

DOI: 10.17725/rensit.2024.16.223

Микрочип для выделения экзосом с возможностью одновременной импрегнации его иматинибом: анализ *in vitro*

¹Амир Монфаредан, ²Фахер Рахим, ³Кожобеков К.Г., ¹Голамреза Тавусидана, ¹Мохаммад Хоссейн Модарресси, ⁴Алавиесадат Хоссейнинасаб, ⁵Али-Акбар Агаджани-Афрузи, ¹Махди Шафи Сабет, ¹Элахе Мотеvasели

¹Тегеранский университет медицинских наук, <http://en.tums.ac.ir/>

Тегеран 1416753955, Иран

²Университет Джихан-Сулеймания, <https://siliciban.edu.krd/>

Сулеймания 46001, Курдистан, Ирак

³Ошский государственный университет, <https://oshsu.kg/ru/>

Ош 723500, Кыргызстан

⁴Компания GeneDia Life science, <https://tracxn.com/>

Тегеран 13000-15000, Иран

⁵Университет Пайаме Нур, <https://pnu.ac.ir/>

Тегеран 19569, Иран

E-mail: monfaredanamir@gmail.com, e_motevaseli@tums.ac.ir, rahim.fakher@siliciban.edu.krd, kudayberdi.kozhobekov@oshsu.kg, g-tavoosi@tums.ac.ir, modaresi@sina.tums.ac.ir, sbrzd.bsni@gmail.com, aghajani3@gmail.com, mshafiees@sina.tums.ac.ir

Postupila 17.01.2024, *рецензирована* 18.01.2024, *принята* 19.01.2024, *опубликована* 25.04.2024

Представлена действительным членом РАЕН В.В. Колесовым

Аннотация: Экзосомы, небольшие двухслойные мембраны, полученные из эукариотических клеток, были идентифицированы как полезная естественная платформа доставки благодаря их подходящему размеру, биосовместимости, структурной стабильности, высокой нагрузочной способности и возможности редактирования поверхности. Из-за сложности поддержания высокой чистоты экзосомы было предпринято несколько попыток использовать методы выделения экзосом. В настоящем исследовании был проведен процесс мягкой литографии для создания каналов для разделения экзосом с функцией иммуноаффинности. Тесты как по биохимическим, так и по биофизическим категориям были проведены для проверки качества экстрагированных экзосом из различных источников (сыворотка, клеточный супернатант и моча) и сравнения их с коммерчески доступным набором. Результаты показали, что нынешний метод способен изолировать экзосомы с высоким выходом, чистотой и низкими затратами времени. Все формы экзосом, нагруженных иматинибом, проявляли противоопухолевую активность в отношении клеточной линии KYO-1.

Ключевые слова: персонализированная медицина; экзосома; лаборатория на чипе; лейкемия; таргетная терапия

УДК 61:53(075.9)

Благодарности: Это исследование было проведено в форме проекта, одобренного под номером 99314850605 факультета современных медицинских технологий Тегеранского университета медицинских наук. Исследование было поддержано Тегеранским университетом медицинских наук [грант №. 99-3-148-50605]. **Этическое одобрение и согласие на участие:** Это исследование было одобрено под номером этического кода IR.TUMS.MEDICINE.REC.1399.969 в Комитете по этике медицинского факультета Тегеранского университета медицинских наук.

Для цитирования: Амир Монфаредан, Фахер Рахим, Кожобеков К.Г., Голамреза Тавусидана, Мохаммад Хоссейн Модарресси, Алавиесадат Хоссейнинасаб, Али-Акбар Агаджани-Афрузи, Махди Шафи Сабет, Элахе Мотеvasели. Микрочип для выделения экзосом с возможностью одновременной импрегнации его иматинибом: анализ *in vitro*. РЭНСИТ: Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии, 2024, 16(2):223-238. DOI: 10.17725/rensit.2024.16.223.

Designing a microchip for exosome isolation with the ability to simultaneously impregnate it with imatinib: an in vitro analysis

Amir Monfaredan, Elahe Motevaseli, Gholamreza Tavoosidana

Tehran University of Medical Sciences, Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, <http://en.tums.ac.ir/>

Tehran 1416753955, Iran

E-mail: monfaredanamir@gmail.com, e_motevaseli@tums.ac.ir, g-tavoosi@tums.ac.ir

Fakher Rahim

Cihan University-Sulaimaniya, <https://sulicihan.edu.krd/>

Sulaimaniya 46001, Iraq

E-mail: rahim.fakher@sulicihan.edu.krd

Kudaiberdi G. Kozhobekov

Osh State University, <http://oshsu.kg/ru/>

Osh 723500, Kyrgyzstan

E-mail: kudayberdi.kozhobekov@oshsu.kg

Mohammad Hossein Modarressi

Tehran University of Medical Sciences, Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, <http://en.tums.ac.ir/>

Tehran 1416753955, Iran

E-mail: modaresi@sina.tums.ac.ir,

Alaviyehsadat Hosseininasab

GeneDia Life science company, <https://tracxn.com/>

Tehran 13000-15000, Iran

E-mail: sbrzd.bsni@gmail.com

Ali-Akbar Aghajani-Afrouzi

Payame Noor University, Department of Business Administration, <https://pnu.ac.ir/>

Tehran 19569, Iran

E-mail: aghajanaliz3@gmail.com, mshafiees@sina.tums.ac.ir

Mahdi Shafiee Sabet

Tehran University of Medical Sciences, School of Medicine, <http://en.tums.ac.ir/>

Tehran 14167539559, Iran

E-mail: mshafiees@sina.tums.ac.ir

Received January 17, 2024, peer-reviewed January 18, 2024, accepted January 19, 2024, published April 25, 2024

Abstract: Exosomes, a small bilayer membrane derived from eukaryotic cells, have been identified as a useful natural delivery platform due to their suitable size, biocompatibility, structural stability, high loading capacity, and editable surface capability. Due to the difficulty of maintaining the highly pure exosome, several attempts have conducted the techniques for exosome isolation. In recent years, microstructures have found many applications in chemistry, biology, and medicine due to their high accuracy and low cost of materials. Soft lithography is a low-cost, fast, accurate, and yet widely used method of construction of Micron channels. In the present study, a soft lithography process has been performed to construct channels for exosome separation with immunoaffinity function. Both biochemical and biophysical categories tests were performed to examine the quality of extracted exosomes from different sources (serum, cell supernatant, and urine) and compared with the commercially available kit. Results showed that the current technique was capable to isolate exosomes with a high yield rate, purity, and low time consumption. All forms of the imatinib loaded exosomes exhibited the antitumor activity against KYO-1 cell line.

Keywords: personalized medicine; exosome; laboratory on a chip; leukemia; targeted therapy

UDC 61:53(075.9)

Acknowledgements: This study was carried out in the form of a project approved under the number 99314850605 of the Faculty of Modern Medical Technologies of Tehran University of Medical Sciences. This study was supported by the Tehran University of medical sciences [grant no. 99-3-148-50605].

Ethics approval and consent to participate: This study was approved by ethics code number IR.TUMS.MEDICINE.REC.1399.969 in the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Tehran University of Medical Sciences

Authors' contributions: Amir Monfaredan analyzed data. Amir Monfaredan wrote the manuscript. Amir Monfaredan and Elahe Motevaseli contributed to the study concept, and drafted and revised the manuscript. Amir Monfaredan and Elahe Motevaseli confirm the authenticity of all the raw data. All authors read and approved the final version of the manuscript.

For citation: Amir Monfaredan, Fakher Rahim, Kudaiberdi G. Kozhobekov, Gholamreza Tavoosidana, Mohammad Hossein Modarressi, Alaviyehsadat Hosseininasab, Ali-Akbar Aghajani-Afrouzi, Mahdi Shafiee Sabet, Elahe Motevaseli. Designing a microchip for exosome isolation with the ability to simultaneously impregnate it with imatinib: an in vitro analysis. *RENSIT: Radioelectronics. Nanosystems. Information Technologies*, 2024, 16(2):223-238e. DOI: 10.17725/j.rensit.2024.16.223.

