

Płynna biopsja jako innowacyjna metoda w diagnostyce egzosomów u psów i kotów

Barbara Szczepankiewicz

z Katedry Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Biopsja chirurgiczna uważana jest za złoty standard w diagnostyce litych guzów nowotworowych. Badanie to oparte jest na morfologii zmiany nowotworowej. Jednak coraz więcej nowotworów profilowanych jest molekularnie, aby móc podjąć decyzję dotyczącą ich leczenia. Ponadto budowa molekularna zmiany, napędzana przez mikrośrodowisko guza, może dynamicznie zmieniać się w czasie. Biopsja chirurgiczna ma też ograniczoną dostępność kliniczną (np. biopsja nadnerczy), niekiedy nawet może spowodować szkodliwe komplikacje (np. biopsja nerki).

Przedstawione wady biopsji tkanek przyczyniły się do poszukiwania nowoczesnej diagnostyki molekularnej płynów ustrojowych (tzw. płynna biopsja). Materiałem do badań są wszystkie płyny organizmu: krew, mocz, mleko, siara, nasienie czy popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe. Technika ta jest mało inwazyjna i umożliwia wgląd w stan guza w czasie rzeczywistym. Ponadto w niektórych przypadkach umożliwia również diagnostykę heterogennego guza (lub wielu zmian przerzutowych). Kolejną zaletą jest częstotliwość wykonywania badań. Biopsję płynną można wykonywać z większą częstotliwością, np. przy okazji badań morfologicznych i biochemicznych krwi czy badania moczu.

Biopsje płynne zmian nowotworowych dzielą się na trzy główne kategorie oparte na materiale pochodzenia nowotworowego w płynach ustrojowych: diagnostyce krążącego DNA guza (circulating tumor DNA-ctDNA), krążących komórkach nowotworowych (circulating tumor cells-CTC) oraz na podstawie pochodzących z guza egzosomów i innych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (extracellular vesicles-EV). Wyzwaniem dla diagnostyki krążących komórek nowotworowych jest fakt, że niektóre nowotwory uwalniają tylko ograniczoną ich liczbę. Dlatego najbardziej obiecującym typem biopsji płynnej jest diagnostyka egzosomów (1).

Egzosomy

Egzosomy to pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, które po raz pierwszy zostały opisane w latach 40. XX wieku. Jednak przez kilkadziesiąt lat egzosomy nie cieszyły się zbyt dużą popularnością, ponieważ początkowo uważano je za cząsteczki usuwające zbędne produkty metabolizmu komórkowego. Jednak w połowie 2000 r. dokonano ważnego odkrycia dotyczącego egzosomów, który zmienił ten trend. Termin „egzosom” użyty został pierwszy raz przez Johnstone’a w roku 1987. Proces uwalniania tych cząstek wydawał się bowiem „podobny do odwrotnej endocytozy”, stąd powstała jego nazwa „egzosom”, co z greckiego „éksó” znaczy „na zewnątrz” (1).

Liquid biopsy as an innovative method in the diagnosis of exosomes in dogs and cats

Szczepankiewicz B., Department of Epizootiology and Clinic of Birds and Exotic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Wrocław University of Environmental and Life Sciences

The aim of this review was to assess the current applications of exosomes in veterinary medicine, particularly in dog and cat patients. Exosomes are extracellular vesicles derived from all types of cells and released into all biological fluids (blood, plasma, serum, urine, breast milk, colostrum). They contain proteins, nucleic acids, and lipids. Exosomes represent a potential sensitive biomarkers. Liquid biopsy offers itself as a non-invasive or minimally invasive, pain-free, time-saving alternative to conventional tissue biopsy. Exosomes find their major application in neoplastic diseases, but applications in the field of veterinary cardiology, nephrology, reproduction, parasitology, and regenerative medicine are currently being explored. Exosome-mediated drug formulations is being developed since they can transport biologically active molecules. Exosomes can therefore be used as diagnostic, prognostic, and therapeutic tools.

Keywords: exosomes, biomarkers, liquid biopsy, diagnostic, dog, cat.

