

УДК 576.54

ПРИНЦИПЫ И ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

© 2022 г. Е. И. Якубович^а*, А. Г. Полищук^а, В. И. Евтушенко^а

^аРоссийский научный центр радиологии и хирургических технологий
им. академика А. М. Гранова Минздрава России, Санкт-Петербург, 197758 Россия

*e-mail: jakubovichelena@mail.ru

Поступила в редакцию 14.01.2022 г.

После доработки 20.01.2022 г.

Принята к публикации 21.01.2022 г.

Экзосомы, подкласс малых мембранных внеклеточных везикул, имеют большой диагностический и терапевтический потенциал, однако отсутствие стандартизированных методов их эффективного выделения и анализа ограничивает внедрение экзосомальных технологий в клиническую практику. В представленном обзоре рассматриваются проблемы, связанные с выделением экзосом из биологических жидкостей, и принципы традиционных и альтернативных методов выделения. Цель представленного обзора — проиллюстрировать разнообразие подходов, основанных на физических и биохимических свойствах экзосом, которые могут быть использованы для выделения экзосом. Обсуждаются достоинства и недостатки разных методов.

Ключевые слова: микровезикулы, экзосомы, биосепарация, методы выделения

DOI: 10.31857/S0233475522030100

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня экзосомы стали одним из популярных объектов научных исследований, что связано с их уникальными природными свойствами, которые могут быть использованы в клинических целях. Экзосомы — специфический подкласс внеклеточных везикул (ВВ) размером 50–100 нм, естественным образом секретируемых большинством эукариотических клеток. Эндосомальный биогенез отличает их от других типов ВВ (апоптотических телец и микровезикул) [1]. Они формируются в эндосомах путем инвагинации эндосомальной мембраны, после чего выбрасываются во внеклеточное пространство в результате слияния образованных мультивезикулярных телец с плазматической мембраной клетки [1].

Эти нановезикулы окружены билипидной мембраной, на поверхности которой присутствуют тетраспанины CD9, CD63, CD81 и CD83, которые сегодня традиционно используются в качестве экзосомальных маркеров [2]. Их внутреннее содержимое включает различные клеточно-специфичные белки, липиды, метаболиты и нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК), спектр которых отчасти может отражать фенотип клетки-продуцента. Экзосомы участвуют в межклеточной коммуникации, транспортируя свое содержимое к клеткам-реципиентам и инициируя в них различные

эффекты. Клетки-реципиенты могут находиться как рядом, так и на значительном удалении от места секреции [3]. Доставка содержимого от клеток-продуцентов экзосом к клеткам-реципиентам происходит адресно и без потерь [4]. Показано, что экзосомы вовлечены в широкий спектр физиологических и патологических процессов: эмбриональное развитие, иммунные реакции, регенерацию тканей, регуляцию сосудистого гомеостаза, развитие различных заболеваний, в том числе онкологических [5–8]. Поскольку экзосомы обнаруживаются во многих биологических жидкостях организма, то количественный и качественный анализ циркулирующих экзосом может быть перспективным инструментом малоинвазивной диагностики заболеваний, мониторинга эффективности лечения и доклинического выявления рецидивов. В настоящее время активно исследуются диагностические возможности протеомного анализа и профилирования микроРНК экзосом, выделенных из плазмы, мочи, слюны и других жидкостей пациентов с разными заболеваниями [9–12]. Другим направлением исследований клинического потенциала экзосом является терапевтическое. Такие природные свойства экзосом, как малый размер, стабильность в кровеносном русле, низкая иммуногенность, способность селективно транспортировать на большие расстояния свое содержимое в клетки-реципиен-

ты, а также возможность модификации их поверхности и содержимого, определяют перспективность использования этих нановезикул для адресной доставки лекарственных препаратов [13–15], создания вакцин [16, 17], развития новых технологий в регенеративной медицине [9, 18].

Ключевой предпосылкой для внедрения экзосомальных технологий в клиническую практику является разработка эффективных и стандартизированных методов выделения, позволяющих получать чистые и однородные препараты экзосом в достаточном количестве. Однако до сих пор таких методов нет. Все наиболее широко используемые сегодня подходы основаны на известных физических (размер, форма, плотность, заряд) или химических (состав поверхности мембраны) свойствах везикул. За последние годы выполнено огромное число исследований, задачей которых был сравнительный анализ разных методов и их комбинаций для выделения экзосом из разных биологических жидкостей [19–23]. Эти работы показали, что препараты экзосом, выделенные из одного и того же биоматериала разными методами, могут значительно различаться как по выходу и чистоте, так и по физическим характеристикам нановезикул (морфологии, размеру) и их биохимическому составу (уровню поверхностных маркеров, спектру микроРНК и белков). С другой стороны, тип биологической жидкости также влияет на конечный результат. Например, Langevin и соавторы сравнили нановезикулы, выделенные методом ультрацентрифугирования, из слюны, сыворотки и мочи здоровых доноров, и показали, что они отличаются по профилю некодирующих РНК [21]. До сих пор нет ясности, какой протокол выделения может быть оптимальным в каждом конкретном случае, в зависимости от типа биологической жидкости и конечной цели исследования. Учитывая актуальность проблемы, работы по разработке новых технологий и протоколов выделения экзосом из разных биологических жидкостей продолжаются.

В представленном обзоре рассмотрены различные методы выделения экзосом из биологических жидкостей как традиционные (ультрацентрифугирование, фильтрация, гель-хроматография, преципитация полимерами, иммуноаффинная сепарация), так и относительно новые: разделение в двухфазной системе, анион-обменное разделение, олиго-фосфатная агрегация (SubX-Matrix technology), преципитация альгиновыми кислотами, метод твердофазного связывания с карбидом кремния. Описаны принципы этих методов, их преимущества и недостатки.

ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ЭКЗОСОМ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Высокая комплексность биологических жидкостей и отсутствие уникальных маркеров экзосом с высоким уровнем экспрессии, позволяющих дифференцировать их от других подтипов ВВ, значительно усложняют задачу получения чистой фракции экзосом без существенных потерь. В любой биологической жидкости, помимо экзосом, циркулируют и другие близкие по размеру, массе и плотности к экзосомам компоненты: белки, липопротеины различной плотности, нуклеопротеиновые комплексы, мембранные везикулы других типов и др. Эти биологически активные частицы, так же как и экзосомы, могут содержать микроРНК или сигнальные белки и липиды. При этом сам пул экзосом также довольно гетерогенный [24]. Он состоит из субпопуляций нановезикул, которые отличаются по размеру, морфологии, поверхностным маркерам, биохимическому содержанию. Контаминация препаратов экзосом неэкзосомальными компонентами биологической жидкости может приводить к искажениям в количественных оценках содержимого экзосом [25]. С другой стороны, в процессе выделения часть экзосом может разрушаться или теряться, например, из-за агрегации нановезикул или низкого уровня экспрессии мембранных маркеров, что также будет искажать результаты.

Спектр контаминирующих компонентов может меняться в зависимости от источника экзосом. Так, например, основным загрязняющим компонентом при выделении из крови могут быть липопротеины и альбумин, которые присутствуют в крови в значительном количестве. Концентрация липопротеинов в сыворотке значительно превосходит концентрацию циркулирующих внеклеточных везикул (10^{12} против 10^7 – 10^9 частиц/мл) [26]. При этом сепарировать экзосомы от липопротеинов чрезвычайно сложно из-за близости их размеров и плотностей. Основной проблемой при выделении из мочи является уромодулин (белок Tamm-Horsfall), концентрация которого может достигать 1.5 мг/мл. Полимерная сеть, формируемая этим белком, может связывать экзосомы, снижая эффективность выделения [27].

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ

Ультрацентрифугирование

Чаще всего в экспериментальных исследованиях экзосомы выделяют методом ультрацентрифугирования — разделения веществ под действием центробежной силы. Метод основан на разной скорости оседания частиц, отличающихся по размеру и плотности. Выделяют три варианта метода, основанных на центрифугировании: дифферен-

циальное центрифугирование, зонально-скоростное градиентное центрифугирование и изопикническое градиентное центрифугирование.

