

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2020

Jana Ondráčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Metody studia a izolace extracelulárních vezikulů ve vztahu k nádorovému
onemocnění

Bakalářská práce

2020

Jana Ondráčková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Ondráčková**
Osobní číslo: **C17198**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Metody studia a izolace extracelulárních vezikulů ve vztahu k nádorovému onemocnění**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte kompilační práci zabývající se extracelulárními vezikuly a možnostmi jejich izolace.
2. Seznamte se s významem extracelulárních vezikulů a exomerů v lidském organismu. Zaměřte se na biologický význam, vnitřní složení, povrchové molekuly, vztah k nádorovým onemocněním a uveďte přehled izolačních metod.
3. Pro vytvoření kompilační práce využijte elektronických vědeckých databází, jako např. *NCBI PubMed*, *ScienceDirect* nebo *Web of Science*. Jako zdroje využijte především odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech mladší 10 let.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Markéta Fojtíková**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.7.2020

Jana Ondráčková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za trpělivost a ochotu při zpracování práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala během celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá extracelulárními vezikuly, které mají důležitou roli v mezibuněčné komunikaci. Zkoumá složení, původ a velikost jednotlivých extracelulárních vezikulů. Na příkladech ukazuje vztahy mezi nádorovým onemocněním a extracelulárními vezikuly. Velká část práce se věnuje izolačním technikám exozomů, kterými je lze studovat nebo stanovit celkové množství.

KLÍČOVÁ SLOVA

Extracelulární vezikuly, exozomy, mikrovezikuly, nádorové onemocnění, izolační metody

TITLE

Methods of study and isolation of extracellular vesicles in relation to cancer

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with extracellular vesicles, which play an important role in intercellular communication. It examines the composition, origin and size of individual extracellular vesicles. Explains the relationship between cancer and extracellular vesicles. Another part of the work is devoted to laboratory techniques that can be used to isolate them or study their composition.

KEYWORDS

Extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, cancer, isolation methods

OBSAH

ÚVOD.....	13
1 Extracelulární vezikuly	14
1.1 Historie.....	14
1.2 Dělení extracelulárních vezikul.....	14
1.2.1 Mikrovezikuly.....	14
1.2.2 Exozomy	15
1.2.3 Apoptická tělíska	17
1.3 Výskyt exozomů v těle.....	17
1.4 Funkce v organismu	17
1.4.1 Komunikace mezi buňkami	18
1.5 Proteinové markery exozomů	18
CD63.....	18
CD9.....	18
CD81	19
CD82.....	19
Proteiny tepelného šoku.....	19
Alix	19
Flotiliny.....	19
1.6 Využití exozomů v diagnostice a léčbě.....	19
2 Nádorová onemocnění a exozomy.....	22
2.1 Úloha exozomálních mikroRNA u nádorů	22
2.2 Diagnostické využití vezikulů při nádorovém onemocnění.....	23
2.3 Terapie při nádorovém onemocnění s použitím vezikulů	23
3 Metody izolace a studia vezikulů.....	25
3.1 Metody ultracentrifugace	26
3.1.1 Diferenciální ultracentrifugace	26
3.1.2 Ultracentrifugace hustotního gradientu	27
3.2 Technika izolace založená na velikosti vezikulů	29
3.2.1 Ultrafiltrace	29
3.2.2 Gelová chromatografie	29
3.2.3 Izolační kit pro exozomy	29
3.2.4 Sekvenční filtrace	30
3.2.5 Frakcionace tokem v poli.....	30

3.3	Technika založená na imunoafinitním principu.....	31
3.3.1	ELISA	31
3.3.2	Magnetická imunoprecipitace.....	33
3.3.3	Western blot.....	33
3.3.4	Průtoková cytometrie.....	34
3.4	Precipitace	35
3.4.1	Precipitace polyethylenglykolem.....	35
3.4.2	Aglutinace indukovaná lektinem	35
3.5	Techniky izolace na bázi mikrofluidik.....	35
3.5.1	Akustický nanofiltr	35
3.5.2	Imunofluorescenční mikrofluidická izolace	36
3.5.3	Mikrofluidní čip na bázi imunomagnetických kuliček.....	37
3.6	Metody založené na mikroskopii	38
3.6.1	Transmisní elektronová mikroskopie.....	38
	ZÁVĚR	39
	POUŽITÁ LITERATURA	40
	Obrázky.....	45

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Rozdíl mezi velikostmi extracelulárních vezikulů a jejich vznikem	17
Obrázek 2: Postup při diferenciální ultracentrifugaci.....	27
Obrázek 3: Rozdíl mezi zonální a izopyknicovou centrifugací	28
Obrázek 4: Princip sendvičové ELISA metody	32
Obrázek 5: Postup při Western blottingu	34
Obrázek 6: Schématické zobrazení akustického nanofiltru	36
Obrázek 7: Grafické a reálné zobrazení mikrofluidního čipu na bázi imunomagnetických kuliček	37
Obrázek 8: Zobrazení exozomů pomocí transmisní elektronové mikroskopie	38
Tabulka 1: Přehled technik	25

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

APC	Antigen prezentující buňky
BSA	Hovězí sérový albumin
CCT2	Chaperonin obsahující podjednotku 2
CD9	Tetraspanin
CD40	Kostimulační protein v antigen prezentujících buňkách
CD63	Protein, tetraspanin
CD81	Protein buněčného povrchu (TAPA-1) nebo tetraspanin-28
CD82	Membránový glykoprotein
CD86	Kostimulační faktor
C3b	Komplement
EDTA	Organická sloučenina kyseliny ethylendiamintetraoctové
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
EpCAM	Epiteliální buněčná adhezivní molekula
Eps15	Receptor epidermálního růstového faktoru
ESCRT	Endozomální třídící komplex potřebný pro transport
EV	Extracelulární vezikuly
HLA-DR	Lidský leukocytární antigen
HRP	Křenová peroxidáza
HSPA5	Protein tepelného šoku
HSP60	Protein tepelného šoku
HSP70	Protein tepelného šoku
HSP90	Protein tepelného šoku
IL-10	Interleukin 10
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
mRNA	Mediátorová RNA (messenger RNA)
MV	Mikrovezikuly
NK	Přirozená zabíječská buňka (Natural killer cell)
PBS	Fosfátový pufr
PEG	Polyethylenglykol

PSI	Jednotka tlaku
Rab5	Protein časného transportu
Rab27A	Protein nadrodiny GTPáz
Rab27B	Protein nadrodiny GTPáz
TGF- β	Transformující růstový faktor- β
TLR	Receptor podobný genu (toll-like receptor)
TMV	Mikrovezikuly odvozené z nádorů (Tumor-derived microvesicles)
TNF	Faktor nádorové nekrózy
TSG101	Nádor citlivý gen
TSP	Trombospondin, adhezivní glykoprotein
ZO-1	Zonula occludens-1 nebo protein těsného spojení 1

ÚVOD

Cílem práce je seznámit se s extracelulárními vezikuly, jejich funkcí v lidském organismu, složením a vztahu k nádorovým onemocněním.

Extracelulární vezikuly jsou v současnosti studovány v souvislosti s rakovinou. Jedná se o váčky ve velikosti od několika desítek nanometrů až po větší váčky dosahující velikosti jednotek mikrometrů. Podle jejich velikosti, vzniku, obsahu nebo funkce se dělí do jednotlivých kategorií. Všeobecně jsou zodpovědné za mezibuněčnou komunikaci a jsou schopné přenášet buněčné složky jako jsou lipidy, nukleové kyseliny nebo proteiny. Účastní se i imunitních pochodů.

Vezikuly mohou být dobrým zdrojem biomarkerů onemocnění. To bylo potvrzeno například u onemocnění ledvin, kloubů, kardiovaskulárního onemocnění, a specifický obsah byl potvrzen v exozomech u Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby. Studovaným faktem je jejich spojitost s rakovinnými změnami nejen díky výskytu v nádorových buňkách, ale zkoumá se jejich použití jako terapeutik při léčbě rakovinného onemocnění. Exozomy se z rakovinných buněk uvolňují ve větším množství než u normálních buněk, což způsobí rychlejší proliferaci, invazi a rychlejší vznik metastáz.

Druhým cílem práce jsou metody studia a izolace vezikulů. Pro studium vezikulů byla vyvinuta celá řada laboratorních metod a postupů. Metody jsou založené na odlišných principech izolace, liší se mírou čistoty získaných vezikulů, náročností a potřebnými zkušenostmi pracovníka při izolaci, nároky na objem nebo úpravu vzorků před analýzou.

V současné době existuje řada izolačních technik, které jsou šetrné ke vzorku, ale je u nich nutná předchozí laboratorní praxe a bývají často zdlouhavé. Takovou technikou je magnetická imunoprecipitace. Naopak jsou techniky, jako je ultracentrifugace, díky kterým se dají exozomy rychle získat z biologického materiálu a nejsou náročné na čas a ani není nutná dlouhodobá praxe pracovníka.

1 Extracelulární vezikuly

1.1 Historie

V roce 1967 prokázal poprvé Peter Wolf roli vylučování krevních destiček při krevní koagulaci. V souvislosti s tím roku 1980 Trams a kol. odhalili zásadní roli, kterou extracelulární vezikuly (EV) hrají při mezibuněčném transportu živin nebo trofických živin [1]. Mezi prvními, kdo popsal EV, byli Pan a Johnstone v roce 1983. Zpočátku se ukázalo, že uvolňování EV bylo součástí likvidačního mechanismu pro odstraňování nežádoucích materiálů z buňky. Další výzkum ukázal, že uvolňování EV je i důležitým mediátorem mezibuněčné komunikace, které se účastní fyziologického procesu, ale i patologické progresse [2].

1.2 Dělení extracelulárních vezikul

EV jsou vezikuly vázající lipidy sekretované buňkami do extracelulárního prostoru. Základní dělení je na základě jejich biogeneze, uvolňovacích cestách, velikosti, obsahu a složení na mikrovezikuly (MV), exozomy a apoptická tělíska [3]. Jednotlivé EV jsou znázorněny v obrázku 1.

1.2.1 Mikrovezikuly

MV jsou EV, které se vytvářejí pučením z buňky ven nebo vyštípnutím plazmatické membrány. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 100 do 1000 nm. Membrána MV obsahuje velké množství cholesterolu, diacylglycerolu a fosfatidylserinu. Hlavními proteinovými markery jsou integriny, seriny a CD40 [4].

1.2.1.1 Význam mikrovezikul

MV byly původně charakterizovány jako produkty aktivovaných destiček a erytrocytů. Důvodem bylo zapojení do koagulace. V současné době jsou popisovány u různých nemocí, kam se řadí i rakovina [5]. Patří k takzvaným mikrovezikulům odvozených z nádorů (TMV). TMV nesou několik proteinů a mRNA nádorových buněk, které se mohou přenášet do monocytů. TMV mohou aktivovat monocyty, kdy dojde ke zvýšení exprese lidského leukocytárního antigenu DR (HLA-DR), dále indukují produkci kyslíkových meziproductů, akumulaci mRNA a sekreci proteinu TNF a interleukinů [6].

