

ХЕЙЛОМСЬКА Т.✉, ЄМЕЦЬ А.

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0009-0008-6246-9257, 0000-0001-6887-0705

✉ tanya.kheylomska@gmail.com

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИЧНИХ ПІДХОДІВ ОТРИМАННЯ ЕКЗОСОМОПОДІБНИХ НАНОВЕЗИКУЛ ІЗ КРОПИВИ ДВОДОМНОЇ (*URTICA DIOICA* L.)

Мета. Розробити методичні підходи щодо ефективного ізолювання екзосомоподібних нановезикул з рослин кропиви дводомної (*Urtica dioica* L.) з урахуванням їх чистоти, кількості та первинних характеристик. **Методи.** Отримання екзосомоподібних нановезикул із зеленої біомаси кропиви дводомної та їх характеризацію проводили за допомогою методів механічної та кріогомогенізації, центрифугування, динамічного розсіювання світла та трансмісійної електронної мікроскопії. **Результати.** У результаті проведеної роботи підібрано умови, здійснено ізолювання різними методами екзосомоподібних нановезикул із зеленої біомаси кропиви дводомної та їх первинну характеризацію. **Висновки.** Продемонстровано придатність протестованих методів для отримання екзосомоподібних нановезикул із зеленої біомаси *U. dioica*. Отримані різними методами та їх модифікаціями екзосомоподібні нановезикули суттєво не відрізняються за розмірами та будовою. Певні відмінності у результатах досліджень за використання динамічного розсіювання світла та трансмісійної електронної мікроскопії знаходяться в межах відтворюваності методів.

Ключові слова: екзосоми, екзосомоподібні нановезикули, методи ізолювання, *Urtica dioica* L., динамічне розсіювання світла, трансмісійна електронна мікроскопія ультрацентрифугування.

Початок бойових дій в Україні у 2014 р., а також початок повномасштабної війни у 2022 р., зробили актуальним завдання з розробки нових, ефективних та безпечних, методів лікування ран, опіків та інших порушень шкірних покривів. Останніми роками з цією метою отримали широке використання екзосомоподібні нановезикули (ЕПН) рослинного походження — нанорозмірні частинки, вкриті фосфоліпідним подвійним шаром, діаметром від 10 до 1000 нм [1]. Будучи давно визнаними медіаторами клітинної комунікації, ЕПН відіграють значну роль у ній, про що свідчить їх здатність переносити білки, ДНК,

РНК та інші речовини від клітин-донорів до клітин-реципієнтів [2].

Завдяки своїй структурі, складу і специфіці походження, ЕПН рослинного походження можуть не розпізнаватися імунною системою організму людини, що може збільшити їх цикл циркуляції та біодоступність [3]. Враховуючи їх неімуногенність, низьку токсичність та біосумісність, ЕПН рослинного походження можуть використовуватись як новий тип високоефективних носіїв для доставлення екзогенних біомолекул та активних інгредієнтів, таких як miRNA, позаклітинні білки та низькомолекулярні сполуки фармацевтичного призначення.

ЕПН рослинного походження, як правило, отримують з різних частин рослин або культур рослинних клітин відповідно до їхніх фізико-хімічних властивостей. Для їх ізолювання використовують такі основні методи, як ультрацентрифугування, центрифугування в градієнті густини сахарози, ультрафільтраційне центрифугування, полімерне осадження, хроматографію та технологію мікрофлюїдного розділення. Однак всі ці методи мають певні переваги та недоліки. Зокрема, при застосуванні методу центрифугування враховують різницю в щільності та розмірах між екзосомами та іншими компонентами, щоб розділити їх за допомогою різних відцентрових сил. Наприклад, за допомогою низької швидкості видаляють домішки та залишки клітин, тоді як за використання високої швидкості відокремлюють везикули та осаджують екзосоми. Метод центрифугування простий у використанні, він дозволяє екстрагувати та виділити більшу кількість екзосом, ніж інші методи [1].

ЕПН рослинного походження мають фізико-хімічні властивості та характеристики, подібні до властивостей екзосом тварин, які вивчають методами динамічного розсіювання світла (ДРС) та трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Морфологія ЕПН, як правило, має блюдцеподібну або чашеподібну форму при їх дослідженні за допомогою ТЕМ [4]. Однак морфологія

деяких везикул може бути змінена внаслідок певних маніпуляцій, що передбачають фіксацію, дегідратацію та фарбування зразків.

На сьогодні дослідники виділили ЕПН з імбиру, грейпфрута, пшениці, чорниці та більшості їстівних овочів та фруктів, з різноманітних рослин, що застосовуються у традиційній китайській медицині тощо [1]. Однак, незважаючи на кілька десятиріч наукових досліджень, далеко не з кожного виду рослин (навіть лікарських) були отримані та досліджені ЕПН. Поза увагою дослідників залишилися багато лікарських рослин, зокрема більшість видів кропиви, препарати, з яких характеризуються кровоспинною та протизапальною дією, а також використовуються для загоювання ран.