Дифференциальное ультрацентрифугирование (или центрифугирование с дифференциальной скоростью) — самый оптимальный метод выделения экзосом, и в настоящее время он считается “золотым стандартом”, относительно которого оценивают эффективность других методов выделения. Эта техника включает обычно несколько последовательных раундов центрифугирования с увеличивающимися центробежной силой и временем центрифугирования, что позволяет разделить осадать частицы, отличающиеся по размеру и плотности. После каждого раунда отбирается супернатант, который подвергается дальнейшему центрифугированию. Хотя используемые в настоящее время протоколы выделения экзосом могут отличаться, большинство из них включает четыре этапа центрифугирования: на первых двух этапах (10 мин при 300 g и далее 10 мин при 2000 g) осаждаются клетки, клеточный “деbris” и крупные везикулы. На третьем этапе (30 мин при 10000 g) экзосомы отделяются от везикул неэкзосомального происхождения, размер которых обычно превышает 100–150 нм. Экзосомы осаждаются на последнем этапе путем центрифугирования при ускорении 100000–150000 g в течение 1–6 ч. В качестве преимуществ этого метода можно назвать возможность выделения экзосом из большого количества биоматериала, относительно невысокую стоимость и отсутствие дополнительных химических реагентов для проведения процедуры, которые могли бы загрязнить препарат экзосом. С другой стороны, для экстракции экзосом из небольших количеств биоматериала этот метод не пригоден. Недостатком метода является трудоемкость, необходимость специального оборудования, зависимость эффективности разделения от типа ротора (угловой или бакет-ротор) и его специфических параметров (максимальный и минимальный радиус ротора, длина седиментационного пути), температуры и вязкости исходной жидкости, что требует индивидуальной корректировки стандартных протоколов центрифугирования в зависимости от используемого ротора и свойств разделяемой биожидкости [28]. Значительным недостатком является также присутствие в осадке экзосом примесей неэкзосомального происхождения. Метод дифференциального центрифугирования позволяет эффективно разделять только фракции частиц, которые значительно отличаются по скорости седиментации. Высокая гетерогенность состава биологической жидкости (включая и пул экзосом), содержащей компоненты с близкой плотностью и размером, приводит к тому, что часть экзосом седиментирует на более ранних этапах центрифугирования вместе с более крупными ча-

стицами, в то время как другая не осаждается даже после центрифугирования при больших g, в результате чего часть экзосом теряется. С другой стороны, вместе с экзосомальной фракцией соосажаются неэкзосомальные компоненты, присутствующие в биологической жидкости, такие как липопroteины, агрегаты белков, нановезикулы других типов. Согласно исследованиям Kowal J. с соавторами, 70% фракции экзосом, выделенной этим методом, составляют частицы размером 50–150 нм, 20% — частицы размером более 150 нм и 10% — менее 50 нм [29]. Комбинация ультрацентрифугирования с дополнительными ступенями очистки (отмывка осадка большими объемами буфера с последующим ре-центрифугированием, ультрафильтрация суспензии экзосом) позволяют дополнительно очистить фракцию экзосом, но ценой потери их количества. К недостаткам метода относится и возможность деформации экзосом во время центрифугирования, что может изменить их морфологию и функциональные свойства.

Более “чистые” экзосомы могут быть выделены методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности. Это модифицированная версия дифференциального центрифугирования. В отличие от дифференциального центрифугирования, центрифугирование в градиенте плотности позволяет разделить близкие по размеру или плотности частицы многокомпонентной пробы. Выделяют два типа ультрацентрифугирования в градиенте плотности: зонально-скоростное и изопикническое ультрацентрифугирование.

При зонально-скоростном центрифугировании частицы разделяются по скорости их седиментации, которая зависит от размера частицы. В отличие от дифференциального центрифугирования, этот метод разделяет частицы разного размера одновременно при одном центрифугировании. Пробу тонким слоем наносят поверх буферного раствора с преформированным градиентом концентрации, постепенно уменьшающейся по направлению от дна пробирки к мениску, и центрифугируют. Под действием центробежной силы частицы перемещаются по раствору, так как их плотность больше плотности раствора, при этом скорость перемещения по градиенту зависит от размера частицы. В результате частицы близкого размера формируют в пробирке дискретные зоны. Градиент плотности повышает эффективность разделения, препятствуя преждевременному осаждению частиц, а также смешиванию зон в результате конвекции жидкости. Центрифугирование ведут до достижения оптимального распределения зон в пробирке, после чего фракции собирают. Поскольку максимальная плотность градиентного буфера меньше плотности частиц в пробе, то при очень длительном центрифугировании все компоненты, включая экзосомы, могут

осесть на дне пробирки, поэтому требуется оптимизация длительности центрифугирования.

Изопикническое градиентное центрифугирование используется для разделения частиц, различающихся по плавучей плотности, и основано на том, что частицы в средах со схожей плавучей плотностью остаются неподвижными. В данном варианте образец наносят на поверхность градиента концентрации буфера, перекрывающего диапазон плотностей всех компонентов пробы. В процессе центрифугирования частицы движутся через градиент буфера, пока не достигнут положения, в котором их плавучая плотность совпадает с плотностью буфера. Частицы остаются в этом конечном положении даже после остановки ротора. Поскольку максимальная плотность градиента выше плотности пробы, то частицы не достигают дна даже при длительном центрифугировании.

Экзосомы чаще всего выделяют в сахарозном градиенте (2.0–0.25 М). Проба наслаивается на градиент и центрифугируется при 210000 g 16 ч. В процессе центрифугирования все компоненты, включая экзосомы, апоптотические тельца, белковые агрегаты, движутся в градиенте, пока не достигнут зоны с плотностью, соответствующей их плавучей плотности. Экзосомы концентрируются в зоне, соответствующей их плавучей плотности (1.10–1.18 г/мл), а белковые агрегаты и нуклеопротеиновые комплексы, плавучая плотность которых больше, собираются ближе ко дну пробирки [30]. Сахарозный градиент позволяет увеличить концентрацию выделяемых экзосом более, чем в 3 раза по сравнению с обычным центрифугированием [31]. Для очистки экзосом от везикул и комплексов с близкой плавучей плотностью предложена методика с использованием “подушки” сахарозы, сформированной из двух слоев сахарозы разной концентрации: 1 и 2 М [32]. В процессе центрифугирования частицы распределяются по слоям в зависимости от их размера: большие везикулы и агрегаты концентрируются в 2 М слое сахарозы, экзосомы – в 1 М, а легкие молекулы остаются в верхних слоях. По данным ряда исследований, использование 5–40% градиента концентрации йодиксанола вместо сахарозы позволяет повысить чистоту выделяемых экзосом [33]. По сравнению с сахарозой йодиксанол (коммерческое название Opti-Prep) более стабилен и менее вязок [34]. Кроме того, градиент йодиксанола изотоничен при всех используемых концентрациях, поэтому везикулы при движении в градиенте плотности сохраняют форму и размер, что значительно увеличивает эффективность разделения [35]. Показано, что центрифугирование в градиенте плотности йодиксанола эффективно сепарирует экзосомы от вирусных частиц и апоптотических телец [36]. Этот метод позволяет эффективно отделить экзосомы

от близких к ним по размеру липопротеинов, таких как хиломикроны, липопротеины очень низкой, промежуточной и низкой плотности, поскольку их плавучая плотность намного ниже (<1.063 г/мл). Липопротеины высокой плотности намного меньше по размеру, чем экзосомы, но имеют плавучую плотность, близкую к экзосомам (1.06–1.21 г/мл), поэтому для очистки экзосом от этих молекул нужно использовать методы, разделяющие по размеру [19]. Таким образом, центрифугирование в градиенте плотности позволяет получить более чистые препараты экзосом, однако этот метод также довольно низкопродуктивный и времязатратный, что ограничивает его использование в исследованиях.