Monocyty jsou přímé prekurzory makrofágů odvozených z krvetvorných kmenových buněk, ty se po jejich náboru do nádorové tkáně mohou přeměnit na makrofágy spojené s nádorem a podporovat tak zahájení vzniku nádoru, jeho progresi nebo vzdálenou tvorbu metastáz [7].

1.2.2 Exozomy

Vznikají uvnitř buňky jako multivezikulární tělíska, poté se po fúzi s buněčnou membránou uvolní do extracelulárního prostoru. Dosahují velikosti mezi 30 až 150 nm. Exozomové membrány obsahují cholesterol, sfingomyelin, fosfatidylinositol, ceramid a lipidové rafty. Mezi proteinové markery vyskytující se u exozomů řadíme CD63, CD9, CD81, CD82, flotilin, TSG101, Alix, HSP60, HSP70, HSPA5, CCT2 a HSP90 [4]. Uvnitř obsahují také nukleové kyseliny jako jsou mikroRNA, dlouhé nekódující RNA a kruhové RNA [8].

1.2.2.1 Vznik a vývoj exozomů

Vznik exozomů je intenzivně regulován specifickými receptory a signalizačními dráhami. Prvním krokem je vznik časného endozomu, který vzniká fúzí primárních endocytárních vezikulů. Při kombinování časných endozomů dochází často k výměně endocytárního obsahu a membránového složení. Tento děj probíhá pomocí klathrinové nebo kavelionové závislé, popřípadě nezávislé dráhy. Časný endozom se může vrátit zpět na plazmatickou membránu, kde odevzdá svůj náklad k takzvané „recyklaci“ nebo se změní na „pozdní endozom“ nazývaný multivezikulární tělísko. Rab5 s efektoem VPS34/p150 má funkci klíčového regulátoru přeměny EV na pozdní endozom v plazmatické membráně. Po recyklaci nákladu na buněčné membráně dochází k tvorbě intraluminárního veziklu v časném endozomu pučením na vnitřní membráně, která vede k sekvestraci a distribuci uvnitř vezikulů [9].

Třídění proteinů intraluminárních vezikulů je vysoce regulováno mechanismem, závislým na endozomálním třídícím komplexu potřebným pro transport (ESCRT) a někdy na něm závislý není. ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II a ESCRT-III jsou čtyři jednotky tvořící celkovou ESCRT. Každá z nich organizuje jiné kroky pro výběr nákladu a formaci exozomů. Na začátku cesty závislé na ESCRT se nachází křižovatka pro dodání nákladu určená pro kontrolní ubikvitinový protein. V závislosti na tomto proteinu jsou zapojeny všechny jednotky ESCRT. ESCRT-0 zodpovídá za rozpoznávání monoubikvitovaných proteinů pomocí heterodimeru HRS a STAM1. HRS je cytosolový protein asociovaný s proteiny jako Eps15 a klathrin. HRS pocházející z klathrinu napomáhá setkání s ubikvitovaným nákladem. ESCRT-I a ESCRT-II se připojují k ESCRT-0, kde vytvoří silnou třídící doménu s vysokou afinitou k ubikvitinovému substrátu na endozomální části membrány a zde vypučí. ESCRT-III se připojí ke komplexu, dojde k rozpadu membrány a uvolnění do endozomu [9, 10]. Dojde k označení intraluminárních vezikulů, které se musí dodat do lysozomu, ale jen v tom případě, že nejsou deubikvitovány

deubikvitačními enzymy [11]. Tyto enzymy odstraní ubikvitin z nákladu a ATPáza VPS4 s kofaktorem VTA1 rozebere ESCR komplex. Ty jsou použity znovu [9].

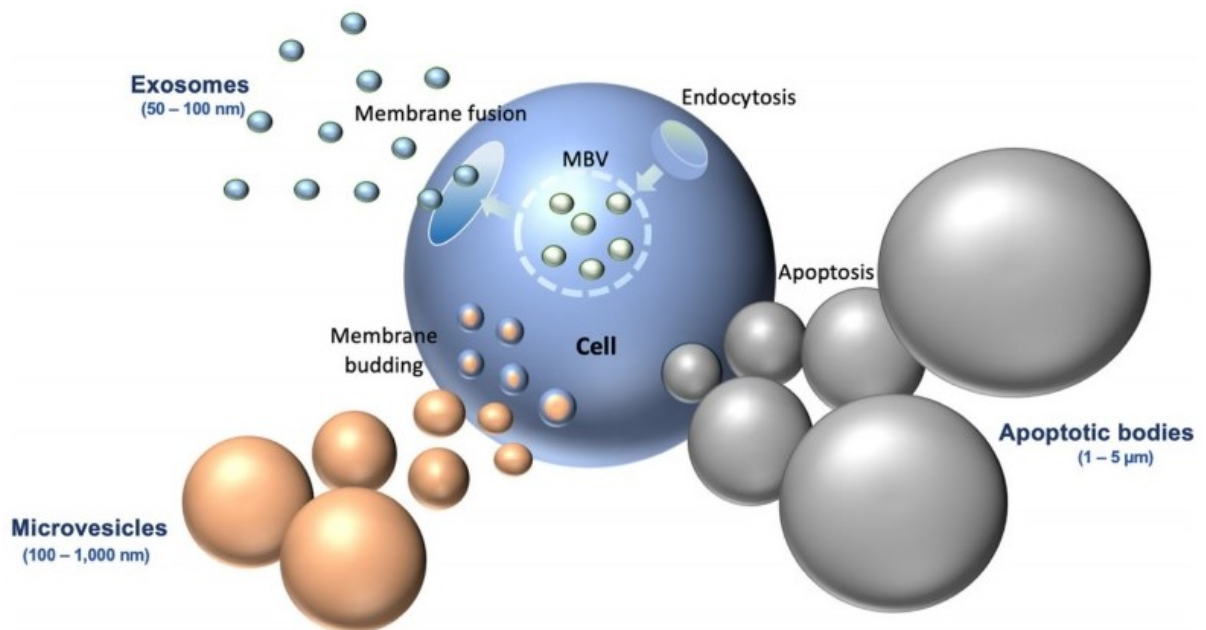
Hlavní roli v biogenezi má Alix, proteineinový marker exozomů. Váže se na ESCRT-III a doručuje neubikvitovaný náklad do intralaminárních vezikulů v přímé vazbě na náklad jako PAR1 nebo nepřímo nesoucí syndekany a tetraspanin CD63 [9]. Přímou interakcí synteninu s Alixem přes tři LYPX L pomáhají vzniku endozomální membrány. ESCRT nezávislý mechanismus probíhá v melanosomech, lysozomech nebo endozomech příbuzným organelám v melanocytech. Melanosomální protein Pmel17, který se zapojuje s lumenálními doménami spolu s lipidy podílející se na vzniku intralaminárních vezikulů [9, 12]. Pmel17 není závislý na ESCRT a existuje jako časné endozomy potažené klathrinem [13].

Multivezikulární tělíska jde sledovat i po vyčerpání všech jednotek ESCRT. Mohou se tvořit nezávisle na ESCRT. Exozomální proteolipidový protein je tříděný v multivezikulárních těliscích lipidem obohaceným endozomálními subdoménami bez klathrinu nezávislého na ESCRT. Takové exozomy jsou obohaceny cholesterolem, sfingomyelinem a ceramidem. Tetraspanin CD63 je protein zprostředkující invaginaci do melanomové membrány nezávislým způsobem na ESCRT a ceramidu [10, 13].

Finální fází multivezikulárních tělísek je splynutí s lysozomy, kde dojde k degradaci, protože obsahují ubikvitovaný náklad nebo jdou směrem k plazmatické membráně a uvolní intraluminární vezikuly do extracelulárního prostoru. Některé komponenty z rodiny Rab jako jsou Rab27A a Rab27B jsou klíčovými mediátory v exozomálním uvolňování, které je vyvoláno přenesením multivezikulárních tělísek na periferii buňky a konečnou fúzí s plazmatickou membránou [9]. Receptor pro rozpustný protein citlivý na N-ethylmaleimid (SNARE) řídí membránové splynutí a exozomální sekreci. Celý proces začíná interakcí synaptotagminálního proteinu, který má funkci jako receptor vápenatých iontů a je na multivezikulárních těliscích a plazmatické membráně známý nebo označován jako protein syntaxin. Nashromážděné multivezikulární tělíska zakotví na plazmatické membráně přes trans-SNARE komplex složený z V-SNARE a T-SNARE. Ten vede k uvolnění exozomů do okolí [14].

1.2.3 Apoptická tělíska

Apoptická tělíska jsou produkována umírajícími buňkami a velikost mají v rozmezí od 50 do 5000 nm. Na membránách mají nekrytý fosfatidylserin a hlavní proteinové markery zahrnující histony, TSP a C3b. Apoptická tělíska také obsahují fragmentovanou DNA a buněčné organely hostitelské buňky [4].



Obrázek 1: Rozdíl mezi velikostmi extracelulárních vezikulů a jejich vznikem (převzato) [1]

1.3 Výskyt exozomů v těle

Exozomy se v těle vyskytují v různých tělních tekutinách, z nichž byly izolovány. Mezi takové tekutiny patří krev, sperma, sliny, plazma, moč, mozkomíšní mok, epididymální tekutina, plodová voda, maligní a pleurální výtok z ascitu, tekutina získaná při bronchoalveolární laváži, sinoviální tekutina i mateřské mléko [15].

1.4 Funkce v organismu

V minulosti se předpokládalo, že exozomy se podílejí na odstraňování zbytečných molekul, které jsou lysozomálním systémem špatně degradovány. Dalšími výzkumy byla objevena ale mnohem složitější funkce, kterou exozomy mají [16]. Hlavní funkcí exozomů je zprostředkování komunikace mezi buňkami [3].

1.4.1 Komunikace mezi buňkami

Tento typ komunikace je rozhodující pro udržení fyziologické homeostázy a řídí patologické projevy. Spíše než přímý kontakt mezi buňkami nebo uvolnění a příjem extracelulárních signálních molekul, kam patří cytokiny, hormony, růstové faktory a extracelulární matrix, se exozomy objevují jako rozhodující prostředníci v intercelulární a intracelulární komunikaci, a to působením v místě nebo na dálku. Exozomy mají na povrchu lipidovou dvojvrstvou membránu, která má funkci ochranného štítu. Membrána zapouzdřuje a chrání mikroRNA nebo proteiny před degradací RNázami nebo proteinázami. Studie uvedly, že biologická aktivita exozomálních molekul věrohodně reguluje buněčné signalizační události a biologické procesy buněk příjemce [17].

1.5 Proteinové markery exozomů

CD63

Patří do nadrodiny tetraspaninů, skupiny proteinů se čtyřmi transmembránovými doménami a sérii aminokyselinových zbytků. Nahromadění tetraspaninem obohacených mikrodomén umožňuje tetraspaninovým proteinům jako je CD63 interakci s jinými integrálními membránovými proteiny, včetně imunoglobulinů, kadherinů, proteoglykanů a signálních molekul na buněčném povrchu. Interakce mají vliv na buněčné funkce, mezi které patří adheze, proliferace a imunitní odpovědi. Povrch CD63 může být endocytovaný do vezikulů potažených klathrinem a následně dodaný do časných endozomů.

