

Exoszómák mennyiségének meghatározása petefészekrákos betegek szérumából



Soltész Beáta dr.¹, Lukács János dr.², Póka Róbert dr.², Nagy Bálint dr.¹

¹Debreceni Egyetem, ÁOK, Humángenetikai Tanszék, Debrecen (Tanszékvezető: Dr. Nagy Bálint)

²Debreceni Egyetem, ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet, Debrecen (Igazgató: Dr. Póka Róbert)

Bevezetés: Az extracelluláris vezikulumok méret szerint három csoportba oszthatók, exoszómák, mikrovezikulumok és apoptotikus testek. Az utóbbi években kerültek az exoszómák a kutatások középpontjába, mivel fontos szerepet játszanak a sejtek közötti információ áramlásában, a tumorok kialakulásában is lényeges szerepük lehet. A neminvaszív diagnosztikában, a folyadékbiopszia módszer bevezetésével biomarkerek lehetnek.

Cél: Az exoszómák mennyiségi meghatározása egészséges és petefészekrákos nők csoportjában.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatokba 18 fő egészséges és 19 fő petefészekrákos beteget vontunk be, tőlük vért vettünk le etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó csövekbe. Az exoszóma koncentrációját ELISA-tesztel határoztuk meg. Az adatokat statisztikailag kiértékeljük.

Eredmények: Az exoszómák mennyisége lényegesen különbözött a petefészekrákos és a kontrollcsoport között (1344,78±1830,3 vs. 608,05±498,82 p=0,0353). Az I-es, III-as és IV-es stádiumú betegeknél a koncentrációkban lényeges eltérések mutatkoztak.

Következtetések: Az exoszómák mennyiségi meghatározására alkalmas az új ELISA-kit. A petefészekrákos betegek plazmájában lényegesen magasabb exoszóma-mennyiségek mutathatók ki, sőt a FIGO-besorolással is összefüggés mutatkozik. Az exoszómák biomarkerként való alkalmazhatóságának vizsgálata ígéretesnek tűnik.

Kulcsszavak: petefészekrák, exoszóma, ELISA, biomarker

Determine the exosome concentration in the plasma of ovarian cancer patients

Objective: The extracellular vesicles could be classified according to their size to exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. Exosomes became a very popular target in the research programs lately as they play pivotal role in the cell to cell communication, they take part in the development of tumors. They could be introduced as non-invasive biomarkers in the application of liquid biopsy in the clinical practice.

Aim: Our study aimed to determine the exosome concentration in the plasma of healthy controls and ovarian cancer patients.

Materials and methods: We included 18 healthy control and 19 ovarian cancer patients in the study. Blood samples were collected into EDTA tubes and plasma was separated. The concentration of the exosomes were determined by ELISA method.

Results: There was a significant difference in the exosome concentration in the ovarian cancer and control group (1344.78±1830.3 µg vs. 608.05±498.82 µg, p=0.0353). However, it showed correlation with the established grading (I, III and IV) too.

Conclusions: The recently introduced exosome ELISA kit is suitable for quantitative measurements. Plasma samples of ovarian cancer patients contained higher exosome concentrations it seems there is a correlation with the FIGO ranking. Further studies of exosomes as biomarkers seem to be promising.

Keywords: ovarian cancer, exosomes, ELISA, biomarker

Levelezési cím:

Dr. Nagy Bálint, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1., E-mail: nagy.balint@med.unideb.hu

Bevezetés

Az exoszómák az utóbbi néhány évben kerültek a tudományos érdeklődés középpontjába [1]. Az élő szervezetek működésében fontos szerepet játszanak a sejtek és szövetek közötti információ áramlásában. Az extracelluláris vezikulumokat méret szerint három csoportba sorolhatjuk, a legkisebbek az exoszómák (30-100 nm), a mikrovezikulumok kicsit nagyobbak (100 nm-1 μ m) és a legnagyobbak az apoptotikus testek (1 μ m-5 μ m) [2]. Keletkezési mechanizmusuk, összetételük és tartalmuk is különböző. A folyadékbiopszia elterjedésével új biomarkerek bevezetése válik lehetővé. Ezek lehetnek a sejteken, szöveteken kívül, a különböző testfolyadékokban kimutatható szabad nukleinsavak (DNS, mtDNS, mRNS, mikroRNS stb), valamint az exoszómák [3].

