

ПРЕЦИПИТАЦИЯ МАЛЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КРОВИ В КИСЛЫХ УСЛОВИЯХ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТОГО МЕТОДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВЕЗИКУЛ НЕЙРОНАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Костина В. В.^{1,2}, Яковлев А. А.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук», Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-практический психоневрологический центр имени З. П. Соловьева Департамента здравоохранения Москвы», Москва, Россия

Контактная информация:

Яковлев Александр Александрович,
Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии РАН,
ул. Бутлерова, д. 5А, Москва, Россия,
117485.
E-mail: al_yakovlev@ihna.ru

Статья поступила в редакцию 27.10.2024
и принята к печати 29.12.2024

Резюме

Актуальность. Исследования состава и свойств малых внеклеточных везикул (мВВ) сегодня становятся все более востребованными в связи с их значимостью для диагностики и терапии многих патологий. При всей актуальности подобных исследований надежные универсальные методы выделения и изучения мВВ все еще не разработаны. **Цель.** Разработать модификацию метода выделения мВВ и использовать новый подход для выделения мВВ нейронального происхождения. **Материалы и методы.** С помощью преципитации полиэтиленгликолем (ПЭГ) при разных значениях pH и ионной силы выделяли мВВ из крови здоровых добровольцев. С помощью иммунопреципитации выделяли мВВ нейронального происхождения. Нейрональные мВВ биотинилировали, биотинилированные белки идентифицировали с помощью масс-спектрометрии. **Результаты.** В результате проведенной работы была разработана модификация метода преципитации ПЭГ при кислых значениях pH, позволившая в несколько раз увеличить выход нейрональных мВВ. Идентифицированы поверхностные белки мВВ, этими белками оказались сывороточный альбумин, аполипопротеин В, компоненты системы комплемента C1r, C1q, C1s, C3 и тяжелые цепи иммуноглобулинов. **Заключение.** Преципитация ПЭГ в кислых условиях позволяет выделять больше нейрональных мВВ из сыворотки крови, чем преципитация ПЭГ в нейтральной среде. При этом нейрональные мВВ в крови, скорее всего, существуют в комплексе с белками крови, представляющими собой так называемую белковую шубу.

Ключевые слова: астроциты, биотинилирование, малые внеклеточные везикулы, нейроны, поверхностные белки, полиэтиленгликоль

Для цитирования: Костина В.В., Яковлев А.А. Преципитация малых внеклеточных везикул крови в кислых условиях и использование этого метода для выделения везикул нейронального происхождения. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 37-50. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-37-50. EDN: XHTWOB

PRECIPITATION OF SMALL EXTRACELLULAR BLOOD VESICLES UNDER ACIDIC CONDITIONS AND THE USE OF THIS METHOD TO ISOLATE VESICLES OF NEURONAL ORIGIN

Vasilisa V. Kostina^{1,2}, Alexander A. Yakovlev^{1,3}

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Moscow, Russia

³ Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z. P. Solovyov, Moscow, Russia

Corresponding author:

Alexander A. Yakovlev,
Institute of Higher Nervous Activity and
Neurophysiology, Russian Academy of
Sciences,
Butlerova str., 5A, Moscow, Russia, 117485.
E-mail: al_yakovlev@ihna.ru.

Received 27 October 2024; accepted
29 December 2024

Abstract

Relevance. Studies of the composition and properties of small extracellular vesicles (sEVs) are becoming more and more important due to their usefulness for the diagnosis and therapy of many pathologies. However, reliable universal methods of sEVs isolation and study have not been developed yet. **Objective.** To develop a modification of the method of sEVs isolation and to use the modified method for isolation of sEVs of neuronal origin. **Materials and Methods.** Using polyethylene glycol (PEG) precipitation at different pH and ionic strength values, sEVs were isolated from the blood of healthy volunteers. Immunoprecipitation was used to isolate sEVs of neuronal origin. Neuronal sEVs were biotinylated, and biotinylated proteins were identified by mass spectrometry. **Results.** As a result of this work, a modification of the PEG precipitation method at acidic pH values was developed, which allowed to increase the yield of neuronal sEVs several times. The surface proteins of sEVs were identified; these proteins were serum albumin, apolipoprotein B, complement system components C1r, C1q, C1s, C3 and immunoglobulin heavy chains. **Conclusion.** PEG precipitation under acidic conditions allows the isolation of more neuronal sEVs from serum than PEG precipitation did in neutral medium. At the same time, neuronal sEVs in blood most likely exist in complex with blood proteins, representing the so-called protein “corona”.

Key words: astrocytes, biotinylation, neurons, polyethylene glycol, small extracellular vesicles, surface proteins

For citation: Kostina VV, Yakovlev AA. Precipitation of small extracellular blood vesicles under acidic conditions and the use of this method to isolate vesicles of neuronal origin. Translational Medicine. 2025; 12(1): 37-50. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-37-50. EDN: XHTWOB

Список сокращений: КТ — комнатная температура, мВВ — малые внеклеточные везикулы, ПААГ — полиакриламидный гель, ПЭГ 6000 — полиэтиленгликоль, молекулярная масса около 6000, Alix — белок внутриклеточной системы упаковки и транспорта везикул, характерный маркер мВВ, CD171 (L1CAM) — белок мембран нейронов, ха-

актерный маркер мВВ нейронального происхождения, DTT — дитиотрейтол, Flotillin-1 — интегральный мембранный белок, характерный маркер мВВ, GFAP — белок цитоскелета астроглиальных клеток, маркер мВВ астроглиального происхождения, PBS — фосфатно-солевой буфер, SDS — додецилсульфат натрия, TNT — буфер для про-

мывки нироцеллюлозных мембран, состоящий из 10 mM Трис pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20.

Введение

В настоящее время очень активно проходят исследования свойств и функций мВВ [1]. Создано международное сообщество по изучению мВВ и опубликованы соответствующие методические рекомендации [2]. Существующий интерес к этой теме обусловлен вовлечением мВВ в межклеточную коммуникацию внутри организма при многих физиологических процессах. Изучение содержимого мВВ дает подсказку о состоянии секретировавшей мВВ клетки, поэтому за мВВ признается очень большой потенциал в диагностике заболеваний человека. В условиях лаборатории внутрь мВВ можно загрузить практически любое лекарство, и с учетом того, что мВВ способны проникать через гистогематические барьеры и не разрушаются фагоцитирующими клетками, они могут оказаться полезными средствами доставки лекарственных препаратов [3]. Для того чтобы использовать мВВ в качестве средств доставки, необходимо исследовать способы их взаимодействия с клетками-мишенями. Не до конца известно, чем определяется специфичность взаимодействия мВВ с клетками. По всей видимости, мембрана мВВ должна содержать молекулы, которые обеспечивают распознавание и избирательное связывание с определенными типами клеток.

На сегодняшний день в подавляющем большинстве исследований нет ответа на вопрос, каким образом мВВ и клетки-мишени узнают друг друга. Известно, что одним из вариантов узнавания может быть взаимодействие интегринов на мембране мВВ с клеткой-мишенью [4]. Насколько широко распространен этот механизм, остается неизвестным. Только непосредственное изучение поверхностных белков мВВ позволит определить механизмы их взаимодействия с клетками и предположить, с какими именно клетками мВВ могут взаимодействовать. Немаловажно и то, что поверхностные белки мембран мВВ могут служить маркерами заболеваний.