CD63 může být nápomocný při tvorbě hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II z plazmatické membrány do endozomálních kompartmentů a je také rekrutovaný do fagocytárních vakuol s cizorodým obsahem, který se internalizuje a později převede na endozomy. Protein CD63 je také spojovaný s virovými interakcemi, například u viru Epstein-Barrové [18].

CD9

Člen nadrodiny tetraspaninů, který je přítomný na hematopoetických buňkách a buňkách regulující aktivitu hematopoézy v kostní dřeni. Hojně je exprimovaný na plazmatické membráně buněk myeloidní linie, jako jsou bazofily, žírné buňky, makrofágy a eozinofily. Podílí se i na regulaci lymfoidní linie. Používá se jako biomarker u rakovinných procesů, kde má vztah k lepšímu přežití a při jeho průkazu se jedná o pozdější stadium rakoviny nebo její invazi [19].

CD81

Člen rodiny tetraspaninů, exprimovaný řadou hematopoetických buněk, kam patří B a T lymfocyty, monocyty, dendritické buňky [20].

CD82

Patří do rodiny tetraspaninů. Objevuje se u fyziologických i patologických procesů. Patologickými procesy jsou invaze a metastáze rakoviny, kdy má vliv na potlačení vzniku metastáz u mnoha maligních solidních nádorových buněk jako je rakovina prostaty, močového měchýře, rakovina prsu, pankreatu a dalších [21].

Proteiny tepelného šoku

Jsou to molekulární chaperony, které udržují homeostázu proteinů díky správnému skládání a aktivaci proteinů v buňce. Vyznačují se také schopností nadměrného vylučování při stresových podmínkách. Mezi tyto proteiny se řadí více molekul, které dostaly své názvy podle jejich přibližné molekulové hmotnosti. Patří sem například HSP60, HSP70, HSP90 a další. Mají svou úlohu v příčinách a progresích nemocí, jako je rakovina, infekce nebo neurodegenerace [22].

Alix

Protein se podílí na apoptóze, má schopnost se vázat na protein vázající vápenaté ionty, reguluje buněčnou adhezi, třídění proteinů, pomáhá při adaptaci na stresové podmínky, dále se podílí na vývoji mozku a smrti neurálních buněk [23].

Flotiliny

Jsou to vysoce konzervované hydrofobní myristoylované a palmitoylované proteiny, patřící do skupiny prohibitinů. Jejich umístění je na vnitřní straně plazmatické membrány, kde hrají zásadní roli při tvorbě lipidových raftů. Obohacují intracelulární vezikuly i EV [24].

1.6 Využití exozomů v diagnostice a léčbě

Exozomy mohou sloužit jako důležité biomarkery pro různá onemocnění. Například bylo zjištěno, že exozomy v plazmě i mozkomíšním moku pacientů s diagnózou Parkinsonovy choroby obsahují alfa synuklein. Exozomy izolované z moči demonstrují schopnost průkazu akutního poškození ledvin. Úspěšné bylo i hledání rakovinných markerů v exozomech u pacientů s nádorovým onemocněním [3], kterému se dále věnuje kapitola 2.

Využití exozomů nesoucí biomarkery je ideální z důvodu minimálního neinvazivního zásahu do těla pacienta. Jedná se totiž o odběr takzvané „kapalné biopsie“. Je to metoda používající se k diagnostice, ale i k monitorování odpovědi pacienta na léčbu [3].

Jak bylo zjištěno, krevní destičky vylučují exozomy schopné regulovat koagulační reakci. Také buňky imunitního systému, jako jsou B lymfocyty a dendritické buňky, zprostředkovávají imunitní odpovědi závislé na MHC prezentaci peptidu po sekreci nanovezikul. Za tímto účelem jsou vezikuly opatřeny specifickými adhezivními molekulami pro úzké zacílení na recipientní buňky [16].

Další potenciál využití exozomů je při vývoji vakcín a pro jiné imunologické účely, protože exozomy působí v podstatě jako vezikuly prezentující antigeny. Exozomy mají dlouhý cirkulační poločas, jsou tolerovány lidským tělem bez jakékoliv odpovědi a jsou schopné nejen pronikat buněčnými membránami, ale také jsou cílené na specifické typy buněk, které z nich dělají vhodného kandidáta pro imunologické aplikace [3].

Exozomy odvozené z mezenchymálních kmenových buněk mají potenciální terapeutické využití. Mají známé protizánětlivé a regenerační účinky. Jsou nejčastějším používaným zdrojem exozomů. Přenáší složky včetně mikroRNA a proteinů, kam patří interleukin-10 (IL-10) a transformující růstový faktor- β (TGF- β). Inhibují expresi prozánětlivých cytokinů, projevující se protizánětlivými účinky a podporují regeneraci tkáně zvýšením přestavby extracelulární matrix. Díky tomu mají exozomy terapeutický potenciál proti různým onemocněním. Patří sem kardiovaskulární onemocnění, poškození jater, poškození ledvin a nervové poškození.

K léčbě onemocnění lze využít samostatných mezenchymálních kmenových buněk nebo mezenchymálních buněk odvozených od exozomů, která se zdají být bezpečnější možností. Terapeutika na bázi exozomů mají nižší riziko vzniku teratomu nebo embolie, které patří k hlavním rizikům terapie mezenchymálními kmenovými buňkami. Exozomy vylučované z indukovaných pluripotentních kmenových buněk odvozených z mezenchymálních kmenových buněk se mohou také uplatňovat pro jejich terapeutické účinky. Tyto exozomy mají lepší účinek při osteoartróze v porovnání se stejným počtem exozomů vylučovaných z mezenchymálních kmenových buněk odvozených ze synoviální membrány. Exozomy vylučované z indukovaných pluripotentních kmenových buněk, embryonálních kmenových buněk a srdečních progenitorových buněk mají podobný terapeutický účinek jako exozomy odvozené z mezenchymálních kmenových buněk.

U exozomů pocházejících z mléka byly potvrzeny imunomodulační účinky na vývoj dítěte. Arntz a jeho kol. prokázali, že orálním podáváním exozomů odvozených z hovězího mléka dojde ke zmírnění artritidy. U exozomových vezikulů odvozených z rostlin, bylo také prokázáno, že mají imunomodulační účinky, i když není jasné, zda tyto vezikuly odpovídají definici exozomů. Imunogenita je hlavním problémem mléčných a rostlinných exozomů, protože se jedná o xenogenní vezikuly. Orální podání těchto xenogenních vezikul může být bezpečnou formou, protože se jedná o látky odvozené od potravin [25].

2 Nádorová onemocnění a exozomy

Při tvorbě primárních nádorů je nutná aktivní komunikace mezi sousedními buňkami a okolním prostředím. Tuto úlohu mají na starosti EV. Mezibuněčná komunikace probíhá mezi nádorovými buňkami a okolním mikroprostředím nádoru. EV se účastní různých invazivních procesů a urychlují metastáze [1].

2.1 Úloha exozomálních mikroRNA u nádorů

Rakovinné buňky uvolňují více exozomů než zdravé buňky, čím podporují mnoho aspektů nádorové malignity včetně proliferace, invaze, metastáze, angiogeneze a imunosuprese [26]. Při proliferaci rakovinných buněk nosohltanu u člověka jsou exozomy uvolněny z nádoru aktivním přenosem onco-mikroRNA. Mezi onco-mikroRNA patří mikroRNA-106-5p, mikroRNA-891a, mikroRNA-24-3p a mikroRNA20a-5p, které propagují proliferaci buněk inhibicí proteinu MARK1 signální dráhou [27].

Kogure a jeho kol. publikovali, že exozomální mikroRNA-584 je schopná urychlit proliferaci rakovinných hepatocelulárních buněk [28]. Další vědci zdůraznili schopnost onkogenní mikroRNA indukovat metastázy a agresivní hmotu z místa nádoru. Dříve byly zdokumentovány exozomy pocházející z nádoru podle výskytu mikroRNA-29a a mikroRNA-21, které přispívají k nádorové buněčné proliferaci a invazi. Aktivace NF- κ B pomocí toll-like receptoru (TLR) po proudu signalizace v imunitních buňkách vede k produkci cytokinů imunitního systému, které zesilují dělení nádorových buněk a rychlost metastáze [29]. V jiné práci bylo dokázáno, že mikroRNA uvolněná nádorem působí jako ligand pro rodinu receptorů TLR, lidských TLR8 a myších TLR7 v imunitních buňkách, které podporují prometastatické zánětlivé faktory vedoucí k pohybu nádorových buněk a jejich agresivitě [30]. Kromě toho mikroRNA-105 v exozomech z rakovinných buněk stimuluje invazi do mozku a dýchacího systému, kde působí jako ZO-1 inhibiční činidlo v endoteliálních buňkách a usnadňuje migraci buněk [31]. V tomto ohledu exozomy nesoucí mikroRNA-21 stimuluje invazi a přemístění nádorových buněk jícnu prostřednictvím aktivace osou PDCD4/JNK v recipientních buňkách [32]. Jiná studie exozomální mikroRNA-122 z buněk prsu přispívala k změněnému uspořádání metabolismu glukózy a tvorbě výklenků v metastázích [33]. Krysí BSp73ASML rakovinné buňky obsahují tzv. onco-mikroRNA jako jsou mikroRNA-494 a mikroRNA-542-3p regulující tvorbu katherin-17 a matrixové metaloproteiny. Ty podporují tvorbu premestazujícího výklenku v příjemcových hostitelských buňkách [34].

2.2 Diagnostické využití vezikulů při nádorovém onemocnění

Proteinové markery obsažené v exozomech, které byly získané z rakovinných buněk, mají významnou roli jako časné biomarkery při detekci rakoviny, relapsu i metastatického šíření.

Glypikan-1 obsažený v exozomech byl detekován u pacientů s rakovinou slinivky břišní se 100 % specifitou a 100 % senzitivitou v porovnání se zdravými pacienty a pacienty s benigní pankreatickou lézí. Tato skutečnost pomáhá při rozlišení mezi benigními a maligními pankreatickými lézemi. Dalším využitím tohoto proteinu je jeho koncentrace, díky které se dá určit, zda se jedná o relaps po chirurgickém zákroku nebo o metastatické šíření. Exozomy s glypikanem-1 lze detekovat také při rakovině prsu nebo u pacientů s gliomem [35].

Dalším významným proteinem je transmembránový protein 256 (TM256). Vyskytuje se v moči u pacientů s prostatickým karcinomem a má velmi vysokou citlivost, která je 94 % a 100 % specifitu [36].

2.3 Terapie při nádorovém onemocnění s použitím vezikulů

Exozomy získané z dendritických buněk mohou mít nejen potenciální využití jako protirakovinné vakcíny, protože si ponechávají povahu dendritických buněk jako antigen prezentující buňky (APC) [25], ale jsou také schopné eradikovat a potlačit růst myších nádorů závislých na T lymfocytech [16].