Az exoszómák előfordulnak minden testfolyadékban. Régebben azt gondolták, hogy a sejtek különböző bomlás-termékeit távolítják el magukból az exoszómák. Azonban kiderült, hogy ennél sokkal fontosabb szerepük van. A tumorsejtekből származó extracelluláris vezikuláknak (mikrovezikulák és exoszómák) prognosztikus jelentősége van a tumor lokális terjedésében és a metasztázisok kifejlődésében, sőt a terápia iránti rezisztencia kialakulásában is. Az extracelluláris vezikulumok jelenléte az ováriumtumorok mikro környezetében és az ascitesben egyaránt kimutatható. Az exoszómák sejtek közötti információ áramlásában vesznek részt, a bennük található különböző DNS, RNS, protein- és lipidmolekulák segítségével [4].

Az exoszómák különböző szignálmolekulák segítségével keletkeznek. Tartalmukat az endoszómális fehérjeosztályozó molekulakomplex (ESCRT) határozza meg. Kívülről az exoszómákat kettősrétegű lipidmembrán határolja. Összetételük az őket termelő sejtek ujjlenyomatait, ennek alapján meghatározható, hogy hol keletkeztek. A fehérjék közül megtalálható bennük az annexin, flotillin, Rab-fehérjék, CD9, CD63, CD 81, HSP 70, HSP 90 stb. A nukleinsavak közül a DNS, a mtDNS, a mikroRNS, a hosszú nemkódoló RNS, piwiRNS, a siRNS és különböző lipidek kerültek eddig kimutatásra [5, 6, 7].

A petefészekrák a 8. leggyakrabban előforduló tumoros megbetegedés a nők között. A diagnózis felállítása a nem specifikus tünetek miatt nem egyszerű. Az alkalmazott tumormarkerek nem elég specifikusak, érzékenyek. Szükség van új biomarkerekre, erre alkalmas lehet a szabadon keringő nukleinsavak mellett az exoszóma is. Az exoszómák izolálása és mennyiségének meghatározása nem könnyű feladat, sok buktatója van [8]. Ezért határoztuk el, hogy lemérjük a petefészekrákos és kontrollszemélyek vérében egy újonnan forgalomba hozott ELISA-módszerrel a keringő exoszómák mennyiségét.

Anyagok és módszerek

Vizsgálati minták

A vizsgálatba bevont személyeket két csoportba soroltuk, egészséges kontroll (n=18; átlagos életkor 59,0 \pm 11,4 év) és

petefészekrákos (n=19; átlagos életkor: 64,52 \pm 8,3 év). Tőlük 6 ml EDTA-s vér került levételre. A mintákat lecentrifugáltuk először 2500 g-vel 10 percig 4 °C-on, majd a leszívott plazmát tovább centrifugáltuk 10 percig 16 000 g-vel 4 °C-on. A végén leszívott plazmát -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. A betegek FIGO-besorolása a következő volt, 4 fő I-es, 6 fő III-es és 9 fő IV-es stádiumú. A tumoros esetek sporadikus megjelenésűek voltak. BRCA1- és BRCA2-gének mutációjának meghatározásai nem történtek meg. Az ETT TUKEB engedélyezte a tanulmányt, a vizsgálatok lényegéről tájékoztattuk az érintetteket, akik beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

Exoszóma mennyiségi meghatározása ELISA-módszerrel

Az exoszómák mennyiségét a kereskedelmi forgalomba újonnan került kettősellenanyag-szendvics ExoTEST ELISA Kittel (HansaBioMed Life Sciences, Lonza, Tallin, Észtország) határoztuk meg. A gyártó protokollját követtük a meghatározások során. A mintákat duplikátumokban mértük le és 0,2 ml plazmát használtunk fel a mérések során. Az ELISA lemezek pan-exoszóma ellenanyagokkal lettek bevonva, amelyek alkalmasak több fajta biológiai mintából származó exoszóma megkötésére. Majd speciális exoszóma specifikus elleni ellenanyaggal történt az inkubáció, ezt követően a másodlagos ellenanyag kerül bemérésre, amely HRP-vel konjugált. A szubsztrát hozzáadása után 450 nm-en történt a leolvasás ELISA-leolvasóval. Liofilizált standardokat is tartalmaz a kit [9]. Az elsődleges ellenanyag monoklonális antihumán CD9.