Содержание

1. Введение (225)
2. Материалы и методы (226)
3. Результаты (230)
4. Обсуждение (233)
5. Заключение (235)

Литература (235)

1. ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные носители (Extracellular vehicles, EV) или экзосомы стали одной из областей интереса из-за их примечательной роли не только в биологических процессах, но также в качестве биосовместимых носителей для диагностики и терапии [1]. Экзосомы представляют собой биосовместимые везикулы небольшого размера, способные покинуть систему мононуклеарных фагоцитов (mononuclear phagocyte system, МФС) [1]. Применение экзосом в биомедицинской диагностике и терапии выявило острую необходимость в новых технологиях быстрых и точных методов разделения экзосом в жидкостях организма. Из-за биомолекулярного содержания экзосом, таких как белки, нуклеиновые кислоты (м. РНК, микроРНК и ДНК), были предприняты многочисленные попытки выявить диагностический и терапевтический потенциал экзосом, связанный с их ролью в межклеточных коммуникациях и доставке лекарств соответственно. . Одна из основных проблем связана с преодолением сложности жидкости

и отсутствия эффективных методов изоляции [2-4]. Экзосомы представляют собой структуры клеточного происхождения, содержащие липиды, белки и нуклеиновые кислоты. Они обнаруживаются в различных жидкостях организма и играют роль в физиологических и патологических процессах. Хотя их потенциал для клинического применения в качестве диагностических и терапевтических инструментов уже выявлен, основным узким местом, препятствующим развитию приложений в быстро растущей области исследований экзосом, является неспособность эффективно отделять очищенные экзосомы от других нежелательных компонентов в жидкостях организма. На сегодняшний день предложены и исследованы различные подходы к выделению экзосом; их основным кандидатом является микрофлюидная технология из-за ее относительной простоты, экономической эффективности и способности к точной и быстрой микромасштабной обработке и автоматизации. В частности, устранение необходимости маркировки экзосом представляет собой значительный прогресс с точки зрения простоты процесса, времени и стоимости, а также с точки зрения сохранения биологической активности экзосом. Несмотря на впечатляющий прогресс в области микрофлюидных стратегий выделения экзосом и многочисленные преимущества безметочных подходов для клинических применений, существующие микрофлюидные платформы для выделения экзосом все еще сталкиваются

с рядом проблем, которые препятствуют их использованию для обработки образцов [5-8].

В этом обзоре основное внимание уделяется недавно разработанным микрофлюидным платформам для выделения экзосом без меток, в том числе основанным на просевании, детерминистическом латеральном смещении, полевом потоке и фракционировании сжимающего потока, а также на вязкоупругих, акустических, инерционных, электрических и центробежных силах [9-11].

В последние годы область микрофлюидики позволила разработать новые методы очистки экзосом. Микрофлюидика предоставляет платформы, включая каналы микронного размера, для обработки небольших количеств жидкостей (от микролитров до пиколитров). Большинство микрофлюидных устройств изготовлены из специального полимера, называемого полидиметилсилоксан, ПДМС [3,12,13]. ПДМС оптически прозрачны и биосовместимы, что делает их полезным материалом для создания биожидкостных устройств. Микрофлюидные платформы могут классифицировать экзосомы с высокой степенью чистоты и чувствительности, сокращая при этом стоимость, время и объем реагентов. Микрофлюидный метод выделения экзосом на основе иммуноаффинности преодолевает многие проблемы традиционных методов (таких как ультрацентрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности, тангенциальная проточная фильтрация, эксклюзионная хроматография), поскольку они являются регулируемыми, автоматическими, масштабируемыми и портативными. Экзосомы можно выделить из других компонентов образца на основе тех же специфических белков CD9, CD41, CD63 и CD81, а также специфические молекулы, такие как гепарин, Tim4 и пептиды, связывающие белок теплового шока, являются распространенными поверхностными маркерами экзосом для выделения на основе иммуноаффинности [14-17].

В данной работе представлены микрофлюидные устройства для выделения экзосом из различных источников с

использованием магнитных шариков, конъюгированных с CD68 [4,18,19].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование COMSOL. Уравнения, управляющие каналами, были сформулированы с использованием мультифизического программного обеспечения COMSOL версии 5.1. Поток моделировался как однофазный ламинарный поток, и из-за его малой толщины для моделирования использовались физические свойства дистиллированной воды при комнатной температуре и $pH = 7.4$. Эффективными и оптимизируемыми параметрами были заданы следующие: угол расположения позиций по длине чипа, проектная ширина криволинейного канала, высота чипа, количество лабиринтов, расчетный радиус кривизны криволинейного канала, ширина канала на выходе и входе, а также расход на входе.

Чиповая конструкция. Изготовление микрочипа для выделения экзосом с возможностью загрузки иматиниба осуществляли по стандартному протоколу мягкой литографии. Кремниевая пластина была покрыта фоторезистом SU8 (Microchem. Corp., Ньютон, Массачусетс). На 4-дюймовую пластину налили 5 см^3 фоторезиста SU8 и нанесли покрытие центрифугированием при 2300 об/мин. Выпечку вафель после центрифугирования осуществляли при температуре 60 и 95 градусов Цельсия в течение 2 часов и 15 минут соответственно. После завершения обжига маску точно выравнивали и подвергали воздействию УФ-излучения напряжением 360 мВ в течение 12 минут на пластине, покрытой SU8. После окончания экспонирования производилась промывка проявителем и изопропанолом в течение 4 и 8 минут соответственно до появления каналов. После подготовки формы готовили и барботировали полидиметилсилоксаном (ПДМС) (Microchem. Corp., Ньютон, Массачусетс) в соотношении 1:10. 10 см^3 раствора ПДМС и отвердителя вылили на форму и инкубировали при комнатной температуре в течение 24 часов для формирования чипа ПДМС. После полного формирования геля ПДМС с использованием плазмообразующего газа мощностью 12 мДж/мин в течение 4 минут

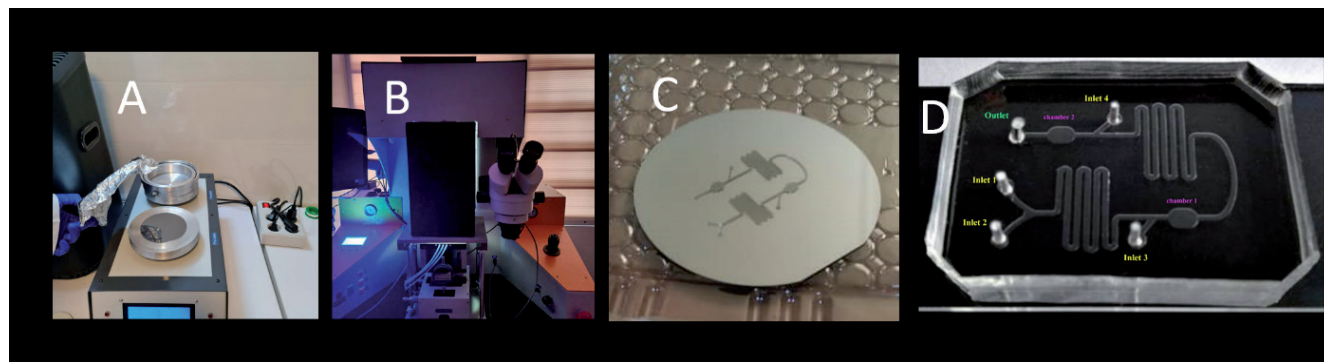


Рис. 1. А: этапы выпечки пластины при температуре 60 и 95 градусов Цельсия, Б: процесс экспонирования по футерованной маске на пластине, В: окончательная форма после воздействия проявителя и промывки изопропанолом, и D: окончательная форма чипа PDMS.

проводили стимуляцию геля и прикрепляли чип ПДМС к стеклу (**Рис. 1**).

АСМ-микроскопия. Топография, шероховатость поверхности, фазовое изображение, изображение трения, магнитные свойства и толщина монослоя анализируются с помощью АСМ-микроскопии. Чтобы исследовать изменения уровня чипа, а также высоты штифта и канала, чип промывали ацетоном и сушили при 60°C.

Экстракция экзосом на основе микрофлюидной технологии. В этой части исследования рассматривались три основных источника экзосом, включая сыворотку, мочу и супернатант клеточной культуры. Анти-CD63 (Abcam, Великобритания) конъюгировали с наночастицами Mag (Jiaquan Quantum Pickup Company, Ухань, Китай) с использованием традиционных методов. Общая связывающая способность наночастиц оценивалась примерно в 10 мкг антитела против CD63 на 1 мг наночастиц при использовании 1 мг/мл Mag-CD63. Образец, содержащий экзосому, смешивали с CD63-Mag и вводили в микрофлюидный чип через вход 1, а анти-CD63 (Abcam, Великобритания) повторно вводили через вход 2. Сдвоенным шприцевым насосом со скоростью потока 1-10 мкл/мин потоки смешивали в первом канале, в результате чего образовывался комплекс Mag-CD63-Exo. Иммуномагнитные частицы (CD63-Mag) удерживались в камере 1 с помощью магнитного диска. Затем из входа 3 вводили буфер PBS для промывки комплекса Exo-CD63-Mag. Затем его хранили в отсеке 2. Иммуноконъюгатные экзосомы собирали для исследования. Экзосомы

были выделены из сыворотки, мочи и клеточного супернатанта с использованием разработанного чипа, названного S-EXOChip, UE-EXOChip и SU-EXOChip соответственно. Кроме того, вход 4 определен для загрузки лекарственного средства, о чем будет сказано далее (**Рис. 2**).

