



ISSN 2410- 5155 (Online), ISSN 2311- 4495 (Print)

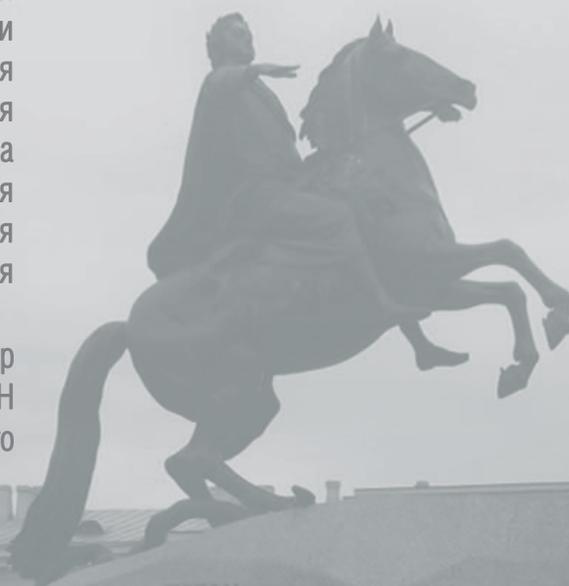
Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

том 12 № 1 / 2025

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто



ПЕТРУ ПЕРВОМУ
ЕКАТЕРИНА ВТОРАЯ
1713



ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 12 № 1 / 2025

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто

**УЧРЕДИТЕЛЬ: Национальный медицинский
исследовательский центр им. В. А. Алмазова**

Министерства здравоохранения Российской Федерации

ISSN 2311–4495 (печатная версия)
ISSN 2410–5155 (электронная версия)



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Шляхто Е. В.

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Конради А. О.

Галагудза М. М.

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

Докшин П. М.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Беленков Ю. Н. (Москва)
Вавилова Т. В. (Санкт-Петербург)
Вебер В. Р. (Великий Новгород)
Волкова Н. И. (Ростов-на-Дону)
Галявич А. С. (Казань)
Гринева Е. Н. (Санкт-Петербург)
Гринштейн Ю. И. (Красноярск)
Даренская М. А. (Иркутск)
Ефремушкина А. А. (Барнаул)
Захарова И. Н. (Москва)
Зенин С. А. (Новосибирск)
Королев Д. В. (Санкт-Петербург)
Кашталап В. В. (Кемерово)
Климонтов В. В. (Новосибирск)
Костарева А. А. (Санкт-Петербург)
Лебедев Д. С. (Санкт-Петербург)
Лопатин Ю. М. (Волгоград)

Макаров С. А. (Кемерово)
Малашичева А. Б. (Санкт-Петербург)
Меликян М. А. (Москва)
Моисеева О. М. (Санкт-Петербург)
Неймарк М. И. (Барнаул)
Никитина И. Л. (Санкт-Петербург)
Протасов К. В. (Иркутск)
Рыжкова Д. В. (Санкт-Петербург)
Рябов В. В. (Томск)
Савченко А. А. (Красноярск)
Садыкова Д. И. (Казань)
Самородов А. В. (Уфа)
Сироткина О. В. (Санкт-Петербург)
Троян В. Н. (Москва)
Усов В. Ю. (Томск)
Чесникова А. И. (Ростов-на-Дону)
Шаповалов К. Г. (Чита)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Ольшанский Б. (США)
Ханссон Г. (Швеция)
Сёберг Г. (Швеция)
Керр Д. (США)
Бакс Ж. (Нидерланды)
Массард Ж. (Франция)
Орлов М. (США)
Содер О. (Швеция)
Феррари Р. (Италия)
Хельманн Р. (Германия)
Сили-Торок Т. (Нидерланды)
Сейерсен Т. (Швеция)
Вааге Я. (Норвегия)
Беркович О. А. (Санкт-Петербург)
Виллевальде С. В. (Санкт-Петербург)
Головкин А. С. (Санкт-Петербург)
Голухова Е. З. (Москва)
Гудкова А. Я. (Санкт-Петербург)
Гурьева И. В. (Москва)
Дземешкевич С. Л. (Москва)
Жлоба А. А. (Санкт-Петербург)
Зазерская И. Е. (Санкт-Петербург)
Заклязьменская Е. В. (Москва)
Звартау Н. Э. (Санкт-Петербург)
Калуев А. В. (Санкт-Петербург)
Карпенко М. А. (Санкт-Петербург)
Карпов Р. С. (Томск)
Козырев С. В. (Санкт-Петербург)
Кухарчик Г. А. (Санкт-Петербург)
Лишманов Ю. Б. (Томск)
Ломиворотов В. В. (Новосибирск)
Мазурок В. А. (Санкт-Петербург)
Маслов Л. Н. (Томск)
Мельниченко Г. А. (Москва)
Михайлов Е. Н. (Санкт-Петербург)
Мосоян М. С. (Санкт-Петербург)
Недошивин А. О. (Санкт-Петербург)
Неймарк А. Е. (Санкт-Петербург)
Поддубный И. В. (Москва)
Пузырев В. П. (Томск)
Салогуб Г. Н. (Санкт-Петербург)
Самочерных К. А. (Санкт-Петербург)
Сидоркевич С. В. (Санкт-Петербург)
Ткачук В. А. (Москва)
Труфанов Г. Е. (Санкт-Петербург)
Фадеев В. В. (Москва)
Чернявский М. А. (Санкт-Петербург)
Шевцов М. А. (Санкт-Петербург)

Свидетельство о рег. ПИ № ФС77–56793 от 29.01.2014 г.

Выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Журнал включен в Российский индекс научного цитирования
Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук».

Периодичность — 6 выпусков в год. Тираж — 1000 экземпляров.
Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова. Корректурa — А. В. Медведева

Издатель: ФОНД «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес редакции и издателя: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон: +7(812)702–37–16

Отпечатано в ООО «Типография Принт24»
Санкт-Петербург, ул. Самойловой, 5

18+

Подача рукописей и переписка с авторами, размещение рекламы и подписка —
e-mail: buletен@almazovcentre.ru

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996

Архив номеров: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396
http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

Все права защищены. © 2025.

Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов

Выход в свет 07.03.2025. Свободная цена

**THE FOUNDER: V. A. Almazov National
Medical Research Centre
Ministry of Health of the Russian Federation**

ISSN 2311-4495 (printed)
ISSN 2410-5155 (online)



EDITOR-IN-CHIEF

Evgeny Shlyakhto

DEPUTY EDITORS:

Alexandra Konradi

Mikhail Galagudza

SCIENTIFIC EDITOR

Pavel Docshin

EDITORIAL BOARD:

Yu. Belenkov (Moscow)
A. Chesnikova (Rostov-on-Don)
M. Darenskaya (Irkutsk)
A. Efremushkina (Barnaul)
A. Galyavich A. S. (Kazan)
E. Grineva (St. Petersburg)
Yu. Grinshtein (Krasnoyarsk)
V. Kashtalap (Kemerovo)
V. Klimontov (Novosibirsk)
D. Korolev (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)
D. Lebedev (St. Petersburg)
Yu. Lopatin (Volgograd)
S. Makarov (Kemerovo)
A. Malashicheva (St. Petersburg)
M. Melikyan (Moscow)
O. Moiseeva (St. Petersburg)

M. Neimark (Barnaul)
I. Nikitina (St. Petersburg)
K. Protasov (Irkutsk)
V. Ryabov (Tomsk)
D. Ryzhkova (St. Petersburg)
D. Sadykova (Kazan)
A. Samorodov (Ufa)
A. Savchenko (Krasnoyarsk)
K. Shapovalov (Chita)
O. Sirotkina (St. Petersburg)
V. Troyan (Moscow)
V. Usov (Tomsk)
T. Vavilova (St. Petersburg)
N. Volkova (Rostov-on-Don)
V. Weber (Veliky Novgorod)
I. Zakharova (Moscow)
S. Zenin (Novosibirsk)

**INTERNATIONAL EDITORIAL
COUNCIL:**

J. Bax (Netherlands)
R. Ferrari (Italy)
G. Hansson (Sweden)
R. Hehlmann (Germany)
D. Kerr (USA)
G. Massard (France)
B. Olshansky (USA)
M. Orlov (USA)
T. Sejersen (Sweden)
G. Sjöberg (Sweden)
O. Söder (Sweden)
T. Szili-Torok (Netherlands)
J. Vaage (Norway)
O. Berkovich (St. Petersburg)
M. Chernyavsky (St. Petersburg)
S. Dzemeshevich (Moscow)
V. Fadeev (Moscow)
A. Golovkin (St. Petersburg)
E. Golukhova (Moscow)
A. Gudkova (St. Petersburg)
I. Guryeva (Moscow)
A. Kaluev (St. Petersburg)
M. Karpenko (St. Petersburg)
R. Karpov (Tomsk)
S. Kozyrev (St. Petersburg)
G. Kukharchik (St. Petersburg)
Yu. Lishmanov (Tomsk)
V. Lomivorotov (Novosibirsk)
L. Maslov (Tomsk)
V. Mazurok (St. Petersburg)
G. Melnichenko (Moscow)
E. Mikhailov (St. Petersburg)
M. Mosoyan (St. Petersburg)
A. Nedoshivin (St. Petersburg)
A. Neumark (St. Petersburg)
I. Poddubny (Moscow)
V. Puzyrev (Tomsk)
G. Salogub (St. Petersburg)
K. Samochnykh (St. Petersburg)
M. Shevtsov (St. Petersburg)
S. Sidorkevich (St. Petersburg)
V. Tkachuk (Moscow)
G. Trufanov (St. Petersburg)
S. Villevalde (St. Petersburg)
E. Zaklyazmenskaya (Moscow)
I. Zazerskaya (St. Petersburg)
A. Zhloba (St. Petersburg)
N. Zvartau (St. Petersburg)

Registration certificate ПИ № ФС77-56793 on 29.01.2014

issued by Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications,
Information Technology and Mass Communications (Roskomnadzor)

The Journal is included in the Russian Citation Index

The journal is listed among Russian peer-reviewed scientific journals approved
by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education
and Science for the publication of major scientific results of theses
for academic degrees of Doctor and Candidate of Sciences.

Periodicity — 6 issues per year. Edition 1000 copies.

Distribution to specialists.

Make-up — L. P. Popova. Proofreader — A. V. Medvedeva

Publisher: FOUNDATION «ALMAZOV FOUNDATION»

Address of editorial office and publishing house:

197341, Saint-Petersburg, Akkuratova str. 2

Tel.: +7(812)702-37-16

Printed by Typography Print24 LLC

5 Samoilova street, St. Petersburg



Manuscript submission and correspondence with authors,
advertising and subscription — **e-mail:** bulleten@almazovcentre.ru

Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996

Archive: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396

http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

All rights reserved. © 2025.

Full or partial reproduction of materials printed in journal is allowed by the written
permission of publisher.

Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.

Published March 7, 2025. Open price

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕДИАТРИЯ

6 Фетисова С. Г., Мельник О. В.,
Фомичева Ю. В., Сокольникова П. С., Аббясова В. Г.,
Федорова О. В., Костарева А. А., Васичкина Е. С.
**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ
ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТАРГЕТНЫХ
ПАНЕЛЕЙ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ДИАГНОСТИКЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ
КАРДИОМИОПАТИИ У ДЕТЕЙ**

РЕДАКТОРСКАЯ СТАТЬЯ

15 Головкин А. С.
**ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ: БОЛЬШИЕ
ПЕРСПЕКТИВЫ МАЛЕНЬКИХ ОБЪЕКТОВ**

ТКАНЕВЫЕ, КЛЕТОЧНЫЕ И ПРОТЕОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

17 Зингеренко Б. В., Макарова Н. П.,
Сысоева А. П., Евтушенко Е. А., Кулакова Е. В.,
Калинина Е. А.
**НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДОЗРЕВАНИЯ
ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИНЪЕКЦИИ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ
ЖИДКОСТИ ДОНОРОВ ПОД БЛЕСТЯЩУЮ
ОБОЛОЧКУ ЖЕНСКОЙ ГАМЕТЫ**

27 Гаврилов М. Ю., Макарова Н. П.,
Якимова А. С., Вишнякова П. А., Карягина В. Е.,
Сысоева А. П., Евтушенко Е. А., Калинина Е. А.
**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ВЕЗИКУЛ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ПУТЕМ АСИММЕТРИЧНОЙ
ГЛУБИННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ**

37 Костина В. В., Яковлев А. А.
**ПРЕЦИПИТАЦИЯ МАЛЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ВЕЗИКУЛ КРОВИ В КИСЛЫХ УСЛОВИЯХ И
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТОГО МЕТОДА
ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВЕЗИКУЛ НЕЙРОНАЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

БИОИНЖЕНЕРИЯ И НАНОТЕХНОЛОГИИ

51 Костина В. В., Яковлев А. А.
**ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ШИРОКО
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ**

67 Моисеева Е. О., Кожевникова Д. Д.,
Сергеев И. С., Блиндман М. А., Заборова О. В.,
Чернышев В. С., Яковлев А. А., Горин Д. А.,
Яценко А. М.
**АФФИННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКЗОСОМ
С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ**

80 Полищук А. Г., Якубович Е. И.,
Евтушенко В. И.
**ПРИРОДНЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ ЭКЗОСОМЫ
ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ НАНОМЕДИЦИНЫ**

ИММУНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

94 Плеханов К. Н., Моисеева А. М.,
Головкин А. С.
**РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ВЕЗИКУЛ В ФОРМИРОВАНИИ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И
УКЛОНЕНИИ ОТ ИММУННОГО НАДЗОРА**

CONTENT

PEDIATRICS

6 Svetlana G. Fetisova, Olesya V. Melnik, Yulia V. Fomicheva, Polina S. Sokolnikova, Venera G. Abbyasova, Olga V. Fedorova, Anna A. Kostareva, Elena S. Vasichkina
COMPARATIVE INFORMATIVENESS OF VARIOUS TARGETED PANELS IN THE GENETIC DIAGNOSIS OF HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY IN CHILDREN

EDITORIAL

15 Alexey S. Golovkin
EXTRACELLULAR VESICLES: BIG POTENTIAL OF SMALL PARTICLES

TISSUE, CELLULAR, AND PROTEOMIC TECHNOLOGIES

17 Boris V. Zingerenko, Natalya P. Makarova, Anastasia P. Sysoeva, Ekaterina A. Evtushenko, Elena V. Kulakova, Elena A. Kalinina
A NEW TECHNOLOGY FOR MATURATION OF HUMAN OOCYTES BY INJECTION OF EXTRACELLULAR VESICLES OF FOLLICULAR DONOR FLUID UNDER THE SHINY SHELL OF THE FEMALE GAMETE

27 Maksim Yu. Gavrilov, Natalya P. Makarova, Alexandra S. Yakimova, Polina A. Vishnyakova, Victoria E. Karyagina, Anastasia P. Sysoeva, Ekaterina A. Evtushenko, Elena A. Kalinina
AGE-RELATED CHANGES IN EXTRACELLULAR VESICLES OF SEMINAL PLASMA ISOLATED BY ASYMMETRIC DEPTH-FILTRATION

37 Vasilisa V. Kostina, Alexander A. Yakovlev
PRECIPITATION OF SMALL EXTRACELLULAR BLOOD VESICLES UNDER ACIDIC CONDITIONS AND THE USE OF THIS METHOD TO ISOLATE VESICLES OF NEURONAL ORIGIN

BIOENGINEERING AND NANOTECHNOLOGY

51 Vasilisa V. Kostina, Alexander A. Yakovlev
KEY TECHNIQUES FOR STUDYING EXTRACELLULAR VESICLES

67 Ekaterina O. Moiseeva, Daria D. Kozhevnikova, Igor S. Sergeev, Maria A. Blindman, Olga V. Zaborova, Vasiliy S. Chernyshev, Alexander A. Yakovlev, Dmitry A. Gorin, Alexey M. Yashchenok
SPECIFIC ISOLATION OF EXOSOMES USING MAGNETIC NANOSPHERES

80 Anna G. Polischouk, Elena I. Yakubovich, Vladimir I. Evtushenko
NATURAL AND ARTIFICIAL EXOSOMES FOR TRANSLATIONAL NANOMEDICINE

IMMUNOLOGY AND MICROBIOLOGY

94 Kirill N. Plekhanov, Alesya M. Moiseeva, Alexey S. Golovkin
BACTERIAL EXTRACELLULAR VESICLES: THEIR ROLE IN ANTIBIOTIC RESISTANCE AND IMMUNE EVASION

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТАРГЕТНЫХ ПАНЕЛЕЙ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИИ У ДЕТЕЙ

Фетисова С. Г., Мельник О. В., Фомичева Ю. В.,
Сокольникова П. С., Аббясова В. Г., Федорова О. В.,
Костарева А. А., Васичкина Е. С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:
Фетисова Светлана Григорьевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail elemax2009@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 18.12.2024
и принята к печати 26.01.2025*

Резюме

Введение. Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является наиболее распространенной формой кардиомиопатии (КМП). Гипертрофия миокарда у детей ассоциирована с большой гетерогенной группой заболеваний с высокой представленностью несаркомерных причин. **Цель исследования:** сравнение диагностической информативности таргетных панелей для высокопроизводительного секвенирования (NGS) разной ширины охвата при генетической диагностике ГКМП у детей. **Материалы и методы.** Проведено молекулярное генетическое исследование с использованием двух таргетных панелей (172 и 39 генов) с оценкой их эффективности в дальнейшем. **Результаты.** Включено 53 ребенка с ГКМП с медианой возраста 10 [3,5; 14,0] лет. С применением большой кардиологической панели, содержащей 172 гена, обследовано 13 детей. Остальные 40 пациентов были обследованы с помощью таргетной панели на ГКМП, содержащей 39 генов, у 10 из них генетическая диагностика с применением данной панели оказалась неинформативной (25,0 %). У 35 (66,0 %) пациентов были выявлены патогенные и вероятно-патогенные варианты в различных генах. Информативность генетической диагностики в группе до 1 года составила 60,7 % против 69,2% в группе с дебютом в возрасте старше 1 года. **Заключение.** Целесообразно использование расширенной кардиопанели для NGS с целью генетической диагностики ГКМП у пациентов с дебютом заболевания на первом году жизни и небольших таргетных панелей на ГКМП — у пациентов с дебютом в более старшем возрасте.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, генетическая диагностика, гипертрофическая кардиомиопатия, дети, кардиомиопатии, таргетные панели

Для цитирования: Фетисова С.Г., Мельник О.В., Фомичева Ю.В. и др. Сравнительная информативность применения различных таргетных панелей при генетической диагностике гипертрофической кардиомиопатии у детей. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 6-14. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-6-14. EDN: ZARDRC

COMPARATIVE INFORMATIVENESS OF VARIOUS TARGETED PANELS IN THE GENETIC DIAGNOSIS OF HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY IN CHILDREN

Svetlana G. Fetisova, Olesya V. Melnik, Yulia V. Fomicheva,
Polina S. Sokolnikova, Venera G. Abbyasova, Olga V. Fedorova,
Anna A. Kostareva, Elena S. Vasichkina

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Svetlana G. Fetisova,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: elemax2009@mail.ru

Received 18 December 2024; accepted
26 January 2025

Abstract

Introduction. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common form of cardiomyopathy (CMP). Myocardial hypertrophy in children is associated with a large heterogeneous group of diseases with a high representation of non-sarcomeric causes. **Purpose.** The study compares diagnostic information from targeted next-generation sequencing (NGS) panels with different gene sets for HCM in children. **Materials and methods.** A molecular genetic study was conducted using two targeted panels (172 and 39 genes), followed by an assessment of their effectiveness. **Results.** The study included 53 children with HCM, the median age of which was 10 ± 3.5 ; 14.0 years. 13 children were examined using a large cardiac panel containing 172 genes. The remaining 40 patients were examined using a targeted panel for HCM containing 39 genes, while in 10 cases (25.0 %) genetic diagnostics was uninformative. Pathogenic and likely pathogenic variants in various genes were detected in 35 (66.0 %) patients. The informativeness of genetic diagnostics in the group of children under one year old was 60.7 %, in the group with onset at the age of over one year — 69.2 %. **Conclusion.** It is advisable to use an extended cardio panel for NGS for the purpose of genetic diagnosis of HCM in patients with the onset of the disease in the first year of life and small target panels for HCM in patients with the onset at an older age.

Key words: cardiomyopathies, children, genetic diagnosis, hypertrophic cardiomyopathy, next-generation sequencing, targeted panels

For citation Fetisova SG, Melnik OV, Fomicheva YuV, et al. Comparative informativeness of various targeted panels in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in children. Translational Medicine. 2025; 12(1): 6-14. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-6-14. EDN: ZARDRC

Список сокращений: ВСС — внезапная сердечная смерть, ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, КМП — кардиомиопатия, ЛЖ — левый желудочек, NGS — высокопроизводительное секвенирование нового поколения.

Введение

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является наиболее распространенной формой кардиомиопатии (КМП) у детей. Внезапная сердечная

смерть (ВСС) и прогрессирование до терминальной стадии застойной сердечной недостаточности являются основными причинами смерти в детском возрасте [1, 2]. Согласно недавним исследованиям, частота встречаемости патологии достигает 1:200 [3]. Гипертрофия миокарда у детей ассоциирована с большой гетерогенной группой заболеваний [4]. Помимо мутаций в саркомерных генах, вклад которых в развитие ГКМП у взрослых наиболее существенен, для ГКМП в педиатрической популяции

характерна высокая представленность несаркомерных причин, включая наследственные нарушения метаболизма, митохондриальные и нервно-мышечные заболевания [4, 5]. При первичной ГКМП наиболее частой причиной развития заболевания являются варианты в генах, кодирующих саркомерные белки (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TPM1*, *ACTC1*, *TNNI3*, *TTN*, *MYL2*), лидерами среди которых являются *MYH7* и *MYBPC3* [6, 7].

Высокопроизводительное секвенирование нового поколения в настоящее время широко распространено и прочно вошло в повседневную практику диагностики причин возникновения как семейных, так и спорадических генетических заболеваний, в том числе в кардиологии. При известном фенотипе наиболее популярным инструментом, отвечающим таким задачам, являются таргетные генетические панели, которые вкуче с существующими методами биоинформатического анализа позволяют определить вид мутации, ее местоположение в геноме пациента, функциональное действие, оценить патогенность и эффект на фенотип, а также прогноз пациента. В свою очередь генетическое тестирование при ГКМП имеет высокую диагностическую эффективность и, следовательно, клиническую ценность [8].

Цель исследования — сравнение диагностической информативности таргетных панелей для высокопроизводительного секвенирования (NGS) разной ширины охвата при генетической диагностике ГКМП у детей.