Molekuly MHC, MHC-I a MHC-II, a kostimulační faktor jako CD86 jsou exprimovány na povrchu exozomů z dendritických buněk. Při podání exozomů získaných z dendritických buněk inkubovaných spolu s rakovinnými antigeny bylo prokázáno, že dochází k indukci specifické protinádorové odpovědi T lymfocytů. Ačkoliv byla potvrzena přímá aktivace T lymfocytů povrchovými exozomálními antigeny, hlavní T buněčná odpověď je indukovaná APC se zachycenými exozomy. Dále bylo potvrzeno, že zralé exozomy pocházející z dendritických buněk vyvolávají silnou T buněčnou odpověď v porovnání s nezralými dendritickými buňkami. Prezentací exozomálních antigenů z dendritických buněk dojde k aktivaci přirozených zabíječských buněk (NK) pomocí svých povrchových receptorů, kterými jsou NKG2D ligand a IL-15R α [25].

Další studie dokázaly, že exozomy vylučované glioblastomem a žírnými buňkami mohou nést mRNA kódující až 1300 genů, které jsou dodány a správně přeneseny do cílových buněk. Taková RNA spojená s vezikuly se nazývá kyvadlová RNA a zahrnuje i malé RNA, jako jsou mikroRNA. Tyto mikroRNA jsou funkční v cílových buňkách, kde účinnost genu utlumí [16].

Předchozím odstavci bylo ukázáno, že exozomy pocházející z B16BL6 myšního melanomu obsahují melanomové antigeny indukované B16BL6 T buněčnou odpovědí a potlačují nádorový růst. Na druhé straně bylo popsáno, že exozomy z rakovinných buněk mají roli v progresi rakoviny, metastáze a rezistenci na léky. Testování bezpečnosti je nezbytné pro použití exozomů získaných z nádorových buněk pro vakcínu [25].

3 Metody izolace a studia vezikulů

Za účelem studia a potenciální aplikace specifických EV v biomedicíně je velmi důležité izolovat tyto exozomy od širokého spektra buněčných komponent a rušivých součástí. Techniky izolace by měly vykazovat vysokou účinnost a měly by být univerzální pro izolaci exozomů z různorodých maticí. V současnosti jsou metody založeny na izolaci a průkazu pomocí optických a neoptických technik vyvinutých pro měření velikosti exozomů, sledování morfologie, stanovení počtu a biochemickém složení exozomů. Techniky využívají různé vlastnosti exozomů, jako je například hustota, tvar, velikost nebo proteiny obsažené na povrchu jejich membrán. Techniky mají své výhody a nevýhody při izolaci [37], přehled je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled technik

Diferenciální ultracentrifugace	Li 2017 [37] Doyle 2019 [2,3]
Ultracentrifugace hustotního gradientu	Li 2017 [37] Doyle 2019 [3]
Zonální centrifugace	Doyle 2019 [3]
Izopyknická centrifugace	Doyle 2019 [3]
Ultrafiltrace	Doyle 2019 [3]
Gelová chromatografie	Carnino 2019 [4]
ExoMir™ Kit	Doyle 2019 [3] Yang 2020[41]
Sekvenční filtrace	Heinemann 2014 [42]
Frakcionace tokem v poli	Hyun 2018 [43]
ELISA	Gurunathan 2019 [15] Grange 2014 [45] Cox 2004 [4]
Magnetická imuniprecipitace	Niu 2020 [47]
Western blot	Mishra 2017 [48] Bass 2017 [5]
Průtoková cytometrie	Koritzinsky 2017 [50]
Precipitace polyethylenglykolem	Batrakova 2015 [51]
Aglutinace indukovaná lektinem	Samsonov 2016 [52]
Akustický nanofiltr	Ko 2016 [53] Shao 2018 [6]
ExoChip	Kanwar 2014 [54]
Mikrofluidní čip na bázi imunomagnetických kuliček	Niu 2020 [46] Niu 2020 [7]
Transmisní elektronová mikroskopie	Van der Pol 2010 [55] Muller 2016 [8]

3.1 Metody ultracentrifugace

Heterogenní směsi suspenzí, jsou vystaveny odstředivé síle neboli odstředování. Složky v suspenzi se díky odstředivé síle usazují podle své hustoty, velikosti a tvaru částic. Hustší nebo větší částice se usazují jako první. Při odstředování se často používají čisté separační částicové materiály, které mají hydrodynamické vlastnosti polymerních materiálů včetně biopolymerů, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. V závislosti na odstředivé síle se částice pro separaci mohou do suspenze přidávat postupně podle fyzikálních vlastností, hustoty a viskozity rozpouštědla. Ultracentrifugace je odstředovací proces, při kterém se využívá mimořádně vysokých hodnot odstředivé síly až do 1 000 000x g.

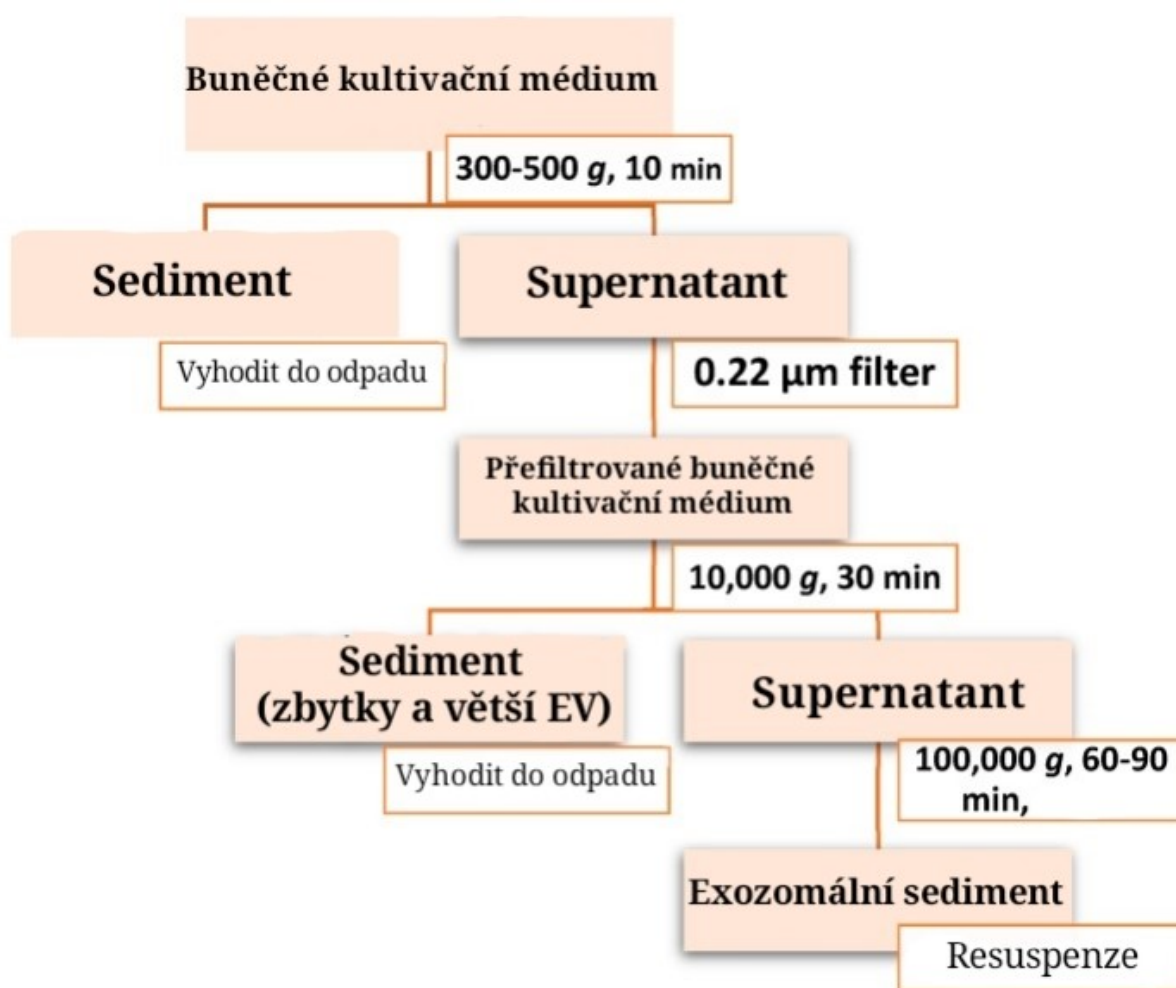
Existují dva druhy ultracentrifugace – analytická a preparativní. Analytická ultracentrifugace využívá fyzikálně – chemických vlastností částicových materiálů a molekulárních interakcí polymerních materiálů. Preparativní ultracentrifugace je také důležitá pro izolaci exozomů, protože je určená pro rozdělení malých biočástic, jako jsou viry, bakterie, podbuněčné organely a extracelulární vezikuly. Izolace exozomů založená na ultracentrifugaci je nejpoužívanější technikou izolace exozomů. Představuje až 56 % všech izolačních technik. Výhodami je snadné použití, nevyžaduje se velká technická znalost, je cenově dostupná, není náročná na čas a lze ji využít i bez předchozí úpravy vzorku. Nejpoužívanější je preparativní ultracentrifugace, která se dělí na dva typy – diferenciální ultracentrifugace a ultracentrifugace hustotního gradientu [37].

3.1.1 Diferenciální ultracentrifugace

Tento typ centrifugace je nejpoužívanější metodou pro izolaci exozomů a zbytků [38]. Metoda je založená na odstředivé síle, separaci exozomů a extracelulárních vezikul od extracelulární matrici, která závisí na hustotě, velikosti a tvaru částic, kdy větší a hustší částice sedimentují nejrychleji [39].

Prvním krokem je centrifugace média s buněčnou kulturou při 500x g 10 minut, kdy se usazují buněčné zbytky a větší částice z matrice. Sediment se vyhodí a supernatant se přefiltruje přes 0,22 µm filtrační membránu. Po filtraci následuje další centrifugace při 10 000x g po dobu 30 minut, která podpoří vyčištění matrice od zbytků a odstranění větších EV a apoptických tělísek. Poslední krokem je odstředění supernatantu při odstředivé síle 100 000x g po dobu 60 až 90 minut. Exozomální výtěžek může být zvýšen použitím delšího času odstředování při otáčkách 100 000x g [3]. Celý postup centrifugace znázorňuje obrázek 2.

Bylo dokázáno, že při delším odstředování více jak 4 hodiny, dochází k významnému mechanickému poškození exozomů a vyšší kontaminaci rozpuštěným proteinem ve výsledném produktu [40]. Při centrifugaci méně než 4 hodiny při otáčkách 100 000x g, vede centrifugace jen k obohacení exozomů, tudíž k nedokonalému odstranění exozomů od ostatních složek v extracelulárním prostoru. Tato metoda je náročnější na čas a vyžaduje i větší objem vzorku, což ztěžuje zpracování několika vzorků v krátkém čase. Výhodou je malá technická zdatnost a malá nebo žádná úprava vzorku před analýzou [3].