Statisztikai kiértékelés

Az adatok statisztikai kiértékelése során Mann-Whitney-tesztet alkalmaztunk, a szignifikancia szintjét p<0,05-ben határoztuk meg.

Eredmények

Alacsony mintaszámmal végzett előtanulmányunkban lényeges különbséget találtunk a petefészekrákos és a kontrollcsoportba sorolt csoportok exoszómaszintje között (608,05 \pm 498,82 μ g vs. 1344,78 \pm 1830,3 μ g, p=0,0353). A FIGO-besorolással is összefüggés mutatkozott a kettősellenanyag-szendvics ELISA-módszerrel. Az 1. ábra grafikusan, az 1. táblázat számszerűen mutatja a kapott eredményeket. Az exoszóma-koncentráció a FIGO-besorolással is összefüggést mutatott, legmagasabb a IV-es stádiumú csoportban volt.

Az exoszómák száma a kontrollcsoportban 1,22 \times 10¹³ \pm 9,98 \times 10¹² db/ml, a petefészekrákos csoportban 2,69 \times 10¹³ \pm 3,66 \times 10¹³ db/ml volt.

Megbeszélés

A petefészekrákos és egészséges egyének exoszóma szérumszintjét elsőként határoztuk meg ELISA-teszttel. Alacsony mintaszámmal végzett előtanulmányunkban lényeges kü-

1. táblázat. Egészséges kontroll és petefészekrákos nők plazma mikroszóma mennyiségének meghatározása ELISA-módszerrel

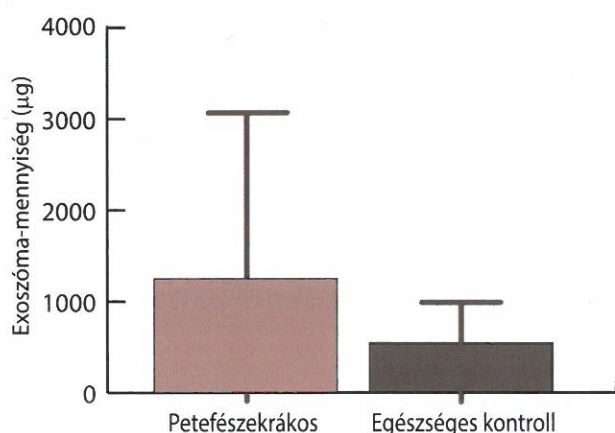
Csoport	Kontroll (n=18)	Petefészekrákos			
		I-es stádium (n=4)	III-as stádium (n=6)	IV-es stádium (n=9)	I-III-IV-es stádium együtt (n=19)
Exoszóma koncentráció (µg)	608,4±498,8	767,7±424,8	1474,6±1700,3	1515,5±2334,7	1344,78±1830,3*

p=0,0353 (kontroll vs. összes beteg)

lönbséget találtunk a két csoport exoszómaszintje között (608,05 ± 498,82 µg vs. 1344,78 ± 1830,3 µg, p=0,0353). A FIGO-besorolással is összefüggés mutatkozott, azonban a mintaszám jelenleg nem teszi lehetővé a részletesebb statisztikai elemzést, de nagyon biztatóak az eredmények és további munkára ösztönöznek bennünket.