Содержание белка в экзосомах. Содержание белка в экзосомах определяли методом Брэдфорда с использованием 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, CAS no., 9048-46-8) при длине волны 595 нм [20].

Анализ проточной цитометрии. Чтобы оценить точность экстракции экзосом, на экстрагированных образцах проводили проточно-цитометрический анализ антитела против CD63 (Padza Padtenrajoooh, cat#MM108,

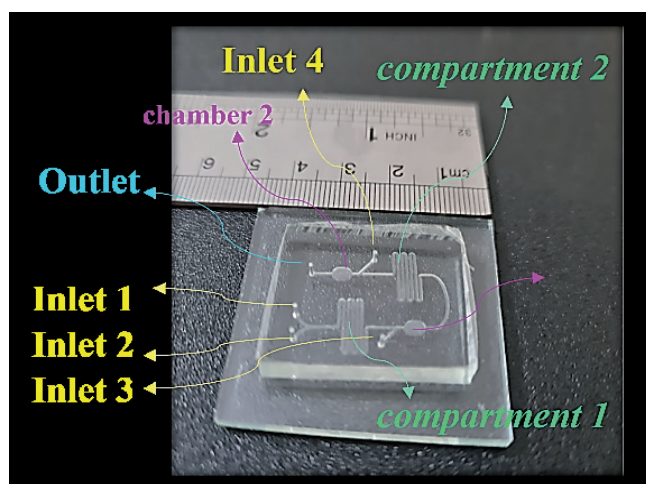


Рис. 2. Разнообразие входов, камер, каналов и выходов чипа. Таким образом, вход 1 и 2 – место инъекции суспензии, содержащей экзосому и специфический магнит, вход 3 – вход PBS, камера 1 – место, где смешивание останавливается этой ловушкой, а вход 4 – место загрузки иматиниба.

Иран) в соответствии с протоколами производителя. Вкратце, в пробирки, содержащие экзосомы, добавляли по 5 мг на тест, затем пробирки осторожно перемешивали и инкубировали в темноте в течение 60 минут при температуре 2-8°C. После этого промывали образцы, используя 1 мл разбавленного 1X буфера для анализа. Для сбора магнитных зерен микропробирки помещали в магнитную цепь, а затем центрифугировали со скоростью 3500×об/мин или при ней в течение 10 мин. Еще раз в пробирку добавляют 350 мкл аналитического буфера 1X и анализируют с помощью проточного цитометра (Millipore Merck, Германия).

Анализ размера и морфологии экзосом. Для измерения гидродинамического размера с помощью DLS-анализа 200 мкл экзосомального раствора экстрагированного клеточного супернатанта разводили 420 мкл отфильтрованного PBS. Затем образец помещали на лед и обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут. Наконец, образец был помещен в устройство DLS с лазерным лучом длиной 632 нм, и результаты были проанализированы с помощью программного обеспечения Zeta Sizer.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) использовалась для анализа размера и морфологии экзосом. Экзосомы покрывали с помощью сканирующего электронного микроскопа FEI Nova 200 Nanolab Dual-beam FIB при низкой энергии (2.0-5.0 кВ) в лаборатории анализа электронной микроскопии (МС2) путем напыления золота или углерода термическим испарением. Затем 200 мкл экстрагированных экзосом клеточного супернатанта выливали на предметное стекло и сушили в течение одного часа при комнатной температуре. Затем образец исследовали с помощью электронной микроскопии.

Вестерн-блоттинг. К обоим экстрагированным образцам добавляли лизирующий буфер объемом 50 мкл с 1% ингибитором протеазы Холта (ThermoFisher Scientific, LTD, США) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Затем образцы выдерживали на льду в течение 10 минут и центрифугировали при 13000×об/мин в течение 15 минут при

4°C. Наконец, образцы хранили при -80°C для дальнейшего анализа. Общий объем 20 мкл каждого образца анализировали с помощью 12% полиакриламидного геля с ДСН (SDWS-PAGE), используемого для разделения и определения молекулярной массы белков при интенсивности напряжения 80 мВ. После разделения белковых полос образца на геле SDS-PAGE в клеточном лизате был обнаружен CD81 как поверхностный мембраноспецифичный белок экзосомы. Для формирования кассеты иммуноблота загружают гель и нитроцеллюлозную бумагу в прибор для блоттинга (Biorad, США). Перенос белковых полос осуществляется в течение 90 мин при напряжении 100 мВ. После этого мембрану промывали в блокирующем буфере в течение 60 мин при 37°C. Наконец, образцы окрашивали антителами против CD81 (1:4000) в буфере TBS (1x), выливали на мембрану из ПВДФ и помещали в шейкер-инкубатор на 37 часов при 37°C. Затем его трижды промывали буфером TBS, каждый раз по 10 мин.

Экстракция экзосомальной РНК и уровни экспрессии микроРНК. Экстракцию РНК проводили с использованием набора Exosome RNA Isolation Kit (№ по каталогу 58000) компании Norgen в соответствии с протоколами производителя. Первоначально добавляли 300 мкл буфера для лизиса А и 37.5 мкл буфера для лизиса в качестве добавки к каждому изолированному образцу экзосомы, затем образцы смешивали встряхиванием в течение 10 секунд. После инкубации образцов при комнатной температуре в течение 10 минут к смеси добавляли 500 мкл 96% этанола и хорошо перемешивали с Vertex в течение 10 секунд. После этого 500 мкл смеси переносят в колонку Mini Spin и центрифугируют при 6000×об/мин в течение 1 мин. После повторения предыдущего этапа в колонку добавляют 600 мкл промывного раствора А и центрифугируют при 13000 об/мин в течение 30 секунд, а затем центрифугируют при 13000 об/мин в течение 1 минуты. Наконец, объем 50 мкл промывочного раствора А добавляют в колонку и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 1 минуты и хранят при -80°C для дальнейшего анализа.

Тотальные некодирующие РНК и малые РНК, такие как микроРНК, конвертировали в набор для экстракции кДНК (АВМ, товарный номер по каталогу G902). Образец микроРНК готовили путем смешивания 2 мкл 5X поли(А)-полимеразного реакционного буфера, 1.5 мкл АТФ (10 мМ), μ мкл $MnCl_2$ (25 мМ), 0.5 мкл поли (А)-полимеразы, дрожжей (1 мкг/мкл) и 2.5 мкл H_2O . Затем смесь инкубировали 30 мин при 37°C. Затем к оставшему материалу добавляли 2 мкл адаптера miRNA Oligo (dT) (10 мМ). Смесь инкубировали в течение 5 минут при 65°C с последующим охлаждением колотым льдом. Наконец, к вышеуказанной смеси добавляли 1 мкл dNTP (10 мМ), 4 мкл 5X RT-буфера, 1 мкл RTase (200 ед./мкл) и 2 мкл H_2O . Синтез кДНК осуществляли путем инкубации образцов в течение 15 мин при 42°C и 10 мин при 70°C. Содержание микроРНК в образцах из трех источников: мочи, сыворотки и клеточного супернатанта определяли с использованием набора miRCURY™ LNATM microRNA Array Ну3™/Ну5™ (Exiqon, Дания) по стандартным протоколам. Выделение экзосом с использованием набора для изоляции экзосом Norgen (№ по каталогу 58000) из трех источников: мочи, сыворотки и клеточного супернатанта. qRT-PCR выполняли для каждого образца в трех системах ПЦР в реальном времени, следуя инструкциям производителя и используя разные праймеры (Таблица 1). Готовили смесь из 7 мкл Exiqon PCR Mastermix, 0.5 мкл Panel Primer (5 пмоль/мкл), 3 мкл хвостовой кДНК и 3 мкл Enhancer, а также 4 мкл воды, обработанной DEPC. Относительная экспрессия микроРНК-155 оценивала метод с U6 в качестве домашнего контроля.

