

Užląstelių vezikulių išskyrimo iš kraujo plazmos metodų literatūros apžvalga ir metaanalizė

Ugnė Šarachovaitė, Linas Černiauskas, Goda Aleknavičiūtė, Dovilė Karčiauskaitė

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University

El. paštas: ugne.sarachovaitė@mf.vu.lt

Santrauka

Darbo tikslas. Įvertinti užląstelių vezikulių koncentracijos priklausomybę nuo išskyrimui naudotų metodų ir sąlygų.

Tyrimo metodai. Metaanalizė buvo atlikta vadovaujantis PRISMA rekomenduojamomis gairėmis. Mokslinių tyrimų paieška atlikta *PubMed*, *Web of Science* ir *Cochrane Library* duomenų bazėse naudojant ieškomiesiems straipsniams reikšmingus raktažodžius. Į metaanalizę įtrauktos publikacijos remiantis atrankos ir atmetimo kriterijais. Metaanalizėje buvo naudoti atsitiktinio efekto dydžio modeliai,

kurių rezultatai pateikti „miško“ (angl. *Forest*) grafikais, taip pat šališkumui įvertinti naudotas „piltuvo“ (angl. *Funnel*) grafikas ir *Egger* testas. Jautrumas įvertintas vieno tyrimo pašalinimo metodu. Statistinė analizė atlikta naudojant R ir RStudio programinę įrangą.

Rezultatai. Įvertinus tyrimus buvo gautas didelis heterogeniškumas, šališkumas nebuvo aptiktas, o jautrumo testas parodė, jog analizė nėra jautri pavieniams tyrimams. Atsitiktinių efektų modelio apskaičiuotas bendras efekto dydis buvo teigiamas – 0,48 su 95 % pasikliautinoju intervalu [0,30; 0,65]. Pogrupių analizė parodė, jog didžiausią įtaką užląstelių vezikulių koncentracijos įverčiams turėjo pasirinktas išskyrimo metodas, mėgintuvėlio priedas etilendiamintetra-acto rūgštis (EDTA) ir mėginių laikymo sąlygos –80 °C.

Išvados. Atlikta metaanalizė ir rezultatų interpretacija parodė, jog yra teigiamas bendras efektas tarp skirtingų tyrimų, o didžiausią įtaką užląstelių vezikulių koncentracijos įverčiams turi pasirinktas išskyrimo metodas.

Reikšminiai žodžiai: dalelės, izoliavimas, ultracentrifugavimas, dydžio išskyrimo chromatografija, koncentracija.

ĮVADAS

Užląstelinės vezikulės (UV) yra iš ląstelių išskiriamos ir fosfolipidiniu dvisluoksniu apgaubtos dalelės. Manoma, jog šios vezikulės yra alternatyvios ląstelių komunikacijos tarpininkės, pernešančios įvairias molekules, pavyzdžiui, citokinus, uždegimo mediatorius, mikroribonukleino rūgštis (miRNR). UV yra svarbios palaikant homeostazę, indukuojant ir (arba) slopinant uždegimą ir skatinant reparaciją. Paskutiniu metu UV tyrimai sulaukia vis daugiau mokslininkų dėmesio dėl jų reikšmės fiziologiniuose ir patologiniuose procesuose, tokiuose kaip imuninis atsakas, audinių regeneracija, širdies ir kraujagyslių bei metabolinės ligos. Vis dažniau UV yra tiriamos kaip potencialūs neinvaziniai biožymenys, nes jų yra visuose organizmo skysčiuose.

Siekiant kuo tiksliau įvertinti UV sudėtį, jų koncentraciją bei funkciją, pirmiausia būtina jas patikimai išskirti iš biologinių mėginių (kraujo, plazmos, šlapimo ar kitų skysčių). Tačiau tai yra didelis iššūkis – skirtingi metodai, tokie kaip ultracentrifugavimas, dydžio išskyrimo chromatografija, polimerinės precipituojančios medžiagos ar komerciniai rinkiniai, pasižymi skirtingu išskyrimo grynumu, selektyvumu, išeiga. Taip pat preanalizinių veiksmų standartizacijos trūkumas lemia rezultatų variaciją. Būtent šie aspektai sunkina tyrimų duomenų palyginimą ir riboja pažangą siekiant UV klinikinio pritaikymo.

Būtent dėl to yra labai aktualu ir reikšminga sistemingai vertinti UV išskyrimo metodus taikant metaanalizės principus. Apibendrinus ir statistškai išanalizavus įvairių tyrimų duomenis apie UV koncentracijas, galima objektyviau įvertinti, kokie veiksniai – įskaitant izoliacijos metodą, mėgintuvėlių priedus, laikymo sąlygas, tiriamųjų imčių charakteristikas – daro reikšmingą įtaką galutiniam rezultatui. Metaanalizė ne tik padeda pasirinkti tinkamiausią UV išskyrimo metodą konkrečiam tyrimui, bet ir prisideda prie šios sparčiai augančios srities metodologinių rekomendacijų sudarymo.

Šio darbo tikslas – įvertinti užląstelių vezikulių koncentracijos priklausomybę nuo eksperimentinių veiksmų taikant metaanalizės principus bei statistinius metodus.

LITERATŪROS APŽVALGA

Užląstelinės vezikulės

Užląstelinės vezikulės (UV) yra iš ląstelių išskiriamos dalelės, kurios negali replikuotis, nes neturi funkcionuojančio branduolio, ir gali būti aptinkamos įvairių kūno skysčių kultūros supernatantuose. Anksčiau vezikulės buvo laikomos ląstelių liekanomis, tačiau dabar jau yra pripažinta, kad jos yra ląstelių komunikacijos tarpininkės, galinčios pernešti įvairias molekules, pavyzdžiui, citokinus, uždegimo mediatorius, miRNR, kurios yra svarbios palaikant

homeostazę, indukuojant ir (arba) slopinant uždegimą ir skatinant reparaciją. UV mokslininkus sudomino dėl galimo jų pritaikymo bandant suprasti įvairių ligų – vėžio, širdies ir kraujagyslių, metabolinių, neurologinių, infekcinių ligų mechanizmus. Taip pat paaiškėjo, jog UV atlieka svarbų vaidmenį kaip diagnostiniai, prognostiniai bei gydymo stebėsenos biožymenys plaučių ir kitų ligų atveju. Šių vezikulių ypatinga svarba buvo pastebėta atlikus tyrimus su žmogaus organizmo skysčiuose cirkuliuojančiomis UV sergant uždegiminėmis ligomis. Svarbu tai, jog šios vezikulės gali būti išskiriamos biologinius ėminius paimant minimaliai invazyviais būdais. UV randama tokiuose biologiniuose ėminiuose kaip kraujas, BAL (bronchoalveolinio lavažo) nuoplovos, šlapimas, seilės, vaisiaus vandenys ir smegenų skystis. Išsamus UV kūno skysčiuose charakterizavimas gali padėti geriau suprasti ligų vystymąsi ir gydymą [1].

Užląstelių vezikulių išskyrimo metodai

Per pastaruosius metus UV tyrimai sparčiai augo, o UV išskyrimo ir charakterizavimo metodų skaičius didėjo, nors daugelis jų vis dar yra nestandartizuoti. UV yra nevienodo dydžio, tankio, kilmės ir molekulinės sudėties, o įvairių UV populiacijų dydžiai ir fenotipai yra panašūs ar net sutampa, todėl jas atskirti yra gana sudėtinga. Šiuo metu dažniausiai taikomi keli pagrindiniai metodai [2].

Ultracentrifugavimu pagrįsti metodai laikomi geriausiu UV išskyrimo metodu [3]. Ultracentrifugavimas naudojamas įvairioms dalelėms, pavyzdžiui, vezikulėms, tirpale nusodinti. Įvairių tipų vezikulės, esančios mėginyje, atskiriamos pagal dydį ir masę, todėl didesni ir tankesni komponentai migruoja tolyn nuo centrifugos ašies, o mažesni ir mažiau tankūs komponentai – link centrifugos ašies. Ultracentrifugavimas yra klasikinis metodas, kuriuo dažniausiai gryninamos vezikulės, naudojant didelę išcentrinę jėgą mažų biologinių dalelių savybėms tirti. Ultracentrifugavimą galima suskirstyti pagal atskyrimo principus: diferencinis ultracentrifugavimas, kuris remiasi daugkartiniu nuosekliu centrifugavimu, siekiant pašalinti ląstelinius komponentus bei ląstelių liekanas, ir ultracentrifugavimas su tankio gradientu, kuris dažniausiai užtikrina didesnį grynumą ir išgaunamą vezikulių kiekį [4].