Természetesen ahhoz, hogy valóban biomarkerként lehessen alkalmazni a kitet több vizsgálatot kell elvégezni nagyobb létszámú populációban. Meg kell vizsgálni, hogy az életkor, a testtömeg, a fizikai állapot, és egyéb betegségek hogyan hatnak a keringésben kimutatható exoszómák mennyiségére. Nagy a kihívás, hogy az exoszómák teljes szabad nukleinsav, protein- és lipidtartalmát meghatározzuk, és összefüggést találjunk a különböző betegségek kialakulásával. Valamint a kezelések hatékonyságának a monitorizálására, vagy esetleg kezelésként is alkalmazzuk őket. Egy 2012-es tanulmány 11 271 fehérjét, 2375 mRNS-t és 764 miRNS-t írt le belőlük [10].

A petefészekrák egyike azoknak a megbetegedéseknek, amelynek kezelése még mindig kihívást jelent az onkológusok számára. A korai kimutatás elősegítené a megfelelő terápia időben történő elkezdését. A klinikai gyakorlatban alkalmazott CA-125 tumormarker nem elég érzékeny és specifikus. A CA-125 egy magas molekulásúlyú glikoprotein, amely azoknak a sejteknek a felszínén mutatható ki, amelyek Müller-típusú epitheliumból differenciálódnak. A CA-125 érték más nőgyógyászati folyamatok során falszpozitív eredményt mutathat, így az ovuláció, a menstruáció és a vándorosság, de hólyag- és májrákban is [11]. Az alkalmazott kit a CD9 molekulát mutatja ki, amely egy sejt felszíni protein, a tetraspanin családba tartozik. A sejtek vándorlását, ad-



1. ábra. Az exoszómák mennyiségének meghatározása ELISA-módszerrel petefészekrákos és kontrollcsoport plazmamintáiban

hézióját befolyásolja, segíti a vérlemezkék aktivációját és aggregációját [12].

Jelentős kutatások folynak új megbízható biomarkerek megtalálására. Ígéretesnek tűnnek a keringésben megtalálható szabad nukleinsavak, amelyek a folyadékbiopsziából gyorsan kimutathatók. Közülük főleg a mikroRNS molekulák kutatása szolgál kifejezetten biztató eredményekkel.

A másik ilyen bizalomra okot adó terület az exoszómák kimutatása. A tumoros megbetegedések előrejelzésében, a kezelése monitorizálásában az extracelluláris vezikulumok szintén értékes biomarkerek lehetnek. A daganatból származó exoszómák nagy mennyiségben mutathatók ki a keringésben. Ezek szerepet játszanak az áttétképzésben, hiszen méretüknél fogva könnyen bekerülhetnek a keringésbe, a sejtek nagyobb méretűek, nehezebben jutnak be [13].

Az extracelluláris vezikulumok szerepe a tumor terjedése szempontjából kettős:

1. Immunszuppresszív fehérjetartalmuk révén, a citotoxikus T-sejtek és NK-sejtek aktivitásának gátlásával fékezik a tumorelles immunválaszt.
2. Résztvesznek a tumorsejtek számára kedvező mikro-környezet kialakításában. In vitro igazolták, hogy az extracelluláris vezikulák a T-sejt jelátviteli útvonalak reverzibilis gátlásával akadályozzák a T-sejt aktivációt, ezzel kedveznek a tumor terjedésének [14, 15].

Az ováriumtól származó exoszómák jellemzése arra mutat rá, hogy speciális glikolizációs mintázatuk, ezért alkalmasak lehetnek biomarkereknek. A daganatos betegségek patomechanizmusában a tumoreredetű extracelluláris vezikulumok fontos szerepet töltenek be. Az exoszómák szerepet játszanak a tumor terjedésében, a nyirokcsomó- és hematogén áttétek kifejlődésében. Gyengítik az immunválaszt és a tumorról kapcsolatos véralvadási zavarok kialakulásában is szerepük van. Adjuváns terápiaként szolgálhat a véráramból való eltávolításuk a daganatos megbetegedésekben [16, 17].

Az immunszuppresszor hatás kialakulásának pontos megismerése segítheti a kezelése hatékonyságának a növelését [13]. Az exoszómák szerepet játszanak az angiogenezisben is. A magasabb stádiumú betegekből izolált exoszómák fehérjetartalmát vizsgálva ATF2 (activating transcription factor 2) és MTA1 (metastasis associated protein 1) proteineket mutattak ki, amelyek segítik az angiogenezist [16]. Az anti-angiogenezis szintén egyik terápiás eszköz lehet. Az *Emblica officinalis* (indiai egres, vagy Amla) kivonatát alkalmazva petefészekrákos betegekben csökkent az IGFR1-szint, ami a *miR-375* sejtben belüli és exoszómális koncentráció emelkedésének a következménye volt [18].

