

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ микроРНК ИЗ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ПРИСУТСТВУЮЩИХ В АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

© 2022 Г.О. Скрябин¹, С.В. Винокурова¹, Н.В. Елкина¹, Д.А. Денисова¹, А.А. Беляева^{1,2}, К.И. Жордания³, Д.В. Багров², А.Д. Еникеев¹, С.А. Галецкий¹, А.В. Комельков^{1*}, Г.И. Краснощекова³, Е.М. Чевкина¹

¹ НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: kotelkov@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 111234 Москва, Россия

³ НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.08.2022

После доработки 21.09.2022

Принята к публикации 26.09.2022

Секретируемые экстраклеточные везикулы (ЭКВ) содержат активные биомолекулы, включая микроРНК, состав которых отражает эпигенетические изменения, возникающие в клетках при патологических процессах, в частности, злокачественной трансформации. Накопленный пул данных о роли ЭКВ в канцерогенезе обусловил поиск диагностических маркеров в составе ЭКВ. Важнейшим фактором, ограничивающим развитие данного направления, является отсутствие «золотых стандартов» как для методик выделения ЭКВ из биологических жидкостей, так и для анализа их молекулярного содержимого, включая состав микроРНК. В работе впервые проведено сравнение эффективности различных методов выделения малых РНК из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости, для последующего анализа микроРНК. Сравнение различных коммерческих наборов показало преимущества методов, включающих фенол-хлороформную экстракцию: Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (TERPIK) и miRNeasy Serum/Plasma Kit (miRNeasy). Анализ транскриптома малых РНК в ЭКВ показал присутствие различных классов молекул, среди которых доля микроРНК в среднем составляла 6%, достигая 10% при использовании набора TERPIK. Набор PureLink miRNA Isolation Kit характеризовался наименьшей эффективностью. Набор miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (miRNeasy_A) показал максимальную концентрацию фракции малых РНК, доля микроРНК в которой, однако, не превышала таковую в случае использования наборов miRNeasy и TERPIK. Более того, данные ОТ-ПЦР анализа индивидуальных микроРНК показали более низкое содержание каждой из четырёх микроРНК – miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p и miR-23a-3p – при использовании набора miRNeasy_A. По совокупности исследуемых характеристик, включая концентрацию малых РНК, процент содержания микроРНК по данным биоанализатора (БА) и результатам секвенирования и уровень индивидуальных РНК, детектируемых методом ОТ-ПЦР, оптимальными можно считать наборы TERPIK и miRNeasy.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экзосомы, микроРНК, методы выделения, экстраклеточные везикулы, miRNeasy Serum/Plasma Kit, Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit, PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit.

DOI: 10.31857/S0320972522110124, **EDN:** LWWLAA

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается неуклонный рост интереса исследователей к свобод-

но циркулирующим нуклеиновым кислотам, включая микроРНК, в контексте их высокого потенциала в качестве биомаркеров широкого спектра заболеваний. Источниками таких

Принятые сокращения: ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; ЭКВ – экстраклеточные везикулы; ISEV – International Society of Extracellular Vesicles, Международное сообщество по изучению экстраклеточных везикул; miRNeasy – miRNeasy Serum/Plasma Kit; miRNeasy_A – miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit; NTA – Nanoparticles Tracking Analysis, анализ траектории движения наночастиц; TERPIK – Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit.

* Адресат для корреспонденции.

молекул являются различные биологические жидкости (плазма/сыворотка крови, моча, семенная жидкость, маточные аспираты, слюна и др.), удобство применения которых в клинике обуславливается малоинвазивной процедурой забора этих материалов. Однако происхождение свободно циркулирующих молекул до сих пор не до конца понятно, и их присутствие в биологических жидкостях может во многом быть результатом распада клеток, то есть неспецифического процесса. Кроме того, время жизни свободной РНК в биологических жидкостях крайне мало (порядка 15 сек в крови, по некоторым данным [1]). В то же время оно может достигать часов и даже дней за счёт образования комплексов с различными классами биомолекул (РНК-связывающими белками, липопротеинами высокой и низкой плотности) [2–4], а также инкапсуляции в составе мембранных пузырьков – экстраклеточных везикул (ЭКВ), мембрана которых защищает их содержимое от деградации [5–7]. ЭКВ представляют собой гетерогенный класс частиц, среди которых можно выделить три основных типа: апоптотические тельца – крупные везикулы размером более 1 мкм, образующиеся в процессе программируемой клеточной гибели, микровезикулы (или эктосомы), возникающие с помощью непосредственного отпочкования от плазматической мембраны клетки, и экзосомы, биогенез которых осуществляется в системе внутриклеточного эндосомального транспорта, в процессе которого происходит строго контролируемый отбор содержимого будущих везикул. Экзосомы являются наноразмерными представителями ЭКВ (их средний размер по разным оценкам составляет от 30 до 150 нм), причём если раньше предполагалось, что микровезикулы и экзосомы можно разделить по размеру, то согласно нынешним представлениям, размеры этих ЭКВ могут пересекаться, в связи с чем ведущая международная организация ISEV (International Society for Extracellular Vesicles, Международное сообщество по изучению экстраклеточных везикул) рекомендует использование термина «экзосомы» только в том случае, если доказан экзосомальный тип биогенеза везикул [8]. ЭКВ продуцируются клетками во внеклеточное пространство как в физиологических, так и в патофизиологических условиях (причём показано, что опухолевые клетки производят их более активно) и осуществляют межклеточную коммуникацию за счёт содержащихся в них биоактивных молекул (факторов роста, рецепторов, цитокинов, а также различных классов кодирующих и некодирующих РНК, в том числе микроРНК). Профиль

биомолекул, присутствующих в ЭКВ, зависит от типа клеток-продуцентов. Соответственно, ЭКВ, секретируемые клетками злокачественных опухолей, отражают изменения молекулярного состава трансформированных клеток, что делает их перспективными источниками опухоль-ассоциированных микроРНК. В настоящее время предпринимаются активные попытки использования микроРНК в составе ЭКВ в качестве диагностических, прогностических и предиктивных маркеров злокачественных новообразований различных типов [6, 9]. Однако, несмотря на многочисленные данные, включая наши собственные результаты [10, 11], свидетельствующие об опухоль-ассоциированных изменениях состава микроРНК, маркеры злокачественных опухолей на их основе до сих пор не внедрены в клиническую практику. Основной проблемой, лимитирующей развитие данного направления, является противоречивость результатов, полученных в различных исследованиях, что объясняется как высокой гетерогенностью самих ЭКВ, так и целым рядом причин методологического характера. В связи с этим важнейшей задачей, определённой ISEV, является стандартизация методов выделения и анализа ЭКВ, а также методов анализа их молекулярного состава [8]. Это в большой степени относится к анализу микроРНК, учитывая низкий уровень их представленности в ЭКВ [12, 13], высокий уровень содержания липидов в мембранах ЭКВ, присутствие в препаратах ЭКВ РНК-содержащих частиц невезикулярного происхождения со сходными физическими характеристиками (прежде всего липопротеиновых комплексов) [14] и ряд других методических сложностей, особенно относящихся к анализу ЭКВ, содержащихся в биологических жидкостях организма, а не в кондиционированной среде культивируемых клеток *in vitro*. Различия в методах экстракции сказываются на эффективности выделения малых РНК, содержании микроРНК и даже на их составе [15, 16].

К настоящему времени опубликовано большое количество работ, посвящённых сравнению методов выделения свободно циркулирующих микроРНК из биологических жидкостей организма [17]. В то же время анализу методов выделения микроРНК из ЭКВ посвящены лишь несколько статей [15, 18–23]. Важно отметить, что методы экстракции РНК постоянно совершенствуются, и на рынке появляются новые наборы для выделения микроРНК.

В связи со сказанным выше целью данного исследования было сравнение методов выделения микроРНК из ЭКВ, содержащихся в

биологических жидкостях организма (асцитической жидкости больных раком яичника), с использованием различных коммерческих наборов – как зарекомендовавших себя для подобного рода задач (miRNeasy Serum/Plasma Kit (miRNeasy, «Qiagen», Нидерланды)), так и ранее почти (Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (TERPIK, «ThermoFisher Scientific», США)) или полностью (PureLink miRNA Isolation Kit («ThermoFisher Scientific») и miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit (miRNeasy_A, «Qiagen»)) не включённых в аналогичные исследования.

Для данной задачи в качестве источника ЭКВ были выбраны асциты брюшной полости, полученные от пациентов с диагнозом рак яичника. Этот тип биологической жидкости достаточно широко используется для анализа молекулярного состава ЭКВ с точки зрения поиска прогностических и предиктивных маркеров данного заболевания [24, 25]. В то же время ЭКВ из асцитической жидкости практически не попадали в исследования, посвящённые сравнению методов выделения РНК [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и первичная обработка клинического материала. Шесть образцов асцитической жидкости были получены от пациентов с диагнозом рак яичника в онкогинекологическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. От каждого пациента было получено добровольное информированное согласие на участие в эксперименте в соответствии с требованиями Этического комитета. Каждый из образцов (исходный объём которых был не менее 300 мл) в течение 1 ч после забора был обработан согласно следующему протоколу последовательного центрифугирования: 300 g (4 °C) в течение 15 мин, 800 g (4 °C) – 20 мин, 2000 g (4 °C) – 30 мин и 10 000 g (4 °C) – 30 мин, чтобы очистить его от клеток, клеточного дебриса и крупных везикул. Полученный супернатант был заморожен на –80 °C.