Таблица 1

Праймеры qRT-PCR, используемые для синтеза кДНК

Праймеры	Последовательности
МиР150-5п-Форвард	5'-TCCCAACCCTGTACCAGTGAA-3'
МиР150-5п-Реверс	Универсальный
МиР92-3п-Форвард	5'-CACTTGTCCGGCCTGTAA-3'
МиР92-3п-Реверс	Универсальный
МиР155-5п-Форвард	5'-TGСТААТСГТГАТAGGGGТААА-3'
МиР155-5п-Реверс	Универсальный
МиР3786-Форвард	5'-CTGGACTTGGAGGCAGAAAA-3'
МиР3786-Реверс	Универсальный

Загрузка лекарств. Для загрузки иматиниба используется модифицированный метод прямой инкубации препаратов и экзосом, захваченных CD63-Mag, с циклом замораживания-оттаивания для увеличения. Экзосомы инкубировали с иматинибом в различных концентрациях. 10 нМ иматиниба со скоростью введения 1 мкл/мин переносили на вход 4 чипов при 25°C в течение 20 мин. Затем в канал вводили папаин и трипсин в концентрациях 0.1 и 0.02% со скоростью потока 1 мкл/мин соответственно.

Выпуск лекарства. Высвобождение иматиниба изучали с использованием диализного мешка. 3 мкг экзосомы гомогенизировали в 3 мл буфера PBS, затем переносили в мешок для диализа и помещали в закрытый контейнер с 60 мл буфера PBS, pH = 7.4, и температуру стабилизировали на уровне 37°C. Содержание высвободившегося иматиниба рассчитывали при длине волны 242 нм с использованием УФ-видимой спектроскопии. Стандартную кривую строили с использованием 1, 2, 5, 10, 15, 20 и 25,30 мкг/мл в растворе PBS.

Клеточная токсичность. МТТ-анализ используется для оценки токсичности нагруженных иматинибом экзосом, захваченных CD63-Mag, против клеточной линии KYO-1. Клеточный метаболизм клеток определяли путем мониторинга активности ферментов митохондриальной дегидрогеназы с использованием метилтиазолтетразолия бромида (МТТ) в качестве субстрата. В связи с этим 10 000 клеток предварительно культивировали в 96-луночных планшетах и инкубировали в течение 24 ч при 37°C с 4% CO_2 и 90% влажности. Экзосомальные образцы имели разные концентрации, включая 2, 4, 8, 10, 20, 50, 100 мкг/мл, и обрабатывались в течение 24, 48 и 72 часов. После этого в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ (10 мкг/мл) и инкубировали в течение 4 ч в указанных выше условиях. Наконец, супернатант отбрасывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО, встряхивали круговыми движениями в течение 8 минут, а затем измеряли поглощение формазана при 490 нм с использованием считывателя ELISA. Процент жизнеспособности клеток

(IC50) исследовали с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 6.0 (США).

Статистический анализ. Статистические данные анализировали с помощью Prism 7.0 (GraphPad Software, США). Значимость количества РНК и проверки qRT-PCR микроРНК среди экзосом оценивали с помощью одного прямого Т-теста. Статистически значимым считалось $p < 0.05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании мы использовали микрофлюидную систему для захвата магнитных шариков, конъюгированных с CD63, для высокоэффективного разделения экзосом. Пресс-форма для чипов из полидиметилсилоксана (ПДМС) изготавливается из узорчатой кремниевой пластины SU-8 100 с использованием стандартной техники мягкой литографии с функцией иммуноаффинности (Рис. 1 и 3). На Рис. 2 показано разнообразие входов, камер, каналов и выходов чипа.

Изображения, полученные с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ), показали поверхность чипа. На Рис. 4 показано двумерное (2D) и трехмерное (3D) изображения поверхности SU-8 100. После экстракции экзосом с помощью CD68-Mag физико-химические свойства экстрагированных экзосом исследовали с использованием DLS, SEM, проточной цитометрии, Брэдфорда, qRT-PCR и вестерн-блоттинга. В связи с этим образцы экзосом исследовали методом проточной цитометрии в присутствии и отсутствии фермента протеазы

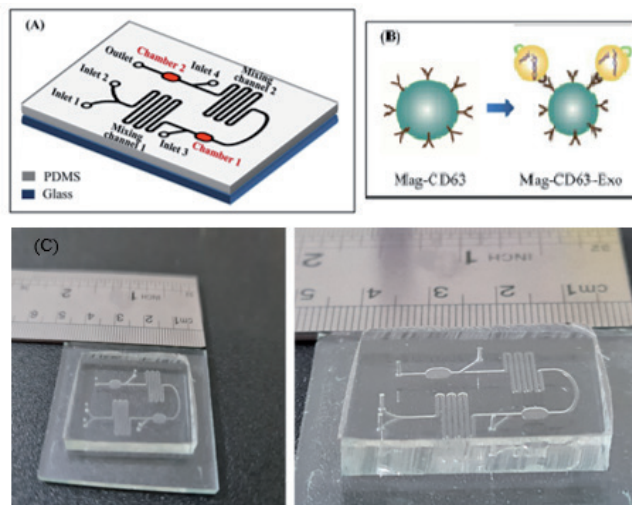


Рис. 3. Схематическая иллюстрация (А) и (С) микрофлюидного чипа и (В) принципов разделения экзосом на основе иммуноаффинности.

(Рис. 5А-Д). Гидродинамический размер экстрагированной экзосомы из различных биологических источников оценивали с использованием как коммерчески доступного набора, так и чипа SU-8 100. На Рис 5Е показано гидродинамическое распределение экзосом по размерам, извлеченных с помощью DLS-анализа, который позволил оценить большую часть популяции в пределах среднего диаметра 135 нм. Изображение анализа SEM показано на Рис 5F. Как можно видеть, удалось обнаружить экзосомы сферической формы диаметром от 30 до 175 нм. Сравнительное исследование клеточного супернатанта и содержания белков экзосом, полученных из мочи, с использованием методов чипа и набора с полуколичественным

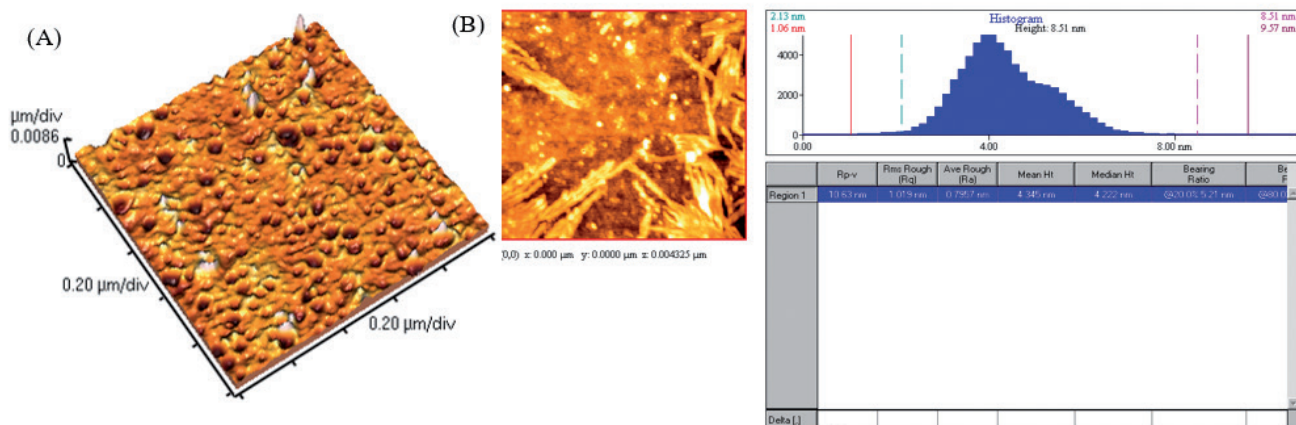


Рис. 4. 3D-изображения (А) и 2D-изображения (В) поверхности чипа SU-8 100.

