

Vérplazma eredetű exoszóma izolálás optimalizálása in vivo kísérletekhez

Onódi Zsófia SE ÁOK IV.

Makkos András SE ÁOK V.

zsosfia.onodi@gmail.com, makkosandras@gmail.com

Bevezetés: Az exoszómák (ES) 30-100 nm átmérőjű, RNS-t, fehérjéket és lipideket tartalmazó extracelluláris vezikulák, melyek fontos szerepet játszanak fiziológiás és patológias folyamatokban. 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 morfológiai és 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.

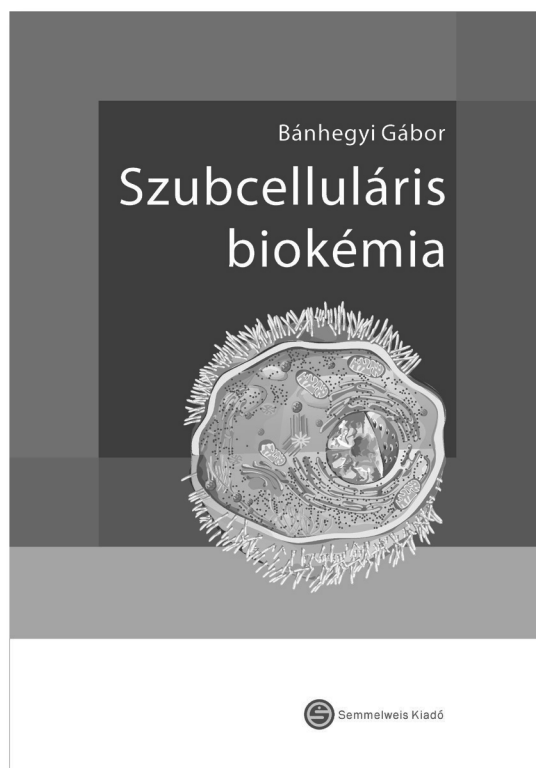
Eredmények: ES-k csak az 1h és 3h UC-t követően voltak azonosíthatók. A TEM alapján a vezikulák átmérőjének módusza 50,5 nm ($n=2440$) volt az 1h, illetve 35,1 nm ($n=353$) volt a 3h UC után. A DLS mérés alapján az 1h UC-s izolátumban szignifikánsan magasabb volt a 30-100 nm átmérőjű vezikulák aránya (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 tárolt ES-k dezintegrálódtak. A vezikulák -80 °C-on is megtartották jellemző méreteloszlásukat, szemben a 4 °C-on tároltakkal.

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

Korábbi publikáció nem jelent meg ebben a témában.

Témavezető(k): Dr. Baranyai Tamás PhD-hallgató, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Dr. Gircz Zoltán tudományos főmunkatárs, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet

Bánhegyi Gábor: SZUBCELLULÁRIS BIOKÉMIA



A Szubcelluláris biokémia egyetemi jegyzet megírására az Egyetem curriculum reformja miatt kerül sor, amelynek során az orvosi biokémia, molekuláris biológia tárgy kiegészül a molekuláris sejtbológiával. Korábban ennek a tananyagnak egy részét hallgatóink a biológia tantárgy keretein belül tanulták. A curriculum átalakulásból következő jelentős szerkezeti és szemléleti tananyag-változásnak megfelelően a jegyzet a szubcelluláris struktúrákkal a molekuláris logika és szemlélet szerint foglalkozik. Ebből adódóan a jegyzet tananyagának elsajátítása az Orvosi Biokémia egyetemi tankönyv ismeretét feltételezi. A jegyzet elsősorban orvos- és fogorvostanhallgatóknak szól, amennyiben nemcsak a szubcelluláris organellek morfológiája és sejbiokémiai, sejttéltani szerepe, hanem a patobiokémiai vonatkozások logikája szerint is tárgyalja a tananyagot.

www.semmelweiskiado.hu