

# Izolacja egzosomów z moczu ludzi i szczurów oraz ich charakterystyka



Sałaga-Zaleska K.<sup>1</sup>, Dziomba Sz.<sup>2</sup>, Steć A.<sup>2</sup>, Płoska A.<sup>3</sup>, Kalinowski L.<sup>3</sup>, Jankowski M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Chemii Klinicznej, Katedra Analityki Klinicznej

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Toksykologii

<sup>3</sup>Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej, Katedra Analityki Klinicznej

Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

www.gumed.edu.pl

## Założenia ogólne

Algorytm rozpoznawania przewlekłej niewydolności nerek (stadium G3-G5 przewlekłej choroby nerek), opierający się na określeniu wydalania albuminy z moczem, stężenia kreatyniny we krwi oraz szacowanej wielkości przesączania kłębuszkowego, pozwala na rozpoznanie 50% utraty funkcji wydalniczej nerek [1]. Analiza zmiany składu białkowego egzosomów (zwnętrzkomórkowych pęcherzyków błonowych) izolowanych z moczu, może wskazywać na rozwijające się zaburzenia struktury kłębuszków nerkowych na wczesnym etapie rozwoju choroby.

## Cel badań

Celem badań było opracowanie procedury izolacji egzosomów z moczu.

## Metodyka badań

Materiał do badań stanowił ludzki mocz poranny oraz mocz z dobowej zbiórki moczu szczurów Wistar. Izolację pęcherzyków błonowych przeprowadzono metodą ultrawierowania (200000 g 1 h 4 °C).

## Wyniki

Ekspresję specyficznego antygenu egzosomalnego CD9 potwierdzono metodą Western blot.

Izolaty badano także przy użyciu kapilarnej elektroforezy strefowej. Analiza ta wykazała obecność **sygnału o czasie migracji charakterystycznym dla pęcherzyków zwnętrzkomórkowych**.

Rozkład wielkości (**67-263 nm**) oraz stężenie ( **$5,2 \cdot 10^{11}$ - $3,5 \cdot 10^{12}$ /ml**) pęcherzyków błonowych określono z wykorzystaniem techniki NTA.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają obecność zwnętrzkomórkowych pęcherzyków błonowych/ egzosomów w uzyskanych izolatach.

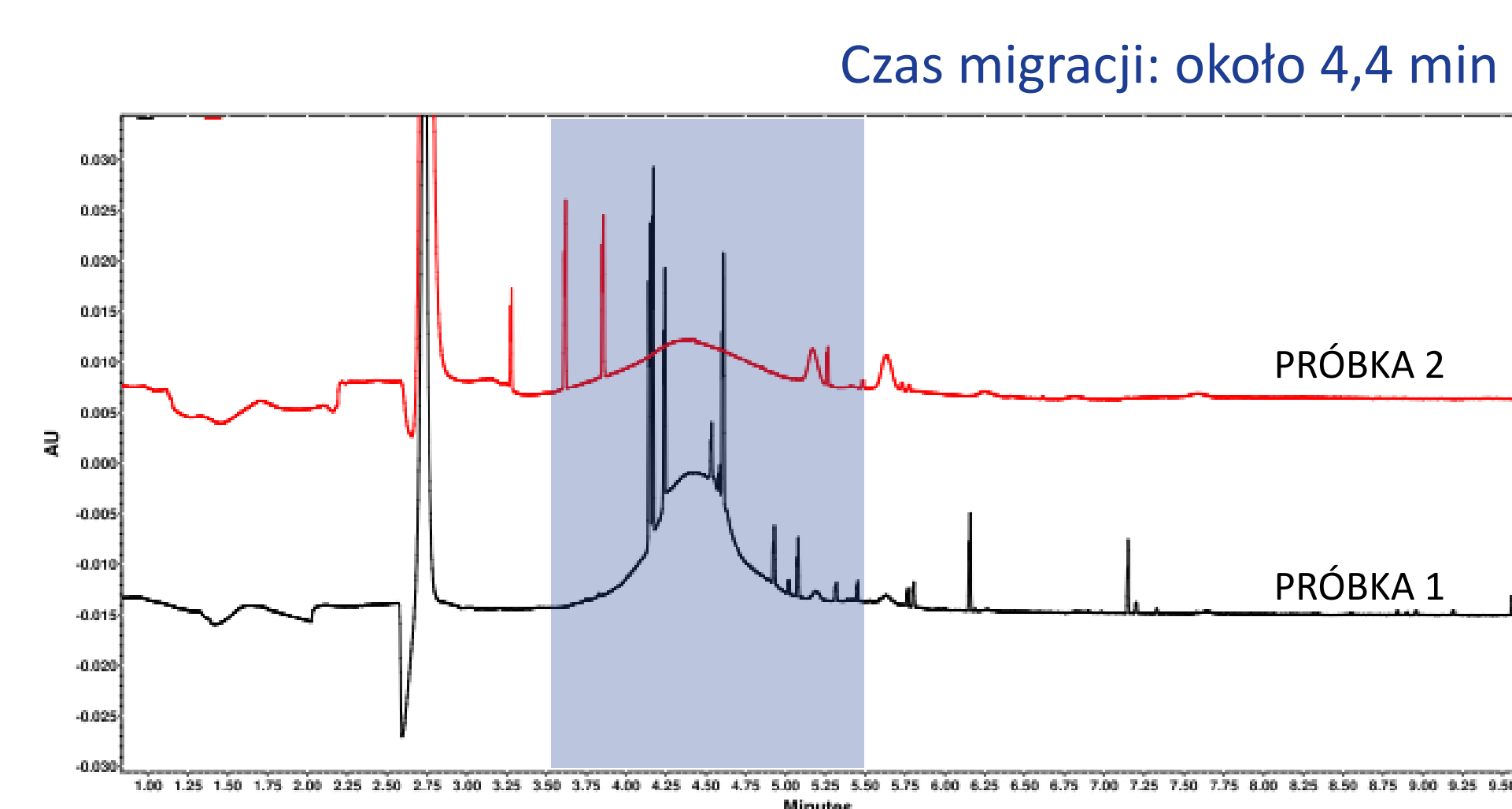
## Wnioski

Badania mają charakter wstępny. Planowane jest badanie składu egzosomów izolowanych z moczu pod kątem zawartości w nich białek pochodzenia podocytarnego (nefryna i podocyna), które mogą wskazywać na progresję spadku wielkości filtracji kłębuszkowej i zaburzeń przepuszczalności bariery filtracyjnej, odzwierciedlającej zaburzenie struktury kłębuszków nerkowych [2].

PRÓBKA 1 2  
35 kDa  
25 kDa

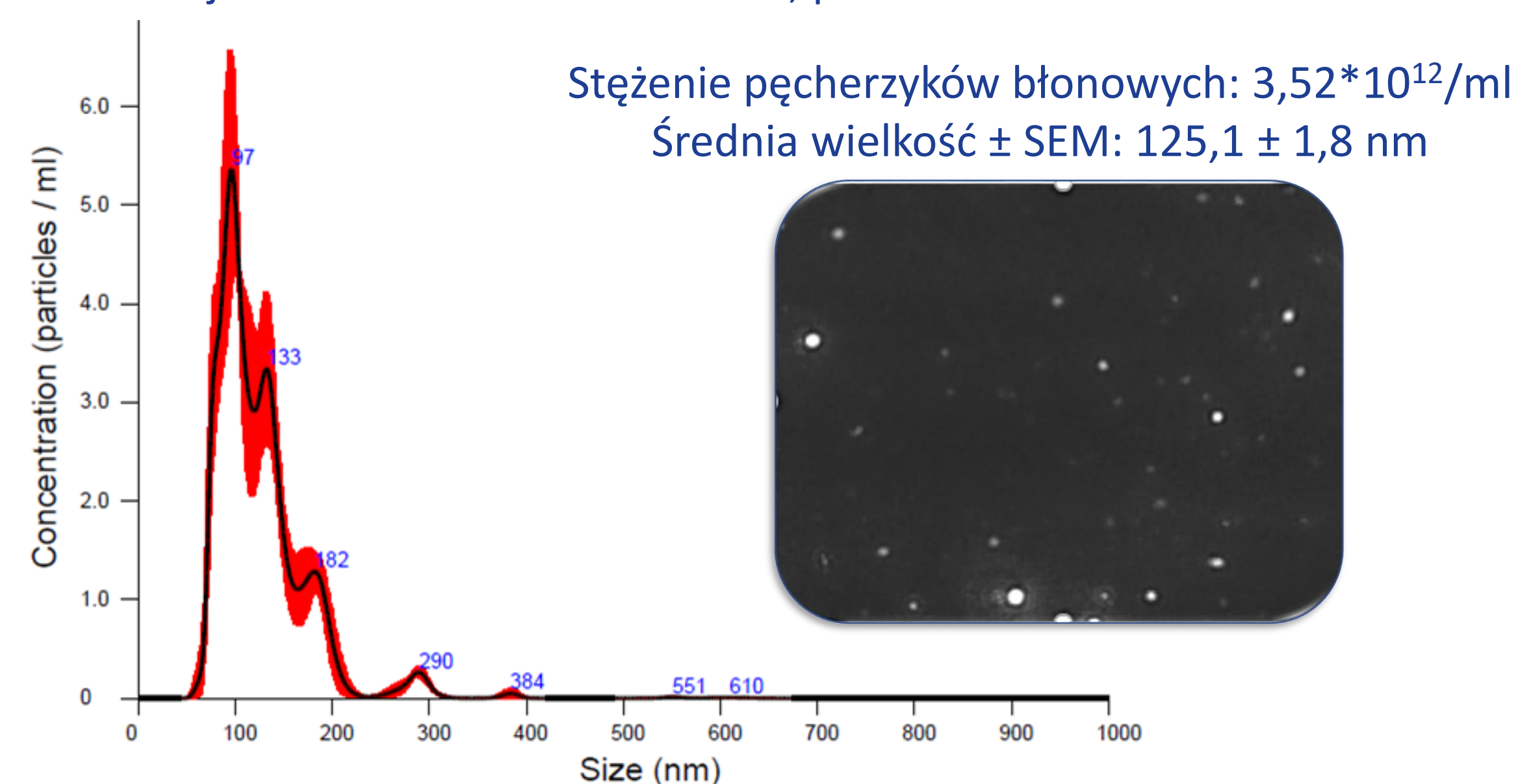


Rycina 1. Ekspresja specyficznego antygenu egzosomalnego CD9 (24 kDa; MA5-31980, Thermo Fisher) określona metodą Western blot (izolacja z dobowej zbiórki moczu szczura Wistar)

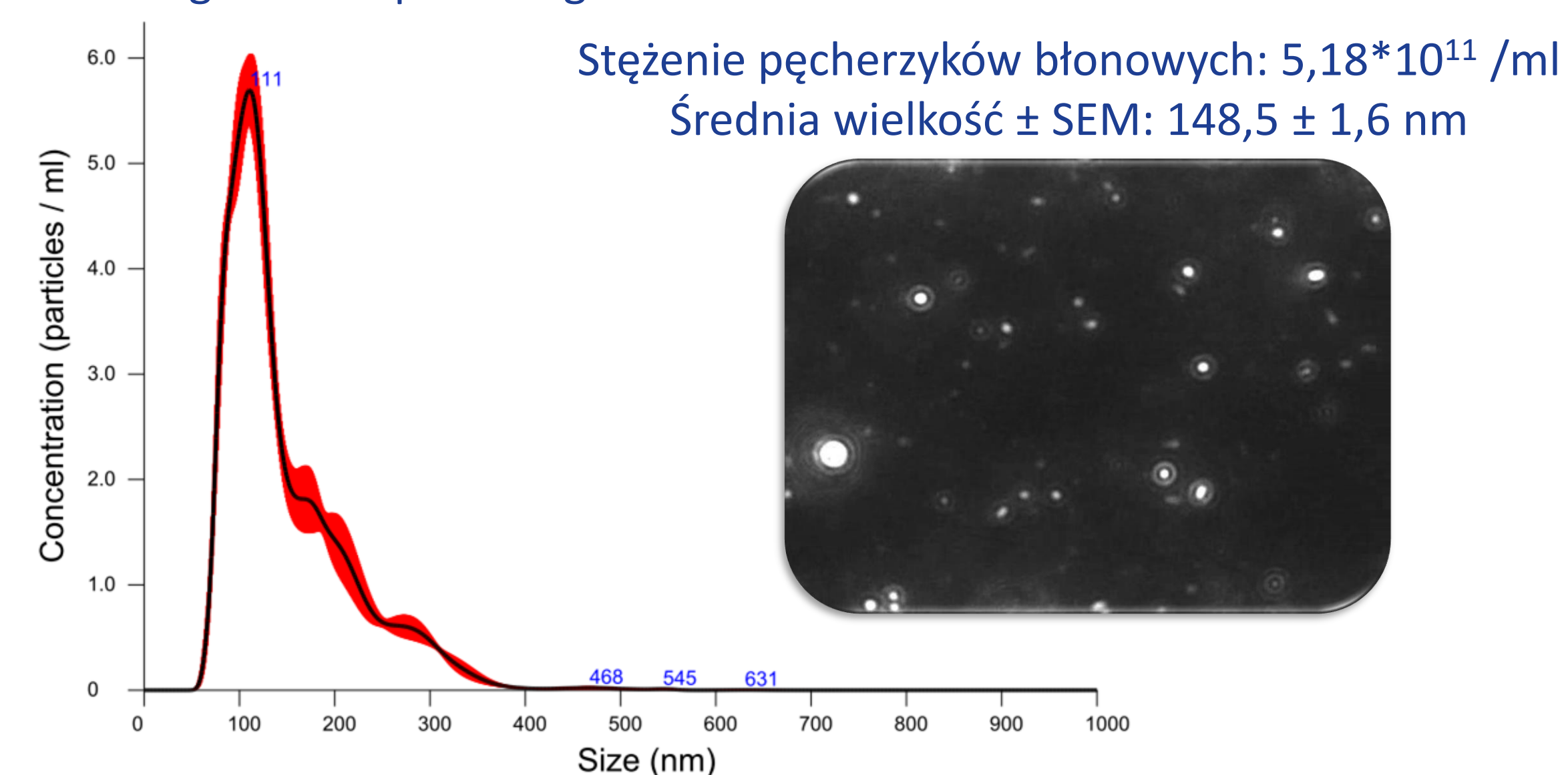


Rycina 2. Sygnał z kapilarnej elektroforezy strefowej o czasie migracji charakterystycznym dla pęcherzyków zwnętrzkomórkowych (izolacja z dobowej zbiórki moczu szczura Wistar)

A - izolacja z dobowej zbiórki moczu szczura Wistar, próbka 1



B - izolacja z ludzkiego moczu porannego



Rycina 3. Rozkład wielkości oraz stężenie pęcherzyków błonowych określone z wykorzystaniem techniki NTA

[1] Renke M., Parszuto J., Rybacki M., Wołyniec W., Rutkowski P., Rutkowski B., i in. „Chronic kidney disease – The relevant information for an occupational physician”, w: „Medycyna Pracy”, 8 listopada 2017; 69(1):67–75.

[2] Musante L., Tataruch D. E., Halthofer H., „Use and isolation of urinary exosomes as biomarkers for diabetic nephropathy”, w: „Frontiers in Endocrinology”, 2014; 5: 149.