Отже, експериментальне порівняння методів ізолювання ЕПН із кропиви дводомної є важливим для розробки ефективних способів препаративного отримання ЕПН з метою їх подальшого практичного застосування для пришивлення загоєння порушених шкірних покривів, які зможуть покращити клінічні результати лікування ран та опіків у пацієнтів. Тому, метою даної роботи було проведення серії досліджень з отримання ЕПН із зеленої біомаси *U. dioica* з використанням різних методів та аналізу ізолюваних ЕПН для відбору найбільш ефективного підходу для їх ізолювання.

Матеріали і методи

ЕПН ізолювали із зеленої біомаси рослин кропиви дводомної (*Urtica dioica* L.) з використанням раніше запропонованих методів [5–9] з деякими модифікаціями, враховуючи вихідний рослинний матеріал, обраний нами в дослідженні. В якості буфера використовували розчин, до складу якого входило 5,0 мМ Тріс, 1,3 мМ ЕДТА та 0,32 М сахарози (рН 7,0). Всі маніпуляції проводилися при температурі +4°C. Спочатку зібрані зелені частини (молоді листя з черешками та верхівкові бруньки) кропиви дводомної відмивали від бруду, видаляли зайву вологу за допомогою фільтрувального папіру і заморожували при -20°C для зберігання та подальшого використання. Перед проведенням досліджень, матеріал розморожували за кімнатної температури, зважували (приблизно 40 г) і піддавали гомогенізації одним з трьох наступних методів.

Згідно з першим методом [5], до листя у фарфоровій ступці додавали 5,5 г кварцового піску та 100 мл буфера, і розтирали до однорідного стану (зразок № 1).

Згідно з другим методом [8], до листя у фарфоровій ступці додавали рідкий азот і розтирали до однорідного дрібного порошку, додаючи азот у міру випаровування. Після досягнення ступкою кімнатної температури додавали 100 мл буфера і розмішували до однорідної маси (зразок № 2).

Згідно з третім методом [9], до наважки листя у пластиковому стакані додавали 100 мл буфера, охолоджували у кризі, що тане і гомогенізували за допомогою блендера (15000 об/хв, 300 Вт) протягом 5 хв імпульсами по 30 с з інтервалами 30 с (зразок № 3).

Після гомогенізації одним з трьох методів, однорідну масу центрифугували при 3500 g протягом 15 хв, збирали супернатант; осад промивали 50 мл буфера з наступним центрифугуванням за тих самих умов; супернатанти відбирали, а осад видаляли. Об'єднані опалесцюючі супернатанти центрифугували при 14000 g протягом 30 хв. Зібраний у такий спосіб частково освітлений супернатант піддавали ультрацентрифугуванню при 100000 g протягом 120 хв. Отриманий осад ЕПН ділили на дві рівні частини. Одну частину використовували для дослідження за допомогою TEM, другу — ресуспендували в буфері з перемішуванням на вортексі та використовували в той самий день для дослідження методом ДРС.

Окремо було досліджено вплив додаткового етапу гомогенізації на якість ізолюваних ЕПН, описаний у [9]. Для цього, три однакові порції рослинного матеріалу піддали гомогенізації згідно з третім методом, після чого одну залишали у якості контрольної (зразок №4), іншу додатково гомогенізували за допомогою ультрагомогенізатора IKA T18 basic Ultra Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Німеччина) на 25000 об/хв (зразок №5), а ще одну гомогенізували додатково за допомогою ультразвукового випромінювача Bandelin SonoPlus (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Німеччина) з насадкою UW2070, робочою частотою 20 кГц та ефективною потужністю 70 Вт (зразок №6). Подальшу обробку зразків №4–6 проводили, як зазначено вище.

Характеристичні розміри ЕПН (гідродинамічний діаметр) оцінювали за допомогою приладу ZetaSizer-3 (Malvern Instruments, Велика Британія) з корелятором Multi8 computing correlator type 7032 се, оснащений гелій-неоновим лазером ЛГ-111 з довжиною хвилі 633 нм і потужністю 25 мВт. Реєстрацію розсіюваного від суспензії лазерного опромінення проводили протягом 1 хв 5-разово під кутом розсіювання 90°. Автокореляційну функцію обробляли за допомогою

стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v 1.61.

Дослідження за допомогою ТЕМ проводили, використовуючи електронний мікроскоп Н-600 (Hitachi, Японія) за прискорювальної напруги 75 kV та збільшення до 80000. Зразок наносили на формварову сітку 200 меш, вкриту карбоном, і негативно контрастували 1 % розчином уранілу ацетату.

Результати та обговорення

Результати дослідження отриманих нановезикул за допомогою ДРС були подібними для всіх протестованих нами методів ізолювання ЕПН. Нижче (рис.; табл.) наведено характеристичні профілі та дані, отримані для зразка ЕПН № 4.

Як видно з рисунка і таблиці, розподіл частинок за розмірами згідно з даними ДРС різниться залежно від параметрів вимірювання. Якщо визначення виконують за об'ємом частинок, то він розподіляється між малими (пік 1 з середнім розміром 46,7 нм; 84,3 % об'єму) і великими (пік 2 з середнім розміром 632,7 нм; 15,7 % об'єму) нановезикулами; якщо визначення виконують за кількістю частинок, домінують малі нановезикули (пік 1 з середнім розміром 30,0 нм;

відсутність піку 2 означає, що кількість великих частинок становить менш ніж 0,1 % від загальної величини). Отримані результати корелюють із даними літературних джерел [10, 11] про те, що розміри ЕПН рослинного походження знаходяться в діапазоні від 30 до 400 нм.

Результати ТЕМ зразків № 1–6 підтверджують утворення ЕПН (структур з двошаровою ліпідною мембраною) з середніми розмірами як 20–70 нм, так і близько 500 нм. Літературні дані також свідчать про утворення ЕПН, неомогенних за розмірами (наприклад, піки 35 і 218 нм розмірів ЕПН за методом ДРС у [11]). Про отримання ЕПН у широкому діапазоні розмірів (від 30 до 150 нм) також зазначено у роботі [12].

Резюмуючи, слід зазначити, що найзручнішим методом для отримання ЕПН із зеленої біомаси кропиви дводомної виявився третій метод (за яким було отримано зразки № 3 та 4), який передбачає гомогенізацію матеріалу за допомогою блендера. Він є досить простим у виконанні та призводить до порівняно прийнятному виходу ЕПН. Також саме цей метод найчастіше зустрічається в публікаціях, що містять описи методів ізолювання ЕПН [1, 11–13].

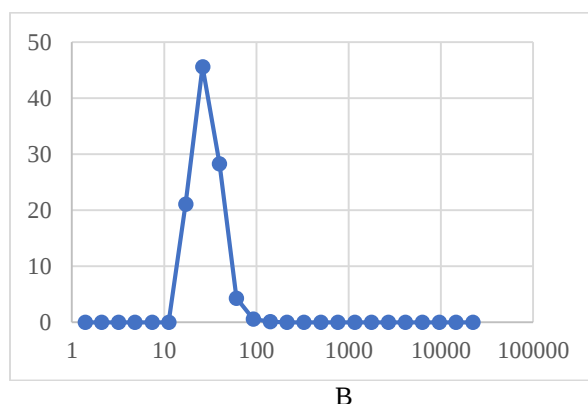
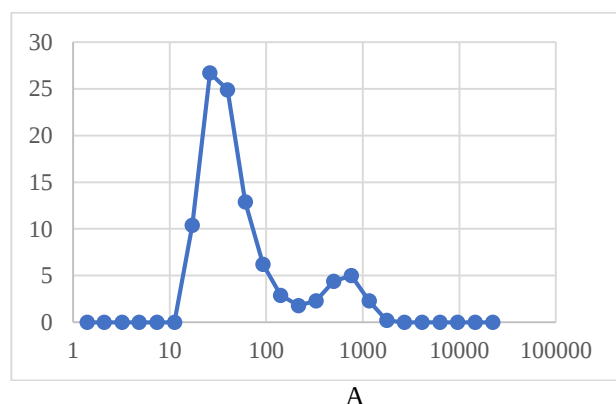


Рис. Залежність долі частинок в зразку ЕПН № 4 від їх середнього розміру, отримана за допомогою ДРС, для різних параметрів визначення: А — об'єм частинок; В — кількість частинок. На абсцисах розмір частинок в нм; на ординатах доля частинок з таким розміром у %.

Таблиця. Характеристики піків залежності долі частинок в зразку ЕПН № 4 від їх середнього розміру, отриманих за допомогою ДРС, для різних параметрів визначення

Параметр визначення	Номер піка	Площа піка, %	Положення максимуму, нм	Ширина піку, нм
Об'єм частинок	1	84,3	46,7	41,2
	2	15,7	632,7	788,6
Кількість частинок	1	100,0	30,0	26,8
	2	-	-	-

Висновки

Вперше проведено дослідження з ізолювання ЕПН з такої лікарської рослини, як кропива дводомна. За результатами проведених досліджень всі запропоновані методи виявилися придатними для отримання ЕПН із зеленої біомаси цього виду рослин. Ізольовані нами різними методами ЕПН були приблизно подібними за розмірами та будовою. Отримані дані підкреслюють

важливість подальшої розробки ефективних способів препаративного отримання ЕПН з метою їх подальшого застосування для пришвидшення загоєння порушених шкірних покривів, які зможуть покращити клінічні результати лікування ран та опіків у пацієнтів.

Роботу виконано частково за фінансової підтримки НАН України (бюджетна програма КПКВК 6541030, 2024–2028 рр., державний реєстраційний номер: 0124U002424).

References

1. Mu N., Li J., Zeng L. et al. Plant-derived exosome-like nanovesicles: current progress and prospects. *Int. J. Nanomedicine*. 2023. Vol. 18. P. 4987–5009. <https://doi.org/10.2147/IJN.S420748>.
2. Zappulli V., Friis K.P., Fitzpatrick Z. et al. Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *J. Clin. Invest.* 2016. Vol. 126 (4). P. 1198–1207. <https://doi.org/10.1172/jci81134>.
3. Kantarcioglu M. New therapeutic players on the horizon: edible plant derived exosomes. *Hepatology Forum*. 2021. Vol. 2 (3). P. 89–90. <https://doi.org/10.14744/hf.2021.2021.ed0002>.
4. Pascucci L., Scattini G. Imaging extracellular vesicles by transmission electron microscopy: Coping with technical hurdles and morphological interpretation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2021. Vol. 1865 (4). 129648. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129648>.
5. Terry M., Williams L. Fractionation of plant tissue for biochemical analyses. In book: *Molecular Plant Biology*. Vol. 2: A Practical Approach. Eds : Gilmarin, P. M., Bowler, C. Oxford University Press, Oxford, UK, 2002. P. 147–171.
6. Liao P. C., Bergamini C., Fato R. et al. Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Methods Cell Biol.* 2020. Vol. 155. P. 3–31. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.10.002>.
7. Huang Y., Wang S., Cai Q. et al. Effective methods for isolation and purification of extracellular vesicles from plants. *J. Integr. Plant Biol.* 2021. Vol. 63 (12). P. 2020–2030. <https://doi.org/10.1111/jipb.13181>.
8. Mezhenka O., Muzychka O., Vovk A., Parkhomenko Yu. Applying affinity chromatography for detection of proteins that exhibit an affinity for thiamine. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. 2016. Iss. 73. P. 160–165. Retrieved from: <http://publications.lnu.edu.ua/bulletins/index.php/biology/article/view/7847/7814>. [in Ukrainian]
9. Burden D. W. Guide to the disruption of biological samples. *Random Primers*. 2012. Vol. 12. P. 1–25. Retrieved from: https://opsdiagnostics.com/applications/OPSD_2012_Disruption_Guide_v1.1.pdf.
10. Ishida T., Morisawa S., Jobu K. et al. Atractylodes lancea rhizome derived exosome-like nanoparticles prevent alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in B16-F10 melanoma cells. *Biochem. Biophys. Rep.* 2023. Vol. 35. 101530. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101530>.
11. Liu Y., Wu S., Koo Y. et al. Characterization of and isolation methods for plant leaf nanovesicles and small extracellular vesicles. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* 2020. Vol. 29. 102271. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102271>.
12. Colombo M., Raposo G., Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Ann Rev. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 30. P. 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
13. Sha A., Luo Y., Xiao W. et al. Plant-derived exosome-like nanoparticles: a comprehensive overview of their composition, biogenesis, isolation, and biological applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2024. Vol. 25 (22). 12092. <https://doi.org/10.3390/ijms252212092>.

KHEYLOMSKA T., YEMETS A.

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetsko str., 2a

DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO OBTAINING OF EXOSOME-LIKE NANOVESICLES FROM *URTICA DIOICA* L.

Aim. To develop methodological approaches for the effective isolation of exosome-like nanovesicles from dioecious nettle (*Urtica dioica* L.) plants, taking into account their purity, quantity and primary characteristics. **Methods.** The preparation of exosome-like nanovesicles from the green biomass of nettle and their characterization was carried out using mechanical and cryo-homogenization, centrifugation, dynamic light scattering, and transmission electron microscopy. **Results.** As a result of this work, conditions were selected, exosome-like nanovesicles were isolated from the green biomass of dioecious nettle by various methods, and their primary characterization was carried out. **Conclusions.** The suitability of the tested methods for the preparation of exosome-like nanovesicles from green biomass of *U. dioica* was demonstrated. The exosome-like nanovesicles obtained by different methods and their modifications are quite similar in size and structure. Certain differences in the results of the studies using dynamic light scattering and transmission electron microscopy are within the limits of the methods reproducibility.

Keywords: exosomes, exosome-like nanovesicles of plant origin, isolation methods, *Urtica dioica* L., dynamic light scattering, transmission electron microscopy, ultracentrifugation.