$ -öt tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények: ES-k csak az 1h és 3h UC-t követően voltak azonosíthatók. A TEM alapján a vezikulák átmérőjének módusza 50,5 nm ($n=2440$) volt az 1h, illetve 35,1 nm ($n=353$) volt a 3h UC után. A DLS mérés alapján az 1h UC-s izolátumban szignifikánsan magasabb volt a 30-100 nm átmérőjű vezikulák aránya (1h: $83,2 \pm 2,5\%$ vs. 3h: $36,9 \pm 2,7\%$; $p < 0,05$; $n=3$). Az UC időtartamával arányosan nőtt az izolátumok fehérjekoncentrációja és az ES-specifikus markerek abszolút mennyisége. Kísérleteinket 1h UC alkalmazásával humán vérszérumon megismételve hasonló eredményeket tapasztaltunk. A -80°C-on 8 hétig tárolt ES-k megőrizték eredeti struktúrájukat, míg a 4°C-on tároltak dezintegrálódtak. A vezikulák -80°C-on is megtartották jellemző méreteloszlásukat, szemben a 4°C-on tároltakkal.

Konklúzió: Vizsgálataink alapján az ES-k biokompatibilis izolálására az 1h UC a legalkalmasabb. A hosszabb UC megváltoztatta az ES-k szerkezetét, valamint emelte a minták nem ES eredetű fehérjetartalmát. Az ES-k -80°C-on legalább 2 hónapig tárolhatóak.

Témavezető: Dr. Baranyai Tamás, Dr. Giricz Zoltán