Выделение ЭКВ. Для выделения малых ЭКВ был использован стандартный протокол дифференциального ультрацентрифугирования, описанный They et al. [26], с небольшими модификациями [27]. Работа состояла из двух этапов, на каждом из которых было обработано по 3 асцита. Размороженные супернатанты были разведены ледяным PBS в 4 раза и подвергнуты первому раунду ультрацентрифугирования при 110 000 g (4 °C) в течение 3 ч. Полученный осадок (состоящий в основном из малых ЭКВ) был ресуспендирован в 5 мл холодного PBS.

На первом этапе работы растворённый осадок был разделён на 5 равных аликвот по 1 мл и повторно центрифугирован при 110 000 g (4 °C) в течение 1 ч. Полученные осадки (4 из 5) растворили в 80 мкл PBS, а оставшийся – в 80 мкл лизирующего буфера (Binding Buffer, BB) из набора PureLink. 20 мкл из растворов, разведённых в PBS, были отобраны для анализа методами NTA (Nanoparticles Tracking Analysis, анализ траектории движения наночастиц), ТЭМ (трансмиссионная электронная микроскопия) и иммуноблоттинга, а оставшиеся 60 мкл использовались для выделения микроРНК. На втором этапе полученный после первого раунда ультрацентрифугирования осадок был растворён в 5 мл холодного PBS и подвергнут второму раунду ультрацентрифугирования при 110 000 g (4 °C) в течение 1 ч. Финальный осадок был растворён в 200 мкл холодного PBS и разделён на 3 аликвоты по 60 мкл (для выделения РНК тремя разными наборами). Оставшиеся 20 мкл использовались для анализа методами NTA, ТЭМ и иммуноблоттинга.

Анализ траектории движения наночастиц. Подсчёт концентрации и размерного распределения частиц в препаратах ЭКВ осуществляли методом NTA на приборе NanoSight LM10 HS, оборудованном ячейкой NanoSight LM14 со встроенным датчиком температуры («Malvern Panalytical Ltd.», Великобритания) и лазерной установкой LM 14C (405 нм, 65 мВт). Съёмку производили высокочувствительной камерой C11440-50B с сенсором CMOS («Hamamatsu Photonics», Япония) в соответствии с рекомендациями ASTM E2834–12(2018) со следующими настройками: Camera Shutter = 1500, Camera Gain = 500, Lower Threshold = 195, Higher Threshold = 1885. Образец разводили до концентрации $1,5 \times 10^8$ част./мл, чтобы попасть в оптимальный рабочий диапазон прибора применительно к анализу везикул (в соответствии с рекомендациями «Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by NTA» (ASTM E2834-12 (2018))), после чего производили 12 минутных видеозаписей, которые обрабатывали с помощью программы NTA software 2.3 build 33 («Malvern Panalytical Ltd.») на следующих настройках: Screen Gain = 10, Detection Threshold = 8 (Multi), Min. expected size = 30 nm. Результаты всех измерений были объединены для получения гистограммы распределения размеров частиц и общей концентрации с поправкой на фактор разбавления.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Анализ морфологии ЭКВ проводили с

помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL, Ltd.», «Akishima», Япония) согласно протоколу, описанному ранее [10]. Для каждого образца анализировалось не менее 10 полей зрения.

Вестерн-блот анализ. Иммуноблоттинг проводили согласно описанной ранее методике [27]. Вкратце, концентрацию белка в образцах ЭКВ и клеточном лизате определяли методом Бредфорда с помощью набора Bradford Assay Kit («Bio-Rad Laboratories, GmbH», Германия). Образец, содержащий 10 мкг белка, подвергали электрофорезу в 15%-ном SDS-ПААГ (m/v), переносили на PVDF-мембрану («Merck Millipore», США), которую после инкубировали в 5%-ном растворе БСА (m/v) («PAA Laboratories GmbH», Австрия) в буфере TBS, содержащем 0,1% Tween 20 (v/v). Затем мембрану инкубировали 12 ч при 4 °C с первичными антителами, проводили стандартную отмывку в буфере TBS/Tween 20 и инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После отмывки белки проявляли с помощью реагента Clarity Western ECL Substrate (#170-5061, «Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System («Kodak», США) с последующей обработкой с помощью программы Carestream Molecular Imaging Software SE ver.5.0.1.27 («Molecular Bioimaging», США). Список использованных в работе антител: anti-Flotillin-2 (#3436S, 1 : 1000; «Cell Signaling Technology», США), anti-CD9 (#13174, 1 : 2000; «Cell Signaling Technology»), anti-TSG-101 (ab125011, 1 : 5000; «Abcam», Великобритания), anti-PCNA (#sc-7907, 1 : 500; «Santa Cruz Biotechnology», США), anti-Stomatin (#sc-134554, 1 : 500; «Santa Cruz Biotechnology»), anti-mouse goat polyclonal antibodies (#2367, 1 : 5000; «Cell Signaling Technology»), и anti-rabbit goat polyclonal antibodies (#29902, 1 : 80 000; «Cell Signaling Technology»).

Выделение и характеристика РНК. Выделение РНК осуществлялось с использованием четырёх коммерческих наборов в соответствии с рекомендациями производителей: TERPIK (4478545, «ThermoFisher Scientific»); miRNeasy (217184, «Qiagen»); PureLink miRNA Isolation Kit (K157001, «Thermo Fisher Scientific»); miRNeasy_A (217204, «Qiagen»). РНК элюировали в 40 мкл деионизированной воды. Концентрацию малых РНК измеряли с помощью набора Qubit™ microRNA Assay Kit (Q32881; «Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Размерное распределение в полученных препаратах РНК и содержание микроРНК анализировали на биоанализаторе

ре (БА) Agilent 2100 с использованием набора для малых РНК «Small RNA Kits» («Agilent Technologies», США).

Секвенирование. 2 мкл образца тотальной экзосомальной РНК были конвертированы в библиотеки кДНК с использованием набора NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB) («BioLabs Inc., Hitchin», Великобритания) для всех препаратов. Выход и распределение длин фрагментов полученных библиотек измеряли с помощью набора High Sensitivity DNA Kit на биоанализаторе Bioanalyzer 2100 («Agilent Technologies») и проводили селекцию кДНК по размеру микроРНК с помощью AMPure XP Beads («BioLabs Inc.») согласно NEB. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 («Illumina») одноконцевыми чтениями длиной 50 нуклеотидов с генерацией не менее 5 миллионов чтений, сопоставленных с геномом человека (версия сборки генома человека human genome hg18).

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Для детекции микроРНК нами была использована модификация ОТ-ПЦР «петля-на-стержне» («stem-loop»), описанная в работе Chen et al. [28]. Праймеры для специфических микроРНК были разработаны с помощью miRBase v22.1 и синтезированы компанией «ДНК-синтез» (Россия) (последовательности приведены в табл. S1 Дополнительных материалов). Эффективность амплификации проверяли с использованием серийных разведений кДНК, полученных в результате реакции обратной транскрипции соответствующих синтезированных микроРНК. Параметры ПЦР были установлены для достижения эффективности от 95% до 105% для всех наборов праймеров.

Все исследованные образцы экзосомальной РНК были разведены до растворов с финальной концентрацией 12 нг/мл, из которых 4 мкл были взяты в реакцию обратной транскрипции, которую проводили с использованием набора 5x RTMIX-3000 (#RTM-100, «Диалат», Россия) в присутствии 1 пмоль микроРНК-специфичных stem-loop ОТ-праймеров. Для каждой микроРНК параллельно ставили ОТ(-) контроль. После двукратного разведения 2 мкл продукта ОТ были амплифицированы на приборе Real-time CFX96 Touch («Bio-Rad Laboratories, Inc.») с использованием набора 5x MasCFE MIX-2025 (#MCFE-100, «Диалат») в присутствии 20 пмоль микроРНК-специфичных прямых праймеров, 10 пмоль универсальных обратных праймеров и 5 пмоль TaqMan™ микроРНК-специфичных зондов. Температуры отжига праймеров составляли: 56 °C для miR-1246, 58 °C для miR200b, 60 °C для miR-23a

и 62 °С для miR-200с. Реакции проводили в трипликатах, и принимались результаты со значением стандартного отклонения меньше 0,3. Для анализа данных и расчёта порогового значения цикла (Ct) использовалось программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager v.3.1.

Биоинформационный анализ результатов секвенирования. Биоинформационный анализ полученных данных с глубиной прочтения не менее 5 млн качественных прочтений на образец проводился по ранее описанной методике [10]. Вкратце, последовательности адаптеров удалялись из полученного текста с помощью пакета cutadapt (v1.12) (параметры --trim-n -n5 -m14), картирование на геном человека проводилось с использованием референсной сборки генома hg18 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.12/) с помощью пакета программ bowtie (v0.12.9) (параметры -n 0), аннотирование полученных результатов проводили с использованием аннотационных файлов баз данных Ensembl data annotations (<https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/biotypes.html>), miRBase v22.1 (<https://www.mirbase.org/>), piRBase v2 (<http://bigdata.ibp.ac.cn/piRBase/>) с помощью пакета программ featureCounts (v1.5.0) (параметры -g transcript_id -t miRNA -Q 10 -a hsa.mature.gtf (или другой файл аннотации)).

Статистическая обработка данных. Все расчёты статистической значимости результатов были проведены на данных трёх повторов независимых экспериментов. Если не указано другое, данные представлены в виде среднего со стандартным отклонением (SD). Методы статистического анализа включали использование двухвыборочного критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок, критерия Манна–Уитни, анализ дисперсии (ANOVA) для сравнения нескольких групп (с посттестом Даннетта). Для оценки трендов (значимости изменений переменной в ряду) использовался вариант ANOVA с проведением линейного анализа трендов. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для расчётов и построения графиков использовались программы GraphPad 8.3 («GraphPad Software», США) и MS Excel for MS Windows ver. 16.0 («Microsoft Software», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и характеристика ЭКВ из асцитических жидкостей. Образцы асцитической жидкости (N = 6) получали от больных раком яичника, проходивших лечение в отделении онкогинекологии ФГБУ «НМИЦ онкологии

имени Н.Н. Блохина». ЭКВ выделяли методом дифференциального центрифугирования по ранее описанной методике [27], полученные препараты валидировали в соответствии с рекомендациями ISEV [8]. Так, анализ размера и морфологии везикул проводили с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии. На рис. 1, а представлены наноразмерные мембранные структуры с типичной для экзосом формой «сдутых мячиков», характерной для данного типа исследования и пробоподготовки.

Размерное распределение и концентрацию препаратов ЭКВ измеряли методом анализа траектории движения наночастиц (рис. 1, б–в). Средний размер частиц варьировал от 118 до 158 нм при положении максимума (мода) от 72 до 92 нм. Средние значения по всем шести образцам ЭКВ, использованным в работе, для медианы и моды составляли 112 нм и 82 нм соответственно. Концентрация ЭКВ в образцах варьировала от 2,02 до $7,62 \times 10^{12}$ частиц/мл и в среднем составила $4,35 \times 10^{12}$ частиц/мл (рис. 1, б–в). Для подтверждения экзосомальной природы везикул был проанализирован уровень экзосомальных маркеров в препаратах ЭКВ методом вестерн-блоттинга. Для этой задачи согласно рекомендациям ISEV были выбраны несколько белков, принадлежащих к различным функциональным классам и имеющих различную внутриклеточную компартиментализацию, включая TSG-101 (коровый компонент комплекса ESCRT-I), тетраспанин CD9 и компонент плоских липидных рафтов флотиллин-2 (Flotillin-2). Помимо указанных белков, мы также проверили присутствие стоматина (Stomatin), белка липидных рафтов, ранее впервые обнаруженного нами в составе ЭКВ и предложенного в качестве нового экзосомального маркера [11, 27]. Белок PCNA был выбран в качестве отрицательного контроля – маркера белков клеточного происхождения, отсутствующего в ЭКВ. Как видно на рис. 1, г, полученные препараты ЭКВ характеризовались высоким содержанием всех экзосомальных маркеров и отсутствием белка PCNA, который детектировался в контроле – лизате клеток линии рака яичника, Ovarc8.

Сравнение методов выделения микроРНК из ЭКВ с помощью коммерческих наборов PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy и TERPIK. На первом этапе мы проводили сравнение трёх коммерческих наборов для выделения микроРНК – PureLink miRNA Isolation Kit («Thermo Fisher Scientific»), miRNeasy («Qiagen») и TERPIK («Thermo Fisher Scientific») из препаратов ЭКВ, выделенных из трёх образцов асцитических

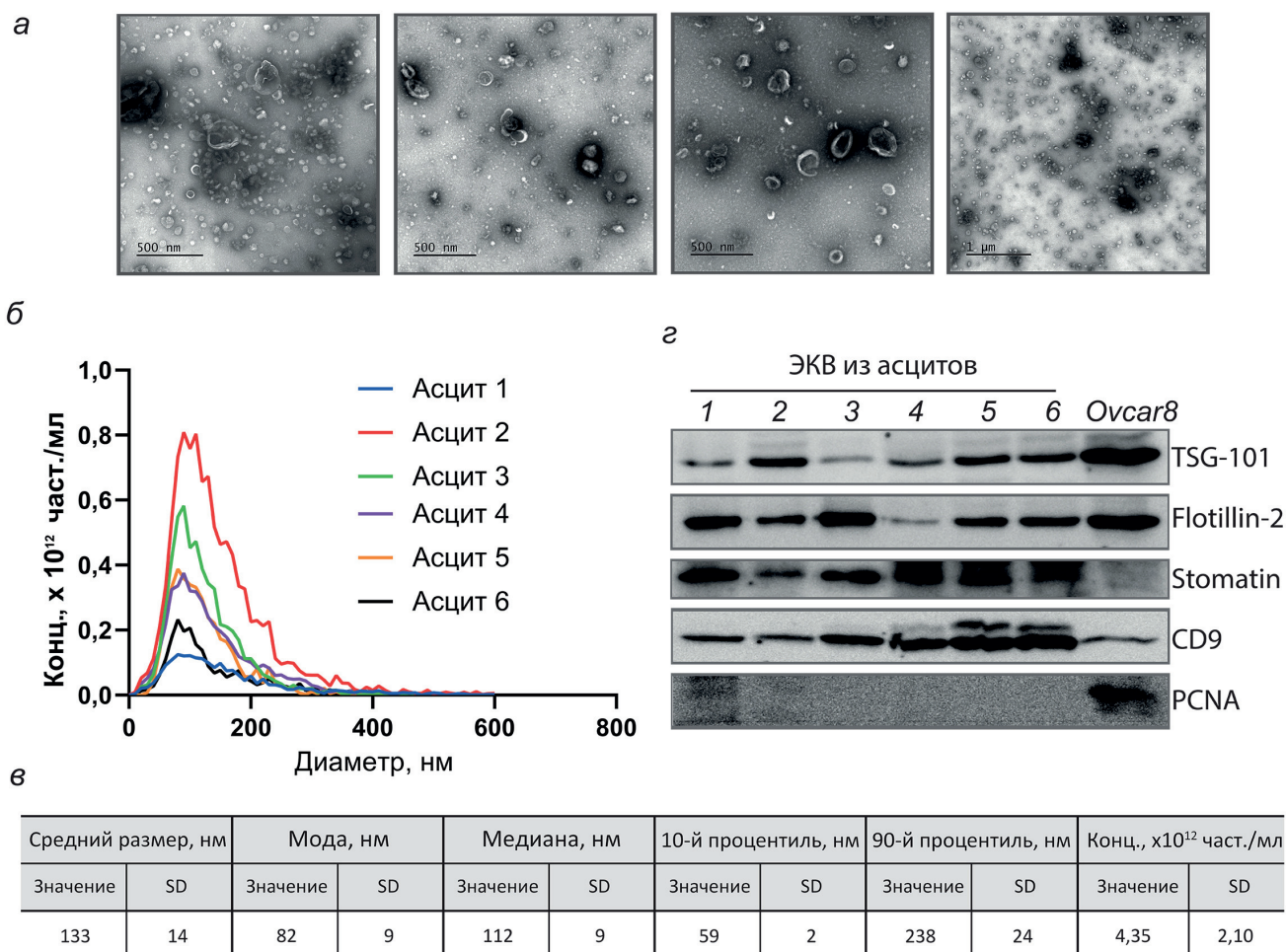


Рис. 1. Характеристики ЭКВ, выделенных из асцитической жидкости больных раком яичника. *а* – Примеры анализа размеров и морфологии везикул, полученных из асцитов 1–4, методом ТЭМ. Приведены масштабные отрезки 500 нм и 1 мкм. *б* – Спектры среднеразмерного распределения и концентрации частиц в образцах ЭКВ, полученных из асцитов 1–6, по данным NTA. *в* – Средние значения размерных характеристик и концентрации везикул в образцах ЭКВ, полученных из асцитов 1–6. *г* – Анализ представленности экзосомальных маркеров CD9, TSG101, Flotillin-2 и Stomatin в образцах ЭКВ, полученных из асцитов 1–6, методом иммуноблоттинга. PCNA – клеточный белок для контроля наличия в препаратах ЭКВ белков невезикулярного происхождения. Ovcar8 – лизат клеток линии рака яичника

жидкостей (асциты 1–3). Поскольку набор PureLink miRNA Isolation Kit изначально предназначен для выделения микроРНК из животных и растительных клеток, а также из бактерий и дрожжей, первым этапом его протокола является лизис клеток и связывание высвобожденных молекул РНК входящим в его состав буфером ВВ, что предполагает наличие сухого клеточного осадка. Однако подавляющее большинство методов выделения ЭКВ предполагает растворение везикул в буфере PBS, в котором везикулы сохраняют свои физико-химические свойства, морфологические характеристики и биологическую активность, что необходимо для последующей верификации ЭКВ и подтверждения их биологической природы (методами электронной микроскопии, NTA или динамического светорассеивания и др.), а также их функционального анализа. В связи с этим набор PureLink miRNA Isolation Kit применялся нами

в двух вариантах первого этапа методики, для чего использовали аликвоты препаратов ЭКВ, выделенных из одних и тех же образцов асцитической жидкости. Для этого осадки ЭКВ в каждом случае параллельно получали из двух равных объёмов каждого из образцов асцитической жидкости, один из которых растворяли в 80 мкл лизирующего буфера ВВ (препараты PL_BB), а второй – в 80 мкл буфера PBS (препараты PL_PBS). В обоих случаях 60 мкл были доведены буфером ВВ до 200 мкл и использованы для выделения РНК. В наборе TERPIK предусмотрена возможность использования дополнительной процедуры (вторая колонка) для обогащения конечного препарата малыми РНК. Мы использовали для сравнения оба протокола: как с использованием 1 колонки (выделение тотальной РНК, препараты TERPIK_1к), так и с использованием 2 колонок (выделение преимущественно малых РНК, препараты TERPIK_2к).

