

**INIMESE FOLLIKULAARVEDELIKUST ERALDATUD RAKUVÄLISTE
VESIIKULITE ALAMPOPULATSIOONIDE ERALDAMINE JA
ISELOOMUSTAMINE**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Katariina Johanna Saretok
Juhendajad: Agne Velthut-Meikas, keemia ja biotehnoloogia instituut, dotsent
Inge Varik, keemia ja biotehnoloogia instituut, doktorant-nooremteadur
Õppekava: LAAB17/20, rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Katariina Johanna Saretok

[allkirjastatud digitaalselt]

Töö vastab bakalaureusetööle/magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Agne Velthut-Meikas

[allkirjastatud digitaalselt]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Indrek Koppel



ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLE SUBPOPULATIONS IN HUMAN FOLLICULAR FLUID

Bachelor's Thesis

Student: Katariina Johanna Saretok

Supervisors: Agne Velthut-Meikas, Department of Chemistry and Biotechnology,
associate professor

Inge Varik, Department of Chemistry and Biotechnology, early stage researcher

Study programme: LAAB17/20, Applied Chemistry and Biotechnology

Tallinn 2023

Sisukord

Annotatsioon	6
Abstract.....	7
Kasutatud lühendid.....	8
Sissejuhatus	9
1. Kirjanduse ülevaade	10
1.1. Follikulogenees	10
1.2. Follikulaarvedelik	11
1.3. Rakuvälised vesiikulid	11
1.4. Rakuväliste vesiikulite alampopulatsioonid.....	12
1.5. Rakuväliste vesiikulite seos naise viljakusega.....	13
1.6. Rakuväliste vesiikulite isoleerimise ja puhastamise meetodid.....	14
1.7. Rakuväliste vesiikulite iseloomustamine	17
2. Töö eesmärgid.....	18
3. Materjal ja meetodika	19
3.1. Uurimismaterjali kogumine	19
3.2. Follikulaarvedeliku töötlemine ja säilitamine.....	19
3.3. Rakuväliste vesiikulite isoleerimine suuruseralduskromatograafia meetodil.....	19
3.4. Nanopartiklite liikumisanalüüs	19
3.5. Rakuväliste vesiikulite alampopulatsioonide isoleerimine.....	20
3.6. Rakuväliste vesiikulite kontsentreerimine	20
3.7. Proovide käitlemine	20
3.8. Valkude kontsentratsiooni määramine	21
3.9. SDS-PAGE ja Western blot	21
3.10. Andmete statistiline analüüs	22
4. Tulemused	23
4.1. SEC meetodil eraldatud EV-de kontsentratsioonid ja suurused ning valguline kontaminatsioon kogutud fraktsioonides.....	23
4.2. EV-de alampopulatsioonide eraldamine.....	25
4.3. EV-de kontsentreerimise optimeerimine	26
4.4. EV-de iseloomustamine Western blot meetodil.....	27
5. Arutelu.....	29

Kokkuvõte	31
Tänuavaldused	32
Kasutatud kirjandus	33
Lisad	38
Lisa 1. Suurte EV-de keskmised suurused ja kontsentratsioonid	38
Lisa 2. Väikeste EV-de keskmised suurused ja kontsentratsioonid	39

Annotatsioon

Rakuvälised vesiikulid (EV-d) on lipiidse kaksikkihiga osakesed, mida on leitud pea kõigis kehavedelikes, kaasaarvatud follikulaarvedelikus. Munasarja folliikuli rakutüüpide sisemusest või pinnalt vabanevad EV-d osalevad rakkudevahelises suhtluses, mõjutades follikulogeneesi ja munarakkude arengu kulgu. EV-d jagunevad oma tekkemehhanismi alusel kolmeks alampopulatsiooniks: eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli optimeerida EV alampopulatsioonide isoleerimise tehnikaid follikulaarvedelikust, keskendudes kvalitatiivsete omaduste säilitamisele, ning tuvastada EV-de valgulisi markereid. Katsete seeria abil loodi protokoll EV-de puhastamiseks follikulaarvedeliku muudest komponentidest, kasutades suuruseralduskromatograafia meetodit. Seejärel eraldati TFF meetodil alampopulatsioonid suuruse alusel ning kontsentreeriti edasiseks valguliste markerite analüüsiks. Western blot meetodil tuvastati eraldatud nanopartiklidel EV-dele omaseid pinnamarkereid ning kontrolliti eraldatud EV-de puhtust albumiini ja lipoproteiinide suhtes. NTA meetodil tehti kindlaks eraldatud osakeste suurused ja kontsentratsioonid ning igas puhastamise etapis arvutati, kui palju EV-sid protseduuri käigus alles jäi.

Saadud tulemuste põhjal saab tulevikus isoleeritud alampopulatsioonidega läbi viia funktsionaalseid katseid, et uurida nende mõju folliikuli eri rakutüüpide paljunemisevõimele, elulemusele, steroidogeneesile ja metabolismile, mis omakorda võimaldab paremini mõista nende rolli naise reproduktiivsüsteemis.

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are lipid bilayer particles present in various body fluids, including follicular fluid. Ovarian follicle cells release into the extracellular environment EVs of endosomal and plasma membrane origin, which participate in intercellular communication and influence folliculogenesis and oocyte development. EVs are classified into three subpopulations based on their biogenesis: exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies.

The aim of this study was to optimize EV subpopulation isolation techniques from human follicular fluid and to identify well-known protein markers associated with EVs. The primary focus was to optimize the yield of EVs while ensuring the preservation of their qualitative characteristics. Initially, the SEC method was used to isolate EVs from follicular fluid, followed by the TFF method to separate EV subpopulations based on their size. These subpopulations were subsequently concentrated for the purpose of protein marker analysis. Western blotting revealed specific surface markers of EVs while the purity of the isolated EVs was verified by checking for albumin and lipoproteins. Additionally, the NTA method was employed to determine the size and concentration of the isolated particles and assess the EV yield at each purification step.

The results of this study pave the way for future functional experiments with EV subpopulations to explore the effects of follicular fluid exosomes on the proliferation, viability, steroidogenesis and metabolism of various follicular cell types. This in turn, offers the potential to improve our understanding of the specific roles of EVs in the female reproductive system.

Kasutatud lühendid

ALIX – ALG2-ga (alfa-1,3/1,6-mannosüültransferaas) interakteeruv valk (*ALG-2-interacting protein X*)

ApoA1 – apolipoproteiin A1

BCA – bitsinhoniinhape analüüs (*bicinchoninic acid assay*)

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumine*)

CD9/CD63/CD81 – diferentseerumise klasteri valgud (*cluster of differentiation proteins*)

dUC – diferentsiaalne ultratsentrifuugimine (*differential ultracentrifugation*)

EDTA - etüleendiamiintetraädikhape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

ESCRT – transpordiks vajalik endosomaalne sortimiskompleks (*endosomal sorting complex required for transport*)

EV – rakuväline vesiikul (*extracellular vesicle*)

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon (*follicle stimulating hormone*)

GPI – glükosüülfosfatidüülinoositol (*glycosylphosphatidylinositol*)

GRP94 – glükoos-reguleeritud valk 94 (*glucose-regulated protein 94*)

HDL - suure tihedusega lipoproteiin (*high density lipoprotein*)

HSP90 – kuumašokivalk 90 (*heat shock protein 90*)

ISEV - Rahvusvaheline Rakuväliste Vesiikulite Ühing (*International Society for Extracellular Vesicles*)

LH – luteiniseeriv hormoon (*lutinizing hormone*)

miRNA – mikroRNA (*microRNA*)

MVB – multivesikulaarne keha (*multivesicular body*)

NTA – nanopartiklite liikumisanalüüs (*nanoparticle tracking analysis*)

OPU – munasarjade punktsioon (*ovum pick-up*)

PBS - fosfaatpuhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

PBST - fosfaatpuhverdatud soolalahus Tween-20-ga (*phosphate buffered saline with Tween-20*)

PCOS – polütsüstiliste munasarjade sündroom (*polycystic ovary syndrome*)

PVDP – polüvinülideendifluoriid (*polyvinylidene difluoride*)

RIPA puhver – radioimmunosadestamise analüüsi puhver (*radioimmunoprecipitation assay buffer*)

SDS – naatrium-dodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

SEC – suuruseralduskromatograafia (*size exclusion chromatography*)

TFF – tangentsiaalvoolu filtratsioon (*tangential flow filtration*)

Sissejuhatus

Rakuvälised vesiikulid ehk EV-d on lipiidse kaksikkihiga nanomõõtmes osakesed, mida eritatakse kõikide teadaolevate rakutüüpide poolt rakuvälisesse keskkonda. EV-sid leidub erinevates kehavedelikes, näiteks veres, uriinis ja follikulaarvedelikus. EV-d osalevad rakkudevahelises suhtluses, transportides ühest rakust teise bioaktiivseid molekule, näiteks valke, lipiide ja nukleiinhappeid. Viimastel aastatel on EV-dele pööratud suurt tähelepanu tänu nende potentsiaalsetele rakendustele haiguste diagnostikas ja ravis.

Inimese follikulaarvedelikku sekreteeritud EV-d osalevad munarakkude küpsemise ja viljastumise protsessides, samuti varase embrüonaalse arengu regulatsioonis. Munasarjas leiduvate EV alampopulatsioonide füüsikaliste omaduste ja funktsioonide uurimine võimaldab tulevikus potentsiaalselt suurendada viljatusravi efektiivsust ja arendada reproduktiivsüsteemi haiguste ennetamist võimaldavaid diagnostilisi lahendusi.

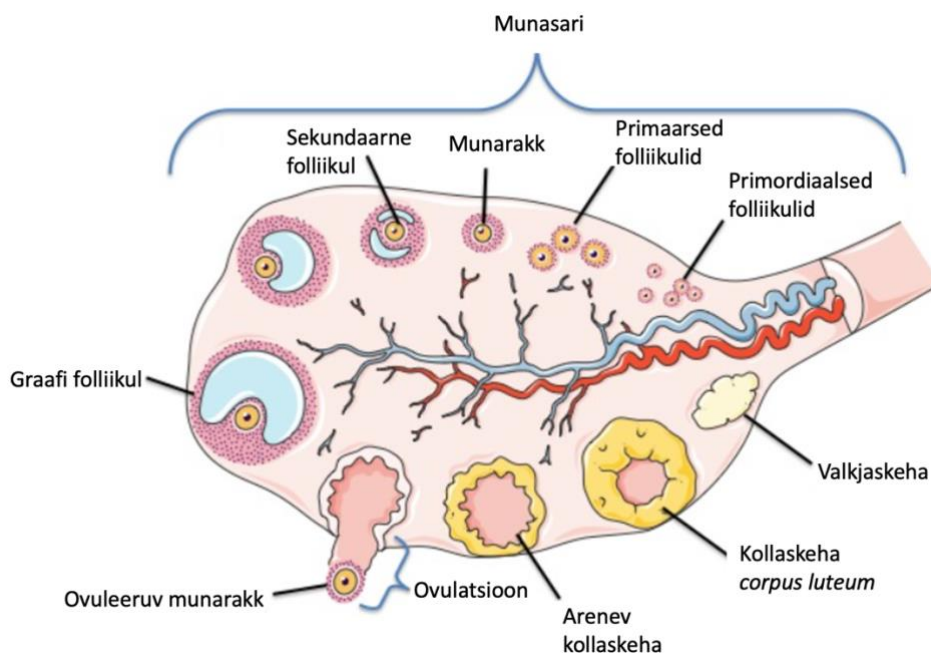
Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse munasarja folliikulite arengut, EV-de alampopulatsioone, nende rolli reproduktiivsüsteemis ning levinumaid meetodeid nende isoleerimiseks ja iseloomustamiseks. Eksperimentaalses osas optimeeritakse follikulaarvedelikust EV alampopulatsioonide eraldamist ning uuritakse erinevusi nende pinnamarkerite ekspressioonis. Järgides MISEV2018 juhiseid, eraldati EV-d follikulaarvedelikust suuruseralduskromatograafia meetodil, jaotati alampopulatsioonideks tangentsiaalvoolu filtratsiooni abil ning kontsentreeriti tsentrifugaalfiltriga. Iga etapi edukust hinnati osakeste läbimõõdu ja kontsentratsiooni mõõtmisega nanopartiklite liikumisanalüüsi meetodil.

Töö tulemusena optimeeriti EV alampopulatsioonide eraldamise protokoll, mida saab kasutada edasistes funktsionaalsetes uuringutes. Optimeerimise käigus suurendati isoleeritud osakeste saagikust ja veenduti, et protseduuri käigus ei eralduks suurtes kogustes kaasa kontamineerivaid bioaktiivseid molekule, näiteks lipoproteiine ja valke. EV-de pinnamarkerite analüüs kinnitas, et isoleeritud nanoosakesed olid tõepoolest rakuvälised vesiikulid, ekspresseerides oma pinnal EV-dele iseloomulikke valke CD9 ja CD81. Saadud tulemused loovad aluse edasistele eksperimentidele, mille käigus uuritakse follikulaarvedeliku EV alampopulatsioonide rolli rakkudevahelises suhtluses.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Follikulogenees

Follikulogeneesiks nimetatakse protsessi, mille käigus munasarja folliikulid suurenevad mõõtmetelt ning valitakse välja üks folliikul, milles küpsenud munarakk ovuleerub. Varaseimateks follikulaarseteks struktuurideks on primordiaalsed folliikulid, mis moodustuvad loote arengu käigus (Joonis 1). Primordiaalsed folliikulid sisaldavad meioosi esimese jagunemise profaasis peatunud munarakku, mis on ümbritsetud ühe kihi lamedate granuloosarakkude eellasrakkude poolt. Primordiaalsest folliikulitest saavad erinevate aktiveerivate ja inhibeerivate faktorite toimel primaarsed ning seejärel sekundaarsed folliikulid, mida ümbritsevad lisaks granuloosarakkudele ka teekarakud (Dunlop & Anderson, 2014). Munasarja folliikuli somaatilised rakud toetavad munaraku kasvu ja arengut, samuti aitab munarakk kaasa granuloosa- ja teekarakkude proliferatsioonile ja diferentseerumisele (Rimon-Dahari et al., 2016).