Материалы и методы

На базе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России была проведена генетическая диагностика детям в возрасте от 0 до 18 лет включительно с диагнозом ГКМП. Основным критерием, определяющим направление биоматериала пациента на генетическое исследование, было наличие гипертрофии миокарда по данным эхокардиографического исследования, а именно толщина стенки левого желудочка (ЛЖ) в любом сегменте в конце диастолы, превышающая 2,0 стандартных отклонения ($> 2,0 z\text{-score}$) от принятых норм для данного пола, возраста и веса (или площади поверхности тела). У законных представителей всех включенных в исследование пациентов было получено информированное согласие. Для выявления генетических вариантов, ассоциированных с развитием ГКМП, применялся метод секвенирования нового поколения с целевым обогащением на приборе Illumina MiSeq. Дизайн панели генов был разработан и успешно использован ранее для поиска генетических вариантов, ведущих к разви-

тию кардиомиопатий. На первом этапе исследований использовалась панель, включающая 172 гена (*ABCC9*, *ACADVL*, *ACTA1*, *ACTC1*, *ACTN2*, *ACVR2B*, *AGK*, *AKAP9*, *ALPK3*, *ANK2*, *ANKRD1*, *ANO5*, *BAG3*, *BRAF*, *CACNA1C*, *CACNA2D1*, *CACNB2*, *CALM1*, *CALM2*, *CALM3*, *CALR3*, *CASQ2*, *CAV3*, *CBL*, *CDH2*, *CMYA5*, *CRELD1*, *CRYAB*, *CSRP3*, *CTNNA3*, *DES*, *DMD*, *DMPK*, *DNAAF1*, *DNAAF3*, *DPP6*, *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *DTNA*, *DYSF*, *EMD*, *EYA4*, *FHL1*, *FHL2*, *FHOD3*, *FKRP*, *FKTN*, *FLNA*, *FLNC*, *FXN*, *GAA*, *GATA4*, *GATA5*, *GATA6*, *GATAD1*, *GDF1*, *GJA5*, *GLA*, *GPD1L*, *HAND1*, *HCN4*, *HFE*, *HRAS*, *ILK*, *ISPD*, *JPH2*, *JUP*, *KCNA5*, *KCND3*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNE3*, *KCNE5*, *KCNH2*, *KCNJ2*, *KCNJ5*, *KCNJ8*, *KCNQ1*, *KRAS*, *LAMA4*, *LAMP2*, *LDB3*, *LEFTY2*, *LMNA*, *LMOD3*, *LRRC10*, *LZTR1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MIB1*, *MMP21*, *MRAS*, *MYBPC3*, *MYBPHL*, *MYH6*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *MYL4*, *MYLK2*, *MYOF*, *MYOM1*, *MYOT*, *MYOZ2*, *MYPN*, *NEBL*, *NEXN*, *NF1*, *NKX2-5*, *NKX2-6*, *NPPA*, *NRAS*, *NUP155*, *PDLIM3*, *PKD1L1*, *PKP2*, *PLEC*, *PLEKHM2*, *PLN*, *PPA2*, *PPP1CB*, *PRDM16*, *PRKAG2*, *PSEN1*, *PSEN2*, *PTPN11*, *RAF1*, *RANGRF*, *RBM20*, *RIT1*, *RRAS*, *RYR2*, *SALL4*, *SCN10A*, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*, *SCN5A*, *SCNN1G*, *SDHA*, *SGCD*, *SHOC2*, *SLMAP*, *SNTA1*, *SOS1*, *SOS2*, *SPEG*, *SPRED1*, *SYNE1*, *SYNM*, *SYNPO2L*, *TAZ*, *TBX20*, *TBX5*, *TCAP*, *TECRL*, *TGFB3*, *TMEM43*, *TMPO*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNI3K*, *TNNT2*, *TPM1*, *TRDN*, *TRPM4*, *TTN*, *TTR*, *VCL*, *ZIC3*), ассоциированных с генетически обусловленными сердечно-сосудистыми заболеваниями и скелетными миопатиями с признаками поражения миокарда. После 2022 года исследования осуществлялись с использованием панели из 39 генов, преимущественно ассоциированных с развитием как первичной ГКМП, так и фенокопий ГКМП (например, болезнь Фабри, РАСопатии), при которых гипертрофия миокарда выступает в качестве одного из симптомов синдрома комплекса (*ACTC1*, *ACTN2*, *ALPK3*, *BAG3*, *BRAF*, *CBL*, *CSRP3*, *FHL2*, *FHOD3*, *FLNC*, *FXN*, *GLA*, *HRAS*, *KRAS*, *LAMP2*, *LDB3*, *LZTR1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *MYLK2*, *MYOM1*, *MYPN*, *NF1*, *NRAS*, *PRKAG2*, *PTPN11*, *RAF1*, *SHOC2*, *SOS1*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TRIM63*, *TTR*). Для подготовки библиотек был использован метод целевого обогащения, основанный на ультразвуковом фрагментировании и последующей гибридизации (SureSelectXT). Фрагментирование ДНК пациентов производилось при помощи прибора Bioruptor Plus до целевой длины 150 п.о., полученные фрагменты использовались для подготовки библиотек. После первичного анализа библиотек на приборе Illumina MiSeq данные об-

рабатывались при помощи биоинформатических программ BWA-MEM, Picard, GATK, Anovar. Для определения эффекта выявленного варианта использовались предсказательные программы *in silico*, такие как SIFT, PolyPhen, FATHM, CADD, MutationTaster. Все обнаруженные генетические варианты в дальнейшем были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру. Для определения степени патогенности детектированных вариантов использовались рекомендации American College of Medical Genetic (ACMG) [9]. Генетические варианты с патогенным и вероятно-патогенным статусом трактовались этиологически значимыми.

Данные описательной статистики представлены медианой *Me* и интерквартильным размахом, учитывая ранее выявленное ненормальное распределение данных в нашем исследовании.

Результаты и обсуждение

В исследование включены 53 ребенка с гипертрофическим фенотипом кардиомиопатии (КМП) от 0 до 18 лет, медиана возраста на момент исследования 10 [3,5; 14,0] лет, среди них 32 (60,4 %) мальчика. Тринадцать детей было обследовано с применением большой кардиологической панели, содержащей 172 гена, только в одном случае генетическая диагностика оказалась неинформативной (7,7 %). Остальные 40 пациентов были обследованы с применением таргетной панели на ГКМП, содержащей 39 генов; у 10 из них генетическая диагностика на основе данной панели оказалась неинформативной (25,0 %). У 35 (66,0 %) пациентов были выявлены патогенные и вероятно-патогенные варианты в различных генах, спектр которых представлен в таблице 1. При этом у двух детей одномоментно было детектировано по две мутации.

Как видно из таблицы 1, среди 35 пациентов, имеющих патогенные и вероятно-патогенные варианты, у 22 детей были обнаружены причинные мутации в генах, кодирующих белки филаментов саркомера, что составляет почти 63,0 %. При этом частота детекции мутаций в *MYH7* в 2 раза превышала таковую в гене *MYBPC3*. Это было ожидаемо с учетом литературных данных, свидетельствующих о доминировании *MYH7*-ассоциированной ГКМП в детском возрасте и увеличении с возрастом доли пациентов с вариантами в *MYBPC3* [10]. Другие этиологически значимые варианты были представлены мутациями в генах RAS-МАРК сигнального пути (37,1 %).

По нашим данным, общий процент диагностической информативности генетического тестирования у обследованных детей вне зависимости от возраста дебюта заболевания оказался выше

по сравнению с ранее опубликованными литературными данными в смешанной гетерогенной по возрастному составу выборке [11–14]. Для ГКМП у детей влияние вторичных модифицирующих факторов, которые могут привести к гипертрофии миокарда ЛЖ (например, артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром), значительно меньше [15]. Следовательно, вероятность исключительно генетической природы патологии значительно выше. Кроме того, уровень нашего учреждения как федерального центра способствует кумуляции более сложных и тяжелых пациентов из разных регионов с большей вероятностью генетически обусловленной патологии, чем в общей популяции.

Для ГКМП характерно 3 возрастных пика дебюта заболевания: два из них приходятся на периоды активного роста детей — 1 год жизни и подростковый период, третий же период приходится на возраст старше 50 лет [10]. Вместе с тем известно, что летальность у детей с дебютом заболевания на первом году жизни является относительно высокой и сопоставима с показателями смертности у детей с врожденными пороками сердца [5, 16, 17].

Первичный анализ наших данных показал, что средний возраст дебюта ГКМП составил 4 [0,03; 9,00] года, при этом у 28 (52,8 %) пациентов он пришелся на первый год жизни.

В зависимости от возраста постановки диагноза ГКМП, среди обследованных пациентов нами было выделено 2 группы: пациенты с дебютом ГКМП в возрасте до 1 года ($N = 28$) и пациенты с дебютом ГКМП в возрасте 1–18 лет ($N = 25$). Характеристика групп представлена в таблице 2.

Данные таблицы 2 наглядно демонстрируют сопоставимость групп по гендерному составу, применению разных панелей для NGS-диагностики, а также значимые различия в доле причинных саркомерных вариантов и вариантов в генах RAS-МАРК сигнального пути в этиологической структуре ГКМП в обеих группах. Так, в группе с дебютом до 1 года процент саркомерных находок составил 28,57 % ($N = 8$) против 56,0 % ($N = 14$) в группе с дебютом в возрасте старше 1 года, при этом в обеих группах доминировали находки в гене, кодирующем тяжелую цепь β -миозина (*MYH7*). И, напротив, доля выявленных вариантов в генах RAS-МАРК сигнального пути была в 2 раза выше в группе детей с дебютом заболевания в младенческом возрасте (32,15 % против 16,0 % в группе с дебютом ГКМП в возрасте старше 1 года). Эти цифры отражают данные N. A. Marston и соавторов (2021) о процентном соотношении саркомерных и несаркомерных вари-

Таблица 1. Спектр генетических находок у обследованной когорты пациентов

Table 1. Spectrum of genetic findings in the examined cohort of patients

Ген	N = 53 чел.	%
<i>MYH7</i>	14	26,4
<i>MYPBC3</i>	7	13,2
<i>TPM1</i>	1	1,9
<i>PTPN11 + TNNT2</i>	1	1,9
<i>BRAF + MYH6</i>	1	1,9
<i>PTPN11</i>	4	7,5
<i>RAF1</i>	4	7,5
<i>BRAF</i>	2	3,8
<i>LZTR1</i>	1	1,9
<i>VUS</i>	7	13,2
Без находок	11	20,8

Таблица 2. Характеристика групп пациентов с дебютом ГКМП в возрасте до 1 года и в возрасте 1–18 лет

Table 2. Characteristics of patient groups with HCM onset at under 1 year of age and between 1–18 years of age

	Группа детей с дебютом ГКМП в возрасте до 1 года, чел. N = 28	Группа детей с дебютом ГКМП после 1 года жизни, чел. N = 25
Гендерный состав:		
Мальчики	17 (60,7 %)	15 (60,0 %)
Девочки	11 (39,3 %)	10 (40,0 %)
Применяемая панель для генетической диагностики:		
39 генов	21 (75,0 %)	19 (76,0 %)
172 гена	7 (25,0 %)	6 (24,0 %)
Генетические находки:		
<i>MYH7</i>	5 (17,86 %)	9 (36,0 %)
<i>MYPBC3</i>	3 (10,71 %)	4 (16,0 %)
<i>TPM1</i>	-	1 (4,0 %)
<i>PTPN11 + TNNT2</i>	1 (3,57 %)	-
<i>BRAF + MYH6</i>	-	1 (4,0 %)
<i>PTPN11</i>	1 (3,57 %)	3 (12,0 %)
<i>RAF1</i>	4 (14,3 %)	-
<i>BRAF</i>	2 (7,14 %)	-
<i>LZTR1</i>	1 (3,57 %)	-
<i>VUS</i>	2 (7,14 %)	5 (20,0 %)
Без находок	9 (32,14 %) * 8 из 9 были тестированы на панели 39 генов	2 (8,0 %) * были тестированы на панели 39 генов

антов у генотип-положительных пациентов в разных возрастных группах [10].

Информативность генетической диагностики в группе до 1 года составила 60,7 % против 69,2 % в группе с дебютом в возрасте старше 1 года. У трети обследованных детей с дебютом ГКМП до 1 года результат генетического тестирования был отрицательным при применении генетической панели 39 генов. Это может свидетельствовать об отсутствии генов интереса в этой панели ввиду большой представленности синдромальных форм ГКМП в указанной возрастной группе. Наши данные позволяют говорить о целесообразности использования расширенной кардиопанели для NGS с целью генетической диагностики природы ГКМП у пациентов с дебютом заболевания на первом году жизни и обоснованности применения небольших таргетных панелей на гипертрофическую ГКМП у пациентов с дебютом в детском возрасте и старше. Следует отметить, что, по результатам наблюдения, летальный исход был у 5 (9,4 %) детей, в среднем в 2 года жизни [0,3; 12]. У всех 5 пациентов дебют заболевания пришелся на 1 год жизни, при этом одна из пациенток имела смешанный характер этиологии ГКМП (*PTPN11* + *TNNT2*). Наиболее вероятно, тяжесть течения заболевания у данной пациентки в большей степени обусловлена патогенным вариантом в гене RAS-МАРК сигнального пути (*PTPN11*), несмотря на одновременное обнаружение вероятно-патогенного варианта в гене саркомера (*TNNT2*). Основной этиологической причиной гипертрофии миокарда являлись: у 2 — РАСопатии, у 2 — саркомерные причины, у 1 пациента мутаций обнаружено не было. Трое пациентов погибли от декомпенсации сердечной недостаточности, один пациент — от фатальных желудочковых нарушений ритма, один пациент с мутацией в гене *MYH7* — от острого отторжения трансплантата в возрасте 20 лет.

По данным ряда авторов дебют ГКМП на 1 году является прогностически неблагоприятным фактором течения заболевания с более высокой смертностью в течение первого года жизни [16, 17]. Однако при пересечении пациентами возрастного рубежа в 1 год жизни, прогноз для дальнейшего течения заболевания был более благоприятным [17]. Надо отметить, что, как и в нашей работе, когорты в ранее проведенных исследованиях включали довольно высокую долю пациентов с РАСопатиями [5, 16–18].

В нашем арсенале не было кардиопанели на ГКМП с меньшим чем 39 количеством генов. Поэтому для сравнения диагностической информативности различных по охвату генов панелей для

NGS мы прибегли к доступным нам литературным данным. Так, в работе М. Сессопи и коллег (2016) проведен сравнительный анализ таргетного секвенирования по Сэнгеру целевых генов и NGS-диагностики ГКМП с помощью панели из 19 генов [19]. Было показано, что 15 из 19 пациентов, подвергшихся NGS-диагностике, имели патогенные и вероятно-патогенные варианты в генах интереса. В выборку вошли пациенты от 0 до 70+ лет, однако, стратификации по возрасту не проводилось. Вместе с тем, среди 15 генотип-положительных пациентов четверо были с дебютом ГКМП в детском возрасте (возраст дебюта — 1 год, 6, 12 и 17 лет), то есть подавляющее большинство когорты пациентов, подвергшихся NGS-диагностике, было представлено лицами с дебютом заболевания во взрослом возрасте. Таким образом, в этой работе и NGS-диагностика с использованием таргетной панели из 19 генов хоть и составила 79 %, тем не менее, применима эта цифра преимущественно к взрослым пациентам. Численность выборки как в нашей работе, так и в исследовании М. Сессопи и соавторов (2016) не может обладать доказательностью, однако, отражает следующую тенденцию: чем раньше происходит дебют гипертрофии миокарда, тем выше вероятность фенокопий ГКМП и шире спектр генов интереса [19]. Тем самым, возможно применение различных по широте генетических панелей для NGS-диагностики в зависимости от возраста дебюта заболевания.

S. Rubattu и коллеги (2016) показали диагностическую эффективность панели на ГКМП, содержащей 17 генов (14 саркомерных и 3 несаркомерных), в 54,3 % [11]. При этом отмечали более высокий уровень обнаружения этиологически значимых генетических вариантов у пациентов с ранним дебютом (≤ 25 лет) и семейным анамнезом ГКМП. Авторы подчеркивают, что возраст при постановке диагноза ГКМП является мощным предиктором положительного генетического тестирования [19].

Несмотря на то, что есть данные о незначительном росте эффективности диагностики при увеличении количества анализируемых генов у саркомер-негативных пациентов [20], ряд авторов отмечает обоснованность и необходимость включения ассоциированных с РАСопатиями генов в мультигенные панели кардиомиопатий в целях повышения диагностической эффективности генетического исследования у лиц с ГКМП [21–23]. Особенно это важно у детей с ранним дебютом заболевания и изолированной гипертрофией миокарда, а также у пациентов с поздним началом ГКМП, поскольку нельзя исключать мозаицизм и дефекты клинической диагностики экстракар-

диальной микросимптоматики РАСопатий [24]. О. Seyhan-Birsoy и соавторы (2018) подчеркивают роль 3 генов RAS-МАРК сигнального пути (*RAF1*, *RIT1* и *PTPN11*), мутации в которых обуславливают изолированную гипертрофию левого желудочка без признаков поражения других систем и органов [25].

Заключение

Генетическое тестирование при ГКМП рекомендовано и прописано в клинических рекомендациях ведения пациентов с ГКМП как в нашей стране, так и за рубежом. Это продиктовано необходимостью понимания генетической природы заболевания, что является фундаментальным моментом для индивидуального подхода к ведению пациента, выбору терапии, определению тяжести течения и прогноза, а также для своевременного выявления

генотип-положительных родственников, с целью кардиологического динамического их наблюдения ввиду потенциальной угрозы развития ГКМП.

Использование расширенной кардиопанели для NGS с целью генетической диагностики ГКМП у пациентов с дебютом заболевания на первом году жизни и небольших таргетных панелей на ГКМП у пациентов с дебютом в старшем возрасте кажется целесообразным исходя из наших данных, в связи с возрастающей значимостью саркомерных причин ГКМП в более старшем возрасте.

Основываясь на своем опыте и литературных данных, мы предложили алгоритм дифференцированного подхода к использованию таргетных панелей для NGS-диагностики ГКМП в зависимости от возраста дебюта заболевания и сведений об этиологической структуре ГКМП в возрастном аспекте (схема 1).



Схема 1. Дифференцированный подход к выбору таргетных панелей для NGS-диагностики ГКМП в зависимости от возраста дебюта заболевания и данных об этиологической структуре ГКМП в возрастном аспекте

Scheme 1. Differentiated approach to selecting targeted panels for NGS diagnostics of HCM based on the age of disease onset and etiological structure data of HCM in age-related aspects

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2023;44(37):3503–3626. DOI:10.1093/eurheartj/ehad194.
- Lipshultz SE, Orav EJ, Wilkinson JD, et al. Risk stratification at diagnosis for children with hypertrophic cardiomyopathy: an analysis of data from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Lancet*. 2013;382(9908):1889–1897. DOI:10.1016/S0140-6736(13)61685-2.
- Semsarian C, Ingles J, Maron MS, et al. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(12):1249–54. DOI:10.1016/j.jacc.2015.01.019.
- Stegeman R, Paauw ND, de Graaf R, et al. The etiology of cardiac hypertrophy in infants. *Sci Rep*. 2021;11(1):10626.
- Chan W, Yang S, Wang J, et al. Clinical characteristics and survival of children with hypertrophic cardiomyopathy in China: A multicentre retrospective cohort study. *EClinicalMedicine*. 2022;49:101466.
- Núñez L, Gimeno-Blanes JR, Rodríguez-García MI, et al. Somatic MYH7, MYBPC3, TPM1, TNNT2 and TNNI3 mutations in sporadic hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J*. 2013;77(9):2358–65. DOI: 10.1253/circj.cj-13-0294.
- Allouba M, Walsh R, Afify A, et al. Ethnicity, consanguinity, and genetic architecture of hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2023 Dec 21;44(48):5146–5158.
- Vogiatzi G, Lazaros G, Oikonomou E, et al. Role of genetic testing in cardiomyopathies: a primer for cardiologists. *World J Cardiol*. 2022 ;26 14(1):29–39.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405–424. DOI:10.1038/gim.2015.30.
- Marston NA, Han L, Olivotto I, et al. Clinical characteristics and outcomes in childhood-onset hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2021;42(20):1988–1996. DOI:10.1093/eurheartj/ehab148.
- Rubattu S, Bozzao C, Pennacchini E, et al. A next-generation sequencing approach to identify gene mutations in early- and late-onset hypertrophic cardiomyopathy patients of an Italian cohort. *Int J Mol Sci*. 2016;17(8):1239. DOI:10.3390/ijms17081239.
- Alfares AA, Kelly MA, McDermott G, et al. Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: expanded panels offer limited additional sensitivity. *Genet Med*. 2015;17(11):880–8. DOI:10.1038/gim.2014.205.
- Andersen PS, Havndrup O, Hougs L, et al. Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives. *Hum Mutat*. 2009;30(3):363–370. DOI:10.1002/humu.20862.
- Erdmann J, Daehmlow S, Wischke S, et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet*. 2003;64:339–349.
- Lorenzini M, Norrish G, Field E, et al. Penetrance of Hypertrophic Cardiomyopathy in Sarcomere Protein Mutation Carriers. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Aug 4;76(5):550–559. DOI:10.1016/j.jacc.2020.06.011.
- Alexander PMA, Nugent AW, Daubeney PEF, et al. On behalf of the National Australian Childhood Cardiomyopathy Study. Long-term outcomes of hypertrophic cardiomyopathy diagnosed during childhood: results from a national population-based study. *Circulation*. 2018;138:29–36. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028895.
- Norrish G, Field E, McLeod K, et al. Clinical presentation and survival of childhood hypertrophic cardiomyopathy: a retrospective study in United Kingdom. *Eur Heart J*. 2019;40:986–993. DOI:10.1093/eurheartj/ehy798.
- Boleti O, Norrish G, Field E, et al. Natural history and outcomes in paediatric RASopathy-associated hypertrophic cardiomyopathy. *ESC Heart Fail*. 2024;11(2):923–936. DOI:10.1002/ehf2.14637.
- Cecconi M, Parodi MI, Formisano F, et al. Targeted next-generation sequencing helps to decipher the genetic and phenotypic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Mol Med*. 2016;38(4):1111–24. DOI:10.3892/ijmm.2016.2732.
- Thomson KL, Ormondroyd E, Harper AR, et al. Analysis of 51 proposed hypertrophic cardiomyopathy genes from genome sequencing data in sarcomere negative cases has negligible diagnostic yield. *Genet Med*. 2019;21(7):1576–84. DOI:10.1038/s41436-018-0375-z.
- Aljeaid D, Sanchez AI, Wakefield E, et al. Prevalence of pathogenic and likely pathogenic variants in the RASopathy genes in patients who have had panel testing for cardiomyopathy. *Am J Med Genet A*. 2019;179(4):608–14. DOI:10.1002/ajmg.a.61072.
- Hathaway J, Krista Heliö K, Saarinen I, et al. Diagnostic yield of genetic testing in a heterogeneous cohort of 1376 HCM patients. *BMC Cardiovascular Disorders*. (2021) 21:126doi: 10.1186/s12872-021-01927-5
- Teekakirikul P, Zhu W, Huang HC, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: An Overview of Genetics and Management. *Biomolecules*. 2019;9(12):878. DOI:10.3390/biom9120878.

24. Seyhan-Birsoy O, Miatkowski MM, Hynes E, et al. NGS testing for cardiomyopathy: utility of adding RASopathy-associated genes. *Hum Mutat.* 2018;39(7):954–8. DOI:10.1002/humu.2.

25. Gal DB, Morales A, Rojahn S, et al. Comprehensive Genetic Testing for Pediatric Hypertrophic Cardiomyopathy Reveals Clinical Management Opportunities and Syndromic Conditions. *Pediatr Cardiol.* 2022;43(3):616–623. DOI:10.1007/s00246-021-02764-1.

Информация об авторах:

Фетисова Светлана Григорьевна, младший научный сотрудник НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», врач — детский кардиолог отделения кардиологии и медицинской реабилитации детского лечебно-реабилитационного комплекса Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мельник Олеся Владимировна, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ молекулярно-клеточного моделирования и генной терапии НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Фомичева Юлия Васильевна, врач — лабораторный генетик центральной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Сокольникова Полина Сергеевна, врач — лабораторный генетик центральной клинко-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Аббясова Венера Газизьяновна, врач — детский кардиолог консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Федорова Ольга Викторовна, руководитель Группы поддержки грантовых конкурсов Управления научными исследованиями ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, д.м.н., директор Института молекулярной биологии и генетики, доцент кафедры внутренних болезней Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Васичкина Елена Сергеевна, д.м.н., руководитель НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; профессор кафедры детских болезней лечебного факультета Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Svetlana G. Fetisova, Junior Researcher, Research Institute of Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine; Pediatric Cardiologist, Department of Pediatric Cardiology and Medical Rehabilitation of Perinatology and Pediatrics of the Almazov National Medical Research Centre;

Olesya V. Melnik, candidate of medical sciences, Senior Researcher, Research Laboratory of Molecular Cellular Modeling and Gene Therapy, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Yulia V. Fomicheva, laboratory geneticist, Almazov National Medical Research Centre;

Polina S. Sokolnikova, laboratory geneticist, Almazov National Medical Research Centre;

Venera G. Abbyasova, pediatric cardiologist at the consultative and diagnostic center of the Almazov National Medical Research Centre;

Olga V. Fedorova, head of the Grant Competition Support Group of the Scientific Research Department of the Almazov National Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, Doctor of Medical Sciences, Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Associate Professor of the Department of Internal Diseases of the Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre;

Elena S. Vasichkina, PhD, MD, Head of the Scientific Research Centre for Unknown, Rare and Genetically Caused Diseases of the World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Professor of the Department of Pediatric Diseases of the Medical Faculty of the Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre.