Užląstelių vezikulių išskyrimui yra taikomi ir kiti metodai, kurių pasirinkimas priklauso nuo mėginio tūrio, tyrimo tikslo ir reikalingo grynumo. Nusodinimu pagrįsti metodai yra paprasti ir tinkami mažo tūrio mėginiams, pasižymi didele išeiga, bet ribotu grynumu, nes kartu išskiriami baltymai ar kitos dalelės [5]. Dydžio išskyrimo chromatografija (angl. *Size Exclusion Chromatography* – SEC) yra plačiai taikomas metodas plazmos ir serumo mėginiams, jis leidžia efektyviai pašalinti priemaišas, yra nebrangus ir gali būti automatizuojamas [6], o ultrafiltracijos derinimas su SEC leidžia pasiekti dar didesnį išeigos ir grynumo santykį, ypač dirbant su didesnio tūrio mėginiais [7]. Afiniškumo chromatografijos metodai leidžia gauti visą UV RNR ir atei tyje gali būti nesudėtingai pritaikomi klinikinėse laboratorijose [8]. Imunologiniai metodai, pagrįsti UV paviršiaus žymenų atpažinimu, leidžia specifiskai nustatyti norimas UV

[9]. Kiti inovatyvūs metodai, tokie kaip lipidų nanozondų sistema ar sintetinio peptido Vn96 naudojimas, užtikrina greitą UV fiksavimą ir pritaikymą biožymenų analizei [10, 11]. Mikroskopsčių technologijos ir mikrolustai leidžia tiksliai manipuliuoti mažais mėginių kiekiais, sumažina laiko sąnaudas ir suteikia galimybę kurti komerciškai perspektyvias automatizuotas platformas [12, 13].

Visi šie metodai turi savo privalumų ir trūkumų, susijusių su išskyrimo laiku, mėginio grynumu, išeiga, metodo sudėtingumu, todėl siekiant efektyvios UV izoliacijos reikia atsižvelgti tiek į turimas sąlygas, tiek į tyrimo tikslą ir pasirinkti tinkamiausią metodą, nes nėra aukso vertės standarto metodo vezikulėms išskirti [8].

Užląstelių vezikulių charakterizavimo metodai

Kaip ir UV išskyrimo metodai, šių dalelių charakterizavimo metodai pasižymi didele gausa ir variabilumu. Pastaruoju metu įprastiems UV aptikimo ir kiekybinio nustatymo metodams patobulinti yra naudojamos mikro- ir nanotechnologijos.

Vienas iš metodų yra imunofermentinė analizė, kuri leidžia jautriai aptikti ir kiekybiškai įvertinti UV, ypač naudojant komercines sistemas, kurios gali aptikti net 50 nm dydžio daleles [14]. Tėkmės citometrija suteikia galimybę diferencijuoti ir rūšiuoti UV pagal fluorescencinius žymenis, o nauji įrenginiai užtikrina didelį jautrumą net pavienių 40 nm dalelių analizei. Tėkmės citometrija UV tyrimams gali būti pritaikyta ir klinikinėse laboratorijose [15]. Nanodalelių sekimo analizė leidžia realiu laiku nustatyti UV dydį ir koncentraciją pagal Brauno judėjimą [16, 17]. Reguluojamoji varžos impulsų analizė leidžia tiksliai įvertinti pavienių dalelių dydį, koncentraciją ir zeta potencialą, todėl tinka UV subpopuliacijoms atskirti [8]. Elektrocheminė detekcija yra jautrus, greitas ir nereikalaujantis didelio mėginio kiekio metodas, grindžiamas antikūnų ir antigenų sąveika ir elektrocheminiais signalais, o nauji jutikliai (pvz., kvantiniais taškais paremti metodai) pasižymi daug didesniu jautrumu nei tradiciniai, tačiau šiems metodams reikalingi sudėtingi gamybos žingsniai [17]. Dinaminė šviesos sklaida – tai metodas, dažniausiai naudojamas dalelių dydžių pasiskirstymui suspensijoje nustatyti, bet mažiau tinkamas UV heterogeniškumui įvertinti [18]. Ramano spektroskopijos metodas leidžia nustatyti molekulinę užląstelių vezikulių sudėtį, tačiau šiam metodui reikia labai koncentruotų mėginių ir ilgai trunkančių matavimų, kas sunkina analizę [19]. Taip pat buvo sukurtas plazmoninis vezikulių aptikimo jutiklis, kuris gali aptikti mažas UV jų nepažymėjus, ir derinant šį metodą kartu su genomo tyrimais, jis taptų perspektyvus klinikinėje praktikoje ir galėtų pagerinti UV pritaikymą diagnostiniams bei prognostiniams tyrimams [20].

Taigi, UV charakterizavimas reikalingas vezikulėms aptikti ir kiekiui įvertinti, tačiau charakterizavimą sunkina mažas vezikulių dydis, taip pat dydžio ir molekulinės sudėties heterogeniškumas, universalių UV identifikavimo metodų trūkumas bei daugelio metodų mažas specifiskumas UV atžvilgiu. Nė vienas metodas negali patenkinti visų UV charakterizavimo

reikalavimų, todėl rekomenduojama derinti kelis metodus, kurie pasižymi skirtingomis charakteristikomis [21].

TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Mokslinių publikacijų atrankos strategija ir paieškos kriterijai

Šis tyrimas buvo atliktas remiantis *PRISMA* (angl. *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) gairėmis [22]. Sisteminė literatūros paieška buvo atlikta *PubMed*, *Web of Science* ir *Cochrane Library* duomenų bazėse, ieškant publikacijų, kuriose aprašomi užląstelių vezikulių išskyrimo iš žmogaus kraujo plazmos metodai ir jų koncentracija mėginiuose. Raktiniai žodžiai bei frazės, naudojamos *PubMed* duomenų bazėje, buvo šios: „extracellular vesicles“, „microvesicles“, „exosomes“, „chromatography“, „ultracentrifugation“, „plasma“, „nanoparticle tracking analysis“. *Web of Science* duomenų bazėje raktiniai žodžiai ir frazės naudoti tie patys kaip ir *PubMed*, tačiau papildomai buvo pridėti šie: „NTA“ ir „nanoparticle tracking“, o *Cochrane Library* duomenų bazėje – papildomai buvo įtraukta: „purification“, „isolation“, „particle size analysis“, „Nanosight“, „nanoparticle NEAR/3 tracking“, „tracking NEAR/3 analysis“.

Publikacijos buvo pasirinktos pagal šiuos atrankos kriterijus: 1) publikacijų metai 2015–2025 m.; 2) tyrimai su žmonėmis; 3) mėginys – kraujo plazma; 4) UV išskyrimo metodai – ultracentrifugavimas ir/arba chromatografija; 5) UV koncentracijos nustatymo metodas – NTA (angl. *Nanoparticle Tracking Analysis*); 6) tiriamųjų grupės – sveikų ir sergančių asmenų. Kaip atmetimo kriterijai buvo pasirinkti šie: 1) publikacijos tipas – apžvalga, klinikinių atvejų analizė; 2) nėra tiksliai apibrėžtų tyrimo sąlygų; 3) publikacijos dubliuojasi (tyrimo pratęsimas).

Mokslinių publikacijų paieška buvo vykdoma nuo 2025 m. balandžio 24 d. iki 2025 m. balandžio 29 d. ir buvo atlikta trijų tyrėjų nepriklausomai.

Duomenų ištraukimas iš publikacijų

Duomenys iš atrankos kriterijus atitikusių publikacijų buvo įtraukti į lentelę, kurioje pateikta informacija apie autorių, publikavimo metus, į analizę įtrauktos imties dydį, UV išskyrimo metodą (-us), tiriamųjų lytį, mėgintuvėlio tipą, sveikatos būklę ir UV koncentraciją kartu su standartiniu nuokrypiu. Statistinei analizei naudotoje lentelėje visos UV koncentracijos ir standartinio nuokrypio reikšmės buvo standartizuotos taip, kad išraiška būtų X^{11} , kur X yra UV koncentracijos arba standartinio nuokrypio reikšmė.