Obrázek 2: Postup při diferenciální ultracentrifugaci (převzato a upraveno) [2]

3.1.2 Ultracentrifugace hustotního gradientu

Metoda centrifugace v hustotním gradientu je běžně užívána při výzkumu. Principem je podobná diferenciální centrifugaci, kde dochází k separaci založené na velikosti a hustotě. Rozdílem je, že dochází k centrifugaci v přítomnosti předem vytvořeného hustotního gradientu, obvykle vyrobeného ze sacharózy nebo jodoxinolu, v centrifugační zkumavce. Vzorek se umístí na vrchol gradientu, aplikuje se odstředivá síla, kdy dochází k průchodu částic

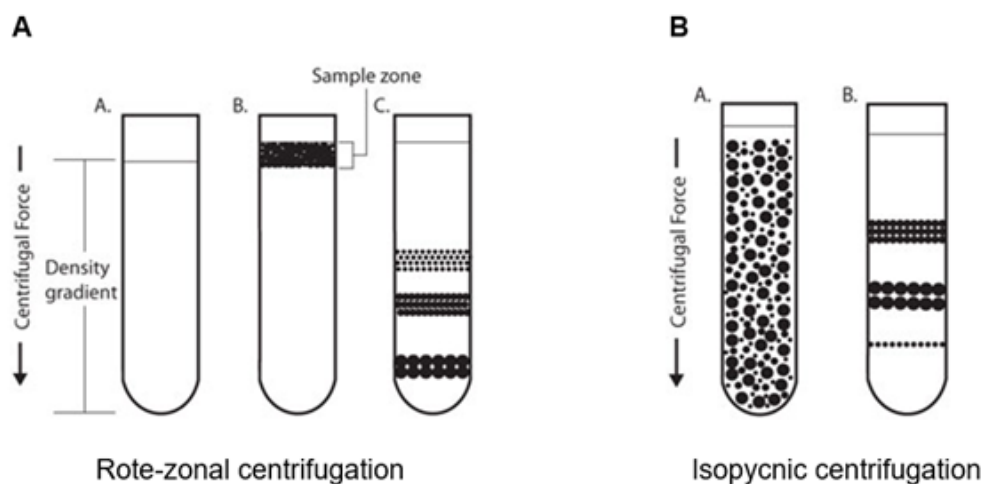
gradientem, který zvyšuje hustotu od shoda dolů, kdy za specifických poměrů dojde k separaci. Exozomy mohou být poté shromažďovány frakcionací obvykle v hustotním poměru 1,1 až 1,2 g/ml. Metoda je velmi účinná při oddělování EV, včetně exozomů od proteinových shluků a nemembránových částic. Je užitečná zejména pro separaci exozomů od jiných EV v tělesných tekutinách. Metoda má stejnou nevýhodu jako diferenciální centrifugace, kterou je nízká výtěžnost exozomů. Existují dva typy centrifugace s hustotním gradientem, kam patří zonální centrifugace a izopyknická centrifugace [3]. Rozdíl mezi nimi znázorňuje obrázek 3.

Zonální centrifugace

Principem je separace na základě sedimentační rychlosti. Vzorek se umístí na mělký vrchol gradientu, kdy po odstředění dojde k rozdělení vzorku do různých zón na základě sedimentační rychlosti, kdy se pohybuje přes gradient s rostoucí hustotou směrem ke dnu zkumavky. Hustší částice se budou pohybovat ke dnu zkumavky rychleji, protože prochází hustšími vrstvami snadněji než menší částičky. Důležité je sledování času odstředování, protože částice se mohou usazovat na dno zkumavky [3].

Izopyknická centrifugace

Při izopyknické centrifugaci dochází k usazování částic ve frakci strmého gradientu hustoty, známého jako izopyknická poloha. Hustota gradientu v této poloze je stejná jako vztlaková hustota částic a díky tomu zůstávají částice v dané části gradientu. Metoda má tu výhodu, že i při delší době odstředování nedochází k usazování částic na dno zkumavky. To je odlišnost od zonální centrifugace. Díky rozdílným hustotám budou mít apoptická tělíska, MV, exozomy a rozpuštěné proteiny jiné izopyknické polohy, které zajistí oddělení extracelulárních složek [3].



Obrázek 3: Rozdíl mezi zonální a izopyknickou centrifugací (převzato) [3]

3.2 Technika izolace založená na velikosti vezikulů

3.2.1 Ultrafiltrace

Jedná se o další z nejdůležitějších metod izolace exozomů. Izolace je závislá na velikosti nebo molekulové hmotnosti exozomů. K izolaci se využívají membránové filtry s definovanou velikostí nebo molekulovou hmotností pro určité vylučovací limity [15]. To znamená, že částice, které mají větší molekulovou hmotnost jsou zadrženy na filtru a částice o menší molekulové hmotnosti, než je použitý filtr, procházejí filtrem do filtrátu. Jedním těžkým úkolem při ultrafiltraci je možné ucpání filtru a zachycení vezikul, tím i následná ztráta exozomů na filtračním papíře. Použitím filtrů s větší molekulovou hmotností a následné použití filtrů pro menší molekulovou hmotnost lze minimalizovat ucpání pórů, ale konečný filtrát nelze použít pro další analýzu. Ultrafiltrace je sice méně náročná na čas než ultracentrifugace a nevyžaduje speciální vybavení, i zde může dojít k deformaci částic či lýze exozomů. Důvodem je smyková síla, která se dá snížit sledováním a regulací transmembránového tlaku [3].

3.2.2 Gelová chromatografie

Metoda je založená na využití porézních kuliček, které oddělují biomolekuly podle hydrodynamických poloměrů. Zahrnuje filtraci roztoku přes sloupec s porézními kuličkami s poloměry menšími, než jsou extracelulární vezikuly, které chceme získat. Výsledkem procesu jsou eluované frakce v pořadí s klesající velikostí. Frakce, kde jsou obsaženy požadované exozomy, lze selektivně izolovat. Jedním z problémů techniky je možná kontaminace vzorku ostatními molekulami podobné velikosti, které se eluují stejnou rychlostí. Důležitá je čistota přípravy, udržení integrity vezikul a prevence před shlukováním extracelulárních vezikul. Kvůli překrývání velikostí dochází obtížnému izolování jednotlivých kategorií exozomů. Nevýhodou je omezení objemu vzorku, potřeba specializovaného vybavení, kam patří chromatografické sloupce a také složitost techniky. Rychlost zpracování je rychlá a odvíjí se na množství vzorku [4].

3.2.3 Izolační kit pro exozomy

ExoMir™ Kit

Dostupná izolační souprava s názvem ExoMir™ Kit izoluje exozomy na základě velikosti. Jedná se o dvě membrány o velikosti 200 a 20 nm. Jsou umístěny do stříkačky, kde filtr o velikosti 200 nm je umístěn nahoře a filtr o velikosti 20 nm je umístěn dole. Vzorek je třeba předem upravit pomocí centrifugace při nízké odstředivé síle, buňky a buněčné zbytky se usadí. Použitím proteinázy K dojde k rozbití větších buněk, které by mohly způsobit ucpání filtrů.

Upravený vzorek prochází stříkačkou přes filtr, kde se větší buňky než 200 nm nedostanou dál filtrem. Mezi filtry zůstanou buňky se svou velikostí mezi 200 a 20 nm, menší buňky projdou i dalším filtrem. Tyto buňky se vyhodí [3,41].

3.2.4 Sekvenční filtrace

Prvním krokem je dead-end (normální) filtrace, kde se supernatant o objemu 150 ml očistí od buněčných zbytků a ostatních buněk při 22 °C. Používá se filtr o velikosti 0,1 µm s nízkými vazebnými vlastnostmi k proteinům. Přes filtr neprojdou velké a pevné částice. Při filtraci se přidává i PBS k dosažení většího výtěžku exozomů.

Druhým krokem je filtrace s tangenciálním tokem. Filtrát se převede do kónické zkumavky a provede se tangenciální filtrace při 4 °C. Vzorek s exozomy je kontinuálně nasávaný z kónické zkumavky pomocí dutých vláken a zpětně recirkulovány do kónické zkumavky. Malé molekuly i s volným proteinem jsou vedeny póry s nízkými vlákny, kde jsou vyloučeny jako permeát a následně odstraněny. Větší molekuly jako jsou exozomy a MV jsou velké na to, aby prošly póry a jsou tedy udržovány v oběhu jako retentát. Ten se zakoncentruje na objem přibližně 50 ml. Tlak filtrace se musí sledovat, aby byl v rozmezí 1,5 až 2,5 PSI. Tím se minimalizuje ztráta exozomů do permeátu. Zakoncentrovaný vzorek se upraví pomocí pěti cyklů diafiltrace a PBS na objem 250 ml. Poté se vzorek znovu zakoncentruje pomocí tangenciální filtrace, kdy se vzorek zbaví kontaminantů menších než 500 kDa molekulové hmotnosti. V pátém cyklu diafiltrace se vzorek redukuje na objem 10 ml a filtr se ještě propláchne 10 ml PBS, kdy se z filtru vyplaví exozomy.

Poslední krokem je filtrace track etch, kdy se kónická zkumavka oddělí od zařízení a vzorkem se naplní stříkačka o objemu 20 ml. Stříkačka se připojí k tlakovému snímači s filtrem TrackEtch o velikosti 10 nm. Během filtrace při 22 °C se musí kontrolovat transmembránový tlak, který nesmí překročit hodnotu 3,5 PSI. Tlak se kontroluje z důvodu toho, aby neprocházely filtrem neexomální mikročástice. Po konečné filtraci se filtr ještě propláchne PBS [42].

3.2.5 Frakcionace tokem v poli

Je to technika izolace, kdy jsou částice separovány podle jejich umístění v laminárním rychlostním gradientu. Při asymetrické frakci toku v poli dojde ke kolmému příčnému toku k toku dolního kanálu, který pohání částice směrem k membráně ohraničující kanál. Difuze způsobí migraci částic ven z membrány proti příčnému toku. Menší částice mají větší Brownův pohyb, díky kterému migrují rychleji do velkého toku, kde se rychlost parabolicky zrychluje se vzdáleností od membrány. Menší částice tedy rychleji migrují polem než částice velké, vylučují

se z kanálu v typických časech, kterým odpovídají charakteristické píky. Tyto frakce se dají detekovat podobně jako při HPLC-GEC.

Technika frakcionace tokem v poli se využívá pro izolaci částic různých velikostí. Technika je na provedení technicky složitější, ale má řadu výhod. Má vysokou kvalitu separace, je šetrnější ke vzorku a nevyžaduje žádnou stacionární fázi. Jemná separační síla působí v gradientu velikostí v tekutém médiu, místo toho, aby se vzorek musel nechat sedimentovat nebo musel projít póry k dosažení jeho separace. Nejsou taky potřebné žádné biologické značky k separaci jednotlivých buněk. I přesto, že je separace jednotlivých buněk možná jen samotnou technikou na základě separace dle velikosti, využívá se afinitních metod ke zvýšení specifity [43].