ТЕМАТИЧЕСКИЙ НОМЕР ЖУРНАЛА
 «ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА»:
 «ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ: БОЛЬШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ
 МАЛЕНЬКИХ ОБЪЕКТОВ»



Исследование внеклеточных везикул (ВВ) — инструментов межклеточных взаимодействий, диагностических маркеров и потенциальных терапевтических агентов — в последнее время переживает бурный рост. Значительные усилия направлены на создание и совершенствование стандартов исследования, повышение доступности методов для широкого круга лабораторий и унификацию методов валидации результатов. Как следствие, улучшается качество и растет количество научных публикаций, а разрабатываемые подходы все активнее внедряются в клиническую практику. Внеклеточные везикулы привлекают все большее внимание как посредники в межклеточных коммуникациях, доставляющие молекулярный груз, как носители нуклеиновых кислот в РНК-вакцинах и как модуляторы иммунного ответа.

Следуя этим трендам современной науки, мы рады представить тематический выпуск журнала, посвященный внеклеточным везикулам. В опубликованных работах представлен широкий спектр интересов отечественных исследователей — от разработки новых и адаптации существующих методов исследования ВВ до демонстрации результатов собственных исследований в области гинекологии, андрологии, терапии и других клинических дисциплин.

Особого внимания заслуживают обзорные и аналитические статьи, которые открывают перспективы дальнейших исследований ВВ и указывают на возможные точки приложения новых знаний, а также на разработку критических технологий в диагностике и терапии заболеваний.

Мы выражаем благодарность отечественным ученым за живой отклик на наше приглашение к публикации. Мы уверены, что интерес к тематике внеклеточных везикул будет только расти, а число исследователей и научных групп, работающих над решением связанных с ними задач, будет увеличиваться. Этот выпуск будет особенно интересен специалистам в области клеточной и молекулярной биологии, биотехнологии, клинической медицины и т. д. Мы надеемся, что представленные работы станут ценным источником информации и вдохновения для дальнейших исследований, и приглашаем всех к продолжению сотрудничества и обмену знаниями на страницах нашего журнала.

**Головкин Алексей Сергеевич,
 д.м.н., заведующий лабораторией
 микровезикулярного сигналинга Института
 молекулярной биологии и генетики ФГБУ
 «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава
 России, профессор кафедры микробиологии
 и вирусологии Института медицинского
 образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
 Минздрава России, выпускающий редактор
 тематического номера журнала**

////////////////////////////////////

**SPECIAL ISSUE OF THE JOURNAL
“TRANSLATIONAL MEDICINE”:
“EXTRACELLULAR VESICLES: BIG POTENTIAL
OF SMALL PARTICLES”**

The study of extracellular vesicles (EVs) — tools for intercellular communication, diagnostic markers, and potential therapeutic agents — has recently experienced rapid growth. Significant efforts are focused on establishing and refining research standards, improving the accessibility of methods for a broad range of laboratories, and harmonizing validation protocols. As a result, the quality of scientific publications is improving, their number is increasing, and the developed approaches are being actively integrated into clinical practice. Extracellular vesicles are attracting growing attention as mediators of intercellular communication, carriers of molecular cargo, vehicles for nucleic acids in RNA vaccines, and modulators of immune responses.

Following these trends in modern science, we are delighted to present a thematic issue of the journal dedicated to extracellular vesicles. The published works reflect the wide-ranging interests of researchers — from the development of new methods and adaptation of existing protocols for studying EVs to the presentation of original research findings in gynecology, andrology, therapy, and other clinical disciplines.

Of note are the review and analytical articles that highlight future research directions for EVs and identify potential applications for new knowledge, as well as the development of critical technologies in disease diagnosis and therapy.

We extend our gratitude to scientists for their enthusiastic response to our call for submissions. We are confident that interest in extracellular vesicles will continue to grow, and the number of researchers and teams working on EV-related challenges will expand. This issue will be especially valuable to specialists in cellular and molecular biology, biotechnology, clinical medicine, and related fields. We hope the featured articles will serve as a valuable source of information and inspiration for future research, and we invite all to continue collaboration and knowledge exchange through our journal.

**Alexey S. Golovkin,
PhD, MD, DrSci, Head of the Laboratory
of Microvesicular Signaling, Institute of Molecular
Biology and Genetics;
Professor, Department of Microbiology and
Virology, Institute of Medical Education, Almazov
National Medical Research Centre;
Guest Editor**

НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИНЪЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ДОНОРОВ ПОД БЛЕСТЯЩУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕНСКОЙ ГАМЕТЫ

Зингеренко Б. В.¹, Макарова Н. П.¹, Сысоева А. П.¹,
Евтушенко Е. А.², Кулакова Е. В.¹, Калинина Е. А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр акушерства,
гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва,
Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Московский государственный
университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

Контактная информация:

Макарова Наталья Петровна,
ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова»
Минздрава России,
ул. Академика Опарина, д. 4, Москва,
Россия, 117997.
E-mail: np_makarova@oparina4.ru

Статья поступила в редакцию 09.10.2024
и принята к печати 18.02.2025

Резюме

Актуальность. В программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) не все ооциты, полученные при трансвагинальной пункции (ТВП), пригодны для оплодотворения, так как не все находятся на стадии МІ. Ооциты на стадиях герминативного везикула (GV) и МІ обычно утилизируются, поскольку после удаления кумулюсных клеток (КК) их созревание и оплодотворение невозможны. В данном исследовании предложен метод созревания таких ооцитов с помощью введения внеклеточных везикул (ВВ) фолликулярной жидкости (ФЖ) в перивителлиновое пространство. **Цель.** Оценить клиническую состоятельность технологии созревания незрелых ооцитов без клеток кумулюса (стадии GV и МІ) путем инъекции ВВ ФЖ донора под блестящую оболочку клетки. **Материалы и методы.** Собрано по 5 мл ФЖ от 4 доноров. Выделение ВВ ФЖ проводили методом последовательного центрифугирования. Часть везикул проанализировали с помощью метода анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), другую часть изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Отобрали 53 незрелых ооцита в основную группу и 18 в группу контроля. Инъекцию ВВ ФЖ донора проводили через 4 часа после удаления КК, вводя под блестящую оболочку суспензию ВВ. Через 17 часов оценивали зрелость ооцитов в обеих группах. **Результаты.** Частота созревания ооцитов в группе основной была статистически значимо выше, чем в группе сравнения, что свидетельствует о потенциальной эффективности метода EV-IVM для созревания ооцитов на стадии GV. **Заключение.** Полученные данные дают надежду на разработку нового метода созревания ооцитов в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: бесплодие, внеклеточные везикулы, вспомогательные репродуктивные технологии, созревание ооцитов, фолликулярная жидкость, экзосомы, IVM

Для цитирования: Зингеренко Б.В., Макарова Н.П., Сысоева А.П. и др. Новая технология созревания ооцитов человека методом инъекции внеклеточных везикул фолликулярной жидкости доноров под блестящую оболочку женской гаметы. *Трансляционная медицина*. 2025; 12(1): 17-26. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-17-26. EDN: UXLPNN

////////////////////////////////////

A NEW TECHNOLOGY FOR MATURATION OF HUMAN OOCYTES BY INJECTION OF EXTRACELLULAR VESICLES OF FOLLICULAR DONOR FLUID UNDER THE SHINY SHELL OF THE FEMALE GAMETE

Boris V. Zingerenko¹, Natalya P. Makarova¹, Anastasia P. Sysoeva¹, Ekaterina A. Evtushenko², Elena V. Kulakova¹, Elena A. Kalinina¹

¹ Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Corresponding author:

Natalya P. Makarova,
Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ac. Oparin str., 4, Moscow, Russia, 117997.
E-mail: np_makarova@oparina4.ru

Received 09 October 2024; accepted 18 February 2025



Abstract

Background. In assisted reproductive technology (ART) programs, not all oocytes obtained during transvaginal puncture (TVP) are suitable for fertilization, as not all of them are at MII stage. Oocytes at germinal vesicle (GV) and MI stages are discarded because, after cumulus cells (CC) removal, their maturation and fertilization become impossible. Study proposes method for oocytes maturing by introducing extracellular vesicles (EVs) from follicular fluid (FF) into the perivitelline space. **Objective.** To evaluate the clinical feasibility of GV/MI oocytes maturing technology without cumulus cells by injecting donor FF EVs under the zona pellucida. **Materials and methods.** FF (5 ml) was collected from 4 donors. EVs were isolated using sequential centrifugation. Portion of EVs was analyzed using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), while another portion was examined using transmission electron microscopy (TEM). Total of 53 immature oocytes were selected for the main group and 18 for the control group. Donor FF EVs were injected 4 hours after CC removal by introducing EVs suspension under zona pellucida. After 17 hours, oocyte maturity was assessed in both groups. **Results.** Oocytes maturation rate in the main group was statistically significantly higher than in the control group, indicating the potential effectiveness of the EV-IVM method for maturing GV-stage oocytes. **Conclusion.** Obtained data provide hope for the development of a new method for *in vitro* oocyte maturation.

Key words: assisted reproductive technologies, exosomes, extracellular vesicles, follicular fluid, infertility, IVM, oocyte maturation

For citation: Zingerenko BV, Makarova NP, Sysoeva AP, et al. A new technology for maturation of human oocytes by injection of extracellular vesicles of follicular donor fluid under the shiny shell of the female gamete. Translational Medicine. 2025; 12(1): 17-26. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-17-26. EDN: UXLPNN

Список сокращений: а-ГнРГ — агонист гонадотропин-рилизинг гормона, ВВ — внеклеточные везикулы, ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии, ИКСИ — интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит, КК — клетки кумулюса, ТВП — трансвагинальная пункция, ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия, ФЖ — фолликулярная жидкость, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, EV-IVM — Extracellular Vesicles *in vitro* maturation, GV — герминативный везикул, NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) — анализ траектории частиц.

Введение

В программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) проводят контролируемую овариальную стимуляцию для получения как можно более качественных зрелых женских половых клеток, находящихся на стадии МII (метафаза II деления мейоза). Однако в клинической практике не все получаемые ооциты являются зрелыми и пригодными для оплодотворения. У пациенток с резистентными яичниками, а также при наличии противопоказаний к стимуляции овуляции врачи прибегают к технологии дозревания ооцитов *in vitro* [1].

In vitro maturation (IVM) — это вспомогательная репродуктивная технология, подразумевающая аспирацию незрелых ооцитов и их последующее созревание *in vitro* [2, 3]. Созревание ооцитов *in vitro* было впервые описано еще в 1930-е гг., а сама технология IVM для ооцитов человека была впервые представлена Р. Эдвардсом в 1965 году. Однако на практике данная методика продемонстрировала положительные результаты только в 1990-е гг.: в 1991 году была зарегистрирована первая беременность после IVM, а в 1994-м — первый случай живорождения после применения IVM у пациенток с синдромом поликистозных яичников. Данная методика IVM подразумевает использование ооцит-кумулюсных комплексов, которые получают при трансвагинальной пункции из небольших фолликулов. Существует несколько разновидностей программ *in vitro* maturation: САРА-IVM, ОТО-IVM, классическое IVM. При этом все программы, в настоящее время применяемые на практике, используют культуральные среды (одно- или многоступенчатые), в которых происходит спонтанное дозревание женских половых клеток, окруженных клетками кумулюса.

Как известно, зрелый фолликул состоит из ооцита, окруженного клетками кумулюса, антральной полости, содержащей фолликулярную жидкость (ФЖ), гранулезных клеток, базальной мембраны и клеток теки. ФЖ продуцируется клетками

гранулезы и кровеносными сосудами, окружающими клетки теки. В состав ФЖ входят различные белки, липиды, полисахариды, факторы роста, нуклеиновые кислоты, стероидные гормоны, активные формы кислорода и антиоксидантные ферменты. Учитывая широкий спектр активных молекул и веществ, содержащихся в ФЖ, можно заключить, что ФЖ играет важную роль в регуляции фолликулогенеза, обеспечивая защиту, питание и созревание ооцита. Ранее исследователи пробовали использовать ФЖ для дозревания ооцитов человека, добавляя ее в среду культивирования, однако данный метод не показал высокую эффективность. При этом типе дозревания всегда используют ооцит-кумулюсные комплексы, так как ооцит напрямую не способен поглощать вещества без окружающих клеток кумулюса.

В программах ВРТ при подготовке к оплодотворению методом ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в ооцит) происходит полное удаление окружающих клеток кумулюса, что делает невозможным последующее дозревание ооцитов на стадиях GV и MI в условиях *in vitro*. Именно поэтому необходима разработка новых технологий доставки необходимых питательных веществ до ооцита без клеток кумулюса.

В последнее время все больше исследований посвящено регулированию различных функций клеток, органов и тканей с помощью внеклеточной сигнализации (внеклеточные везикулы, ВВ), которые обнаружены во всех биологических жидкостях, в том числе в ФЖ [4–6]. В 2022 году в составе экзосом ФЖ женщин были обнаружены экзосомальные микроРНК и с помощью биоинформатического анализа выявлена их способность регуляции развития фолликулов, возобновления в ооцитах мейоза и последующей овуляции [7]. Однако авторы использовали метод простого сокультивирования ВВ ФЖ с незрелыми ооцитами. Именно в силу значимой роли внеклеточных везикул ФЖ для созревания ооцитов предложено инъецировать их под блестящую оболочку, тем самым создавая предпосылки для возобновления мейоза и созревания ооцитов [8, 9].

Цель настоящей работы — оценка клинической состоятельности технологии дозревания незрелых ооцитов без клеток кумулюса (стадии GV и MI) путем инъекции ВВ ФЖ донора под блестящую оболочку клетки.

Материалы и методы

Получение фолликулярной жидкости и выделение внеклеточных везикул

Фолликулярная жидкость была получена у доноров ооцитов, практически здоровых женщин

в программах ВРТ на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Перед проведением программы ВРТ доноры ооцитов (фолликулярной жидкости) были обследованы согласно приказу Министерства здравоохранения РФ от 31 июля 2020 г. № 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», Приложение № 5 к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 августа 2012 г. № 107н, в том числе на наличие вирусных инфекций [10].

Пациентки подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено на заседании комиссии по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Подготовку к стимуляции овариальной функции осуществляли согласно клиническим рекомендациям «Женское бесплодие» (2024 г.) [11]. Собирали ФЖ доминантного фолликула без примеси крови. Выбирали только тех женщин, у которых стимуляция функции яичников проводилась по стандартной схеме с гонадотропинами и антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ). Триггером финального созревания служил препарат хорионического гонадотропина человека. Всего было собрано по 5 мл ФЖ от 4 доноров ФЖ. Далее проводили выделение ВВ ФЖ из каждого образца ВВ методом последовательного центрифугирования (400g в течение 10 мин., 10 000g при 4 °C в течение 30 мин., далее — 108 000g) согласно публикациям, рекомендованным Международным обществом по изучению внеклеточных везикул (the International Society for Extracellular Vesicles) [12]. Полученный осадок разбавляли в 100 мкл фосфатно-солевого буфера, разделяли на несколько пробирок и хранили при температуре -80 °C до момента использования [13]. Отдельно по такому же протоколу выделяли ВВ ФЖ у женщин-доноров с триггером агониста гонадотропин-рилизинг гормона.

Проведение трекового анализа частиц (Nanoparticle Tracking Analysis)

Для оценки содержания ВВ ФЖ и их размеров при различных триггерах финального созревания фолликулов образцы помещали в прибор NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания) стерильным шприцем (1 мл). Настройки захвата и анализа устанавливали вручную согласно инструкции производителя. Визуализировали ВВ ФЖ с помощью рассеяния лазерного света, броуновское движение ВВ записывали на видео. Затем записанные видео анализировали с помощью

программного обеспечения NanoSight NTA 3.1 (Malvern Instruments, Малверн, Великобритания). Количество анализируемых треков для каждого видео — более 200, суммарное число треков для каждого образца — более 5000.

Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости

Выделенные образцы ВВ ФЖ отдавали на трансмиссионную электронную микроскопию, которую выполняли рутинным методом, описанным ранее [6, 14]. Кратко, для приготовления препаратов использовались медные сетки для электронной микроскопии 1GC300 (PELCO), покрытые коллодиевой пленкой с углеродным напылением. На сетку наносилось 15 мкл образца ВВ ФЖ с концентрацией ВВ по белку — 1,7 мг/мл. После инкубации в течение 1 минуты лишняя жидкость отбиралась с помощью фильтровальной бумаги, затем проводилось негативное контрастирование 2 % водным раствором уранилацетата в течение 10 секунд, после чего жидкость отбиралась с помощью фильтровальной бумаги. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL), цифровой фотокамеры Quemesa и программного обеспечения iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

Процедура инъекции ВВ ФЖ донора в незрелые ооциты и критерии оценки

Незрелые ооциты были получены у пациенток в программах лечения бесплодия методами ВРТ после подписания информированного добровольного согласия. В рутинной практике все незрелые ооциты утилизируют, поскольку они не могут быть оплодотворены после удаления клеток кумулюса для ИКСИ. Отбирали только тех женщин, у которых было получено при трансвагинальной пункции не менее 2 незрелых ооцитов на стадии GV (группа сравнения и группа основная). Группой сравнения служили незрелые ооциты GV самой пациентки, оставленные без вмешательств в культуральной среде для ооцитов (Sage ONE step, ORIGIO, Дания). Всего было отобрано 53 незрелых ооцита в группе основной (EV-IVM, Extracellular Vesicles in vitro maturation) и 18 ооцитов в группе сравнения. Инъекцию ВВ ФЖ донора выполняли через 4 часа после очищения ооцитов от клеток кумулюса, вводя под блестящую оболочку. Процедура инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку ооцита на стадии GV проводилась на инвертированном микроскопе (Nikon Eclipse Ti, Япония) с установленными манипуляторами (Narishige Takanome, Япония). На первом этапе подготавливалась чашка

для ИКСИ (Corning, Германия) с двумя каплями: капля со средой для оплодотворения (SAGE-1 step, Origio, Дания), в которую помещали ооциты, и капля с ВВ ФЖ, обе капли покрывали культуральным маслом (OVOIL, Vitrolife, Швеция). Вторым этапом была инъекция ВВ ФЖ под блестящую оболочку ооцита с помощью микропипетки для ИКСИ (Origio, Дания). Объем вводимых ВВ ФЖ был равен $1,88-2,45 \times 10^{-6}$ мкл (диаметр ооцита 130 мкм \times внутренний диаметр иглы 4,3-4,9 мкм, ORIGIO, Дания). Концентрация по белку вводимой суспензии ВВ ФЖ была 2–2,2 мг/мл. Через 17 часов оценивали зрелость женских половых клеток в обеих группах. В случае дозревания ооцита до стадии МП проводили оплодотворение донорской спермой и дальнейшее культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты. Используемые культуральные среды были одинаковы в обеих группах (Sage ONE step, ORIGIO, Дания) без добавления дополнительных факторов. В качестве конечных точек исследования были выбраны следующие критерии: частота дозревания ооцитов до стадии МП (число клеток МП/число незрелых ооцитов GV) и частота оплодотворения (число зигот/число МП).

Статистический анализ

Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали в тесте Шапиро-Уилка. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали медиану (Me) и стандартное отклонение (SD). Для остальных данных использовали парный критерий Хи-квадрат. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

Результаты

На первом этапе было оценено содержание ВВ ФЖ у доноров при различных типах триггера финального созревания фолликулов. NTA-анализ показал различное содержание ВВ в ФЖ женщин (рис. 1). Установлено, что средний размер ВВ ФЖ при триггере овуляции а-ГнРГ составил $131 \pm 3,94$ нм, при ХГЧ — $134 \pm 6,12$ нм. В образцах обеих групп женщин присутствовали ВВ от 20 до 960 нм. Данные размеры ВВ ФЖ соответствовали микровезикулам и экзосомам. При этом концентрация ВВ существенно различалась у отобранных молодых пациенток в зависимости от типа препарата. При использовании ХГЧ средняя концентра-

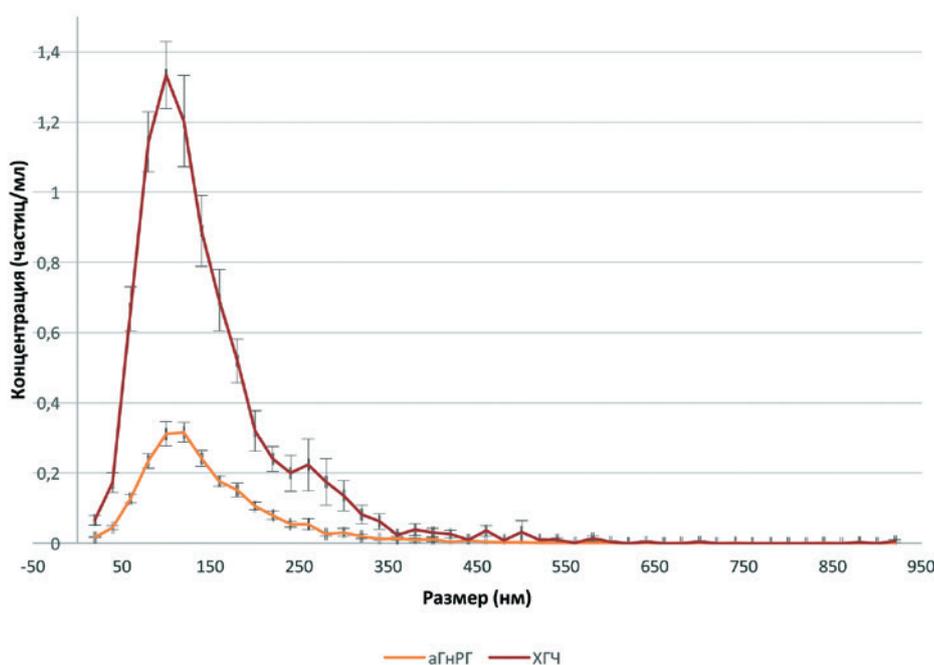


Рис. 1. Распределение частиц по размерам и концентрации, полученное методом NTA, для образцов ВВ ФЖ женщин при различных типах триггера финального созревания фолликулов
Примечание: ХГЧ — хорионический гонадотропин человека; а-ГнРГ — агонист гонадотропин-рилизинг гормона.

Figure 1. Distribution of particles by size and concentration, obtained using the NTA method, for samples of follicular fluid (FF) from women with different types of triggers for final follicular maturation

Note: hCG — human chorionic gonadotropin; a-GnRH — gonadotropin-releasing hormone agonist.

ция ВВ составила $(9,36 \pm 1,3) \times 10^{10}$ част./мл, при аГнРГ — $(1,02 \pm 0,2) \times 10^{10}$ част./мл. Данные по концентрации и размерам представлены на рисунке 1.

Результаты трансмиссионной электронной микроскопии подтвердили результаты, полученные при НТА-анализе. Микрофотографии показаны на рисунках 2 и 3. Морфометрический анализ данных препаратов мы проводили, опираясь на результаты A. S. Neugoud и соавторов (2022), которые ввели классификацию ВВ ФЖ женщин [7]. Были обнаружены ВВ следующих морфологических классов (рис. 2, 3): экзосомы и экзосомы с двойной оболочкой.