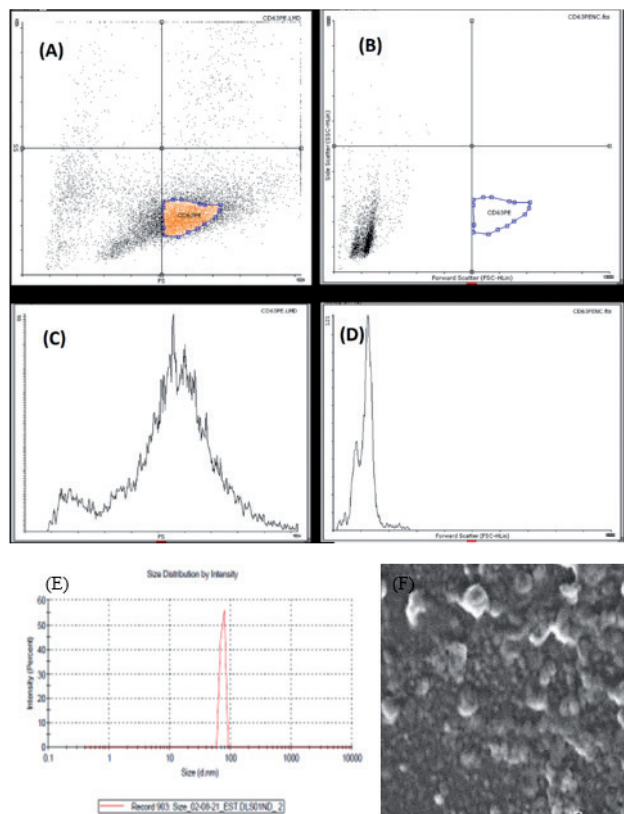


Рис. 5. (А) Анализ методом проточной цитометрии образца, экстрагированного чипом, против антитела CD68-PE. (В) Чип экстрагировал образец в присутствии ферментов протеаз. (С) Гистограмма образца, извлеченного из чипа. (D) Гистограмма образца, извлеченного из чипа, в присутствии ферментов протеазы. (Е) Гистограмма DLS изолятов экзосом. (F) СЭМ – изображения извлеченных экзосом.

методом Брэдфорда представлено на **Рис. 6**. Содержание белка в сыворотке и клеточном супернатанте существенно не изменилось при использовании обоих методов. В случае экзосом, экстрагированных мочой, хотя содержание коммерчески доступного белка было значительно выше, белки из экзосом,

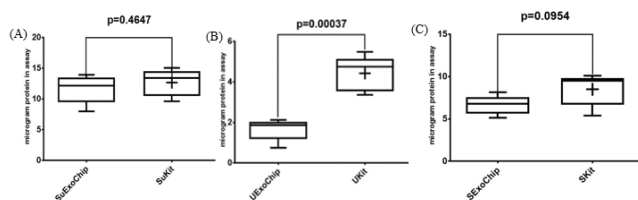


Рис. 6. Содержание белка в (А) клеточном супернатанте, (В) экзосомах мочи и (С) сыворотке с использованием коммерчески доступного набора чипов SU-8 100 от Bradford.

экстрагированных с помощью чипа, были более гомогенными.

Исследование профиля экспрессии экзосомных микроРНК. После того, как экстракция РНК была проведена в условиях, свободных от РНКазы, был проведен электрофорез в агарозном геле, чтобы подтвердить здоровье РНК и их качество. При исследовании в геле наличие рибосомальных полос S28, S18 и S5 указывает на отсутствие деградации РНК. Кроме того, размытие, наблюдаемое между этими двумя полосами, указывает на присутствие мРНК (**Рис. 7А**). На диаграмме ниже показана ось Y, показывающая экспрессию микроРНК на основе ее эталонного гена U6, а горизонтальная ось показывает происхождение образцов экзосом,

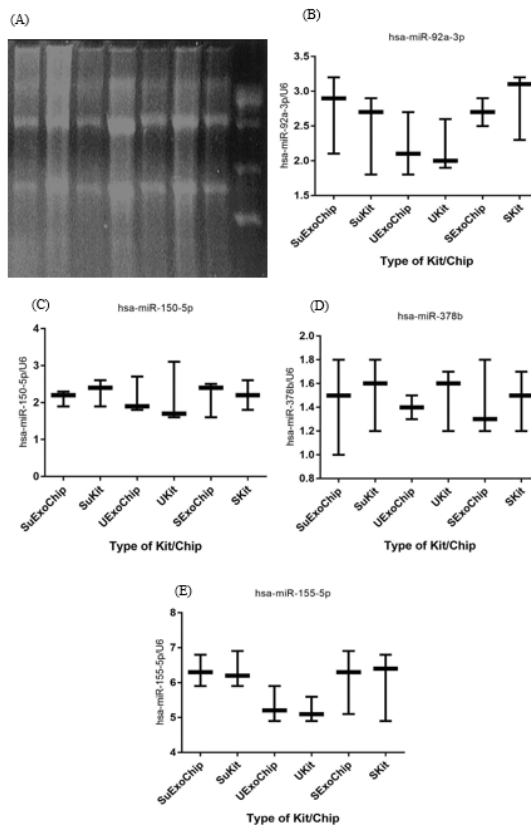


Рис. 7. (А) Качество экстракции РНК из образцов экзосом сыворотки, мочи и клеточного супернатанта с использованием электрофореза в 2% агарозном геле. Относительная экспрессия (В) миР-92а-3р, (С) миР-150-5р, (D) миР-378 и (Е) миР-155-5р в образцах экзосом сыворотки, мочи и клеточного супернатанта с использованием Микросхемы SU-8 100 и имеющегося в продаже комплекта. Изменения значимости, связанные с содержанием РНК в эксперименте, анализировали с использованием непарного t-критерия с порогом $P < 0.05$.

Таблица 2

Статистический анализ кратности экспрессии образцов сыворотки, мочи и клеточного супернатанта с использованием чипа SU-8 100 и коммерчески доступного набора выявил значимый характер гена миР-155 с использованием непарного Т-теста

	Источник жидкости	Чип СУ-8 100	Коммерчески доступный комплект	Величины
миР-92а	Экзосома клеточного супернатанта	Кратное изменение		1.68
		р-значение		0.6018
		Т		0.5657
		df		4
		Значение		Нет
	Сыворотка	Кратное изменение		1.39
		р-значение		0.6164
		Т		0.5423
		df		4
		Значение		Нет
	Моча	Кратное изменение		1.79
		р-значение		0.9274
		Т		0.09713
		df		4
		Значение		Нет
миР-150	Экзосома клеточного супернатанта	Кратное изменение		1.66
		р-значение		0.5263
		Т		0.6934
		df		4
		Значение		Нет
	Сыворотка	Кратное изменение		1.96
		р-значение		0.9319
		Т		0.09091
		df		4
		Значение		Нет

извлеченных с помощью коммерческого набора и чипа, разработанных в этом исследовании. Согласно Рис. 7В-Е и Таблице 2, существенных относительных различий в микроРНК не наблюдалось. Это указывает на то, что разработанный чип смог изолировать ее, не повреждая содержимое нуклеиновой кислоты экзосомы.

Выпуск иматиниба. Поскольку сохранение структуры носителя лекарственного средства, такой как экзосома, очень эффективно при высвобождении лекарственного средства, высвобождение иматиниба из экстрагированных экзосом исследовали с использованием обеих захваченных иматинибом CD63-Mag экзосом с чипом. На Рис. 6А показан пик адсорбции

раствора иматиниба в PBS. Как видно, пик максимального поглощения иматиниба расположен при 242 ± 1 нм. Калибровочная кривая с $R^2 = 0.994$ была представлена для оценки скорости высвобождения лекарственного средства (Рис. 8).

Оценка клеточной токсичности. Было проведено сравнительное исследование выживаемости клеточной линии KYO-1 свободного иматиниба, нагруженной иматинибом экзосомы, захваченной CD63-Mag, с чипом и коммерчески доступным набором. Согласно Рис. 9А-С, результаты указывают на дозозависимую токсичность свободного иматиниба, нагруженной иматинибом CD63-Mag-захваченной экзосомы с чипом и доступными наборами на клетках KYO-1. Кроме того, при обработке клеток экстрагированной экзосомой с использованием коммерческого набора эффективная доза была изменена до 100 мкмоль, но примечательно, что это связано с сохранением чипом структуры и морфологии экстрагированной экзосомы с течением времени. Эффективная доза была эквивалентна воздействию иматиниба непосредственно на клетки.

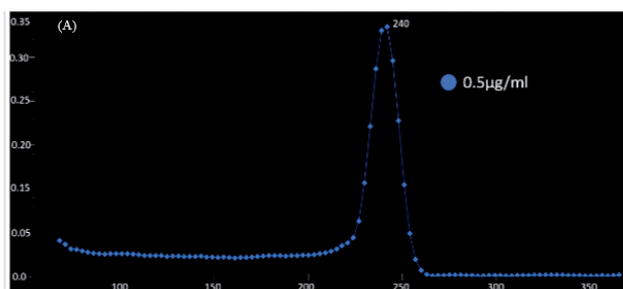


Рис. 8. (А) УФ-видимые спектры загруженной иматинибом CD63-Mag, захваченной экзосомы с чипом. (В) Линейное уравнение иматиниба в растворе PBS.