3.3 Technika založená na imunoafinitním principu

Membrány exozomů obsahují velké množství receptorů a proteinů. Díky této skutečnosti lze využít technik izolace založených na imunoafinitních interakcích mezi antigeny a specifickými protilátkami. Na membránách lidských exozomů se vyskytují tetraspaniny jako jsou CD9, CD63 a CD81. Ty se využívají jako markery exozomů při jejich detekci. Dále jsou využívány také speciální nádorové markery, mezi které řadíme například receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) a epiteliální buněčnou adhezní molekulu (EpCAM). Principem je, že se využívají specifické protilátky proti exozomům, které jsou začleněny na pevném základě. K zachycení exozomů složí interakce antigen – protilátka. Přestože mají imunoafinitní metody řadu výhod, kterými jsou rychlost a snadnost, mají i omezující limity. Mezi nevýhody řadíme skutečnost, že exprese specifických markerů se může lišit mezi jednotlivými typy buněk v důsledku heterogenity nádorů. Tyto modifikace mohou vést k různým izolačním efektům. Ty brání přesné a reprodukovatelné analýze exozomů [44].

3.3.1 ELISA

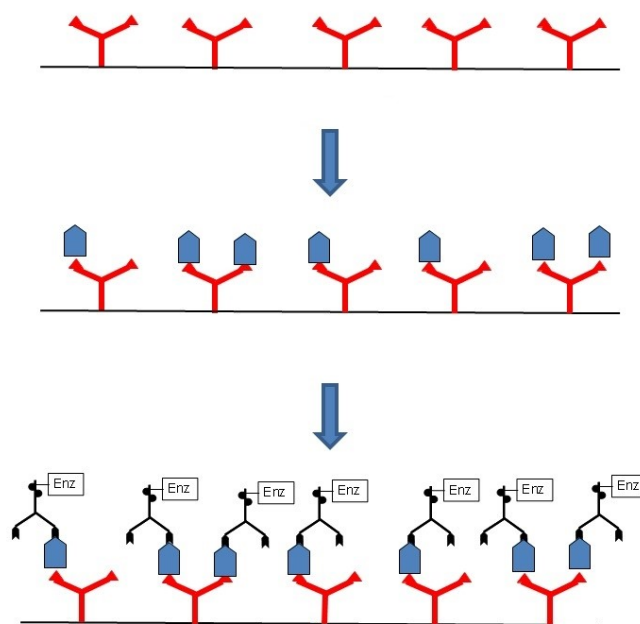
Zkratka je vytvořená z anglického názvu Enzyme-Linked Immunosorbent assay neboli enzymem vázaný imunosorbent [45]. Metoda je vhodná pro detekci specifických exozomálních markerů, jako je CD63 nebo nádorových proteinů. Pomocí ELISA se dají exozomy zachytit a kvantifikovat z plazmy, séra a moči. Specifita a výtěžnost izolace je srovnatelná s metodou ultracentrifugace [15].

ELISA má několik možností průkazu hledané látky ve vzorku. Pro izolaci exozomů se využívá sendvičové imunoanalýzy. Principem je vazba známé specifické protilátky na povrch mikrotitrační destičky. Po přidání vzorku se hledaný antigen naváže na protilátku. Dalším krokem je přidání dalších specifických protilátek, které jsou značeny enzymy. Tyto protilátky

se vážou na antigeny [45]. K dosažení barevného produktu je nutno přidat do reakce substrát, který se naváže na enzym a přemění se na barevný produkt. Jako enzymy se používají nejčastěji alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza nebo β -galaktosidáza [46]. Zjednodušený princip je znázorněn na obrázku 4.

Test se provádí v 96-jamkové mikrotitrační destičce potažené protilátkami v uhličitanovém pufru. Jeho pH je 9,6 a je blokováný 0,5% roztokem BSA a stabilizovaný 1 % roztokem sacharózy. Jako promývací roztok se používá PBS s 0,05 % Tween-20, kdy vzorky k analýze se také naředí v PBS. Vzorky se přidají do jamek a inkubují přes noc při 4 °C nebo 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci se jamky promývají promývacím roztokem a následně se přidá sekundární protilátka s navázaným enzymem (HRP). K sekundární protilátce se přidá pro zvýraznění reakce substrát. V tomto případě jde o BM Blue POD. K získání výsledku se mikrotitrační destička vloží do čtečky mikrodestiček, kde se změří absorbance při 450 nm [38].

Sendvičová ELISA



Obrázek 4: Princip sendvičové ELISA metody (převzato a upraveno)[4]

3.3.2 Magnetická imunoprecipitace

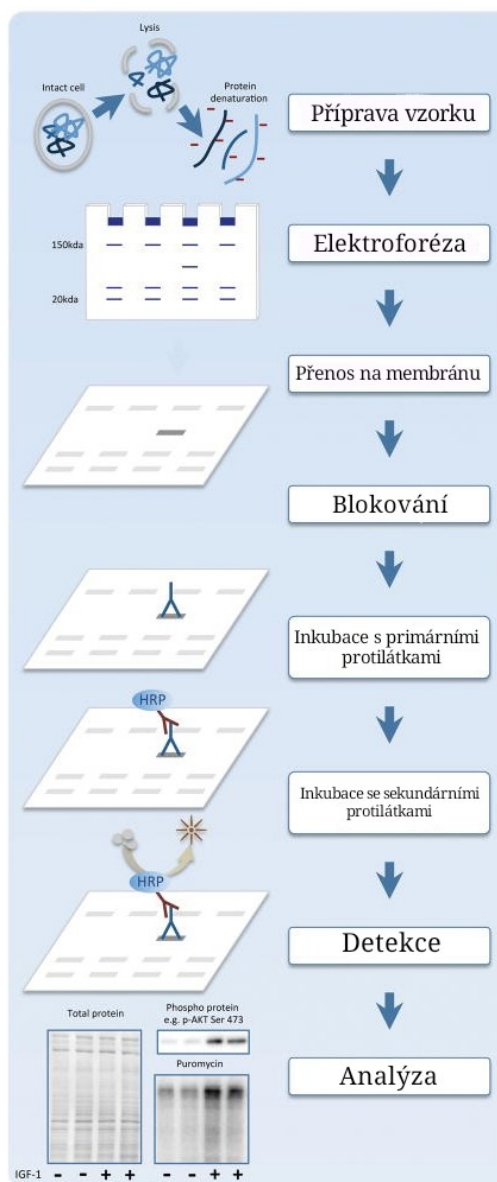
Imunomagnetická izolace je nejčastější využívanou imunoafinitní metodou. Pro metodu je důležité, aby se na povrch magnetických kuliček navázaly ligandy, jimiž jsou protilátky. Díky tomuto lze na magnetickou kuličku s protilátkou navázat hledaný antigen, který je obsažen v exozomech. Mezi typické markerové proteiny patří CD9, CD63 a CD81. Tyto proteiny se vyskytují v různých exozomech a tím se dají od sebe odlišit. Hledané exozomy mohou být uvolněny a sbírány ze směsi vázaných látek, zatímco magnetické kuličky se zachytí magnetického pole pomocí magnetů nebo elektromagnetů.

Důležitým krokem izolace exozomů je navázání protilátky na povrch magnetické kuličky. Na ni se navážou exozomy ze vzorku. Po navázání se odstraní nečistoty a to tak, že se použije magnetické pole, které drží magnetické kuličky a zbytek se uvolní.

Metoda umožňuje izolovat určité subpopulace exozomů a je vhodná pro menší množství vzorku, které díky tomu má vyšší specifitu, čistotu a nulové poškození vzorku. Nevýhodou je ruční zpracování, které je zdlouhavé a na izolaci má také vliv rozdílná zkušenost pracovníka [47].

3.3.3 Western blot

Používá se k detekci proteinů a posttranslačních modifikací proteinů, kdy poskytuje kvantitativní nebo jen semikvantitativní údaje o proteinu [48]. Pro detekci exozomů se využívá proteinů, jako jsou tetraspaniny CD9, CD63 a CD81, dále proteiny Alix, flotilin a různé Rab proteiny [49]. Jedná se o vícestupňový postup složený z přípravy vzorku, separace proteinů podle jejich velikosti na polyakrylamidovém gelu dodecylsulfátu sodného pomocí elektroforézy, imobilizací separovaných proteinů do nitrocelulózy nebo polyvinylidenu fluoridu, blokováním nespecifických proteinů na membráně, zkoumáním cílových proteinů pomocí specifických protilátek, inkubací se sekundárními protilátkami konjugovanými s chemiluminiscenční nebo fluorescenční molekulou, detekcí signálu vzniklou vazbou antigen-protilátka a denzitometrickou analýzou určitých proteinových pásů pomocí přístroje [48]. Vícestupňový postup je znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5: Postup při Western blottingu (převzato a upraveno)[5]

3.3.4 Průtoková cytometrie

Metoda detekuje částice suspendované v tekutině pomocí laserového paprsku při průtoku detekční celou. Tekutina se používá pro udržení částic ve středu detekční cely. Při průchodu částic celou dochází k rozptylu laserového paprsku. Pokud jsou přítomny fluorofory dochází i k fluorescenci. Průtoková cytometrie používá pro detekci komerční prostředky původně navržené pro buňky, poté byly upraveny tak, aby byl snížený detekční práh. Úpravy zahrnují menší kapacitu sondy, snížený stupeň průtoku a změny použité optiky a detektorů. Detekce rozptýleného světla vyžaduje vysokou citlivost. I při užití předního a bočního rozptylu se používá pro analýzu buněk intenzita úměrná „šesté síle“ průměru částic, která je pro malé částice (exozomy) velmi blízká šumu v pozadí. Fluorescence poskytuje silnější signál. Nevýhodou je menší citlivost pro menší částice, kdy se detekují spíše větší částice a jsou jimi

překryty. Stanovení velikosti je náročné. Důvodem jsou rozdílné optické vlastnosti standardů, které změní vztah mezi velikostmi částic a intenzitou signálu. Při analýze postranním rozptylem je důležité použít standard, který je podobný indexu lomu exozomům [50].

3.4 Precipitace

3.4.1 Precipitace polyethylenglykolem

Srážení s polymery se používá k izolaci virů a dalších makromolekul více než 50 let. Nejčastějším polymerem je polyethylenglykol (PEG). Nejpoužívanější komerčním produktem je ExoQuick-TC™ od společnosti Systém Biosciences. Využívá se roztok polyethylenglykolu s molekulovou hmotností 8 000 Da. Precipitační roztok je kombinovaný s biofluidem obsahující exozomy. Roztok se inkubuje přes noc při 4 °C. Po inkubaci se roztok odstředí nízkou rychlostí za vzniku usazeniny obsahující exozomy. Výtěžek je poměrně snadno použitelný a nevyžaduje speciální vybavení. Nevýhodou je koprecipitace nevezikulárních kontaminantů, kam patří lipoproteiny, které také polymerují. Problém je snadno řešitelný úpravným krokem buď před nebo po izolaci. Úprava před izolací zahrnuje odstranění subcelulárních částic, kterými jsou například lipoproteiny, pomocí centrifugace. Úprava po izolaci se týká odstranění polymerů pomocí kolony Sephadex G–25 [51].

3.4.2 Aglutinace indukovaná lektinem

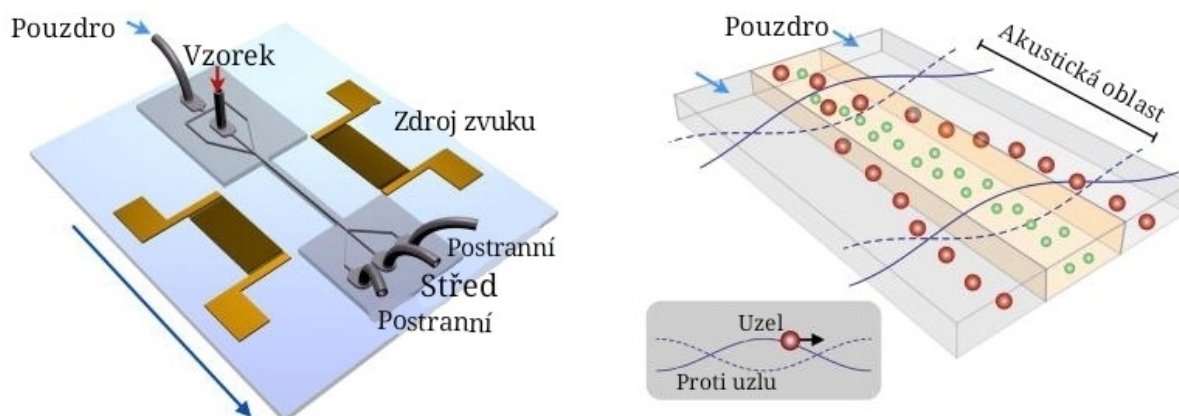
Lektiny jsou rostlinné nebo živočišné proteiny vázající se na různé cukerné skupiny s vysokou specifitou a relativně nízkou afinitou. Izolace exozomů pomocí lektinů je možná díky vazbě na uhlohydráty, které jsou na povrchu exozomů. Při vazbě dojde ke změně rozpustnosti exozomů. Výsledkem je jejich vysrážení. Vzorek se před zpracováním upraví ultracentrifugací k odstranění buněčných zbytků nebo jiných složek, které by mohly obsahovat uhlohydráty. Dále se vzorek inkubuje přes noc spolu s lektinem. Takovým lektinem může být například Concanavalin A nebo fytohemaglutinin. K získání exozomů je nutná centrifugace. Vysrážené exozomy se usadí na dno zkumavky. Metoda je jednoduchá na provedení, nenáročná na čas a nejsou potřebné odborné znalosti [52].

3.5 Techniky izolace na bázi mikrofluidik

3.5.1 Akustický nanofiltr

Jedná se o slibnou metodu pro třídění exozomů a MV v mikrofluidickém zařízení využívající aplikovaná pole, jako jsou například akustická, k vyvíjení sil na exozomy a MV než použití nanofabrikovaných fyzikálních bariér. Metoda nevyžaduje nanolitografii a je také méně náchylná k ucpávání, protože silová pole jdou korfigurovat. Vědci Lee a Weissleder vytvořili

čištění exozomů bez označení využívající mikrofluidní zařízení na bázi akustiky. Akustické filtry oddělují exozomy od ostatních biologických složek na základě jejich velikosti. Částice aplikované do akustického pole se pohybují směrem k tlakovým uzlům díky radiační síle se silou úměrnou velikosti částice. Větší částice se pohybují rychleji napříč mikrofluidním kanálem než menší částice, což umožňuje rozdělení částic podle jejich velikosti [53]. Schématické zobrazení akustického nanofiltru je na obrázku 6.



Obrázek 6: Schématické zobrazení akustického nanofiltru (převzato a upraveno) [6]

3.5.2 Imunofluorescenční mikrofluidická izolace

ExoChip

Metoda je určena pro kvantifikaci exozomů. Pro tyto účely se využívá fluorescenčního barviva a následné kvantifikaci pomocí čtečky destiček. Metoda má jednoduchý postup, který se skládá ze tří kroků.

Prvním krokem je nalití vyšetřovaného vzorku séra do ExoChip, který je předem potažený exozomově specifickými protilátkami antiCD63. Tento protein patří do nadrodiny tetraspaninů nebo nadrodiny transmembránových 4. Protein se vyskytuje v exozomech v hojném počtu a díky tomu poskytuje vysokou selektivitu izolace.

Druhým krokem je použití fluorescenčního barviva, kdy se obarví jen membrána navázaných vezikulů v ExoChip. Fluorescenční barvivo poskytuje tedy snadnou vizualizaci malých vezikulů.

Ve třetím kroku se měří intenzita zbarvení pomocí analytických přístrojů jako je čtečka destiček. Kalibrace intenzity zbarvení se provádí pomocí měření kalibrační řady se zvyšující se koncentrací exozomů. Používá se kalibrace se sérem bez exozomů, s 50 % koncentrací exozomů a 100 % koncentrací exozomů [54].

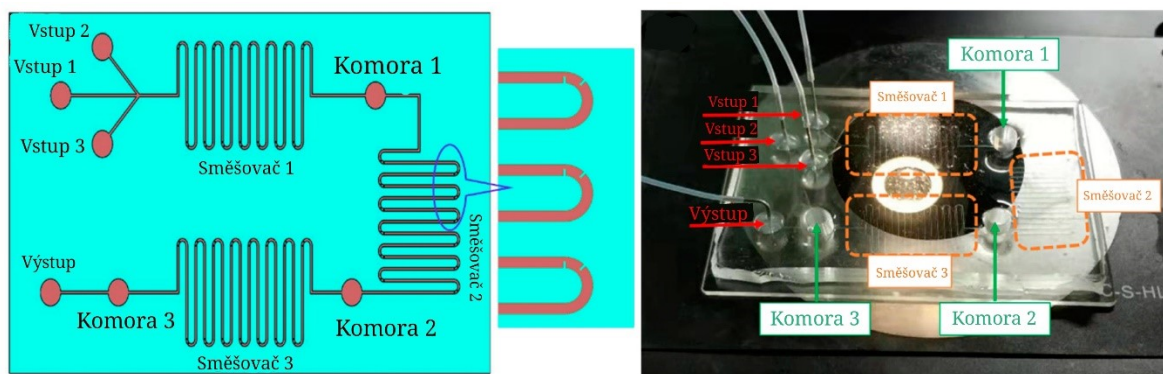
3.5.3 Mikrofluidní čip na bázi imunomagnetických kuliček

Mikrofluidní čip je nově se rozvíjející zařízení k izolaci exozomů [47]. Využívá principu specifických protilátek proti exozomům, které jsou začleněny na pevném základě. K zachycení exozomů složí interakce antigen – protilátka [44]. Kombinují se s fyzikálními a biochemickými principy k dosažení rychlé, efektivní, automatizované a levné izolaci exozomů.

Prvním krokem je navázání imunomagnetických kuliček na exozomy. Do dvou ze tří vstupů se vstříkne suspenze imunomagnetických kuliček potažených specifickými protilátkami a séra pomocí stříkačky průtokové rychlosti 5 $\mu\text{l}/\text{minutu}$ po dobu 30 minut. Výsledná směs se promíchá v mixéru 1, kde dojde k vytvoření vazeb antigen-protilátka. Při průtoku komorami se reakční směs zachytí na umístěné magnety. Většina částic je omezená v komoře 1, zatímco se zbytek zachytí na magnety ve dvou komorách. Tento postup se opakuje ještě jednou, aby se dosáhlo požadované koncentrace suspenze.

Následujícím krokem je odstranění nečistot pomocí PBS, který se vstříkne do prvního vstupu rychlostí 10 $\mu\text{l}/\text{minutu}$ po dobu 10 minut. Po uplynutí 10 minut se odstraní magnet umístěný v komoře číslo 1. Vstřikování PBS do vstupu 1 pokračuje dalších 10 minut, kdy se vyplaví nečistoty, které zůstaly v kanále. Během čistícího procesu se navázané magnetické kuličky s exozomy smíchaly s roztokem PBS v mixéru číslo 2. Potom se zachytily magnetem v komoře číslo 2.

Posledním krokem je izolace a sběr exozomů. Exozomální eluční pufr, který obsahuje chelatační činidlo EDTA se vstříkne do prvního vstupu rychlostí 5 $\mu\text{l}/\text{minutu}$ po dobu 10 minut. Magnet se z komory číslo 2 odstraní. Navázané magnetické kuličky s exozomy a elučním pufrům se dokonale smíchají ve třetím mixéru. Exozomy se před vyloučením z čipu propláchnou a magnetické kuličky se zachytí třetím magnetem. Celkový čas izolace je přibližně 50 minut [47]. Mikrofluidní čip je zobrazen na obrázku 7.



Obrázek 7: Grafické a reálné zobrazení mikrofluidního čipu na bázi imunomagnetických kuliček (převzato) [7]

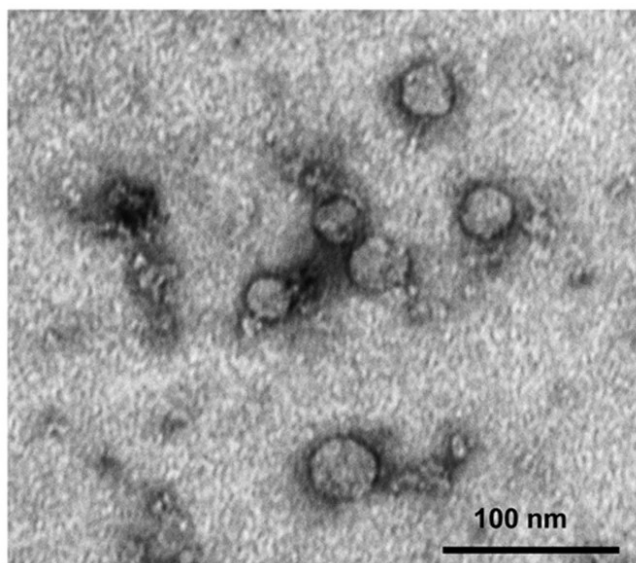
3.6 Metody založené na mikroskopii

3.6.1 Transmisní elektronová mikroskopie

Mikroskopie využívá k tvorbě obrazu elektrony místo fotonů. Nejlepší rozlišení mikroskopického zobrazení je závislé do značné míry na prostorové stabilitě svazku elektronů spolu s chemickou stabilitou vzorku. Vlnová délka elektronů je kratší o tři řády než vlnová délka viditelného světla. Díky tomu se dá dosáhnout rozlišení menší i než 1 nm [55].

Je vhodná pro charakterizaci morfologie, velikosti a fenotypu EV. Slouží i pro kontrolu čistoty vzorků s EV. Díky vysokému rozlišení se dají odlišit EV od buněk podobně velkých, které mezi EV nepatří [4]. Na obrázku 8 je snímek pořízený transmisním elektronovým mikroskopem.

Transmisní elektronová mikroskopie se provádí ve vakuu a je nutné, aby se vzorky před mikroskopií fixovaly a dehydratovaly. Tento postup, ale může ovlivnit jejich velikost a také morfologii. Je také nezbytné zakoncentrovat MV pomocí centrifugace. K zobrazení biochemických informací se používá značení pomocí zlata [55].



Obrázek 8: Zobrazení exozomů pomocí transmisní elektronové mikroskopie (převzato) [8]

ZÁVĚR

EV jsou významné nejen při mezibuněčné komunikaci, ale slouží i jako diagnostické prostředky při nádorových a dalších onemocněních. Podle koncentrace exozomů se dá určit stádium rakovinného onemocnění, relaps nebo zda dochází k tvorbě metastáz. Budoucnost mají v terapii jako vakcíny proti rakovině, které se získávají z rakovinných buněk. Exozomy, které se získávají z kmenových buněk, jsou testovány jako léčebné prostředky pro nerakovinná onemocnění.

EV obsahují řadu proteinových markerových složek, díky kterým je lze detekovat. K takovým patří CD63, proteiny tepelného šoku, Alix, flotilin a další.

Metod, kterými se dají EV izolovat, je velké množství. Preferují se takové metody, které dokážou izolovat co největší množství EV v co nejčistší formě. Některé techniky izolace se skládají hned z několika metod, které na sebe navazují. Takovými jsou například precipitace PEG nebo aglutinace indukovaná lektinem, kdy je nutná úprava vzorku před samotnou izolací pomocí ultracentrifugace.

Budoucnost EV je velká. Ukazuje se, že mohou sloužit jako diagnostické markery, které jsou přítomné ve většině biologických tekutin a nezatěžují pacienta. Možnost objevení nových léčebných uplatněních je taky dost vysoká vzhledem k rychlému rozvoji izolačních metod. Další možností v budoucnosti je využití exozomů získaných z rostlinných nebo živočišných zdrojů. Protože jsou to xenogenní látky, lze je podat pacientovi jen v orální podobě.

POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*. 2016;30(6):836-848. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.009
- 2) Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301-312. doi:10.1007/s10571-016-0366-z
- 3) Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7):727. doi:10.3390/cells8070727
- 4) Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respir Res*. 2019;20(1):240. doi:10.1186/s12931-019-1210-z
- 5) Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51. doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.010
- 6) Bian X, Xiao YT, Wu T, et al. Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression. *Mol Cancer*. 2019;18(1):50. doi:10.1186/s12943-019-0973-7
- 7) Richards DM, Hettinger J, Feuerer M. Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron*. 2013;6(2):179-191. doi:10.1007/s12307-012-0123-x
- 8) Wang T, Nasser MI, Shen J, Qu S, He Q, Zhao M. Functions of Exosomes in the Triangular Relationship between the Tumor, Inflammation, and Immunity in the Tumor Microenvironment. *J Immunol Res*. 2019;2019:4197829. doi:10.1155/2019/4197829
- 9) Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2019;18(1):75. doi:10.1186/s12943-019-0991-5
- 10) McGough IJ, Vincent JP. Exosomes in developmental signalling. *Development*. 2016;143(14):2482-2493. doi:10.1242/dev.126516

- 11) Yeates EF, Tesco G. The Endosome-associated Deubiquitinating Enzyme USP8 Regulates BACE1 Enzyme Ubiquitination and Degradation. *J Biol Chem*. 2016;291(30):15753-15766. doi:10.1074/jbc.M116.718023
- 12) Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(4):452-457. doi:10.1016/j.ceb.2011.04.008
- 13) van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*. 2011;21(4):708-721. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.019
- 14) Kennedy MJ, Ehlers MD. Mechanisms and function of dendritic exocytosis. *Neuron*. 2011;69(5):856-875. doi:10.1016/j.neuron.2011.02.032
- 15) Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Qasim M, Kim JH. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells*. 2019;8(4):307. doi:10.3390/cells8040307
- 16) Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med*. 2013;7(5):769-778. doi:10.2217/bmm.13.63
- 17) Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci*. 2018;109(8):2364-2374. doi:10.1111/cas.13697
- 18) Hurwitz SN, Cheerathodi MR, Nkosi D, York SB, Meckes DG Jr. Tetraspanin CD63 Bridges Autophagic and Endosomal Processes To Regulate Exosomal Secretion and Intracellular Signaling of Epstein-Barr Virus LMP1. *J Virol*. 2018;92(5):e01969-17. doi:10.1128/JVI.01969-17
- 19) Brosseau C, Colas L, Magnan A, Brouard S. CD9 Tetraspanin: A New Pathway for the Regulation of Inflammation?. *Front Immunol*. 2018;9:2316. doi:10.3389/fimmu.2018.02316
- 20) Küppers R. CD81 as target for B cell lymphomas. *J Exp Med*. 2019;216(7):1469-1470. doi:10.1084/jem.20190733
- 21) Zhu J, Liang C, Hua Y, et al. The metastasis suppressor CD82/KAI1 regulates cell migration and invasion via inhibiting TGF- β 1/Smad signaling in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(31):51559-51568. doi:10.18632/oncotarget.18086

- 22) Shrestha L, Bolaender A, Patel HJ, Taldone T. Heat Shock Protein (HSP) Drug Discovery and Development: Targeting Heat Shock Proteins in Disease. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(25):2753-2764. doi:10.2174/1568026616666160413141911
- 23) Salim S, Nasir J, Chen PE. Overexpression of the dopamine receptor-interacting protein Alix/AIP1 modulates NMDA receptor-triggered cell death. *FEBS Lett.* 2019;593(12):1381-1391. doi:10.1002/1873-3468.13434
- 24) Angelopoulou E, Paudel YN, Shaikh MF, Piperi C. Flotillin: A Promising Biomarker for Alzheimer's Disease. *J Pers Med.* 2020;10(2):E20. doi:10.3390/jpm10020020
- 25) Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of Exosome-Based Therapeutics and Challenges in Production of Exosomes Eligible for Therapeutic Application. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(6):835-842. doi:10.1248/bpb.b18-00133
- 26) Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(3-4):623-642. doi:10.1007/s10555-013-9441-9
- 27) Ye SB, Li ZL, Luo DH, et al. Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(14):5439-5452. doi:10.18632/oncotarget.2118
- 28) Kogure T, Lin WL, Yan IK, Braconi C, Patel T. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology.* 2011;54(4):1237-1248. doi:10.1002/hep.24504
- 29) Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Croce CM. A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors [published correction appears in RNA Biol. 2019 Jul;16(7):988-989]. *RNA Biol.* 2013;10(2):169-174. doi:10.4161/rna.23144
- 30) Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(31):E2110-E2116. doi:10.1073/pnas.1209414109
- 31) Zhou W, Fong MY, Min Y, et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014;25(4):501-515. doi:10.1016/j.ccr.2014.03.007

- 32) Liao J, Liu R, Shi YJ, Yin LH, Pu YP. Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer. *Int J Oncol.* 2016;48(6):2567-2579. doi:10.3892/ijo.2016.3453
- 33) Fong MY, Zhou W, Liu L, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):183-194. doi:10.1038/ncb3094
- 34) Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(11):3792-3801. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4455
- 35) Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* 2015;523(7559):177-182. doi:10.1038/nature14581
- 36) Zijlstra C, Stoorvogel W. Prostatosomes as a source of diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1144-1151. doi:10.1172/JCI81128
- 37) Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics.* 2017;7(3):789-804. doi:10.7150/thno.18133
- 38) Zarovni N, Corrado A, Guazzi P, et al. Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods.* 2015;87:46-58. doi:10.1016/j.ymeth.2015.05.028
- 39) Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol [published correction appears in *Sci Rep.* 2016;6:21447. Livshits, Mikhail A [corrected to Livshits, Mikhail A]]. *Sci Rep.* 2015;5:17319. doi:10.1038/srep17319
- 40) Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience.* 2015;65(8):783-797. doi:10.1093/biosci/biv084
- 41) Yang, Dongbin, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation-efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 2020, 10.8: 3684.
- 42) Heinemann ML, Ilmer M, Silva LP, et al. Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *J Chromatogr A.* 2014;1371:125-135. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.026

- 43) Hyun KA, Gwak H, Lee J, Kwak B, Jung HI. Salivary Exosome and Cell-Free DNA for Cancer Detection. *Micromachines (Basel)*. 2018;9(7):340. doi:10.3390/mi9070340
- 44) Kalishwaralal, K., Kwon, W.Y. and Park, K.S. (2019), Exosomes for Non-Invasive Cancer Monitoring. *Biotechnol. J.*, 14: 1800430. doi:[10.1002/biot.201800430](https://doi.org/10.1002/biot.201800430)
- 45) Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth*. 2014;112(2):213-216. doi:10.1093/bja/aet293
- 46) Jeong S, Park MJ, Song W, Kim HS. Current immunoassay methods and their applications to clinically used biomarkers of breast cancer. *Clin Biochem*. 2020;78:43-57. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.01.009
- 47) Niu F, Chen X, Niu X, et al. Integrated Immunomagnetic Bead-Based Microfluidic Chip for Exosomes Isolation. *Micromachines (Basel)*. 2020;11(5):503. doi:10.3390/mi11050503
- 48) Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017;14(11):1037-1053. doi:10.1080/14789450.2017.1388167
- 49) Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012;(59):e3037. doi:10.3791/3037
- 50) Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, Yuen PS. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1587-1590. doi:10.1002/jcp.25387
- 51) Batrakova, Elena & Kim, Myung Soo. (2015). Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 219. 10.1016/j.jconrel.2015.07.030.
- 52) Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate*. 2016;76(1):68-79. doi:10.1002/pros.23101
- 53) Ko J, Carpenter E, Issadore D. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. *Analyst*. 2016;141(2):450-460. doi:10.1039/c5an01610j

- 54) Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagrath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip*. 2014;14(11):1891-1900. doi:10.1039/c4lc00136b
- 55) van der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost*. 2010;8(12):2596-2607. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x

Obrázky

- 1) Carnino JM, Lee H, Jin Y. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. *Respir Res*. 2019;20(1):240. doi:10.1186/s12931-019-1210-z
- 2) Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019;8(7):727. doi:10.3390/cells8070727
- 3) Frei, M. Centrifugation Separations. Retrieved December, 2019, from <https://sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/centrifugation-separations.html#ref>
- 4) Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S. Immunoassay Methods. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., eds. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
- 5) Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27(1):4-25. doi:10.1111/sms.127020
- 6) Shao H, et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical reviews*, 2018, 118.4: 1917-1950.
- 7) Niu F, Chen X, Niu X, et al. Integrated Immunomagnetic Bead-Based Microfluidic Chip for Exosomes Isolation. *Micromachines (Basel)*. 2020;11(5):503. doi:10.3390/mi11050503
- 8) Muller L, et al. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Scientific reports*, 2016, 6.1: 1-13.