Statistinė analizė

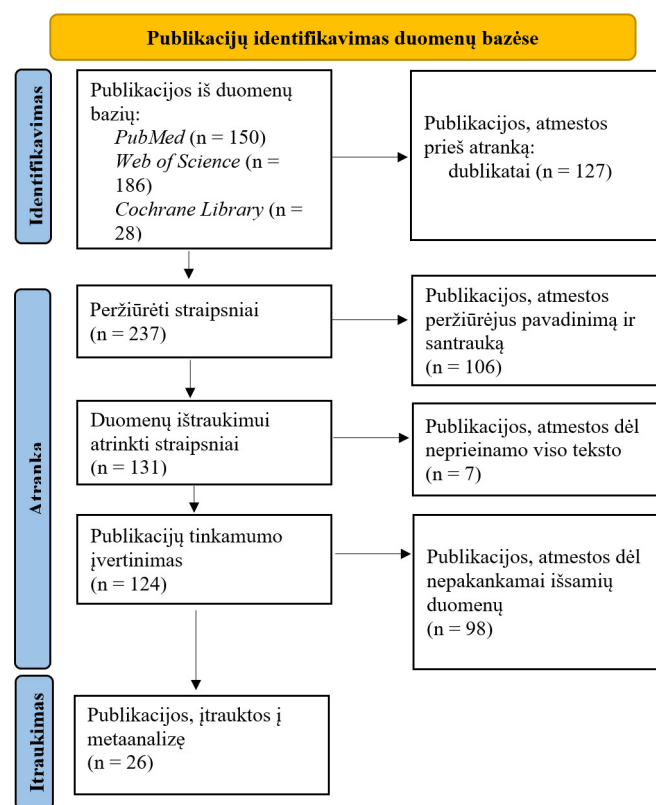
Metaanalizė buvo atlikta naudojantis R ir Rstudio programinės įrangos versija v4.5.0; R Core Team 2025. UV koncentracijų reikšmės buvo naudojamos kaip efekto dydžio matas. Fišerio Z logaritminė transformacija buvo naudojama dispersijai normalizuoti, šališkumui pašalinti ir Fišerio Z reikšmėms apskaičiuoti, Fišerio Z reikšmės – efekto dydžiams bei jų pasikliautiniams intervalams tarp pogrupių įvertinti. Imčių dydžiai buvo naudojami kaip

kiekvieno tyrimo įtakos bendram rezultatui matas. χ^2 (Cochran Q) ir I^2 testai buvo naudojami heterogeniškumui tarp studijų įvertinti. I^2 statistinės analizės rezultatai buvo interpretuojami taip: 25 % – mažas, 50 % – vidutinis, 75 % – didelis heterogeniškumas. Atsitiktinio efekto dydžio modelis buvo naudojamas, jeigu I^2 statistika buvo ≥ 50 % ir $P \geq 0,10$ tarp tyrimų. Šališkumui įvertinti buvo naudojami „piltuvo“ (angl. *Funnel*) grafikas ir Egger testas. Jautrumo analizė pagrįsta vieno tyrimo pašalinimo metodu. Pogrupių analizė buvo atlikta pasitelkiant atsitiktinio efekto dydžio modelius, kurių rezultatai buvo pateikti „miško“ (angl. *Forest*) grafikais.

REZULTATAI

Tyrimų identifikavimas ir atranka

Naudojant raktinių žodžių derinius, visose trijose duomenų bazėse buvo rastos 364 publikacijos. Peržiūrėjus publikacijas, remiantis įtraukimo ir atmetimo kriterijais į analizę buvo įtrauktos 26 publikacijos (1 pav.).



1 pav. PRISMA flow diagrama publikacijų atrankai
Fig. 1. PRISMA flow diagram for publication selection

Atrinktų tyrimų charakteristikos

Metaanalizei atrinkti 26 tyrimai [26–48] yra pateikti 1 lentelėje. Dar 3 tyrimai [23–25] buvo atmeti jau pradėjus statistinę analizę dėl stipriai išsiskiriančių reikšmių, todėl galutinis į metaanalizę įtrauktas tyrimų skaičius – 23. Šalys, kuriose buvo atlikti šie tyrimai, yra plačiai pasiskirsčiusios ir nėra nė vienos dominuojančios šalies, kurioje būtų atlikta daugiausia tyrimų. Atrinktuose tyrimuose UV išskirti buvo naudotos trys metodų grupės: ultracentrifugavimas (UC), dydžio išskyrimo chromatografija (SEC) arba šių metodų

derinys (UC + SEC). Atrinktų tyrimų imtyse buvo tiek sveikų, tiek sergančių asmenų. Kaip mėgintuvėlių priedai, į kuriuos buvo imamas kraujas, dažniausiai buvo naudojami EDTA ir natrio citratas. Keletas tyrimų kaip priedą pasirinko hepariną, o vienas – rūgštinę citrato dekstrozę. Likusiuose tyrimuose mėgintuvėlio priedas nebuvo nurodytas. Dažniausiai pasirinktos mėginių laikymo sąlygos buvo –80 °C, rečiau –20 °C arba visai nenurodytos.

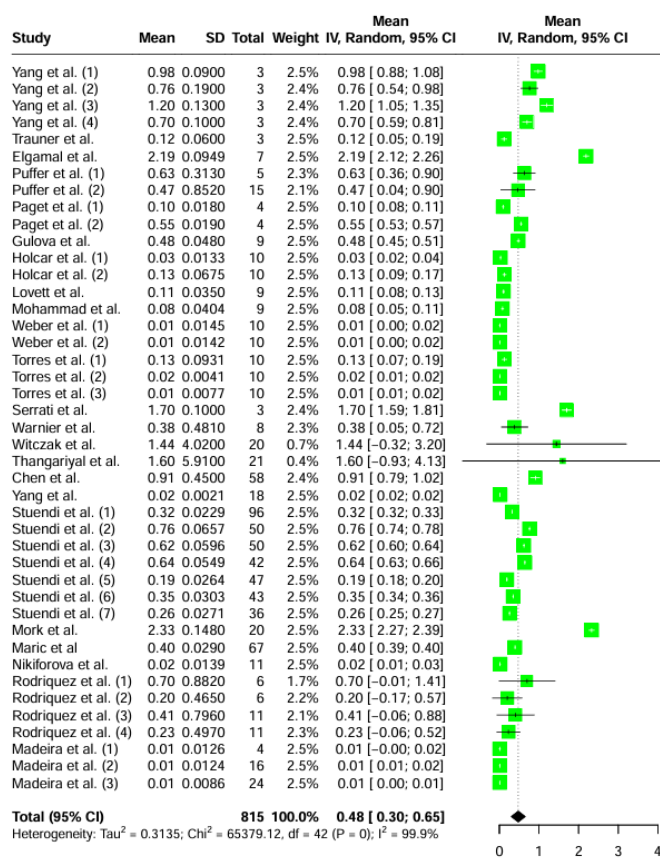
1 lentelė. Metaanalizei atrinktų tyrimų pagrindinės charakteristikos
Table 1. Key characteristics of studies selected for meta-analysis