Crow és mtsai a platinarezisztencia kialakulásában kifejtett hatását vizsgálták az exoszómáknak. Platinarezisztens petefészek-daganatból izolált exoszómákkal képesek voltak érzékeny sejteket ellenállóvá alakítani. Ebben az epitheliális-mesenchimális átalakulás, valamint a SMAD4-mutáció kialakulása játszott szerepet. Ebben a folyamatban az SMAD4/SMAD3 útvonalban résztvevő gének vesznek részt. Az epitheliális-mesenchimális átalakulás szerepe jól ismert a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásában [19, 20, 21].

Következtetések

Az itt bemutatott eredményekkel az exoszóma-koncentráció meghatározásának egy viszonylag egyszerű formáját mutatjuk be. Előzetes eredményeink biztatóak és további vizsgálatok szükségességét indokolják. A folyadékbiopszia felhasználása az exoszómák mennyiségének meghatározásával egy lehetséges biomarker lehet a petefészekrák kimutatásában.

A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

IRODALOM

- Guo W, Gao Y, Li N, et al. Exosomes: new players in cancer. *Oncol Reports* 2016; 38: 665–675.
- Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, et al. Exosomes: new molecular targets of diseases. *Acta Pharm Sinica* 2017; 1–12.
- Tang SKM, Wong TSA. Exosomes: emerging biomarkers and targets for ovarian cancer. *Cancer Letters* 2015; 367: 26–33.
- Ibrahim A, Marbán E. Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 2016; 78: 67–83.
- Beach A, Zhang H-G, Ratajczak ZM, et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J Ovarian Research* 2014; 7: 14.
- Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, et al. The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res* 2004; 295: 315–329.
- Yi H, Zheng X, Song J, et al. Exosomes mediated pentose phosphate pathway in ovarian cancer metastasis: a proteomics analysis. *Int J Exp Pathol* 2015; 8: 15719–15728.
- He F, Liu H, Guo X, et al. Direct Exosome Quantification via Bivalent-Cholesterol-Labeled DNA Anchor for Signal Amplification. *Anal Chem* 2017; 89: 12968–12975.
- Logozzi M, De Milito A, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009; 4:e5219.
- Mathivanan S, Fahner C, Reid G. ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acid Research* 2012; 40: D1241–1244.
- Sharma S, Zuniga F, Rice EG, et al. Tumor-derived exosomes in ovarian cancer – liquid biopsies for early detection and real-time monitoring of cancer progression. *Oncotarget* 2017; 8: 104687–104703.
- Sumiyoshi N, Ishitobi H, Miyaki S, et al. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. *Biomed Res* 2016; 37: 283–291.
- Li Y, Wang X. The emerging roles and therapeutic potential of exosomes in epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer* 2017; 16: 92.
- Marleau AM, Chen CS, Joyce JA, et al. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 134.
- Robbins DR, Morelli EM. Regulation of immune response by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 195–208.
- Wen C, Seeger CR, Fabbri M, et al. Biological role and potential application of immune cell-derived extracellular vesicles. *J Extracellular Vesicles* 2017; 6: 1400370.
- Filipazzi P, Burdek M, Vila A, et al. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol* 2012; 22, 342–349.
- Yi H, Yang XM, Zhang LW, et al. High-grade ovarian cancer secreting effective exosomes in tumor angiogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 85062–85070.
- De A, Powers B, De A, et al. Emblica officinalis extract downregulates pro-angiogenic molecules via upregulation of cellular and exosomal miR-375 in human ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2016; 7: 31484–500.
- Crow J, Atay S, Banskota S, et al. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 11917–11936.
- Marchini S, Fruscio R, Clivio L, et al. Resistance to platinum based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2013; 49: 520–530.