Доступная в настоящее время информация о поверхностных белках мВВ нейронального происхождения получена в результате масс-спектрометрических экспериментов. Однако, даже если белок присутствует в образцах нейрональных мВВ, невозможно сказать, находится ли данный белок на поверхности мВВ и, если находится, доступен ли он, например, для антител в растворе? Как и для большинства мВВ, поверхностные белки мВВ нейронального происхождения практически не изучены в прямых экспериментах. Фактически активно

используется только один более-менее надежный маркер нейрональных мВВ, белок CD171 (он же L1CAM). Метод выделения нейрональных мВВ основан на преципитации всех везикул из сыворотки с помощью ПЭГ [5] с последующей иммунопреципитацией нейрональных везикул с помощью антител против нейронального белка CD171 [6]. Материалом для исследования служит сыворотка крови [6]. В своей работе мы предприняли попытку исследования поверхностных белков мВВ нейронального происхождения. Для этого была разработана модификация метода преципитации с ПЭГ, позволяющая добиться большего выхода нейрональных везикул.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование были включены 25 здоровых добровольцев от 18 до 60 лет, набранные в Московском научно-практическом центре психоневрологии ДЗМ. Критериями исключения были: расстройства шизофренического спектра; история злоупотребления алкоголем и психоактивными веществами; тяжелые неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, черепно-мозговые травмы); дислипидемия; эндокринные нарушения (сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы или прием тиреотропных препаратов/заместительная терапия); любые инвалидизирующие заболевания внутренних органов; серьезный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки перед обследованием, круглосуточные смены, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период участия в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом, и все участники подписали информированное согласие до его начала.

Сбор образцов

В качестве материала для исследования использовали сыворотку крови. Забор крови осуществляли утром натощак путем венепункции в пробирки VACUETTE (#454204, Greiner). Учитывая, что на формирование мВВ влияет множество факторов, процедура забора крови и преаналитический этап пробоподготовки были максимально стандартизированы. Для всех проб соблюдались одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, тип пробирок и размер иглы (21,5G); временной интервал (не более 30 мин.) и комнатная температура между забором крови и центрифугированием (около 22 °C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа.

Выделение мВВ с помощью преципитации ПЭГ

Малые внеклеточные везикулы выделяли согласно описанному нами протоколу с некоторыми модификациями [7]. Перед преципитацией мВВ образцы сыворотки крови очищали от остатков клеток, агрегатов и высокомолекулярных комплексов с помощью центрифужной фильтрации. Если этого не сделать, во фракции мВВ окажутся везикулы не эндосомального происхождения (например, апоптотические тельца) и не везикулярные частицы (например, агрегаты сывороточных белков). Сыворотку быстро размораживали при 37 °С в воде. Медленная разморозка приведет к выпадению в осадок криоагрегатов. Сыворотку разводили 1 мл + 4 мл PBS и сразу же фильтровали через центрифужный фильтр 0,45 мкм 3000 g 15 мин. при КТ. После этого к 4 мл разведенной сыворотки добавляли 4 мл 6 % ПЭГ 6000 (w/v в воде) и смесь инкубировали 30 мин. в холодильнике. Затем образцы центрифугировали при 1000 g 30 мин. при 4 °С. Полученный осадок промывали 1 мл PBS и растворяли в 1 мл PBS. При необходимости полученную фракцию замораживали при -80 °С.

Модификация метода преципитации мВВ с помощью ПЭГ

Изменения в базовом протоколе касаются стадии преципитации мВВ из сыворотки с помощью ПЭГ 6000. А именно: преципитация ПЭГ была проведена при разных значениях pH и при разных значениях ионной силы. Для проверки эффективности выделения мВВ из сыворотки крови при разных значениях pH были приготовлены растворы 6 % ПЭГ 6000 (w/v) не только в воде, но и в 0,2 М HEPES pH 8,0 или 7,0, в MES pH 6,0 и в 0,2 М ацетате натрия pH 5,0 или pH 4,0. Все растворы содержали 10 mM ЭДТА. Для проверки эффективности выделения мВВ из сыворотки крови при разных значениях ионной силы были приготовлены такие же растворы, содержащие 0,2 М хлорида натрия. Во всем остальном модифицированная схема преципитации ПЭГ не отличалась от базовой.

Модифицированный метод выделения мВВ из сыворотки крови человека при кислых значениях pH был использован в дальнейших экспериментах по выделению мВВ нейронального происхождения. Эта модификация заключалась в том, что преципитация мВВ с помощью ПЭГ происходила в 0,1 М ацетате натрия pH 5,0 в присутствии 0,1 М хлорида натрия.

Выделение мВВ нейронального происхождения

Выделенные с помощью ПЭГ везикулы служат материалом для выделения мВВ нейронального

происхождения [6]. Для этих целей был использован практически единственный на сегодня метод выделения нейрональных везикул — преципитация с использованием антител к белку L1CAM (другое название CD171), содержащемуся на мембранах нейрональных везикул. мВВ 0,5 мл инкубировали 4 ч. в холодильнике в присутствии 4 мкг мышинных антител к белку CD171 (L1CAM) человека (клон 5G3, eBioscience, США). Затем к смеси добавляли 15 мкл иммобилизованного стрептавидина (Ultralink, Thermo Scientific, США) в 25 мкл PBS и инкубировали ночь при 4 °С. Затем смесь центрифугировали 1 мин. при 500 g. Осадок смолы ресуспендировали в 100 мкл 0,1 М глицина pH 2,8, быстро встряхивали на вортексе и центрифугировали при 4500 g при 4 °С для диссоциации нейрональных мВВ и смолы. Элюат сразу нейтрализовывали с помощью 1 М Tris. Супернатанты содержат нейрональные мВВ (т. е. мВВ, содержащие белок CD171 в мембране). Исходный протокол в качестве одного из компонентов раствора для преципитации нейрональных везикул содержал 3 % БСА [6]. В предварительных экспериментах мы установили, что даже при тщательной отмывке часть БСА попадает в элюат и может маскировать истинно везикулярные белки при электрофоретическом разделении. По этой причине БСА был исключен из всех растворов при выделении мВВ нейронального происхождения.

Биотинилирование поверхностных белков мВВ нейронального происхождения и выделение биотинилированных белков

Нейрональные мВВ переводили в буфер PBS, не содержащий аминов, с помощью гель-фильтрации на спин-колонках Biorad Biogel P6. Поверхностные белки мВВ биотинилировали в 0,5 мл раствора Sulfo-NHS-SS-Biotin (ApexBio, Китай) концентрацией 0,6 мг/мл в PBS 30 мин. при КТ при покачивании. Остатки непрореагировавшего Sulfo-NHS-SS-Biotin удаляли с помощью гель-фильтрации на спин-колонках Biorad Biogel P6. мВВ лизировали в 1x RIPA (50 mM Трис, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % дезоксихолата натрия, 0,1 % SDS) 30 мин. при интенсивном помешивании при КТ. Затем к смеси добавляли 30 мкл иммобилизованного на магнитных частицах стрептавидина (Dynamag, Thermo Scientific, США) в PBS и инкубировали 30 мин. при КТ. Связанные белки диссоциировали от смолы в 50 мкл 1x буфера Лэммли (62,5 mM Трис pH 6,8, 10 % глицерин, 2 % SDS, 0,01 % бромфеноловый синий, содержащий или не содержащий 100 mM DTT) в течение 30 мин. при перемешивании при 95 °С.