Dziś wiemy, że egzosomy to kuliste struktury ograniczone warstwową lipidową, naturalnie uwalniane przez wszystkie komórki do środowiska zewnątrzkomórkowego, również przez komórki nowotworowe. Egzosomy należą do populacji mikro-pęcherzyków błonowych, które ze względu na swoją wielkość, pochodzenie oraz mechanizm działania można podzielić na trzy główne grupy. Pierwszą grupą są pęcherzyki wielkości od 30 do ok. 200 nm, czyli egzosomy, natomiast kolejne dwie grupy to pęcherzyki powyżej 200 nm, czyli ektosomy/mikropęcherzyki (microvesicles, MVs) oraz ciała apoptyczne. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi opublikowanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Pęcherzyków Pozakomórkowych sugeruje się, aby subpopulacje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych były klasyfikowane według ich wielkości, gęstości, składu biochemicznego i pochodzenia komórkowego (2).

Egzosomy tworzone są przez wgłębienie błony późnych endosomów, czyli tzw. ciała wielopęcherzykowe (multivesicular body-MVB). Wewnątrz nich znajdują się DNA, RNA, białka, lipidy, struktura cukru, metabolity, a nawet część organelli (3). Stosunkowo wysoka powtarzalność składu zawartości białka większości egzosomów wskazuje, że sposób ich powstawania nie jest przypadkowy, ale jest ściśle ukierunkowany, zależy od dostępności unikalnych i specyficznych białek, a także rodzaju komórki (3).

Egzosomy pochodzenia nowotworowego

Egzosomy pochodzenia nowotworowego (tumor derived exosomes-TEX) są wzbogacone o czynniki, które promują wzrost nowotworu i aktywność immunosupresyjną, takie jak ligandy indukujące apoptozę związane z czynnikiem martwicy nowotworów (TNF) dla receptorów apoptozy (FasL lub TRAIL), ligandy dla receptorów punktów kontrolnych, takich jak ligand programowanej śmierci 1 (PD-L1), cytokiny immunosupresyjne (IL-10 i transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β 1), prostaglandynę E2. Jednocześnie TEX mogą zawierać również antygeny związane z nowotworem i cząsteczki kostymulujące, różne receptory czynników wzrostu, takie jak receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) czy receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER-2), które umożliwiają stymulację komórek układu odpornościowego i promują odpowiedź przeciwnowotworową. Taki profil molekularny nadaje egzosomom nowotworowym podwójną zdolność do pośredniczenia w tłumieniu lub aktywacji odpowiedzi immunologicznej (mogą zarówno wchodzić w interakcje z komórkami dendrytycznymi, jak i indukować odpowiedź komórek T (4).

Doniesiono, że komórka rakowa może uwolnić ponad 20 000 tych pęcherzyków w ciągu 48 godz. (5), podczas gdy całkowita liczba pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w osoczu krwi została oszacowana na 10^7 do 10^{12} EV/mL (6). Ilość egzosomów pochodzenia nowotworowego jest większa niż egzosomów pochodzących z prawidłowych tkanek, związane jest to z podwyższoną aktywnością metaboliczną komórek nowotworowych oraz obniżonym pH, które sprzyjają procesom proliferacji (7).

Dodatkowo, ze względu na ich dwuwarstwową strukturę lipidową, zmniejszoną immunogenność i biokompatybilność, egzosomy odgrywają znaczącą rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i komunikacji. Egzosomy biorą również udział w autofagii, dostarczaniu energii, tworzeniu przyjaznego mikrośrodowiska guza, przekazywaniu informacji genetycznej z lekiem/genem, biorą udział w homeostazie komórkowej i immunomodulacji (1). TDE niosą miRNA, mRNA i DNA pochodzenia onkogenne, które indukują złośliwą transformację komórek i sprzyjają naciekaniu komórek nowotworowych. Komórki rakowe wydzielają egzosomy, aby przeprogramować swoje otoczenie do mikrośrodowiska, które będzie promować progresję nowotworu i przerzuty poprzez transformację nabłonkowo-mezenchymalną, degradację macierzy zewnątrzkomórkowej i przeciekanie naczyń (1).

Diagnostyka egzosomów w biopsji płynnej

Postęp wiedzy o zastosowaniu klinicznym egzosomów w biopsji płynnej nadal stoi przed poważnymi wyzwaniami, które utrudniają ich zastosowanie kliniczne. Pierwszym krokiem torującym drogę do wykorzystania egzosomów jest ich izolacja. Wprowadzone z sukcesem różne metody izolacji egzosomów zapewniają uzyskanie wiarygodnych wyników. Egzosomy izolowane z różnych biofluidów

zawierają od tysięcy do miliardów egzosomów na mikrolitr próbki.

Egzosomy są wydzielane do licznych płynów ustrojowych, takich jak osocze, surowica, ślina, mleko, mocz, nasienie, płyn pęcherzykowo-oskrzelowy (BALF), ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn owodniowy, opłucnowy i osierdziowy (1).

Ze względu na niewielkie rozmiary egzosomów i ich niejednorodność pod względem wielkości, funkcji lub źródła pochodzenia ich izolacja jest trudna. Ponadto większość dzisiejszych technologii izolacji nie jest w stanie całkowicie oddzielić egzosomów od białek (immunoglobulin, albumin) i lipoprotein o wysokiej gęstości, niskiej i bardzo niskiej gęstości – chylomikronów (HDL i LDL, VLDL). Wysokowydajna izolacja egzosomów i separacja od zanieczyszczeń to obecnie główny problem, który ma kluczowe znaczenie dla dalszej analizy egzosomów. Z tego powodu stale podejmowane są kroki w celu ulepszenia i standaryzacji tych metod.

Ultrawirowanie jest podstawową metodą separacji egzosomów ze względu na wysoki poziom zdolności przetwarzania agregatów białkowych i zanieczyszczenia lipoproteinami. Wysoka liczba egzosomów uzyskanych tą metodą znacznie utrudnia ich ocenę ilościową i analizę funkcjonalną. Ultrawirowanie zapewnia wysoką czystość izolowanych egzosomów oraz zachowuje ich strukturę i funkcję. Ultrawirowanie polega na sekwencyjnej separacji gęstości, wielkości i kształtu cząstek stałych oraz substancji rozpuszczonych. W tych procedurach $400 \times g$ pomaga usunąć komórki i duże szczątki komórek, $10\,000$ – $20\,000 \times g$ usuwa duże szczątki i nieosadzone organelle, a $100\,000$ – $150\,000 \times g$ służy do osadzania egzosomów (8).

Ultrafiltracja opiera się na membranach o określonej średnicy porów ($0,22 \mu m$) w celu izolowania cząstek o określonej wielkości. Dlatego otrzymane egzosomy są definiowane przez rozmiar. Ten protokół może być stosowany jako uzupełnienie ultrawirowania w celu oddzielenia dużych mikropęcherzyków i egzosomów.

Chromatografia immunopowinowactwa to technologia izolacji i oczyszczania oparta na specyficznym wiązaniu przeciwciał i ligandów w celu oddzielenia pożądaných substancji od heterogenicznych mieszanin. Technika przeznaczona do szybkiej izolacji egzosomów, które można izolować w oparciu o określone przeciwciała. Metody te nie potrafią wykryć antygenów wewnątrzkomórkowych. Te unieruchomione przeciwciała są wykorzystywane do wizualizacji wychwyconych egzosomów. Chromatografię immunopowinowactwa można połączyć z ultrawiroowaniem i ultrafiltracją w celu oceny próbek wolnych od komórek.

Chromatografia wykluczania (size exclusion chromatography – SEC) jest metodą izolacji opartą na rozmiarze. Wykonuje się ją po odwirowaniu lub filtracji (w celu usunięcia większych komórek). Małe białka, takie jak albumina, są zatrzymywane w fazie stacjonarnej, podczas gdy większe cząstki, w tym egzosomy, eluują szybciej. Ta technika jest szybsza niż ultrawirówka i pomaga uzyskać egzosomy o wysokiej czystości.

Narzędzia mikroprzepływowe do rozdzielania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych można ogólnie sklasyfikować jako oparte na wielkości lub oparte na powinowactwie immunologicznym w swoim działaniu. Urządzenie mikroprzepływowe zapewnia dużą prędkość i małą objętość próbki. Urządzenia mikroprzepływowe wykonane z elastomerów (przede wszystkim polidimetylosiloksan) są zazwyczaj przeznaczone do zastosowań jednorazowych (9).

Gotowe zestawy do izolacji egzosomów mogą być jedną z wygodnych technik izolowania egzosomów przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji egzosomów. Zapewniają pełną i szybką izolację przy użyciu kolumny wychwytywującej.

Jako medium stosuje się glikol polietylenowy (PEG), a egzosomy zbiera się w warunkach wirowania, zmniejszając rozpuszczalność egzosomów. Jednak czystość i stopień odzysku są stosunkowo niskie i dają fałszywie dodatnie wyniki, a wytworzony polimer jest trudny do usunięcia, co nie sprzyja późniejszej funkcjonalnej analizie eksperymentalnej.

Jednym z najważniejszych problemów, z jakimi boryka się diagnostyka egzosomów, jest brak konsensusu co do metod określania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z bioptynów. Klasyczne ultrawirowanie jest metodą czasochłonną, w przeciwieństwie do komercjalizowanych zestawów, często też jest dość drogie, zwłaszcza gdy wymaga analizy wielu próbek. Istotną kwestią jest objętość próbki, z punktu widzenia praktyka pożądana jest mała objętości próbki (biorąc pod uwagę diagnostykę ras małych i miniaturowych psów), ale niska wydajność pęcherzyków,

spowodowana zanieczyszczeniem próbki białkami lub lipidami o podobnej gęstości i rozmiarach, jest głównym czynnikiem ograniczającym.

Wszystkie te techniki mają zalety i wady, a połączenie dwóch lub więcej technik jest najlepszą opcją izolacji egzosomów z różnych bioptynów. Kolejnym problemem, przed którym stoi diagnostyka egzosomów, jest rozróżnienie między egzosomami pochodzenia nowotworowego (TEX), od egzosomów pozostałych, pochodzenia nienowotworowego (non-TEX; 10).

Aktualne wyzwania i perspektywy

Nowatorskie skupienie się na egzosomach pochodzących z guzów nowotworowych w biopsji płynnej stanowi nowe wyzwanie w badaniach nad rakiem. Biopsja płynna guzów stanowi obiecujące niewazyjne podejście diagnostyczne i prognostyczne. Niestety zastosowanie egzosomów w medycynie weterynaryjnej jest na wczesnym etapie badań. Na 220 artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych tylko kilkanaście dotyczy psów i kotów (dane na sierpień 2022; 12). Egzosomy znajdują swoje główne zastosowanie w chorobach nowotworowych, ale obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem w dziedzinie kardiologii weterynaryjnej, nefrologii, rozrodu, parazytologii i medycyny regeneracyjnej. Egzosomy mogą być zatem wykorzystywane jako narzędzia diagnostyczne, prognostyczne, a w niektórych przypadkach także terapeutyczne (11, 12; **tab. 1**).

Tabela 1. Przegląd aktualnych zastosowań egzosomów w diagnostyce u psów i kotów (11, 12)

Dziedzina	Zastosowanie	Gatunek	Materiał do badań	Izolacja	Diagnostyka	Zastosowanie
Onkologia	osteosarkoma	pies	hodowla komórkowa	wirowanie	NTA	prognozowanie
Onkologia	osteosarkoma	pies	surowica	wirowanie	NTA	prognozowanie i diagnostyka
Onkologia	nowotwór listwy mleczej	pies	hodowla komórkowa	wirowanie	TEM	diagnostyka
Onkologia	guz limfatyczny	pies	hodowla komórkowa	wirowanie	NTA	diagnostyka
Onkologia	guz weneryczny, gruczorak sutka	kot	hodowla komórkowa z biopsji	wirowanie	TEM	terapia
Kardiologia	niedomykalność zastawki mitralnej, przewlekła niewydolność serca	pies	osocze	ultrawirowanie	cytometria przepływowa, TEM, NTA	diagnostyka
Kardiologia	kardiotoksyczność doksyrybicyny	pies	osocze	chromatografia różnicowa	TEM	diagnostyka
Rozród	jakość nasienia	pies	MSC pochodzące z psiej tkanki tłuszczowej	Invitrogen Total Exosome	TEM	diagnostyka
Rozród	jakość siary	pies	siara	ultrawirowanie	Western blot, TEM	diagnostyka
Nefrologia	przewlekła niewydolność nerek	pies, kot	mocz	Total Exosome Isolation albo miRCURY Exosome Isolation Kit Cells	Immunoblot, SEM	diagnostyka
Parazytologia	leiszmanioza	pies	surowica	zestaw ExoQuick	cytometria przepływowa, TEM, DLS	prognozowanie
Ortopedia i gojenie ran	leczenie ran	pies	MSCs	ultrawirowanie	analiza cytofluorymetryczna	zastosowanie terapeutyczne

DLS – dynamiczne rozpraszanie światła (z ang. Dynamic Light Scattering), MSCs – mezenchymalne komórki macierzyste (z ang. Mesenchymal Stem Cells), NTA – metoda śledzenia nanocząstek (z ang. Nanoparticle Tracking Analysis Technology), TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy (z ang. Transmission Electron Microscope)

Piśmiennictwo

1. Yong W.Y., Jun H.L., Sang-Yeob K., Chan-Gi P., Dae H.H., Sang R.P., Jinkwon Y., Byong S.C.: Advances in Analysis of Biodistribution of Exosomes by Molecular Imaging. *Int J Mol Sci* 2020, **19**, 21, 665–670.
2. Thery C., Lavieu G., Martin-Jaular L., Mathieu M., Tkach M., Zivkovic A. M., Zocco D.: 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* 2018, **7**, 15–25.
3. Huang T., Deng C. X.: Current progresses of exosomes as cancer diagnostic and prognostic biomarkers.: *Int J Biol Sci.* 2019, **15**, 1–11.
4. Yang C., Robbins P.D The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis.: *Clin Dev Immunol*, 2011, **11**, 1–10.
5. Dou Y., Cha D. J., Franklin J. L., Higginbotham J. N., Jeppesen D. K., Weaver A. M., Prasad N., Levy S., Coffey R. J., Patton J. G., Zhang B.: Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes. *Sci Rep* 2016, **28**, 1–11.
6. Sódar B.W., Kittel Á., Pálóczi K., Vukman K.V., Osteikoetxea X., Szabó-Taylor K., Németh A., Sperlág B., Baranyai T., Giricz Z., Wiener Z., Turriák L., Drahos L., Pállinger É., Vékey K., Ferdinandy P., Falus A., Irén Buzás E.: Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep* 2016,**18**,1-16.
7. Ludwig N., Razzo B. M., Yerneni S.S., Whiteside T. L.: Optimization of cell culture conditions for exosome isolation using mini-size exclusion chromatography (mini-SEC). *Exp Cell Res* 2019, **15**, 149–157.
8. Greening D.W., Xu R., Ji H., Tauro B.J., Simpson R.J.: A protocol for exosome isolation and characterization: Evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. *Methods Mol Biol* 2016, **10**, 12–22.
9. Meng Y., Asghari M., Aslan M.K., Yilmaz A., Mateescu B., Stavarakis S., deMello A.: Microfluidics for extracellular vesicle separation and mimetic synthesis: Recent advances and future perspectives. *Chem Eng J* 2020, **11**, 1–10.
10. Pietrowska M., Zebrowska A., Gawin M., Marczak L., Sharma P., Mondal S., Mika J., Polańska J., Ferrone S., Kirkwood J.M., Widlak P., Whiteside T.L.: Proteomic profile of melanoma cell-derived small extracellular vesicles in patients' plasma: a potential correlate of melanoma progression. *J Extracell Vesicles* 2021, **10**, 1–11.
11. Diomaiuto E., Principe V., De Luca A., Laperuta F., Alterisio C., Di Loria A.: Exosomes in Dogs and Cats: An Innovative Approach to Neoplastic and Non-Neoplastic Diseases. *Pharmac* 2021, **4**, 14–22.
12. Moccia V., Sammarco A., Cavicchioli L., Castagnaro M., Bongiovanni L., Zappulli V.: Extracellular Vesicles in Veterinary Medicine. *Animals* 2022, **12**, 1–25.

Dr n. wet. Barbara Szczepankiewicz;
e-mail: barbara.szczepankiewicz@upwr.edu.pl