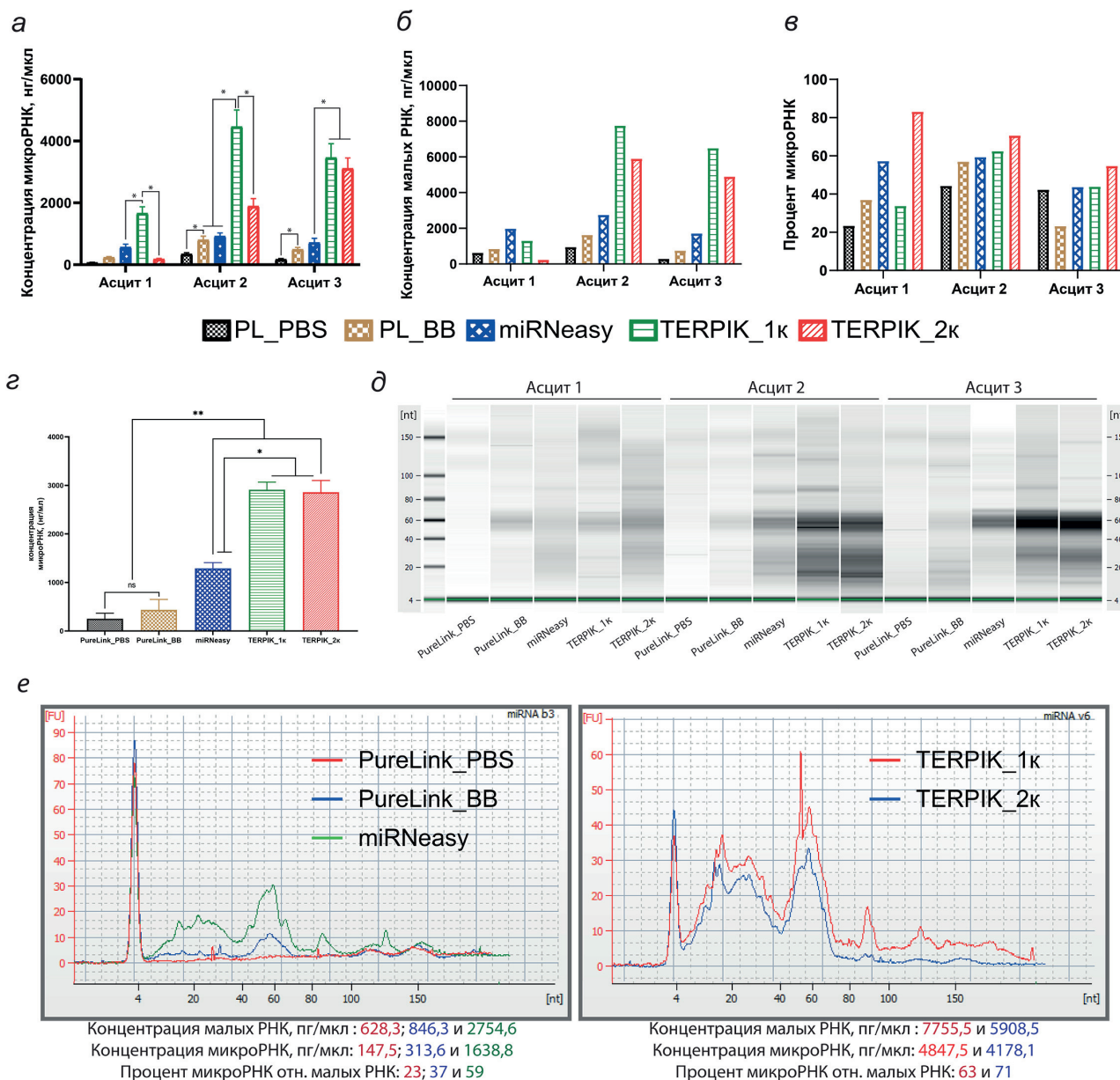


Рис. 2. Анализ концентрации микроРНК, выделенных с помощью наборов PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy и TERPIK из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости больных раком яичника (образцы 1–3). *а* – Анализ концентрации микроРНК в препаратах, полученных из ЭКВ асцитов 1–3, с использованием набора Qubit™ microRNA Assay Kit. *б–в* – Анализ концентрации малых РНК и содержания микроРНК по данным биоанализатора Bioanalyzer. *г* – Сравнение усреднённых значений концентрации микроРНК в препаратах, полученных из всех образцов ЭКВ с помощью различных методов выделения, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *д* – Микроэлектрофореграммы, полученные с помощью Bioanalyzer 2100, для всех исследуемых образцов. *е* – Пример результатов анализа – размерного распределения и концентрации малых РНК – в препаратах, полученных с помощью различных методов выделения из образца ЭКВ, выделенных из асцита 2. TERPIK_1к – набор TERPIK, протокол с использованием 1 колонки; TERPIK_2к – набор TERPIK, протокол с использованием 2 колонок; PL_BB – набор PureLink miRNA Isolation Kit, протокол с растворением сухого осадка ЭКВ в буфере производителя; PL_PBS – набор PureLink miRNA Isolation Kit, протокол с использованием ЭКВ в растворе PBS; miRNeasy – набор miRNeasy

Таким образом, из каждого образца асцитической жидкости было выделено 5 идентичных препаратов ЭКВ, из которых были получены с помощью указанных методик пять препаратов микроРНК: PL_PBS, PL_BB, miRNeasy, TERPIK_1к и TERPIK_2к.

Для оценки эффективности выделения микроРНК из образцов ЭКВ нами была из-

мерена концентрация микроРНК с помощью набора Qubit™ microRNA Assay Kit. Согласно полученным данным, наименьшей эффективностью выделения обладает набор PureLink miRNA Isolation Kit, причём из препарата везикул, растворённых в буфере PBS, РНК выделяется хуже, чем из изначально растворённых в буфере BB (рис. 2, *а*).

Использование двух других наборов, miRNeasy и TERPIK, показало более высокий «выход» малых РНК. Лучший результат по данному критерию показал набор TERPIK, причём в случае использования одной колонки (протокол TERPIK_1к) концентрация микроРНК по данным Qubit™ microRNA Assay Kit оказалась выше (в среднем в 5,25 раз), чем при использовании дополнительного этапа (протокол TERPIK_2к).

Следующим шагом был анализ размерного распределения малых РНК методом капиллярного микроэлектрофореза с помощью чипов Small RNA kit для биоанализатора Bioanalyzer 2100 («Agilent Technologies»). Результаты анализа, включая концентрацию малых РНК, процентную долю микроРНК, микроэлектрофореграммы и примеры спектров размерного распределения, представлены на рис. 2, б–е. Как по данным биоанализатора (рис. 2, б–в), так и по данным, полученным с помощью Qubit™ microRNA Assay Kit (рис. 2, а, г), набор PureLink miRNA Isolation Kit, основанный на сорбционном методе экстракции, уступает наборам, использующим фенол-хлороформный протокол (miRNeasy и TERPIK), не только по совокупному количеству полученной РНК, но и по качеству препаратов, поскольку даже вариант с лизированием сухого осадка ЭКВ в буфере BB (PureLink_BB) демонстрирует маловыраженные пики как в размерной области микроРНК (18–25 нт), так и в области молекул РНК большего размера (рис. 2, д, е). Результаты, полученные с использованием наборов miRNeasy и TERPIK, показали широкий размерный спектр малых РНК, включая пик около 23 нуклеотидов, соответствующий микроРНК, и высокую эффективность выде-

ления. Соотношение эффективности выделения наборами miRNeasy и TERPIK по каждому из используемых критериев оценки несколько варьировало в зависимости от образца, при этом по совокупности критериев однозначных преимуществ между этими наборами не выявлено. Интересно, что дополнительная стадия обогащения препарата малыми РНК в наборе TERPIK (протокол TERPIK_2к) не привела к достоверному увеличению фракции микроРНК в полученных образцах, однако снизила общий выход микроРНК согласно данным биоанализатора в среднем в 1,63 раза, а малых РНК – в 2,72, в связи с чем мы отказались от использования этой модификации в дальнейшем.

Чтобы изучить влияние методов выделения на профиль экзосомальных РНК, было проведено глубокое секвенирование нового поколения (NGS) транскриптома малых РНК (small RNA-seq) в трёх образцах, выделенных из одного асцита (асцит 2) тремя вариантами: PL_PBS, miRNeasy и TERPIK_1к. Далее был проведён биоинформационный анализ полученных данных (не менее 5 млн прочтений на образец), включавший в себя картирование на геном человека (с использованием референсной сборки генома hg18, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.12/) с помощью пакета программ bowtie (v0.12.9) и аннотирование полученных результатов с использованием аннотационных файлов баз данных Ensembl data annotations (<https://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/biotypes.html>), miRBase v22.1 (<https://www.mirbase.org/>), piRBase v2 (<http://bigdata.ibp.ac.cn/piRBase/>) с помощью пакета программ featureCounts (v1.5.0). Анализ показал присутствие в ЭКВ различных видов РНК, включая регуляторные РНК,