Eilės nr.	Autorius	Šalis, metai	Lytis	Išskyrimo metodas	Imties dydis	Sveikatos statusas	Mėginio laikymo sąlygos	Mėgintuvėlio priedas	UV koncentracija (vidurkis)	Standartinis nuokrypis
1	Yang ir kt. [26]	Kinija, 2024	Moteris ir vyras	UC	3	Sveikas	NA	Heparinas	9,80E+10	9,00E+09
					3			EDTA	7,60E+10	1,90E+10
					3			Citratas	1,20E+11	1,30E+10
					3			Citratas	7,00E+10	1,00E+10
2	Trauner ir kt. [27]	Vokietija, 2025	Moteris ir vyras	UC	3	Sveikas	–80 °C	Citratas	1,20E+10	6,00E+09
3	Elgamal ir kt. [28]	JAV, 2021	Moteris ir vyras	UC	7	Nesveikas	–80 °C	Rūgštinė citrato dekstrozė	2,19E+11	9,49E+09
4	Puffer ir kt. [29]	JAV, 2021	Moteris ir vyras	UC	5	Sveikas	NA	NA	6,30E+10	3,13E+10
					15	Nesveikas			4,70E+10	8,52E+10
5	Paget ir kt. [30]	JK, 2022	Moteris ir vyras	UC	4	Sveikas	–80 °C	EDTA	9,50E+09	1,80E+09
				SEC	4				5,50E+10	1,90E+09
6	Gulova ir kt. [31]	Slovakija, 2024	Moteris ir vyras	SEC	9	Sveikas	–80 °C	Citratas	4,80E+10	4,80E+09
7	Holcar ir kt. [32]	Slovėnija, 2020	Moteris ir vyras	UC	10	Sveikas	–80 °C	EDTA	3,07E+09	1,33E+09
				SEC	10				1,28E+10	6,75E+09
8	Lovett ir kt. [33]	Šiaurės Afrika, 2024	Vyras	SEC	9	Sveikas	–80 °C	EDTA	1,06E+10	3,50E+09
9	Nielsen ir kt. [23]	Danija, 2018	Moteris	UC	6	Sveikas	–80 °C	Citratas	1,66E+12	1,28E+12
10	Mohammad ir kt. [34]	Kanada, 2021	Moteris	UC	9	Sveikas	–80 °C	EDTA	8,11E+09	4,04E+09
11	Weber ir kt. [35]	Vokietija, 2023	Moteris ir vyras	SEC	10	Nesveikas	NA	NA	1,13E+09	1,45E+09
					10	Sveikas			1,15E+09	1,42E+09
12	Torres ir kt. [36]	Ispanija, 2024	Moteris ir vyras	UC	10	Sveikas	–80 °C	Heparinas	1,28E+10	9,31E+09
				SEC	10				1,56E+09	4,08E+08
				UC + SEC	10				1,47E+09	7,73E+08
13	Serrati ir kt. [37]	Italija, 2021	Moteris ir vyras	UC	3	Sveikas	–20 °C	NA	1,70E+11	1,00E+10
14	Kulabukhova ir kt. [24]	Rusija, 2021	Moteris ir vyras	UC	63	Nesveikas	–80 °C	NA	1,84E+13	1,11E+13
15	Warnier ir kt. [38]	Belgija, 2022	Vyras	SEC + UC	8	Sveikas	–80 °C	EDTA	3,85E+10	4,81E+10
16	Witczak ir kt. [39]	JK, 2017	Moteris ir vyras	UC	20	Nesveikas	–80 °C	EDTA	1,44E+11	4,02E+11
17	Askeland ir kt. [25]	Danija, 2020	Moteris ir vyras	SEC	3	Sveikas	–80 °C	Citratas	6,81E+11	5,08E+11
18	Thangariyal ir kt. [40]	Indija, 2025	Moteris ir vyras	UC	21	Sveikas	–80 °C	EDTA	1,60E+11	5,91E+11
19	Chen ir kt. [41]	Kinija, 2020	Moteris ir vyras	SEC	58	Nesveikas	–80 °C	NA	9,08E+10	4,50E+09
20	Yang ir kt. [42]	Kinija, 2023	Moteris ir vyras	UC	18	Nesveikas	–80 °C	NA	1,95E+09	2,10E+08
21	Stuendi ir kt. [43]	Vokietija, 2021	Moteris ir vyras	SEC	96	Nesveikas	–80 °C	EDTA	3,24E+10	2,29E+09
					50	Nesveikas			7,62E+10	6,57E+09
					50	Nesveikas			6,20E+10	5,96E+09
					42	Sveikas			6,44E+10	5,49E+09
					47	Nesveikas			1,90E+10	2,64E+09
					43	Nesveikas			3,47E+10	3,03E+09
					36	Nesveikas			2,57E+10	2,71E+09
22	Mork ir kt. [44]	Danija, 2016	Moteris ir vyras	SEC	20	Sveikas	–80 °C	Citratas	2,33E+11	1,48E+10

23	Maric ir kt. [45]	Slovėnija, 2024	Moteris ir vyras	UC	67	Sveikas	-80 °C	EDTA	3,95E+10	2,90E+09
24	Nikiforova ir kt. [46]	Rusija, 2021	Moteris ir vyras	UC + SEC	11	Sveikas	-80 °C	EDTA	1,91E+09	1,39E+09
25	Rodriguez ir kt. [47]	Ispanija, 2022	Moteris ir vyras	SEC	6	Sveikas	-80 °C	EDTA	7,00E+10	8,82E+10
					6	Nesveikas			2,00E+10	4,65E+10
					11	Nesveikas			4,10E+10	7,96E+10
					11	Nesveikas			2,30E+10	4,97E+10
26	Madeira ir kt. [48]	Brazilija, 2024	Moteris ir vyras	UC + SEC	4	Nesveikas	NA	EDTA	1,02E+09	1,26E+09
					16	Sveikas			1,19E+09	1,24E+09
					24	Nesveikas			8,26E+08	8,63E+08

Efeko dydžio ir heterogeniškumo įvertinimas

Remiantis atsitiktinio efekto dydžio modelio rezultatu, matomas statistiškai reikšmingas teigiamas bendras efektas UV koncentracijai tarp į analizę įtrauktų tyrimų (2 pav.). Gautas bendras vidurkis yra 0,48 su 95 % pasikliautinuojų intervalu [0,30; 0,65]). Tarp tyrimų buvo pastebėtas ir didelis heterogeniškumas ($I^2 = 99,9 \%$, $p = 0$).

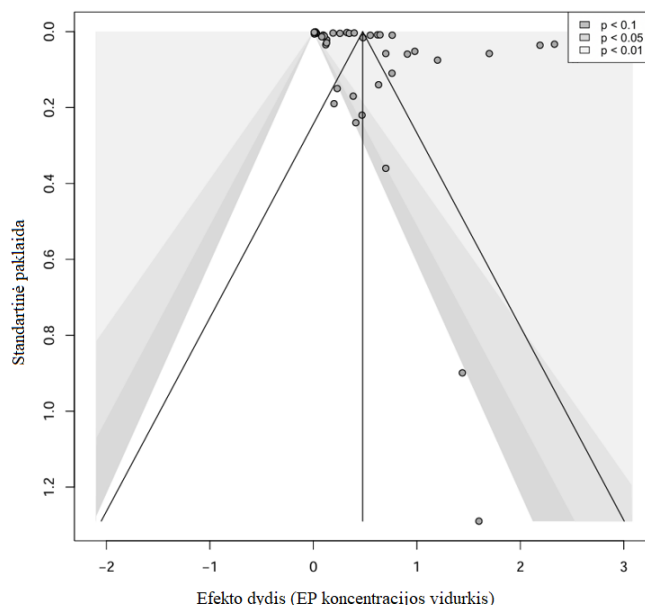


2 pav. „Miško“ grafikas visiems į analizę įtrauktiems tyrimams

Fig. 2. Forest plot for all studies included in the analysis

Tyrimų šališkumo įvertinimas

Šališkumui įvertinti buvo nubraižytas ir įvertintas „piltuvo“ (angl. *Funnel*) grafikas (3 pav.) bei *Egger* testas. Apžvelgus „piltuvo“ grafiką matomas bendrai simetriškas tyrimų pasiskirstymas ir grafike taškai yra išsidėstę gana tolygiai aplink bendrą efekto dydį. Atlikus *Egger* testą „piltuvo“ grafiko asimetrijai įvertinti, buvo gautas nereikšmingas rezultatas ($p = 0,531$), o tai rodo, jog nėra statistiškai reikšmingo mažų tyrimų poveikio ar šališkumo.

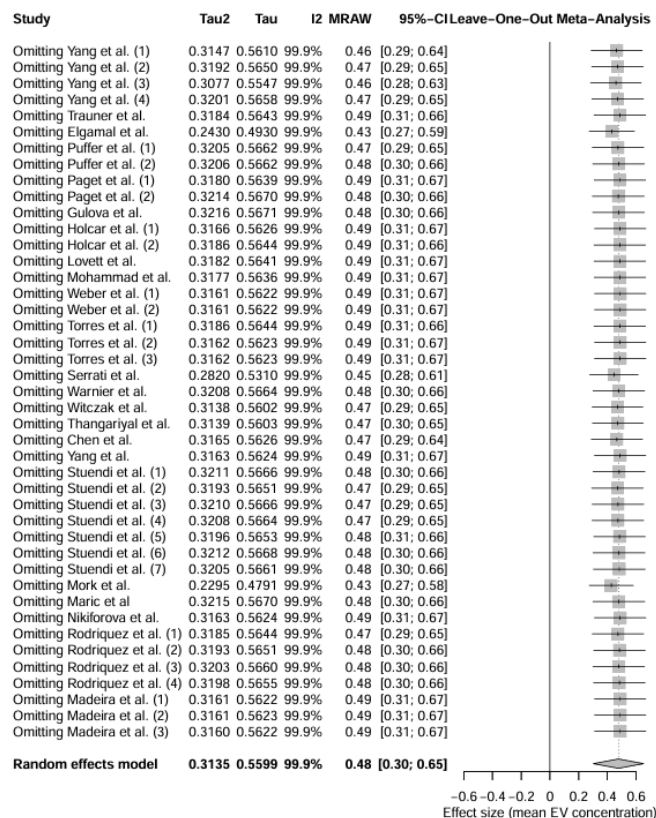


3 pav. „Piltuvo“ grafikas publikacijų šališkumui įvertinti
Fig. 3. Funnel chart for assessing bias of publications

Jautrumo analizė

Siekiant įvertinti, ar atskiri tyrimai turi įtakos bendram rezultatui, buvo taikytas vieno tyrimo pašalinimo (angl. *Leave-one-out*) metodas bei nubraižytas poveikio grafikas (4 pav.). Iš šio jautrumo analizės grafiko galime matyti, jog pašalinus kiekvieną atskirą tyrimą po vieną bendras efekto dydis išlieka panašus. Tai parodo, jog nė vienas tyrimas neturi reikšmingos įtakos bendram rezultatui. Pasikliautinieji

intervalai yra panašaus pločio kaip bendro efekto dydžio intervalas, o tai rodo, jog rezultatai yra patikimi. Taigi, analizė neturi nė vieno dominuojančio tyrimo, kuris lemtų reikšmingus analizės rezultato pokyčius.



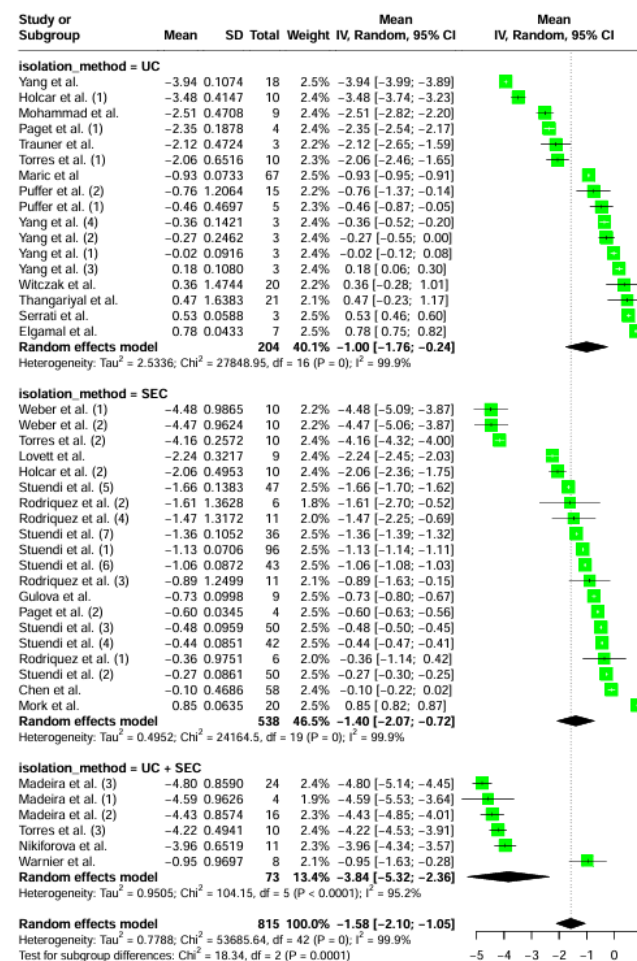
4 pav. Jautrumo analizė ir vieno tyrimo pašalinimo metodo grafikas

Fig. 4. Sensitivity analysis using the leave-one-out analysis

Pograpių analizė

Pasitelkiant atsitiktinio efekto dydžio modelį skirtingų UV išskyrimo metodų įtakai įvertinti, pastebėta, jog naudojant skirtingus UV izoliavimo metodus gaunamas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp UV kiekio įverčių ($p = 0,0001$). Tai leidžia teigti, jog izoliavimo metodas daro reikšmingą įtaką UV koncentracijai. Gauti rezultatai parodo 5 paveikslė. Ultracentrifugavimo pograpiui apskaičiuotas bendras vidurkis yra $-1,00$ su 95 % PI $[-1,76; -0,24]$, o transformavus atgal į originalią skalę $-0,37$ su 95 % PI $[0,17; 0,78]$. SEC pograpiui apskaičiuotas bendras vidurkis buvo mažesnis už UC metodo ir atitiko $-1,40$ su 95 % PI $[-2,07; -0,72]$ arba originalioje skalėje $0,24$ su 95 % PI $[0,12; 0,47]$. Taip pat UC + SEC sudėtinio metodo pograpiui bendras vidurkis buvo reikšmingai mažesnis ir atitiko $-3,84$ su 95 % PI $[-5,32; -2,36]$, o pavertus į originalią skalę $0,02$ su 95 % PI $[0,005; 0,097]$. Lyginant šiuos metodus tarpusavyje buvo nustatyta, jog jų bendro vidurkio reikšmės

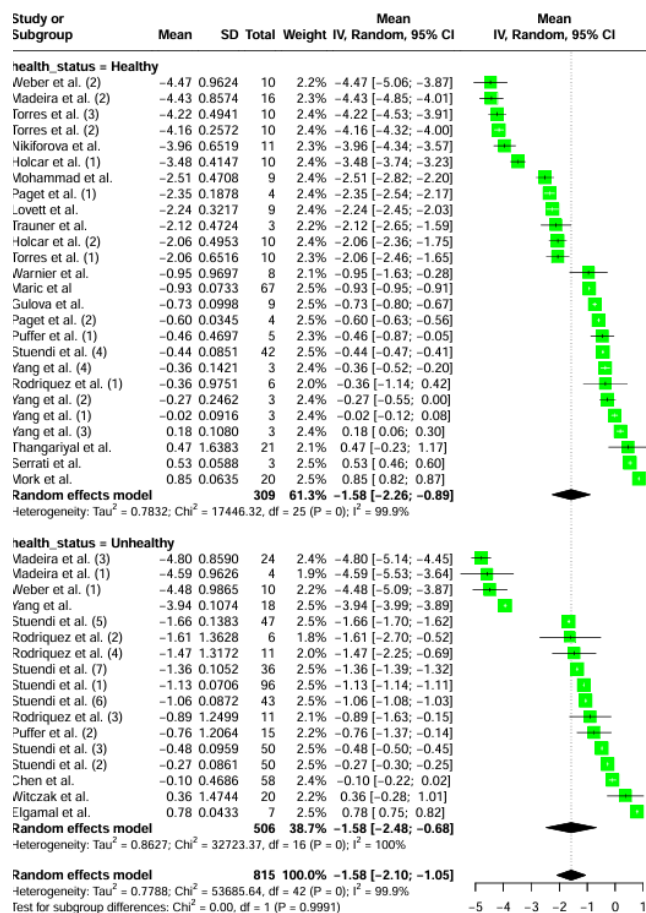
tarpusavyje statistiškai reikšmingai skyrėsi. Mažiausias įvertis buvo gautas UC + SEC metodų deriniui, didesnis – SEC, o didžiausias – UC. Tai rodo, kad naudojant metodų derinį UV išskirti, tikėtina, yra prarandama daugiausia dalelių. Taigi, išskyrimo metodas daro esminę įtaką išskiriamų vezikulų kiekiui.



5 pav. „Miško“ grafikas UV išskyrimo metodų pograpiams

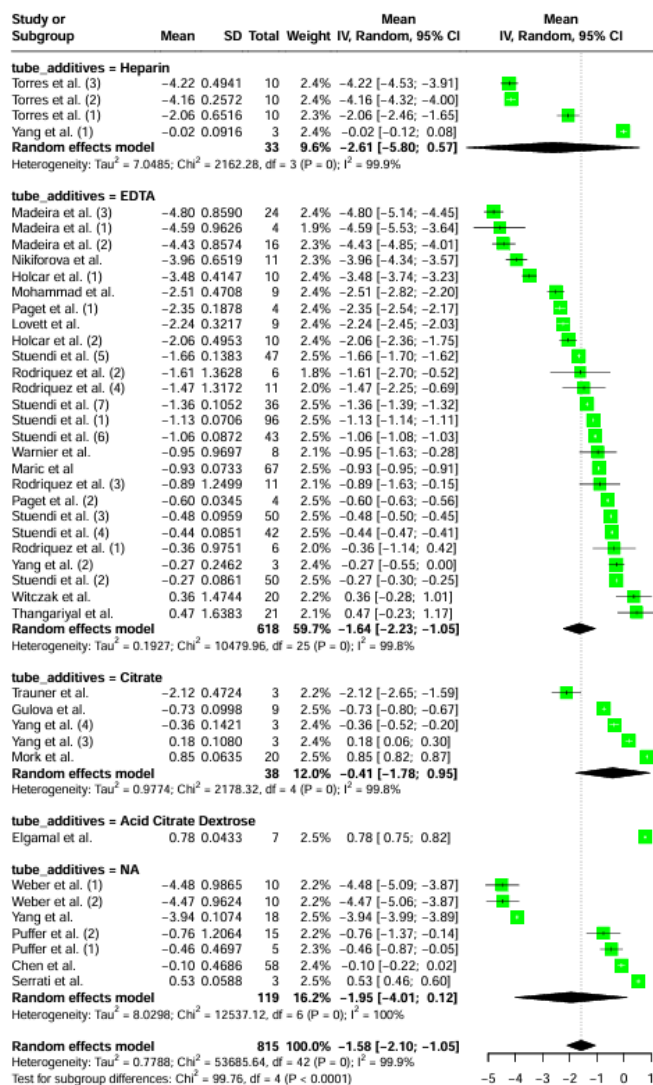
Fig. 5. Forest plot for the EV isolation method subgroups

Atsitiktinio efekto dydžio modelio analizės sveikatos būklės pograpiui grafikas pateiktas 6 paveiksle. Šių sveikatos būklės pograpių rezultatai parodė, jog UV kiekio įverčiai sveikų ir sergančių asmenų mėginiuose buvo labai panašūs ir tarp šių pograpių statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo ($p = 0,9991$). Tai leidžia daryti išvadą, jog tiriamųjų sveikatos būklė neturėjo įtakos UV kiekiui. Sergančių tiriamųjų pograpije logaritmiškai transformuotas bendras vidurkis buvo gautas $-1,58$ su 95 % PI $[-2,48; -0,68]$, o originalus įvertis $0,21$ su 95 % PI $[0,08; 0,51]$. Sveikų tiriamųjų pograpije bendras transformuotas vidurkis atitiko $-1,58$ su 95 % PI $[-2,26; -0,86]$, o originalioje skalėje $0,21$ su 95 % PI $[0,10; 0,41]$. Tokie metaanalizės rezultatai rodo, jog tiriamųjų sveikatos būklė nedarė įtakos UV kiekio įverčiams.