Ультрафильтрация

Метод ультрафильтрации также основан на разделении частиц по размеру. В основе метода лежит процедура фильтрации жидкости через фильтр с порами определенного размера. Протоколы выделения экзосом включают несколько последовательных этапов фильтрации через фильтры с порами диаметром 0.8, 0.45, 0.22, иногда и 0.1 мкм, в результате чего из фильтруемой жидкости постепенно удаляются частицы, размер которых больше размера пор. Чаще всего используются коммерческие фильтры из гидрофильных полимеров с низкой аффинностью к белкам, такие как VVLP-фильтр фирмы Millipore из поливинилиденфторида с размером пор 0.1 мкм [37]. По данным ряда работ, сравнивающих разные методы выделения экзосом по таким параметрам, как морфология частиц, их число, загрязнение неэкзосомальными белками, представленность экзосомальных маркеров, методом ультрафильтрации возможно получить экзосомы, сравнимые с экзосомами, выделенными ультрацентрифугированием [38–40]. Преимуществом метода ультрафильтрации является простота процедуры, не требующая специального оборудования и квалификации, скорость очистки, что позволяет за короткий срок выполнить очистку большого количества образцов, и отсутствие дополнительных реагентов, примеси которых могли бы контаминировать экзосомы. К недостаткам методики следует отнести возможность деформации экзосом и загрязнение компонентами жидкости, размер которых меньше размера пор фильтра. Кроме того, часть экзосомальных везикул может абсорбироваться на мембране, в результате чего часть экзосом теряется, что существенно при выделении из малых объемов жидкостей [41]. Засорение пор фильтра белками и другими биополимерными молекулами в процессе фильтрации, вызванное постепенным концентрированием контаминирующих молекул, может снижать скорость очистки и также приводить к потере части экзосом. Тех-

нология ультрафильтрации используется в коммерческих наборах для выделения экзосом ExoMirTMKit (Bioo Scientific).

Метод гель-фильтрации

Метод гель-фильтрации, или эксклюзионной хроматографии, разделяет частицы или молекулы по гидродинамическому радиусу за счет их разной способности проникать в поры геля неподвижной фазы. Этот метод был эффективно адаптирован для выделения экзосом из разных типов жидкостей [42]. Метод позволяет отделить маленькие везикулы от больших, а также от несвязанных с экзосомами растворимых белков и липопротеинов высокой плотности, поскольку они меньше, чем экзосомы. Наиболее часто в качестве неподвижной фазы используют шитую агарозу (Sephacrose (CL-2B и CL-4B) и Sephacryl S-400). По сравнению с другими методами, экзосомы, выделенные гель-фильтрацией, менее всего контаминированы белками плазмы [43]. При этом, как показано в ряде работ, степень очистки экзосом от белковых примесей зависит от используемого полимера и длины колонки [44, 45]. Следует отметить, что разделить везикулы близкого размера, но разного типа, а также отделить экзосомы от других биомолекул близкого размера, методом гель-фильтрации практически невозможно. Поэтому экзосомальная фракция часто загрязнена мелкими не экзосомальными везикулами, крупными белковыми агрегатами и липопротеинами, такими как хиломикроны, липопротеины низкой и очень низкой плотности [19]. Недостатком метода является и низкий выход целевого продукта, который к тому же разбавлен. Тем не менее, несмотря на ряд недостатков, связанных с контаминацией и потерями, метод гель-фильтрации имеет значительные преимущества перед другими методами, особенно в контексте их терапевтического и диагностического использования, и рассматривается некоторыми авторами как наиболее оптимальный метод выделения [42]. Поскольку в процессе разделения частицы движутся в потоке жидкости (чаще всего это фосфатный буфер с pH 7.4) только под действием силы тяжести, то экзосомы сохраняют целостность и функциональную активность [46]. В процессе разделения не используются никакие дополнительные химические реагенты, поэтому дополнительная очистка, как, например, при ПЭГ-преципитации, не требуется.

Сегодня на рынке представлено несколько наборов, использующих технологию гель-фильтрации для выделения экзосом, например, Smart-SECTM Single for EV Isolation (System Biosciences), qEV (Izon Science), PURE-EVs (Hansa Biomed). С целью увеличить выход продукта и его чистоту, компания Cell Guidance Systems разработала ком-

бинированный набор Exo-spinTM, сочетающий ПЭГ-преципитацию с последующей очисткой методом гель-фильтрации.

Методы преципитации

Метод преципитации основан на агрегации экзосом в присутствии преципитирующих агентов. Процедура сводится к смешиванию образца с преципитирующим агентом, инкубации и осаждению образовавшихся агрегатов везикул низкоскоростным центрифугированием (1500 g), после чего осадок растворяется в буфере в объеме, меньше исходного, и используется для дальнейшего анализа.

ПЭГ-преципитация. Наиболее популярным преципитирующим агентом является сильногидрофильный полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ). Он давно используется для осаждения вирусных частиц, нуклеиновых кислот и других биомолекул. Экспериментально установленный феномен преципитации в присутствии ПЭГ пока мало изучен. Наиболее популярными теоретическими моделями, описывающими этот процесс, являются теория исключенного объема и теория эффективной силы притяжения, обусловленной исключенным объемом [47]. Согласно модели исключенного объема, преципитация молекул происходит в результате уменьшения их гидратации в присутствии полимера [48]. Вторая модель объясняет преципитацию эффектом притяжения молекул, вызванного осмотическим давлением раствора полиэтиленгликоля [49]. Преимуществами этого метода являются простота и скорость, что позволяет одновременно анализировать несколько проб, а также минимальные потери в процессе выделения. В настоящее время по частоте использования ПЭГ-преципитация уступает только ультрацентрифугированию. Обычно для выделения экзосом используется 8–12% ПЭГ 6 кДа и 8–10% ПЭГ 8 кДа [50, 51]. Среди достоинств можно выделить также то, что в отличие от ультрацентрифугирования и ультрафильтрации, во время которых везикулы могут деформироваться, метод преципитации позволяет получить морфологически и функционально качественные экзосомы. Главным недостатком метода является низкая “чистота” экзосомального препарата. Этот метод только концентрирует экзосомальную фракцию, но не разделяет от других компонентов пробы. Поскольку ПЭГ не специфично осаждает экзосомы, то осадок экзосом содержит свободные белки, такие как липопротеины, иммуноглобулины, а также вирусные и другие частицы [52]. Примеси полиэтиленгликоля в целевом продукте, а также плохая растворимость осажденных агрегатов также ограничивают дальнейший анализ и использование выделенных экзосом.

Технология преципитации с использованием ПЭГ лежит в основе ряда коммерческих наборов для выделения экзосом: Total Exosome Isolation Kit (Invitrogen), ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution (System Biosciences), miRCURY Exosome Kits (QIAGEN), Exo-Prep (HansaBioMed), PureExo Exosome Isolation kit (101Bio), ExoGAG (Nasasbiotech), Exosome Precipitation Solutions (Immunostep), miRCURY Exosome Isolation Kit (Exiqon). Существенным недостатком коммерческих наборов является их высокая стоимость, значительный уровень контаминации экзосом неэкзосомальными компонентами, ограничения по масштабируемости. Между тем, в ряде работ показано, что оптимизация стандартного протокола ПЭГ-преципитации (например, использование ПЭГ разной молекулярной массы и концентрации, дополнения протокола дополнительными отмывками и инкубациями) позволяет выделить экзосомы даже более эффективно, чем с использованием коммерческих наборов, при этом гораздо дешевле [51–54]. Кроме того, метод может быть успешно использован для выделения из больших объемов биожидкости [50].

Вариант оптимизации метода ПЭГ-преципитации, позволяющий получить более “чистые” препараты экзосом, описан в работе [55]. Авторы предложили перед добавлением ПЭГ обогатить пробу мембранными везикулами. Для этого в предварительно очищенный от клеточных остатков центрифугированием супернатант добавляется мембранотропный/бифункциональный агент Dextran Blue (2000 кДа), который инициирует агрегацию преимущественно мембранных частиц, оставляя немембранные органоиды, большие биополимеры и супрамолекулярные комплексы в растворе. Далее добавляется ПЭГ (20 кДа) и экзосомы осаждаются низкоскоростным центрифугированием. Поскольку используемые концентрации Dextran Blue и ПЭГ достаточно маленькие, то полученные препараты экзосом не содержат преципитирующих полимеров, которые бы мешали дальнейшему анализу.