Joonis 1. Munasarja folliikulite areng. Kohandatud <https://www.repropedia.org/folliculogenesis> järgi.

Follikulogeneesi viimane faas ehk antraalne follikulogenees algab puberteedieas ning selle kulg sõltub gonadotropsetest hormoonidest. Ajuripatsi poolt toodetud folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH) toetab antraalsete ehk Graafi folliikulite kasvu, kuni suurim ehk dominantne folliikul hakkab tootma FSH supressorina toimivat östradioli. Hüpofüüsis indutseeritava luteiniseeriva hormooni (LH) järsu kontsentratsiooni tõusu tagajärjel toimub dominantse folliikuli ovulatsioon ning ülejäänud antraalsed folliikulid taanduvad. LH impulsside sagedusest ja amplituudist sõltub, kas dominantne folliikul jõuab ovulatsioonini või mitte (Hennet & Combelles, 2012). Menstruatsioonitsükli jooksul võib enne LH taseme tõusu dominantse folliikuli valik toimuda kaks või kolm korda (Scaramuzzi et al., 2011). Mitmed munasarja folliikulid, mis dominantseks folliikuliks

ei arenenud, taanduvad atreesia käigus. Follikulaarne atreesia on apoptootiline protsess, mis algab granuloosarakkude kihis ning seejärel kulgeb teekarakkudes, põhjustades folliikuli arengu peatumise ja taandumise (Craig et al., 2007). Peale munaraku ovuleerumist moodustub dominantsest folliikulist progesterooni tootev kollaskeha (*corpus luteum*), mille eesmärgiks on viljastatud munaraku implanteerumiseks emaka endomeetriumi ettevalmistamine (Reed & Carr, 2000). Viljastumise korral püsib kollaskeha kuni platsenta moodustumiseni (Oliver & Pillarsetty, 2023). Kui viljastamist ei toimu, kollaskeha taandub ning moodustub valkjaskeha (Reed & Carr, 2000).

1.2. Follikulaarvedelik

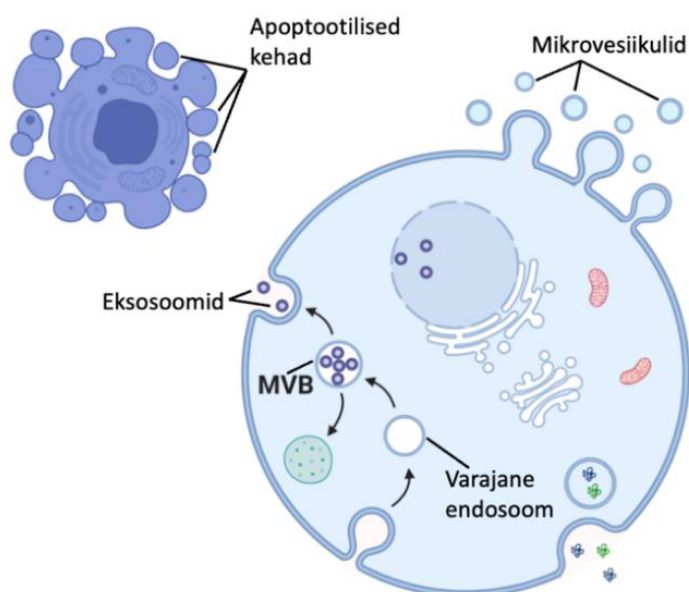
Kui folliikulid arenevad antraalsesse staadiumi, moodustub nende sisemusse õõnsus, mis täitub follikulaarvedelikuga. Tegu on keskkonnaga, mis loob soodsad tingimused munaraku arenguks, sest follikulaarvedelikus leiduvad nii vereringest kui ka folliikuli somaatiliste rakkude poolt sekreteeritud komponendid: steroid- ja valguhormoonid, antikoagulandid, ensüümid, elektrolüüdid, reaktiivsed hapnikuühendid, antioksüdandid, kasvufaktorid, metaboliidid ja rasvhapped. Follikulaarvedelikku sekreteeritud komponendid võimaldavad antraalses folliikulis sisalduvate rakkude omavahelist suhtlust. (Basuino & Silveira, 2016; Hennet & Combelles, 2012)

Follikulaarvedelikku kogutakse munasarjade punktsiooni ehk OPU (ingl k *ovarian pick-up*) meetodil, mille käigus aspireeritakse nõela abil ultraheli kontrolli all Graafi folliikulitest follikulaarvedelik, mis sisaldab küpseid munarakke. Enne protseduuri teostamist stimuleeritakse munasarju gonadotropiinidega, et ühe menstruatsioonitsükli jooksul valmiks võimalikult palju munarakke. Protseduuri teostatakse viljakusravikliinikutes kehavälise viljastamise eesmärgil, et koguda piisaval hulgal küpseid munarakke. (Benammar et al., 2021)

1.3. Rakuvälised vesiikulid

Kõik teadaolevad rakutüübid vabastavad rakuvälisesse keskkonda lipiidse kaksikkihiga osakesi, mida nimetatakse rakuväliseks vesiikuliteks ehk EV-deks (ingl k *extracellular vesicles*) (Doyle & Wang, 2019). Algselt kirjeldati rakuvälise vesiikulite sekreteerimist kui mehhanismi, mille abil eemaldatakse rakkudest ebavajalikke biomolekule, kuid tänapäeval peetakse EV-sid hoopis võimalikuks rakkudevahelise suhtluse mehhanismiks. Kui EV-d on vabanenud rakuvälisesse keskkonda, on nad võimelised sisenema sihtmärkrakkudesse ning vabastama oma sisu, kutsudes seeläbi esile rakusiseseid muutusi (van Niel et al., 2018). EV-d transpordivad endaga kaasas erinevaid valke, lipiide, nukleiinhappeid ja metaboliite. EV-sid on leitud mitmetest kehavedelikest: follikulaarvedelikest (Rooda et al., 2020), seemnevedelikest (Aalberts et al., 2013), verest (Caby et al., 2005), uriinist (Pisitkun et al., 2004), sülgest (Ogawa et al., 2011), rinnapiimast (Admyre et al., 2007), amnionivedelikest (Asea et al., 2008), liikvorist (Vella et al., 2007) ja sapist (Masyuk et al., 2010). Rakuvälised vesiikulid erinevad üksteisest suuruse, morfoloogia ning koostise poolest (van Niel et al., 2018) ning neid jaotatakse tekkeviisi alusel kolmeks alampopulatsiooniks: eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad (Doyle & Wang, 2019, Joonis 2).

EV-d osalevad organismi mitmete füsioloogiliste protsesside kulgemisel, säilitades tüvirakke, parandades kudesid ja koaguleerides verd. Kuid EV-d võivad osaleda ka patoloogilistes protsessides ning toetada kasvaja arengut ja metastaseerumist (Maimets & Kuuse, 2018). Tänu sellele, et EV-sid leidub pea igas kehaveidelikus, on võimalik neid kasutada biomarkeritena haiguste tuvastamisel (Keller et al., 2006). Näiteks on leitud, et plasma ja liivvori eksosoomid sisaldavad Parkinsoni tekkega seotud valku α -sünukleiini, mistõttu on nende abil võimalik haiguse kulgu ennustada (Niu et al., 2020). Samuti saab EV-sid kasutada ravimite või vaktsiinide efektiivsemaks manustamiseks, takistades ravimi enneaegset lagunemist. Läbi EV fosfolipiidse membraani on võimalik edukalt sisestada hüdrofiilseid või hüdrofoobseid ravimeid ning transportida neid läbi rakkude plasmamembraani (Lai et al., 2013).



Joonis 2. Rakuväliste vesiikulite tekkeviisid. Multivesikulaarne keha (MVB, ingl k *multivesicular body*) on hiline endosoom, mille sisu võib kas laguneda lüsoosoomiga liitumisel või vabaneda plasmamembraaniga liitumisel rakuvälisesse ruumi (Li et al., 2018). Kohandatud <https://www.tamirna.com/comprehensive-ev-characterization> järgi.

1.4. Rakuväliste vesiikulite alampopulatsioonid

Enim uuritud EV-de alampopulatsioonideks on eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad, mida eristatakse nende päritolu alusel, kuid üha enam tõendeid viitab sellele, et ka neid alampopulatsioone saab jaotada omakorda alampopulatsioonideks (Jeppesen et al., 2023). Eksosoomi nimetatakse ka valendikuväliseks vesiikuliteks, sest nad on väikesed endosomaalse päritoluga ja kaksikkihiga ümbritsetud 30-150 nm läbimõõduga rakuvälised vesiikulid. Eksosoomid tekivad varajaste endosoomide membraanide sissesopistumisel, millest arenevad välja multivesikulaarsed kehad (MVB). Nii varajased endosoomid kui ka MVB-d osalevad valkude sortimises, taaskasutuses, säilitamises, transpordis ja vabastamises. Lõpuks saadetakse MVB-d koos kõigi sisalduvate komponentidega kas lüsoosoomi lagundamisele või nende membraanid ühinevad rakumembraaniga, et vabastada eksosoomi rakuvälisesse keskkonda (Doyle & Wang, 2019). Imetajate eksosoomid on sarnased struktuuri, tiheduse ja valgulise koostise poolest, sisaldades nii

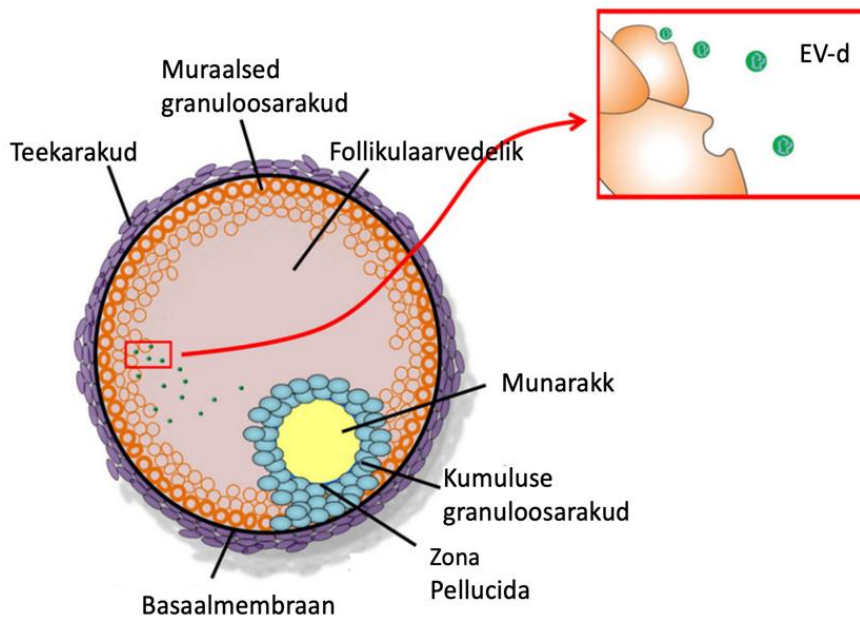
ühiseid tsütoplasmaatilisi valke kui ka pinnavalke (Keller et al., 2006). Eksosoomide moodustamises ja MVB-de transpordis osalevad transpordiks vajaliku endosomaalse sortimise kompleksi ehk ESCRT (ingl k *endosome sorting complex required for transport*) valgud, seega leidub sellesse kompleksi kuuluvaid valke (ALIX, HSP90) kõigis eksosoomides, sõltumata sellest, missugusest rakutüübist nad pärinevad. Kuna varajane endosoom pärineb raku plasmamembraanist, esinevad eksosoomide pinnal ka plasmamembraanis sisalduvad valgud, näiteks tetraspaniinid CD9, CD63 ja CD81 (Doyle & Wang, 2019).

Mikrovesiikulid vabanevad rakuvälisesse keskkonda rakupinna pungumisel ja nende suurus jääb vahemikku 50-1000 nm. Mikrovesiikulite kokkupuutel sihtmärkrakkudega võib toimuda kolm eri protsessi: mikrovesiikuli ja sihtmärkraku membraanid ühinevad ja vesiikuli sisu pääseb rakku, mikrovesiikul endotsüteeritakse või seondub plasmamembraanile pinnamolekulide kaudu ja käivitab rakusisesed signaalirajad (Maimets & Kuuse, 2018). Erinevad vähiuuringud on näidanud, et kasvajakarust pärinevad mikrovesiikulid mängivad olulist rolli kasvaja ümbruses olevate rakkude surmas, suurendavad teiste kasvajakarude proliferatsiooni, levitavad kasvajat ja põhjustavad haiguse progressiooni (Samii & Razmkhah, 2020).

Apoptootilised kehad on üldiselt suurema läbimõõduga kui eksosoomid ja mikrovesiikulid (500-2000 nm) ning need tekivad raku apoptoosi hilises faasis, sisaldades rakust pärit tuumamaterjali, organelle ning komponente nii tsütosoolist kui ka plasmamembraanist. Apoptootiliste kehade membraanid sisaldavad fosfaditüülseriini, anneksiin V, trombospondiini ja komplementi C3b, mis aktiveerivad makrofaage neid fagotsüteerima ning fagolüsoosoomides lagundama. (Maimets & Kuuse, 2018)

1.5. Rakuväliste vesiikulite seos naise viljakusega

Munasarja folliikulid koosnevad mitmest eri rakutüübist, mis osalevad erinevates bioloogilistes protsessides, sealhulgas reageerivad hüpopfüüsi poolt toodetud gonadotropiinidele, mis on vajalikud munarakkude arenguks, küpsemiseks ja ovulatsiooniks (Roos et al., 2022, Joonis 3). Uuringud on näidanud, et granuloosarakud on võimelised follikulaarvedelikus sisalduvaid EV-sid enda sisemusse vastu võtma (Hung et al., 2017). Kuigi eeldatakse, et enamik follikulaarvedeliku EV-dest on sekreteeritud muraalsete ja kumuluse granuloosarakkude poolt, on siiski leitud, et osa neist pärineb hoopis munarakust või teekarakkudest (Matsuno et al., 2019). Samuti on leitud, et EV-de sisemus ja pinnamarkerid sõltuvad follikulaarse arengu etapist (Machtinger et al., 2020). Näiteks antraalse folliikuli varajases staadiumis isoleeritud EV-d sisaldavad miRNA-sid (mikroRNA), mida seostatakse rakkude proliferatsiooniga, kuid hilisemas arenguetapis on EV-des sisalduvad miRNA-d seotud põletikulise vastusega (Navakanitworakul et al., 2016).



Joonis 3. Munasarja preovulatoorse folliikuli skeem ja seal esinevad peamised rakutüübid. Kohandatud Machtinger et al., 2016 järgi.

Rakkudevahelisel suhtlusel on oluline roll nii follikulogeneesis, munarakkude viljastumisel kui ka embrüogeneesis, sest munasarjas, munajuhas, endomeetriumis ja platsentas olevad EV-d mõjutavad gametogeneesi ja viljastumist ning võimaldavad embrüo ja ema vahelist suhtlust (Machtinger et al., 2016). Viljastamise ajal võivad EV-d reguleerida ema immuunsust, soodustada embrüo implanteerumist ja varast embrüo arengut ning vältida raseduse katkemist. Follikulaarvedelikust eraldatud EV-sid saab potentsiaalselt kasutada biomarkeritena erinevate reproduktiivsüsteemi haiguste tuvastamiseks nagu näiteks polütsüstiliste munasarjade sündroom (PCOS, ingl k *Polycystic Ovary Syndrome*), endometrioos ning munasarja- ja emakakaelavähk (Zhou et al., 2022). Mitmed uuringud on näidanud, et erinevad diagnoosid, nagu PCOS ja endometrioos, samuti vananemine, kõrge kehamassiindeks ja kokkupuude keskkonnas olevate kemikaalidega, põhjustavad erinevusi EV-de sisemuses olevate miRNA-de profiilis (Machtinger et al., 2020; Rooda et al., 2020). Samuti on näidatud, et sea follikulaarvedelikust eraldatud eksosoomid sisaldavad miRNA-sid, mis suurendavad granuloosarakkude proliferatsiooni ning põhjustavad muutusi rakkude geeniekspressioonis (Yuan et al., 2021). EV-de kontsentratsioon follikulaarvedelikus ja miRNA-de profiil on erinevad viljakate naiste ja PCOS patsientide vahel (Rooda et al., 2020). Kuna *in vitro* uuringutes ei suudeta piisavalt jäljendada inimese reproduktiivorganite keskkonda, nõuab valdkond rohkem uuringuid, et paremini mõista follikulaarvedeliku EV-de mõju munasarjas leiduvatele rakutüüpidele (Machtinger et al., 2020).

1.6. Rakuväliste vesiikulite isoleerimise ja puhastamise meetodid

Sõltuvalt eri kehavedelike omadustest ning nendes leiduvate EV-de suurustest ja molekulaarsetest omadustest, esineb mitmeid EV-de isoleerimise meetodeid, mis aitavad paremini mõista nende bioloogilisi funktsioone. Sellegipoolest mõjutavad eri isoleerimismeetodid edasiste katsete tulemusi ning seeläbi ka reprodutseeritavust (Abramowicz et al., 2016). Enim kasutatud EV-de

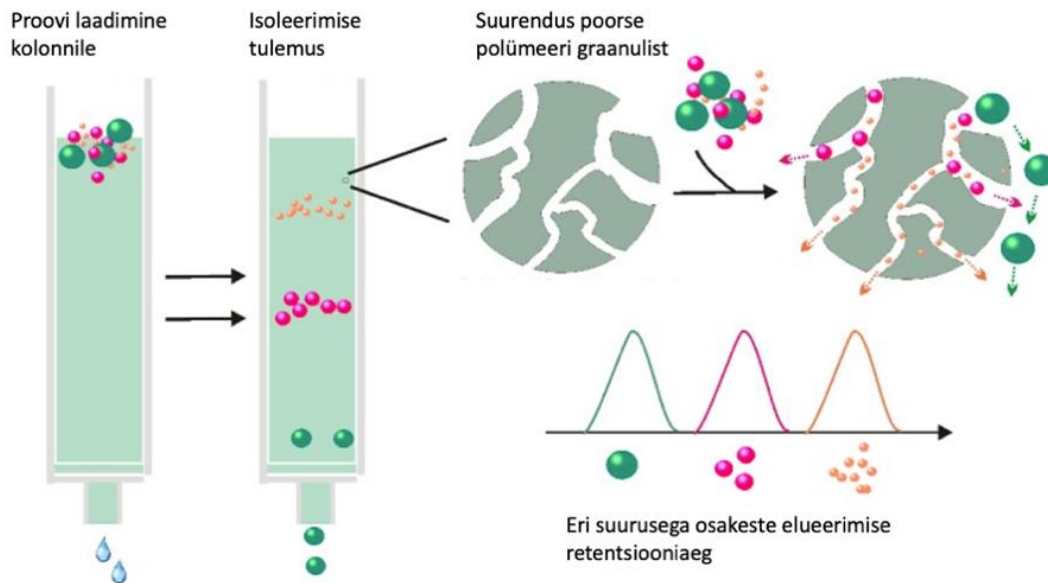
isoleerimise meetodiks on diferentsiaalne ultratsentrifuugimine (dUC), mis põhineb EV-de settimisel suure tsentrifugaaljõu abil (Théry et al., 2006). Tegu on meetodiga, mis on aeganõudev, nõuab spetsiaalset väljaõpet ja ultratsentrifuugi olemasolu. Meetodi puuduseks on ka see, et suurel kiirusel tsentrifuugimine võib põhjustada EV-de agregeerumist, purunemist ja lahuses olevate valkudega sadestumist, mõjutades EV-de füüsikalisi omadusi ja preparaadi edasist analüüsi (Monguió-Tortajada et al., 2019).

Isoleerimismeetodite hulka kuuluvad veel EV-de sadestamisel põhinevad protokollid, mis on kasutajasõbralikud, odavad ning hõlpsasti rakendatavad. Enamik neist põhineb hüdrofiilse polümeeriga EV-de väljasadestamisel, millele järgneb madalal kiirusel tsentrifuugimine. Kuigi EV-de sadestamine tagab suurema saagikuse, on meetodi probleemiks madal puhtusaste, sest välja sadenevad kõik lahuses leiduvad osakesed, sealhulgas ka näiteks valgud ja lipoproteiinid. (Ayala-Mar et al., 2019)

Lisaks EV-de füüsikalistel omadustel põhinevatele meetoditele on olemas meetodid, mis võimaldavad EV-sid isoleerida nende pinnavalkude põhjal. Immuunafiinsusmeetodil on võimalik EV-sid isoleerida, kasutades EV-dele iseloomulike pinnamarkerite CD9-, CD63- ja CD81-vastaseid antikehi. Kuna seni pole teada ühtegi markerit, mis paikneks kõigi EV-de pinnal, on antud meetodi puuduseks see, et saadakse EV-de alampopulatsioon, mille edasisel uurimisel saadud tulemused võivad olla kallutatud ega iseloomusta kogu EV-de populatsiooni. (Monguió-Tortajada et al., 2019)

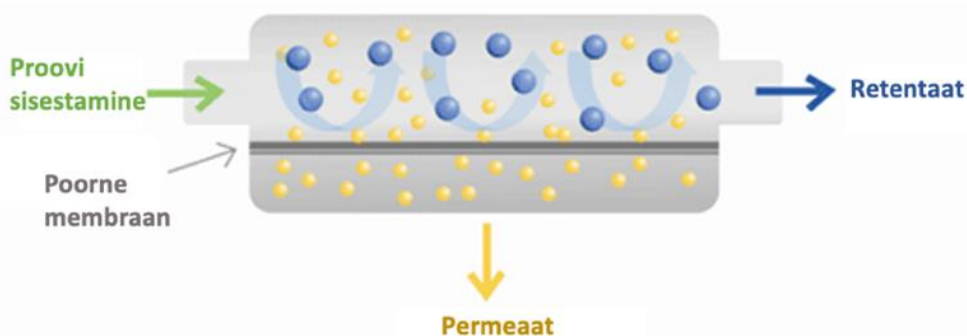
Sarnaselt immuunafiinsusmeetodile isoleeritakse voolutsütomeetria abil EV-sid pinnamarkerite alusel. Meetodi puuduseks on see, et EV-de väikese läbimõõdu tõttu vajatakse kõrge eraldusvõimega voolutsütomeetrit. Lisaks eelnevalt mainitud meetoditele on välja töötatud alternatiivseid viise, mis asendavad traditsioonilisi isoleerimismeetodeid, pakkudes suuremat saagikust. Peamiselt on esile tõusnud meetodid, mis eraldavad EV-sid suuruse alusel. Nendeks on suuruseralduskromatograafia (SEC) ja tangentsiaalvoolu filtratsioon (TFF). (Monguió-Tortajada et al., 2019)

Üha enam populaarsust koguv SEC meetod põhineb erineva suurusega osakeste erinevatel elueerumisprofiilidel (Joonis 4). SEC-i käigus jooksutatakse proovi läbi poorse polümeeri. Väikesed osakesed, näiteks valgud, takerduvad polümeeri pooridesse, mistõttu nende kolonni läbimisteed on pikem ning nad elueeruvad pärast EV-sid. Kuna EV-d on suuremad kui polümeeri poorid, liiguvad EV-d kolonnis kiiremini ning elueeruvad enne valkuseid. SEC meetodil EV-de isoleerimine põhjustab proovi lahjenemist ning edasisteks analüüsideks on vaja proove kontsentreerida. Siiski on tegu laialdaselt kasutatava meetodiga, sest see on traditsiooniliste meetoditega võrreldes lihtsam ja kiirem ning tagab puhtamad EV-d, mille omadusi on võimalik säilitada. SEC on laborites hõlpsasti rakendatav, sest kolonne on võimalik peale pesemisetappe taaskasutada, samuti on meetodit võimalik automatiseerida ning kombineerida teiste meetoditega nagu TFF (Monguió-Tortajada et al., 2019). Kuna SEC meetodil jooksutatakse proove passiivse gravitatsioonijõu abil, ei avaldata EV-dele isoleerimise ajal liigset survet, säilitades nende algset struktuuri ja seeläbi ka funktsioone (Yang et al., 2020).



Joonis 4. SEC meetodil EV-de isoleerimise põhimõtte. Proovi läbimisel läbi poorse polümeeri eralduvad osakesed suuruse alusel: suurema läbimõõduga osakesed elueeruvad esimesena ning väiksemad osakesed sisenevad polümeeri pooridesse ning elueeruvad hiljem, põhjustades erinevusi retentsiooniajas. Kohandatud Yang et al., 2020 järgi.

EV-sid saab eraldada ka erinevate filtreerimistehnikate abil, kasutades poolläbilaskvaid poorseid membraane. Pori suurusest väiksemad osakesed läbivad membraani ning eralduvad proovist (Monguió-Tortajada et al., 2019). Üheks levinumaks EV-de filtreerimise meetodiks on ultrafiltreerimine. Kuigi meetod on lihtne ja kiire, esineb tihti membraani pooride ummistumist, mis takistab EV-de isoleerimist ning põhjustab kallite membraanide eluea lühenemist. TFF pakub antud probleemile lahenduse, sest membraan on pidevalt paralleelse voolujõu all, vältides seeläbi pooride ummistumist ning võimaldades kolonni korduvalt kasutada. TFF meetodil voolutatakse proovi membraaniga paralleelselt, mille tulemusel väiksemad osakesed liiguvad läbi membraanis olevate pooride ning suuremad osakesed elueeruvad retentaadina (Joonis 5). Filtreerimise käigus voolutatakse ülejääki korduvalt toitemahutis edasi-tagasi, võimaldades suuremat saagikust (Yang et al., 2020).



Joonis 5. Tangentsiaalvoolu filtratsiooni põhimõtte. Mahutisse sisestatakse proov, mida jooksutatakse paralleelselt poorse membraaniga, põhjustades pooridest väiksemate osakeste elueerumist permeaadina. Retentaadina kogutakse proovi koos osakestega, mille diameeter on pooridest suurem ning seetõttu ei läbi ka membraani. Kohandatud <https://tblplastics.com/tangential-flow-filtration-tff/> järgi.

1.7. Rakuväliste vesiikulite iseloomustamine

2014. aastal avaldasid Rahvusvahelise Rakuväliste Vesiikulite Ühingu (ISEV) juhatuse liikmed väljaande (MISEV2014), milles kirjeldatakse minimaalseid eksperimentaalseid nõudeid EV-de ja nende funktsioonide määratlemiseks teadusuuringutes. 2018. aastal anti välja MISEV2018, uuendatud versioon EV-de uurimise juhistest ja soovituslikest protokollidest. Kuna EV-de isoleerimine pole standardiseeritud protsess ning uuringutes kasutatakse erinevaid isoleerimistehnikaid, nõutakse teostatud protseduuride üksikasjalikku dokumenteerimist, et saadud tulemusi oleks võimalik korrata. (Théry et al., 2018)

MISEV2018 juhistes on antud suunised EV-de iseloomustamiseks valguliste markerite abil, mis kuuluvad kolme kategooriasse: 1) transmembraansete või GPI-ga (ingl k *glycosylphosphatidylinositol*) ankurdatud valkude olemasolu, mis toestab lipiidse kaksikmembraani olemasolu; 2) tsütosoolsete või periplasmaatiliste valkude olemasolu ning 3) lipoproteiinide ja mitteintegraalsete valkude (nagu albumiin või atsetüülkoliinesteraas) puudumine, mis võimaldab kirjeldada EV proovi puhtusastet. Samuti tuleb raporteerida saadud EV-de kontsentratsioonid, kasutades mõõtmiste teostamiseks erinevaid nanopartiklite loendamise tehnoloogiaid. Üheks oluliseks punktiks antud juhises on soovitus teadusuuringutes kindla alampopulatsiooni funktsioonide uurimisel kaasata ka teisi alampopulatsioone ning neid omavahel võrrelda. (Théry et al., 2018)

Spetsiifiliste valkude tuvastamiseks kasutatakse tavaliselt Western blot analüüsi, mis võimaldab kindlaks määrata nii EV-de pinnamarkerite kui ka tsütosoolsete markerite olemasolu (Bağcı et al., 2022). EV-dest isoleeritud valgud lahutatakse elektroforeesi käigus suuruse alusel, kantakse üle membraanile ning uuritavat valku visualiseeritakse antikehade abil (Mahmood & Yang, 2012). Western blot meetod võimaldab kindlaks teha uuritava proovi puhtust kontamineerivate valkude suhtes, mis võivad edasisi tulemusi mõjutada (Bağcı et al., 2022).

Nanopartiklite liikumisanalüüs (NTA) on üks sagedamini kasutatavaid biofüüsikalisi meetodeid EV-de suuruse ja arvukuse määramisel. Meetod põhineb vedelsuspensioonis olevate osakeste Browni liikumise mõõtmisel, mis on otseses sõltuvuses osakeste suurusega. EV-d laetakse laserkiirega valgustatud kambrisse, laseriga kokkupuutel peegeldub valgus kaamerasse ning osakeste läbimõõt arvutatakse Stokes-Einsteini võrrandi abil. (Bağcı et al., 2022)

2. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli:

1. Optimeerida inimese follikulaarvedelikust EV-de alampopulatsioonide eraldamise tehnikaid;
2. Uurida eraldatud EV-de alampopulatsioonide füüsikalisi omadusi (suurus ja kontsentratsioon);
3. Tuvastada ja võrrelda EV-de alampopulatsioonidel esinevaid valgulisi markereid Western blot meetodil.

3. Materjal ja metoodika

3.1. Uurimismaterjali kogumine

Antud bakalaureusetöös kasutati 10 patsiendi ovulatsioonieelsetest folliikulitest kogutud follikulaarvedelikke. Materjali koguti Nova Vita kliinikus viljatusravi raames läbi viidud munasarja punktsiooni käigus. Munasarjade hormonaalseks stimulatsiooniks manustati patsientidele gonadotropiini vabastava hormooni antagonist (Cetrotide, Merck, Saksamaa) ja rekombinantset folliikuleid stimuleerivat hormooni (Gonal-F, Merck, USA). Patsientidele teostati munasarjade punktsioon, kui vähemalt kaks folliikulit olid suuremad kui 18 mm, 36 tundi pärast inimese kooriongonadotropiini (Ovitrelle, Merck) manustamist. Uuringusse kaasamise eel paluti patsientidel täita kirjalik informeeritud nõusoleku vorm. Proovide kogumine on heaks kiidetud Tartu Ülikooli inimuuringu eetika komitee poolt (protokolli number: 289/M-8).

3.2. Follikulaarvedeliku töötlemine ja säilitamine

Munasarja punktsiooni käigus kogutud follikulaarvedelikke transporditi termosel ning materjali töödeldi samal päeval. Follikulaarvedeliku tsentrifuugiti rakkude eemaldamiseks 10 minutit 300 g juures ning seejärel tsentrifuugiti uuesti 10 minutit 2000 g juures täielikuks rakujäätmete eemaldamiseks. Supernatant tõsteti uude katsutisse, võtmata kaasa rakulist materjali. Sama patsiendi eri folliikulitest kogutud vedelik töödeldi ühes katsutis, jaotati 1,5 ml alikvootideks ja säilitati -80 °C juures.

3.3. Rakuväliste vesiikulite isoleerimine suuruseralduskromatograafia meetodil

EV-de eraldamiseks kasutati PURE-EVs SEC kolonni (HansaBioMed Life Sciences, Eesti), mida voolutati enne proovi laadimist 3 korda 1x fosfaatpuhverdatud soolalahusega (PBS, Corning, USA). Follikulaarvedelik tõsteti tunniks ajaks toatemperatuurile sulama. Seejärel pipeteeriti 1,5 ml follikulaarvedeliku SEC kolonnile ning eluaat koguti käsitsi 0,5 ml fraktsioonide kaupa. Kui follikulaarvedelik oli täielikult kolonni sisenenud, lisati edaspidi 2 ml kaupa 1x PBS-i, kuni kõik fraktsioonid said kogutud. Seejärel pesti SEC kolonni kolm korda 1x PBS-iga ja säilitati +4 °C juures. Ühte SEC kolonni kasutati kuni 5 korda.

3.4. Nanopartiklite liikumisanalüüs

Nanopartiklite liikumisanalüüsi seadet ZetaView® (Particle Metrix, Saksamaa) kasutati isoleeritud rakuväliste vesiikulite kontsentratsiooni ja suuruse mõõtmiseks. Instrumenti kalibreeriti 100 nm polüstüreenist nanopartiklitega (Applied Microspheres, Holland) vastavalt tootja protokollile. Seejärel puhastati instrumenti 1x PBS puhvriga. SEC-il kogutud fraktsioone lahjendati 1x PBS-iga

ligikaudse kontsentratsioonini $10^6 - 10^7$ partiklit/ml, et vaateväljas olevad partiklid oleksid instrumendi poolt tuvastatavad (50-200 partiklit kaadri kohta). Partiklite suurust ja kontsentratsiooni mõõdeti kolmes tsükliks, 11 kaameraposisioonis ning igas positsioonis tehti 30 kaadrit. Mõõtmised teostati temperatuuril 25 °C ning järgmiste parameetritega: tundlikkus 85, säriaeg 1/100 sekundit.

3.5. Rakuväliste vesiikulite alampopulatsioonide isoleerimine

Tangensiaalvoolu filtratsioon (TFF) võimaldab isoleeritud EV-sid üksteisest eraldada suuruse alusel. TFF protseduuriks kasutati TFF-MV filtrit (HansaBioMed Life Sciences), mis sisaldab polüsulfoonist valmistatud õõneskiudusid, milles on 200 nm läbimõduga poorid. SEC meetodil follikulaarvedelikust eraldatud EV-sid sisaldavad fraktsioonid koguti kokku 15 ml katsutisse ja proovi ruumala viidi 1x PBS-iga 5 ml-ni. TFF filtri ühte otsa asetati tühi süstal ning teise otsa sisestati EV proovi sisaldav süstal. Üks TFF filtri alumistest korkidest eemaldati ning avaus asetati tühja 15 ml katsuti kohale. Filtreerimiseks vajutati vaheldumisi süstalde hoobadele. Esmalt koguti permeaat, mis sisaldab <200 nm diameetriga EV-sid, misjärel pesti filtrit 5 ml 1x PBS-iga. Viimaks koguti retentaat, mis sisaldab >200 nm diameetriga EV-sid. Retentaadi kogumiseks suleti filtri alumine kork ning 5 ml 1x PBS-i kanti süstla abil filtrile. 1x PBS-i voolutati süstlatega läbi filtri umbkaudu 30 korda ning retentaat koguti uude 15 ml katsutisse. TFF filtrit pesti peale isoleerimist kolm korda 5 ml 1x PBS-iga ning kasutati kuni 25 korda.

3.6. Rakuväliste vesiikulite kontsentreerimine

Proovide kontsentreerimiseks lisati TFF protseduuri käigus saadud proovid Amicon Ultra-15 100 kDa tsentrifugaalfiltritele (Merck Millipore, USA), millega on võimalik proove kontsentreerida maksimaalselt 200 µl-ni. Kontsentreerimine teostati 5000 g ja 3200 g juures toatemperatuuril. Proovide lõppmaht jäi vahemikku 200-700 mikrolitrit.

3.7. Proovide käitlemine

Valgualanüüsiks esmalt lüofiliseeriti kontsentreeritud EV proovid Scanvac CoolSafe lüofilisaatoriga (LaboGene, Taani) 5% sahharoosi lahuses ning lahustati hiljem 50-100 µl Milli-Q vees. Inimese follikulaarvedelikust ning SEC meetodi käigus kogutud fraktsioonidest 11-14 sadestati valgud, lisades 300 mikrolitri proovile 400 µl metanooli, 100 µl kloroformi ja 100 µl Milli-Q vett. Seejärel tsentrifugiti proove 14 000 g juures 5 minutit, eemaldati supernatant, lisati uuesti sama kogus metanooli ja tsentrifugiti 14 000 g juures. Sadestatud valgud suspendeeriti cOmplete mini (Roche, Saksamaa) 1x proteaasi inhibiitorit sisaldavas 0,25% SDS lahuses. Positiivse kontrollina kasutati eksperimendis HCT116 käärsoolevähi rakuliini poolt toodetud EVsid (HansaBioMed Life Sciences, Eesti), mis võeti üles 100 µl Milli-Q vees. Lisaks kasutati positiivse kontrollina inimese granuloosa rakuliini KGN (Nishi et al., 2001). KGN rakke inkubeeriti koekultuuri plaadilt lahti saamiseks 0,05% trüpsiini + 0,53 mM etüleendiamiintetraäädikhape (EDTA) lahusega (Corning, USA) ning seejärel

tsentrifuugiti 5 minutit 400 g juures. Järgnevalt eemaldati supernatant ning rakke pesti 1x PBS-iga. Rakke tsentrifuugiti uuesti 5 minutit 400 g juures, eemaldati supernatant ning seejärel lüüsi RIPA puhvril (50 mM Tris pH 7,4; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1% SDS), millele oli lisatud 1x proteaasi inhibiitor. Lüsaati hoiti jääl 30 minutit ning aeg-ajalt segati vorteksil. Järgnevalt tsentrifuugiti lüsaati 10 000 g juures 10 minutit ja supernatant tõsteti uude tuubi. Proove säilitati kuni kasutamiseni -80 °C juures.

3.8. Valkude kontsentratsiooni määramine

Proovide valgukontsentratsioonid määrati Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, USA) komplektiga vastavalt tootja protokollile. Kalibratsioonikõvera koostamisel kasutati standardlahustena veise seerumi albumiini (BSA) lahjendusi 1x PBS puhvril (lahjenduste seeria: 2000; 1500; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8; 0 µg/ml). 10 µl proovi pipeteeriti 96-kaevulisele plaadile ning seejärel lisati 200 µl töölahust (Reagent A, Reagent B, 50:1). Plaati inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures ning valguse neelduvust mõõdeti 570 nm lainepikkuse juures TECAN GENios Pro plaadilugejaga (TECAN Group Ltd, Šveits). Proovide kontsentratsioonid arvutati lahjenduste seeria mõõtmistulemuste põhjal.

3.9. SDS-PAGE ja Western blot

10 µg valgule lisati võrdses mahus redutseerivat (puhvrile on lisatud 10% β-merkaptotetanool) või mitteredutseerivat 2x Laemmli puhvrit (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,008% broomfenoolsinine; 20% glütserool). Lüsaate kuumutati 5 minutit 95 °C juures. Valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelil Mini-PROTEAN® Tetra Cell aparaadiga, mis sisaldas 1x jooksupuhvrit (25 mM Tris; 190 mM glütstiin; 0,1% SDS). Valke lahutati 30 minutit 90 V juures ning 60 minutit 150 V juures. Elektroforeesi lõppedes pandi kokku ülekandekassett Immobilon-P polüvinülideen difluoriid (PVDF) membraaniga (Merck Millipore, USA), mida oli eelnevalt inkubeeritud 1 minut metanoolis ning 5 minutit ülekandepuhvril (25 mM Tris base; 192 mM glütstiin; 9,6% etanool). Ülekanne teostati 370 mA juures 60 minuti jooksul Mini-PROTEAN® Tetra Cell aparaadiga. Pärast ülekannet asetati PVDF membraan 5 minutiks PBST lahusesse (0,1% Tween-20; 0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10,2 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) ning blokeeriti tund aega 5% lõssilahuses. Membraani inkubeeriti üleöö +4 °C juures primaarsete antikehadega (Tabel 1) 2,5% lõssilahuses. Järgmisel päeval pesti membraani PBST lahusega 3 korda 5 minutit, misjärel lisati sekundaarne antikeha (Tabel 1) 2,5% lõssilahuses ja inkubeeriti toatemperatuuril tund aega. Pärast inkubatsiooni pesti membraani 5 korda 5 minutit PBST lahuses. Valkude detekteerimiseks kasutati SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate reagenti (Thermo Scientific, USA) vastavalt tootja protokollile. Signaal detekteeriti ImageQuant LAS4000 seadme (GE Healthcare, UK) abil.

Tabel 1. Western blot analüüsis kasutatud primaarsed ja sekundaarsed antikehad ning nende lahjendused

Primaarne antikeha	Tootja	Algkontsentratsioon	Lahjendus
Jänese albumiini-vastane polükloonaalne antikeha	Proteintech, UK	0,75 mg/ml	1 : 10 000
Hiire ApoA1-vastane monokloonaalne antikeha	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1 : 1000
Hiire CD9-vastane monokloonaalne antikeha	HansaBioMed Life Sciences, Eesti	1 mg/ml	1 : 500
Hiire CD81-vastane monokloonaalne antikeha			
Hiire ALIX-vastane monokloonaalne antikeha		0,2 mg/ml	
Jänese Grp94-vastane polükloonaalne antikeha	Enzo Life Sciences, Šveits	1 mg/ml	1 : 1000
Sekundaarne antikeha	Tootja	Algkontsentratsioon	Lahjendus
Jänese-vastane kitses toodetud polükloonaalne antikeha	Thermo Fisher Scientific, USA	1 mg/ml	1 : 10 000
Hiire-vastane kitses toodetud polükloonaalne antikeha	Jackson Immuno Research, USA	0,8 mg/ml	1 : 20 000

3.10. Andmete statistiline analüüs

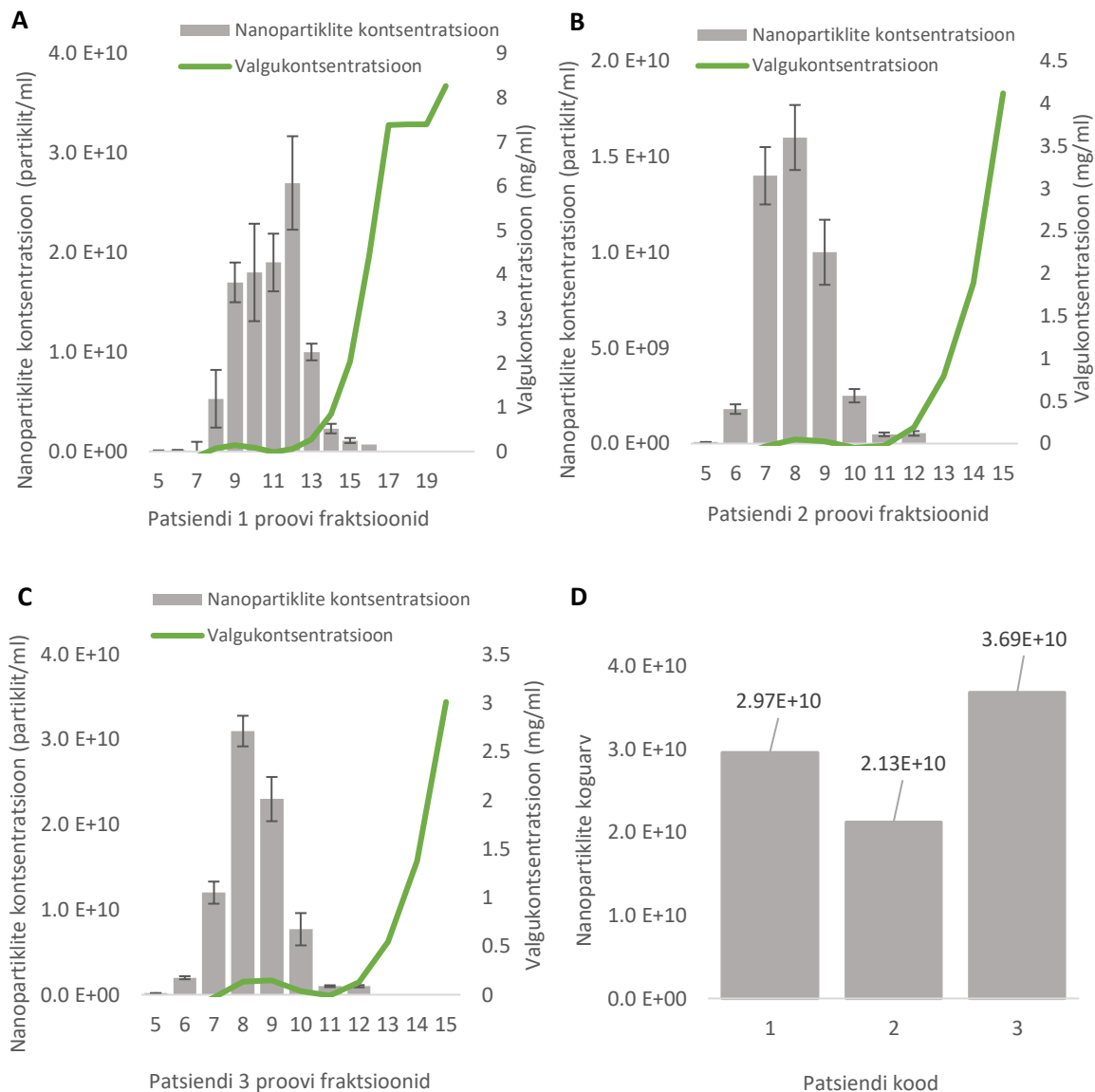
Käesolevas uurimistöös teostati eksperimendid ühes kuni kolmes korduses ning tulemuste veapiiridena on kasutatud standardhälvete väärtuseid. Statistilise olulisuse määramiseks sooritati MS Excelis 16.54 versioonis kahepoolne Studenti t-test ning tulemusi peeti statistiliselt oluliseks $p < 0,05$ korral.

4. Tulemused

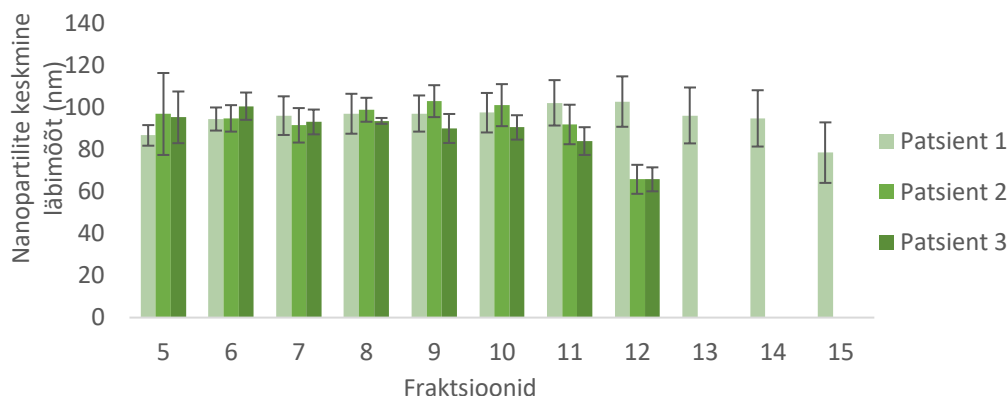
4.1. SEC meetodil eraldatud EV-de kontsentratsioonid ja suurused ning valguline kontaminatsioon kogutud fraktsioonides

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli optimeerida rakuväliste vesiikulite eraldamise tehnikaid. Selleks määrati esmalt kindlaks, missugustes SEC meetodi käigus kogutud fraktsioonides sisaldub võimalikult palju EV-sid, kuid võimalikult vähe valgulisi komponente. SEC meetodil isoleeriti EV-d kolme patsiendi follikulaarvedelikust ning saadud proovidele teostati kontsentratsiooni ja suuruse mõõtmised NTA meetodil. Kuna NTA seade ei ole võimeline eristama, kas tegemist on EV või mõne muu nanomõõtmetes osakese (näiteks lipoproteiiniga), nimetatakse NTA meetodil analüüsitud EV-sid siinkohal üldisema mõistega „nanopartiklid“.

Lähtuvalt asjaolust, et SEC-i käigus koguti fraktsioone käsitsi, võisid kogumise protseduuris esineda inimlikud mõõtmisvead, mistõttu võivad erinevate patsientide fraktsioonides esineda nanopartiklite kontsentratsioonid üksteise suhtes nihkes. Näiteks leidub patsiendil 1 enim nanopartikleid fraktsioonides 10-12, kuid patsientidel 2 ja 3 fraktsioonides 7-9 (Joonis 6). Nanopartiklid olid tuvastatavad alates 5. fraktsioonist ning alates 16. fraktsioonist segas mõõtmiste teostamist proovides sisalduvate valkude rohkus. Selleks, et saavutada võimalikult kõrge nanopartiklite kontsentratsioon, kuid võimalikult madal valgukontsentratsioon, koguti edasistes analüüsides kokku fraktsioonid 7-10. Kuigi 11. fraktsioon sisaldab veel arvestatavas koguses nanopartikleid, otsustati 11. fraktsioon valgulise kontaminatsiooni vältimiseks EV-de kogumisel välja jätta. Fraktsioonide 7-10 kogumine võimaldas 1,5 ml follikulaarvedelikust eraldada ligikaudu $2-4 \cdot 10^{10}$ nanopartiklit (Joonis 6D). Nanopartiklite keskmine diameeter oli fraktsioonides 5-11 sarnane, jäädes 80-100 nm vahemikku, kuid partiklite läbimõõt vähenes alates 12. fraktsioonist tõenäoliselt seetõttu, et alates sellest fraktsioonist esines rohkem valgulisi komponente (Joonis 7).



Joonis 6. Nanopartiklite ja valkude kontsentratsioon patsientidel 1 (A), 2 (B), 3 (C). Tulpdiaagrammidena on kuvatud NTA meetodil mõõdetud nanopartiklite kontsentratsioonid (partiklit/ml) ning rohelse joonega on näidatud BCA meetodil mõõdetud valkude kontsentratsioonid (mg/ml). Igale fraktsioonile on nanopartiklite kontsentratsiooni ning valkude kontsentratsiooni mõõtmised teostatud ühes korduses. Kolme patsiendi follikulaarvedelikust SEC meetodil eraldatud nanopartiklite koguarvud fraktsioonides 7-10 (D). Joonistel 6A-6C on veapiiridena esitatud standardhälbed, mis on arvutatud NTA käigus 11 mõõdetud kaadri põhjal.



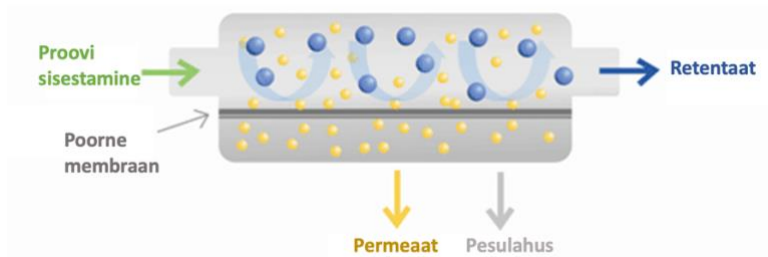
Joonis 7. NTA meetodil mõõdetud kolme patsiendi nanopartiklite keskmine läbimõõt (nm) fraktsioonide lõikes. Nanopartiklite diameetrid patsientide 2 ja 3 fraktsioonides 13-15 pole esitatud, kuna antud fraktsioonid ei olnud ZetaView® seadmega mõõdetavad valgulise kontaminatsiooni tõttu. Veapiiridena on esitatud standardhälbed, mis on arvutatud NTA käigus 11 mõõdetud kaadri põhjal.

4.2. EV-de alampopulatsioonide eraldamine

Järgnevalt oli eesmärgiks eraldada inimese follikulaarvedelikus sisalduvaid EV-sid läbimõõdu alusel. TFF meetodil eraldati EV-d diameetri alusel kahte gruppi: <200 nm läbimõõduga ehk väikesed nanopartiklid ja >200 nm läbimõõduga ehk suured nanopartiklid.

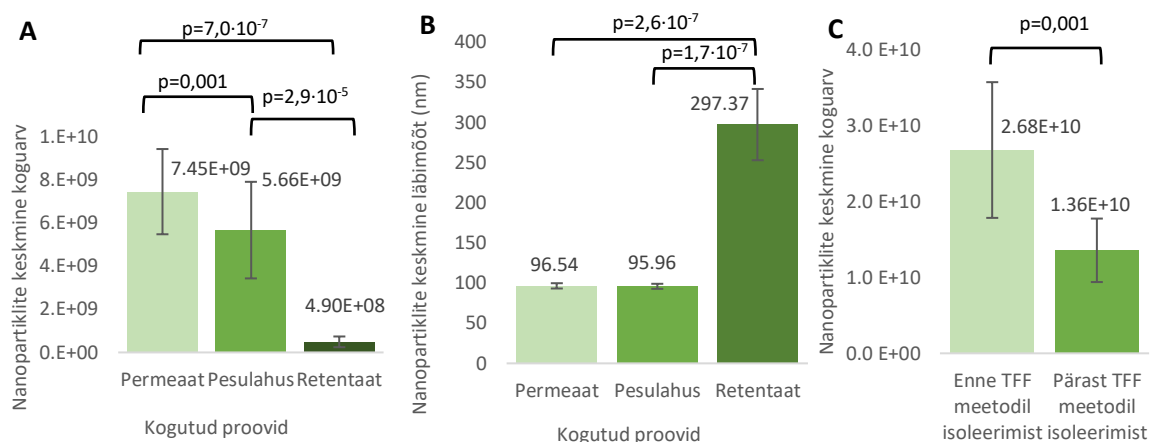
TFF meetodi käigus isoleeritud suurte ja väikeste nanopartiklite koguarv oli patsientide vahel varieeruv. Retentaadis sisalduvate ehk suurte nanopartiklite koguarv oli võrreldes permeaadis sisalduvate ehk väikeste nanopartiklitega keskmiselt 15 korda väiksem (Joonis 9A). Tulemus viitab sellele, et follikulaarvedelik sisaldab peamiselt väiksemaid nanopartikleid, mille keskmine läbimõõt on ~100 nm (Joonised 9A ja 9B).

Suurendamiseks alampopulatsioonide eraldamise käigus saadud nanopartiklite koguseid, koguti pärast permeaadi elueerumist lisaks pesulahus, mis sisaldas märkimisväärselt palju väikeseid nanopartikleid, keskmiselt $5,7 \cdot 10^9$ partiklit. Pesulahuse kogumisel oli võimalik suurendada väikeste partiklite saagikust koguni 76% ning sellest lähtuvalt otsustati järgnevates eksperimentides nanopartiklite koguarvu suurendamiseks lisada permeaadile ka pesulahus. Pärast SEC meetodil isoleerimist oli keskmine nanopartiklite koguarv $2,68 \cdot 10^{10}$ ja peale TFF filtratsiooni oli keskmine nanopartiklite koguarv $1,36 \cdot 10^{10}$ (Joonis 9C). Kuigi pesulahuse kogumisega suurendati väikeste nanopartiklite saagikust, kaotati TFF protseduuri tõttu keskmiselt 49% nanopartiklitest.



Joonis 8. Alampopulatsioonide eraldamisel kasutatud TFF meetodi põhimõte. Mahutisse sisestati proov, mida jookutati paralleelselt poorse membraaniga. Pooridest väiksemad osakesed elueeriti permeaadina. Retentaadina koguti proovi koos osakestega, mille diameeter oli pooridest suurem ning seetõttu ei läbinud ka membraani. Pesulahus koguti peale permeaadi elueerumist, sisestades kolonni proovi asemel PBS-i. Kohandatud <https://tblplastics.com/tangential-flow-filtration-tff/> järgi.

Retentaadis sisalduvate nanopartiklite diameeter oli vahemikus 250-350 nm (Lisa 1) ning permeaadis ja pesulahuses sisalduvate nanopartiklite läbimõõt oli ligikaudu 100 nm (Lisa 2, Joonis 9B). Väikeste nanopartiklite diameeter erines patsientide vahel märgatavalt vähem (variatsioonikordaja 3,41%) kui suurtel partiklitel (variatsioonikordaja 14,93%). Saadud tulemustest saab järeldada, et nanopartikleid on võimalik TFF meetodi abil suuruse alusel isoleerida, kuid selle käigus väheneb EV-de koguarv statistiliselt olulisel määral (Joonis 9C, $p=0,001$).

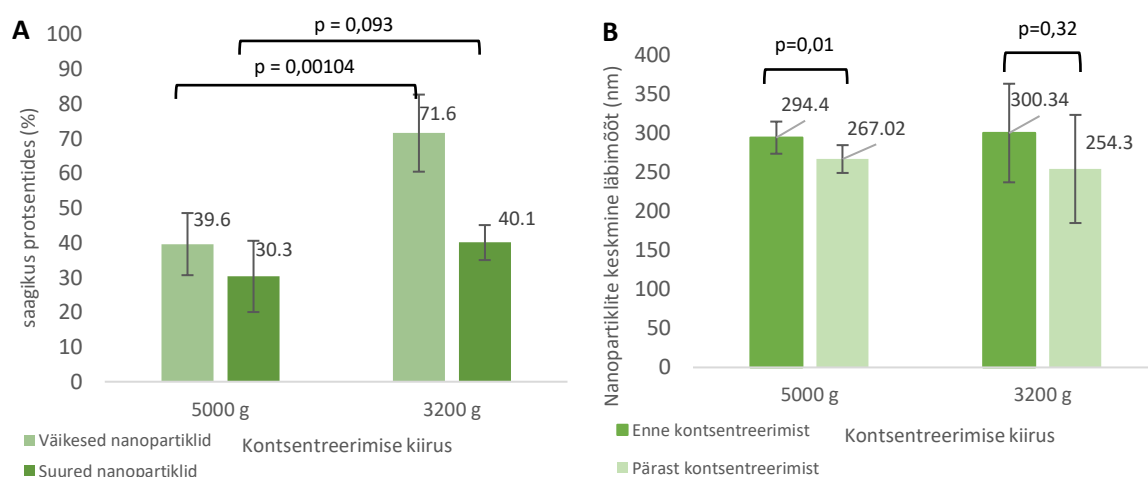


Joonis 9. NTA meetodil mõõdetud 10 patsiendi keskmised nanopartiklite koguarvud (A) ja diameetrid (B) permeaadis, pesulahuses ning retentaadis ning 10 patsiendi keskmine nanopartiklite koguarv enne ja pärast TFF meetodil alampopulatsioonide isoleerimist (C). Veapiiridena on esitatud standardhälbed.

4.3. EV-de kontsentreerimise optimeerimine

Selleks, et isoleeritud EV-sid oleks võimalik iseloomustada Western blot meetodil, kontsentreeriti tsentrifugaalfiltriga viie patsiendi väikeseid EV-sid vastavalt tootja protokollile 20 minutit 5000 g juures ning suuri EV-sid 15 minutit 5000 g juures. Pärast kontsentreerimist mõõdeti uuesti proovides sisalduvate nanopartiklite kontsentratsioone ja suuruseid NTA meetodil. Mõõtmistel

selgus, et kontsentreerimise protseduuri käigus on väikeste nanopartiklite saagikus 40% ja suurte nanopartiklite saagikus 30% (Joonis 10A). On võimalik, et 5000 g suurune tsentrifugaaljõud surub EV-sid liialt tugevalt vastu filtrit, põhjustades EV-de lõhkemist. Selleks, et EV-de saagikust kontsentreerimisel suurendada, otsustati tsentrifuugida proove madalamal kiirusel – 3200 g juures. Katse tulemusena tõusis väikeste EV-de saagikus statistiliselt olulisel määral ($p = 0,00104$), koguni 72%-ni (Joonis 10A). Suurte EV-de keskmine saagikus tõusis 40%-ni, kuid statistiliselt olulist erinevust ei täheldatud ($p = 0,093$). Nii 5000 g kui ka 3200 g juures kontsentreerides märgati suuremat kadu nimelt suurte EV-de koguarvus. Arvatavasti on kadu suurtel EV-del suurem, kuna laiem kokkupuutepind tsentrifugaalfiltriga võib suurendada nanopartiklite lõhkemise tõenäosust.



Joonis 10. Viie patsiendi keskmine väikeste ja suurte nanopartiklite saagikus eri tsentrifugaaljõudu kasutades (A) ja viie patsiendi suurte nanopartiklite keskmised suurused enne ja pärast kontsentreerimist 5000 g ja 3200 g juures (B). Veapiiridena on esitatud standardhälbed.

Kontsentreerides 5000 g juures, vähenes viie patsiendi suurte nanopartiklite keskmine diameeter statistiliselt oluliselt ($p=0,01$) 294 nanomeetrilt 267 nanomeetrini (Joonis 10B). 3200 g juures kontsentreerimisel vähenes suurte nanopartiklite diameeter samuti 300 nanomeetrilt 254 nanomeetrini, kuid erinevus ei olnud suurte veapiiride tõttu statistiliselt oluline ($p=0,32$). Saadud tulemused viitavad sellele, et suuremad partiklid purunevad suuremat tsentrifugaaljõudu rakendades. Tsentrifugaaljõu vähendamine tõstis EV-de saagikust, kuid pikendas kontsentreerimisele kuluvat aega: 5000 g juures tsentrifuugides, vähendati 15-20 minutiga proovi maht 200-700 μ l-ni, kuid kiirusel 3200 g tsentrifuugides oli vajalik sama tulemuse saavutamiseks kontsentreerimisaega pikendada 60 minutini.

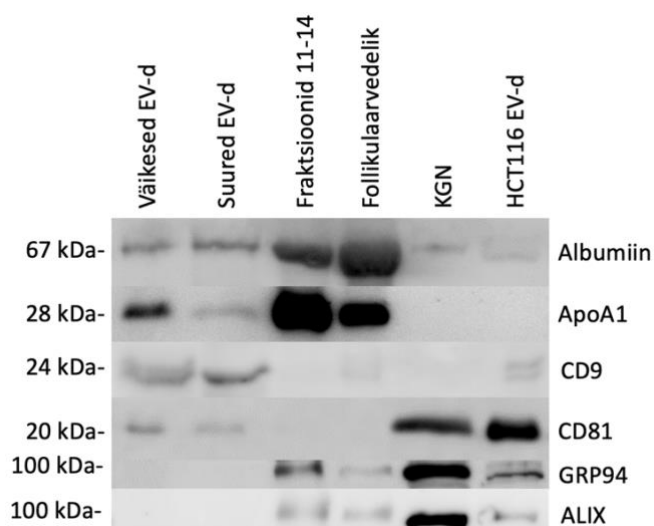
4.4. EV-de iseloomustamine Western blot meetodil

Tegemaks kindlaks, et isoleeritud nanopartiklid on tõepoolest EV-d, teostati isoleeritud proovidele Western blot analüüs, tuvastamaks Théry *et al.*, 2018 poolt kirjeldatud EV markereid CD9, CD81 ja ALIX ning EV-de puhtusega seotud markereid albumiin ja apolipoproteiin A1 (ApoA1). EV-dele iseloomulike markerite (CD9, CD81 ja ALIX) tuvastamisel kasutati positiivse kontrollina komertsiaalseid HCT116 käärsoolevähi rakuliini poolt toodetud EV-sid. Albumiini ja ApoA1

markerite positiivse kontrollina kasutati follikulaarvedelikku, milles eeldati näha EV-dele iseloomulike markerite puudumist. KGN rakuliini kasutati kontrollina, et tuvastada kõigi uuritavate valkude olemasolu.

Ekspriimendi tulemusena selgus, et follikulaarvedelikust eraldatud suured ja väikesed EV-d sisaldasid madalamal tasemel ApoA1 ja albumiini kui follikulaarvedelik ja peamiselt valgulisi komponente sisaldavad fraktsioonid 11-14 (Joonis 11). Tulemus kinnitab, et eelnevalt läbiviidud SEC protseduuri käigus puhastati EV-d suuremast kogusest valkudest ja lipoproteiinidest. Väikeste ja suurte EV proovide puhtusaste tundub olevat veidi madalam kui kommertsiaalsetel HCT116 rakuliinist eraldatud EV-del, mis viitab sellele, et tõenäoliselt on tulevikus võimalik EV-de eraldamise meetodit optimeerides saavutada veelgi kõrgem puhtusaste.

EV-dele iseloomulikest markeritest tuvastati nii suurtel kui ka väikestel EV-del CD9 ja CD81 pinnamarkeri signaal. Teadmata põhjusel ei suudetud EV-dest tuvastada ALIX markerit. On võimalik, et follikulaarvedelikust isoleeritud EV-d küll sisaldavad ALIX valku, kuid koguses, mis jäi detekteerimise piirist allapoole. CD9 ja CD81 markerite olemasolu annab aga kinnitust, et follikulaarvedelikust eraldatud nanopartiklid on tõepoolest EV-d. Western blot meetodil ei detekteeritud isoleeritud EV-des endoplasmaatilise retiikulumi valku GRP94, mis on kirjanduse andmetel EV-de negatiivseks markeriks. Huvitaval kombel detekteeriti HCT116 rakuliini EV-des lisaks EV-dele iseloomulikele markeritele ka GRP94. Kuna tegu on apoptootiliste kehade markeriga (Pedrioli et al., 2021), on võimalik, et HCT116 EV-de proov sisaldas apoptootilisi kehasid. KGN rakkude lüsaadis tuvastati albumiini, CD81, GRP94 ja ALIX valkude signaal, kuid ApoA1 ja CD9 markereid ei tuvastatud. Võimalikuks põhjuseks võis olla, et ApoA1 ja CD9 valkude kogus proovis jäi alla detekteerimispiiri.



Joonis 11. Western blot meetodil tuvastati EV-de markerid CD9, CD81 ja ALIX, valgulise kontaminatsiooni markereid albumiin ja ApoA1 ning negatiivset EV markerit GRP94. EV-de markerite tuvastamiseks kasutati positiivse kontrollina HCT116 rakuliini eksosoomide ning valgulise kontaminatsiooni markerite tuvastamiseks kasutati positiivse kontrollina follikulaarvedelikust sadestatud valku (fraktsioonid 11-14). Lisaks kasutati kõigi uuritud markerite positiivse kontrollina KGN rakkude lüsaati.

5. Arutelu

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli optimeerida follikulaarvedeliku EV-de alampopulatsioonide eraldamise tehnikaid, uurida EV-de füüsikalisi omadusi ning tuvastada nende pinnal ja sisemuses esinevaid valgulisi markereid, et saada uusi teadmisi inimese follikulaarvedelikus esinevate EV-de alampopulatsioonide omadustest.

Esmalt töötati välja EV-de puhastamise protokoll SEC meetodil, et eraldada EV-d follikulaarvedelikust ja puhastada teistest makromolekulaarsetest komponentidest. Töö tulemusena määrati kindlaks, missugustes SEC protseduuri käigus kogutud fraktsioonides on rikastunud EV-d ning missugustes fraktsioonides on rikastunud valgud. Seejärel mõõdeti NTA abil EV-de füüsikalisi omadusi – partiklite läbimõõtu ja kontsentratsiooni. Sobiva eraldamismeetodi väljatöötamine on EV uuringutes kriitilise tähtsusega etapp, kuna EV-de puhastamise meetodi valik mõjutab EV-de saagist ja spetsiifilisust, mis omakorda võib kallutada järgnevate katsete tulemusi (Théry et al., 2018). Selleks, et tulevikus oleks võimalik uurida follikulaarvedeliku EV-de alampopulatsioonide mõju inimese munasarjas leiduvatele rakutüüpidele, otsustati EV-sid eraldada SEC meetodil, kuna SEC tagab kõrgema puhtusastme kui kuldstandardina rakendatav ultratsentrifuugimine (Soares et al., 2023).

MISEV2018 juhistes soovitatakse EV-de alampopulatsioonide eraldamiseks kasutada suuruse alusel filtreerimist, kombineerides meetodit teiste puhastamise meetoditega nagu näiteks SEC (Théry et al., 2018). Juhistest lähtudes eraldati EV-de alampopulatsioonid TFF meetodi abil suuruse alusel kahte gruppi: nanopartiklid läbimõõduga alla 200 nm ja üle 200 nm. Follikulaarvedelikust eraldatud väikeste nanopartiklite keskmine läbimõõt oli ligikaudu 100 nm ning suurte nanopartiklite diameeter jäi vahemikku 250-350 nm, kusjuures väikeseid nanopartikleid saadi 15 korda rohkem kui suuri. Varasematest publikatsioonidest leidub vähe andmeid inimese follikulaarvedelikust eraldatud väikeste ja suurte EV alampopulatsioonide jaotusest, kuid on täheldatud, et SEC meetodil isoleeritud EV-de totaalse populatsiooni keskmine läbimõõt jääb vahemikku 50-150 nm (Soares et al., 2023).

Käesolevas töös püüti EV-de alampopulatsioonide eraldamisel saagikust suurendada, kogudes TFF protseduuri käigus pesulahust. Kuigi pesulahuse kogumine võimaldas väikeste nanopartiklite saagikust suurendada kuni kaks korda, kaotati keskmiselt ligi pool algsest nanopartiklite kogusest. Pesulahuse kogumise tagajärjel suurenes proovide maht, mistõttu oli tarvis EV proove pikema aja jooksul kontsentreerida.

Selleks, et EV-de pinnal ja sisemuses leiduvaid markereid Western blot meetodil uurida, kontsentreeriti proovides sisalduvad nanopartiklid tsentrifugaalfiltril. NTA mõõtmiste järel selgus, et kontsentreerimise tulemusel langes EV-de koguarv proovides märkimisväärselt ning suurte partiklite keskmine diameeter vähenes statistiliselt olulisel määral. Saagikuse tõstmiseks optimeeriti kontsentreerimise protseduuri, vähendades tsentrifuugimise kiirust ja pikendades tsentrifuugimise aega.

Uurimistöö järgmiseks eesmärgiks oli tuvastada isoleeritud EV-de alampopulatsioonidel esinevaid valgulisi markereid. Western blot meetodi abil tehti kindlaks, et EV-de isoleerimine follikulaarvedelikust ja selles sisalduvatest valkudest oli edukas. Nii suured kui ka väikesed EV-d

sisaldasid märkimisväärselt madalamal tasemel valke ApoA1 ja albumiini kui peamiselt valgulisi komponente sisaldavad follikulaarvedelik ja SEC meetodil kogutud fraktsioonid 11-14. Kuna ApoA1 valk on peamine koostisosa HDL ehk suure tihedusega lipoproteiinides, mille diameeter jääb vahemikku 5-12 nm, on tõenäolisem, et ApoA1 valku esineb väikeste EV-de proovis rohkem kui suurte EV-de proovis (Karimi et al., 2018). MISEV2018 juhiste alusel pole määratud EV preparaatides lubatud ApoA1 ja albumiini koguse lävendit, sest nende kontaminantide isoleerimine koos EV-dega on paratamatu ning ei saa välistada, et need markerid võivad olla iseloomulikud mõnele EV alampopulatsioonile (Théry et al., 2018).

Rakuvälistele vesiikulitele iseloomulikest markeritest tuvastati nii väikestel kui ka suurtel EV-del CD9 ja CD81 signaal. Ka varasemates uuringutes on leitud, et mõlemaid markereid esineb nii eksosoomide kui ka mikrovesiikulite pinnal, kuigi on täheldatud, et eksosoomid ekspresseerivad antud valke rohkem (Kowal et al., 2016).

ALIX valku ei tuvastatud follikulaarvedelikust isoleeritud EV-des, kuigi tegu on ESCRT valguga, mida seostatakse eksosoomide biogeneesiga, mistõttu leidub antud valku pigem eksosoomides (Keller et al., 2006). Saadud tulemus on samuti vastuolus Soares et al., 2023 tulemustega, kus follikulaarvedelikust eraldatud EV-d sisaldasid ALIX valku. On võimalik, et follikulaarvedeliku EV-des esineb antud valku niivõrd madalal tasemel, et seda ei olnud võimalik eksperimentaalselt tuvastada. Samuti on võimalik, et kasutatud primaarne antikeha ei olnud ALIX valgu vastu piisavalt spetsiifiline, põhjustades visualiseerimisel signaali puudumist.

Negatiivse markerina kasutatud GRP94 signaali isoleeritud EV-des ei tuvastatud, küll aga detekteeriti ootamatult HCT116 rakuliini poolt toodetud EV-des. GRP94 on endoplasmaatilise retiikulumi valk, mida ekspresseeritakse kõrgemal tasemel valesi volditud valkude kuhjumisel (Marzec et al., 2012). On võimalik, et söötme kogumisel HCT116 rakkudest võis osa rakke olla apoptootilises faasis, sekreteerides söötmesse apoptootilisi kehasid, mis sisaldavad GRP94 valku (Pedrioli et al., 2021).

Antud töös esitatud tulemuste põhjal optimeeriti EV-de isoleerimist SEC meetodil, alampopulatsioonideks jaotamist TFF meetodil ning edasisteks eksperimentideks kontsentreerimist. Töö tulemusena määrati kindlaks, et follikulaarvedelikust isoleeritud EV-de alampopulatsioonid ekspresseerivad CD9 ja CD81 markereid, mis andis kinnitust sellele, et isoleeritud nanopartiklid olid tõepoolest EV-d.

Saadud tulemused võimaldavad edaspidi isoleeritud EV alampopulatsioonidega läbi viia funktsionaalseid katseid, et uurida EV alampopulatsioonide mõju rakkude elulemusele ja proliferatsioonile. Uurimistöös optimeeritud meetodite abil saab tulevikus edasi uurida ka erinevusi EV-de alampopulatsioonide miRNA profiilis, et mõista paremini nende rolli rakkudevahelises suhtluses ning uurida miRNA ülekannet rakkudesse. Tuvastades biomarkereid, mille abil saab hinnata ja ennustada munarakkude kvaliteeti, on võimalik EV-sid potentsiaalselt rakendada haiguste diagnostikas ja ravis.

Kokkuvõte

Munasarja folliikuli rakutüübid vabastavad rakuvälisesse keskkonda lipiidse kaksikkihiga osakesi, mida nimetatakse rakuvälisteks vesiikuliteks ehk EV-deks. EV-d jagunevad oma tekkemehhanismi alusel kolmeks suuremaks rühmaks: eksosoomid, mikrovesiikulid ja apoptootilised kehad. EV-d osalevad rakkudevahelises suhtluses, mõjutades follikulogeneesi ja munarakkude arengu kulgu. Lisaks tekkeviisile esineb alampopulatsioonide vahel erinevusi nii läbimõõdus, morfoloogias kui ka koostises, põhjustades seeläbi erinevaid muutusi sihtmärkrakkudes.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli optimeerida EV alampopulatsioonide isoleerimise tehnikaid follikulaarvedelikust ning tuvastada EV-de valgulisi markereid. Katsete seeria abil loodi edukalt protokoll EV-de puhastamiseks follikulaarvedeliku muudest komponentidest, alustades SEC meetodil follikulaarvedelikust EV-de isoleerimisega. TFF meetodi abil eraldati EV-d suuruse alusel, mille tulemusena saadi ~100 nm läbimõõduga väikeste EV-de alampopulatsioon ning ~250 nm läbimõõduga suurte EV-de alampopulatsioon, mida kontsenteeriti edasiseks valguliste markerite analüüsiks. Saagikuse suurendamiseks ja EV-de kvalitatiivsete omaduste säilitamiseks koguti TFF meetodil pesulahust ning muudeti kontsenteerimistingimusi. Western blot meetodil tuvastati eraldatud nanopartiklidel EV-dele omaseid pinnamarkereid CD9 ja CD81 ning kontrolliti eraldatud EV-de puhtust albumiini ja lipoproteiinide suhtes. NTA meetodil tehti kindlaks eraldatud osakeste suurused ja kontsentratsioonid ning igas puhastamise etapis arvatati, kui palju EV-sid protseduuri käigus alles jäi.

Saadud tulemuste põhjal saab järeldada, et follikulaarvedelikust on eelnevalt loetletud meetodite abil võimalik isoleerida eri suurusega EV-sid. Tulevikus saab isoleeritud alampopulatsioonidega läbi viia funktsionaalseid katseid, et uurida EV-de alampopulatsioonide mõju folliikuli eri rakutüüpide paljunemisevõimele, elulemusele, steroidogeneesile ja metabolismile, mis omakorda võimaldab paremini mõista nende rolli naise reproduktiivsüsteemis ning suurendada viljatusravi efektiivsust. Kuigi EV-de eraldamise tehnikad ja eri kehavedelikes esinevate EV-de alampopulatsioonide iseloomustamine ei ole seni standardiseeritud, on tegu teadusharuga, mis on jõudsalt arenemas tänu biotehnoloogia kiirele arengule.

Tänuavaldused

Soovin väljendada suurt tänu oma juhendajatele Agne Velthut-Meikasele ja Inge Varikule huvitava projekti, meeldiva koostöö, asjakohase kriitika ja kannatlikkuse eest kogu lõputöö koostamise vältel. Samuti soovin tänada Nova Vita viljatusravi kliinikut, kust pärines töös kasutatud uurimismaterjal ning HansaBioMed Life Sciences töötajaid nõuannete ja laboriruumide kasutamise võimaldamise eest.

Kasutatud kirjandus

- Aalberts, M., Sostaric, E., Wubbolts, R., Wauben, M. W. M., Nolte-'t Hoen, E. N. M., Gadella, B. M., Stout, T. A. E., & Stoorvogel, W. (2013). Spermatozoa recruit prostasomes in response to capacitation induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(11), 2326–2335. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.08.008>
- Abramowicz, A., Widlak, P., & Pietrowska, M. (2016). Proteomic analysis of exosomal cargo: The challenge of high purity vesicle isolation. *Molecular BioSystems*, 12(5), 1407–1419. <https://doi.org/10.1039/c6mb00082g>
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1969–1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- Asea, A., Jean-Pierre, C., Kaur, P., Rao, P., Linhares, I. M., Skupski, D., & Witkin, S. S. (2008). Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of Reproductive Immunology*, 79(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2008.06.001>
- Ayala-Mar, S., Donoso-Quezada, J., Gallo-Villanueva, R. C., Perez-Gonzalez, V. H., & González-Valdez, J. (2019). Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes. In *Electrophoresis* (Vol. 40, Issues 23–24, pp. 3036–3049). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elps.201800526>
- Bağcı, C., Sever-Bahcekapili, M., Belder, N., Bennett, A. P. S., Erdener, Ş. E., & Dalkara, T. (2022). Overview of extracellular vesicle characterization techniques and introduction to combined reflectance and fluorescence confocal microscopy to distinguish extracellular vesicle subpopulations. *Neurophotonics*, 9(02). <https://doi.org/10.1117/1.nph.9.2.021903>
- Benammar, A., Derisoud, E., Vialard, F., Palmer, E., Ayoubi, J. M., Poulain, M., & Chavatte-Palmer, P. (2021). The mare: A pertinent model for human assisted reproductive technologies? In *Animals* (Vol. 11, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11082304>
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, 17(7), 879–887. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>
- Craig, J., Orisaka, M., Wang, H., Orisaka, S., Thompson, W., Zhu, C., Kotsuji, F., & Tsang, B. K. (2007). Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 12).
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. In *Cells* (Vol. 8, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>

- Dunlop, C. E., & Anderson, R. A. (2014). The regulation and assessment of follicular growth. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74(SUPPL. 244), 13–17. <https://doi.org/10.3109/00365513.2014.936674>
- Hennet, M. L., & Combelles, C. M. H. (2012). The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10–12), 819–831. <https://doi.org/10.1387/ijdb.120133cc>
- Hung, W. T., Navakanitworakul, R., Khan, T., Zhang, P., Davis, J. S., McGinnis, L. K., & Christenson, L. K. (2017). Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. *Biology of Reproduction*, 97(4), 644–655. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox106>
- Jeppesen, D. K., Zhang, Q., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. (2023). Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. In *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002>
- Karimi, N., Cvjetkovic, A., Jang, S. C., Crescitelli, R., Hosseinpour Feizi, M. A., Nieuwland, R., Lötvall, J., & Lässer, C. (2018). Detailed analysis of the plasma extracellular vesicle proteome after separation from lipoproteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(15), 2873–2886. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2773-4>
- Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A., & Altevogt, P. (2006). Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. In *Immunology Letters* (Vol. 107, Issue 2, pp. 102–108). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.09.005>
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., Tan, K. H., & Lim, S. K. (2013). Exosomes for drug delivery - A novel application for the mesenchymal stem cell. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 5, pp. 543–551). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.008>
- Li, X., Bao, H., Wang, Z., Wang, M., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2018). Biogenesis and function of multivesicular bodies in plant immunity. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00979>
- Machtiger, R., Baccarelli, A. A., & Wu, H. (2020). Extracellular vesicles and female reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(3), 549–557. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02048-2/Published>
- Machtiger, R., Laurent, L. C., & Baccarelli, A. A. (2016). Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. In *Human Reproduction Update* (Vol. 22, Issue 2, pp. 182–193). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv055>

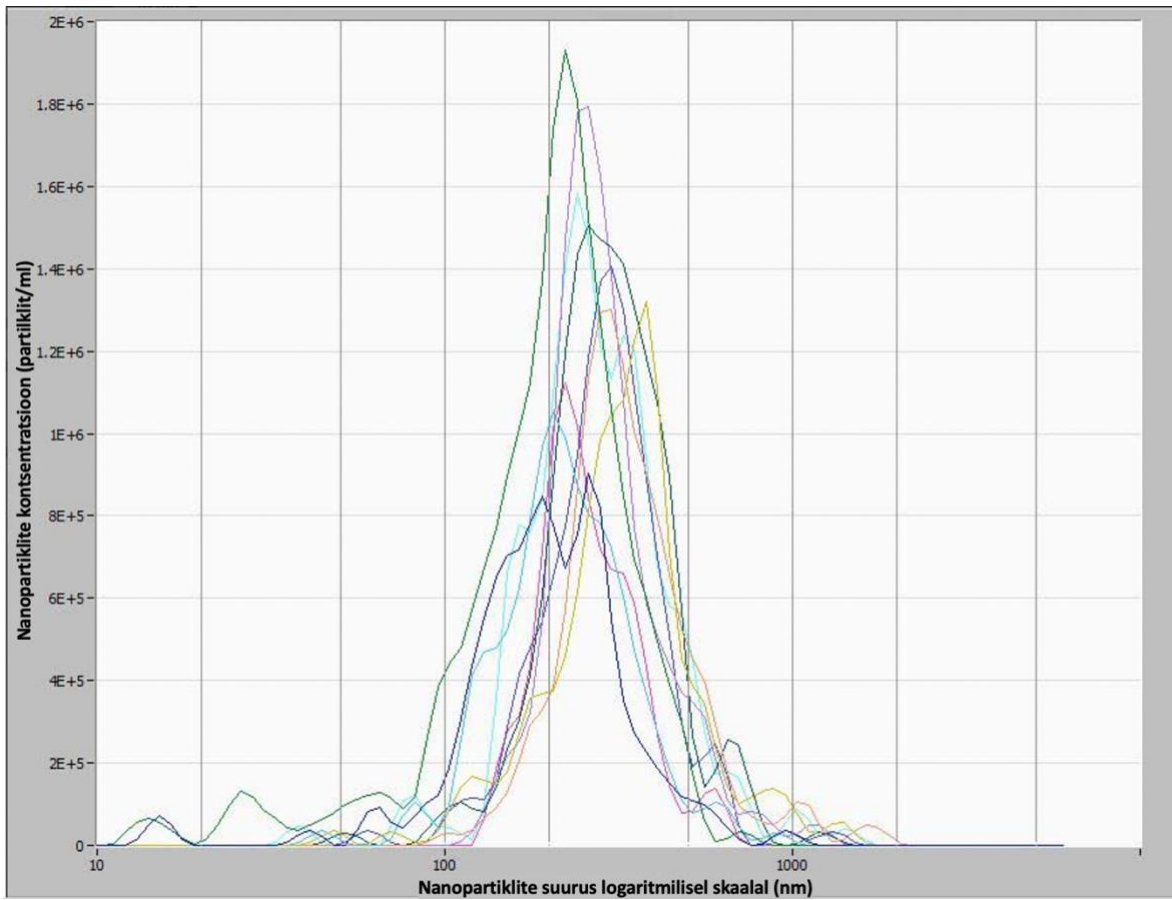
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Maimets, T., Kuuse, S. (2018). *Rakubiologia*. Tartu: Tartu Ülikool. ISBN 978-9949-77-773-0
- Marzec, M., Eletto, D., & Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(3), 774–787. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.013>
- Masyuk, A. I., Huang, B. Q., Ward, C. J., Gradilone, S. A., Banales, J. M., Masyuk, T. V., Radtke, B., Splinter, P. L., & LaRusso, N. F. (2010). Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(4), G990–G999. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00093.2010>
- Matsuno, Y., Kanke, T., Maruyama, N., Fujii, W., Naito, K., & Sugiura, K. (2019). Characterization of mRNA profiles of the exosome-like vesicles in porcine follicular fluid. *PLoS ONE*, 14(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217760>
- Monguió-Tortajada, M., Gálvez-Montón, C., Bayes-Genis, A., Roura, S., & Borràs, F. E. (2019). Extracellular vesicle isolation methods: rising impact of size-exclusion chromatography. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03071-y>
- Navakanitworakul, R., Hung, W. T., Gunewardena, S., Davis, J. S., Chotigeat, W., & Christenson, L. K. (2016). Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep25486>
- Nishi, Y., Yanase, T., Mu, Y.-M., Oba, K., Ichino, I., Saito, M., Nomura, M., Mukasa, C., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Kashimura, Y., Haji, M., & Nawata, H. (2001). Establishment and Characterization of a Steroidogenic Human Granulosa-Like Tumor Cell Line, KGN, That Expresses Functional Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *Endocrinology*, 142(1), 437–445. <https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7862>
- Niu, M., Li, Y., Li, G., Zhou, L., Luo, N., Yao, M., Kang, W., & Liu, J. (2020). A longitudinal study on α -synuclein in plasma neuronal exosomes as a biomarker for Parkinson's disease development and progression. *European Journal of Neurology*, 27(6), 967–974. <https://doi.org/10.1111/ene.14208>
- Ogawa, Y., Miura, Y., Harazono, A., Kanai-Azuma, M., Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamaguchi, T., Toda, T., Endo, T., Tsubuki, M., & Yanoshita, R. (2011). Proteomic Analysis of Two Types of Exosomes in Human Whole Saliva. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(1), 13–23. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.13>
- Oliver, R., & Pillarisetty, L. S. (2023). *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary Corpus Luteum*.

- Pedrioli, G., Piovesana, E., Vacchi, E., & Balbi, C. (2021). Extracellular vesicles as promising carriers in drug delivery: Considerations from a cell biologist's perspective. *Biology*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/biology10050376>
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(36), 13368–13373. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>
- Reed, B. G., & Carr, B. R. (2000). *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation*.
- Rimon-Dahari, N., Yerushalmi-Heinemann, L., Alyagor, L., & Dekel, N. (2016). *Ovarian Folliculogenesis* (pp. 167–190). https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5_7
- Rooda, I., Hasan, M. M., Roos, K., Viil, J., Andronowska, A., Smolander, O. P., Jaakma, Ü., Salumets, A., Fazeli, A., & Velthut-Meikas, A. (2020). Cellular, extracellular and extracellular vesicular miRNA profiles of pre-ovulatory follicles indicate signaling disturbances in polycystic ovaries. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms21249550>
- Roos, K., Rooda, I., Keif, R.-S., Liivrand, M., Smolander, O.-P., Salumets, A., & Velthut-Meikas, A. (2022). Single-cell RNA-seq analysis and cell-cluster deconvolution of the human preovulatory follicular fluid cells provide insights into the pathophysiology of ovarian hyporesponse. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.945347>
- Samii, A., & Razmkhah, F. (2020). Transformation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Leukemia Extracellular Vesicles: A Step Toward Leukemogenesis. In *Stem Cell Reviews and Reports* (Vol. 16, Issue 6, pp. 1081–1091). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09975-8>
- Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., Campbell, B. K., Driancourt, M.-A., Dupont, J., Fortune, J. E., Gilchrist, R. B., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S., Monget, P., Monniaux, D., Viñoles, C., & Webb, R. (2011). Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, *23*(3), 444–467.
- Soares, M., Pinto, M. M., Nobre, R. J., de Almeida, L. P., da Graça Rasteiro, M., Almeida-Santos, T., Ramalho-Santos, J., & Sousa, A. P. (2023). Isolation of Extracellular Vesicles from Human Follicular Fluid: Size-Exclusion Chromatography versus Ultracentrifugation. *Biomolecules*, *13*(2), 278. <https://doi.org/10.3390/biom13020278>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Jose Alcaraz, M., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Bach, M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., ... Jung, S. (2018). Journal of Extracellular Vesicles 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. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1). <https://www.tandfonline.com/loi/zjev20>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vella, L., Sharples, R., Lawson, V., Masters, C., Cappai, R., & Hill, A. (2007). Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *The Journal of Pathology*, 211(5), 582–590. <https://doi.org/10.1002/path.2145>
- Yang, D., Zhang, W., Zhang, H., Zhang, F., Chen, L., Ma, L., Larcher, L. M., Chen, S., Liu, N., Zhao, Q., Tran, P. H. L., Chen, C., Veedu, R. N., & Wang, T. (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - Efforts for efficient exosome-based theranostics. In *Theranostics* (Vol. 10, Issue 8, pp. 3684–3707). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.41580>
- Yuan, C., Li, Z., Zhao, Y., Wang, X., Chen, L., Zhao, Z., Cao, M., Chen, T., Iqbal, T., Zhang, B., Fan, W., Wei, Y., Li, C., & Zhou, X. (2021). Follicular fluid exosomes: Important modulator in proliferation and steroid synthesis of porcine granulosa cells. *The FASEB Journal*, 35(5). <https://doi.org/10.1096/fj.202100030RR>
- Zhou, W., Zhang, T., Lian, Y., & Zhang, W. (2022). *Roles of Extracellular Vesicles in Human Reproduction*. www.intechopen.com

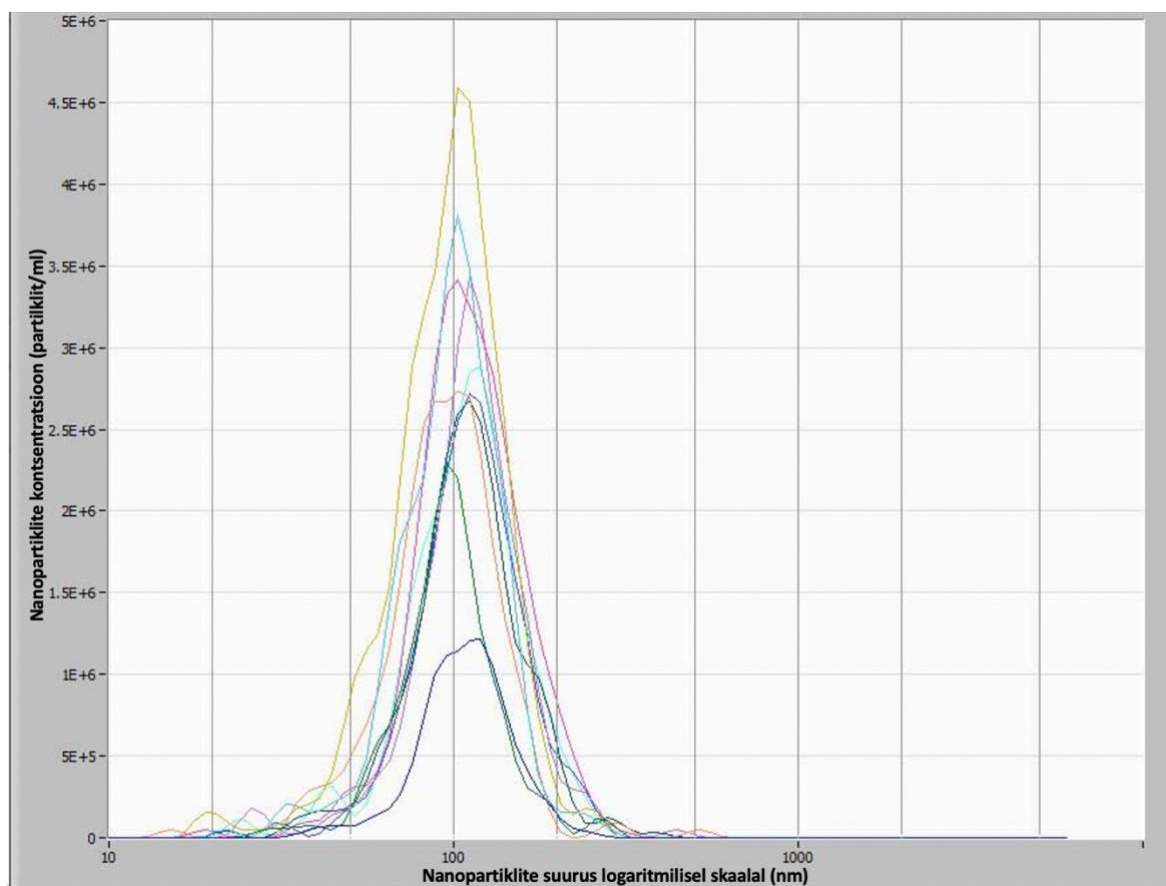
Lisad

Lisa 1. Suurte EV-de keskmised suurused ja kontsentratsioonid



Lisa 1. 10 patsiendi follikulaarvedelikust eraldatud suurte EV-de keskmised suurused ja kontsentratsioonid, mõõdetud NTA meetodil. Iga patsiendi andmed on esitatud eraldi värviga. y-teljel on esitatud nanopartiklite kontsentratsioon (partiklit/ml) ja x-teljel nanopartiklite suurusjaotus (nm) logaritmilisel skaalal.

Lisa 2. Väikeste EV-de keskmised suurused ja kontsentratsioonid



Lisa 2. 10 patsiendi follikulaarvedelikust eraldatud ning NTA meetodil mõõdetud väikeste EV-de keskmised suurused ja kontsentratsioonid. Iga patsiendi andmed on esitatud eraldi värviga. y-teljel on esitatud nanopartiklite kontsentratsioon (partiklit/ml) ja x-teljel nanopartiklite suurusjaotus (nm) logaritmilisel skaalal.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Katariina Johanna Saretok,

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Inimese follikulaarvedelikust eraldatud rakuväliste vesiikulite alampopulatsioonide eraldamine ja iseloomustamine“, mille juhendajad on Agne Velthut-Meikas ja Inge Varik,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

30.05.2023