6 pav. „Miško“ grafikas sveikatos būklės pogrupiams
Fig. 6. Forest chart for health status subgroups

Vertinant mėgintuvėlio priedo įtaką buvo nustatyta, jog tarp skirtingų mėgintuvėlių priedų pogrupių UV kiekio vidurkių reikšmės statistškai reikšmingai skyrėsi ($p < 0,0001$). Tai reiškia, jog mėgintuvėlio priedas turi įtakos gautam UV kiekiui. Tačiau statistškai reikšmingas skirtumas nuo lyginamosios vertės buvo gautas tik EDTA pogrupyje, kur bendro vidurkio transformuotas įvertis atitiko $-1,64$ su 95 % PI $[-2,23; -1,05]$, o originalus įvertis buvo $0,19$ su 95 % PI $[0,11; 0,35]$. Taip pat šioje analizėje rūgštinio citrato dekstrozės pogrupyje buvo įtrauktas tik vienas tyrimas, todėl išvadas apie šį pogrupį reikėtų daryti tik į analizę įtraukus daugiau tyrimų. Heparino, citrato ir nenurodytos priedo reikšmės (angl. *Not Available* – NA) pogrupiams buvo apskaičiuoti bendri vidurkiai, kurie nebuvo statistškai reikšmingi, nes PI apima 0, todėl negalima pasakyti, ar su šiais priedais UV koncentracijos įverčiai būtų mažesni, ar didesni už lyginamąjį įvertį. Šio pogrupio grafikas pateikiamas 7 paveiksle.

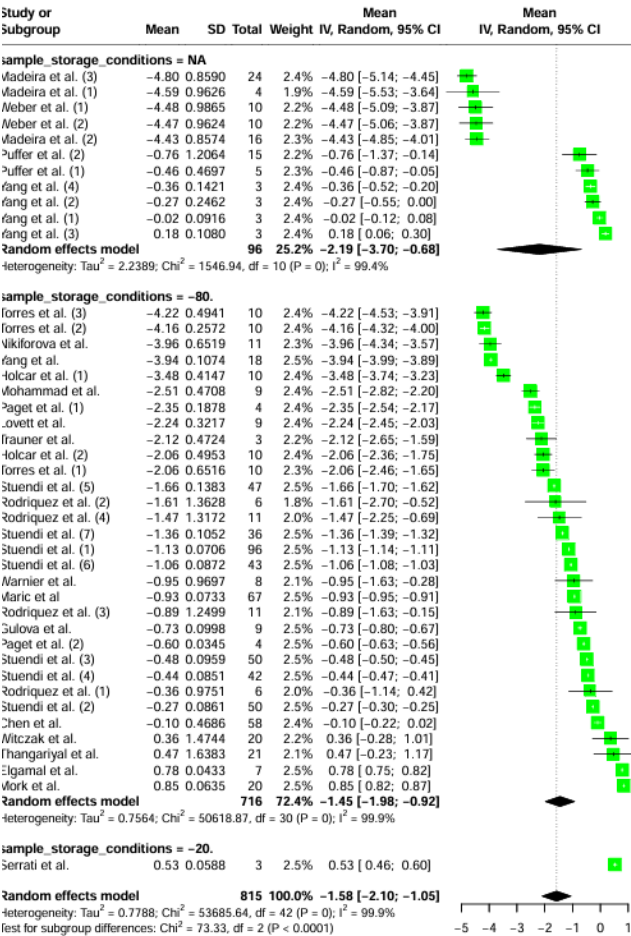


7 pav. „Miško“ grafikas skirtingų mėgintuvėlių priedų pogrupiams

Fig. 7. Forest graph for the test tube additives subgroup

Mėginių laikymo sąlygų įtakai įvertinti atlikta atsitiktinio dydžio efekto modelio analizė parodė, jog tarp skirtingų laikymo sąlygų pogrupių bendrų vidurkių yra statistškai reikšmingas skirtumas. Taip pat -20 °C sąlygų pogrupyje buvo tik vienas tyrimas, todėl patikimą statistinę analizę ir išvadas apie šias laikymo sąlygas reikėtų daryti tik į analizę įtraukus daugiau tyrimų. Statistiškai reikšmingos UV bendrų vidurkių vertės buvo gautos -80 °C ir nenurodytos reikšmės (angl. *Not Available* – NA) laikymo sąlygomis ir atitinkamai logaritmiškai transformuotos reikšmės buvo $-1,45$ su 95 % PI $[-1,98; -0,92]$ ir $-2,19$ su 95 % PI $[-3,70; -0,68]$. Šios vertės originalioje skalėje buvo $0,23$ su

95 % PI [0,14; 0,4] ir 0,11 su 95 % PI [0,025; 0,51] atitinkamai. Tokie rezultatai rodo, jog mėginiai, laikyti -80°C temperatūroje, turėjo mažesnę bendrą UV kiekio vidurkį. Rezultatai pateikiami 8 paveiksle.



8 pav. „Miško“ grafikas skirtingų laikymo sąlygų pogrupiams
Fig. 8. Forest graph for different storage conditions subgroups

REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA

Šia metaanalize buvo siekiama įvertinti bendrinius UV koncentracijos įverčius tarp atrinktų analizei skirtingų tyrimų ir identifikuoti veiksnys, kurie gali lemti rezultatų variaciją. Taikant atsitiktinio efekto dydžio modelį buvo nustatytas statistškai reikšmingas bendras efektas. Taip pat buvo nustatytas itin didelis heterogeniškumas tarp į analizę įtrauktų tyrimų. Didelį heterogeniškumą gali lemti daugybė priežasčių. Viena iš jų yra tai, jog tiriamųjų imtys buvo iš viso pasaulio ir nebuvo nė vienos dominuojančios šalies, iš kurios būtų didžioji dalis atrinktų tyrimų. Priežastis gali būti ir metodologiniai aspektai – UV izoliavimas buvo atliktas ne tik skirtingais metodais, bet ir naudojant vienodus metodus buvo remtasi skirtingais protokolais. UV matavimo laikas po išskyrimo, skirtingų reagentų naudojimas, skirtingas laikas nuo mėginio paėmimo ir apdorojimo, tiriamųjų amžius, lytis, mėgintuvėlių priedų įvairovė bei skirtingos mėginių laikymo sąlygos – šie ir dar daug kitų aspektų galėjo lemti tokį didelį heterogeniškumą. Siekiant išvengti didelio heterogeniškumo reikėtų kuo labiau standartizuoti naudojamus

metodus ir kuo daugiau juos aprašyti publikacijose. Taip pat atsirenkant tyrimus metaanalizei reikėtų pasirinkti griežtesnius atrankos bei atmetimo kriterijus. Toliau įvertinus publikavimo šališkumą buvo gauti rezultatai, parodantys, jog nėra mažų tyrimų efekto ar šališkumo. Jautrumo analizė atskleidė, jog nė vieno atskiro tyrimo pašalinimas reikšmingai nekeitė bendro efekto, dėl to galima teigti, jog metaanalizės rezultatai nėra nulemti pavienių tyrimų įtakos.