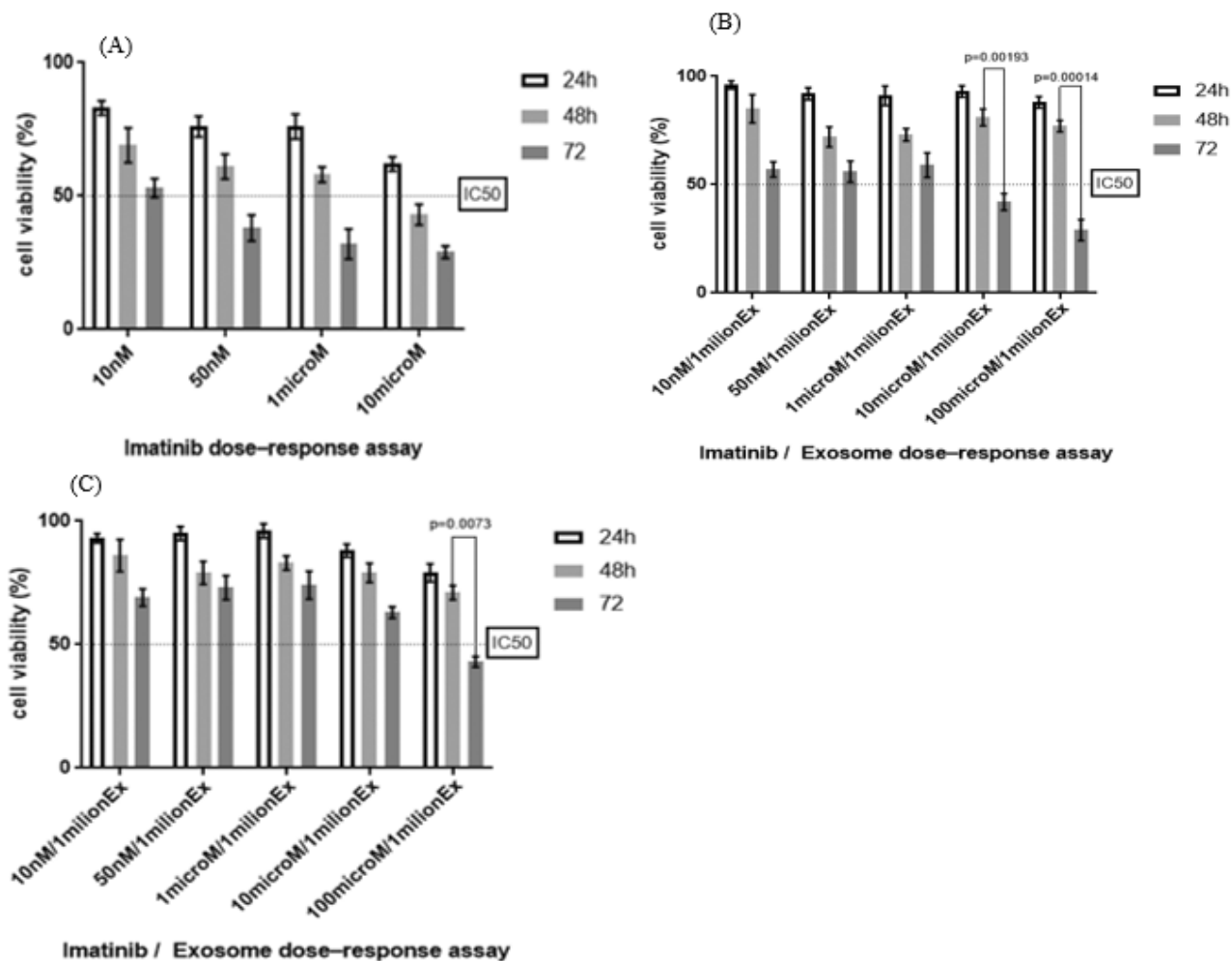


Рис. 9. Жизнеспособность клеток через 24, 48 и 72 часа инкубации при обработке клеток (A) свободным иматинибом, (B) загруженной иматинибом экзосомой, захваченной CD63-Mag, с помощью чипа и (C) экзосомой, загруженной иматинибом, с использованием коммерчески доступного набора.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее десятилетие растет интерес к роли экзосом, таких как жидкостная биопсия, в обнаружении биомаркеров рака. Эти исследования подчеркнули острую необходимость в новых технологиях для быстрого и точного разделения экзосом в жидкостях организма с минимальными этапами подготовки проб [21-25]. Подверженность экзосом загрязнению и механическим повреждениям приводит к серьезным проблемам с чистотой и сохранением работоспособности. Экстракция экзосом на основе микрофлюидной технологии улучшает методы многих более ранних методов, во многих аспектах, включая изоляцию, молекулярный анализ и обнаружение. С помощью микрофлюидной технологии

были получены высокопроизводительные анализы экзосом до 100 мкл/мин с пределами обнаружения около 50 экзосом/мкл [3,26,27].

С развитием исследований экзосом стало признанным, что экзосомы тесно связаны со многими физиологическими действиями, а также с возникновением и развитием заболеваний. Поэтому выделение и анализ экзосом очень важны для исследований и приложений, связанных с экзосомами [14,28-30]. Однако традиционные методы выделения экзосом имеют множество ограничений, таких как дорогие инструменты и реагенты, а также значительные затраты времени. По сравнению с традиционными методами микрофлюидная технология имеет преимущества высокой эффективности и высокой чувствительности при разделении экзосом. В последние годы,

благодаря быстрому развитию технологий и расширению исследований, микрофлюидная технология позволила эффективно разделять, обогащать и обнаруживать множественную информацию экзосом, интегрированную в один чип. Это указывает на то, что микрофлюидные чипы имеют большой потенциал в клинических исследованиях, таких как тестирование на месте оказания медицинской помощи [6,13,14,17,28-30].

Аналогично этому исследованию было проведено использование анти-CD9 иммуноаффинных магнитных шариков с использованием конъюгатов стрептавидин-биотин на образцах плазмы с высокой эффективностью разделения и повышенной чувствительностью. Кроме того, протоколы на основе гранул не накладывают ограничений на размер выборки. В другом исследовании магнитные шарики, конъюгированные с анти-CD9, анти-CD81 и коктейлем антител, были использованы для иммуноаффинной изоляции, что обеспечило примерно в три раза больший выход, чем традиционные методы. Кроме того, Tim4, который специфически связывается с фосфатидилсерином, расположенным на поверхности экзосомных клеток, показал меньшую контаминацию, чем те, которые были получены с использованием традиционных методов [31-33].

Микрофлюидные устройства были внедрены для улучшения методов обнаружения и изоляции путем облегчения иммунологического разделения, скрининга и захвата экзосом. Это делает их очень привлекательными объектами для обнаружения и анализа заболеваний. Как показал ряд исследований, специфические белки и нуклеиновые кислоты – «груз» экзосом – могут быть важным источником биомаркеров, полученных из биожидкостей [34-37]. Анализ РНК экзосом из образцов жидкой биопсии может дополнить информацию классического анализа ДНК, прояснить конкретные процессы и, в конечном итоге, проложить путь к персонализированной медицине. Учитывая такие аспекты, жидкая биопсия с использованием микрофлюидных систем также

может стать важной стратегией в разработке персонализированной таргетной терапии и мониторинга заболевания [38]. Основная сфера исследований микрофлюидных устройств будет заключаться в том, как преодолеть проблемы, возникающие на пути к клинической трансляции и клиническому применению экзосом в качестве источников биомаркеров [39]. Различные новые микрофлюидные платформы LOC стремятся повысить чувствительность процесса выделения и еще больше облегчить анализ *in situ*. Это соответствует современной тенденции и спросу на реализацию «умных» систем с повышенной функциональностью и удобством использования даже неспециалистами в области ПОКТ [23]. Более того, реализация, стандартизация и использование такого современного оборудования может стать первым шагом на пути к персонализированному здравоохранению. Это также может приблизить более отдаленную цель — создание машины для целостного разделения и анализа всех компонентов жидкой биопсии, чтобы обеспечить высокоэффективную прогностическую медицину для действительно персонализированной диагностики и лечения [23]. Чтобы проложить путь к широкому признанию такого оборудования практикующими врачами во всем мире, необходимо также преодолеть сложность и трудность клинических испытаний и валидации. Более того, главной задачей клиники является совершенствование технологии, увеличение динамического диапазона платформ и производство экономически эффективных, специфичных и чувствительных устройств для персонализированной медицины [4,8,17].