MGP-преципитация (Mannuronate-Guluronate Polymer-precipitation). Альтернативная технология, также основанная на полимерном осаждении экзосом, описана в работе [56]. В отличие от методов преципитации с образованием агрегатов, в основе этого метода лежит “захват” экзосом порами альгинатного гидрогеля, сформированного из гомополимерных и гетерополимерных остатков маннурановой и гулурановой кислот в присутствии ионов кальция [57]. Этот метод включает три основных этапа: смешивание полимера с образцом, кратковременная инкубация смеси при комнатной температуре и осаждение экзосом низкоскоростным центрифугированием. В сравнении с ПЭГ-преципитацией, экзосомы, выделенные MGP-методом, менее загрязнены белка-

ми плазмы, но сильнее контаминированы везикулами большого размера.

Заряд-зависимая преципитация

Все внеклеточные везикулы в физиологических условиях отрицательно заряжены. На основе этого свойства везикул были разработаны так называемые “charge-base” (заряд-зависимые) методы преципитации. Экспериментально было показано, что агрегация экзосом может быть стимулирована добавлением положительно заряженных молекул протамина [58]. Аналогичный эффект может вызвать и ацетат натрия [59]. Авторы полагают, что ацетат натрия нарушает гидратную оболочку экзосом и нейтрализует их отрицательный заряд, что приводит к агрегации везикул за счет усиления гидрофобного взаимодействия.

Аффинное взаимодействие

Эта группа методов основана на способности различных биомолекул, присутствующих на поверхности везикул (липидов, полисахаридов, протеинов), к аффинному взаимодействию с другими молекулами, включая антитела, лектины и липид-связывающие протеины.

Связывание мембранных белков. На поверхности экзосомальных мембран экспонированы различные белки, включая тетраспанины CD9, CD63, CD81, CD82, белки теплового шока Hsp70 и Hsp90, антигены главного комплекса гистосовместимости (HLA-антигены) и др. Антитела к этим белкам используются как для анализа экзосомальной фракции, так и для иммунопреципитации экзосом. Для иммунопреципитации обычно используют антитела, конъюгированные с твердофазным носителем (латекс, силикон), который может быть в виде магнитных частиц, покрытых полимером (Dynabeads Magnetic Beads, Thermo Fisher Scientific), колонки для центрифугирования (ExoTrap Exosome Isolation Spin Column, CosmoBio), модифицированных наконечников для пипеток (MSIATMD.A.R.T.'S, Thermo Fisher Scientific) и др. Взаимодействие между антителом, иммобилизованным на поверхности матрикса, и мембраной экзосом относительно сильное, что позволяет отмыть связанные экзосомы от многочисленных компонентов биологической жидкости. Разнообразие используемых антител и носителей в разных форматах объясняет наличие большого количества используемых протоколов, основанных на аффинном взаимодействии. Например, в работе Clayton с соавторами экзосомы, секретируемые В-лимфоцитами, выделялись из кондиционной среды с помощью магнитной сепарации, используя магнитные частицы с конъюгированными HLA-антителами (DP, DQ и DR) [60]. Магнитные частицы инкуби-

ровали с кондиционной средой в течение 24 ч, после чего собирали их с помощью магнита и отмывали. Выделенные частицы характеризовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитометрии. 70% выделенных везикул имели средний размер около 70 нм, и 30% — больше 100 нм. Другая исследовательская группа перед магнитной сепарацией экзосом из различных клеточных линий сначала сконцентрировала везикулы из кондиционной среды с помощью гидрофильного полимера, используя набор Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen) [61]. После инкубации с реагентом в течение 12 ч и центрифугирования осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Экзосомы из обогащенного препарата были выделены с помощью магнитных частиц, конъюгированных с антителами к CD9, CD63 и CD81. Анализ методами трансмиссионной микроскопии, проточной цитометрии и Western-блота показал, что выделенный препарат содержал везикулы одинакового или близкого размера, с однообразной морфологией и не содержал примесей белков и белковых агрегатов.

В ряде работ предпринята попытка автоматизировать выделение экзосом на основе технологии аффинного связывания с целью ускорить процесс их анализа. Так, Ueda K. с соавторами предложили использовать для этих целей мультиканальную платформу с наконечниками MSIA D.A.R.T.'S, Protein G tips (Thermo Fisher Scientific) [62]. Эти наконечники изначально были разработаны для автоматического быстрого выделения антител с последующим их масс-спектрометрическим анализом. Наконечники содержат матрикс из пористого силикагеля, который ковалентно связан с рекомбинантным G-белком, утратившим, в отличие от нативного белка, способность к взаимодействию с альбумином. Такой матрикс при выделении из плазмы не связывает альбумин, что увеличивает эффективность обнаружения минорных фракций специфических белков. Для специфического “захвата” экзосом на силикагеле дополнительно были иммобилизованы антитела к CD9. Сыворотка в объеме 300 мкл вносилась в наконечник, после чего связанные везикулы отмывали и элюировали из матрикса. Время одновременного выделения везикул из 12 образцов занимает всего 30 мин.

Основным преимуществом метода аффинного связывания является чистота препарата, которая обеспечивается специфичностью антиген-антительного связывания. Эта же специфичность является одновременно и минусом метода, поскольку она способствует обогащению конечного продукта экзосомами с высоким уровнем определенного поверхностного маркера и потере экзосом с низким уровнем его экспрессии. Недостатком метода являются ограничения, связанные с

доступностью антител, а также сложности отделения экзосом от связавшихся антител.

Аптамеры. Альтернативой антителам при аффинном связывании могут быть аптамеры — короткие искусственные одноцепочечные олигонуклеотиды, которые способны высокоспецифично узнавать определенные молекулы-мишени за счет формирования уникальной трехмерной структуры. Преимуществами аптамеров перед антителами являются возможность отбора аптамеров практически для любой мишени и возможность их химической модификации, что позволяет получить аптамер с желательными свойствами. Аптамеры дешевле антител, имеют длительный срок хранения, сохраняют устойчивость в широком диапазоне условий.

Выделение экзосом на основе аффинного взаимодействия ДНК-аптамеров с поверхностным экзосомальным маркером CD63 описаны в работах [63–65]. Zhang с соавторами использовали CD63-аптамер, модифицированный биотином, который был иммобилизован на магнитных частицах, покрытых стрептавидином [63]. Полученный комплекс инкубировали с плазмой, после чего связавшиеся с магнитным комплексом экзосомы собирали с помощью магнита. Для освобождения экзосом из комплекса авторы добавляли комплементарную аптамеру нуклеотидную последовательность. В результате гибридизации этой последовательности с аптамером происходит нарушение конформационной структуры аптамера, что приводит к высвобождению экзосом. Аналогичный подход был использован в работе [64] для выделения экзосом из клеточных линий, за исключением того, что экзосомы от магнитного комплекса отделяли, изменяя концентрацию NaCl. Возможность выделения экзосом из мочи с помощью CD63-аптамера показана в работе [65]. Модифицированный тиоловыми группами аптамер был иммобилизован на титановой оболочке магнитных частиц ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TiO}_2\text{-DNA aptamer}$). Двойное специфическое связывание частиц с экзосомами достигалось как с помощью аптамера, так и с помощью диоксида титана TiO_2 , который, как было установлено, избирательно связывается с фосфатными группами на поверхности билипидной мембраны экзосом. После стандартной процедуры концентрирования на магнитных частицах под действием магнита экзосомы элюировали путем гидролиза аптамера ДНКазой и отмывкой в 10% NH_4OH (для нарушения связи диоксида титана с фосфатными группами). Авторы показали, что разработанный комплекс позволяет за 10 мин выделить из мочи 92.6% экзосом, которые сохраняют интактность, содержат маркеры экзосом мочи и по протеомному составу близки к экзосомам, выделенным ультрацентрифугированием.