Pogrupių analizė leido daugiau apžvelgti skirtingų veiksmų įtaką UV koncentracijos įverčiams. Izoliavimo metodas buvo vienas svarbiausių veiksmų, lemiančių rezultatų variaciją. Rezultatai atskleidė, jog naudojant du metodus vezikulių išskyrimui UV koncentracijos įverčiai yra mažiausi. Tokių rezultatų buvo galima tikėtis, nes kuo daugiau metodų ir etapų naudojama UV izoliuoti, tuo daugiau UV prarandama kiekviename etape. Naudojant vieną metodą gaunamos galimai didesnės UV koncentracijos, tačiau mėginys, tikėtina, nėra toks grynas. Išskiriant UV reikia atsižvelgti ne tik į naudojamus metodus, bet ir į jų kiekį siekiant gauti optimalią išėigą bei grynumą. *MISEV2023* gairės pabrėžia, jog daugiausia tyrimuose yra naudojamas vienas arba du metodai [21]. Taip pat sveikatos būklės pogrupio analizė parodė, jog nebuvo reikšmingos įtakos UV kiekio įverčiams, sveikų ir sergančių asmenų grupių rezultatai buvo labai panašūs. Tokie rezultatai leidžia manyti, jog tiriamųjų sveikatos būklė nėra pagrindinis veiksnys, lemiantis UV koncentracijos rezultatų įverčius. Mėgintuvėlių priedai daro reikšmingą įtaką UV įverčiams, tačiau tik EDTA priedas lėmė reikšmingą skirtumą nuo lyginamojo įverčio. Heparino bei nenurodytos reikšmės grupių rezultatai nebuvo reikšmingi, o rūgštinio citrato deksrozės grupėje buvo tik vienas tyrimas, todėl reikėtų įtraukti daugiau tyrimų su šiais mėgintuvėlių priedais ir tuomet pakartoti analizę. Buvo tik vienas tyrimas -20°C laikymo sąlygų pogrupyje, todėl reikėtų įtraukti daugiau tyrimų, kad rezultatai būtų patikimi, o -80°C laikymo sąlygų pogrupyje buvo gauti statistškai reikšmingi rezultatai ir sumažėję UV įverčiai. *MISEV2023* gairės taip pat rekomenduoja mėginius laikyti -80°C [21].

Taigi, ši metaanalizė leido pamatyti, kad yra daug veiksmų, lemiančių UV koncentraciją, bet pagrindinis veiksnys yra izoliacijos metodas. Taip pat paaiškėjo, jog UV izoliavimo tyrimų srityje vis dar trūksta standartizavimo tiek preanaliziniame etape, tiek UV išskyrimo etape.

IŠVADOS

Į metaanalizę įtrauktų 26 mokslinių tyrimų apie užląstelinį vezikulių išskyrimo metodus analizė atskleidė, jog nebuvo publikacijų šališkumo, rastas didelis heterogeniškumas tarp tyrimų bei įvertinta įvairių preanalizinių veiksmų bei išskyrimo metodų įtaka. Didžiausią įtaką užląstelinį vezikulių koncentracijos įverčiams turėjo izoliavimo metodas. Mėgintuvėlio priedo, sveikatos būklės ir laikymo sąlygų analizė parodė, jog statistškai reikšmingą skirtumą užląstelinį vezikulių koncentracijos įverčiams turėjo EDTA mėgintuvėlio priedas bei -80°C laikymo sąlygos, o sveikatos būklė įtakos neturėjo.

Gauta: 2025 09 19 Priimta spaudai: 2025 11 12

Summary

LITERATURE REVIEW AND META-ANALYSIS OF METHODS FOR THE ISOLATION OF EXTRACELLULAR VESICLES FROM BLOOD PLASMA

Ugnė Šarachovaitė, Linas Černiauskas, Goda Aleknavičiūtė, Dovilė Karčiauskaitė

Background. Extracellular vesicles (EV) are secreted by various types of cells into body fluids and play a crucial role in intracellular communication. They are capable of carrying biologically active molecules and are involved in numerous physiological and pathological processes. Due to their widespread presence in the body and diverse functions, extracellular vesicles are considered promising non-invasive biomarkers. However, research on these vesicles is often hindered by methodological challenges – varying and non-standardized pre-analytical factors and isolation techniques result in significant variability across studies. To address these challenges, a systematic evaluation of extracellular vesicles isolation methods is necessary to determine which factors most significantly influence result variation. Meta-analysis enables the integration of data from multiple studies and provides a statistical assessment of the variables affecting outcomes, thereby contributing to the development of methodological recommendations required for research standardization. This study aims to identify the key factors contributing to variability in extracellular vesicles concentration estimates.

Aim. To evaluate the dependence of extracellular vesicle concentration on experimental factors using a meta-analysis approach.

Methods. The meta-analysis was conducted following PRISMA guideline recommendations. A systematic search for relevant scientific studies was performed across PubMed, Web of Science and Cochrane library databases using targeted keywords. Studies were included in the meta-analysis based on predefined inclusion and exclusion criteria. Random-effects models were applied and visualized using Forest plots. Publication bias was assessed using a Funnel plot and Egger's test, while sensitivity was evaluated using the leave-one-out method. Statistical analysis was carried out using R and RStudio software.

Results. The analysis revealed a high degree of heterogeneity; no publication bias was detected, and sensitivity analysis confirmed that the results were not overly influenced by individual studies. The calculated overall effect size using a random-effects model was positive – 0.48 with a 95% confidence interval [0.30;

0.65]. Subgroup analysis showed that the most influential factors on extracellular vesicles concentration estimates were the isolation methods, the use of EDTA as a tube additive, and sample storage at -80°C .

Conclusions. The meta-analysis and interpretation of results revealed a consistent overall positive effect across studies, with the isolation method being the most significant factor influencing extracellular vesicle concentration estimates.

Keywords: particles, isolation, ultracentrifugation, size exclusion chromatography, concentration.

LITERATŪRA

1. Bazzan E, Tinè M, Casara A, Biondini D, Semenzato U, Cocconcelli E, et al. Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. *Int J Mol Sci* 2021; 22(12): 6417. doi: 10.3390/ijms22126417.
2. van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 2016; 14(1): 48–56. doi: 10.1111/jth.13190.
3. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001; 166(12): 7309–18. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7309.
4. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Ji H, Mathivanan S, Scott AM, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods* 2012; 56(2): 293–304. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.01.002.
5. Karttunen J, Heiskanen M, Navarro-Ferrandis V, Das Gupta S, Lipponen A, Puhakka N, et al. Precipitation-based extracellular vesicle isolation from rat plasma co-precipitate vesicle-free microRNAs. *J Extracell Vesicles* 2019; 8(1): 1555410. doi: 10.1080/20013078.2018.1555410.
6. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* 2014; 3(1): 23430. doi: 10.3402/jev.v3.23430.
7. Benedikter BJ, Bouwman FG, Vajen T, Heinzmann ACA, Grauls G, Marinam EC, et al. Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15297. doi: 10.1038/s41598-017-15717-7.
8. Bano R, Ahmad F, Mohsin M. A perspective on the isolation and characterization of extracellular vesicles from different biofluids. *RSC Adv* 2021; 11(32): 19598–615. doi: 10.1039/D1RA01576A.
9. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, Gil D, Matthiesen R, Valle M, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res* 2008; 7(12): 5157–66. doi: 10.1021/pr8004887.

10. Discovery and technology for human health. *Nat Biomed Eng* 2017; 1(1): 0001. doi: 10.1038/s41551-016-0001.
11. Ghosh A, Davey M, Chute IC, Griffiths SG, Lewis S, Chacko A, et al. Rapid isolation of extracellular vesicles from cell culture and biological fluids using a synthetic peptide with specific affinity for heat shock proteins. *PLoS One* 2014; 9(10): e110443. doi: 10.1371/journal.pone.0110443.
12. Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* 2014; 507(7491): 181–9. doi: 10.1038/nature13118.
13. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagra S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip* 2014; 14(11): 1891–1900. doi: 10.1039/C4LC00136B.
14. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp* 2012; 59: e3037. doi: 10.3791/3037.
15. Kim HK, Song KS, Lee ES, Lee YJ, Park YS, Lee KR, et al. Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13(5): 393–7. doi: 10.1097/00001721-200207000-00003.
16. Zhu S, Ma L, Wang S, Chen C, Zhang W, Yang L, et al. Light-scattering detection below the level of single fluorescent molecules for high-resolution characterization of functional nanoparticles. *ACS Nano* 2014; 8(10): 10998–11006. doi: 10.1021/nn505162u.
17. Boriachek K, Islam N, Moller A, Salomon C, Nguyen NT, Hossain SA, et al. Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles. *Small* 2018; 14(6): 1702153. doi: 10.1002/sml.201702153.
18. Liu C, Yang Y, Wu Y. Recent advances in exosomal protein detection via liquid biopsy biosensors for cancer screening, diagnosis, and prognosis. *AAPS J* 2018; 20(2): 41. doi: 10.1208/s12248-018-0201-1.
19. Bryant G, Thomas JC. Improved particle size distribution measurements using multiangle dynamic light scattering. *Langmuir* 1995; 11(7): 2480–85. doi: 10.1021/la00007a028.
20. Im H, Shao H, Park YI, Peterson VM, Castro CM, Weissleder R, et al. Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nat Biotechnol* 2014; 32(5): 490–95. doi: 10.1038/nbt.2886.
21. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkinsop C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): from basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024; 13(2): e12404. doi: 10.1002/jev.2.12404.
22. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021; 372: n71. doi: 10.1136/bmj.n71.
23. Nielsen T, Kristensen AF, Pedersen S, Christiansen G, Kristensen SR. Investigation of procoagulant activity in extracellular vesicles isolated by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 2018; 7(1): 1454777. doi: 10.1080/20013078.2018.1454777.
24. Kulabukhova DG, Garaeva LA, Emelyanov AK, Senkevich KA, Gracheva EV, Miliukhina IV, et al. Blood plasma exosomes in hereditary forms of Parkinson's disease. *Mol Biol* 2021; 55(2): 338–45. doi: 10.31857/S0026898421010092.
25. Askeland A, Borup A, Ostergaard O, Olsen JV, Lund SM, Christiansen G, et al. Mass-spectrometry based proteome comparison of extracellular vesicle isolation methods: comparison of ME-kit, size-exclusion chromatography, and high-speed centrifugation. *Biomedicines* 2020; 8(8): 246. doi: 10.3390/biomedicines8080246.
26. Yang C, Han J, Liu H, He Y, Zhang Z, Liu X, et al. Storage of plasma-derived exosomes: evaluation of anticoagulant use and preserving temperatures. *Platelets* 2024; 35(1). doi: 10.1080/09537104.2024.2337255.
27. Trauner GJ, Nagy DB, Kalinyaprak MS, Merker S, Luzarowski M, Leuschner F, et al. Isolation, characterization, and proteomic analysis of plasma-derived extracellular vesicles for cardiovascular biomarker discovery. *J Vis Exp* 2025; 215: e67083. doi: 10.3791/67083.
28. Elgamal S, Cocucci E, Sass EJ, Mo XM, Blissett AR, Calomeni EP, et al. Optimizing extracellular vesicles' isolation from chronic lymphocytic leukemia patient plasma and cell line supernatant. *JCI Insight* 2021; 6(15): e137937. doi: 10.1172/jci.insight.137937.
29. Puffer RC, Garcia LMC, Himes BT, Jung MY, Meyer FB, Okonkwo DO, et al. Plasma extracellular vesicles as a source of biomarkers in traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2021; 134(6): 1921–8. doi: 10.3171/2020.4.JNS20305.
30. Paget D, Checa A, Zohrer B, Heilig R, Shanmuganathan M, Dhaliwal R, et al. Comparative and integrated analysis of plasma extracellular vesicle isolation methods in healthy volunteers and patients following myocardial infarction. *J Extracell Biol* 2022; 1(11): e66. doi: 10.1002/jex.2.66.
31. Gulova S, Slovinska L, Fecskeova LK, Bzdilova J, Matejova J, Moravek M, et al. Extracellular vesicles from platelet-poor plasma possess anti-inflammatory and anti-catabolic effects in chondrocytes stimulated with IL-1 β or synovial membrane-conditioned media. *J Orthop Surg Res* 2024; 19(1): 847. doi: 10.1186/s13018-024-05355-x.
32. Holcar M, Ferdin J, Sitar S, Žnidarič MT, Dolžan V, Plemenitaš A, et al. Enrichment of plasma extracellular vesicles for reliable quantification of their size and concentration for biomarker discovery. *Sci Rep* 2020; 10(1): 21346. doi: 10.1038/s41598-020-78422-y.
33. Lovett J, McColl RS, Durcan P, Vechetti I, Myburgh KH. Analysis of plasma-derived small extracellular vesicle characteristics and microRNA cargo following exercise-induced skeletal muscle damage in men. *Physiol Rep* 2024; 12(18): e70056. doi: 10.14814/phy.2.70056.
34. Mohammad S, Hutchinson KA, da Silva DF, Bhattacharjee J, McInnis K, Burger D, et al. Circulating small extracellular vesicles increase after an acute bout of moderate-intensity exercise in pregnant compared to non-pregnant women. *Sci Rep* 2021; 11(1): 12615. doi: 10.1038/s41598-021-92180-5.
35. Weber B, Henrich D, Schindler CR, Marzi I, Leppik L. Release of exosomes in polytraumatized patients: the injury

pattern is reflected by the surface epitopes. *Front Immunol* 2023; 14: 1107150. doi: 10.3389/fimmu.2023.1107150.

36. Torres A, Bernardo L, Sánchez C, Morato E, Solana JC, Carrillo E. Comparing the proteomic profiles of extracellular vesicles isolated using different methods from long-term stored plasma samples. *Biol Proced Online* 2024; 26(1): 18. doi: 10.1186/s12575-024-00243-4.

37. Serrati S, Palazzo A, Lapenna A, Mateos H, Mallardi A, Marsano RM, et al. Salting-out approach is worthy of comparison with ultracentrifugation for extracellular vesicle isolation from tumor and healthy models. *Biomolecules* 2021; 11(12): 1857. doi: 10.3390/biom11121857.

38. Warnier G, Groote ED, Delcorte O, Martinez DN, Nederveen JP, Nilsson MI, et al. Effects of a 6-wk sprint interval training protocol at different altitudes on circulating extracellular vesicles. *Med Sci Sports Exerc* 2023; 55(1): 46–54. doi: 10.1249/MSS.00000000000003031.

39. Witczak JK, Min T, Prior SL, Stephens JW, James PE, Rees A. Bariatric surgery is accompanied by changes in extracellular vesicle-associated and plasma fatty acid binding protein 4. *Obes Surg* 2018; 28(3): 767–74. doi: 10.1007/s11695-017-2879-z.

40. Thangariyal S, Bhat S, Mittal A, Subudhi PD, Negi P, Bihari C, et al. Comprehensive method for isolation and functional characterization of bacterial vesicles from human biological samples. *Methods* 2025; 237: 1–8. doi: 10.1016/j.ymeth.2025.02.012.

41. Chen Y, Han X, Sun Y, He X, Xue D. A circulating exosomal microRNA panel as a novel biomarker for monitoring post-transplant renal graft function. *J Cell Mol Med* 2020; 24(20): 12154–63. doi: 10.1111/jcmm.15861.

42. Yang P, Huang Y, Zhu Y, Wang Q, Guo Y, Li L. Plasma exosomes proteome profiling discovers protein markers associated with the therapeutic effect of Chaihu-Longgu-Muli

decoction on temporal lobe epilepsy. *J Ethnopharmacol* 2024; 318: 116928. doi: 10.1016/j.jep.2023.116928.

43. Stuendl A, Kraus T, Chatterjee M, Zapke B, Sadowski B, Moebius W, et al. α -Synuclein in plasma-derived extracellular vesicles is a potential biomarker of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2021; 36(11): 2508–18. doi: 10.1002/mds.28639.

44. Mørk M, Pedersen S, Botha J, Lund SM, Kristensen SR. Preanalytical, analytical, and biological variation of blood plasma submicron particle levels measured with nanoparticle tracking analysis and tunable resistive pulse sensing. *Scand J Clin Lab Invest* 2016; 76(5): 349–60. doi: 10.1080/00365513.2016.1178801.

45. Marić I, Žibera K, Kolenc A, Maličev E. Platelet activation and blood extracellular vesicles: the influence of venepuncture and short blood storage. *Blood Cells Mol Dis* 2024; 106: 102842. doi: 10.1016/j.bcmd.2024.102842.

46. Nikiforova N, Chumachenko M, Nazarova I, Zabegina L, Slyusarenko M, Sidina E, et al. CM-Dil staining and SEC of plasma as an approach to increase sensitivity of extracellular nanovesicles quantification by bead-assisted flow cytometry. *Membranes (Basel)* 2021; 11(7): 526. doi: 10.3390/membranes11070526.

47. Sanchez-Rodriguez MB, Tellez E, Casulleras M, Borrás FE, Arroyo V, Claria J, et al. Reduced plasma extracellular vesicle CD5L content in patients with acute-on-chronic liver failure: interplay with specialized pro-resolving lipid mediators. *Front Immunol* 2022; 13: 842996. doi: 10.3389/fimmu.2022.842996.

48. Madeira RP, Meneghetti P, Lozano N, Namiyama GM, Pereira-Chiocola VL, Torrecilhas AC. Exploring peripheral blood-derived extracellular vesicles as biomarkers: implications for chronic Chagas disease with viral infection or transplantation. *Microorganisms* 2024; 12(1): 116. doi: 10.3390/microorganisms12010116.