

УДК 606;576.31

**Экзосомы молока лошади: выделение, микроскопический и биохимический анализ, перспективы использования**

© 2020 С.Е. СЕДЫХ<sup>1,2\*</sup>, А.Е. КУЛЕШОВА<sup>1,2</sup>, Л.В. ПУРВИНЬШ<sup>1,2</sup>, Е.Е. БУРКОВА<sup>1,2</sup>,  
А.Е. ГРИГОРЬЕВА<sup>1</sup>, Е.Г. ЕВТУШЕНКО<sup>3</sup>, Г.А. СТЕПАНОВ<sup>1,2</sup>, Е.И. РЯБЧИКОВА<sup>1,2</sup>,  
Г.А. НЕВИНСКИЙ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН», Новосибирск, 630090

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, 630090

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, 119992

\*e-mail: sedyh@niboch.nsc.ru

Поступила 31.03.2020 г.  
После доработки 16.06.2020 г.  
Принята в печать 14.09.2020 г.

Описана технология выделения и очистки препаратов экзосом из молока лошади. Проведен их микроскопический и биохимический анализ. Показано, что стадия гель-фильтрации на сорбенте Ultrogel A4 позволяет значительно уменьшить количество белков молока, совыделяющихся с экзосомами. Предложены методы выделения нуклеиновых кислот из препаратов на разных стадиях очистки, проведен анализ содержания нуклеиновых кислот в экзосомах молока лошади. Продемонстрировано, что препараты экзосом молока лошади не обладают цитотоксичностью в отношении культур клеток человека. Обсуждаются перспективы использования экзосом молока лошади для доставки препаратов в культуры клеток.

*Ключевые слова:* экзосомы, молоко лошади, выделение экзосом, нуклеиновые кислоты

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-62-71

Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы, секретируемые клетками путем экзоцитоза мультивезикулярных телец [1]. Из-за близких размеров (диаметр порядка 40–100 нм) и трудностей выделения в чистом виде экзосомы, эктосомы и апоптотические тельца объединяют общим термином «внеклеточные везикулы».

В последние годы стала понятна роль экзосом во внеклеточной коммуникации. Так, показано, что внеклеточные везикулы переносят белки, пептиды, мРНК, микроРНК, ДНК [2], выявлено их участие в развитии заболеваний [3]. Экзосомы рассматривают в качестве природных векторов для адресной доставки терапевтических препаратов [4]. Предметом наших исследований стали экзосомы, содержащиеся в молоке лошади. Изучение

белковых и нуклеиновых компонентов экзосом молока исключительно важно для разработки новых подходов адресной доставки лекарственных препаратов в клетки-мишени, так как молоко – доступный источник для получения больших объемов экзосом, чем, например, культуры клеток или плазма крови. Молоко лошади имеет ряд преимуществ перед молоком коровы и плазмой крови в качестве источника экзосом, использование которых ограничено из-за возможной контаминации в первом случае прионами, а во втором инфекционными агентами, передающимися парентерально [5].

Ранее нами предложен оригинальный метод выделения экзосом, позволяющий получать препараты, практически не содержащие совыделяющихся белков [6]. Данные, полученные другими

*Список сокращений:* ПААГ — полиакриламидный гель; DTT — дитиотреитол; MALDI TOF — времяпролетная матричноактивированная лазерная десорбция/ионизация; SDS — додецилсульфат натрия.

авторами на недостаточно очищенных препаратах экзосом, указывают на наличие более двух тысяч разных белков [7] и более 19 тыс. разных мРНК [8] в этих внеклеточных везикулах молока. С нашей точки зрения, эти цифры чрезмерно преувеличены, так как тривиальные математические расчеты указывают на то, что экзосома диаметром 40 нм может вместить не более 400 индивидуальных белков. Использование хорошо очищенных препаратов экзосом позволило нам идентифицировать белки, входящие в их состав, а в дальнейшем мы планируем определить и нуклеиновые кислоты, которые совыделяются с экзосомами в процессе очистки.

Нерешенной проблемой до сих пор остается разработка подходов для выделения препаративных количеств экзосом из биологических жидкостей. Нами предложен метод получения экзосом из двух и более литров молока лошади, а также протокол анализа биологической активности этих экзосом, по результатам которого можно оценить возможность их использования в качестве средств доставки лекарственных средств в культуры клеток и в перспективе в живой организм

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Выделение экзосом из молока

Образцы молока дважды центрифугировали в течение 20 мин при 4 °С при 16 500 g (ротор JA-14, центрифуга Avanti J-E; Beckman Coulter, США) для удаления жира и осаждения белков и клеточного дебриса. К супернатанту добавляли 2,4 М ацетат натрия до 50 мМ и, перемешивая на магнитной мешалке, титровали ледяной уксусной кислотой до pH 4,4 и оставляли на ночь при 4 °С. Полученную смесь центрифугировали 20 мин при 4 °С при 16 500 g (ротор JA-14), осадок удаляли. К супернатанту добавляли насыщенный раствор Трис pH 10,0 до достижения pH 7,5, смесь центрифугировали 20 мин при 4 °С при 16 500 g (ротор JA-14) и осадок удаляли. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Ультрафильтрат дополнительно центрифугировали 120 мин при 16 500 g при 4 °С (ротор JA-30.50, центрифуга Avanti J-30I; Beckman Coulter). Супернатант повторно центрифугировали 120 мин при 100 000 g при 4 °С для осаждения везикул. Супернатант удаляли, а гелеобразный осадок ресуспендировали в буфере TBS (20 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 150 мМ NaCl) и центрифугировали (ротор JA-14, центрифуга Avanti J-E; Beckman Coulter) 5 мин при 12 000 g и 4 °С. Супернатант ультрацентрифугировали в течение 120 мин при 129 000 g при 4 °С (ротор SW-60, ультрацентрифуга L8-70M; Beckman Coulter).

Осадок ресуспендировали в TBS, фильтровали через фильтр с размером пор 0,1 мкм, проводили гель-фильтрацию на колонке Ultrogel A4 (Sigma, США) объемом 30 мл (скорость элюции 0,8 мл/мин), уравновешенной 20 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 500 мМ NaCl. Фракции первого пика, обогащенные везикулярными частицами, собирали, диализовали против 20 мМ Трис-НСl, pH 7,5, в течение ночи при 4 °С, после чего замораживали при -70 °С и подвергали лиофилизации в FreeZone 2,5 (Labconco, США) в течение ночи. Лиофилизованные препараты растворяли в 200 мкл дистиллированной воды со степенью очистки milli-Q.

### Просвечивающая электронная микроскопия

Препараты анализировали методом негативного контрастирования. Исследуемый препарат сорбировали на медную сетку, покрытую формовой пленкой, в течение 1 мин. После инкубации промывали сетку каплей дистиллированной воды в течение 10 с, излишки жидкости убирали фильтровальной бумагой. Контрастирование проводили 0,5%-ным раствором уранилацетата в течение 10 с. Сетки исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Jem-1 400 (Jeol, Япония), снимки получали с помощью цифровой камеры Veleta (EMSIS, Германия).

### Нанотрекинговый анализ

Измерение размера и определение концентрации очищенных препаратов экзосом молока проводили при помощи нанотрекингового анализа (NTA) в соответствии с рекомендациями ASTM 2834-12(2018) [9] и ранее описанной методикой [10, 11]. Использован прибор Nanosight LM10 HS-BF (Nanosight Ltd., Великобритания), лазерная установка с длиной волны 405 нм и мощностью 65 мВ и высокочувствительная EMCCD камера (Andor Luca, Великобритания). Образец разбавляли фосфатным буфером (PBS), pH 7,5, до достижения концентрации около  $1,5 \cdot 10^8$  частиц/мл. Проводили 7 измерений, в ходе которых записывали видео продолжительностью 60 с, далее делали еще одно разведение образца и проводили аналогичное измерение. Таким образом, каждый образец измеряли в двух технических репликах. Видео анализировали в программном обеспечении NTA software 2,3 build 33. Результаты всех измерений одного образца использовали для вычисления среднего гидродинамического диаметра и общей концентрации частиц.

### Выделение и анализ нуклеиновых кислот

Из образцов супернатантов и осадков, полученных на разных этапах выделения экзосом

(всего более 20 образцов), выделяли РНК с использованием аналога TRIzol — реагента Лира («Биолабмикс», Россия), затем на магнитных частицах («Sileks», Россия) и на колонках («Биолабмикс»). Препараты нуклеиновых кислот анализировали методом капиллярного электрофореза на чипе RNA 6000 Pico (Agilent Technologies, США).

*Выделение РНК с реагентом Лира.* Образец смешивали с реагентом Лира (объем образца не превышал 10% от объема реагента), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и добавляли хлороформ — 1/5 от исходного объема реагента Лира, — энергично встряхивали, в течение 15–20 с, инкубировали 5–10 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая пробирку, до образования однородной суспензии. Смесь центрифугировали 12 мин при 10 000 g при 4 °С для разделения на нижнюю органическую фазу, интерфазу и верхнюю водную фазу. Верхнюю фазу, содержащую РНК, отбирали и добавляли к ней 3 М NaOAc до концентрации 0,5 М и 5–10 мкг гликогена, после чего добавляли равный объем изопропанола, предварительно охлажденного до –20 °С, перемешивали, переворачивая пробирку несколько раз. Смесь инкубировали 40 мин при –20 °С, центрифугировали 10 мин при 16 000 g при 4 °С. Супернатант удаляли, к осадку добавляли 75%-ный этанол, охлажденный до –20 °С, в расчете 1–1,5 объема водной фазы, аккуратно перемешивали и центрифугировали 5 мин при 16 000 g при 4 °С. Супернатант удаляли, осадок высушивали на воздухе, в течение 10 мин, после чего растворяли в 20–50 мкл воды milli-Q, свободной от РНКаз, и инкубировали в термостате 5–10 мин при 50–60 °С. Выделенную РНК хранили при –70 °С.

*Выделение РНК на магнитных частицах.* Для выделения РНК из водной фазы, полученной на первых этапах выделения с помощью реагента Лира, использовали набор реагентов KIRPS0100 (Sileks, Россия). К водной фазе добавляли предварительно приготовленную суспензию из 400 мкл буфера Binding с 5 мкл магнитных частиц, покрытых SiO<sub>2</sub> MagNA (Sileks, Россия). Смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течении 3 мин при комнатной температуре до образования однородной суспензии. Перемещали пробирки в магнитный штатив и после того, как частицы полностью собрались на стенке пробирки, удаляли супернатант. Пробирки переносили в обычный штатив и ресуспендировали магнитные частицы в 700 мкл промывочного буфера Wash1. Цикл повторяли последовательно для буферных растворов Wash2, Wash3 и FinalWash, после чего переносили пробирки в обычный штатив, удаляли

FinalWash и высушивали частицы. Высушенные магнитные частицы ресуспендировали до гомогенной смеси в 50 мкл воды milli-Q, свободной от РНКаз, предварительно нагретой до 60 °С, инкубировали в термостате 5 мин при 60 °С. Пробирки перемещали в магнитный штатив и собирали РНК-содержащий супернатант. Выделенную РНК хранили при –70 °С.

*Выделение РНК на колонках.* В водную фазу, полученную на первых этапах выделения с помощью реагента Лира и содержащую РНК, добавляли 1/3 объема 96%-ного этанола, перемешивали, наносили на колонку, центрифугировали 30 с при 10 000 g. Переносили фильтрат в чистую пробирку. К фильтрату добавляли равный объем 96%-ного этанола и наносили образец на новую колонку, центрифугировали 30 с при 10 000 g, фильтрат удаляли. На вторую колонку дважды наносили 500 мкл буфера для промывки WB, центрифугировали 30 с при 10 000 g и удаляли фильтрат. Элюировали РНК добавлением 50 мкл буфера для элюции EB.

*Анализ РНК.* Для определения характеристик РНК (длина, относительная концентрация), выделенных из препаратов экзосом молока, использовали чип RNA 6000 Pico и прибор Bioanalyzer 2100, согласно инструкциям производителя (Agilent Technologies).

### Электрофоретический анализ белков

Электрофоретический анализ белков проводили по методу Лэммли в присутствии и в отсутствие DTT в 4–18%-ном ПААГ в течение 1,5–2 ч при 25 °С в буфере 25 мМ Трис-глицин, pH 8,3, с 0,1% SDS, при 100–170 В. Белки окрашивали Coomassie Blue R-250.

Анализ белков методом двумерного электрофореза проводили в две стадии: изоэлектрофокусирование и разделение во втором направлении в ПААГ. Исходный образец смеси белков выдерживали в буфере для регидратации (2,9 М мочевины, 2% NP-40, 0,03 мМ DTT, 1% амфолиты, 0,001% бромфеноловый синий), наносили на стрип (Ready IPG Strip +3–10 17 cm; Bio-Rad, США) и помещали в камеру для изофокусирования Protean i12 (Bio-Rad) с установленными электродами; сверху размещали стрип гелем вниз, наносили масло и фиксировали. После разделения белков в геле стрип переносили в камеру для уравнивания, содержащую буфер для уравнивания 1 (0,375 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 6 М мочевины, 20% глицерин, 2% SDS, 2% DTT, 0,001% бромфеноловый синий) и затем в буфер для уравнивания 2 (буфер 1 + 100 мМ йодоцетамид). После уравнивания переносили

стрип в концентрирующий гель (стекла 20 × 20 см) 4–18%-ного ПААГ, проводили электрофорез в течение 3 ч при 25 °С в буфере 25 мМ Трис-глицин, pH 8,3, с 0,1% SDS, при 150 В первые 20 мин и 300–400 В в оставшееся время. Белки окрашивали Coomassie Blue R-250.

### Масс-спектрометрический анализ белков

Полученный в результате электрофореза в ПААГ и 2D-электрофоретического разделения белков гель выдерживали в воде, после чего вырезали участки геля с белками и переносили их в отдельные пробирки. Фрагменты геля дважды промывали дистиллированной водой milli-Q по 15 мин, затем дважды 50%-ным ацетонитрилом в 50 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> по 30 мин и один раз 100%-ным ацетонитрилом в течение 20 мин, после чего отбирали жидкость и высушивали 10 мин при 30 °С в вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Германия). К высушенным фрагментам геля добавляли по 20 мкл раствора, содержащего 1 мкг трипсина (Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega, США), выдерживали 45 мин на ледяной бане и затем удаляли жидкость. К гелю добавляли раствор 25 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> и инкубировали при 37 °С в течение ночи. Жидкость переносили в отдельные пробирки, к гелю добавляли 50%-ный ацетонитрил в 50 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> и встряхивали 15 мин на Multi-Vortex V-32 (BioSan, Латвия), после чего жидкость объединяли с предыдущей и повторяли процедуру. Далее дважды промывали гель 100%-ным ацетонитрилом в течение 15 мин и супернатант объединяли с предыдущими. Собранные объединенные фракции от каждого геля по отдельности высушивали в вакуумном концентраторе в течение 3 ч при 60 °С. Анализ пептидов проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Bruker Reflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, США), снабженным 337-нм азотным лазером VSL-337 ND (Laser Science, США) с продолжительностью импульса 3 нс. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор α-циано-4-гидроксикоричной кислоты (HCCA) в смеси ацетонитрила и 0,1%-ной трифторуксусной кислоты (1:2). К 2 мкл реакционной смеси, содержащей анализируемый образец, добавляли 2 мкл 0,2%-ной трифторуксусной кислоты и матрицы, далее 1 мкл полученной смеси наносили на стальную подложку, высушивали и анализировали.

### МТТ-тест

Для определения уровня цитотоксичности препаратов экзосом молока лошади использовали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-те-

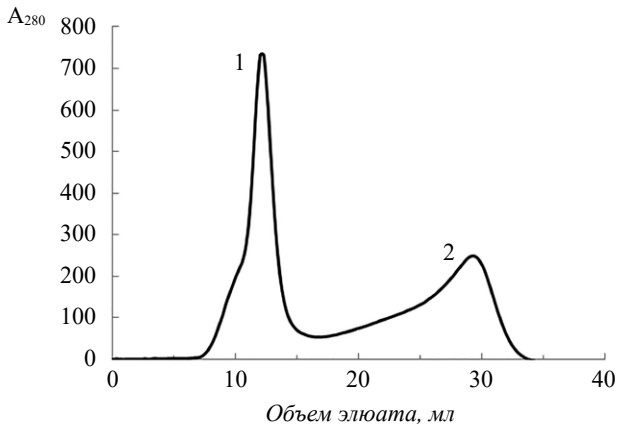
тразолиум бромид (МТТ), который в живых клетках восстанавливается в формазан. После инкубации клеток с образцами (0–10 мкг/лунка) в лунки планшета добавляли по 10 мкл раствора МТТ с концентрацией 1 мг/мл и выдерживали в течение 3 ч при 37 °С. Среду отбирали, формазан растворяли добавлением 100 мкл изопропанола в каждую лунку. Измерение оптической плотности раствора проводили с использованием двух длин волн: 570 нм и 620 нм – на планшетном сканере Uniscan (Thermo Fisher Scientific, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе описаны результаты исследований, согласно которым препараты экзосом, выделенные из молока, могут содержать до нескольких тысяч белков [7, 12]. Эти результаты получены с использованием высокочувствительных методов top-down протеомики, например, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, tandemно соединенной с ионизирующей электроспреей масс-спектрометрией трипсиновых гидролизатов [12, 13]. Существенный недостаток этого подхода заключается в том, что пептиды и короткие фрагменты белков, совыделяющиеся с экзосомами, невозможно отличить от входящих в состав экзосом полноразмерных белков вследствие того, что обработка трипсином происходит до фракционирования белков (подход bottom-up) [14]. Таким образом, не все идентифицированные в таких работах белки входят в состав экзосом; скорее всего, их репертуар сильно завышен. Так, Е.Д. Свердлов в критическом обзоре [15] указывает на некорректность многих экспериментальных данных по содержанию белков и РНК в экзосомах. Ранее нами показано, что гомогенные препараты экзосом молока содержат значительно меньше белков, чем считалось [6, 16]. Сходные результаты получены нами при анализе внеклеточных везикул плаценты [17, 18].

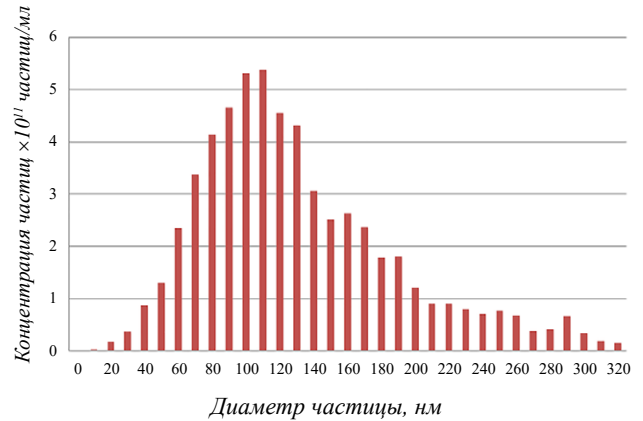
### Выделение, качественный и количественный анализ экзосом

В данной работе из 10 литров молока (от 10 здоровых лошадей), при помощи центрифугирования, ультрафильтрации, ультрацентрифугирования и гель-фильтрации (рис. 1) выделены экзосомы с выходом 1 нмоль частиц из 1 л молока (согласно данным нанотрекингового анализа, см. ниже). Полученные препараты проанализированы с использованием просвечивающей электронной микроскопии (рис 2), нанотрекингового анализа (рис. 3), а также проточной цитометрии (результаты представлены в работах [14, 18]).



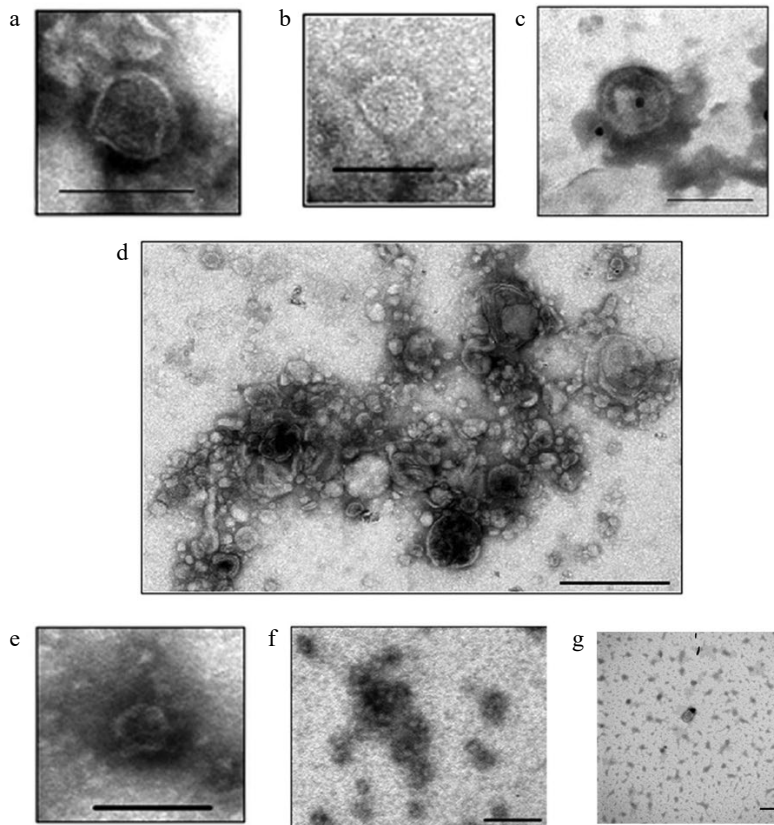
**Рис. 1.** Очистка фракции, полученной после ультрацентрифугирования, гель-фильтрацией на колонке Ultrogel A4 (диаметр 1 см, длина 40 см, скорость элюции 0,8 мл/мин). Пик 1 содержал везикулярные структуры, пик 2 — совыделяющиеся примеси.

**Fig. 1.** Gel-filtration of fraction obtained after ultracentrifugation on Ultrogel A4 (diameter 1 cm, length 40 cm, elution rate 0.8 ml/min). Peak 1 contained vesicular structures, peak 2 contained co-isolating impurities.



**Рис. 3.** Профиль распределения экзосом по размеру. Нанотрекинг анализ препарата экзосом молока лошади проведен на материале пика 1 (см. рис. 1).

**Fig. 3.** Profile of exosomes size distribution. Nanotracking analysis of the horse milk exosomes was carried out on the material of peak 1 (see fig. 1).



**Рис. 2.** Просвечивающая электронная микроскопия препаратов экзосом молока лошади, полученных ультрацентрифугированием при 100 000 г с последующей гель-фильтрацией (см. рис. 1, пик 1). *a, b, c* — препараты пика 1 гель-фильтрации на Ultrogel A4; *d, e, f* — препараты до гель-фильтрации; *c* — иммуноцитохимический анализ маркера экзосом тетраспанина CD63 с использованием специфического антитела, конъюгированного с наночастицами золота; *g* — раствор PBS, использованный при разбавлении экзосом для нанотрекингового анализа. Длина масштабной линии соответствует 100 нм.

**Fig. 2.** Transmission electron microscopy of horse milk exosomes obtained by ultracentrifugation at 100,000 g followed by gel filtration (see fig. 1, peak 1). *a, b, c* — peak 1 of gel-filtration on Ultrogel A4; *d, e, f* — preparations before gel filtration; *c* — immunocytochemical analysis of the exosomal marker tetraspanin CD63 using a specific antibody conjugated to gold nanoparticles; *g* — PBS solution used for diluting the exosomes for nanotracking analysis. The scale line length corresponds to 100 nm.

**Идентификация белков, входящих в состав экзосом, методом MALDI-TOF-MS/MS****Identification of milk exosomal proteins by MALDI-TOF-MS/MS analysis**

Идентифицированный белок	M <sub>r</sub> , кДа	
	до гель-фильтрации	после гель-фильтрации
Актин цитоплазматический	48,9	45,3
Альфа-казеин	25,3	Нет
Альфа-казеин, предшественник	24,6	Нет
Бета-казеин	15,8	Нет
Бета-лактоглобулин	20,3	20,3
Бутирофилин А1		58,6
Каппа-казеин	21	Нет
Ксантиндегидрогеназа	142,6	146,4
Лактадхерин	47,8	47,8

*Примечание:* приведены результаты анализа трипсиновых гидролизатов электрофоретически разделенных белков, содержащихся в препарате экзосом после ультрацентрифугирования до гель-фильтрации и в пике 1 элюата после гель-фильтрации (см. рис. 1).

*Note:* the results of the MALDI-TOF-MS/MS analysis of hydrolysates obtained from gel fragments after electrophoresis in exosomal preparations after ultracentrifugation before gel-filtration and in the peak 1 after the gel-filtration.

Согласно результатам просвечивающей электронной микроскопии, препараты после ультрацентрифугирования молока лошади и последующей гель-фильтрации (рис. 2) содержат большое количество везикулярных структур, соответствующих по размеру экзосомам (40–100 нм). Гель-фильтрация (рис. 2a, b) позволяет значительно снизить количество рыхлых глобулярных структур, которые часто имеют округлую чашеобразную форму, четкую границу и низкую электронную плотность. Препарат до гель-фильтрации содержал скопления мембранных структур, в том числе везикулярных структур, подобных ранее опубликованным в литературе [2, 19] (рис. 2d), в том числе морфологически сходных с экзосомами (рис. 2e), а также структуры, без мембраны (рис. 2f). Таким образом, многоэтапный процесс очистки, включающий последовательное применение центрифугирования, ультрафильтрации, ультрацентрифугирования и гель-фильтрации, позволил получить достаточно гомогенные препараты экзосом молока лошади, пригодные для дальнейшего анализа.

Тетраспанины CD9, CD63, CD81 являются маркерами экзосом, а их определение в выделяемых препаратах считается обязательным согласно рекомендациям International Society for Extracellular Vesicles [20]. Иммуноцитохимическим анализом с использованием антител к тетраспанину CD63 показано наличие этого маркера в полученном препарате экзосом (рис. 2c).

Согласно результатам нанотрекингового анализа, препарат везикул молока лошади после гель-фильтрации был представлен в основном

частицами с диаметром 80–120 нм (рис. 3), что соответствует размерам экзосомам. Аликвота препарата, соответствующая количеству экзосом, выделенных примерно из 50 мл молока, по результатам нанотрекинга, содержала  $6,1 \cdot 10^{12}$  частиц/мл. Содержание частиц в PBS, использованном при разведении препаратов экзосом, не превышало  $10^9$  частиц/мл (рис. 2g).

Как видно из табл. 1, очищенные гель-фильтрацией на Ultrogel A4 препараты экзосом не содержали таких белков молока, как казеины, которые не могут входить в состав экзосом согласно их механизму секреции. В большинстве работ, посвященных выделению экзосом из молока, обнаружен фермент ксантиндегидрогеназа, а также белки лактадхерин и бутирофилин [12, 21]. Таким образом, гель-фильтрация позволяет выделить препараты экзосом, не содержащие примесей совыделяющихся белков.

**Анализ РНК экзосом молока**

Входящую в состав препаратов экзосом молока лошади РНК выделяли двумя методами: на магнитных частицах и на колонках с кремниевой мембраной. Дальнейший анализ с использованием технологии электрофореза на микрочипе показал, что препараты РНК, полученные на колонках, по качеству превосходят выделенные на магнитных частицах. Примеры электрофореграмм, полученных на микрочипе Eucaryote Total RNA Pico (Agilent Technologies), приведены в дополнительных материалах (рис. S1 Приложения). Из аликвоты препарата экзосом из пика



**Выживаемость культур клеток при внесении препаратов экзосом молока (МТТ-тест)**  
**Cell viability after addition of milk exosomes to the cell culture (MTT assay)**

Линия клеток	Выживаемость культуры клеток после внесения экзосом молока, %		
	Препарат экзосом, мкг в лунке		
	1,0	5,0	10,0
Mcf-7	98,3±2,1	99,9±2,3	102,1±2,8
HeLa 229	92,0±2,6	96,4±2,7	93,8±3,5
U937	85,7±3,6	107,5±3,3	109,3±1,6
A549	91,3±1,4	98,8±3,1	104,7±2,6

*Примечание:* представлены средние значения выживаемости клеток по минимум трем лункам. За 100% приняты значения выживаемости клеток в контрольных лунках (вместо экзосом внесена равная по объему аликвота стерильного PBS).

Линии клеток: Mcf-7 — аденокарцинома молочной железы; HeLa 229 — карцинома шейки матки; U937 — гистиоцитарная лимфома; A549 — аденокарцинома легких.

*Note:* average values of cell viability for at least three wells are presented. The values of viability in control wells (an equal aliquot of sterile PBS was added in same volume) were taken as 100%.

Cell lines: Mcf-7 — breast adenocarcinoma; HeLa 229 — cervical carcinoma; U937 — histiocytic lymphoma; A549 — lung adenocarcinoma.

1 (см. рис. 1), которая соответствует 50 мл молока, на магнитных частицах была выделена РНК с концентрацией не выше 6 нг/мкл, в то время как при выделении на колонках концентрация РНК составляла около 32 нг/мкл. Различалась РНК и по размеру: при использовании магнитных частиц ее длина не превышала 250 нуклеотидов (рис. S1b), в то время как с колонок элюировали РНК длиной до 350 нуклеотидов (рис. S1b).

Полученные препараты РНК были пригодны для анализа микроРНК методом ПЦР в реальном времени и приготовления библиотек для высокопроизводительного секвенирования РНК.

#### **Перспективы использования экзосом молока для доставки в клетки**

Препараты, используемые для доставки целевых продуктов в клетки, должны удовлетворять такому требованию, как отсутствие детектируемой цитотоксичности. Как видно из табл. 2, препараты экзосом лошади, до и после гель-фильтрации, при содержании 1–10 мкг в лунке не проявляли цитотоксичности по отношению к исследованным культурам клеток человека. Следовательно, полученные препараты экзосом молока лошади можно рассматривать как потенциальные системы для доставки лекарственных средств в культуры клеток.

В настоящее время наиболее подробно описана биологическая активность и диагностическая значимость экзосом молока коровы и свиньи. Показано, что белки [14] и нуклеиновые кислоты [22] экзосом молока могут быть использованы для диагностики воспалительных заболеваний молочной

железы (мастит крупного рогатого скота). Путь секреции белков в экзосомы молока в значительной степени отличается от образования других компонентов молока (например, белков жировых мембран) [12]. Большинство белков молока экзосом свиньи имеет цитоплазматическое происхождение и участвует в регуляции иммунной системы и воспаления [23]. Показана роль экзосом молока крысы в предотвращении развития острого некротизирующего энтероколита [24]. При сравнительном анализе белков экзосом молока коровы и человека обнаружен дифференциальный уровень экспрессии более чем для половины белков [25]. Уровень микроРНК изменяется во время лактации и максимален в молозиве [26].

Разработаны методы доставки гидрофильных и липофильных веществ, в том числе препаратов, используемых для химиотерапии, с помощью экзосом молока коровы [27]. Это паклитаксел [28] и малые интерферирующие РНК [29]. Находясь внутри экзосом, чувствительные к расщеплению биологически активные молекулы остаются нативными в жестких условиях окружающей среды, в том числе желудочно-кишечного тракта: при низких значениях pH, в присутствии множества РНКаз и протеаз [30]. Экзосомы молока коровы и содержащиеся в них РНК попадают в разные ткани [31]. Показано, что экзосомы молока коровы поглощаются макрофагами человека в культуре клеток [8]. Интересно, что культура клеток эндотелия человека транспортирует экзосомы молока коровы в клетку путем эндоцитоза [32], а экзосомы молока человека сохраняют способность к слиянию с клетками

эпителия кишечника после прохождения через желудочно-кишечный тракт и доставляют зрелые микроРНК в клетки [33].

Экзосомы имеют ряд преимуществ перед обычными реагентами, используемыми для трансфекции, благодаря естественному происхождению [34]. Показано, что кормление мышей молоком со сниженным содержанием везикул приводит к изменению микробиома кишечника [35]. Известно, что по сравнению с коровьим молоком лошади реже вызывает аллергию у младенцев [36].

Таким образом, исследования экзосом молока лошади как потенциальных систем доставки биологически активных соединений в клетки-мишени представляет перспективное направление медицинской биотехнологии.

Молоко лошади – уникальный источник экзосом, которые могут иметь широкое применение в качестве средств адресной доставки биологически активных соединений (лекарственных препаратов, инструментов для генетической инженерии и геномного редактирования) в культуры клеток. Описанная технология выделения экзосом из больших объемов молока позволяет получить чистые препараты этих внеклеточных везикул в концентрации выше  $10^{12}$  частиц/мл. Проведен анализ чистоты полученных препаратов экзосом, подтверждено отсутствие в них совыделяющихся примесей количественными и качественными методами. Полученные результаты подтверждают перспективность использования экзосом молока лошади в качестве средств доставки.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования С.Е. Седых, А.Е. Кулешовой, Л.В. Пурвиньш, Е.Е. Бурковой поддержаны проектом Российского научного фонда 18-74-10055) (рук. С.Е. Седых); исследования Г.А. Невинского (масс-спектрометрический анализ) поддержаны проектом базового бюджетного финансирования № 2013–2020 № АА-АА-А17-117020210023-1 в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук (рук. Г.А. Невинский).

#### СООТВЕТСТВИЕ ЭТИЧЕСКИМ СТАНДАРТАМ

Статья не содержит результатов экспериментов над животными или людьми. Образцы молока лошади были предоставлены ЗАО Племязавод «Ирмень» (Новосибирская область, Ордынский район). Для отбора молока были использованы лошади, используемые в производстве кумыса.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Дополнительный материал** Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru>

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu. Rev. Physiol.*, 2015, 77, 13–27. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071641
2. Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1820(7), 940–948. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017
3. Isola A., Chen S. Exosomes: the messengers of health and disease. *Curr. Neuropharmacol.*, 2016, 15(1), 157–165. doi: 10.2174/1570159X14666160825160421
4. Edgar J.R. Q&A: what are exosomes, exactly? *BMC Biol.*, 2016, 14(1), 46. doi: 10.1186/s12915-016-0268-z
5. Franscini N., El Gedaily A., Matthey U., et al. Prion protein in milk. *PLoS One*, 2006, 1(1), 1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0000071
6. Sedykh S.E., Purvinish L.V., Monogarov A.S., et al. Purified horse milk exosomes contain an unpredictable small number of major proteins. *Biochim. Open*, 2017, 4, 61–72. doi: 10.1016/j.biopen.2017.02.004
7. van Herwijnen M.J.C., Zonneveld M.I., Goerdal S., et al. Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. *Mol. Cell. Proteomics*, 2016, 15(11), 3412–3423. doi: 10.1074/mcp.M116.060426
8. Izumi H., Tsuda M., Sato Y., et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J. Dairy Sci.*, 2015, 98(5), 2920–2933. doi:10.3168/jds.2014-9076
9. ASTM E2834 — 12 (2018). *Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by nanoparticle tracking analysis (NTA)*. West Conshohocken, PA, USA, 2018. doi: 10.1520/E2834-12R18
10. Semina S., Scherbakov A., Vnukova A., et al. Exosome-mediated transfer of cancer cell resistance to antiestrogen drugs. *Molecules*, 2018, 23(4), 829. doi: 10.3390/molecules23040829
11. Silachev D., Goryunov K., Shpilyuk M., et al. Effect of MSCs and MSC-derived extracellular vesicles on human blood coagulation. *Cells*, 2019, 8(3), 258. doi: 10.3390/cells8030258



12. Reinhardt T.A., Lippolis J.D., Nonnecke B.J., Sacco R.E. Bovine milk exosome proteome. *J. Proteomics*, 2012, 75(5), 1486–1492. doi: 10.1016/j.jprot.2011.11.017
13. Sedykh S.E., Burkova E.E., Purvinsh L.V., Klemeshova D.A., Ryabchikova E.I., Nevinsky G.A. Milk exosomes: isolation, biochemistry, morphology, and perspectives of use. In: *Extracellular Vesicles and Their Importance in Human Health*. IntechOpen, 2020. doi: 10.5772/intechopen.85416
14. Reinhardt T.A., Sacco R.E., Nonnecke B.J., Lippolis J.D. Bovine milk proteome: quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Proteomics*, 2013, 82, 141–154. doi: 10.1016/j.jprot.2013.02.013
15. Catherman A.D., Skinner O.S., Kelleher N.L. Top down proteomics: facts and perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014, 445(4), 683–693. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.041
16. Sverdlov E.D. Amedeo Avogadro's cry: What is 1 µg of exosomes? *BioEssays*, 2012, 34(10), 873–875. doi: 10.1002/bies.201200045
17. Burkova E.E., Grigor'eva A.E., Bulgakov D.V., et al. Extra purified exosomes from human placenta contain an unpredictable small number of different major proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(10), 2434. doi: 10.3390/ijms20102434
18. Burkova E.E., Dmitrenok P.S., Bulgakov D.V., Vlassov V.V., Ryabchikova E.I., Nevinsky G.A. Exosomes from human placenta purified by affinity chromatography on sepharose bearing immobilized antibodies against CD81 tetraspanin contain many peptides and small proteins. *IUBMB Life*, 2018, 70(11), 1144–1155. doi: 10.1002/iub.1928
19. Février B., Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004, 16(4), 415–421. doi: 10.1016/j.ceb.2004.06.003
20. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., et al. 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*, 2019, 8(1), 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750
21. Samuel M., Chisanga D., Liem M., et al. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci. Rep.*, 2017, 7(1), 5933. doi: 10.1038/s41598-017-06288-8
22. Sun J., Aswath K., Schroeder S.G., Lippolis J.D., Reinhardt T.A., Sonstegard T.S. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Genomics*, 2015, 16(1), 806. doi: 10.1186/s12864-015-2044-9
23. Chen T., Xi Q.-Y., Sun J.-J., et al. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis. *BMC Vet. Res.*, 2017, 13(1), 101. doi: 10.1186/s12917-017-1021-8
24. Hock A., Miyake H., Li B., et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *J. Pediatr. Surg.*, 2017, 52(5), 755–759. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.01.032
25. Yang M., Song D., Cao X., et al. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Food Res. Int.*, 2017, 92, 17–25. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.041
26. Gu Y., Li M., Wang T., et al. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PLoS One*, 2012, 7(8), e43691. doi: 10.1371/journal.pone.0043691
27. Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., Gupta R.C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett.*, 2016, 371(1), 48–61. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.020
28. Agrawal A.K., Aqil F., Jeyabalan J., et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine*, 2017, 13(5), 1627–1636. doi: 10.1016/j.nano.2017.03.001
29. Aqil F., Munagala R., Jeyabalan J., et al. Milk exosomes — natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Lett.*, 2019, 449, 186–195. doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.011
30. Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T., Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J. Dairy Sci.*, 2012, 95(9), 4831–4841. doi:10.3168/jds.2012-5489
31. Manca S., Giraud D., Zempleni J. The bioavailability and distribution of bovine milk exosomes is distinct from that of their cargos in mice. *FASEB J.*, 2017, 31(Suppl. 1), 148.2–148.2. doi: 10.1096/fasebj.31.1\_supplement.148.2
32. Kusuma R.J., Manca S., Friemel T., Sukreet S., Nguyen C., Zempleni J. Human vascular endothelial cells transport foreign exosomes from cow's milk by endocytosis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2016, 310(10), C800–C807. doi: 10.1152/ajpcell.00169.2015
33. Liao Y., Du X., Li J., Lönnerdal B. Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2017, 61(11), 1–11. doi: 10.1002/mnfr.201700082
34. Johnsen K.B., Gudbergsson J.M., Skov M.N., Pilgaard L., Moos T., Duroux M. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles — endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1846(1), 75–87. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.005
35. Groff R., Strom M., Hopkins L., Feng L., Hopkins A., Funk J. Dietary supplements and nutritional approaches used for rheumatoid arthritis self-management. *FASEB J.*, 2017, 31(Suppl. 1), lb396. doi: 10.1096/fasebj.31.1\_supplement.965.24
36. Businco L., Giampietro P.G., Lucenti P., et al. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, 105 (5), 1031–1034. doi: 10.1067/mai.2000.106377

## Horse Milk Exosomes: Isolation, Microscopic and Biochemical Analysis, and Prospects of Use

S.E. SEDYKH<sup>1,2\*</sup>, A.E. KULESHOVA<sup>1,2</sup>, L.V. PURVINSH<sup>1,2</sup>, E.E. BURKOVA<sup>1,2</sup>, A.E. GRIGORIEVA<sup>1</sup>, E.G. EVTUSHENKO<sup>3</sup>, G.A. STEPANOV<sup>1,2</sup>, E.I. RYABCHIKOVA<sup>1,2</sup> and G.A. NEVINSKII<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, 630090, Russia*

<sup>2</sup> *Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090, Russia*

<sup>3</sup> *Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

\*e-mail: [sedyh@niboch.nsc.ru](mailto:sedyh@niboch.nsc.ru)

Received March 31, 2020

Revised June 16, 2020

Accepted September 14, 2020

**Abstract**—Horse milk exosomes have been isolated and purified via the developed technology, and their microscopic and biochemical analyzes have been carried out. It was shown that the gel-filtration on the Ultrogel A4 resin can significantly reduce the amount of milk proteins co-isolated with exosomes. Methods for the isolation of nucleic acids from the preparations at various purification stages were proposed, and the content of nucleic acids in horse milk exosomes was analyzed. It was demonstrated that horse milk exosome preparations are not toxic to human cell cultures. The prospects of using horse milk exosomes for drug delivery into cell cultures are discussed.

**Keywords:** exosomes, horse milk, exosome isolation, nucleic acids

**Funding**—The research carried out by S.E. Sedykh, A.E. Kuleshova and E.E. Burkova was financially supported by the Russian Scientific Foundation (project no.18-74-10055 to S.E. Sedykh); the research by G.A. Nevinskii (MALDI TOF MS/MS analysis) was supported by the basic budget financing project no. ICBFM SB RAS # AAAA-A17-117020210023-1 (to G.A. Nevinsky).

**Supplementary material**—The online version of this paper contains supplementary material available free of charge at <http://www.biotechnology-journal.ru>

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-62-71