Таким образом, на первом этапе исследования было установлено, что при использовании триггера ХГЧ концентрация ВВ ФЖ практически в 9,1 раза превышает таковую при а-ГнРГ. Данный факт может быть объяснен различным биологическим действием препаратов на клетки кумулюса (КК) при стимуляции функции яичников. Действие ХГЧ приводит

к большей экспансии КК и разрастанию гиалуронового матрикса, окружающего ооцит-кумуляный комплекс, что позволяет клеткам с большей интенсивностью выделять ВВ в полость фолликула.

На втором этапе оценивали эффективность метода EV-IVM. Результаты показаны в таблице 1. Как видно из таблицы, результаты технологии дозревания ооцитов путем инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку показали свою высокую клиническую значимость. Частота дозревания статистически значимо была выше в группе основной по сравнению с группой ооцитов, которые не подвергали воздействию ВВ: 73,5 % против 33,3 %, $p = 0,003$. По частоте оплодотворения группы между собой не отличались.

Обсуждение

В процессе созревания ооцита человека очень важна коммуникация между КК и ооцитом жен-

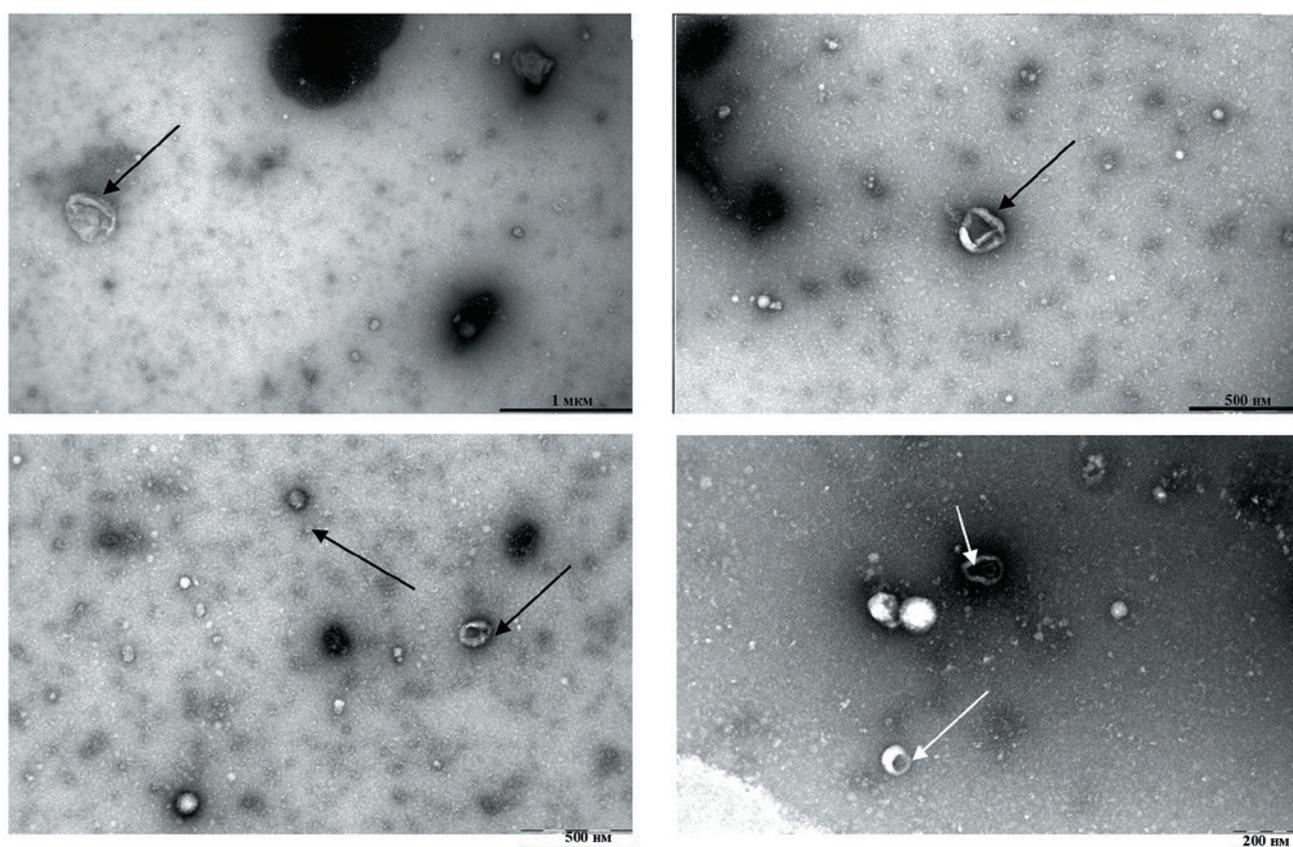


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин в программах стимуляции функции яичников с триггером хорионический гонадотропин человека (масштабный отрезок указан на микрофотографиях; стрелками указаны ВВ)

Figure 2. Transmission electron microscopy of extracellular vesicles from the follicular fluid of women in ovarian stimulation programs with human chorionic gonadotropin as the trigger (the scale bar is indicated on the micrographs; arrows indicate EVs (extracellular vesicles))

Таблица 1. Оценка эффективности дозревания и оплодотворения при использовании технологии инъекции ВВ ФЖ под блестящую оболочку

Table 1. Evaluation of the efficiency of maturation and fertilization using the technology of FF EV injection under the zona pellucida

	Группа основная EV-IVM n = 53	Группа сравнения n = 18	
Частота дозревания МП, %	73,5 % (39/53)	33,3 % (6/18)	p = 0,003 (хи-квадрат) ОШ = 5,57 ДИ:1,75–17,6
Частота оплодотворения, %	74,3 % (29/39)	66,6 % (4/6)	p > 0,05

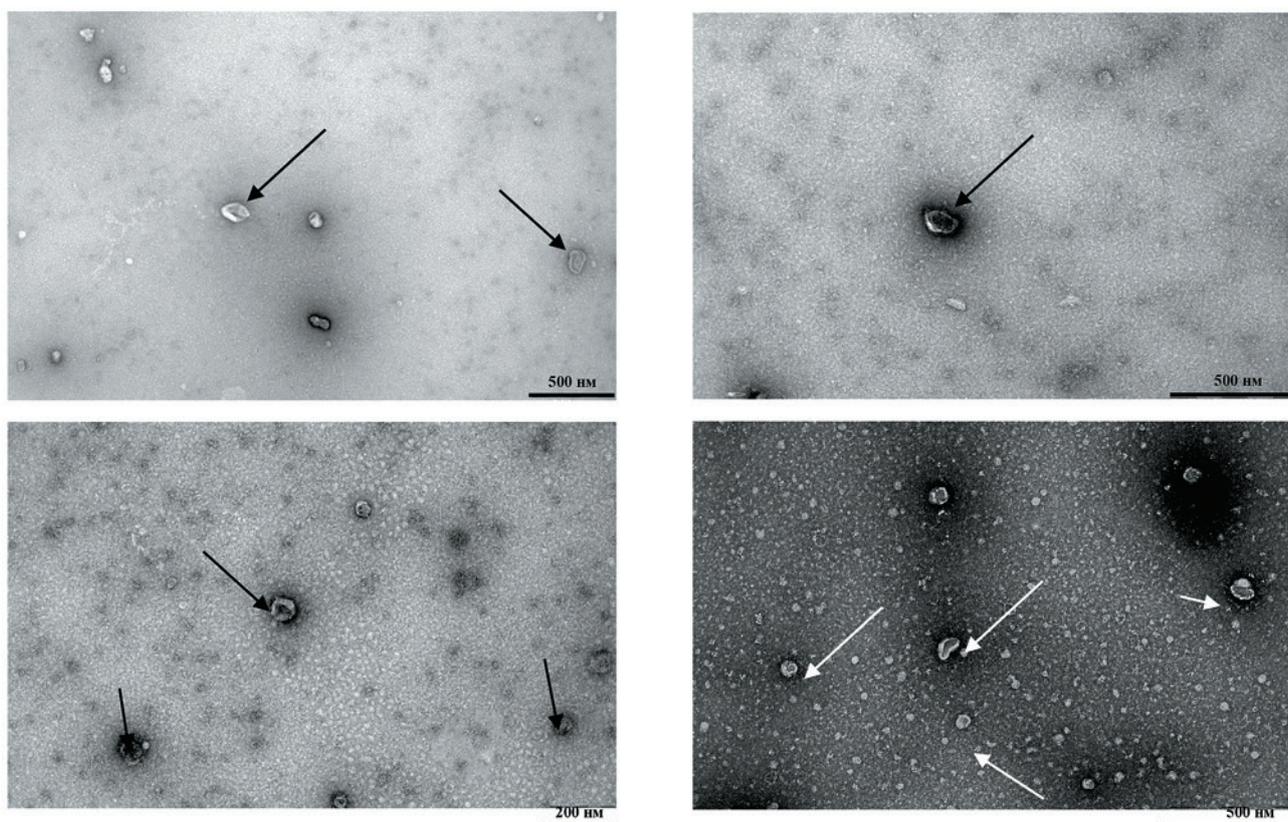


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул фолликулярной жидкости женщин в программах стимуляции функции яичников с агонистом гонадотропин-рилизинг гормона (масштабный отрезок указан на микрофотографиях; стрелками указаны ВВ)

Figure 3. Transmission electron microscopy of extracellular vesicles from the follicular fluid of women in ovarian stimulation programs with a gonadotropin-releasing hormone agonist as the trigger (the scale bar is indicated on the micrographs; arrows indicate EVs (extracellular vesicles))

ской гаметы. Особенно важны межклеточные коммуникации в преовуляторном фолликуле. В течение нескольких часов после повышения уровня лютеинизирующего гормона контакты между клетками кумулюса ослабевают, ооцит-кумуляный комплекс быстро увеличивается в размере

[15]. Это стимулирует экспрессию EGF-подобных факторов (амфирегулин, эпирегулин), которые секретируются в антральную область для связывания рецепторов EGF, расположенных на КК. Эти EGF-подобные сигналы, наряду с факторами роста, секретируемые ооцитом (например, GDF9,

BMP15 и др.), обеспечивают мощный коктейль стимуляторов, который способствует активизации генов, необходимых для быстрой пролиферации и дифференцировки КК (например, HAS2, PTGS2, PTX3 и TNFAIP6). Эти гены, в свою очередь, секретируют так называемый гелеобразный матрикс из гиалуроновой кислоты и стабилизирующих факторов, вызывающих экспансию КК [16, 17].

Стоит отметить, что именно ВВ ФЖ несут важные факторы, влияющие на ооцит [18]. Экспериментальные модели на животных показали, что добавление ВВ из ФЖ небольших фолликулов в среду культивирования приводило к увеличению количества бластоцист, изменениям в транскрипции генов эмбрионов, а также изменению уровней метилирования ДНК [8, 19]. На ооцитах крупного рогатого скота было показано, что в ВВ ФЖ присутствуют отдельные регуляторные миРНК (miR-151-3p и miR-425-5p), которые улучшают не только созревание ооцитов, но и дальнейшее эмбриональное развитие [20]. Интересное исследование провели М. Luis-Calero и коллеги (2024), охарактеризовав секрет ВВ преовуляторной ФЖ и его влияние на ооциты лошадей во время созревания *in vitro*. Авторы показали, что степень экспрессии GDF9 и BMP15 влияет на компетентность созревания ооцитов лошадей [21]. С каждым годом аналогичных исследований становится все больше, и необходимо экстраполировать данные, полученные на животных моделях, на биологический материал человека для более глубокого понимания механизмов созревания женских гамет и применения полученных знаний в клинической практике.

Исследования подобного типа на ооцитах человека описаны в литературе не были. Также на животных моделях было установлено, что экзосомы ФЖ обладают цитопротекторным действием. Обработка ооцитов экзосомами, полученными из ФЖ, снижала апоптоз КК и повреждение ооцитов, вызванное тепловым шоком [22].

В программах лечения бесплодия триггер финального созревания ооцита является крайне важным в силу биологических процессов, необходимых для формирования компетентного ооцита. В то время как использование хорионического гонадотропина человека является стандартным подходом для индукции овуляции в циклах ВРТ, агонисты гонадотропин-рилизинг-гормона также применяются для индукции всплеска лютеинизирующего гормона. Важным клиническим преимуществом триггера а-ГнРГ является его способность вызывать лютеализ и ингибировать секрецию вазоактивных продуктов, особенно фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), внутри формирующегося желтого тела.

Недавно была показана существенная разница в профиле экспрессии малых некодирующих РНК (miRNAs) во ВВ ФЖ женщин при различных типах триггера финального созревания ооцитов в программах ВРТ [22]. Авторы идентифицировали 41 EV-miRNA, уровни экспрессии которых значительно различались между двумя группами триггеров. Биоинформатический анализ генов, регулируемых этими EV-miRNAs, показал различные пути между двумя триггерами, включая сигнализацию TGF-beta, клеточный цикл и сигнальные пути WNT. Большинство этих путей регулируют каскады, связанные с апоптозом, развитием эмбриона, имплантацией, децидуализацией и развитием плаценты.

В настоящем исследовании для дозревания применяли ВВ ФЖ при триггере ХГЧ, воздействуя на ооциты, полученные при использовании триггера а-ГнРГ. Именно данная комбинация позволила получить высокую частоту дозревания ооцитов. В первоначальном пилотном проекте мы не разделяли незрелые ооциты на стадии GV пациенток по типу триггера, и, возможно, поэтому не было получено достоверной разницы (результаты не представлены).

Заключение

Частота получения зрелых ооцитов в программах лечения бесплодия методами ВРТ не превышает 80 %, а иногда все полученные клетки не пригодны для оплодотворения в силу своей незрелости и программу приходится останавливать. Ооциты на стадии зародышевого пузырька, получаемые при трансвагинальной пункции, крайне редко спонтанно созревают, именно поэтому необходима разработка подходов их дозревания. ФЖ представляет собой жидкость яичников, которая играет важную роль в созревании яйцеклеток и является источником ВВ. В настоящей работе предложено использовать инъекцию ВВ ФЖ донора под блестящую оболочку ооцита, что позволило увеличить частоту дозревания с 33,3 % до 73,5 %. В отличие от традиционных программ дозревания ооцитов ОТО-IVM и САРА-IVM, которые невозможно проводить без окружающих клеток кумулюса, выделение внеклеточных везикул является недорогой процедурой, позволяющей получать хорошие результаты. Более того, предлагаемый метод использует женские половые клетки на стадии GV без окружающих клеток кумулюса, которые были удалены при стандартной подготовке к процедуре ИКСИ. Такие ооциты GV в рутинной практике не пригодны для дальнейшего применения в программах лечения бесплодия методами ВРТ. Считаем, что метод EV-IVM можно использовать для дозревания ооцитов

на стадии GV, чтобы увеличить число пригодных для оплодотворения клеток и тем самым повысить шансы наступления беременности в программах лечения бесплодия методами ВРТ.

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Silber SJ, Goldsmith S, Castleman L, Hayashi K. *In Vitro* Maturation, *In Vitro* Oogenesis, and Ovarian Longevity. *Reprod Sci.* 2024 May;31(5):1234–1245. DOI: 10.1007/s43032-023-01427-1. Epub 2023 Dec 30. PMID: 38160209; PMCID: PMC11090930.
- Das M, Son WY. *In vitro* maturation (IVM) of human immature oocytes: is it still relevant? *Reprod Biol Endocrinol.* 2023 Nov 22;21(1):110. DOI: 10.1186/s12958-023-01162-x. PMID: 37993914; PMCID: PMC10664544.
- Ho VN, Ho TM, Vuong LN, Garcia-Velasco J. An update on the current indications for *in vitro* maturation. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2024 Jun 1;36(3):173–180. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000942. Epub 2024 Jan 31. PMID: 38295060.
- Nejabati HR, Roshangar L, Nouri M. Follicular fluid extracellular vesicle miRNAs and ovarian aging. *Clin Chim Acta.* 2023 Jan 1;538:29–35. DOI: 10.1016/j.cca.2022.11.003. Epub 2022 Nov 8. PMID: 36368351.
- Zhou Z, Zhang Y, Zhang X, et al. Follicular Fluid-Derived Small Extracellular Vesicles Alleviate DHEA-Induced Granulosa Cell Apoptosis by Delivering LINC00092. *Reprod Sci.* 2023 Oct;30(10):3092–3102. DOI: 10.1007/s43032-023-01251-7. Epub 2023 May 15. PMID: 37188981.
- Sysoeva AP, Makarova NP, Silachev DN, et al. Influence of Extracellular Vesicles of the Follicular Fluid on Morphofunctional Characteristics of Human Sperm. *Bull Exp Biol Med.* 2021 Dec;172(2):254–262. DOI: 10.1007/s10517-021-05372-4. Epub 2021 Dec 2. PMID: 34855079.
- Neyroud AS, Chiechio RM, Moulin G, et al. Diversity of Extracellular Vesicles in Human Follicular Fluid: Morphological Analysis and Quantification. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 2;23(19):11676. DOI: 10.3390/ijms231911676. PMID: 36232981; PMCID: PMC9570429.
- Gabryś J, Kij-Mitka B, Sawicki S, et al. Extracellular vesicles from follicular fluid may improve the nuclear maturation rate of *in vitro* matured mare oocytes. *Theriogenology.* 2022 Aug;188:116–124. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.05.022. Epub 2022 May 27. PMID: 35689941.
- Makarova NP, Sysoeva AP, Sylachev DN, et al. Technology for human oocyte maturation at Gv-stage using extracellular follicular fluid vesicles in fertilization programs *in vitro*:v-ivm (extracellular vesicles *in vitro* maturation) No 2023101793: date of filling: 27.01.2023: published: 15.11.2023. Proprietor(s): Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie “Natsionalnyj meditsinskij issledovatel’skij centr akusherstva, ginekologii i perinatologii imeni akademika V. I. Kulakova” Ministerstva zdavookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU) - EDN WEZOFP. In Russian [Патент № 2807492 С1 Российская Федерация, МПК С12N 5/075, А61К 35/54. Технология дозревания ооцитов человека на стадии GV с помощью внеклеточных везикул фолликулярной жидкости в программах экстракорпорального оплодотворения: EV-IVM (extracellular vesicles *in vitro* maturation): № 2023101793: заявл. 27.01.2023: опубл. 15.11.2023 / Н. П. Макарова, А. П. Сысоева, Д. Н. Силачев [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. EDN WEZOFP].
- Order of the Ministry of Health of the Russian Federation (RU) 31.07.2020 No 803n “About the procedure for the use of assisted reproductive technologies, contraindications and restrictions to their use” (Registration 19.10.2020 No 60457). Text: web-site // Official Internet portal of legal information: – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202010190041?>. In Russian [Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31.07.2020 № 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению» (зарегистрирован 19.10.2020 № 60457). Текст: электронный // Официальный интернет-портал правовой информации: – URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202010190041?>].
- Clinical recommendations. Female infertility. 2024. Text: electronic // Ministry of Health of the Russian Federation: official website. – URL: <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/magic/default/download/14971.html> (data obrashcheniya: 01.12.2024). In Russian [Клинические рекомендации. Женское бесплодие. 2024. Текст: электронный // Министерство здравоохранения Российской Федерации: официальный сайт. – URL: <https://mosgorzdrav.ru/ru-RU/magic/default/download/14971.html> (дата обращения: 01.12.2024)].
- Welsh JA, Goberdhan DCI, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024 Feb;13(2):e12404. DOI: 10.1002/jev2.12404. Erratum in: *J Extracell Vesicles.* 2024 May;13(5):e12451. DOI: 10.1002/jev2.12451. PMID: 38326288; PMCID: PMC10850029.
- Kenigsberg S, Wyse BA, Librach CL, da Silveira JC. Protocol for exosome isolation from small volume of ovarian follicular fluid: evaluation of ultracentrifugation and

commercial kits // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1660. P. 321–341. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1_26.

14. Zorova LD, Kovalchuk SI, Popkov VA, et al. Do Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Contain Functional Mitochondria? *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 3;23(13):7408. DOI: 10.3390/ijms23137408. PMID: 35806411; PMCID: PMC9266972.

15. Martinez CA, Rizos D, Rodriguez-Martinez H, Funahashi H. Oocyte-cumulus cells crosstalk: New comparative insights. *Theriogenology.* 2023 Jul 15;205:87–93. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.04.009. Epub 2023 Apr 18. PMID: 37105091.

16. Nagyova E. The Biological Role of Hyaluronan-Rich Oocyte-Cumulus Extracellular Matrix in Female Reproduction. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 18;19(1):283. DOI: 10.3390/ijms19010283. PMID: 29346283; PMCID: PMC5796229.

17. Del Bianco D, Gentile R, Sallicandro L, et al. Electro-Metabolic Coupling of Cumulus-Oocyte Complex. *Int J Mol Sci.* 2024 May 14;25(10):5349. DOI: 10.3390/ijms25105349. PMID: 38791387; PMCID: PMC11120766.

18. Machtinger R, Racowsky C, Baccarelli AA, et al. Recombinant human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone agonist differently affect the profile of extracellular vesicle microRNAs in human follicular fluid. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40:527–536. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02703-w>

19. Piibor J, Dissanayake K, Midekessa G, et al. Characterization of bovine uterine fluid extracellular vesicles proteomic profiles at follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Vet Res Commun.* 2023;47:885–900. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10052-3>

20. Aoki S, Inoue Y, Hara S, et al. microRNAs associated with the quality of follicular fluids affect oocyte and early embryonic development. *Reprod Med Biol.* 2024 Jan 18;23(1):e12559. DOI: 10.1002/rmb2.12559. PMID: 38239486; PMCID: PMC10795439.

21. Luis-Calero M, Marinaro F, et al. Characterization of preovulatory follicular fluid secretome and its effects on equine oocytes during *in vitro* maturation. *Res Vet Sci.* 2024 May;171:105222. DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105222. Epub 2024 Mar 11. PMID: 38513461.

22. Nicolao MC, Rodriguez Rodrigues C, Cumino AC. Extracellular vesicles from *Echinococcus granulosus* larval stage: Isolation, characterization and uptake by dendritic cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(1):e0007032. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007032>

Информация об авторах:

Зингеренко Борис Владимирович, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Макарова Наталья Петровна, д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Сысоева Анастасия Павловна, к.б.н., эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Евтушенко Екатерина Алексеевна, к.б.н., старший преподаватель биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

Кулакова Елена Владимировна, д.м.н., старший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России.

Authors information:

Boris V. Zingerenko, Junior Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Natalya P. Makarova, DSc, leading researcher, department of IVF named after Professor B. V. Leonov, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Anastasia P. Sysoeva, PhD, Embryologist, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Ekaterina A. Evtushenko, PhD, Senior Lecturer, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University;

Elena V. Kulakova, MD, senior researcher, department of IVF named after Professor B. V. Leonov, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Elena A. Kalinina, MD, PhD, professor, Chief of Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПУТЕМ АСИММЕТРИЧНОЙ ГЛУБИННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Гаврилов М. Ю.¹, Макарова Н. П.¹, Якимова А. С.¹,
Вишнякова П. А.^{1,3}, Карягина В. Е.^{1,3}, Сысоева А. П.¹,
Евтушенко Е. А.², Калинина Е. А.¹

Контактная информация:
Макарова Наталья Петровна,
ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии
и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова»
Минздрава России,
ул. Академика Опарина, д. 4, Москва,
Россия, 117997.
E-mail: np_makarova@oparina4.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины медицинского института, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

*Статья поступила в редакцию 11.10.2024
и принята к печати 27.12.2024*

Резюме

Актуальность. Биологические жидкости организма содержат множество популяций внеклеточных везикул (ВВ), которые различаются по размеру, клеточному происхождению, молекулярному составу и биологической активности. В данном исследовании впервые был применен метод выделения ВВ из семенной плазмы (СП) с помощью асимметричной глубинной фильтрации без использования метода ультрацентрифугирования, который на данный момент является классическим в лабораторной практике. **Цель.** Подтвердить возможность использования нового метода выделения ВВ СП с помощью асимметричной глубинной фильтрации через полупроницаемую мембрану, который может послужить достойной альтернативой рутинному методу ультрацентрифугирования. **Материалы и методы.** Было отобрано 12 образцов семенной плазмы молодых мужчин и пациентов позднего репродуктивного возраста со слабо выраженной формой тератозооспермии. Из данных проб исследуемым методом были выделены ВВ СП. Вестерн-блот анализ на мембранные маркеры везикул CD9, CD63, CD81 показал присутствие ВВ СП в изучаемых образцах. Трансмиссионная электронная микроскопия также доказала присутствие ВВ СП. Были описаны морфологические особенности ВВ СП мужчин различного возраста. Количественные характеристики образцов ВВ СП оценивали с помощью Nanoparticle Tracking Analysis (NTA-анализ). **Результаты.** Полученные распределения частиц по размерам и концентрации демонстрируют возрастные изменения ВВ СП: в препаратах группы позднего репродуктивного возраста выявлен сдвиг пика распределения в сторону частиц большего размера по сравнению с пиком распределения в группе молодых мужчин. **Заключение.** Полученные результаты дают основание для продолжения изучения ВВ СП и рассмотрения возможностей клинического использования ВВ СП в программах экстракорпорального оплодотворения.