Электрофоретическое разделение биотинилированных белков

Все пробы наносили по 20 мкл в лунку 10-луночного 10 % ПААГ. Разделяли белки при силе тока 20 мА на гель в течение примерно 60 мин., после чего один гель окрашивали серебром (пробоподготовка включала прогрев с DTT, описание ниже), а содержимое второго (пробоподготовка не включала прогрев с DTT) переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Места неспецифического связывания на мембране блокировали 5 % обезжиренным молоком 30 мин. при покачивании при КТ. Конъюгат стрептавидин-пероксидазы (Invitrogen, США, разведение 1/5000) инкубировали с мембраной в течение ночи в холодильнике при покачивании в 30 мл 5 % молока. Мембраны промывали буфером TNT (20 мМ Трис pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween 20) 5 x 5 мин. и проявляли субстратом Clarity Max Western (Bio-Rad, США) на приборе MicroChem (DNR, Израиль) в автоматическом режиме выбора времени экспозиции.

Окраска нитратом серебра

Окрашивание гелей нитратом серебра проводили, как описано ранее, с минимальными изменениями [8]. Гель после электрофореза быстро ополаскивали водой и погружали на 10 мин. в фиксирующий раствор (50 % этанол, 10 % уксусная кислота), затем отмывали сначала 10 мин. в 10 % спирте, затем еще 10 мин. в воде. После этого проводили сенситизацию (2 мин. в растворе 0,02 % тиосульфата натрия) и после 2 мин. отмывки водой инкубировали 20 мин. в растворе 0,1 % нитрата серебра. Для проявления окраски гель помещали в раствор 0,1 % формальдегида, 2 % соды, а для остановки реакции окрашенный гель помещали в 50 мМ EDTA. Окрашенные полосы вырезали из геля и определяли последовательность содержащихся в них белков с помощью масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрическая идентификация белков

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Аминокислотную последовательность определяли при помощи MALDI масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker, Германия). Предварительный протеолиз в полиакриламидном геле проводили с использованием трипсина (Promega, USA) в течение 3 ч. при 37 °С. При нанесении на мишень 1,5 мкл образца смешивали с 0,5 мкл раствора 2,5-дигидрок-

сибензойной кислоты. Спектры после протеолиза получали в отраженном режиме прибора в диапазоне 500–6500 m/z, точность измеренных моноизотопных масс не превышала 0,004 % (40 ppm); для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора. Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik, Германия). Идентификация пептидов осуществлялась с помощью опции «пептидный фингерпринт» в программе Biotools 3.2 (Bruker Daltonik, Германия) по базе данных SwissProt.

Материалы

В работе были использованы антитела против белков Alix (Cell Signaling Technology, Rabbit mAb #92880), Flotillin-1 (Cell Signaling Technology, Rabbit mAb #18634), GFAP (DAKO, Rabbit pAb #Z0334), CD171 (L1CAM) (eBioscience, biotinylated Mouse mAb #13-1719-32), конъюгат стрептавидин-пероксидазы (Invitrogen, #21126), меченные пероксидазой вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика (Biorad, # 1706515). Все использованные реактивы были качеством не ниже, чем химически чистые.

Иммуноблоттинг

Все пробы MBV 5 мин. прогревали при 95 °С, каждый образец 40 мкл плюс 10 мкл 5x буфера Лэммли (1x это 62,5 мМ Трис pH 6,8, 10 % глицерин, 2 % SDS, 100 мМ DTT 0,01 % бромфеноловый синий) и наносили по 10 мкл в лунку 10-луночного 10 % ПААГ. Разделяли белки при силе тока 15 мА на гель в течение примерно 120 мин., после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Места неспецифического связывания антител блокировали 5 % обезжиренным молоком 30 мин. при покачивании при КТ. Антитела инкубировали с мембраной в течение ночи в холодильнике при покачивании в конвертах по 1 мл в 5 % молоке. Были использованы антитела против следующих антигенов: L1CAM (CD171, мышинные биотинилированные, производство eBioscience), разведение 1/1000; Alix (кролик, производство CST), разведение 1/1000; GFAP (кролик, производство DAKO), разведение 1/4000; Flotillin-1 (кролик, производство CST), разведение 1/1000. Мембраны промывали буфером TNT (20 мМ Трис pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween 20) 5 x 5 мин. и инкубировали со вторичными антителами (Bio-Rad, США, антикролик, разведение 1/3333) или конъюгатом стрептавидин-пероксидазы (Invitrogen, США, разведение 1/3333) при покачивании при КТ в 10 мл 5 % молока 60 мин. Промывали TNT 5 x 5 мин. и про-

являли субстратом Clarity Max Western (Bio-Rad, США) на приборе MicroChem (DNR, Израиль). Количественную оценку экспрессии белков проводили с помощью ImageJ (Университет штата Висконсин, США) и выражали в условных единицах (УЕ), пропорциональных площади белковой полосы и ее интенсивности.

Определение концентрации белка по методу Бредфорда

Пробы 30 мкл аккуратно смешивали с 45 мкл раствора Кумасси в биохимическом планшете на 384 лунки и инкубировали смесь 15 мин. КТ. Пробы после преципитации ПЭГ предварительно разводили 1/20 в PBS, в качестве калибровочного стандарта использовали растворы БСА в PBS в диапазоне концентраций 1–1000 мкг/мл. Определяли поглощение при 595 нм и по калибровочному графику переводили поглощение в концентрацию белка.

Определение концентрации и размера выделенных мВВ с помощью динамического светорассеяния и анализа траекторий наночастиц

Свойства мВВ исследованы с использованием оборудования Центра коллективного пользования № 40606 ИВНД и НФ РАН «Функциональное картирование мозга». Динамическое светорассеяние мВВ определяли с помощью прибора Zetasizer Nano S производства Malvern Panalytical (Великобритания). В одноразовую пластиковую кювету наливали разведенные в 25 раз в PBS мВВ и определяли светорассеяние на угол 173 градуса на длине волны 633 нм за два повтора длительностью по 20 сек. каждый. Этот метод позволяет не только вычислить размер наночастиц, но также и определить число отраженных фотонов, выражаемое в тысячах фотонов в секунду, kcps. Общее число отраженных фотонов используется для вычисления размера частиц, но также служит и самостоятельным параметром, характеризующим образец.