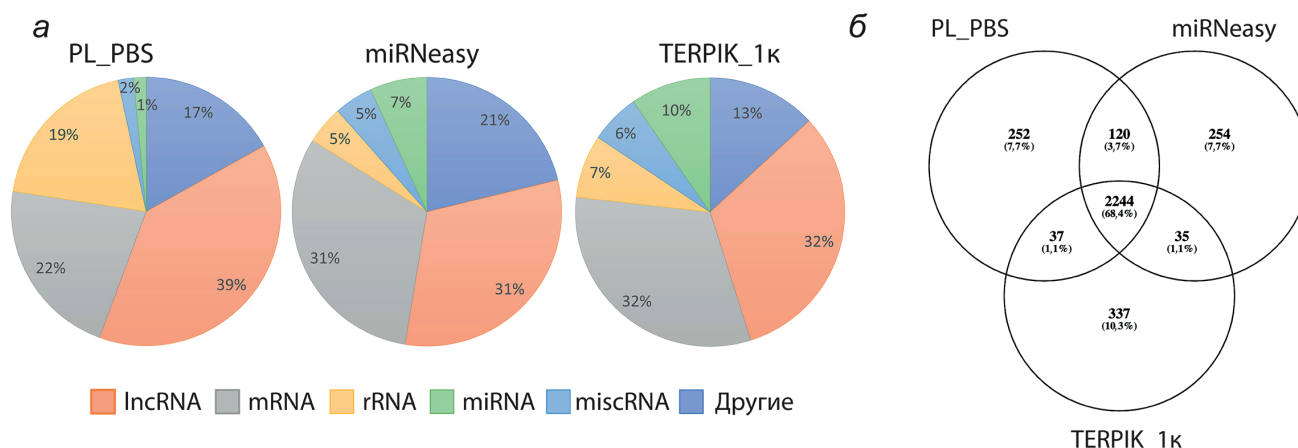


Рис. 3. Состав и процентное содержание различных классов малых РНК по данным глубокого секвенирования (small RNAseq). а – Среднее значение процентного соотношения малых РНК различных классов, включая содержание микроРНК, в препаратах, полученных с помощью различных методов выделения из асцита 2. б – Диаграмма Венна, отражающая пересечение профилей микроРНК при использовании различных методов выделения

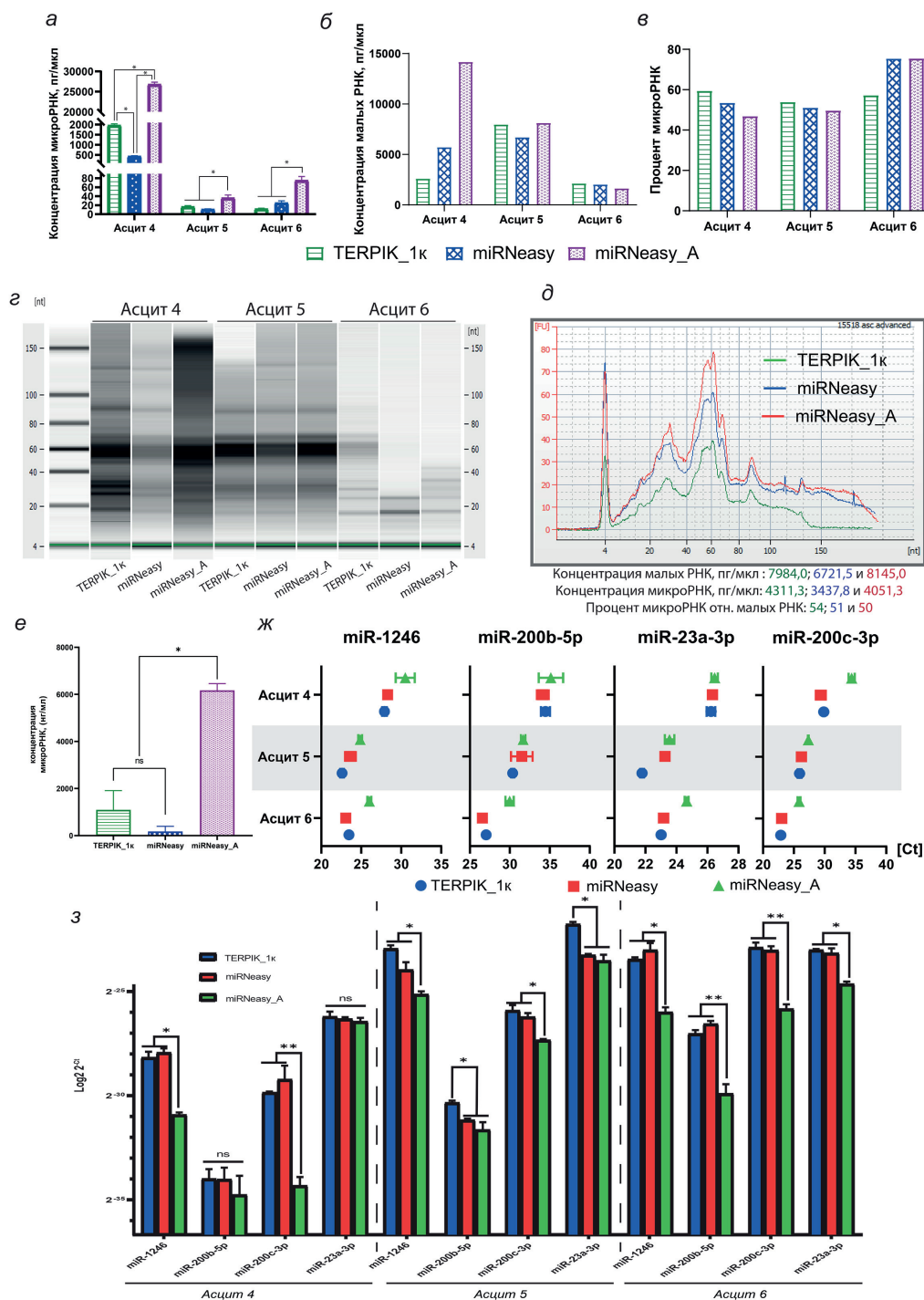


Рис. 4. Анализ концентрации микроРНК, выделенных с помощью наборов miRNeasy, TERPIK и miRNeasy_A из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости больных раком яичника (образцы 4–6). *а* – Анализ концентрации микроРНК в препаратах, полученных из ЭКВ асцитов 4–6, с использованием «Qubit™ microRNA Assay Kit»; *б–в* – анализ концентрации малых РНК и содержания микроРНК по данным биоанализатора Bioanalyzer 2100; *г* – результаты микроэлектрофореграммы, полученные с помощью Bioanalyzer 2100 для всех исследуемых образцов; *д* – пример результатов анализа (размерного распределения и концентрации малых РНК) в препаратах, полученных с помощью различных методов выделения из образца ЭКВ, выделенных из асцита 5; *е* – сравнение усреднённых значений концентрации микроРНК в препаратах, полученных из всех образцов ЭКВ с помощью различных методов выделения, * $p < 0,05$; *ж* – средние значения Ct четырёх эндогенных микроРНК в образцах ЭКВ, выделенных из образцов 4–6; *з* – сравнение уровней микроРНК, выделенных тремя вышеперечисленными наборами в образцах ЭКВ асцитов 4–6. По оси ординат представлено сравнение экспрессии (2^{-Ct}) проанализированных микроРНК (на \log_2 шкале). Данные размерного распределения показали широкий спектр малых РНК, присутствующих в ЭКВ, полученных с использованием всех исследуемых наборов, включая пик в районе 23 нуклеотидов, соответствующий микроРНК. Микроэлектрофореграмма для всех образцов приведена на рис. 4, *г*, пример сравнения гистограмм размерного распределения малых РНК для ЭКВ из асцита 5 – на рис. 4, *д*. Таким образом, несмотря на больший «выход» малых РНК при использовании набора «miRNeasy_A» (статистически достоверные различия по суммарной выборке образцов представлены на рис. 4, *е*), этот набор не показал преимуществ по содержанию микроРНК.

такие как длинные некодирующие РНК (Long non-coding RNAs, lncRNA), микроРНК (miRNA), малые ядерные РНК (Small nuclear RNA, snRNA), малые ядрышковые РНК (Small nucleolar RNA, snoRNA), пивиРНК (piwi-interacting RNA, piwiRNA), а также короткие фрагменты кодирующих и структурных РНК, таких как рРНК, мРНК, различные псевдогены и др. (рис. 3, а).

Процент микроРНК в общем пуле малых РНК по данным секвенирования в среднем составлял 6%, максимальное значение – 10% микроРНК – было получено при использовании набора TERPIK. Интересно, что несмотря на низкую эффективность выделения РНК методом PL_PBS, этот образец на 68% перекрывался по составу микроРНК с образцами, выделенными фенол-хлороформными методами (рис. 3, б), хотя в них доля этой фракции заметно выше: 7% и 10% против 1% (рис. 3, а). Также следует отметить, что в препарате, выделенном набором PL_PBS, наблюдается повышенное содержание рРНК по сравнению с наборами miRNeasy и TERPIK.

Таким образом, по итогам сравнения наиболее эффективными в отношении количества выделяемых малых РНК и содержания микроРНК по данным биоанализатора и результатам секвенирования оказались наборы miRNeasy и TERPIK, причём однозначных преимуществ при сравнении двух данных наборов между собой по результатам анализа ЭКВ из трёх образцов асцитической жидкости выявлено не было.

Сравнение методов выделения микроРНК из ЭКВ с помощью коммерческих наборов miRNeasy, miRNeasy_A и TERPIK. На втором этапе работы мы добавили в сравнение набор miRNeasy_A, который, как и PureLink miRNA Isolation Kit, не имеет в своём составе фенола – выделение включает гуанидин-тиоцианатный метод экстракции с последующей адсорбцией нуклеиновых кислот на кремниевой поверхности стекловолоконных колонок, заменив им набор PureLink miRNA Isolation Kit в связи с выявленной низкой эффективностью данного набора. Соответственно, сравнение включало наборы miRNeasy, miRNeasy_A и TERPIK (протокол «TERPIK_1к»). Для сравнения использовали дополнительные образцы ЭКВ, полученные из трёх других асцитов (асциты 4–6). По результатам анализа концентрации набор «miRNeasy_A» продемонстрировал наибольший «выход» для всех исследованных образцов. Так, средняя концентрация микроРНК, измеренная с помощью набора Qubit™ microRNA Assay Kit, в препаратах, полученных с помощью «miRNeasy_A», была в 7,2 раз выше таковой для

набора «TERPIK» и в 11,4 раз – для «miRNeasy» (рис. 4, а). Любопытно, что такая закономерность не сохранялась при определении концентрации микроРНК на биоанализаторе (рис. 4, б–г). Так, несмотря на то что количество малых РНК в целом при использовании «miRNeasy_A» было несколько выше (рис. 4, б, асциты 4 и 5), содержание микроРНК во всех случаях было приблизительно равное или даже меньше (рис. 4, в, асциты 4 и 5), чем при использовании набора «TERPIK». При этом различия в проценте микроРНК по отношению к общему пулу малых РНК при выделении разными наборами среди всей выборки образцов были статистически не значимы ($p > 0,05$).

Далее мы провели сравнение эффективности количественного анализа индивидуальных микроРНК в образцах, полученных с помощью исследуемых коммерческих наборов. Для оценки были выбраны четыре эндогенных микроРНК, присутствующие на высоком уровне, согласно нашим ранее опубликованным данным [10] и данным литературы [29, 30], как в тканях, так и в ЭКВ при раке яичников: hsa-miR-1246, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200c-3p и hsa-miR-23a-3p. Сравнение концентрации данных молекул проводили с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием модификации «петля-на-стержне» (Stem-Loop-RT-qPCR). Результаты анализа показали широкий диапазон представленности этих микроРНК в исследуемых образцах, при этом наибольший уровень детектировался в препаратах, полученных с помощью наборов «TERPIK_1к» и «miRNeasy» (рис. 4, ж, з), в то время как в образцах, выделенных методом «miRNeasy_A», несмотря на самую высокую концентрацию малых РНК в исходных препаратах, все исследуемые микроРНК детектировались на более поздних циклах амплификации.

Таким образом, добавленный в сравнение метод с использованием набора miRNeasy_A по совокупности критериев оценки не показал преимуществ в сравнении с наборами TERPIK и miRNeasy, а по отдельным из них, таким как содержание микроРНК и концентрация индивидуальных микроРНК, даже в среднем уступал этим двум наборам.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что наборы, основанные на гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформном методе экстракции, дают лучшие результаты по сравнению с содержащими только хаотропные агенты (гуанидин-тиоцианат). Соответственно, оптимальными методиками можно считать использование наборов TERPIK и miRNeasy.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что на сегодняшний день существует множество методик выделения РНК и достигнут определённый прогресс в их развитии, согласно данным NIH Extracellular RNA Communication Consortium, ни одна из них не может быть выдвинута в качестве наиболее эффективной для изоляции внеклеточных РНК, и работы по разработке и оптимизации новых подходов к решению этой задачи должны быть продолжены [31].

Для защиты от действия различных рибонуклеаз и фосфодиэстераз, обнаруживаемых в большинстве биологических жидкостей, внеклеточные микроРНК либо образуют комплексы с белками и липопротеинами, либо находятся в составе ЭКВ, в частности экзосом, которые ограждают их от действия ферментов. По данным ряда исследований, экзосомы являются основными транспортёрами внеклеточных нуклеиновых кислот и, в частности, микроРНК, в биологических жидкостях, таких как кровь, моча, слюна [32, 33]. В то же время, по данным других исследований, содержание микроРНК в экзосомах может быть достаточно низким, не превышая одной копии каждой из индивидуальных молекул микроРНК на одну везикулу [13]. Однако учитывая высокое содержание самих экзосом в биологических жидкостях — в среднем 10^8 – 10^{12} на мл крови [12, 32] — очевидно, что общее количество переносимых в составе ЭКВ молекул является очень высоким.

Мембраны ЭКВ обогащены липидами в различных сочетаниях: так, мембраны экзосом обогащены холестерином, фосфотидилсеринном церамидом и сфингомиелином — липидами, обнаруживаемыми в составе мембранных микродоменов, — участков мембран, устойчивых к действию неионогенных детергентов [34–36], а мембраны микровезикул в большей степени обогащены лизофосфотидилхолинами, сфингомиелином и ацилкарнитинами [37, 38]. Высокое содержание липидов и липопротеинов в ЭКВ, а также значительно более высокое по сравнению с клетками соотношение площади поверхности мембраны к содержимому везикулы обуславливают дополнительную сложность в их эффективном лизировании для разрушения мембран, диссоциации комплексов микроРНК с различными биомолекулами и удаления самих липидов и протеинов на финальном этапе получения препарата. В зависимости от успешности этой процедуры профиль полученных препаратов может широко варьировать, поскольку разные по составу микроРНК обладают разным сред-

ством к различным белкам и липопротеинам. Например, было показано, что в зависимости от объёма исходного образца плазмы менялся GC-состав полученных из неё микроРНК [39].

В настоящее время ситуация с методами выделения РНК из ЭКВ ещё менее понятна, чем с выделением свободно циркулирующих молекул из биологических жидкостей, поскольку, как уже говорилось, исследований, в которых проводились подобные сравнения, на порядок меньше. Так, среди многих десятков статей, посвящённых анализу методов выделения микроРНК из тканей и биологических жидкостей, нам удалось найти лишь семь аналогичных работ по методам выделения РНК из ЭКВ. Одна из них была посвящена выбору оптимального метода выделения микроРНК из экзосом, содержащихся в моче [18], в других работах сравнивались методы экстракции РНК из плазмы и сыворотки крови, а также из кондиционированной среды культивируемых клеток [15, 19–23]. ЭКВ из других биологических жидкостей с точки зрения выделения микроРНК ранее не исследовались, хотя происхождение ЭКВ существенно влияет на состав полученных препаратов, поскольку в разной степени контаминирует образцы ЭКВ липопротеиновыми комплексами, крупными протеиновыми агрегатами, рибонуклеопротеинами и другими частицами со сходными с ЭКВ физическими характеристиками. Кроме того, ЭКВ в составе биологических жидкостей являются производными клеток и тканей различного происхождения, и в зависимости от биологического источника характеризуются большой гетерогенностью по размерам, морфологии и молекулярному составу [11, 40, 41], что также влияет на эффективность выделения РНК.

Несмотря на то что авторы всех приведённых выше работ сходятся на том, что оптимизация этапа выделения нуклеиновых кислот является важнейшим аспектом исследования РНК, и в особенности микроРНК, так как в большей степени влияет на последующие результаты анализа, в остальном же данные различных работ в сильной степени варьируют, прежде всего потому, что сильно разнятся наборы, используемые в сравнении. Наиболее часто включаемым в сравнение набором для выделения микроРНК является набор miRNeasy.

Большинство современных методов выделения микроРНК основаны на фенол-хлороформ-гуанидин тиоцианатном методе экстракции, которая позволяет разделить липиды, белки и нуклеиновые кислоты между органической и неорганической фазами. Данный метод может быть усовершенствован добавлением

ем стадии осаждения микроРНК на колонках из стекловолокна, как это сделано в наборах miRNeasy, miRVANA и TERPIK. В случае последнего набора также используется дополнительная стадия лизиса ЭКВ в β -меркаптоэтанол-содержащем буфере, хотя для двух других наборов стадия лизиса протекает непосредственно в фенол-содержащем буфере. К недостаткам данного метода можно отнести временную затратность, высокую токсичность используемых реагентов и частичную потерю РНК с низким содержанием гуанидина и цитозина [42]. При другом, не содержащем фенола, подходе к выделению микроРНК используется ГТЦ в качестве хаотропного агента, а дальнейшая экстракция основана на взаимодействии между функциональными группами нуклеиновых кислот и твёрдыми сорбентами при определённых условиях. Он лежит в основе наборов PureLink miRNA Isolation Kit и miRNeasy_A, где РНК экстрагируется на колонках со стекловолокном, причём производитель набора miRNeasy_A гарантирует лизис содержащихся в плазме ЭКВ и высвобождение из них РНК. Ограничениями для подобного метода могут являться недостаточная диссоциация микроРНК-содержащих комплексов и ко-преципитация с содержащимися в биологических жидкостях биополимерами. Все исследуемые наборы предполагают использование гуанидин тиоцианата на начальной стадии, который обеспечивает разрушение гидрофобных связей и диссоциацию РНК-содержащих комплексов.

В недавнем обзоре был проведён анализ более 20 опубликованных экспериментальных статей, в которых сравнивались различные методики выделения РНК из биологических жидкостей, а также из ЭКВ, имеющих различное происхождение. Авторы обзора пришли к выводу, что наибольшей эффективностью в изоляции РНК обладает метод, основанный на гуанидин-фенол-хлороформной экстракции, хотя разные варианты протокола отличались по производительности по данным различных исследований [17].

В целом это совпадает и с результатами приведённых выше нескольких работ по сравнению отдельных методов выделения микроРНК из ЭКВ – в большинстве случаев оптимальные результаты получали с использованием набора miRNeasy Kit [15, 19, 21].

В нашем исследовании мы провели независимый анализ методов выделения микроРНК из препаратов ЭКВ с использованием четырёх наборов miRNeasy («Qiagen»), TERPIK («Thermo Fisher Scientific»), miRNeasy_A («Qiagen») и PureLink miRNA Isolation Kit

(«Thermo Fisher Scientific») с дополнительными вариантами в случае наборов PureLink miRNA Isolation Kit (варианты пробоподготовки ЭКВ) и TERPIK (варианты с использованием одной или двух колонок).

Набор miRNeasy был выбран в связи с тем, что, как было сказано выше, он довольно часто использовался в подобного рода сравнениях, достаточно хорошо себя зарекомендовал и мог использоваться в качестве «точки отсчета». Набор TERPIK использовался лишь в одной работе [22]. Исследований с использованием наборов miRNeasy_A («Qiagen») и PureLink miRNA Isolation Kit («ThermoFisher Scientific») для сравнения эффективности выделения циркулирующих внеклеточных микроРНК практически не проводилось, а в отношении их эффективности для выделения микроРНК из ЭКВ нами не было обнаружено ни одной статьи.

В данной работе для сравнения методов выделения микроРНК использовались препараты ЭКВ, полученные из образцов асцитической жидкости больных раком яичника. Выделение ЭКВ производили с помощью дифференциального ультрацентрифугирования – метода, рекомендованного ISEV [26]. Препараты были валидированы в соответствии с рекомендациями и критериями ISEV и характеризовались высокой концентрацией частиц (в среднем $4,35 \times 10^{12}$) характерного размера (30–150 нм) и морфологии, а также высоким уровнем экзосомальных маркеров. Образцы микроРНК, полученные с помощью исследуемых наборов, анализировались с использованием следующих критериев: концентрации микроРНК, детектируемой спектрофотометром Qubit с использованием набора для определения микроРНК, Qubit™ microRNA Assay Kit; размерного распределения и концентрации малых РНК, а также содержания молекул, соответствующих по размеру микроРНК, с использованием биоанализатора Bioanalyzer 2100 и чипа Small RNA kit; количества микроРНК по данным глубокого секвенирования транскриптома малых РНК; уровня детекции индивидуальных микроРНК (miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p и miR-23a-3p) методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Полученные нами результаты совпадают с данным других исследований в отношении набора miRNeasy, хотя данный набор не демонстрировал преимуществ по сравнению с набором TERPIK. Оба этих набора отличались наилучшим соотношением «выход/качество», причём использование TERPIK со стадией обогащения малыми РНК не приводило к существенному увеличению чистоты препарата, однако сильно сказывалась на его финальной

концентрации. Таким образом, по совокупности характеристик, включая концентрацию малых РНК, содержание микроРНК (по данным капиллярного микроэлектрофореза и результатам глубокого секвенирования) и эффективность амплификации индивидуальных микроРНК, данные наборы можно считать оптимальными для выделения микроРНК.

Набор PureLink miRNA Isolation Kit характеризовался наихудшими результатами по всем исследуемым критериям, что, по-видимому, связано с недостаточной эффективностью первого этапа выделения. Так, критически важной стадией при выделении РНК из ЭКВ представляется лизис их мембран и диссоциация РНК-белковых комплексов. Интересно, что при использовании стандартных препаратов ЭКВ (разведение везикул в фосфатно-солевом буфере) наблюдалось ещё большее падение как концентрации выделенной РНК, так и качества полученных препаратов. Однако даже в случае использования исключительно буфера производителя (BB), для чего необходимо было дополнительно получать отдельную «порцию» ЭКВ в виде сухого осадка специально для выделения РНК с отсутствием возможности оценить размер и морфологию везикул, полученные препараты показали худшие результаты для всех образцов ЭКВ по сравнению с другими наборами.

Интересно, что основанный на сходном принципе (лизирующий буфер, не содержащий фенола, и колонки с твёрдым сорбентом) набор miRNeasy_A продемонстрировал наибольший выход РНК, свидетельствующий о более результативном выделении и стабилизации РНК, но наименьшую эффективность амплификации всех четырёх исследованных микроРНК. Это может быть связано с обогащением молекулами или фрагментами молекул сходного с микроРНК размера, образовавшимися после сверхуспешного лизиса, либо с «предпочтительным» выделением микроРНК того или иного определённого нуклеотидного состава, что могло привести к снижению доли микроРНК «стандартного» состава. Такого рода феномен – влияние метода и условий выделения на состав микроРНК и типы образуемых ими комплексов с различными биомолекулами – ранее были показаны как для микроРНК, выделяемых из тканей, так и для свободно циркулирующих микроРНК [39, 43].

Также важно отметить, что согласно результатам анализа методом ОТ-ПЦР в реальном времени, все 4 микроРНК – miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p и miR-23a-3p, которые как по данным литературы [29, 30], так и

по нашим ранее опубликованным данным [10], ассоциированы с патогенезом рака яичника, оказались представлены на высоком уровне в ЭКВ, полученных из асцитической жидкости больных раком яичника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на активное развитие направления, связанного с использованием ЭКВ в качестве источника биомаркеров, в том числе микроРНК-маркеров, для диагностики онкозаболеваний, использование данного подхода в клинической практике на сегодняшний день лимитируется рядом проблем, важнейшие из которых связаны с отсутствием «золотых стандартов» как выделения самих ЭКВ из биологических жидкостей, так и методов анализа их молекулярного содержания, включая методы выделения и анализа микроРНК. При этом в отличие от методов выделения свободно циркулирующих микроРНК из биологических жидкостей, сравнению методов выделения микроРНК из ЭКВ посвящены лишь единичные исследования. В данной работе мы впервые сравнили эффективность выделения микроРНК из ЭКВ, содержащихся в асцитической жидкости больных раком яичника. В исследование включены коммерческие наборы для выделения микроРНК: miRNeasy («Qiagen»), TERPIK («Thermo Fisher Scientific»), miRNeasy_A («Qiagen») и PureLink miRNA Isolation Kit («Thermo Fisher Scientific»). По совокупности оцениваемых критериев – концентрации малых РНК, концентрации микроРНК и их процентному содержанию в полученных препаратах, а также по эффективности амплификации индивидуальных микроРНК при анализе методом ОТ-ПЦР в реальном времени – оптимальными наборами можно считать TERPIK и miRNeasy.

Вклад авторов. Г.О. Скрыбин – экспериментальные исследования: получение первичных данных, статистический анализ результатов, оформление иллюстраций, написание статьи; С.В. Винокурова – дизайн экспериментов по анализу индивидуальных микроРНК; Н.В. Елкина – экспериментальные исследования: разработка праймеров для анализа микроРНК, отработка условий для метода «StemLoop RT-PCR»; Д.А. Денисова – экспериментальные исследования: анализ экзосомальных маркеров, анализ микроРНК; А.А. Беляева – экспериментальные исследования: анализ траектории движения наночастиц;

К.И. Жордания – забор клинических образцов асцитической жидкости; Д.В. Багров – экспериментальные исследования: трансмиссионная электронная микроскопия; А.Д. Еникев – экспериментальные исследования: анализ размерного распределения и концентрации микроРНК; С.А. Галецкий – экспериментальные исследования: выделение экзосом из асцитической жидкости; А.В. Комельков – биоинформационный анализ данных глубокого секвенирования; Г.И. Краснощекова – клинико-морфологическая характеристика клинических образцов; Е.М. Чевкина – дизайн исследования, анализ литературных данных, анализ полученных результатов, редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00373).

Благодарности. Измерения методом ТЭМ выполнены на базе Центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» биологического факультета МГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsui, N. B., Ng, E. K., and Lo, Y. D. (2002) Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma, *Clin. Chem.*, **48**, 1647-1653, doi: 10.1093/clinchem/48.10.1647.
2. Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., et al. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5003-5008, doi: 10.1073/pnas.1019055108.
3. Geekiyanage, H., Rayatpisheh, S., Wohlschlegel, J. A., Brown, R., and Ambros, V. (2020) Extracellular microRNAs in human circulation are associated with miRISC complexes that are accessible to anti-AGO2 antibody and can bind target mimic oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 24213-24223, doi: 10.1073/pnas.2008323117.
4. Michell, D. L., and Vickers, K. C. (2016) Lipoprotein carriers of microRNAs, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 2069-2074, doi: 10.1016/j.bbali.2016.01.011.
5. O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., and Breakefield, X. O. (2020) RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 585-606, doi: 10.1038/s41580-020-0251-y.
6. Li, C., Zhou, T., Chen, J., Li, R., Chen, H., et al. (2022) The role of exosomal miRNAs in cancer, *J. Translat. Med.*, **20**, 6, doi: 10.1186/s12967-021-03215-4.
7. Florijn, B. W., Duijs, J. M. G. J., Levels, J. H., Dallinga-Thie, G. M., Wang, Y., et al. (2019) Diabetic nephropathy alters the distribution of circulating angiogenic microRNAs among extracellular vesicles, HDL, and Ago-2, *Diabetes*, **68**, 2287-2300, doi: 10.2337/db18-1360.
8. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J. Extracell. Vesicles*, **7**, 1535750, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
9. Dilsiz, N. (2020) Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer, *Fut. Sci. OA*, **6**, FSO465, doi: 10.2144/fsoa-2019-0116.
10. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Zhordania, K. I., Bagrov, D. V., Vinokurova, S. V., et al. (2022) Extracellular vesicles from uterine aspirates represent a promising source for screening markers of gynecologic cancers, *Cells*, **11**, 1064, doi: 10.3390/cells11071064.
11. Skryabin, G. O., Vinokurova, S. V., Galetsky, S. A., Elkin, D. S., Senkovenko, A. M., et al. (2022) Isolation and characterization of extracellular vesicles from gastric juice, *Cancers*, **14**, 3314, doi: 10.3390/cancers14143314.
12. Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., et al. (2014) Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers, *Philos. Transact. R. Soc. B Biol. Sci.*, **369**, 20130502, doi: 10.1098/rstb.2013.0502.
13. Tosar, J. P., and Cayota, A. (2018) Detection and analysis of non-vesicular extracellular RNA, *Methods Mol. Biol.*, **1740**, 125-137, doi: 10.1007/978-1-4939-7652-2_10.
14. Yuana, Y., Levels, J., Grootemaat, A., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2014) Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation, *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 23262, doi: 10.3402/jev.v3.23262.

15. Martínez-González, E., Brochado-Kith, Ó., Gómez-Sanz, A., Martín-Carbonero, L., Jimenez-Sousa, M. Á., et al. (2020) Comparison of methods and characterization of small RNAs from plasma extracellular vesicles of HIV/HCV coinfecting patients, *Sci. Rep.*, **10**, 11140, doi: 10.1038/s41598-020-67935-1.
16. Zhang, N., Hu, G., Myers, T. G., and Williamson, P. R. (2019) Protocols for the analysis of microRNA expression, biogenesis, and function in immune cells, *Curr. Protoc. Immunol.*, **126**, e78, doi: 10.1002/cpim.78.
17. Bryzgunova, O., Konoshenko, M., Zaporozhchenko, I., Yakovlev, A., and Laktionov, P. (2021) Isolation of cell-free miRNA from biological fluids: influencing factors and methods, *Diagnostics*, **11**, 865, doi: 10.3390/diagnostics11050865.
18. Channavajjhala, S. K., Rossato, M., Morandini, F., Castagna, A., Pizzolo, F., et al. (2014) Optimizing the purification and analysis of miRNAs from urinary exosomes, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **52**, 345-354, doi: 10.1515/cclm-2013-0562.
19. El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F., and Berchem, G. (2016) Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material, *Sci. Rep.*, **6**, 19529, doi: 10.1038/srep19529.
20. Moldovan, L., Batte, K., Wang, Y., Wisler, J., and Piper, M. (2013) Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR, *Methods Mol. Biol.*, **1024**, 129-145, doi: 10.1007/978-1-62703-453-1_10.
21. Meerson, A., and Ploug, T. (2016) Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation, *Biol. Methods Protocols*, **1**, bpw003, doi: 10.1093/biomethods/bpw003.
22. Tang, Y.-T., Huang, Y.-Y., Zheng, L., Qin, S.-H., Xu, X.-P., et al. (2017) Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum, *Int. J. Mol. Med.*, **40**, 834-844, doi: 10.3892/ijmm.2017.3080.
23. Eldh, M., Lötvall, J., Malmhäll, C., and Ekström, K. (2012) Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods, *Mol. Immunol.*, **50**, 278-286, doi: 10.1016/j.molimm.2012.02.001.
24. Záveský, L., Jandáková, E., Weinberger, V., Minář, L., Hanzíková, V., et al. (2019) Ascites-derived extracellular microRNAs as potential biomarkers for ovarian cancer, *Reproduct. Sci.*, **26**, 510-522, doi: 10.1177/1933719118776808.
25. Schindler, P., Kupcinskas, J., Juzenas, S., Skieceviciene, J., Salteniene, V., et al. (2018) Expression of microRNAs in the ascites of patients with peritoneal carcinomatosis and peritonitis, *Cancer Cytopathol.*, **126**, 353-363, doi: 10.1002/cncy.21966.
26. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **3**, 3.22.1-3.22.29, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
27. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Galetsky, S. A., Bagrov, D. V., Evtushenko, E. G., et al. (2021) Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker, *J. Cell. Biochem.*, **122**, 100-115, doi: 10.1002/jcb.29834.
28. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., et al. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e179, doi: 10.1093/nar/gni178.
29. Xu, Y. F., Hannafon, B. N., Khatri, U., Gin, A., and Ding, W. Q. (2019) The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells, *RNA Biol.*, **16**, 770-784, doi: 10.1080/15476286.2019.1585738.
30. Savolainen, K., Scaravilli, M., Ilvesmäki, A., Staff, S., Tolonen, T., et al. (2020) Expression of the miR-200 family in tumor tissue, plasma and urine of epithelial ovarian cancer patients in comparison to benign counterparts, *BMC Res. Notes*, **13**, 311, doi: 10.1186/s13104-020-05155-6.
31. Laurent, L. C., Abdel-Mageed, A. B., Adelson, P. D., Arango, J., Balaj, L., et al. (2015) Meeting report: discussions and preliminary findings on extracellular RNA measurement methods from laboratories in the NIH extracellular RNA communication consortium, *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 26533, doi: 10.3402/jev.v4.26533.
32. Fernando, M. R., Jiang, C., Krzyzanowski, G. D., and Ryan, W. L. (2017) New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes, *PLoS One*, **12**, e0183915, doi: 10.1371/journal.pone.0183915.
33. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., and Illei, G. G. (2012) The Majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes, *PLoS One*, **7**, e30679, doi: 10.1371/journal.pone.0030679.
34. Van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 213-228, doi: 10.1038/nrm.2017.125.
35. Record, M., Carayon, K., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 108-120, doi: 10.1016/j.bbali.2013.10.004.
36. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Savelyeva, E. E., and Tchekvina, E. M. (2020) Lipid rafts in exosome biogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 177-191, doi: 10.1134/S0006297920020054.
37. Frey, B., and Gaipl, U. S. (2011) The immune functions of phosphatidylserine in membranes of dying cells and microvesicles, *Semin. Immunopathol.*, **33**, 497-516, doi: 10.1007/s00281-010-0228-6.
38. Kastelowitz, N., and Yin, H. (2014) Exosomes and microvesicles: identification and targeting by particle

- size and lipid chemical probes, *ChemBioChem*, **15**, 923-928, doi: 10.1002/cbic.201400043.
39. Monleau, M., Bonnel, S., Gostan, T., Blanchard, D., Cournaud, V., et al. (2014) Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells, *BMC Genomics*, **15**, 395, doi: 10.1186/1471-2164-15-395.
40. Yuana, Y., Koning, R. I., Kuil, M. E., Rensen, P. C. N., Koster, A. J., et al. (2013) Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma, *J. Extracell. Vesicles*, **2**, 21494, doi: 10.3402/jev.v2i0.21494.
41. Zabeo, D., Cvjetkovic, A., Lässer, C., Schorb, M., Lötvall, J., et al. (2017) Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology, *J. Extracell. Vesicles*, **6**, 1329476, doi: 10.1080/20013078.2017.1329476.
42. Kim, Y.-K., Yeo, J., Kim, B., Ha, M., and Kim, V. N. (2012) Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells, *Mol. Cell*, **46**, 893-895, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.036.
43. Brown, R. A. M., Epis, M. R., Horsham, J. L., Kabir, T. D., Richardson, K. L., et al. (2018) Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal, *BMC Biotechnol.*, **18**, 16, doi: 10.1186/s12896-018-0421-6.

COMPARISON OF METHODS FOR MICRORNA ISOLATION FROM EXTRACELLULAR VESICLES OBTAINED FROM ASCITIC FLUIDS

G. O. Skryabin¹, S. V. Vinokurova¹, N. V. Elkina¹, D. A. Denisova¹, A. A. Beliaeva^{1,2}, K. I. Zhordania³, D. V. Bagrov², A. D. Enikeev¹, S. A. Galetsky¹, A. V. Komelkov^{1*}, G. I. Krasnoshekhova³, and E. M. Tchevkina¹

¹ Institute of Carcinogenesis, Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia; e-mail: komelkov@gmail.ru

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 111234 Moscow, Russia

³ Institute of Clinical Oncology, Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia

Secreted extracellular vesicles (EVs) contain active biomolecules, including miRNAs, the composition of which represents epigenetic changes occurring in cells during pathological processes, in particular, malignant transformation. The accumulated pool of data on the role of EVs in carcinogenesis has stimulated the study of EV-derived cancer markers. The most important factors limiting the development of this scientific direction are the lack of “gold standards” both for methods of EV isolating from biological fluids and for analyzing their molecular content, including the composition of miRNAs. Here we first examined the efficacy of various methods for small RNA isolation from EVs contained in ascitic fluid for subsequent miRNA analysis. Comparison of different commercial kits showed the advantages of methods based on phenol-chloroform extraction: Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit and miRNeasy Serum/Plasma Kit. Analysis of the small RNA transcriptome showed the presence of various classes of molecules in EVs, among which the proportion of miRNAs averaged 6%, reaching 10% with the Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit. The PureLink miRNA Isolation Kit demonstrated the lowest efficiency. The miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit showed the highest concentration of the small RNA fraction, miRNA proportion of which, however, did not exceed that of the miRNeasy Serum/Plasma Kit and Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit. Moreover, RT-PCR analysis of individual molecules showed lower levels of each of miRNAs investigated — miR-1246, miR-200b-5p, miR-200c-3p, and miR-23a-3p — when using the miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit. In sum, Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit and miRNeasy Serum/Plasma Kit can be considered to be the optimal kits in terms of the combination of studied characteristics, including small RNA concentration, percentage of microRNA according to bioanalyzer and sequencing results, and levels of individual miRNAs detected by RT-PCR.

Keywords: exosomes, miRNA, isolation methods, extracellular vesicles, miRNeasy Serum/Plasma Kit, Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit, PureLink miRNA Isolation Kit, miRNeasy Advanced Serum/Plasma Kit