В частности, захват частиц на основе иммуноаффинности — это высокоспецифичный способ разделения экзосом, который можно интегрировать в микрофлюидные платформы. В нескольких исследованиях было проведено использование магнитных шариков, конъюгированных с антителами, для разделения экзосом. Магнитные шарики, конъюгированные с CD9, разных размеров были протестированы на разделение плазменных экзосом с

использованием внешней силы для движения магнитных шариков с эффективностью в 10-15 раз выше, чем при использовании ультрацентрифуг [27]. Они обнаружили, что инкубация магнитных шариков, конъюгированных с антителами, с растворами, содержащими экзосомы, обеспечивает лучшие условия для взаимодействия между везикулами и лигандами на шариках. Кроме того, протоколы на основе гранул не накладывают ограничений на размер выборки. Также микрофлюидное устройство на основе иммуноаффинной хроматографии (CD63) использовалось для экзосом плазмы больных раком поджелудочной железы. Разделение основано на рецепторах с дополнительным входом для добавления лизирующего буфера для прямой экстракции РНК и белка из экзосом. Другой подход к разработке микрофлюидного устройства был реализован с использованием входного канала для маркировки экзосом флуоресцентным красителем для количественного определения экзосом на чипе. В этом исследовании микрофлюидное устройство было представлено в качестве платформы для разделения экзосом на чипе и флуоресцентного анализа для быстрого количественного определения экзосом. Другие микрожидкости, содержащие методы фотолитографии, основанные на микроразмерных участках оксида графена (GO)/полидофамин (PDA), покрытых белком G, были исследованы для разделения экзосом рака яичников. Разработанная система имеет потенциал использования экзосом для диагностики и прогноза [27].

Химиотерапия может уменьшить объем опухоли или вызвать кратковременную ремиссию. Однако со временем раковые клетки стали устойчивы к химиотерапии. Лекарственная устойчивость остается препятствием на пути к излечению больных раком. Экзосомы, полученные из МСК, можно модифицировать и применять в терапии рака и повышении химиочувствительности раковых клеток. Например, miP-302a из экзосом hucMSC подавляла рост и миграцию раковых клеток. В другом исследовании экзосомы, полученные из hucMSC, повышали чувствительность клеток

K562 к IM. Здесь снижение уровня miP-146a-5p у пациентов с ХМЛ, особенно у пациентов с резистентностью к IM, предполагает дополнительную роль в приобретении резистентности к IM. ХМЛ представляет собой миелоидное новообразование, вызванное слитым геном BCR-ABL, который вызывает нарушение регуляции клеточной пролиферации и устойчивость к апоптозу за счет вмешательства в нижестоящие сигнальные пути. Недавно сообщалось, что уровни miP-150 отрицательно коррелируют с уровнем транскрипта BCR-ABL и значительно повышаются после снижения активности тирозинкиназы BCR-ABL. Уровни экспрессии miP-31, miP-155 и miP-564 также снижались при ХМЛ и подвергались влиянию активности BCR-ABL [7,40-42].

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы разработали простой микрофлюидный подход, основанный на иммуноаффинности, для разделения экзосом по емкости лекарственного средства. Разработанная система способна изолировать экзосомы с высокой чувствительностью, высокой скоростью извлечения и чистотой, а также с небольшим требуемым объемом и высокоскоростной процедурой экстракции. Чип можно масштабировать для высокопроизводительной изоляции экзосом с возможностью загрузки лекарств для клинического использования. Следовательно, эта платформа должна стать полезным инструментом в клинических приложениях для персонализированной медицины и в качестве персональных диагностических устройств в будущем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernardi S, Farina M. Exosomes and Extracellular Vesicles in Myeloid Neoplasia: The Multiple and Complex Roles Played by These "Magic Bullets". *Biology* (Basel) 2021, 10(2).
2. Bernardi S, Foroni C, Zanaglio C, Re F, Polverelli N, Turra A, Morello E, Farina M, Cattina F, Gandolfi L et al. Feasibility of tumor-derived exosome enrichment in the onco-hematology

- leukemic model of chronic myeloid leukemia. *Int J Mol Med*, 2019, 44(6):2133-2144.
3. Gamage SST, Pahattuge TN, Wijerathne H, Childers K, Vaidyanathan S, Athapattu US, Zhang L, Zhao Z, Hupert ML, Muller RM et al. Microfluidic affinity selection of active SARS-CoV-2 virus particles. *Sci Adv*, 2022, 8(39):eabn9665.
 4. Li Y, Cai T, Liu H, Liu J, Chen SY, Fan H. Exosome-shuttled miR-126 mediates ethanol-induced disruption of neural crest cell-placode cell interaction by targeting SDF1. *Toxicol Sci*, 2023, 195(2):184-201.
 5. Jafarzadeh N, Gholampour MA, Alivand MR, Kavousi S, Arzi L, Rad F, Sadeghizadeh M, Pornour M. CML derived exosomes promote tumor favorable functional performance in T cells. *BMC Cancer*, 2021, 21(1):1002.
 6. Kang KW, Jung JH, Hur W, Park J, Shin H, Choi B, Jeong H, Kim DS, Yu ES, Lee SR et al. The Potential of Exosomes Derived from Chronic Myelogenous Leukaemia Cells as a Biomarker. *Anticancer Res*, 2018, 38(7):3935-3942.
 7. Keramati F, Jafarian A, Soltani A, Javandoost E, Mollaei M, Fallah P. Circulating miRNAs can serve as potential diagnostic biomarkers in chronic myelogenous leukemia patients. *Leuk Res Rep*, 2021, 16:100257.
 8. Lan X, Yu R, Xu J, Jiang X. Exosomes from chondrocytes overexpressing miR-214-3p facilitate M2 macrophage polarization and angiogenesis to relieve Legg Calve-Perthes disease. *Cytokine*, 2023, 168:156233.
 9. Li MY, Zhao C, Chen L, Yao FY, Zhong FM, Chen Y, Xu S, Jiang JY, Yang YL, Min QH et al. Quantitative Proteomic Analysis of Plasma Exosomes to Identify the Candidate Biomarker of Imatinib Resistance in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Front Oncol*, 2021, 11:779567.
 10. Li P, Chen J, Chen Y, Song S, Huang X, Yang Y, Li Y, Tong Y, Xie Y, Li J et al. Construction of Exosome SORL1 Detection Platform Based on 3D Porous Microfluidic Chip and its Application in Early Diagnosis of Colorectal Cancer. *Small*, 2023, 19(20):e2207381.
 11. Li Y, Xu M, Zhu Z, Xu F, Chen B. Transendothelial electrical resistance measurement by a microfluidic device for functional study of endothelial barriers in inflammatory bowel disease. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:1236610.
 12. Lu RXZ, Rafatian N, Zhao Y, Wagner KT, Beroncal EL, Li B, Lee C, Chen J, Churcher E, Vosoughi D et al. Heart-on-a-chip model of immune-induced cardiac dysfunction reveals the role of free mitochondrial DNA and therapeutic effects of endothelial exosomes. *bioRxiv*, 2023.
 13. Pattabiraman PP, Feinstein V, Beit-Yannai E. Profiling the miRNA from Exosomes of Non-Pigmented Ciliary Epithelium-Derived Identifies Key Gene Targets Relevant to Primary Open-Angle Glaucoma. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(2).
 14. Han Z, Peng X, Yang Y, Yi J, Zhao D, Bao Q, Long S, Yu SX, Xu XX, Liu B et al. Integrated microfluidic-SERS for exosome biomarker profiling and osteosarcoma diagnosis. *Biosens Bioelectron*, 2022, 217:114709.
 15. Hu M, Brown V, Jackson JM, Wijerathne H, Pathak H, Koestler DC, Nissen E, Hupert ML, Muller R, Godwin AK et al. Assessing Breast Cancer Molecular Subtypes Using Extracellular Vesicles' mRNA. *Anal Chem*, 2023, 95(19):7665-7675.
 16. Jafarzadeh N, Safari Z, Pornour M, Amirizadeh N, Forouzandeh Moghadam M, Sadeghizadeh M. Alteration of cellular and immune-related properties of bone marrow mesenchymal stem cells and macrophages by K562 chronic myeloid leukemia cell derived exosomes. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4):3697-3710.
 17. Lin S, Zhu B. Exosome-transmitted FOSL1 from cancer-associated fibroblasts drives colorectal cancer stemness and chemo-resistance through transcriptionally activating ITGB4. *Mol Cell Biochem*, 2023.
 18. Mineo M, Garfield SH, Taverna S, Flugy A, De Leo G, Alessandro R, Kohn EC. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis*, 2012, 15(1):33-45.

19. Wan Z, Chen X, Gao X, Dong Y, Zhao Y, Wei M, Fan W, Yang G, Liu L. Chronic myeloid leukemia-derived exosomes attenuate adipogenesis of adipose derived mesenchymal stem cells via transporting miR-92a-3p. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):21274-21283.
20. Ninfa AJ, Ballou DP, Benore M. *Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology*. John Wiley & Sons, 2009.
21. Patterson SD, Copland M. The Bone Marrow Immune Microenvironment in CML: Treatment Responses, Treatment-Free Remission, and Therapeutic Vulnerabilities. *Curr Hematol Malign Rep*, 2023, 18(2):19-32.
22. Song F, Wang C, Wang C, Wang J, Wu Y, Wang Y, Liu H, Zhang Y, Han L. Multi-Phenotypic Exosome Secretion Profiling Microfluidic Platform for Exploring Single-Cell Heterogeneity. *Small Methods*, 2022, 6(9):e2200717.
23. Surappa S, Multani P, Parlatan U, Sinawang PD, Kaifi J, Akin D, Demirci U. Integrated "lab-on-a-chip" microfluidic systems for isolation, enrichment, and analysis of cancer biomarkers. *Lab Chip*, 2023, 23(13):2942-2958.
24. Taverna S, Amodeo V, Saieva L, Russo A, Giallombardo M, De Leo G, Alessandro R. Exosomal shuttling of miR-126 in endothelial cells modulates adhesive and migratory abilities of chronic myelogenous leukemia cells. *Mol Cancer*, 2014, 13:169.
25. Wang QS, Xiao RJ, Peng J, Yu ZT, Fu JQ, Xia Y. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal KLF4 Alleviated Ischemic Stroke Through Inhibiting N6-Methyladenosine Modification Level of Drp1 by Targeting lncRNA-ZFAS1. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(7):3945-3962.
26. Corrado C, Raimondo S, Saieva L, Flugy AM, De Leo G, Alessandro R. Exosome-mediated crosstalk between chronic myelogenous leukemia cells and human bone marrow stromal cells triggers an interleukin 8-dependent survival of leukemia cells. *Cancer Lett*, 2014, 348(1-2):71-76.
27. Fonseca-Benitez A, Romero-Sanchez C, Lara SJP. A Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids on Porous Membranes: Simulation vs. Experiment. *Micromachines* (Basel), 2022, 13(12).
28. Giallongo C, Parrinello NL, La Cava P, Camiolo G, Romano A, Scalia M, Stagno F, Palumbo GA, Avola R, Li Volti G et al. Monocytic myeloid-derived suppressor cells as prognostic factor in chronic myeloid leukaemia patients treated with dasatinib. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(2):1070-1080.
29. He L, Chen Y, Lin S, Shen R, Pan H, Zhou Y, Wang Y, Chen S, Ding J. Regulation of Hsa-miR-4639-5p expression and its potential role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Aging Cell*, 2023, 22(6):e13840.
30. Hrdinova T, Toman O, Dresler J, Klimentova J, Salovska B, Pajer P, Bartos O, Polivkova V, Linhartova J, Machova Polakova K et al. Exosomes released by imatinib-resistant K562 cells contain specific membrane markers, IFITM3, CD146 and CD36 and increase the survival of imatinib-sensitive cells in the presence of imatinib. *Int J Oncol*, 2021, 58(2):238-250.
31. Shi C, Pei S, Ding Y, Tao C, Zhu Y, Peng Y, Li W, Yi Y. Exosomes with overexpressed miR 147a suppress angiogenesis and inflammatory injury in an experimental model of atopic dermatitis. *Sci Rep*, 2023, 13(1):8904.
32. Wang M, Zhang Z, Li G, Jing A. Room-Temperature Self-Healing Conductive Elastomers for Modular Assembly as a Microfluidic Electrochemical Biosensing Platform for the Detection of Colorectal Cancer Exosomes. *Micromachines* (Basel), 2023, 14(3).
33. Wang M, Zhao H, Chen W, Bie C, Yang J, Cai W, Wu C, Chen Y, Feng S, Shi Y et al. The SMAD2/miR-4256/HDAC5/p16(INK4a) signaling axis contributes to gastric cancer progression. *Oncol Res*, 2023, 31(4):515-541.
34. Yu H, Wu Y, Zhang B, Xiong M, Yi Y, Zhang Q, Wu M: Exosomes Derived from E2F1(-/-) Adipose-Derived Stem Cells Promote Skin Wound Healing via miR-130b-5p/TGFB3 Axis. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18:6275-6292.
35. Yu Z, Tang H, Chen S, Xie Y, Shi L, Xia S, Jiang M, Li J, Chen D. Exosomal LOC85009 inhibits

- docetaxel resistance in lung adenocarcinoma through regulating ATG5-induced autophagy. *Drug Resist Updat*, 2023, 67:100915.
36. Zhang B, Sun C, Liu Y, Bai F, Tu T, Liu Q. Exosomal miR-27b-3p Derived from Hypoxic Cardiac Microvascular Endothelial Cells Alleviates Rat Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibiting Oxidative Stress-Induced Pyroptosis via Foxo1/GSDMD Signaling. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:8215842.
37. Zhang X, Wang C, Huang C, Yang J, Wang J. Doxorubicin resistance in breast cancer xenografts and cell lines can be counterweighted by microRNA-140-3p, through PD-L1 suppression. *Histol Histopathol*, 2023, 38(10):1193-1204.
38. Zhong AN, Yin Y, Tang BJ, Chen L, Shen HW, Tan ZP, Li WQ, He Q, Sun B, Zhu Y et al. CircRNA Microarray Profiling Reveals hsa_circ_0058493 as a Novel Biomarker for Imatinib-Resistant CML. *Front Pharmacol*, 2021, 12:728916.
39. Wang Y, Wang S, Chen A, Wang R, Li L, Fang X. Efficient exosome subpopulation isolation and proteomic profiling using a Sub-ExoProfile chip towards cancer diagnosis and treatment. *Analyst*, 2022, 147(19):4237-4248.
40. Cetin Z, Ilker Saygili E, Yilmaz M. Crosstalk between CML cells with HUVECS and BMSCs through CML derived exosomes. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26(3):444-467.
41. Chinnappan R, Ramadan Q, Zourob M. An integrated lab-on-a-chip platform for pre-concentration and detection of colorectal cancer exosomes using anti-CD63 aptamer as a recognition element. *Biosens Bioelectron*, 2023, 220:114856.
42. Edlinger L, Berger-Becvar A, Menzl I, Hoermann G, Greiner G, Grundschober E, Bago-Horvath Z, Al-Zoughbi W, Hoefler G, Brostjan C et al. Expansion of BCR/ABL1(+) cells requires PAK2 but not PAK1. *Br J Haematol*, 2017, 179(2):229-241.
- Амир Монфаредан**
PhD
Тегеранский университет медицинских наук
Тегеран, Иран
E-mail: monfaredanamir@gmail.com
- Фахер Рахим**
PhD
Университет Джихан-Сулеймания
Курдистан, Ирак
E-mail: rahim.fakher@sulicihan.edu.krd
- Кожобеков Кудайберди Гапаралиевич**
д.ф.-м.н.
Ошский государственный университет
331, ул. Ленина, Ош 723500, Кыргызстан
E-mail: kudayberdi.kozhobekov@oshsu.kg
- Голамреза Тавусидана**
PhD
Тегеранский университет медицинских наук
Тегеран, Иран
E-mail: g-tavoosi@tums.ac.ir
- Мохаммад Хоссейн Модарресси**
PhD
Тегеранский университет медицинских наук
Тегеран, Иран
E-mail: modaresi@sina.tums.ac.ir
- Алавиесадат Хоссейнинасаб**
PhD
Компания GeneDia Life science
Тегеран, Иран
E-mail: hrzd.hsni@gmail.com
- Али-Акбар Агаджани-Афрузи**
PhD
Университет Пайаме Нур
Тегеран, Иран
E-mail: aghajani3@gmail.com
- Махди Шафи Сабет**
PhD
Тегеранский университет медицинских наук
Тегеран, Иран
E-mail: mshafiees@sina.tums.ac.ir
- Элахе Мотевасели**
PhD
Тегеранский университет медицинских наук
Тегеран, Иран
E-mail: e_motevaseli@tums.ac.ir