Преципитация лектинами

Метод основан на специфическом и обратимом связывании лектинов (гликопротеинов, в основном растительного происхождения) с углеводными остатками (такими как, гликаны), присутствующими на поверхности клеток и мембранных везикул. Связывание лектинов с мембранами индуцирует агрегацию везикул. Образовавшиеся агрегаты могут быть легко осаждены низкоскоростным центрифугированием. Для освобождения отдельных экзосом из агрегатов к осадку добавляют избыток простых сахаров (глюкоза или манноза), которые конкурентно разрушают связь между полисахаридами экзосом и лектинами, после чего экзосомы отмывают от лектина. Поскольку лектины связываются не только с экзосомальными мембранными олигосахаридами, то перед добавлением лектина все клетки и крупные везикулы должны быть удалены, например, центрифугированием или фильтрацией. Следует отметить, что осаждение экзосом лектинами в исследованиях используется редко, а результаты представлены в единичных методологических работах.

Лектины разного происхождения были опробованы для осаждения экзосом из разных биологических жидкостей, в частности, выделенные из цианобактерий (OAA), картофеля (STL), пшеницы (WGA), бобовых (Con A) [66]. Так, например, в работе Royo F. с соавторами для выделения экзосом из мочи использовался лектин картофеля *Solanum tuberosum* (STL) (Vector Laboratories) [67]. Предварительно образцы мочи очищали от клеток и их фрагментов центрифугированием при 2000 g и фильтрованием через мембрану с диаметром пор 0.22 мкм. Затем pH очищенных образцов подводили до 7.5, после чего добавляли конъюгированный с биотином лектин STL. После инкубации в течение ночи образовавшиеся STL/экзосомные комплексы собирали, используя магнитные частицы, покрытые стрептавидином. Присутствие экзосом в препаратах, выделенных лектинами, было подтверждено с помощью криоэлектронной микроскопии и Western-блота, однако по количеству РНК эти препараты значительно уступали препаратам, выделенным набором Urine Exosome RNA Isolation Kit, Norgen Biotek (0.2 против 2.7 нг/мл мочи), а также ультрацентрифугированием и Total Exosome Isolation Reagent, Invitrogen (0.2 против 0.5 нг/мл мочи). В целом, метод преципитации лектинами прост, не требует специального оборудования и дорогих реактивов, но характеризуется низким выходом и низкой чистотой целевого продукта.

Преципитация SubX-Matrix

В этом методе также используются свойства везикулярной мембраны, а именно наличие на ее поверхности кластеров фосфолипидов. Оба конца молекулы коммерческого субстрата SubX (Capital Biosciences) способны связываться с фосфатным кластером. Это свойство позволяет каждой молекуле SubX связать через мембранные фосфатные остатки две соседние экзосомы, образуя везикулярный димер. Поскольку мембранные фосфолипиды содержат много фосфатных групп, то добавление в биологическую жидкость избытка SubX вызывает образование агрегатов микронного размера, состоящих из 10–15 экзосом, которые далее эффективно осаждаются низкоскоростным центрифугированием [68]. Специально подобранный буфер позволяет диссоциировать осажденные агрегаты обратно в мономерную форму и провести дальнейший анализ экзосом. Возможности этой технологии для выделения экзосом из плазмы были представлены в работе [69]. Сравнительный анализ экзосом, выделенных по SubX-протоколу и рядом традиционных методов, показал, что SubX позволяет получить относительно чистую фракцию экзосом, уступая лишь методу иммунопреципитации. Однако эффективность метода относительно невелика: выход экзосом более чем в 10 раз меньше, чем при ультрацентрифугировании. Вместе с тем, метод очень прост, легко может быть стандартизирован и масштабирован для выделения из больших объемов.

Разделение в двухфазной системе полиэтиленгликоль–декстран

Метод основан на селективном распределении биополимеров и их комплексов между двумя фазами, образуемыми в водном растворе несовместимыми полимерами, такими как, например, декстран и полиэтиленгликоль. Эмпирически было обнаружено, что в такой двухфазной полимерной системе возможно сконцентрировать везикулы преимущественно в фазе декстрана, а белки, биополимеры и супрамолекулярные комплексы — в фазе ПЭГ [70]. Для получения более чистых препаратов экзосом можно повторно экстрагировать белки из фазы декстрана путем замены ПЭГ-фазы. Способности такой двухфазной системы избирательно концентрировать экзосомы в фазе декстрана были продемонстрированы в работах Shin H. с соавторами [71, 72]. Следует заметить, что распределение биологических частиц или молекул в двухфазной системе зависит от многих факторов, таких как ионная сила, pH, тип используемых полимеров, их концентрация и молекулярный вес, поверхностные свойства частиц, поэтому, с одной стороны, заранее предсказать поведение системы очень сложно, с другой сторо-

ны, такая многофакторность делает систему исключительно гибкой, поскольку, манипулируя параметрами, можно получать системы с разными разделяющими свойствами. Возможность оптимизации системы для выделения экзосомальной фракции показана в работе [73].

Метод анионного обмена

Благодаря отрицательному поверхностному заряду в физиологических условиях экзосомы могут быть электростатически связаны с положительно заряженным сорбентом, а потом элюированы с него буфером высокой ионной силы. Доказательства возможности такого подхода получены в работе [74]. Экзосомы были выделены из кондиционной среды различных клеточных линий, используя колонку с монолитным полимерным материалом, функционализированным четвертичными аммонийными группами (сильный анионообменный сорбент). Авторы продемонстрировали, что по таким параметрам, как выход конечного продукта, его качество и чистота, метод не уступает ультрацентрифугированию, но гораздо быстрее и проще. А по сравнению с ультрафильтрацией, значительно эффективнее отделяет экзосомы от белков. Следует отметить, что этот подход пока опробован только на кондиционных средах клеточных культур. Для того чтобы оценить возможности техники анион-обменной хроматографии для выделения экзосом из более сложных жидкостей, таких как плазма, требуются дополнительные исследования.

Альтернативный вариант, также основанный на платформе анионного обмена, предложен в работе [75]. Экзосомы из плазмы были сорбированы на магнитных частицах, покрытых поликатионным полимером (ExoCAS-2). Весь процесс выделения занимает 40 мин и состоит из трех основных этапов. Профильтрованную через 0.8 мкм фильтр плазму смешивают с магнитными частицами и инкубируют при встряхивании 30 мин. Связанные с магнитными частицами экзосомы собирают с помощью магнита и отмывают их от белков плазмы, которые сорбировались вместе с экзосомами, буфером с pH 6 (экспериментально подобранная величина в интервале pI-значений белков). Экзосомы элюируют с частиц высокосольным раствором (1 M NaCl). Анализ выделенных экзосом (распределение по размерам, выход продукта, морфология частиц, уровень контаминации белками, состав микроРНК) показал, что ExoCAS-2-метод превосходит такие методы, как ультрацентрифугирование и коммерческие наборы ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution (System Biosciences) и exoEasy (QIAGEN).

Твердофазное связывание с карбидом кремния

Принципиально новый подход к выделению экзосом предложен компанией Norgen Biotek [76]. Он реализован в коммерческих наборах фирмы: Plasma/Serum Exosome Purification Kit, Urine Exosome Purification Kit, Cell Culture Media Exosome Purification Kits и Saliva Exosome Purification Kit. Метод основан на селективном связывании белков с отрицательно-заряженным карбидом кремния в зависимости от pH раствора и значения изоэлектрической точки белка. Значение изоэлектрической точки поверхностных экзосомальных белков отличается от изоэлектрических точек гистонов и других белков биологической жидкости, что позволяет путем оптимизации pH избирательно сорбировать, а затем элюировать экзосомы с сорбента. Процедура выделения очень простая, быстрая, масштабируемая и не требует специального оборудования. Она включает три этапа: смешивание с сорбентом (карбид кремния) в связывающем буфере, осаждение сорбента со связанными экзосомами низкоскоростным центрифугированием, элюирование экзосомальной фракции с сорбента (возможен также колоночный вариант выделения). Выделенные экзосомы могут быть далее использованы для выделения экзосомальной РНК и белков. Внеклеточные везикулы, выделенные с использованием SiC, имеют существенно сниженные уровни загрязняющих материалов, таких как макромолекулярные комплексы, рибосомы и белки, по сравнению с внеклеточными везикулами, выделенными с использованием ультрацентрифугирования или осаждающих агентов. Сравнительный анализ технологии Norgen Biotek с другими коммерческими наборами (ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution, System Biosciences и Total Exosome Isolation Reagent, Invitrogen), а также с ультрацентрифугированием, показал, что при выделении из мочи использование SiC значительно повышает выход маркерных экзосомальных белков и РНК, а также воспроизводимость результатов [67].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящее время для выделения и очистки экзосом используются различные стратегии, но до сих пор нет единого мнения о том, какой из этих методов лучше. Между тем, конечный результат, как показывают исследования, зависит от выбранного протокола выделения, поскольку у каждого метода есть свои ограничения, которые влияют на чистоту и выход экзосом. Выбор подходящего протокола должен зависеть от цели дальнейшего исследования. Например, для выявления биомаркера требуются методы, позволяющие выделять “чистые” экзосомы из небольшого объема, а в терапевтической ситуации первостепенное значение имеет функ-

циональная целостность везикул и их количество. Идеальный метод выделения экзосом для клинической диагностики имеет следующие характеристики: низкий уровень контаминации пробы, сохранение целостности везикул, высокий выход, воспроизводимость, универсальность (позволяет выделять из всех биологических жидкостей), низкая стоимость, высокая скорость выделения одновременно из большого числа проб (желательно не более одного часа), доступность и простота используемого оборудования, возможность автоматизации процесса [77]. Все используемые в настоящее время стандартные методы выделения в основном времязатратные и трудоемкие, имеют нестабильный выход целевого продукта, требуют специальной пробоподготовки. Но основная проблема связана с контаминацией экзосом различными неэкзосомальными компонентами биологической жидкости, особенно при выделении из такой комплексной жидкости, как кровь. Самым оптимальным вариантом решения проблемы на сегодня представляется использование комбинаций различных методов выделения, однако это значительно удлиняет время проведения анализа, что ограничивает использование такого подхода в клинических целях.

В последние годы ряд современных технологий фракционирования были адаптированы для выделения экзосом, например, FFF (Field flow fractionation) — метод фракционирования наночастиц в потоке под действием полей различной физической природы (электрического, магнитного, теплового, гидравлического, центробежного и др.). Так, Sitar с соавторами применили для сепарации экзосом один из вариантов FFF-фракционирования — метод фракционирования в асимметричном потоке (AF4, Asymmetric Flow Field Flow Fractionation), в основе которого лежит разделение частиц по их размерам [78]. Выделенные этим методом экзосомы сохраняют свою морфологию и функциональность, поскольку фракционирование происходит в мягких условиях (без стационарной фазы). Этот метод позволяет не только сепарировать экзосомы плазмы от различных макромолекул, таких как липопротеины, белки и везикулы других типов, но и разделить различные субпопуляции экзосом [24, 79]. Еще одним примером относительно новой техники выделения и очистки экзосом является метод электрофореза [80]. Эта технология основана на разделении молекул по заряду. Во время электрофореза везикулы и их субпопуляции могут быть фракционированы на основе их электрофоретической подвижности, т. е. с учетом не только размера, но и заряда. Наряду с разработкой методов, основанных на новых принципах разделения частиц, активно исследуются возможности различных микрофлюидных платформ, использующих один или комбинацию разных принципов сепарации, а также позволяющих одновременно выделять экзосомы и сразу их анализировать [81].

Перспективным направлением исследований в области экзосомальных технологий является поиск новых универсальных биомаркеров этих нановезикул, в частности, мембранных белков [82]. В настоящее время для выделения экзосом широко используются тетраспанины CD9, CD63 и CD81. Однако уровень экспрессии этих мембранных белков в разных типах клеток может сильно варьировать, что ограничивает их использование для иммуноаффинного выделения экзосом, секретируемых популяциями клеток с низким уровнем этих белков. Идентификация новых универсальных биомаркеров, присутствующих в большом количестве на мембранах всех экзосом, независимо от их происхождения, может стать основой для разработки новой эффективной технологии выделения экзосом.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (“Разработка технологии и набора реагентов для выделения экзосом из биологических жидкостей человека на основе аффинного фосфолипид-связывающего наноконструкта”). Регистрационный номер 121031100099-7).

Соответствие принципам этики. Статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Niel G., D'angelo G., Raposo G. 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 213–228.
2. Jeppesen D.K., Fenix A.M., Franklin J.L., Higginbotham J.N., Zhang Q., Zimmerman L.J., Liebler D.C., Ping J., Liu Q., Evans R., Fissell W.H., Patton J.G., Rome L.H., Burnette D.T., Coffey R.J. 2019. Reassessment of exosome composition. *Cell*. **177** (2), 428–445.
3. Tkach M., Théry C. 2016. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell*. **164**, 1226–1232.
4. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. 2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17.
5. Isola A., Chen S. 2016. Exosomes: The messengers of health and disease. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 157–165.
6. Lin Y., Anderson J.D., Rahnema L.M.A., Gu S.V., Knowlton A.A. 2020. Exosomes and extracellular vesicles in cardiovascular physiology exosomes in disease and regeneration: Biological functions, diagnostics, and

- beneficial effects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **319** (6), H1162–H1180.
7. de Toro J., Herschlik L., Waldner C., Mongini C. 2015. Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: New insights for diagnosis and therapeutic applications. *Front. Immunol.* **6**, 203.
 8. Dai J., Su Y., Zhong S., Cong L., Liu B., Yang J., Tao Y., He Z., Chen C. 2020. Exosomes: Key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal Transduct. Targeted Ther.* **5**, 145.
 9. Popowski K., Lut, H., Hu S., George A., Dinh P.U., Cheng K. 2020. Exosome therapeutics for lung regenerative medicine. *J. Extracel. Vesicles.* **9** (1), 1785161.
 10. Zarà M., Amadio P., Campodonic, J., Sandrini L., Barbieri S.S. 2020. Exosomes in cardiovascular diseases. *Diagnostics.* **10** (11), 943.
 11. Yang H., Ma Q., Wang Y., Tang Z. 2020. Clinical application of exosomes and circulating microRNAs in the diagnosis of pregnancy complications and foetal abnormalities. *J. Transl. Med.* **18**, 32.
 12. Makler A., Asghar W. 2020. Exosomal biomarkers for cancer diagnosis and patient monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **20** (4), 387–400.
 13. Tran P. H., Wang T., Yin W., Tran T.T., Barua H.T., Zhang, Y., Midge S.B., Nguyen T.N.G., Lee B.-J., Duan W. 2019. Development of a nanoamorphous exosomal delivery system as an effective biological platform for improved encapsulation of hydrophobic drugs. *Int. J. Pharm.* **566**, 697–707.
 14. Liang Y., Duan L., Lu J., Xia J. 2021. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics.* **11**, 3183–3195.
 15. Salunkhe S., Dheeraj Basak M., Chitkara D., Mittal A. 2020. Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance. *J. Control. Release.* **326**, 599–614.
 16. Xu Z., Zeng S., Gong Z., Yan Y. 2020. Exosome-based immunotherapy: A promising approach for cancer treatment. *Mol. Cancer.* **19**, 160.
 17. Barros F.M., Carneiro F., Machado J.C., Melo S.A. 2018. Exosomes and immune response in cancer: Friends or foes? *Front. Immunol.* **9**, 730.
 18. Maqsood M., Kang M., Wu X., Chen J., Teng L., Qiu L. 2020. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sci.* **256**, 118002.
 19. Brennan K., Martin K., FitzGerald S.P., O'Sullivan J., Wu Y., Blanco A., Richardson C., Mc Gee M. 2020. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Sci. Rep.* **10**, 1039.
 20. Martins T.S., Catita J., Rosa I.M., da Cruz e Silva O.A.B., Henriques A.G. 2018. Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLoS One.* **13** (6), e0198820.
 21. Langevin S.M., Kuhnell D., Biesiada J., Zhang X., Medvedovic M., Talaska G.G., Burns K.A., Kasper S. 2020. Comparability of the small RNA secretome across human biofluids concomitantly collected from healthy adults. *PLoS One.* **15** (4), e0229976.
 22. Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Märte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein O.K., Pfaffl M.W., Schelling G., Reithmair M. 2018. Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *J. Extracel. Vesicles.* **7** (1), 1481321.
 23. Mussack V., Wittmann G., Pfaffl M.W. 2019. Comparing small urinary extracellular vesicle purification methods with a view to RNA sequencing—Enabling robust and non-invasive biomarker research. *Biomol. Detect. Quantif.* **17**, 100089.
 24. Zhang H., Freitas D., Kim H.S., Fabijanic K., Li Z., Chen H., Mark M.T., Molina H., Martin A.B., Bojmar L., Fang J., Rampersaud S., Hoshino A., Irina Matei I., Kenific C.M., Nakajima M., Mutvei A.P., Sansone P., Buehring W., Wang H., Jimenez J.P., Cohen-Gould L., Paknejad N., Brendel M., Manova-Todorova K., Magalhães A., Ferreira J.A., Osório H., Silva A.M., Ashish Massey A., Cubillos-Ruiz J.R., Galletti G., Giannakakou P., Cuervo A.M., Blenis J., Schwartz R., Brady M.S., Peinado H., Bromberg J., Matsui H., Reis C.A., Lyden D. 2018. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.* **20**, 332–343.
 25. Sverdllov E.D. 2012. Amedeo Avogadro's cry: What is 1 µg of exosomes? *BioEssays.* **34**, 873–875.
 26. Johnsen K.B., Gudbergsson J.M., Andresen T.L., Simonsen J.B. 2019. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* **1871** (1), 109–116.
 27. Fernández-Llama P., Khositseth S., Gonzales P.A., Star R.A., Pisitkun T., Knepper M.A. 2010. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney Int.* **77** (8), 736–742.
 28. Livshits M.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lazarev V.N., Kulemin N.A., Semina S.E. 2015. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.* **5**, 17319.
 29. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primdal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113** (8), E968–E977.
 30. Whiteside T.L. 2015. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **15** (10), 1293–1310.
 31. Singh K., Nalabotla R., Koo K.M., Bose S., Nayak R., Shiddiky M.J. 2021. Separation of distinct exosome subpopulations: Isolation and characterization approaches and their associated challenges. *Analyst.* **146**, 3731–3749.
 32. Raj D.A.A., Fiume I., Capasso G., Pocsfalvi G. 2012. A multiplex quantitative proteomics strategy for protein

- biomarker studies in urinary exosomes. *Kidney Int.* **81**, 1263–1272.
33. Yu L.L., Zhu J., Liu J.X., Jiang F., Ni W.K., Qu L.S., Ni R.Z., Lu C.H., Xiao M.B. 2018. A comparison of traditional and novel methods for the separation of exosomes from human samples. *BioMed. Res. Int.* **2018**, 3634563.
34. van Veldhoven P.P., Baumgart E., Mannaerts G.P. 1996. Iodixanol (optiprep), an improved density gradient medium for the iso-osmotic isolation of rat liver peroxisomes. *Anal. Biochem.* **237** (1), 17–23.
35. Li X., Donowitz M. 2008. Fractionation of subcellular membrane vesicles of epithelial and nonepithelial cells by OptiPrep™ density gradient ultracentrifugation. In: *Exocytosis and endocytosis. Methods in Molecular Biology*, **440**. Eds Ivanov A.I., New York: Humana Press, p. 97–110.
36. Cantin R., Diou J., Bélanger D., Tremblay A. M., Gilbert C. 2008. Discrimination between exosomes and HIV-1: Purification of both vesicles from cell-free supernatants. *J. Immunol. Methods.* **338** (1–2), 21–30.
37. Merchant M.L., Powell D.W., Wilkey D.W., Cummins T.D., Deegens J., Rood I.M., McAfee K.J., Fleischer C., Klein E., Klein J.B. 2010. Microfiltration isolation of human urinary exosomes for characterization by MS. *Proteomics Clin. Appl.* **4** (1), 84–96.
38. Gerlach J.Q., Krüger A., Gallogly S., Hanley S.A., Hogan M.C., Ward C.J., Joshi L., Griffin M.D. 2013. Surface glycosylation profiles of urine extracellular vesicles. *PLoS One.* **8** (9), e74801.
39. Alvarez M.L., Khosroheidari M., Kanchi Ravi R., Distefano J.K. 2012. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* **82**, 1024–1032.
40. Andreu Z., Rivas E., Sanguino-Pascual A., Lamana A., Marazuela M., González-Alvaro I., Sánchez-Madrid F., de la Fuente H., Yáñez-Mó M. 2016. Comparative analysis of EV isolation procedures for miRNAs detection in serum samples. *J. Extracel. Vesicles.* **5** (1), 31655.
41. Taylor D.D., Shah S. 2015. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods.* **87**, 3–10.
42. Sidhom K., Obi P.O., Saleem A.A. 2020. A review of exosomal isolation methods: Is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* **21** (18), 6466.
43. Baranyai T., Herczeg K., Onódi Z., Voszka I., Módos K., Marton N., Nagy G., Mäger I., Wood M.J., Andalousi S.E.I., Pálincás Z., Kumar V., Nagy P., Ágnes Kittel A., Buzás E.I., Ferdinandy P., Giricz Z. 2015. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS One.* **10** (12), e0145686.
44. Hagel L., Ostberg M., Andersson T. 1996. Apparent pore size distributions of chromatography media. *J. Chromatogr. A.* **743** (1), 33–42.
45. Arntz O.J., Pieters B.C., van Lent P., Koenders M.I., van der Kraan P.M., van de Loo F.A. 2020. An optimized method for plasma extracellular vesicles isolation to exclude the copresence of biological drugs and plasma proteins which impairs their biological characterization. *PLoS One.* **15** (7), e0236508.
46. Gámez-Valero A., Monguió-Tortajada M., Carreras-Planella L., Beyer K., Borrás F.E. 2016. Size-exclusion chromatography-based isolation minimally alters extracellular vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci. Rep.* **6**, 33641.
47. Lohmann L.J., Strube J. 2020. Accelerating biologics manufacturing by modeling: Process integration of precipitation in mAb downstream processing. *Processes.* **8** (1), 58.
48. Atha D.H., Ingham K.C. 1981. Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *J. Biol. Chem.* **256** (23), 12108–12117.
49. Marenduzzo D., Finan K., Cook P.R. 2006. The depletion attraction: An underappreciated force driving cellular organization. *J. Cell Biol.* **175** (5), 681–686.
50. Ludwig A.K., De Miroshedji K., Doepfner T.R., Börger V., Ruesing J., Rebmann V., Durst S., Jansen S., Bremer M., Behrmann E., Singer B.B., Jastrow H., Kuhlmann J.D., Magraoui F.E.I., Meyer H.E., Hermann D.M., Opalka B., Raunser S., Eppel M., Horn P.A., Giebel B. 2018. Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *J. Extracel. Vesicles.* **7** (1), 1528109.
51. Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. 2016. ExtraPEG: A polyethylene glycol-based method for enrichment of extracellular vesicles. *Sci. Rep.* **6**, 23978.
52. Weng Y., Sui Z., Shan Y., Hu Y., Chen Y., Zhang L., Zhang Y. 2016. Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst.* **141** (15), 4640–4646.
53. Garcia-Romero N., Madurga R., Rackov G., Palacin-Alana I., Nunez-Torres R., Asensi-Puig A., Carrión-Navarro J., Esteban-Rubio S., Peinado H., González-Neira A., González-Rumayor V., Belda-Iniesta C., Ayuso-Sacido A. 2019. Polyethylene glycol improves current methods for circulating extracellular vesicle-derived DNA isolation. *J. Transl. Med.* **17** (1), 75.
54. Neerukonda S.N., Egan N.A., Patria J., Assakhi I., Tavlarides-Hontz P., Modla S., Muñoz E.R., Hudson M.B., Parcells M.S. 2020. A comparison of exosome purification methods using serum of Marek's disease virus (MDV)-vaccinated and-tumor-bearing chickens. *Heliyon.* **6** (12), e05669.
55. Konoshenko M.Y., Lekchnov E.A., Bryzgunova O.E., Kiseleva E., Pyshnaya I.A., Laktionov P.P. 2021. Isolation of extracellular vesicles from biological fluids via the aggregation–precipitation approach for downstream miRNAs detection. *Diagnostics.* **11** (3), 384.
56. Grunt M., Failla A.V., Stevic I., Hillebrand T., Schwarzenbach H. 2020. A novel assay for exosomal and cell-free miRNA isolation and quantification. *RNA Biol.* **17**, 425–440.

57. Hay I.D., Rehman Z.U., Moradali M.F., Wang Y., Rehm B.H. 2013. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.* **6** (6), 637–650.
58. Deregibus M.C., Figliolini F., D'antico S., Manzini P.M., Pasquino C., De Lena M., Tetta C., Brizzi M.F., Camussi, G. 2016. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Med.* **38** (5), 1359–1366.
59. Brownlee Z., Lynn K.D., Thorpe P.E., Schroit A.J. 2014. A novel “salting-out” procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J. Immunol. Methods.* **407**, 120–126.
60. Clayton A., Court J., Navabi H., Adams M., Mason M.D., Hobot J.A., Newman G.R., Jasani B. 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **247** (1–2), 163–174.
61. Oksvold M.P., Neurauter A., Pedersen K.W. 2015. Magnetic bead-based isolation of exosomes. In: *RNA Interference. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. **1218**. Eds Sioud M. New York: Humana Press, p. 465–481.
62. Ueda K., Ishikawa N., Tatsuguchi A., Saichi N., Fujii R., Nakagawa H. 2014. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes. *Sci. Rep.* **4**, 6232.
63. Zhang K., Yue Y., Wu S., Liu W., Shi J., Zhang Z. 2019. Rapid capture and nondestructive release of extracellular vesicles using aptamer-based magnetic isolation. *ACS sensors.* **4** (5), 1245–1251.
64. Song Z., Mao J., Barrero R.A., Wang P., Zhang F., Wang T. 2020. Development of a CD63 aptamer for efficient cancer immunochemistry and immunoaffinity-based exosome isolation. *Molecules.* **25** (23), 5585.
65. Zhang N., Sun N., Deng C. 2021. Rapid isolation and proteome analysis of urinary exosome based on double interactions of Fe₃O₄@TiO₂-DNA aptamer. *Talanta.* **221**, 121571.
66. Liangsupree T., Multia E., Riekkola M.L. 2021. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *J. Chromatogr. A.* **1636**, 461773.
67. Royo F., Zuñiga-Garcia P., Sanchez-Mosquera P., Egia A., Perez A., Loizaga A., Arceo R., Lacasa I., Rabade, A., Eurne Arrieta E., Bilbao R., Unda M., Carracedo A., Falcon-Perez J.M. 2016. Different EV enrichment methods suitable for clinical settings yield different subpopulations of urinary extracellular vesicles from human samples. *J. Extracel. Vesicles.* **5** (1), 29497.
68. Malykh A.G., Malek A., Lokshin A., Evtushenko V. 2018. Simultaneous isolation of exosomes and cfDNA from liquid biopsies using universal kit based on SubX-Matrix TM technology. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2018 Apr 14–18; Chicago, IL. *Cancer Res.* **78** (13 Suppl). Abstract nr 1618. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-1618>
69. Shtam T., Evtushenko V., Samsonov R., Zabrodskaya Y., Kamysinsky R., Zabegina L., Verlov N., Burdakov V., Garaeva L., Slyusarenko M., Nikiforova N., Konevega A., Malek A. 2020. Evaluation of immune and chemical precipitation methods for plasma exosome isolation. *PLoS One.* **15** (11), e0242732.
70. Kim J., Shin H., Kim J., Kim J., Park J. 2015. Isolation of high-purity extracellular vesicles by extracting proteins using aqueous two-phase system. *PLoS One.* **10** (6), e0129760.
71. Shin H., Park Y.H., Kim Y.G., Lee J.Y., Park J. 2018. Aqueous two-phase system to isolate extracellular vesicles from urine for prostate cancer diagnosis. *PLoS One.* **13** (3), e0194818.
72. Shin H., Han C., Labuz J.M., Kim J., Kim J., Cho S., Gho Y.S., Takayama S., Park J. 2015. High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system. *Sci. Rep.* **5**, 13103.
73. Slyusarenko M., Nikiforova N., Sidina E., Nazarova I., Egorov V., Garmay Y., Merdalimova A., Yevlampieva N., Gorin D., Malek A. 2021. Formation and evaluation of a two-phase polymer system in human plasma as a method for extracellular nanovesicle isolation. *Polymers.* **13** (3), 458.
74. Heath N., Grant L., De Oliveira T.M., Rowlinson R., Osteikoetxea X., Dekker N., Overman R. 2018. Rapid isolation and enrichment of extracellular vesicle preparations using anion exchange chromatography. *Sci. Rep.* **8**, 5730.
75. Kim H., Shin, S. 2021. ExoCAS-2: Rapid and pure isolation of exosomes by anionic exchange using magnetic beads. *Biomedicines.* **9** (1), 28.
76. Haj-Ahmad Y., Norgen Biotek Corp. 2018. Methods for extracellular vesicle isolation and selective removal. *United States Patent US10160964B2*. 2018. Dec 25.
77. Abhange K., Makler A., Yi Wen Y., Ramnauth N., Mao W., Asghar W., Wan Y. 2021. Small extracellular vesicles in cancer. *Bioact. Mater.* **6** (11), 3705–3743.
78. Sitar S., Kejžar A., Pahovnik D., Kogej K., Tušek-Žnidarič M., Lenassi M., Žagar E. 2015. Size characterization and quantification of exosomes by asymmetrical-flow field-flow fractionation. *Anal. Chem.* **87** (18), 9225–9233.
79. Kim Y.B., Yang J.S., Lee G.B., Moon M.H. 2020. Evaluation of exosome separation from human serum by frit-inlet asymmetrical flow field-flow fractionation and multiangle light scattering. *Anal. Chim. Acta.* **1124**, 137–145.
80. Morani M., Mai T.D., Krupova Z., Defrenaix P., Multia E., Riekkola M.L., Taverna M. 2020. Electrokinetic characterization of extracellular vesicles with capillary electrophoresis: A new tool for their identification and quantification. *Anal. Chim. Acta.* **1128**, 42–51.
81. Lin B., Lei Y., Wang J., Zhu L., Wu Y., Zhang H., Wu L., Zhang P., Yang C. 2021. Microfluidic-based exosome analysis for liquid biopsy. *Small Methods.* **5** (3), 2001131.
82. Kugeratski F.G., Hodge K., Lilla S., McAndrews K.M., Zhou X., Hwang R.F., Zanivan S., Raghu Kalluri R. 2021. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat. Cell Biol.* **23** (6), 631–641.

Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids

E. I. Yakubovich¹, *, A. G. Polischouk¹, V. I. Evtushenko¹

¹*Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197758 Russia*

**e-mail: jakubovichelena@mail.ru*

Exosomes, a subclass of small membrane extracellular vesicles, have great diagnostic and therapeutic potential, but the lack of standardized methods for their efficient isolation and analysis limits the introduction of exosomal technologies into clinical practice. This review discusses the problems associated with the isolation of exosomes from biological fluids, as well as the principles of traditional and alternative methods of isolation. The aim of the presented review is to illustrate the variety of approaches based on the physical and biochemical properties of exosomes that can be used for exosome isolation. The advantages and disadvantages of different methods are discussed.

Keywords: microvesicles, exosomes, bioseparation, isolation methods