

Kokkuvõte

Eksosoomid on endo-lüisosomaalse päritolu ja lipiidse membraaniga bioaktiivsed kehakesed, mida väljutatakse pea kõikidest rakutüüpidest raku homeostaasi või patogeneesi tagajärel. Eksosoomid kannavad rakkudest pärit valkusiid ning funktsionaalseid nukleiinhappeid, peegeldades seeläbi päritoluraku füsioloogilist seisundit ja organismi üldist heaolu. Eksosoomide uurimine on väga oluline, kuna rakuvälises keskkonnas võivad eksosoomid mõjutada rakkude signalisatsiooni, tumorigeeni taustaga eksosoomid aga hoopis aidata kaasa vähi arengule. Samas on teada, et eksosoomidel on ka suur terapeutiline potentsiaal ning on muutumas üha olulisemateks molekulideks haiguste täpsemal prognoosimisel ning diagnoosimisel, andes tõuke personaalse meditsiini arengule ja tuleviku meditsiinile.

Antud magistritöös prooviti leida alternatiivseid lahendusi eksosoomide puhastamiseks erinevatest biovedelikest ning võrrelda saadud tulemusi standardiseeritud eksosoomide puhastusmeetodiga -ultratsentrifuugeerimisega. Käesoleva magistritöö käigus jõuti järedusteni:

Ultratsentrifugeerimine

- Limiteeritud koguse inimese doonorplasma eksosoomide puhastamine ultratsentrifugeerimise teel on ebaefektiivne ja saagis on väike. Tulemused näitasid, et signaali tundlikkus kasvab plasma koguse suurendes, mistõttu eksosoomide puhastamine kliinilistel eesmärkidel ultratsentrifuugiga oleks ebatõenäoline.
- In vitro kasvatatud söötme eksosoomide puhastamine ja nende hilisem töötlemine proteaasidega viitab hüpoteetiliselt sellele, et eksosoomide membraanid võivad kõrge välise jõu mõjul viga saada. Eksosoomid on ultratsentrifuugi tuubi külge agregeerunud, lisaks võib membraanide katkemist soodustada nende mehaaniline suspenderimine. Kahjustada saanud eksosoomid aga kaotavad oma bioaktiivse toime.

- Eksosoomide puhastamine erinevatest biovedelikest nagu inimese plasma, uriin ja söötmes kasvanud eksosoomid asuvad väga erinevates valgukeskkondades ning vajaksid seetõttu ka erinevaid protokolle kohendusi. Näiteks plasma filtreerimine enne ultratsentrifugeerimist aitab vähendada müra.

Immunoafiinsus meetodika aldehyüd-sulfaat latekskerakestega

- Immunoafiinsusmeetodika eksosoomide spetsiifilise antikeha ja eksosoomide pinna antigeeni vahel on efektiivsem meetod plasma eksosoomide isoleerimiseks, võrreldes ultratsentrifugeerimisega. Tulemused tõestasid, et efektiivsus võib olla kuni 6 korda parem.
- anti-CD9, anti-Rab5, anti-CD63 antikehad on eksosoomide püüdmiseks sobilikud 1:5 suhtes (antikeha:kerakesed) 4 või 1 µm suuruste aldehyüd-sulfaat latekskerakestega.

Immunoaffiinsus tulemused ELISA meetodikaga (EXOTEST™)

- 100 µl eel-puhastatud inimese doonorplasma analüüsimine EXOTEST™ ELISA meetodikaga võimaldas saada tundliku signaali eksosoomide detekteerimiseks ning oli võrreldav ultratsentrifuugi teel puhastatud eksosoomidega.
- 10 erineva doonori plasma analüüsimine EXOTEST™ demonstreeris eksosoomide variatsiooni erinevate doonorite vahel CD63 markeri suhtes, mis oli sarnases korrelatsioonis sama koguse ultratsentrifugeeritud eksosoomide analüüsimisel.

Eksosoomide sadestamine ammooniumsulfaadiga

- Ammooniumsulfaadiga eksosoomide sadestamine on alternatiivne võimalus eksosoomide isoleerimiseks, mis ei vaja kalleid laboratoorseid vahendeid, kuid on võimalik, et koos eksosoomidega sadenevad ka ebaspetsiifilised valgud.