Анализ траекторий наночастиц проводили на приборе NanoSight NS300 производства Malvern Panalytical (Великобритания). В качестве источника света в приборе используется лазер с длиной волны 488 нм. Свет от лазера входит в проточную кювету, содержащую образец, и рассеивается на мВВ. Под углом около 90 градусов к направлению света находится объектив микроскопа, через который все рассеивающие свет частицы снимаются на камеру с частотой 25 кадров в секунду. Последующая компьютерная обработка отснятого видео позволяет проследить траекторию движения каждой частицы индивидуально и, используя уравнение Стокса-Эйнштейна, из величины пере-

мещения за единицу времени вычислить размер частицы. Образец постоянно подается в проточную кювету с помощью шприцевого насоса, что позволяет записать на видео движение большого числа индивидуальных везикул. Прибор поддерживает постоянную температуру во время эксперимента. Выделенные везикулы разводили в PBS в 100 раз и снимали два видео продолжительностью 30 сек. каждое, результаты для каждого образца получали усреднением результатов обработки двух видеороликов. При таком разведении в каждом кадре оказывается около ста отдельных мВВ. Скорость прокачки образца насосом составляла 60 у. е., так что суммарное число треков на каждом видео составляло около двух тысяч. При компьютерной обработке видео выставляли одинаковые для всех образцов параметры обсчета, Blur 5x5, Max jump 12, Min track length 5.

Статистический анализ

Для обработки и графического представления результатов использовали программу GraphPad Prism ver. 10. Получены репрезентативные результаты как минимум трех независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты

Для разработки протокола преципитации была проведена серия дополнительных экспериментов. Обычно преципитацию мВВ с помощью ПЭГ выполняют либо в буфере с нейтральным pH, либо без буфера вообще. Наши предварительные эксперименты показали, что при нейтральном pH выход как тотальной фракции мВВ, так и фракции мВВ нейронального происхождения настолько мал, что не позволяет надежно детектировать поверхностные белки мВВ (данные не представлены). Из данных литературы известно, что одним из способов увеличения выхода мВВ при преципитации ПЭГ является закисление [9], поэтому в серии экспериментов мы попробовали увеличить выход мВВ за счет изменения pH, при котором происходит преципитация ПЭГ. Для преципитации были использованы растворы от pH 8,0 до pH 4,0, а также раствор ПЭГ без добавления какого-либо буфера. Количество выделенных мВВ оценивали с помощью иммуноблоттинга. Результаты эксперимента отображены на рисунке 1. Оценка интенсивности экспрессии белков на рисунке 1 проведена в программе ImageJ, результаты представлены в таблице 1.

Оказалось, что модификация метода с использованием преципитации ПЭГ при кислом pH по-разному влияет на выделение мВВ в зависимо-

сти от содержания на мВВ характерных маркеров (рис. 1 и табл. 1). Самая большая разница по эффективности преципитации мВВ между кислым и нейтральным рН (практически втрое) была обнаружена для мВВ, содержащих белок L1CAM, то есть для нейрональных везикул. Менее выраженная — для мВВ, содержащих белок GFAP, то есть для астро-

глиальных везикул, и для мВВ, содержащих белок Alix. При этом эффективность выделения мВВ, содержащих Flotillin-1, практически не изменилась (рис. 1 и табл. 1).

Маркеры Alix, Flotillin-1 и GFAP выкрашиваются иммуноблоттингом в виде одной полосы, тогда как маркер нейрональных мВВ CD171 за счет

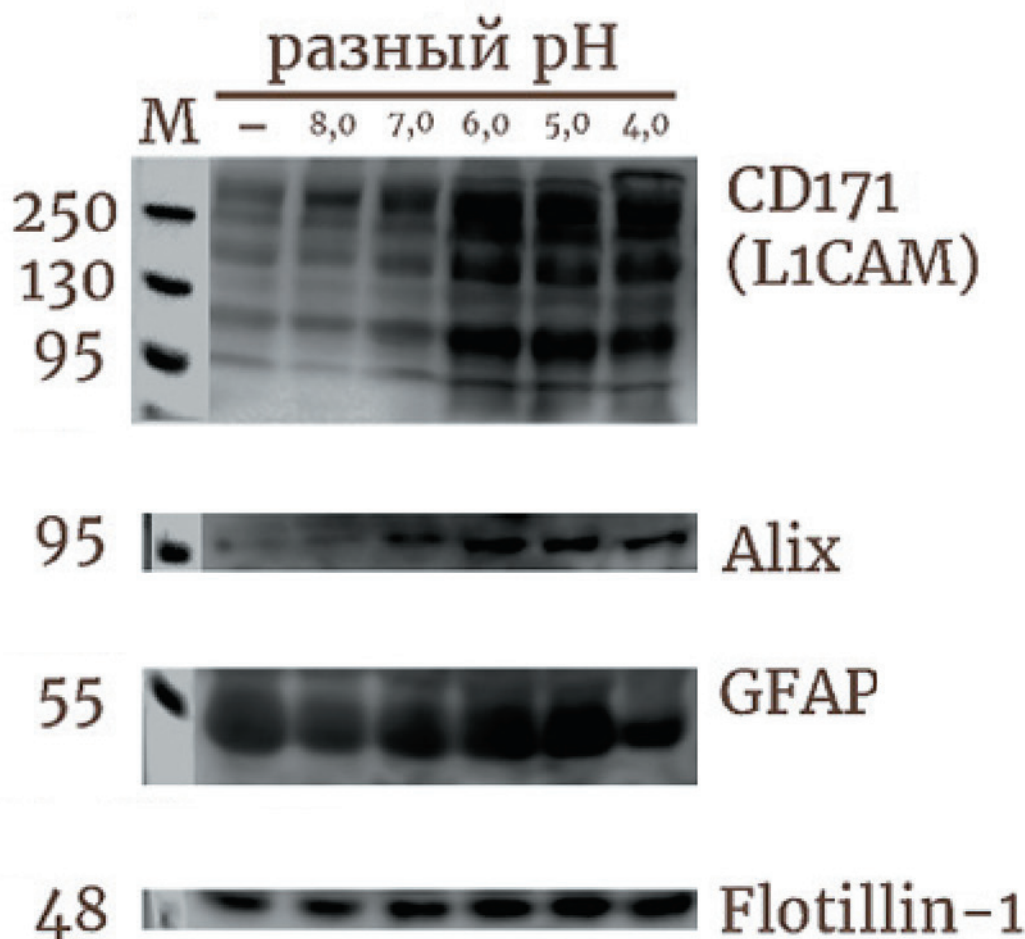


Рис. 1. Окрашивание антителами мВВ после преципитации ПЭГ с разным рН (подробности эксперимента в тексте)

Преципитацию ПЭГ проводили при значениях рН от 4,0 до 8,0, знаком «-» обозначена преципитация раствором ПЭГ без доведения рН. CD171 (L1CAM) — белок мембран нейронов, характерный маркер мВВ нейронального происхождения; Alix — белок внутриклеточной системы упаковки и транспорта везикул, характерный маркер мВВ; GFAP — белок цитоскелета астроглиальных клеток, маркер мВВ астроглиального происхождения; Flotillin-1 — интегральный мембранный белок, характерный маркер мВВ. Содержание всех исследованных антигенов во фракции мВВ увеличивается по мере закисления преципитирующего раствора с ПЭГ. Слева М — маркер молекулярного веса, кДа.