Ключевые слова: бесплодие, внеклеточные везикулы, возраст, вспомогательные репродуктивные технологии, простасомы, семенная плазма, экзосомы, эякулят

Для цитирования: Гаврилов М.Ю., Макарова Н.П., Якимова А.С. и др. Возрастные изменения внеклеточных везикул семенной плазмы, выделенных путем асимметричной глубинной фильтрации. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 27-36. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-27-36. EDN: VBTDL



AGE-RELATED CHANGES IN EXTRACELLULAR VESICLES OF SEMINAL PLASMA ISOLATED BY ASYMMETRIC DEPTH-FILTRATION

Maksim Yu. Gavrilov¹, Natalya P. Makarova¹,
Alexandra S. Yakimova¹, Polina A. Vishnyakova^{1,3},
Victoria E. Karyagina^{1,3}, Anastasia P. Sysoeva¹,
Ekaterina A. Evtushenko², Elena A. Kalinina¹

Corresponding author:

Natalya P. Makarova,
Academician V. I. Kulakov National Medical
Research Centre for Obstetrics, Gynecology
and Perinatology,
Ac. Oparin str., 4, Moscow, Russia, 117997.
E-mail: np_makarova@oparina4.ru

¹ Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for
Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples'
Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Received 11 October 2024; accepted
27 December 2024



Abstract

Background. Biological fluids contain diverse extracellular vesicle (EV) populations differing in size, origin, composition, and function. This study pioneers asymmetric depth filtration for isolating seminal plasma (SP) EVs, bypassing ultracentrifugation (current gold standard). **Objective.** Validate the novel asymmetric depth filtration method for SP EV isolation as an alternative to ultracentrifugation. **Design and methods.** Twelve samples of seminal plasma were collected from young men and patients of advanced reproductive age with mild teratozoospermia. EVs were isolated from the SP using the proposed method. Western blot analysis for vesicle membrane markers CD9, CD63, and CD81 confirmed the presence of SP EVs in the studied samples. Transmission electron microscopy further validated the presence of SP EVs. Morphological characteristics of SP EVs from men of different age groups were described. Quantitative characteristics of the SP EV samples were assessed using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). **Results.** The obtained particle size and concentration distributions revealed age-related changes in SP EVs: in the advanced reproductive age group, a shift in the distribution peak toward larger particles was observed compared to the peak distribution in the young men group. **Conclusion.** The results provide a basis for further investigation of SP EVs and exploration of their potential clinical applications in assisted reproductive technologies, such as *in vitro* fertilization programs.

Key words: age, assisted reproductive technologies, ejaculate, exosomes, extracellular vesicles, infertility, prostasomes, seminal plasma

For citation: Gavrilov MYu, Makarova NP, Yakimova AS, et al. Age-related changes in extracellular vesicles of seminal plasma isolated by asymmetric depth-filtration. *Translational Medicine*. 2025; 12(1): 27-36. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-27-36. EDN: VBTDL

Список сокращений: ВВ — внеклеточные везикулы, ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии, СП — семенная плазма, NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) — анализ траекторий наночастиц.

Введение

Семенная плазма представляет собой сложную биологическую жидкость, которая необходима для выполнения различных функций мужских половых клеток в процессе оплодотворения: от поддержания подвижности сперматозоидов до изменения иммунного ответа женского репродуктивного тракта во время оплодотворения. Семенная плазма очень богата внеклеточными везикулами, вырабатываемыми железами внутренней секреции мужского полового тракта (простата, эпидидимис, семенные пузырьки и бульбоуретральные железы) [1, 2]. В научной литературе были описаны три вида ВВ СП в зависимости от места их образования: микровезикулы и простасомы (размеры от 100 нм до 1000 нм, вырабатываются эпидидимисом и клетками предстательной железы соответственно), миелinosомы (размер от 200 нм до 700 нм, вырабатываются извитыми семенными канальцами) и экзосомы (размер от 30 нм до 100 нм, вырабатываются преимущественно простатой) [1, 3].

С возрастом происходит старение органов мужской репродуктивной системы, что отражается на фертильности мужских половых клеток, в частности все чаще исследователи указывают на эпигенетическое старение сперматозоидов [3, 4]. Происходит накопление точечных мутаций в геноме клетки, снижается возможность транскрипции определенных генов, уменьшается концентрация половых клеток в эякуляте [3]. Гистологические исследования на животных и человеке подтверждают морфологические изменения тканей органов репродуктивной системы с увеличением возраста [5]. Именно поэтому все чаще говорят об изменениях не только самих половых клеток, но и в биологических жидкостях репродуктивных органов и тканей [6, 7].

Целью данного исследования было определить возможность выделения внеклеточных везикул (ВВ) семенной плазмы (СП) методом глубинной фильтрации через полупроницаемую мембрану и сравнить характеристики ВВ СП у молодых мужчин и пациентов позднего репродуктивного возраста.

Материалы и методы

Получение семенной плазмы

Образцы эякулята были получены у 12 мужчин различного возраста, проходящих лечение

бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Всем мужчинам проводили оценку эякулята согласно Руководству ВОЗ по оценке и обработке эякулята (2010 г.). В исследование были отобраны мужчины, у которых были рожденные дети (подтвержденная фертильность), однако по результатам спермограммы выявлялось незначительное снижение количества морфологически нормальных форм сперматозоидов, слабо выраженная форма тератозооспермии — снижение числа морфологически нормальных форм сперматозоидов менее 4 % (строгий анализ спермограммы по Крюгеру). Концентрация мужских половых клеток и их подвижность находились в пределах нормальных значений. Все мужчины-доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Образцы спермы были получены путем мастурбации после 3–5 дней полового воздержания, далее происходил процесс разжижения на электрической мешалке на 150 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре с последующей оценкой характеристик эякулята. Семенная плазма отделялась от клеточных элементов эякулята путем центрифугирования при 400g в течение 10 минут при комнатной температуре, далее отбирался супернатант и переносился в новую пробирку для последующего выделения внеклеточных везикул. Все образцы полученной семенной плазмы были разделены на две группы в зависимости от возраста мужчины: группа 1 (молодые пациенты, 24–28 лет, n = 6) и группа 2 (мужчины позднего репродуктивного возраста, 43–48 лет, n = 6).

Выделение внеклеточных везикул семенной плазмы путем асимметричной глубинной фильтрации

Выделение внеклеточных везикул осуществляли при стандартизированном объеме семенной плазмы для всех пациентов, равном 2 мл, при помощи дифференциального центрифугирования, включая стадию отмычки от крупной фракции и последующее пропускание через полупроницаемую мембрану [8, 9]. Семенную плазму получали путем осаждения сперматозоидов из эякулята на центрифуге 10 минут 500g, дальнейшая очистка семенной плазмы происходила на микроцентрифуге при 15 000 об/мин в течение 30 минут при комнатной температуре [10]. Затем очищенную семенную плазму использовали для выделения везикул с помощью асимметричной глубинной фильтрации [11] в соответствии с протоколом производителя картриджей («Простагност», Москва, Россия) при скорости центрифугирования, уста-

новленной на 400g. После выделения ВВ хранили в пробирках protein LoBind (Эппендорф, Гамбург, Германия) при температуре -20 °С до анализа.

Оценка общего содержания белка во внеклеточных везикулах семенной плазмы

Анализ концентрации общего белка проводился с помощью спектрофотометра DS-11 FX+ (DeNovix, США) по технологии NanoDrop согласно инструкции производителя. Для исследования 1 мкл образца помещали в испытательную камеру и воздействовали излучением с длиной волны 280 нм для получения количественного определения образцов на основе значений абсорбции на детекторе 2048 element CCD.

Анализ траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis)

Перед проведением анализа траекторий наночастиц (NTA) образцы внеклеточных везикул размораживали и разводили в пропорции 1:10 000 в DPBS (Gibco, США). NTA выполнялся с помощью NanoSight LM10, оснащенного лазером мощностью 45 МВт с длиной волны 488 нм (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). В течение нескольких минут после разбавления образец вводили в испытательную ячейку, освещали лазером и записывали пять видеороликов продолжительностью 1 минута на высокочувствительную камеру sCMOS с уровнем восприимчивости сигнала, установленным на 15, для фиксации движения частиц. Затем видеозаписи были проанализированы с помощью программного обеспечения Nanosight версии 3.2 с порогом обнаружения, равным 5, раз-

мером размытия и максимальным расстоянием скачка, установленным на авто, для определения концентрации ВВ и распределения по размерам. Предполагалось, что вязкость DPBS соответствует вязкости воды при той температуре, которая была во время измерений [12].

Вестерн-блот внеклеточных везикул семенной плазмы

Маркеры внеклеточных везикул охарактеризовали с помощью метода вестерн-блоттинга. Образец ВВ смешивали с 2x Laemmli Sample буфером (Bio-rad, США). По 10 мкл образца наносили на 12 % полиакриламидный гель. Использовали белковый маркер молекулярной массы 10–250 кДа (Thermo Fisher Scientific, США). Белки разделяли при напряженности поля 80 В в течение 30 минут в концентрирующем геле и 180 В в разделяющем геле в течение 1 часа. Далее осуществляли полусухой перенос белков из геля на PVDF-мембрану с помощью системы Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-rad, США). После блокирования сайтов неспецифического связывания антител мембрану инкубировали с первичными антителами (табл. 1): анти-CD81 (Affinity Biosciences, DF8045, 1:1000), анти-CD63 (Affinity Biosciences, AF5117, 1:500), анти-CD9 (Affinity Biosciences, AF5117, 1:1000) при +4 °С в течение 18 часов. Далее мембраны трижды промывали TBST (TBS буфер с 0,1 % Твин-20) и инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывки добавляли Clarity Western ECL (Bio-rad, США) субстрат для

Таблица 1. Моноклональные антитела, специфичные для внеклеточных везикул, использованные в исследовании

Table 1. Monoclonal antibodies specific to extracellular vesicles used in the study

Название	Номер в каталоге	Организм	Применение	Производитель	Концентрация
CD81 Antibody	DF8045	Человек	Вестерн-блот; иммуноферментный анализ	Affinity Biosciences, Китай	1:1000
CD63 Antibody	AF5117	Человек, Мышь, Крыса	Вестерн-блот; иммуногистохимия, иммуноферментный анализ	Affinity Biosciences, Китай	1:500
CD9 Antibody	AF5139	Человек, Мышь, Крыса	Вестерн-блот; иммуногистохимия, иммунофлюоресценция/ иммуноцитохимия, иммуноферментный анализ	Affinity Biosciences, Китай	1:1000

хемилюминесцентной детекции с помощью системы документации ChemiScore (Clinx, Китай). Программное обеспечение Clinx применялось для денситометрического анализа. В качестве контроля использовали буфер PBS без ВВ СП.

Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул семенной плазмы

Для приготовления препаратов из выделенных образцов ВВ СП применяли медные сетки для электронной микроскопии IGC300 (PELCO), покрытые коллодиевой пленкой с углеродным напылением. На сетку наносили 15 мкл образца ВВ СП. После инкубации в течение 1 минуты лишнюю жидкость отбирали с помощью фильтровальной бумаги, затем проводили негативное контрастирование 2 % водным раствором уранилацетата

в течение 10 секунд с последующим отбором лишней жидкости фильтровальной бумагой. Оценку ВВ СП выполняли с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL), цифровой фотокамеры Quemesa и программного обеспечения iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

Статистический анализ данных

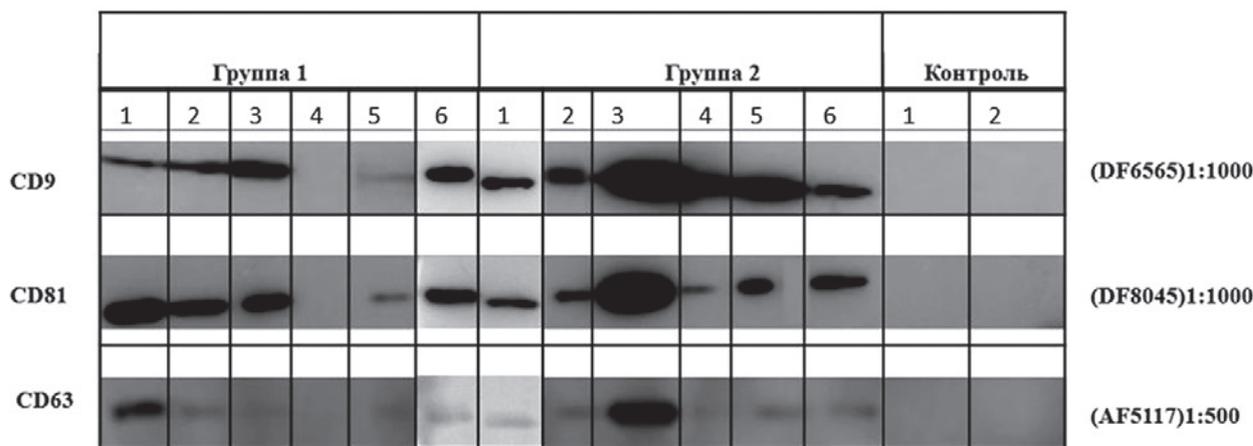
Статистическая обработка данных выполнялась с помощью таблиц Microsoft Excel и статистической программы SPSS Statistics 22 (США). Статистический анализ проводили с помощью χ^2 -теста для сравнения категориальных данных. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали в тесте Шапиро-Уилка. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение,

Таблица 2. Показатели эякулята в день выделения внеклеточных везикул семенной плазмы

Table 2. ejaculate parameters on the day of seminal plasma extracellular vesicle isolation

Параметр*	Группа 1 n = 6	Группа 2 n = 6	P
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл, млн/мл	81 (47; 110)	84 (68; 90)	> 0,05
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	66 (65; 67)	60 (55; 61)	> 0,05
Морфологически нормальные сперматозоиды, %	3 (2; 3)	2 (2; 3)	> 0,05

* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом (Q1; Q3).



Интенсивность сигнала соответствует 25 кДа.

Рис. 1. Оценка основных маркеров внеклеточных везикул, выделенных из семенной плазмы мужчин

Figure 1. evaluation of key markers of extracellular vesicles isolated from seminal plasma of men

использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате M (SD). При ранжировании признаков с распределением, отличающимся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Величину порогового уровня значимости (p) во всех исследованиях принимали равной 0,05.

Результаты

На первом этапе были охарактеризованы количественные показатели эякулята отобранных групп пациентов. Результаты показаны в таблице 2. Как видно, значимых различий по показателям спермограммы между возрастными группами мужчин не наблюдалось. Концентрация сперматозоидов в группе 1 молодых мужчин составила 81 (47; 110) млн/мл, в группе 2 — 84 (68; 90) млн/мл; прогрессивно-подвижных сперматозоидов в группе молодых — 66 (65; 67) %, группе возрастных мужчин — 60 (55; 61) %. Морфология мужских половых клеток (%) соответственно 3 (2; 3) и 2 (2; 3). Таким образом, группы по данным показателям были сопоставимы между собой. Далее методом глубинной фильтрации проводили выделение ВВ СП, которые были охарактеризованы качественно по главным маркерам внеклеточных везикул (CD81, CD63, CD9) [15]. Результаты вестерн-блота представлены на рисунке 1. Было показано, что выделенные фракции ВВ СП содержат специфичные маркеры везикул, это позволило провести дальнейшую характеристику выделенных ВВ СП в двух группах. Метод глубинной фильтрации показал свою эффективность для семенной плазмы. В более ранних работах использовался метод ультрацентрифугирования [2], метод глубинной фильтрации применен впервые.

На следующем этапе исследования выполнена сравнительная характеристика выделенных ВВ СП у мужчин разного возраста. Оценка общей концентрации белка показала отсутствие

достоверной разницы между группами (табл. 3). Результаты анализа траекторий наночастиц представлены на рисунке 2. В группе 1 молодых мужчин максимальная концентрация в препарате ВВ СП была у частиц размером 80 нм, а в группе 2 (возрастных) — 100 нм. Данные размеры везикул соответствуют экзосомам и простасомам. Более того, в группе молодых мужчин на графике прослеживается еще один пик частиц размером 170 нм. Трансмиссионная электронная микроскопия также подтвердила присутствие ВВ СП в выделенных образцах. Микрофотографии показаны на рисунках 3 и 4. ВВ СП представляют собой структуры с чашеобразной морфологией.

Таким образом, впервые примененный метод глубинной фильтрации для выделения ВВ СП подтвердил свою эффективность, а также при последующем анализе была выявлена разница в количественных характеристиках ВВ СП у мужчин разного возраста, но с одинаковыми показателями спермограммы.

Обсуждение

В нашем исследовании было показано, что метод глубинной фильтрации эффективно позволяет выделить ВВ СП. С помощью CD-маркеров и электронной микроскопии были качественно описаны ВВ. Ранее было установлено, что данный метод выделения ВВ может быть использован для других биологических жидкостей, для семенной плазмы метод предложен впервые [11].

Обнаруженные возрастные изменения ВВ СП указывают на сдвиг пика распределения частиц по размерам в сторону ВВ больших размеров у возрастных мужчин, при этом у молодых пациентов регистрировали большую концентрацию мелких ВВ. Такие изменения СП могут также объяснять эффекты внутриматочной перфузии СП на наступление беременности [13]. Как показали авторы на модели мышей, частота имплантации

Таблица 3. Оценка концентрации белка в выделенных из семенной плазмы внеклеточных везикулах у мужчин разного возраста

Table 3. Protein concentration assessment in extracellular vesicles isolated from seminal plasma of men of different age groups

Исследуемый параметр	Группа 1 n = 6	Группа 2 n = 6	p
Концентрация белка, мг/мл	6,84 (2,7; 7,1)	3,43 (0,8; 8,3)	> 0,05

* Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом (Q1; Q3).

эмбриона была примерно на 40 % ниже у мышей после внутриматочной перфузии семенной плазмы от старых самцов, чем семенной плазмы от молодых самцов. Также авторами была изучена возможность «донации» семенной плазмы. Снижение частоты имплантации было частично устранено путем добавления в «старую» мужскую семенную плазму ВВ «молодой» СП перед предимплантационной внутриматочной перфузией, с увеличением на 20 %. Эти различия объясняются разницей в содержании ВВ СП у старых и молодых самцов, вызывающей иммуномодуляцию клеток эндометрия посредством экспрессии цитокинов и хемокинов, а также различия уровней экспрессии генов в матках мышей с СП старых и молодых самцов [13].

Также показано, что с возрастом у мужчин в организме увеличивается системное воспаление, которое затрагивает семенную плазму [14]. Установлено, что угасание репродуктивной функции связано с оксидативным стрессом, воспалительными процессами в органах и тканях, и большее число обнаруженных простасом в семенной плазме в представленном эксперименте, полученных

с помощью метода выделения ВВ СП путем асимметричной глубинной фильтрации, может быть следствием общих процессов старения.

В нашей работе показана тенденция возрастных изменений ВВ СП, которую мы планируем подтвердить увеличением выборки пациентов в дальнейшем. Однако уже полученные результаты могут быть основанием для использования ВВ в программах экстракорпорального оплодотворения у человека. Возможность клинического использования ВВ СП может повысить эффективность программ экстракорпорального оплодотворения путем донации ВВ СП молодых мужчин, причем как донорской СП, так и собственной — после предварительной криоконсервации. Однако данные предположения требуют тщательного анализа и проведения предварительных экспериментальных работ на половых клетках человека. Результаты исследования подтвердили возможность выделения внеклеточных везикул семенной плазмы методом глубинной фильтрации через полупроницаемую мембрану, что являлось основной целью работы.

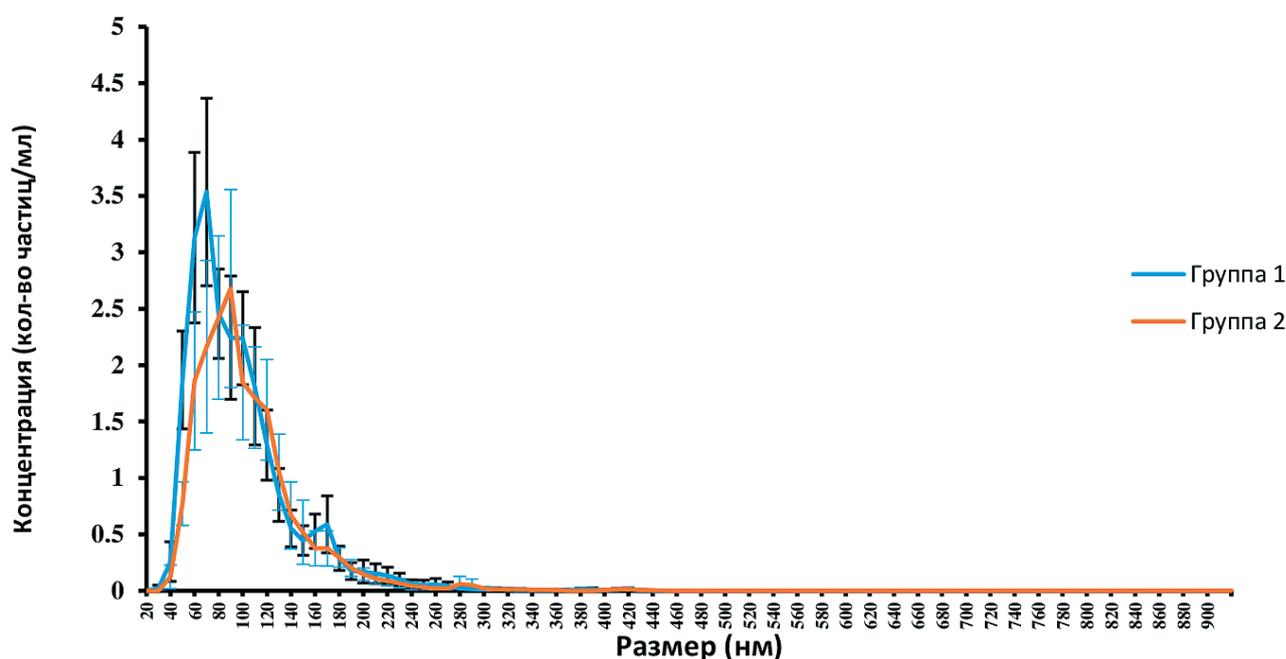


Рис. 2. Проведение анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis) внеклеточных везикул семенной плазмы мужчин выделенных возрастных групп. Группа 1 — молодые мужчины, группа 2 — мужчины позднего репродуктивного возраста. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение

Figure 2. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) of Extracellular Vesicles from Seminal Plasma of Men in Different Age Groups. Group 1 — young men, Group 2 — men of advanced reproductive age. Data are presented as mean \pm standard deviation

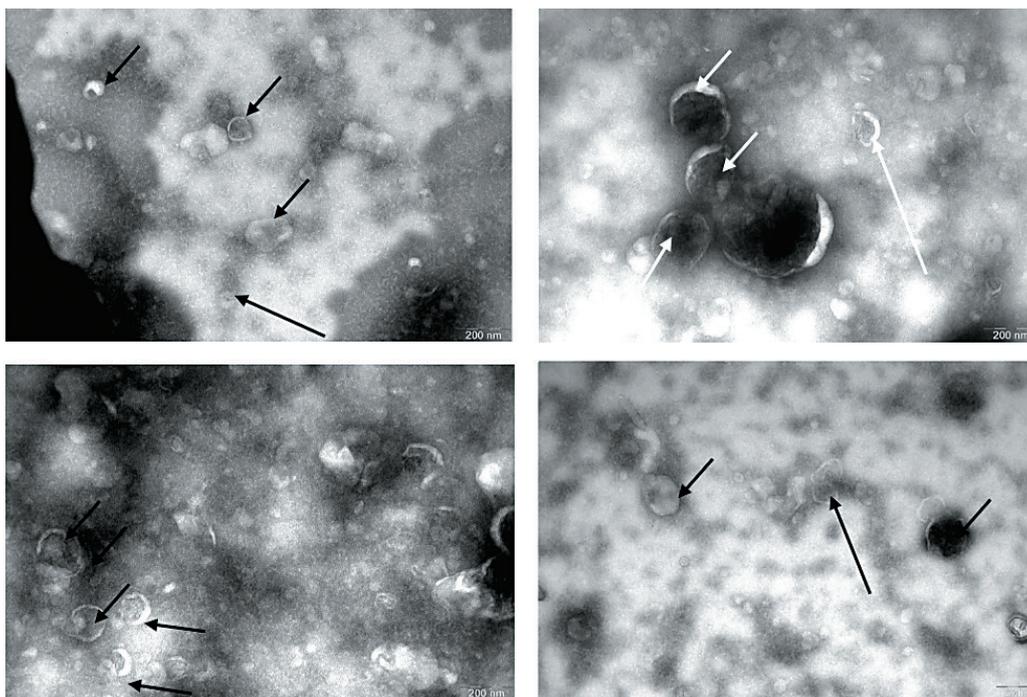


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул семенной плазмы мужчин молодого возраста. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях. Стрелками указаны ВВ СП

Figure 3. Transmission Electron Microscopy of Extracellular Vesicles from Seminal Plasma of Young Men. The scale bar is indicated on the micrographs. Arrows indicate SP EVs

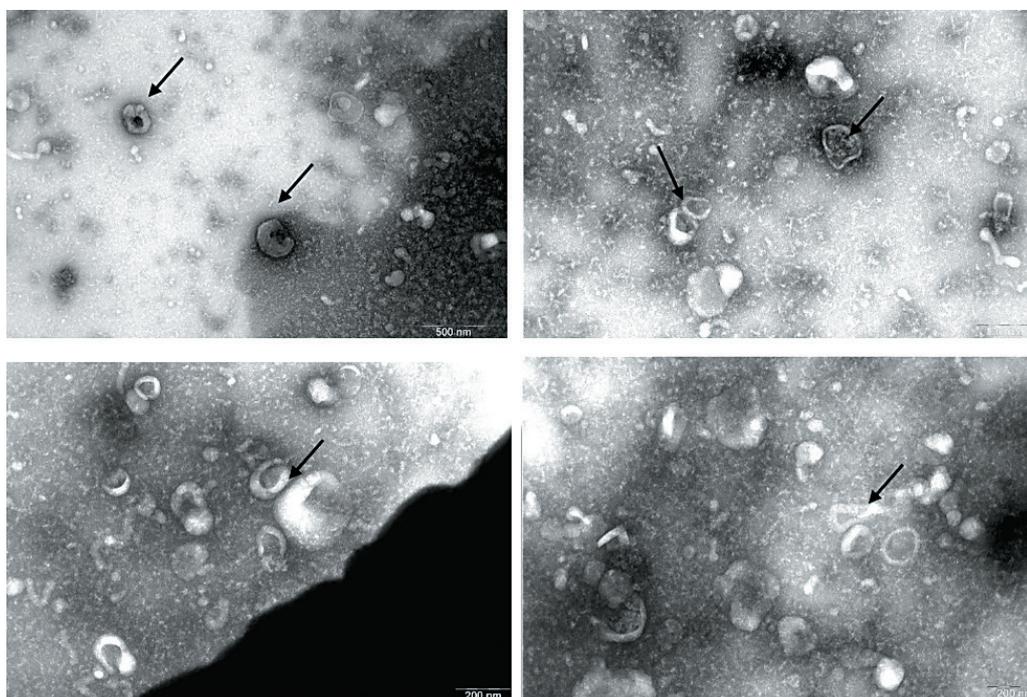


Рис. 4. Трансмиссионная электронная микроскопия внеклеточных везикул семенной плазмы мужчин позднего репродуктивного возраста. Масштабный отрезок указан на микрофотографиях. Стрелками указаны ВВ СП

Figure 4. Transmission Electron Microscopy of Extracellular Vesicles from Seminal Plasma of Men of Advanced Reproductive Age. The scale bar is indicated on the micrographs. Arrows indicate SP EVs

Заключение

Изучение ВВ СП важно, поскольку сперматозоиды находятся в состоянии транскрипционного и трансляционного «покоя» из-за упаковки ДНК с помощью протаминов, то есть события посттестискулярного созревания в придатке яичка и женских половых путях модифицируемы внешними сигналами, в том числе через везикулярный транспорт. В работе показана возможность простого выделения ВВ СП путем глубокой фильтрации, без использования большой ультрацентрифуги — дорогостоящего устройства повышенной опасности, которая требует дополнительной квалификации от сотрудника, что увеличивает время и трудозатраты на выделение внеклеточных везикул. В работе показаны изменения в концентрации (количество частиц/мл) (рис. 2) и размерах ВВ СП в зависимости от возраста мужчины. В группе молодых пациентов ВВ СП представлены большим количеством ВВ малых размеров (около 80 нм), а в группе возрастных пациентов был обнаружен сдвиг пика распределения по размерам в сторону ВВ большего размера. Данные изменения чаще всего связаны с накопленным грузом соматических заболеваний, увеличивающимся с возрастом мужчины [16]. Полученные результаты обнадеживают в возможностях оптимизации эмбриологического этапа программ лечения бесплодия методами ВРТ у человека.

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена в рамках инициативного научного проекта «Изучение влияния внеклеточных везикул биологических жидкостей репродуктивных органов и тканей на гаметы, процесс оплодотворения и раннего эмбриогенеза человека и имплантации» (2025-2027, руководитель Макарова Н.П.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. Кулакова» МЗ РФ (директор академик РАН, профессор, д.м.н. Сухих Г.Т.) / The work was carried out within the framework of the initiative scientific project "Influence of extracellular vesicles of biological fluids of reproductive organs and tissues on human gametes, fertilization, embryogenesis and implantation" (2025-2027, head Makarova N.P.) of the Federal State Budgetary Institution "Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Director Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Doctor of Medical Sciences Sukhikh G.T.).

Список литературы

1. Roca J, et al. Extracellular vesicles in seminal fluid and effects on male reproduction. An overview in farm animals and pets. *Animal Reproduction Science*. 2022; 246:106853.
2. Neyroud AS, Chiechio R, Yefimova M, et al. Extra-cellular vesicles of the male genital tract: new actors in male fertility? *Basic Clin. Androl*. 2021;31(1):25. <https://doi.org/10.1186/s12610-021-00141-9>
3. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res Rev Bras PesquiMedicas E Biol*. 2013; 46:824–30.
4. Klutstein M, Gonen N. Epigenetic aging of mammalian gametes. *Mol Reprod Dev*. 2023 Dec;90(12):785–803. DOI: 10.1002/mrd.23717. Epub 2023 Nov 24. PMID: 37997675.
5. Kühnert B, Nieschlag E. Reproductive functions of the ageing male. *Human Reproduction Update*. Vol. 10, Issue 4. July 2004, P. 327–339. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh030>
6. Vashisht A, Gahlay GK. Understanding seminal plasma in male infertility: emerging markers and their implications. *Andrology*. 2024 Jul;12(5):1058–1077. DOI: 10.1111/andr.13563. Epub 2023 Nov 28. PMID: 38018348.
7. Parra A, et al. Seminal extracellular vesicles and their involvement in male (in) fertility: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(5):4818.
8. Li H, et al. Cell-free seminal mRNA and micro-RNA exist in different forms // *PloS one*. 2012;7(4): 34566.
9. Crescitelli R, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes // *Journal of extracellular vesicles*. 2013;2(1):20677.
10. Aalberts M, et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans // *Biology of reproduction*. 2012;86(3):82, 1–8.
11. Chernyshev VS, et al. Asymmetric depth-filtration: A versatile and scalable method for high-yield isolation of extracellular vesicles with low contamination // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2022;11(8):e12256.
12. Gardiner C, et al. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles // *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):25361.
13. Wang D, et al. Seminal plasma and seminal plasma exosomes of aged male mice affect early embryo implantation via immunomodulation. *Front. Immunol*. 2021; 12:723409.
14. Frungieri MB, Calandra RS, Bartke A, Matzkin ME. Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Andrologia*. 2018 Dec;50(11):e13034. DOI: 10.1111/and.13034. Epub 2018 May 8. PMID: 29740839.

15. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019;19(1):9.

16. Frungieri MB, Calandra RS, Bartke A, Matzkin ME. Ageing and inflammation in the male reproductive tract. *Andrologia.* 2018;50(11):e13034. DOI:10.1111/and.13034.

Информация об авторах:

Гаврилов Максим Юрьевич, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Макарова Наталья Петровна, д.б.н., ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Якимова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Вишнякова Полина Александровна, к.б.н., руководитель лаборатории регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы;

Карягина Виктория Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России, НИИ молекулярной и клеточной медицины, Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы;

Сысоева Анастасия Павловна, к.б.н., эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова, ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии, перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Евтушенко Екатерина Алексеевна, к.б.н., старший преподаватель биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б. В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России.

Maksim Y. Gavrilov, Junior Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Natalya P. Makarova, PhD, Leading Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Alexandra S. Yakimova, Junior Research Fellow, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Polina A. Vishnyakova, chief of Laboratory of Regenerative Medicine, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University);

Victoria E. Karyagina, Junior Research Fellow, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University);

Anastasia P. Sysoeva, PhD, Embryologist, Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Ekaterina A. Evtushenko, PhD, Senior Lecturer, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University;

Elena A. Kalinina, MD, PhD, professor, Chief of Department of Assistive Technologies in Infertility Treatment, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

Authors information:

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 мМ Трис рН 8,0, 150 мМ 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 венопункции 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 NERES 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 мМ 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 мМ Tris, pH 7,5, 150 мМ 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 мМ Tris pH 6,8, 10 % глицерин, 2 % SDS, 0,01 % бромфеноловый синий, содержащий или не содержащий 100 мМ 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 полоски 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-

сигбензойной кислоты. Спектры после протеолиза получали в отраженном режиме прибора в диапазоне 500–6500 m/z, точность измеренных мономерных 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 Biotoools 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 мВВ 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 ИФ 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 +/- стандартное отклонение.

Результаты

Для разработки протокола преципитации была проведена серия дополнительных экспериментов. Обычно преципитацию мВВ с помощью ПЭГ выполняют либо в буфере с нейтральным рН, либо без буфера вообще. Наши предварительные эксперименты показали, что при нейтральном рН 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 рН, при котором происходит преципитация ПЭГ. Для преципитации были использованы растворы от рН 8,0 до рН 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 рН 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

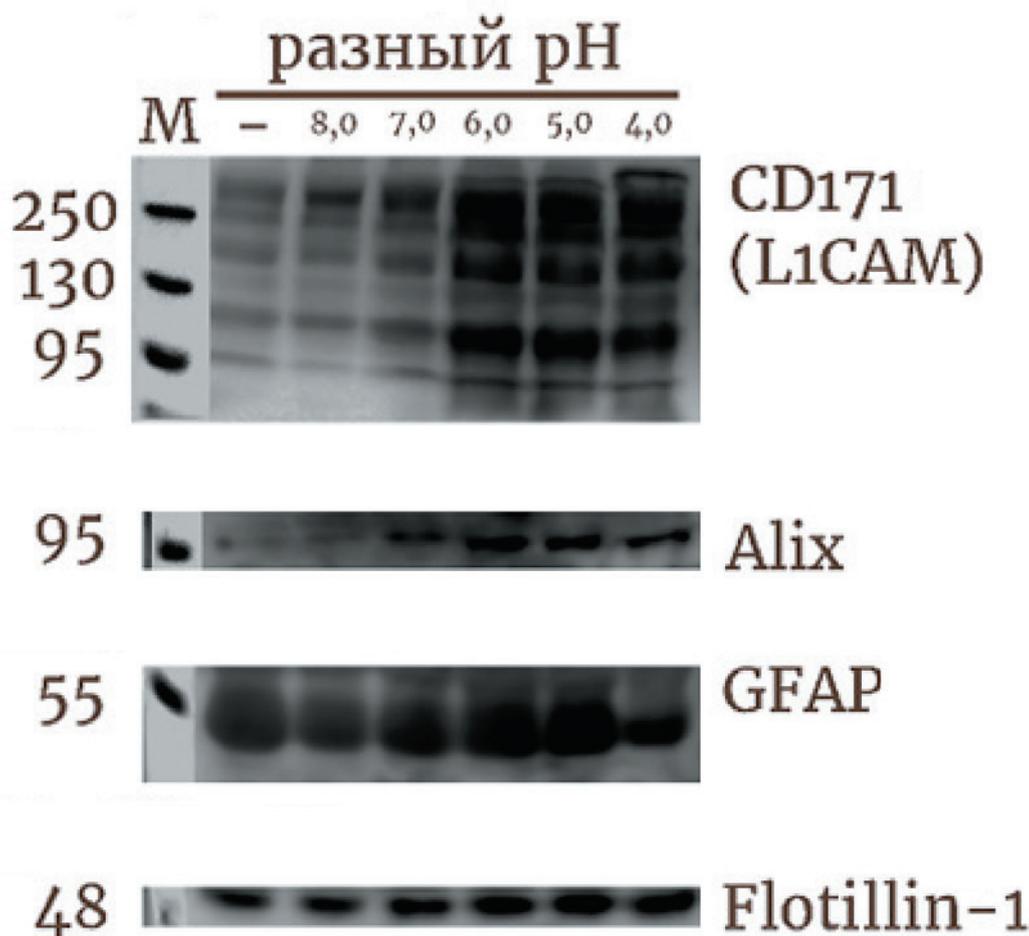


Рис. 1. Окрашивание антителами мВВ после преципитации ПЭГ с разным рН (подробности эксперимента в тексте)

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 рН 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 рН от 8,0 до 6,0 количество выделенного белка не превышает 1 мг, а при использовании для преципитации растворов ПЭГ с рН 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 рН, у. е.

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

	Без доведения рН	рН 8,0	рН 7,0	рН 6,0	рН 5,0	рН 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

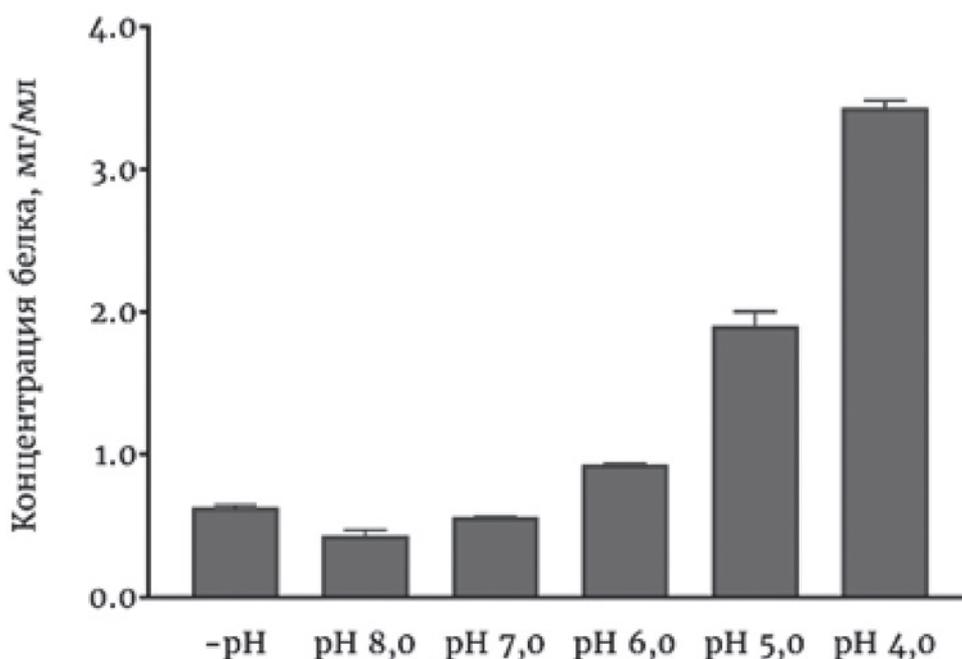


Рис. 2. Концентрация тотального белка в мВВ после преципитации ПЭГ с разным рН

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 рН 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

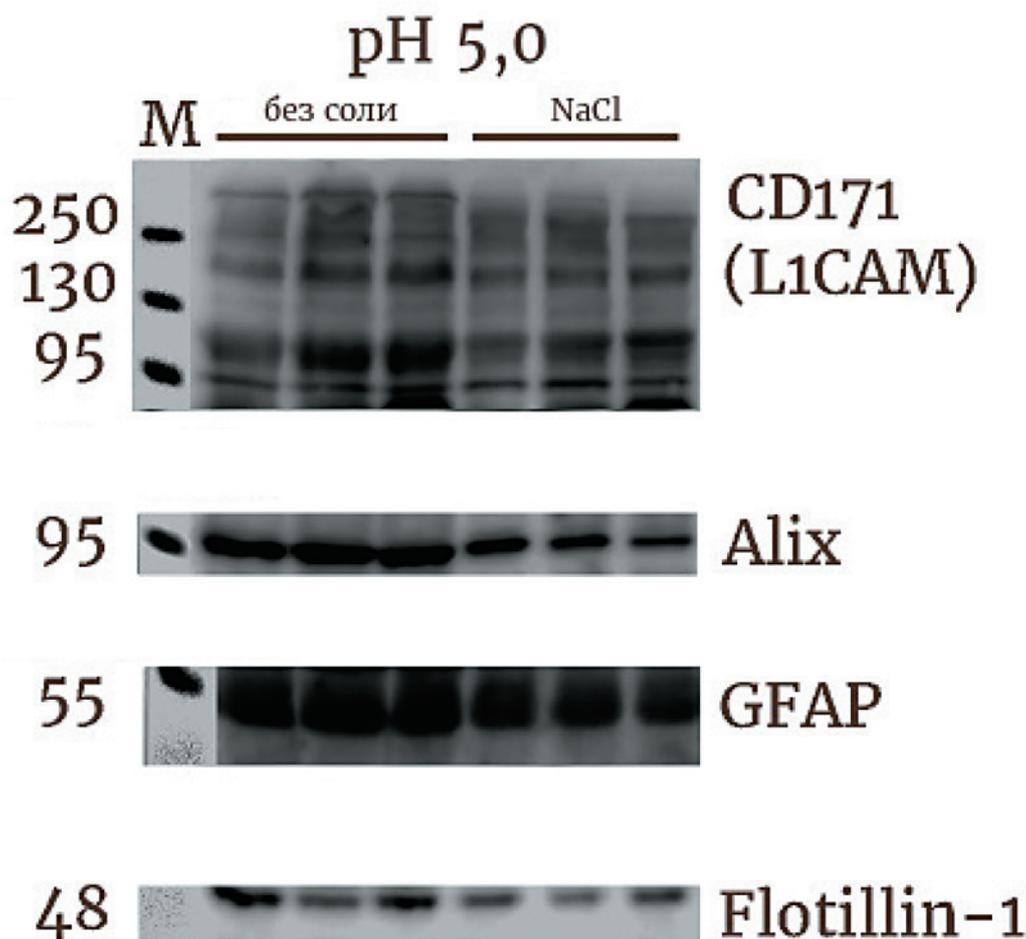


Рис. 3. Окрашивание антителами мВВ после преципитации ПЭГ рН 5,0, содержащим или не содержащим 0,2 М NaCl (подробности эксперимента в тексте)

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

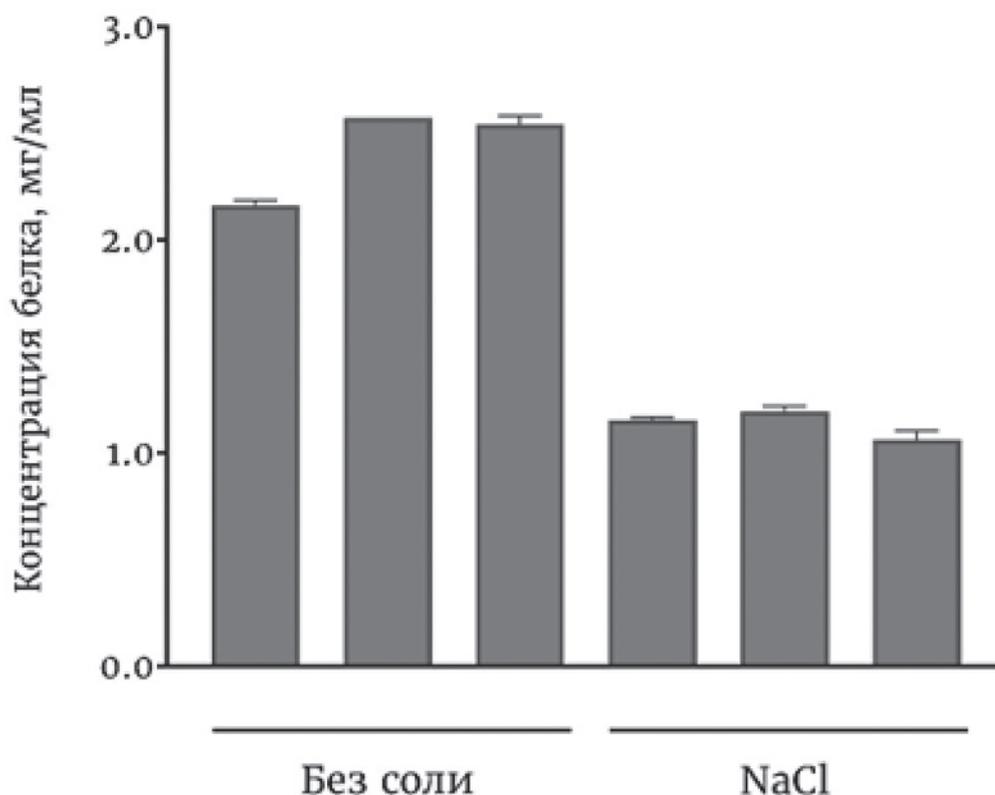


Рис. 4. Концентрация тотального белка в мВВ после преципитации ПЭГ pH 5,0 с разной концентрацией хлорида натрия

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 рН означают, скорее всего, разный заряд поверхностных белков на мембранах мВВ разного происхождения.

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

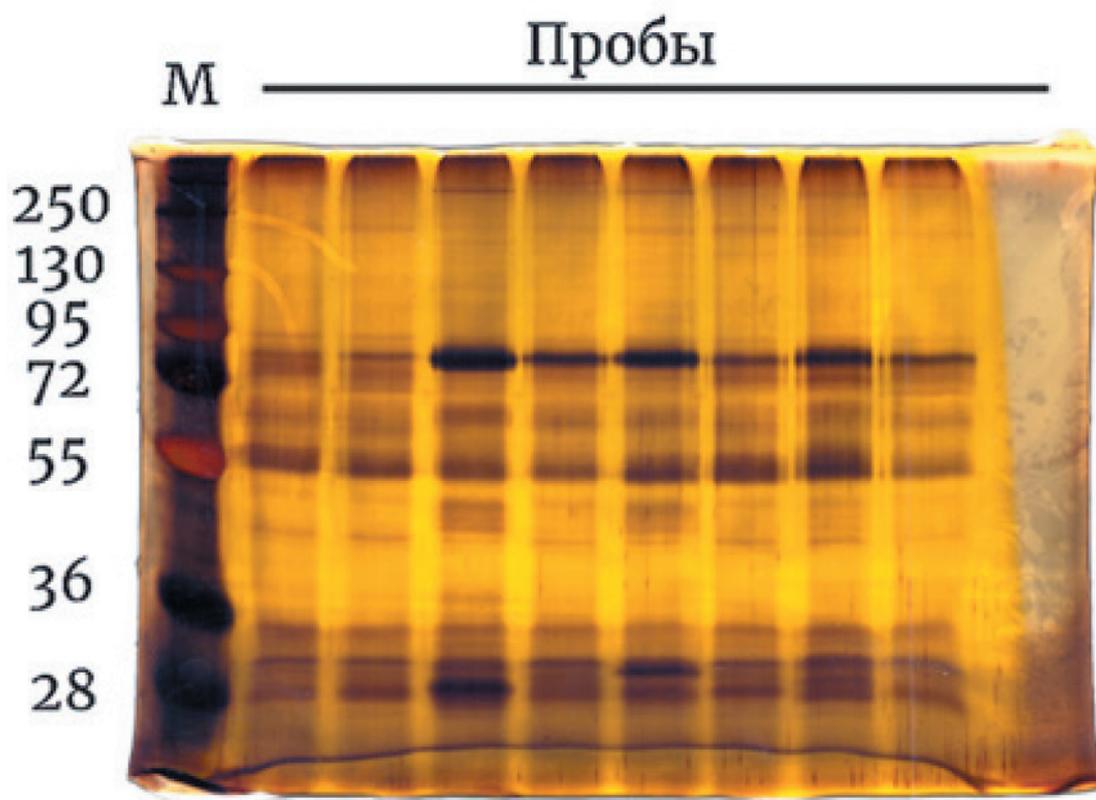


Рис. 5. Результат окрашивания нитратом серебра поверхностных белков мВВ нейронального происхождения

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-

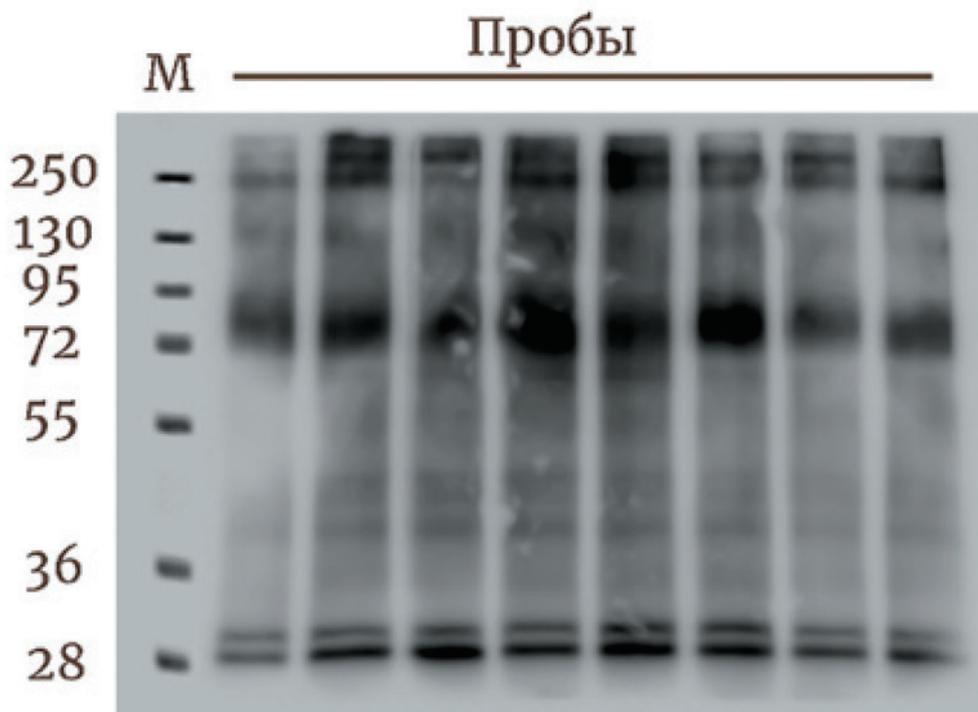


Рис. 6. Результат окрашивания стрептавидин-пероксидазой биотинилированных поверхностных белков мВВ нейронального происхождения

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 радиоодинирования 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 рН 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 РФФИ, 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.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ШИРОКО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

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 18.11.2024
и принята к печати 29.12.2024

Резюме

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой гетерогенную группу везикул, имеющих размер от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров. ВВ способны проникать через гистогематические барьеры и обнаруживаются во всех биологических жидкостях. Состав ВВ в значительной степени отражает состав секретировавших их клеток. В настоящее время ВВ широко используются для поиска диагностических и терапевтических маркеров, в связи с чем исследования состава и свойств ВВ сегодня становятся все более востребованными. Несмотря на очевидный потенциал ВВ в биомедицинских приложениях, отсутствие единых методов их выделения, анализа и количественного измерения значительно ограничивает научный прогресс в данной области. В научной литературе встречаются описания десятков методов выделения и изучения ВВ, причем зачастую исследователи не представляют сравнительных преимуществ и недостатков используемых методов. В связи с этим становится актуальным обзор методов исследования ВВ. В данном обзоре представлен всесторонний анализ современных методов исследования ВВ. Каждый метод обладает своими преимуществами и ограничениями, влияющими на выход, чистоту и характеристики выделенных везикул, а также на точность получаемых результатов. Метод выделения и анализа ВВ необходимо выбирать с учетом цели и специфики исследования, поскольку универсального подхода в настоящее время не существует. Только глубокое понимание особенностей различных методик позволит подобрать оптимальный протокол для решения конкретных задач исследования, обеспечивая надежность и воспроизводимость результатов.

Ключевые слова: анализ траекторий наночастиц, внеклеточные везикулы, гель-фильтрация, динамическое рассеяние света, ультрафильтрация, ультрацентрифугирование

Для цитирования: Костина В.В., Яковлев А.А. Преимущества и недостатки широко используемых методов изучения внеклеточных везикул. *Трансляционная медицина*. 2025; 12(1): 51-66. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-51-66. EDN: XJCLEP

KEY TECHNIQUES FOR STUDYING EXTRACELLULAR VESICLES

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 18 November 2024; accepted 29
December 2024

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are heterogeneous nanoparticles (30–500 nm) found in all biological fluids. The composition of EVs largely reflects the composition of the cells that secreted them. At present, EVs are widely used to search for diagnostic and therapeutic markers, and therefore studies of EVs composition and properties are becoming more and more in demand today. Despite the obvious potential of EVs in biomedical applications, the lack of unified methods for their isolation, analysis and quantitative measurement significantly limits scientific progress in this field. In scientific literature there are descriptions of dozens of methods for isolation and study of EVs, and often researchers do not present comparative advantages and disadvantages of the methods used. In this regard, a review of methods for the study of EVs becomes relevant. This review presents a comprehensive analysis of modern methods for the study of EVs. Each method has its own advantages and limitations affecting the yield, purity and characteristics of isolated vesicles, as well as the accuracy of the results obtained. The choice of the method for the isolation and analysis of EVs should be made considering the purpose and specificity of the study, since there is no universal approach at present. A thorough understanding of methodological nuances is critical for optimizing reproducibility and reliability in EV research.

Key words: extracellular vesicles, dynamic light scattering, gel filtration, nanoparticle tracking analysis, ultracentrifugation, ultrafiltration

For citation: Kostina VV, Yakovlev AA. Key techniques for studying extracellular vesicles. Translational Medicine. 2025; 12(1): 51-66. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-51-66. EDN: XJCLEP

Список сокращений: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ВВ — внеклеточные везикулы, ДРС — динамическое рассеяние света, Крио-ЭМ — крио-электронная микроскопия, мВВ — малые внеклеточные везикулы, МС — масс-спектрометрия, ПЭГ — полиэтиленгликоль, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ТЭМ — просвечивающая электронная микроскопия, ЭМ — электронная микроскопия, А4F — асимметричное фракционирование в полевом потоке, Alix — белок внутриклеточной системы упаковки и транспорта везикул, характерный маркер мВВ, CD63 — белок семейства тетраспанинов, характерный маркер мВВ, ERK1/2 — киназы, регулируемые внеклеточным сигналом, FFF — фракционирование в свободном потоке, NTA — анализ траектории наночастиц.

Введение

Термин «внеклеточные везикулы» (ВВ) применяется к везикулам, которые высвобождаются из клеток, ограничены липидным бислоем и не могут реплицироваться самостоятельно [1]. Международное сообщество рекомендует использовать этот термин в любых публикациях, где не установлена точная природа везикул. ВВ представляют собой гетерогенную популяцию мембранных везикул, различающихся своим биогенезом [2]. Двумя основными субпопуляциями ВВ являются эктосомы (микровезикулы) и экзосомы, и вместе эти две субпопуляции составляют основную часть малых ВВ (мВВ), то есть везикул размером меньше 200 нм [2]. Существующие методы выделения внеклеточных везикул могут отобрать везикулы только по размеру, плотности или поверхностным антигенам. Эктосомы и экзосомы схожи по всем этим характеристикам.

Высвобождение экзосом из клетки включает образование мультивезикулярных эндосом, которые при транспортировке к плазматической мембране и слиянии с ней высвобождают свои внутрипросветные везикулы, которые и становятся экзосомами. Эктосомы отпочковываются от плазматической мембраны наружу.

Биологическая значимость ВВ

В биологии ВВ исследуются как один из важнейших механизмов межклеточной коммуникации [3]. В отличие от более традиционных сигналов, таких как нейромедиаторы или гормоны, ВВ обеспечивают прямую доставку сложных молекулярных комплексов, сохраняя их структуру и активность [4]. Процесс доставки может быть избирательным, благодаря белковым маркерам на поверхности ВВ,

которые помогают им взаимодействовать только с определенными клетками-мишенями. ВВ участвуют в регуляции множества физиологических процессов, включая иммунный ответ, клеточную пролиферацию, апоптоз и восстановление тканей. Роль ВВ в биологических процессах делает их объектом интереса для изучения механизмов многих заболеваний, поскольку сбои в их производстве, составе или доставке могут быть связаны с патологией.

Медицинская значимость ВВ

В медицине ВВ рассматриваются и как потенциальные биомаркеры, и как терапевтические агенты [5]. Так как содержимое ВВ отражает состояние клетки-донора, их анализ может дать важную информацию о состоянии секретировавшей их клетки и выявить признаки заболеваний на самых ранних стадиях. ВВ могут применяться в диагностике рака [6], нейродегенеративных заболеваний [7, 8], сердечно-сосудистых патологий [9] и других нарушений. Кроме того, благодаря способности к целевой доставке молекул, ВВ рассматриваются как естественные носители для доставки лекарств [10, 11]. Их мембрана защищает терапевтические молекулы от разрушения, а биологическая совместимость и способность проходить через биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер, делают их особенно перспективными для доставки лекарств к труднодоступным клеткам и органам.

Методы выделения внеклеточных везикул Ультрацентрифугирование

Ультрацентрифугирование считается золотым стандартом для выделения и очистки ВВ. Однако этот метод требует сложного оборудования и отнимает много времени, что ограничивает его широкое применение в клинической практике.

Метод основан на разделении частиц по их размеру и плотности с использованием высокоскоростного центрифугирования. В процессе ультрацентрифугирования везикулы отделяются от других компонентов раствора благодаря воздействию центробежного ускорения. Везикулы большого размера или большой плотности осаждаются на дно пробирки, что позволяет отделить их от маленьких и легких молекул. Этот метод эффективно разделяет везикулы в растворах с однородной плотностью, что делает его популярным для исследования и очистки биомолекул. Подробный протокол выделения популяций ВВ был опубликован Тери и соавторами в 2006 году [13].

В стандартных процедурах дифференциального центрифугирования, описанных в научных

исследованиях, на первом этапе обычно используется ускорение около $10\,000\text{--}20\,000 \times g$ на протяжении 10–90 минут для обогащения преимущественно более крупных или плотных ВВ (более 200 нм). Для осаждения более мелких и легких ВВ применяется максимальное ускорение в диапазоне $100\,000\text{--}200\,000 \times g$ на протяжении 45–150 минут [1]. Принцип метода показан на рисунке 1.

Несмотря на широкое использование, ультрацентрифугирование имеет ряд ограничений. Одним из главных недостатков метода является его плохая масштабируемость. Для больших объемов образцов требуется значительное время и ресурсы, что делает его непригодным для массового применения. Вязкость раствора также влияет на продолжительность процесса — для полного разделения может потребоваться до двух часов. При этом отделение ВВ от невезикулярного материала, такого как липопротеины и белковые комплексы, зачастую затруднено, что снижает эффективность метода при выделении чистых фракций везикул.

Выход и чистота ВВ, выделенных с помощью ультрацентрифугирования, в значительной степени зависят от типа ротора и времени центрифугирования [14]. В зависимости от выбранных условий центрифугирования можно получить фракции, обогащенные либо более крупными и плотными ВВ, либо более мелкими и легкими. Однако полное разделение этих двух популяций не достигается. Выход более мелких ВВ может оставаться низким, особенно если они находятся в жидкостях, богатых белками, таких как плазма или сложные культуральные среды. Увеличение времени или ускорения центрифугирования

не всегда помогает решить проблему выделения мелких ВВ из таких сложных объектов.

Одним из серьезных недостатков ультрацентрифугирования является возможность разрушения везикул или изменения их функциональных свойств. Высокие скорости вращения и длительное время обработки могут негативно воздействовать на структуру везикул, что делает этот метод менее подходящим для исследований, требующих сохранения биологической активности выделенных частиц. Это особенно важно учитывать при работе с хрупкими биомолекулами, когда сохранение функциональности и структуры везикул является ключевым фактором для дальнейших исследований или терапевтического использования.

Ультрацентрифугирование в градиенте плотности

Ультрацентрифугирование в градиенте плотности — это метод, который обычно применяется для повышения чистоты изолированных ВВ. Его можно использовать для дополнительной очистки ВВ от примесей, полученных в процессе ультрацентрифугирования. В процессе центрифугирования ВВ всплывают в градиенте растворов с разной плотностью (например, сахарозы или йодиксанола). При центрифугировании ВВ мигрируют к своей (равновесной) плотности. Скорость миграции или скорость флотации зависят от размера, формы и плотности ВВ (рис. 2).

Этот метод также используется для решения проблемы гетерогенности ВВ. Метод позволяет выделять отдельные популяции ВВ и даже отдельные субпопуляции мВВ [15, 16]. В процессе

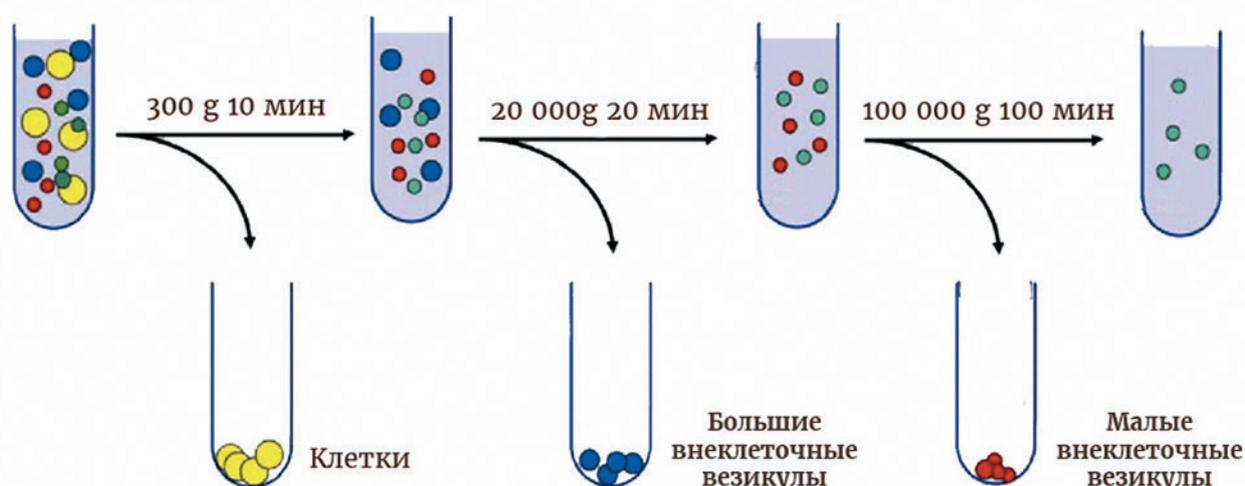


Рис. 1. Принцип выделения ВВ с помощью дифференциального центрифугирования

Figure 1. The principle of isolation of extracellular vesicles by differential centrifugation

центрифугирования изолированные мВВ (осадок, полученный при $100\,000 \times g$) поднимаются через растворы сахарозы с уменьшающейся плотностью и разделяются на отдельные фракции.

Гель-фильтрация

Гель-фильтрация, или эксклюзионная хроматография, представляет собой удобную альтернативу дифференциальному ультрацентрифугированию и центрифугированию в градиенте плотности. Одним из ее главных преимуществ является сохранение целостности ВВ, что позволяет поддерживать их функциональные свойства [17, 18]. Это особенно актуально для биомедицинских исследований, где критически важны структура и функция везикул. Гель-фильтрация широко применяется в исследованиях ВВ, поскольку является простым методом, который помогает избежать проблем, характерных для ультрацентрифугирования, таких как разрушение везикул, их агрегация и контаминация [19]. Процедура проводится с использованием колонки, заполненной пористыми полимерными шариками, которые выполняют роль неподвижной фазы. Когда раствор, содержащий частицы, проходит через колонку, более мелкие частицы задерживаются

в порах шариков, а крупные — проходят быстрее и элюируются раньше (рис. 3).

Этот метод широко используется в исследованиях ВВ, так как он решает проблемы, характерные для ультрацентрифугирования, такие как разрушение везикул, агрегация и совместное выделение нежелательных компонентов. При этом выход целевых частиц может достигать 100 %, что делает метод весьма эффективным для выделения и очистки ВВ. Гель-фильтрация позволяет достигать обогащения до 1000 раз по отношению к растворимым белкам, что обеспечивает высокую степень чистоты выделенного материала.

Особенно важно отметить, что были выявлены различия в функциональной активности ВВ, выделенных методами дифференциального ультрацентрифугирования и гель-фильтрацией. Хотя трансмиссионная электронная микроскопия не показала значительных морфологических различий между ВВ, выделенными этими методами, — в обоих образцах присутствовали как крупные, так и мелкие ВВ, иммуноблоттинг выявил обогащение обеих фракций белками Alix и CD63. Однако эксперименты на эндотелиальных клетках продемонстрировали, что ВВ, выделенные методом

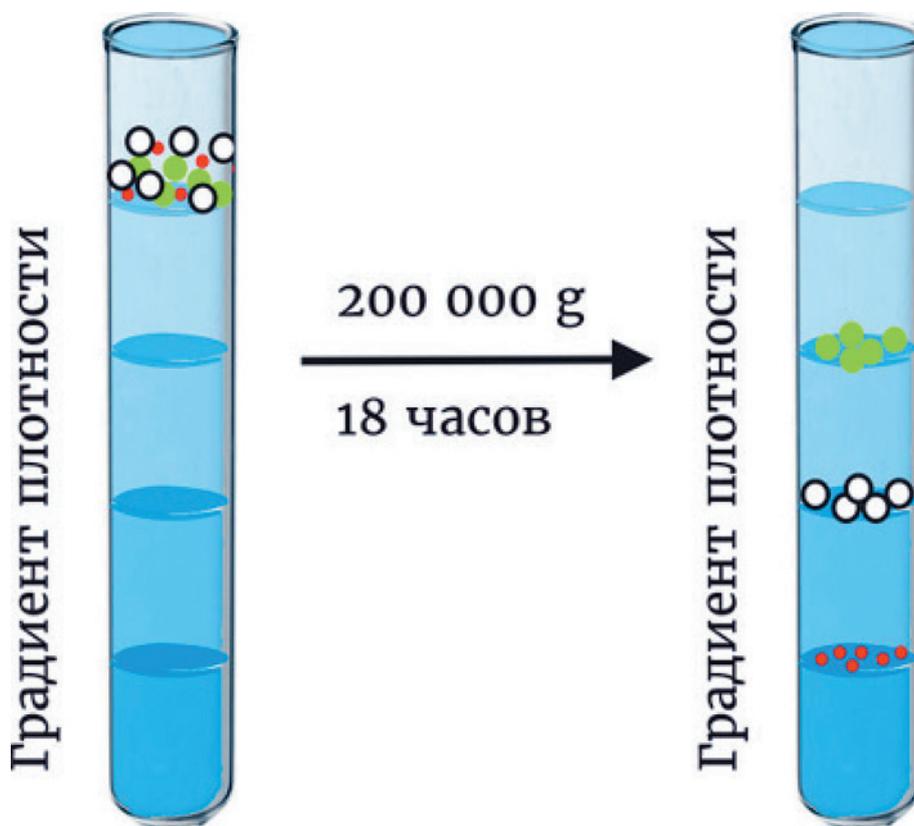


Рис. 2. Принцип выделения ВВ методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности

Figure 2. The principle of isolation of extracellular vesicles by ultracentrifugation in a density gradient

гель-фильтрации, значительно сильнее активировали фосфорилирование ERK1/2 по сравнению с ВВ, выделенными методом ультрацентрифугирования, что свидетельствует о большей функциональности везикул, выделенных с помощью гель-фильтрации [18].

Гель-фильтрация позволяет обогатить ВВ по сравнению с другими надмолекулярными комплексами, такими как липопротеины. Например, можно достигнуть обогащения до 100 раз по отношению к липопротеинам высокой плотности и до 5 раз по отношению к липопротеинам низкой плотности. Время, необходимое для проведения гель-фильтрации, может составлять около 15 минут, что делает данный метод быстрым и удобным. Важным преимуществом является то, что при этом можно одновременно обрабатывать множество образцов, что повышает эффективность исследований и производства.

Гель-фильтрация может быть использована как самостоятельный метод, но она также хорошо сочетается с другими методами выделения, такими как ультрафильтрация и ультрацентрифугирование, что позволяет получить еще более высокие результаты по чистоте и концентрации выделенных везикул [17]. Благодаря правильному выбору носителя для гель-фильтрации метод также может использоваться для отделения субпопуляций ВВ друг от друга (табл. 1).

Фракционирование в свободном потоке

Фракционирование в свободном потоке (FFF) — это метод, схожий с гель-фильтрацией, но без использования колонки. В данном процессе разделение везикул происходит в свободном потоке жидкости, что позволяет избежать использования фиксированных пористых материалов [20]. В методе FFF частицы вводятся в небольшой

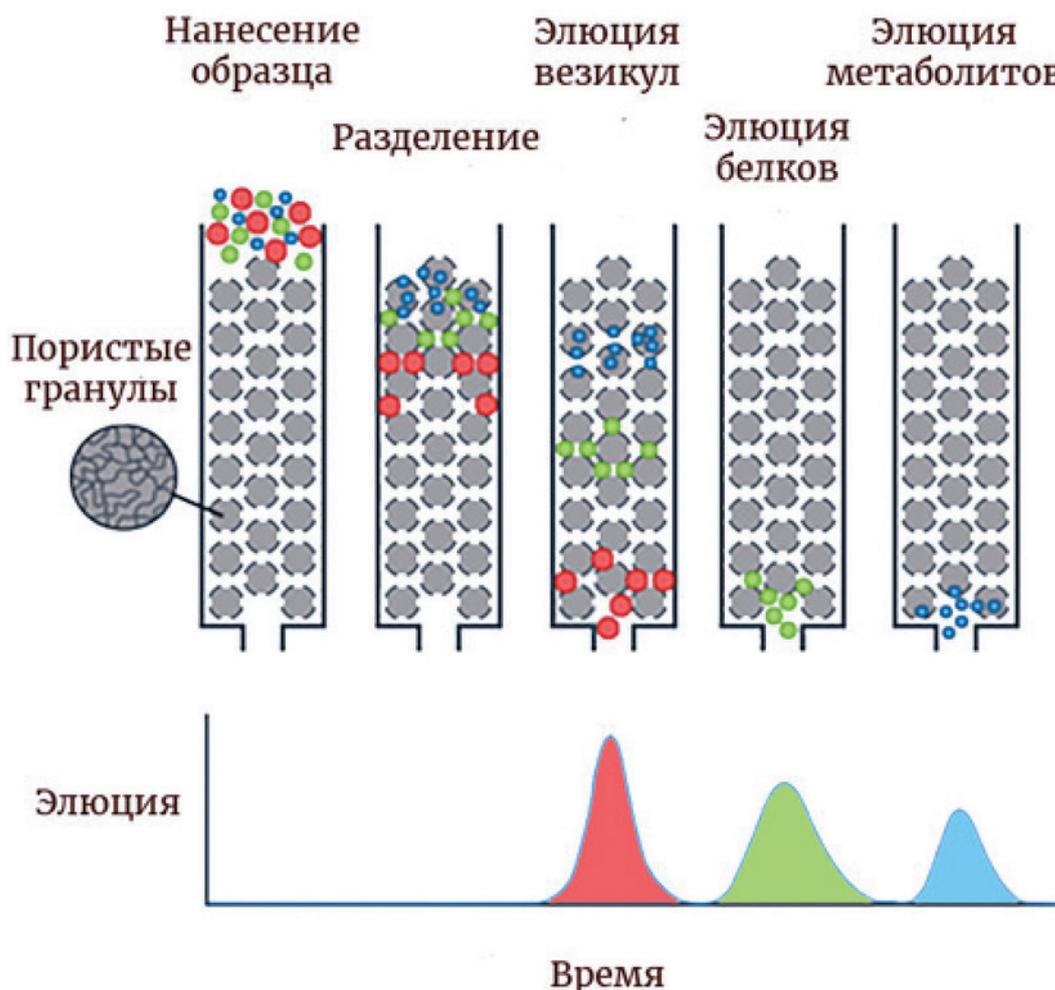


Рис. 3. Принцип выделения ВВ методом гель-фильтрации

Figure 3. The principle of isolation of extracellular vesicles by gel filtration

канал, который состоит из двух полупроницаемых мембран. В этом канале разделение частиц происходит за счет взаимодействия двух потоков: поперечного и продольного. Различия в размерах частиц (гидродинамическом диаметре) и молекулярной массе определяют их различную скорость движения через канал, что позволяет проводить последующее разделение [21] (рис. 4).

Асимметричное фракционирование в полевом потоке (FFFF, или A4F) является относительно новой техникой в области исследования ВВ и использует одну полупроницаемую мембрану [22]. Метод A4F способен фракционировать отдельные популяции внеклеточных везикул (например, экзосомы, эктосомы и апоптотические тельца), а также их субпопуляции, при этом сохраняя их биофизические свойства неизменными. Также

уменьшается вероятность потери везикул из-за прилипания к мембранам (как в случае ультрафильтрации) или к неподвижной фазе (при использовании гель-фильтрации). Тем не менее, для каждого конкретного применения A4F требуется значительная экспериментальная настройка, поскольку универсальных параметров для этого метода не существует [21]. Метод эффективен для выделения до 100 % ВВ и подходит для работы с образцами различного происхождения.

Процесс выделения занимает около одного часа, что делает его быстрым и удобным для исследовательских целей. Однако в некоторых случаях перед проведением фракционирования может потребоваться предварительное концентрирование образцов, особенно если исходная концентрация везикул недостаточна для эффективного разделения.

Таблица 1. Характеристики носителей для гель-фильтрации

Table 1. Characteristics of gel filtration media

Смола	Материал	Размер пор, нм
Sepharose CL-2B	2 % сшитая агароза	75
Sepharose CL-4B	4 % сшитая агароза	42
Sepharose CL-6B	6 % сшитая агароза	24
Sephacryl S-1000 SF	Аллил декстран и метиденбисакриламид	~400 nm
Sephacryl S-500 HR	Аллил декстран и метиденбисакриламид	~200 nm
Sephacryl S-400 HR	Аллил декстран и метиденбисакриламид	~35 nm
TOYOPEARL HW-75	Гидроксированный метакрилат	> 100
TOYOPEARL HW-65	Гидроксированный метакрилат	100
TOYOPEARL HW-55	Гидроксированный метакрилат	50

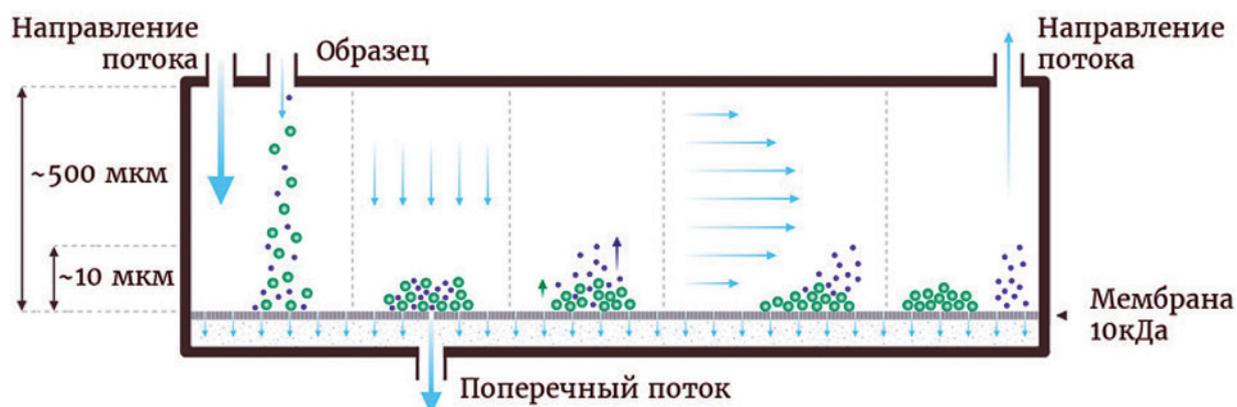


Рис. 4. Принцип выделения ВВ методом FFF

Figure 4. The principle of extracellular vesicle extraction by the FFF method

Одним из ключевых преимуществ метода является то, что везикулы сохраняют свою целостность и не разрушаются в процессе выделения. Это делает фракционирование в свободном потоке идеальным выбором для исследований, где важно сохранить биологические функции и структуры везикул для последующего анализа.

Ультрафильтрация

Ультрафильтрация позволяет проводить разделение с использованием полупроницаемых мембран с определенными порогами молекулярной массы или размерами пор. Частицы с молекулярной массой или размером ниже применяемой мембраны фильтра проходят через мембрану, тогда как более крупные частицы задерживаются (рис. 5).

В случае ВВ используются ультрафильтры с порогом молекулярной массы от 100 до 300 кДа. Ультрафильтрация обеспечивает сохранение целостности везикул и их эффективное отделение от белков, липидов и других растворенных молекул, что делает ее привлекательной для биологических исследований и медицинских применений [23, 24].

Для выделения внеклеточных везикул ультрафильтрация предоставляет высокую эффективность, позволяя получить от 40 % до 100 % целевых ВВ при использовании мембран с порогом 100 кДа. При применении тангенциальной ультра-

фильтрации, где поток жидкости направлен вдоль мембраны, можно достичь выхода до 95 % везикул, что значительно повышает эффективность метода. Более того, данный способ позволяет обогатить выделенные везикулы в 20–30 раз по сравнению с белками. Чистота фракции, полученной при ультрафильтрации, зачастую сопоставима с результатами, достигнутыми с помощью ультрацентрифугирования, но при этом метод более быстрый и удобный.

Одним из главных преимуществ ультрафильтрации является ее способность обрабатывать большое количество образцов одновременно и за относительно короткий промежуток времени — от 20 минут до 4 часов, в зависимости от объема и вязкости образца. Этот метод также хорошо сочетается с другими технологиями, такими как гель-фильтрация и ультрацентрифугирование, что позволяет достичь еще большей чистоты фракции. Однако стоит учитывать, что при неправильных условиях везикулы могут разрушаться или изменять свои функциональные свойства, что является важным фактором при их последующем применении в исследованиях или клинических испытаниях.

Преципитация

Метод преципитации с использованием полимеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ), является неспецифическим способом концентрирова-

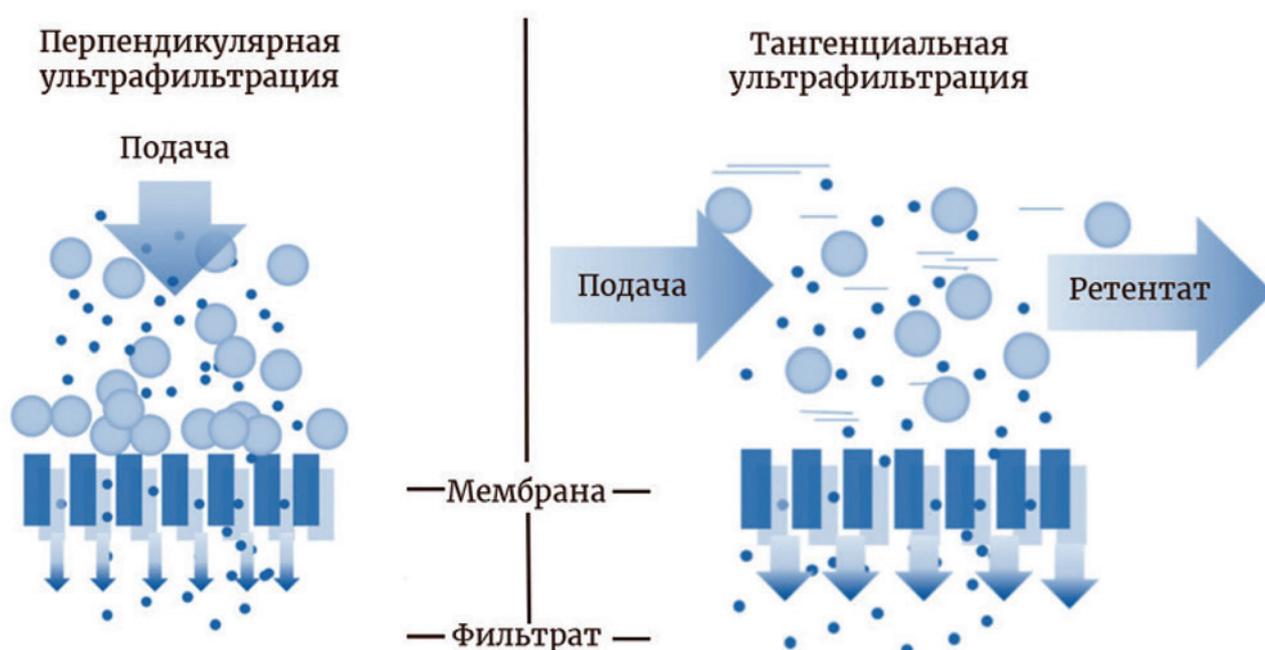


Рис. 5. Принцип выделения ВВ методом ультрафильтрации

Figure 5. The principle of extracellular vesicle extraction by ultrafiltration

ния ВВ [25]. Этот метод основан на способности полиэтиленгликоля «забирать» воду из раствора, что приводит к осаждению растворенных веществ, включая ВВ. Преципитация с ПЭГ позволяет эффективно осаждавать везикулы, обеспечивая высокий выход, который может достигать 100 %.

Хотя метод позволяет обогатить ВВ до 50 раз по сравнению с растворимыми белками, обогащение по отношению к липопротеинам остается незначительным. Время преципитации варьируется от 30 минут до 24 часов в зависимости от концентрации ПЭГ, что позволяет гибко настраивать процесс в зависимости от конкретных нужд эксперимента. Преципитация подходит для одновременной обработки большого количества образцов, что делает ее эффективным методом для массового выделения ВВ. В некоторых случаях преципитация может использоваться как дешевая альтернатива ультрафильтрации.

Преципитация ВВ часто комбинируется с другими методами, такими как гель-фильтрация и ультрацентрифугирование, для получения более чистых фракций. Однако важно учитывать, что данная технология может повлиять на целостность везикул: везикулы могут разрушаться, слипаться или изменять свои функциональные свойства, что снижает их пригодность для некоторых типов исследований и терапевтических применений [26].

Аффинная преципитация

Аффинная преципитация является методом выделения ВВ, основанным на специфическом

связывании везикул с иммобилизованными антителами, лигандами или рецепторами. Этот подход позволяет не только выделять везикулы, но и разделять их на различные субпопуляции, что делает метод особенно полезным для исследований с высокой степенью точности [27, 28]. Одним из ключевых преимуществ является высокая специфичность метода, что позволяет эффективно выделять именно те везикулы, которые содержат нужные биомаркеры или молекулы на своей поверхности.

Метод аффинной преципитации отличается простотой и быстротой по сравнению с другими способами — ультрацентрифугированием или гель-фильтрацией. Однако он требует использования дорогостоящих расходных материалов, таких как специальные антитела или лиганды. Кроме того, перед началом аффинного связывания необходима предварительная очистка образцов, что добавляет дополнительные этапы в рабочий процесс.

Время выделения везикул с помощью аффинной преципитации обычно составляет несколько часов, что сравнительно быстро для сложных биологических образцов. Кроме того, этот способ позволяет обрабатывать одновременно большое количество образцов, что делает его удобным для исследований с высоким потоком данных. Однако с каждым новым антителом требуется тщательная отработка метода, чтобы убедиться в его эффективности и специфичности для выделения конкретных субпопуляций везикул.

Сравнение методов выделения представлено на рисунке 6.

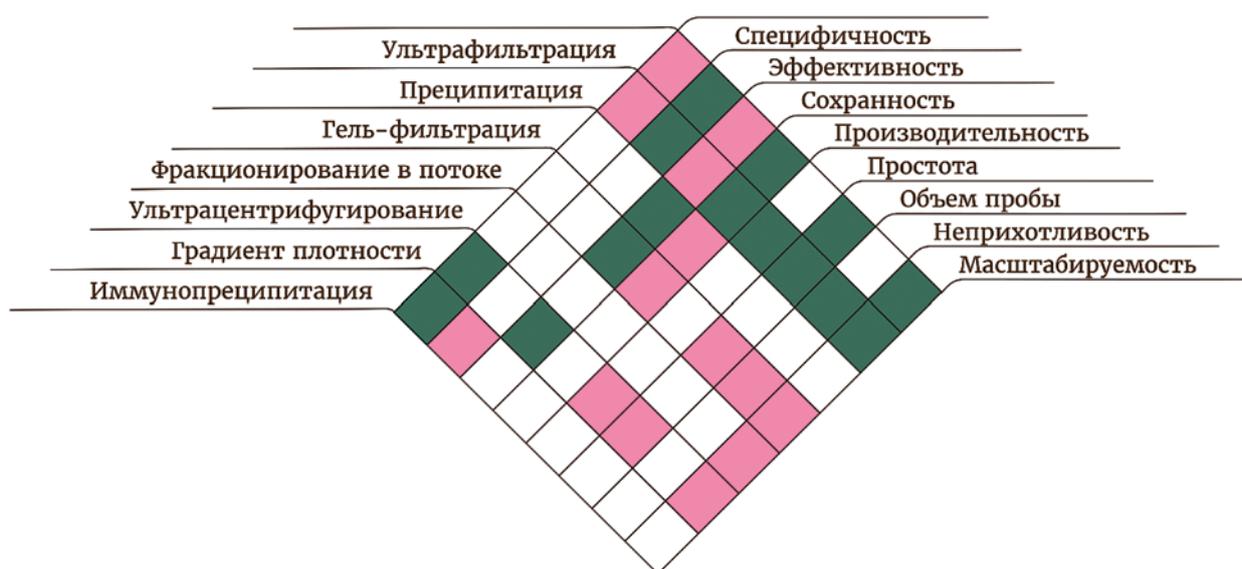


Рис. 6. Сравнение методов выделения ВВ

Figure 6. Comparison of extracellular vesicle isolation methods

Методы анализа внеклеточных везикул НТА

Метод анализа траекторий наночастиц (НТА), также известный как отслеживание отдельных частиц, представляет собой оптический метод, который широко применяется для анализа размеров и концентрации частиц, особенно в области внеклеточных везикул. Кроме того, метод НТА может быть использован для определения эффективного показателя преломления частиц и для выявления эпитопов [29, 30].

Эффективный показатель преломления является важным параметром, который позволяет оценить свойства наночастиц, а также понять их состав и строение. С помощью НТА можно измерить, как свет взаимодействует с наночастицами, а это зависит от их размера, формы и состава, а также от наличия или отсутствия биологических молекул, таких как белки, на их поверхности. Метод НТА позволяет обнаружить эпитопы путем связывания антител с конкретными участками поверхности наночастиц, что приводит к изменению их оптических свойств. Эти изменения регистрируются и анализируются с помощью НТА, что дает возможность подтвердить наличие специфических эпитопов на поверхности наночастиц. Размер частиц определяется НТА путем расчета их гидродинамического размера, который выводится на основе измерений коэффициента диффузии с использованием математического алгоритма.

При измерении распределения размеров и концентрации везикул в сложных биологических жидкостях с помощью НТА следует проявлять осторожность, так как могут учитываться посторонние частицы, такие как липопротеины и крупные белковые комплексы, а также крупные ВВ диаметром более нескольких сотен нанометров, которые трудно точно измерить.

Электронная микроскопия

Методы электронной микроскопии (ЭМ) позволяют измерить размер и форму объектов в принципе во всем диапазоне и являются одними из немногих, способных обнаруживать ВВ независимо от их размера. Однако низкая пропускная способность ЭМ приводит к тому, что более крупные ВВ зачастую недооцениваются по сравнению с меньшими [31].

Хотя для анализа ВВ можно использовать различные методы ЭМ, такие как сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [32, 33], просвечивающая электронная микроскопия (ТЭМ) [34] и крио-ЭМ [35], они не являются взаимозаменяемыми и не всегда обеспечивают одинаковое качество изображения. Например, крио-ЭМ лучше сохраняет структуру

липидного бислоя и морфологию ВВ по сравнению с методами дегидратации, применяемыми для ТЭМ, что позволяет получить более точные количественные данные, так как визуализируются все частицы в определенном объеме, а не только те, которые прилипают к поверхности сетки. При использовании ТЭМ необходим адаптированный протокол, включающий контрастирование и встраивание в смесь ураниловых соединений и метилцеллюлозы для сохранения структуры липидного бислоя [13]. СЭМ дает возможность исследовать поверхность ВВ любого размера, но изображения, полученные при максимальном увеличении для мелких ВВ, могут быть сложнее для интерпретации.

Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) позволяет получать изображения отдельных ВВ и изолированных наночастиц без необходимости использования меток или красителей [36–38]. Чтобы провести визуализацию с помощью АСМ, образцы нужно наносить на твердую подложку. Затем измерения могут проводиться либо после высушивания образца, либо при его погружении в жидкую среду, такую как физиологический раствор или питательная среда для культивирования клеток. Используя морфометрию АСМ, можно получить данные о распределении размеров ВВ, их ультраструктурных особенностях, а также оценить наличие и относительное количество загрязнений [39, 40]. Также АСМ позволяет измерять наномеханические свойства отдельных везикул, что является редкостью среди методов анализа и может использоваться для корреляции с их идентичностью и функцией [41]. Такой уникальный механический «отпечаток» везикул помогает отличать их от других внеклеточных частиц схожих размеров и формы [42].

Проточная цитометрия

Одну из основных трудностей в изучении ВВ с помощью проточной цитометрии представляет их малый размер. ВВ значительно меньше клеток, для анализа которых изначально были разработаны проточные цитометры, поэтому их исследование на стандартных приборах может приводить к множеству артефактов. Если исследователь не примет необходимые меры предосторожности, может возникнуть «рой» — совмещение событий, возникающее при пересечении лазера с образцом [43]. Это явление, а также избыточные аномалии сигналов при их обработке в приборе могут серьезно исказить результаты анализа ВВ.

Метод проточной цитометрии с использованием шариков широко применяется для изучения по-

верхностных белков ВВ. В этом методе используются крупные шарики, которые могут захватывать частицы независимо от их поверхностного состава (например, альдегидные/сульфатные шарики без поверхностно-активных веществ) [13], или шарики, конъюгированные с антителами, которые связываются с частицами, несущими соответствующий антиген. На рынке доступны мультиплексные наборы для ВВ, позволяющие исследовать более 30 поверхностных антигенов [44, 45]. После захвата частиц шарики маркируются флуоресцентными аффинными реагентами (или их комбинацией) для последующего обнаружения.

Окрашивание шариков дает полуколичественные результаты, так как сигнал исходит от нескольких частиц, захваченных одним шариком. Различия в интенсивности сигнала могут указывать на разную концентрацию частиц, плотность эпитопов, распределение диаметров или относительное содержание подмножеств ВВ.

Проточная цитометрия для анализа одиночных внеклеточных везикул (Single-EV) — это оптический метод, позволяющий обнаруживать везикулы размером до примерно 40 нм в специализированных случаях [46] и около 100 нм с использованием современных стандартных цитометров через светорассеяние и флуоресценцию [46–49]. Благодаря калибровке можно определять такие параметры частиц, как их диаметр [50–52], количество и плотность эпитопов [52, 53], эффективный показатель преломления [54, 55] и концентрацию в заданных диапазонах размеров [56].

Масс-спектрометрия: анализ белкового состава ВВ

Масс-спектрометрия (МС) позволяет определять отношение массы к заряду молекул и широко применяется для анализа белков, связанных с ВВ, как в исследовательских, так и в прикладных целях [57–59]. В целевых анализах обычно используют жидкостную хроматографию с тройным квадруполом, тогда как для нецелевой протеомики часто применяют платформы Time-of-Flight или Orbitrap MS [60]. Целевые и нецелевые протеомные подходы различаются по особенностям применения, обработке образцов и анализу данных, а также имеют свои преимущества и ограничения.

Нецелевой протеомный анализ помогает выявить все присутствующие ионы, включая белки ВВ и загрязнения из матрицы, обеспечивая комплексное понимание белкового состава образца, что особенно полезно для поиска биомаркеров [61]. Для выявления маркеров чистоты ВВ и загрязнений матрицы более подходящим может быть целе-

вой пептидный анализ, который показывает наличие или отсутствие нужных веществ выше порога обнаружения и позволяет количественно определить абсолютное содержание белков.

Мультиплексирование — это метод, позволяющий одновременно анализировать несколько компонентов или параметров в одном образце, что повышает эффективность эксперимента и чувствительность анализа. В масс-спектрометрии мультиплексирование часто осуществляется за счет разделения различных ионов по массе, заряду или другим характеристикам, чтобы можно было одновременно отслеживать их сигналы и проводить параллельный анализ нескольких молекул, а также повышает чувствительность, что полезно при работе с ограниченными объемами образцов, например, из клинических исследований [62]. Целевая протеомика также может быть более полезна для количественного анализа изменений содержания белков, например, при заболеваниях или под воздействием терапии [63, 64].

Динамическое рассеяние света

Динамическое рассеяние света (ДРС), или динамическое светорассеяние — это метод, который основан на измерении броуновского движения [65] и используется для анализа движения частиц в растворе. Частицы, такие как везикулы, находясь в растворе, подвержены случайному движению как результату тепловых флуктуаций. Скорость этого движения зависит от свойств среды: температуры, вязкости и концентрации солей, а также от размеров самих частиц.

При помощи ДРС можно анализировать это движение и, таким образом, вычислить гидродинамический размер частиц в диапазоне от 2 до 1000 нанометров. