



## СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСОСОМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Н.И. Пономарева<sup>1,2,\*</sup>, А.П. Костюшева<sup>1</sup>, С.А. Брезгин<sup>1</sup>, В.В. Смирнов<sup>2</sup>, В.И. Гегечкори<sup>2</sup>,  
Д.С. Костюшев<sup>1,3</sup>, В.П. Чуланов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии  
и инфекционных заболеваний» Минздрава России  
127473, Российская Федерация, Москва, ул. Достоевская, 4, к. 2

<sup>2</sup> ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»  
Минздрава России (Сеченовский Университет)  
119991, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

<sup>3</sup> Научно-технологический университет «Сириус»  
354340, Российская Федерация, Сочи, Олимпийский просп., 1

Экзосомы — наноразмерные мембранные везикулы, которые секретируются почти всеми видами клеток и стабильно существуют в организме. Благодаря уникальным свойствам они могут быть использованы в биомедицинских исследованиях в качестве лекарственных препаратов и как платформа для направленной доставки лекарственных средств. В данном исследовании был разработан протокол получения внеклеточных везикул из культуральной жидкости с использованием анионообменной хроматографии. Созданный протокол превосходит наиболее используемый протокол выделения экзосом ультрацентрифугированием за счёт возможности выделения из больших объёмов культуральной среды.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, экзосомы, анионообменная хроматография, ультрацентрифугирование, доставка лекарств

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-15-00373.

**Для цитирования:** Пономарева Н.И., Костюшева А.П., Брезгин С.А., Смирнов В.В., Гегечкори В.И., Костюшев Д.С., Чуланов В.П. Сравнение методов получения экзосом, используемых в биомедицинских исследованиях. *Биомедицина*. 2021;17(3E):76–79. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-76-79>

Поступила 16.04.2021

Принята после доработки 31.05.2021

Опубликована 20.10.2021

## COMPARISON OF EXOSOME ISOLATION METHODS FOR BIOMEDICAL RESEARCH

Natalia I. Ponomareva<sup>1,2,\*</sup>, Anastasia P. Kostyusheva<sup>1</sup>, Sergey A. Brezgin<sup>1</sup>,  
Valery V. Smirnov<sup>2</sup>, Vladimir I. Gegechkory<sup>2</sup>, Dmitry S. Kostyushev<sup>1,3</sup>, Vladimir P. Chulanov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Phthiopulmonology and Infectious Diseases  
of the Ministry of Health Care of Russia  
127473, Russian Federation, Moscow, Dostoevskaya Str., 4, Building 2

<sup>2</sup> I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia  
119991, Russian Federation, Moscow, Trubetskaya Str., 8, Building 2

<sup>3</sup> Sirius University of Science and Technology  
354340, Russian Federation, Sochi, Olimpiyskiy Avenue, 1

Exosomes are nanoscale membrane vesicles secreted by almost all kinds of cells and stably existing in the body. Due to their unique properties, exosomes can be used in biomedical research as regenerative preparations or drug delivery vehicles. In this study, an anion exchange (AIEX) chromatography-based protocol for isolation of extracellular vesicles from a cell-conditioned medium was developed. The exosome isolation method based on AIEX chromatography overperforms the canonical ultracentrifugation-based isolation method in terms of its capability of large-volume processing.

**Keywords:** extracellular vesicles, exosomes, anion exchange chromatography, ultracentrifugation, drug delivery

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Funding:** this work was supported by the Russian Science Foundation Grant No. 20-15-00373.

**For citation:** Ponomareva N.I., Kostyusheva A.P., Brezgin S.A., Smirnov V.V., Gegechkory V.I., Kostyushev D.S., Chulanov V.P. Comparison of Exosome Isolation Methods for Biomedical Research. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):76–79. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-76-79>

Submitted 16.04.2021

Revised 31.05.2021

Published 20.10.2021

## Введение

В настоящее время экзосомы проходят клинические испытания в терапии аутоиммунных заболеваний и как средство регенеративной медицины благодаря своей иммуномодулирующей и противовоспалительной активности. Также исследуется применение экзосом в качестве носителя для доставки лекарственных препаратов и как метода «жидкой биопсии» для ранней диагностики онкопатологий и мониторинга противоопухолевой терапии [5]. Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы диаметром 30–150 нм с билипидной мембраной, аналогичной мембранам клеток. Экзосомы подвергаются фагоцитозу клетками на моделях *in vitro* и *in vivo*, после чего происходит высвобождение содержимого экзосом (белков, нуклеиновых кислот) [1, 2].

Возможность продукции в производственных масштабах и безопасность использования, а также уникальные свойства экзосом (биосовместимость, способность проникать через биологические барьеры, иммуномодулирующее действие и низкий макрофагальный клиренс) определяют высокие перспективы их применения в медицине и фармации. С другой стороны, выделение экзосом из различных биоло-

гических жидкостей организма и последующее изучение их белкового и липидного состава и экзосомальных РНК позволяют выявлять патологические процессы в организме человека (например, злокачественную трансформацию клеток).

Усовершенствование методов выделения экзосом из различных биологических жидкостей и культуральной среды клеток необходимо для дальнейшего развития исследований в области применения внеклеточных везикул для диагностики и терапии [3, 4, 6].

## Материалы и методы

Экзосомы были выделены из культуральной жидкости мезенхимных стромальных/стволовых клеток (МСК) и клеток почки эмбриона человека (НЕК293Т) при помощи двух различных методов получения внеклеточных везикул: (1) классического метода ультрацентрифугирования, (2) анионообменной хроматографии.

Анионообменную хроматографию проводили на приборе BioRad BioLogic LP с использованием анионообменной смолы MacroPrep DEAE Media («BioRad», США).

Характеризация экзосом осуществлялась методом динамического светорассеяния (определение размера и дзета-потенциала

частиц) и методом вестерн-блоттинга (определение экзосомальных маркеров CD63, CD81, HSP70).

### Результаты исследований

Сравнительный анализ методов выделения экзосом показал, что внеклеточные везикулы, полученные с помощью анионообменной хроматографии (AIEХ), имели средний размер, равный 100 нм, а дзета-потенциал экзосом, выделенных оптимизированным методом AIEХ, составлял  $\approx -12,5$  мВ. Данные параметры сопоставимы с аналогичными характеристиками частиц, полученных классическим методом ультрацентрифугирования. Вестерн-блот-анализ изолятов внеклеточных везикул

подтвердил наличие основных маркеров, характерных для экзосом (CD63, CD81, HSP70).

### Заключение

Усовершенствован протокол получения экзосом при помощи анионообменной хроматографии. Данный метод позволяет получать внеклеточные везикулы из больших объемов жидкости (до десятков литров) для масштабирования выделения экзосом. Частицы, полученные с помощью разработанного метода, по характеристикам соответствуют экзосомам и сопоставимы с внеклеточными везикулами, выделенными при помощи ультрацентрифугирования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

---

1. Haraszti R.A., Didiot M.C., Sapp E., et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell Vesicles*. 2016;5:32570. DOI: 10.3402/jev.v5.32570.
2. Liu D., Yang F., Xiong F., Gu N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*. 2016;6(9):1306–1323. DOI: 10.7150/thno.14858.
3. Mol E.A., Goumans M.J., Doevendans P.A., Sluijter J.P.G., Vader P. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine*. 2017;13(6):2061–2065. DOI: 10.1016/j.nano.2017.03.011.
4. Patel G.K., Khan M.A., Zubair H., et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci. Rep.* 2019;9:5335. DOI: 10.1038/S41598-019-41800-2.
5. Théry C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2(8):569–579. DOI: 10.1038/nri855.
6. Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-'t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H., Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell Vesicles*. 2013;2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

---

**Пономарева Наталья Игоревна\***, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); e-mail: [ponomareva.n.i13@yandex.ru](mailto:ponomareva.n.i13@yandex.ru)

**Костюшева Анастасия Павловна**, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; e-mail: [kostyusheva\\_ap@mail.ru](mailto:kostyusheva_ap@mail.ru)

**Natalia I. Ponomareva\***, National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: [ponomareva.n.i13@yandex.ru](mailto:ponomareva.n.i13@yandex.ru)

**Anastasia P. Kostyusheva**, Cand. Sci. (Biol.), National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; e-mail: [kostyusheva\\_ap@mail.ru](mailto:kostyusheva_ap@mail.ru)

**Брезгин Сергей Алексеевич**, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России;  
e-mail: [seegez@mail.ru](mailto:seegez@mail.ru)

**Смирнов Валерий Валерьевич**, к.фарм.н., доц., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [vall@mail.mipt.ru](mailto:vall@mail.mipt.ru)

**Гегечкори Владимир Ираклиевич**, к.фарм.н., ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [vgegechkori@gmail.com](mailto:vgegechkori@gmail.com)

**Костюшев Дмитрий Сергеевич**, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; Научно-технологический университет «Сириус»;  
e-mail: [dkostushev@gmail.com](mailto:dkostushev@gmail.com)

**Чуланов Владимир Петрович**, д.м.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России; ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);  
e-mail: [vladimir@chulanov.ru](mailto:vladimir@chulanov.ru)

**Sergey A. Brezgin**, National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [seegez@mail.ru](mailto:seegez@mail.ru)

**Valery V. Smirnov**, Cand. Sci. (Pharmaceutic.), Assoc. Prof., I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [vall@mail.mipt.ru](mailto:vall@mail.mipt.ru)

**Vladimir I. Gegechkory**, Cand. Sci. (Pharmaceutic.), I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [vgegechkori@gmail.com](mailto:vgegechkori@gmail.com)

**Dmitry S. Kostyushev**, Cand. Sci. (Biol.), National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; Sirius University of Science and Technology;  
e-mail: [dkostushev@gmail.com](mailto:dkostushev@gmail.com)

**Vladimir P. Chulanov**, Dr. Sci. (Med.), National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health Care of Russia; I.M. Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health Care of Russia;  
e-mail: [vladimir@chulanov.ru](mailto:vladimir@chulanov.ru)

---

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author