Figure 1. Staining with mBB antibodies after precipitation of PEG with different pH (details of the experiment are in the text)

PEG precipitation was carried out at pH values from 4.0 to 8.0, the “-” sign indicates precipitation with a PEG solution without bringing the pH. CD171 (L1CAM) is a neuronal membrane protein, a characteristic marker of mBB of neuronal origin; Alix is a protein of the intracellular system of packing and transporting vesicles, a characteristic marker of mBB; GFAP is a protein of the cytoskeleton of astroglial cells, a marker of mBB of astroglial origin; Flotillin-1 is an integral membrane protein, a characteristic marker of mBB. The content of all studied antigens in the mBB fraction increases as the precipitating solution with PEG acidifies. On the left M is the molecular weight marker, kDa.

представленности разных изоформ выкрашивается в виде целой серии полос с основными полосами на 250, 170 и 120 кДа.

Результатом выделения тотальных мВВ по разработанному нами протоколу с использованием кислого ПЭГ стало примерно пятикратное увеличение выхода. По данным динамического светорассеяния и анализа траекторий наночастиц при выделении с нейтральным ПЭГ количество выделяемых частиц составляло около 2×10^{11} частиц/мл, а в экспериментах с использованием кислого ПЭГ число выделенных частиц составило около 10^{12} частиц/мл. Точный расчет, насколько больше частиц нейронального происхождения выделяет этот метод, затруднен, так как нейрональные мВВ составляют очень малую долю в общем числе частиц, а существующие методы

не обладают соответствующей чувствительностью. Размер выделенных частиц не изменился и при любой процедуре выделения составлял около 120 нм.

Результат использования кислого pH для преципитации мВВ также хорошо заметен при определении концентрации общего белка (рис. 2). Все осадки после преципитации ПЭГ растворяли в 1 мл PBS и определяли количество растворенного белка в этом растворе. Так, при использовании для преципитации растворов ПЭГ с pH от 8,0 до 6,0 количество выделенного белка не превышает 1 мг, а при использовании для преципитации растворов ПЭГ с pH 5,0 и 4,0 количество выделенного белка составляет 2 мг и 3,5 мг соответственно. Судя по всему, применение для преципитации кислых растворов ПЭГ существенно увеличивает как специфический выход

Таблица 1. Оценка уровня экспрессии белков в везикулах, выделенных при разных значениях pH, у. е.

Table 1. Assessment of the level of protein expression in vesicles isolated at different pH values, SU

	Без доведения pH	pH 8,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 5,0	pH 4,0
L1CAM	4,0	4,7	5,6	14,1	11,5	14,1
Alix	1,4	1,5	2,3	4,5	3,6	4,0
GFAP	11,6	8,2	13,4	17,0	15,1	7,2
Flotillin	12,2	10,7	10,5	9,5	8,7	9,3

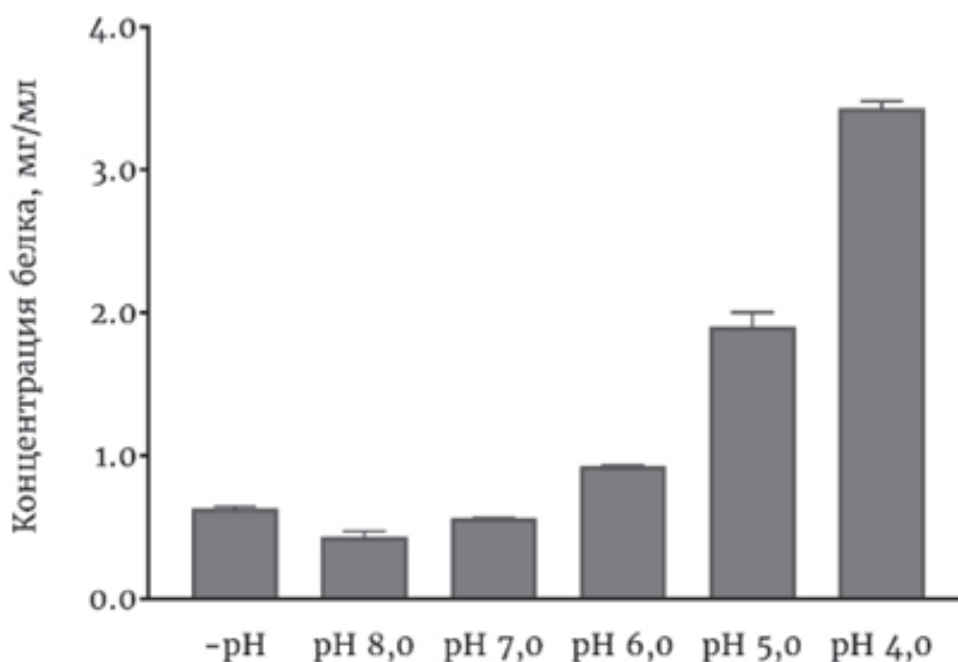


Рис. 2. Концентрация тотального белка в мВВ после преципитации ПЭГ с разным pH

Figure 2. Total protein concentration in mBB after PEG precipitation with different pH

мВВ (рис. 1), так и количество выделяемого белка (рис. 2). Выделение при кислом значении pH позволило получить в 2–4 раза больше тотального белка.

Однако увеличение выхода общего белка не всегда играет на пользу выделению специфических субфракций мВВ. Как правило, увеличение количества общего белка означает увеличе-

ние количества балластного примесного белка, не имеющего отношения к мВВ. Стоит отметить, что преципитация ПЭГ не является специфичным методом выделения мВВ и зачастую этим методом выделяется значительное количество примесного белка. В попытке снизить количество примесного белка мы провели еще серию экспериментов

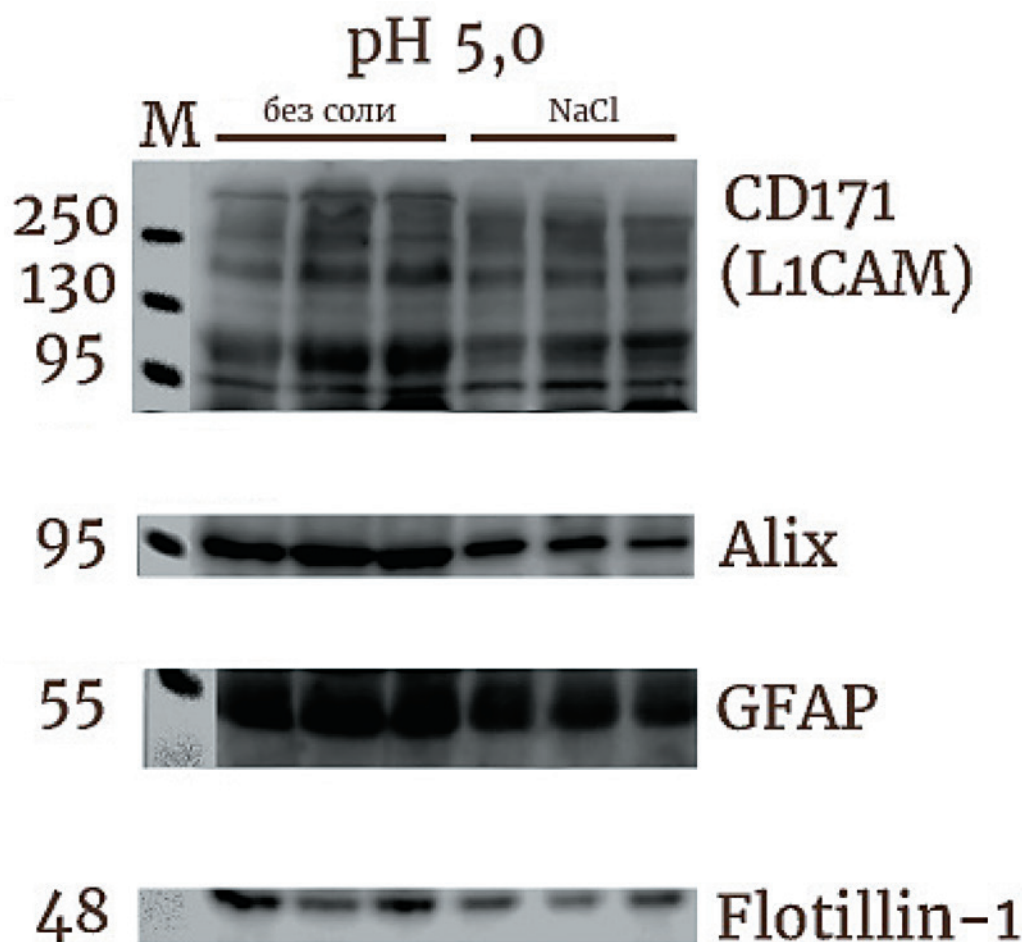


Рис. 3. Окрашивание антителами мВВ после преципитации ПЭГ pH 5,0, содержащим или не содержащим 0,2 М NaCl (подробности эксперимента в тексте)

CD171 (L1CAM) — белок мембран нейронов, характерный маркер мВВ нейронального происхождения; Alix — белок внутриклеточной системы упаковки и транспорта везикул, характерный маркер мВВ; GFAP — белок цитоскелета астроглиальных клеток, маркер мВВ астроглиального происхождения; Flotillin-1 — интегральный мембранный белок, характерный маркер мВВ. Содержание всех исследованных антигенов во фракции мВВ, преципитированных ПЭГ без соли, немного превышает содержание этих белков при преципитации раствором ПЭГ, содержащим 0,2 М NaCl. Слева М — маркер молекулярного веса, кДа.

Figure 3. Staining with mBB antibodies after precipitation of PEG pH 5.0, containing or not containing 0.2 M NaCl (details of the experiment are in the text)

CD171 (L1CAM) is a neuronal membrane protein, a characteristic marker of mBB of neuronal origin; Alix is a protein of the intracellular system of packing and transporting vesicles, a characteristic marker of mBB; GFAP is a protein of the cytoskeleton of astroglial cells, a marker of mBB of astroglial origin; Flotillin-1 is an integral membrane protein, a characteristic marker of mBB. The content of all the studied antigens in the mBB fraction precipitated by PEG without salt is slightly higher than the content of these proteins when precipitated with a PEG solution containing 0.2 M NaCl. On the left M is the molecular weight marker, kDa.

по преципитации мВВ с помощью ПЭГ в буферах с разной ионной силой. Данные литературы указывают на возможность преципитации мВВ в буфере, содержащем, помимо ПЭГ, 0,1 М NaCl [10] and their presence in biofluids can be indicative for (patho. В следующей серии экспериментов мы использовали ацетатный буфер pH 5,0, в который

добавляли или не добавляли 0,1 М NaCl. Количество выделенных мВВ также оценивали с помощью иммуноблоттинга. Результаты эксперимента изображены на рисунке 3. Оценка интенсивности экспрессии белков (усредненное значение для трех параллелей) на рисунке 3 проведена в программе ImageJ, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Оценка уровня экспрессии белков в везикулах (усредненное значение для трех параллелей), выделенных при разных значениях ионной силы, у. е.

Table 2. Assessment of the level of protein expression in vesicles (average value for three parallels) isolated at different values of ionic strength, SU

	Без соли	0,1 М NaCl
L1CAM	10,3	9,3
Alix	13,0	11,5
GFAP	16,6	11,4
Flotillin	12,9	9,7

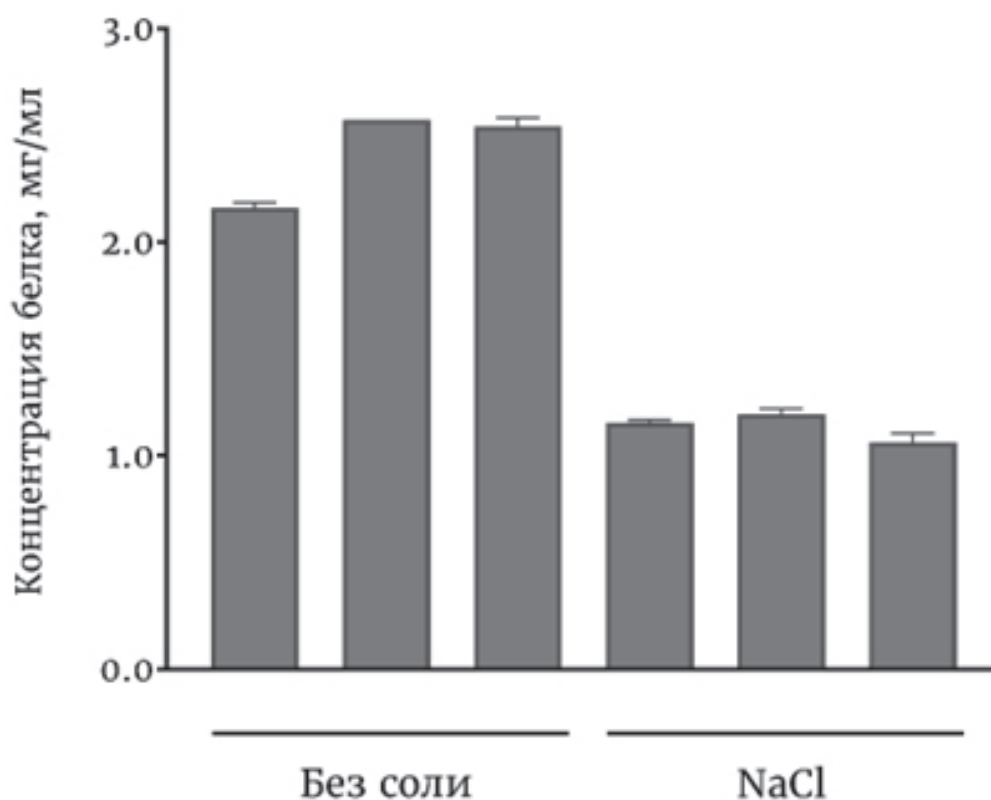


Рис. 4. Концентрация тотального белка в мВВ после преципитации ПЭГ pH 5,0 с разной концентрацией хлорида натрия

Figure 4. Total protein concentration in mBB after precipitation of PEG pH 5.0 with different concentrations of sodium chloride

Полученные результаты свидетельствуют о том, что преципитация мВВ с помощью ПЭГ более эффективна без использования соли (рис. 3). Наличие NaCl, тем не менее, не сильно сказывается на выходе мВВ и нигде не приводит даже к двукратному изменению эффективности (рис. 3). Результат использования соли для преципитации мВВ также хорошо заметен при определении концентрации общего белка (рис. 4).

Выделенные с помощью ПЭГ мВВ использовали для преципитации мВВ нейронального происхождения с применением антител против L1CAM. В дальнейшем мВВ нейронального происхождения использовали для биотинилирования и выделения поверхностных белков. Результат одного репрезентативного эксперимента по выделению поверхностных белков мВВ нейронального происхождения представлен на рисунке 5. Окрашены белки в широком диапазоне молекулярных масс, причем между образцами конкретные полипептидные полосы обычно совпадают. Статистического сравнения интенсивности полосок не проводили, была

выполнена только качественная идентификация полипептидов.

Очень похожий профиль окрашивания обнаружен и для биотинилированных белков (рис. 6). Однако заметно, что всего полипептидов (рис. 5) больше, чем биотинилированных пептидов (рис. 6).

Обсуждение

В работе представлена новая модификация метода выделения мВВ из сыворотки крови, и данная модификация позволяет выделять в несколько раз больше везикул именно нейронального происхождения. Различия между эффективностью выделения мВВ с разными маркерами могут свидетельствовать в пользу структурных различий, существующих между мВВ сыворотки крови. Структурные различия в контексте преципитации при разных pH означают, скорее всего, разный заряд поверхностных белков на мембранах мВВ разного происхождения.

Кроме того, нами обнаружен очень полезный для преципитации мВВ эффект, заключающийся

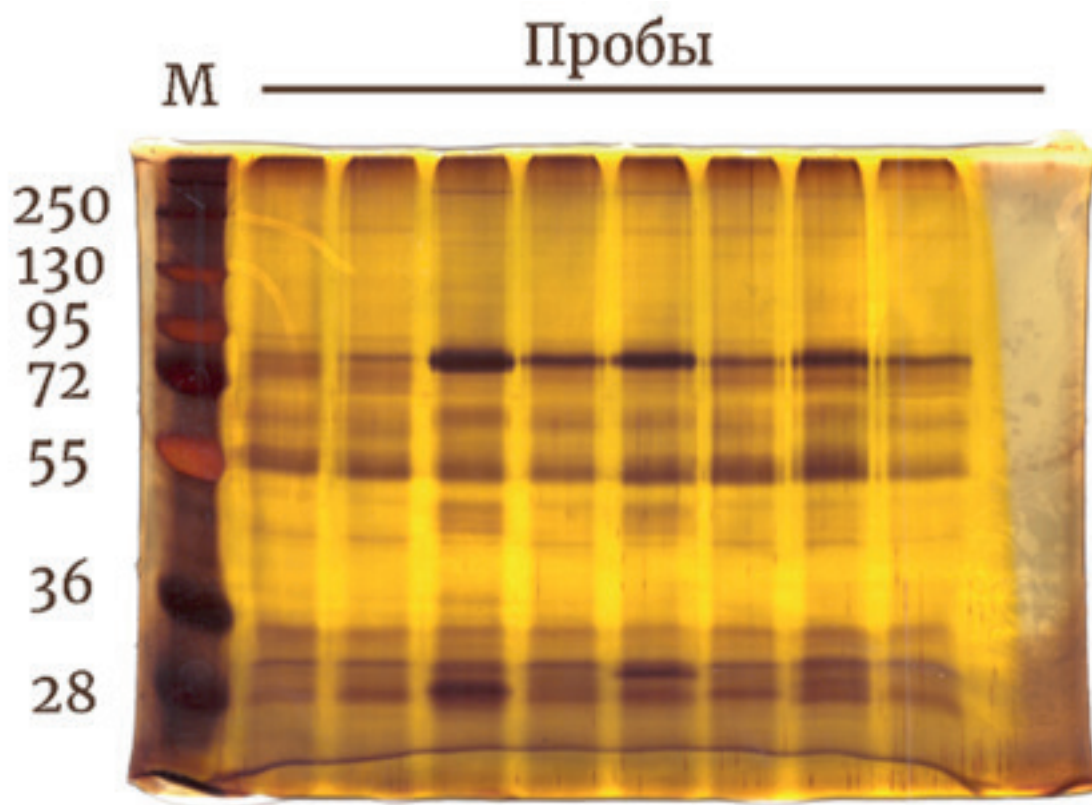


Рис. 5. Результат окрашивания нитратом серебра поверхностных белков мВВ нейронального происхождения

Слева М — маркер молекулярного веса, кДа.

Figure 5. Result of staining of mBB surface proteins of neuronal origin with silver nitrate
On the left M is the molecular weight marker, kDa.

ся в том, что применение солевого буфера делает осадок мВВ более плотным. Такое качество очень полезно, особенно при выделении мВВ одновременно из большого числа проб, так как неплотные осадки могут быть легко потеряны при промывке. Важным фактором при выборе состава преципитирующего раствора также является тотальное количество выделяемого белка (в основном это количество примесного белка).

Полученные результаты не оставляют сомнений в том, что добавление соли снижает выход тотального белка при преципитации ПЭГ. Судя по всему, огромная часть выделяемого белка не принадлежит мВВ и является примесью. Таким образом, несмотря на некоторое снижение выхода специфических маркеров мВВ при преципитации в буфере, содержащем 0,1 М соли (рис. 3), общая эффективность выделения мВВ в присутствии соли возрастает, так как количество примесного белка снижается практически в два раза (рис. 4).

Разработанный подход позволил нам биотинилировать поверхностные белки мВВ нейронального происхождения. Весь белковый трек на рисунке

6 окрашивается стрептавидин-пероксидазой, что говорит о достаточно большом числе биотинилируемых нашим методом белков. Конечно, далеко не каждый белок, помеченный биотином, может быть успешно идентифицирован, но, по крайней мере, в этом направлении можно продолжать исследования. Паттерн биотинилирования (рис. 6) повторяет общий профиль белков по окрашиванию серебром (рис. 5). Наблюдаемые отличия могут быть связаны с тем, что часть белков непосредственно не биотинилируется, но выделяется в комплексе вместе с биотинилированными белками.

Масс-спектрометрический анализ выявил несколько белков, присутствующих в пробах. Ими оказались сывороточный альбумин, аполипопротеин В, компоненты системы комплемента C1r, C1q, C1s, C3 и тяжелые цепи иммуноглобулинов. Нельзя не отметить, что все эти белки являются одними из основных белковых компонентов крови. Полученный результат допускает только одну интерпретацию — циркулирующие в крови мВВ (в нашем случае нейрональные, но, вероятно, и мВВ иного происхождения) покрыты снаружи белковой «шу-

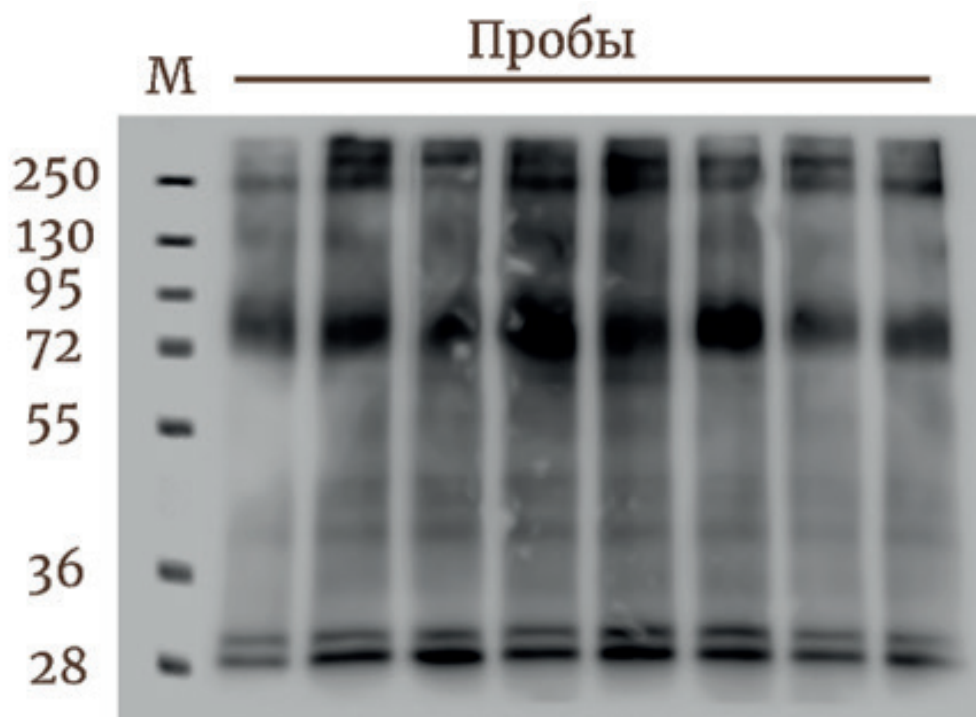


Рис. 6. Результат окрашивания стрептавидин-пероксидазой биотинилированных поверхностных белков мВВ нейронального происхождения

Слева М — маркер молекулярного веса, кДа.

Figure 6. Result of staining with streptavidin peroxidase of biotinylated mBB surface proteins of neuronal origin

On the left M is the molecular weight marker, kDa.

бой», то есть слоем белков, плотно закрепленных на внешней мембране мВВ. Очень похожие результаты были получены на мВВ из других источников [11, 12]. В частности, альбумин, иммуноглобулины и белки комплемента обнаруживаются в 100 % везикул крови, а аполипопротеин В в 66 % везикул [11]. Для того чтобы мВВ оказались полностью покрыты белками крови, требуется от 15 до 30 мин. инкубации мВВ в очищенной от клеток сыворотке [11, 12].

Подозрение о том, что обнаруживаемые белки крови являются примесью и результатом несовершенства методов выделения, было тщательно проверено. Оказалось, белки крови по-настоящему заякорены на внешней мембране мВВ, что показано с помощью иммуно-колокализации посредством электронной микроскопии и с помощью радиоиндирования мВВ [11, 12]. Несколько методов выделения, дифференциальное центрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности и гель-фильтрация, подтверждают нахождение белков крови на внешней мембране циркулирующих мВВ [11, 12].

Не все белки, находящиеся на внешней мембране нейрональных мВВ, оказались идентифицированы. Как видно из рисунков 5 и 6, белковых полос гораздо больше, чем удалось четко идентифицировать методами масс-спектрометрии, в первую очередь вследствие недостаточной чувствительности современных методов. Из общих соображений понятно, что белки крови, покрывающие каждую везикулу, будут присутствовать в большем количестве, чем исходные белки нейрональных мВВ, те белки, которые были компонентами везикул еще до выхода этих везикул из мозга в кровь. Таким образом, по результатам наших экспериментов возникает представление о поверхностных белках мВВ нейронального происхождения. А именно, самыми представленными компонентами поверхностного протеома мВВ нейронального происхождения после выхода мВВ из мозга в кровь являются собственные белки крови, то есть компоненты белковой «шубы» мВВ.

Заключение

В работе мы предложили полезную модификацию метода выделения мВВ из крови с помощью ПЭГ. Оказалось, что, если проводить преципитацию ПЭГ при pH 5,0, то выход мВВ увеличивается в несколько раз. Увеличение выхода касается мВВ, содержащих нейрональный маркер L1CAM, но не глиальный маркер GFAP. Кроме того, увеличивается выход мВВ, содержащих Alix, при этом выход мВВ, содержащих Flotillin-1, не изменяется.

Полученные результаты демонстрируют высокую степень гетерогенности мВВ в крови. По этой причине для выделения мВВ с помощью ПЭГ стоит предварительно подбирать оптимальные условия эксперимента для каждой субпопуляции мВВ в образце. Модифицированная схема преципитации стала основой выделения нейрональных мВВ. Применение биотинилирования позволило нам идентифицировать несколько поверхностных белков нейрональных мВВ (сывороточный альбумин, аполипопротеин В, компоненты системы комплемента C1r, C1q, C1s, C3 и тяжелые цепи иммуноглобулинов), которые оказались белками «шубы», формирующими поверхностный протеом мВВ, циркулирующих в крови. Этот результат показывает, что, как и для мВВ других типов, основным компонентом поверхности любых мВВ, циркулирующих в крови, являются белки «шубы».

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgement

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23–25–00011. / The work was carried out with the financial support of the Russian National Science Foundation, project No. 23-25-00011.

Список литературы / References

1. Liu YJ, Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Communication and Signaling*. 2023;21(1):77. DOI:10.1186/s12964-023-01104-5.
2. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2024;13(2):e12404. DOI:10.1002/jev2.12404.
3. Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*. 2021;16(7):748–759. DOI:10.1038/s41565-021-00931-2.
4. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329–335. DOI:10.1038/nature15756.
5. Rider MA, Hurwitz SN, Meckes DG. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci Rep*. 2016;6:23978. DOI:10.1038/srep23978.
6. Goetzl EJ, Boxer A, Schwartz JB, et al. Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in

preclinical Alzheimer disease. *Neurology*. 2015;85(1):40–47. DOI:10.1212/WNL.0000000000001708.

7. Yakovlev AA, Druzhkova TA, Stefanovich A, et al. Elevated Level of Small Extracellular Vesicles in the Serum of Patients With Depression, Epilepsy and Epilepsy with Depression. *Neurochemical Journal*. 2023;17(4):571–583. DOI:10.1134/S1819712423040149.

8. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 1996;68(5):850–858. DOI:10.1021/ac950914h.

9. Ban JJ, Lee M, Im W, Kim M. Low pH increases the yield of exosome isolation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;461(1):76–79. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.03.171.

10. Zhang X, Borg EGF, Liaci AM, et al. A novel three step protocol to isolate extracellular vesicles from plasma or cell culture medium with both high yield and purity. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1791450. DOI:10.1080/20013078.2020.1791450.

11. Tóth EÁ, Turiák L, Visnovitz T, et al. Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(11):e12140. DOI:10.1002/jev2.12140.

12. Yerneni SS, Solomon T, Smith J, et al. Radioiodination of extravesicular surface constituents to study the biocorona, cell trafficking and storage stability of extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2022;1866(2):130057. DOI:10.1016/j.bbagen.2021.130057.

Информация об авторах:

Костина Василиса Васильевна, бакалавр, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России;

Яковлев Александр Александрович, д.б.н., внештатный научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы, ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН».

Authors information:

Vasilisa V. Kostina, Bachelor's degree, Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov;

Alexander A. Yakovlev, Ph.D., Senior Researcher, Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences.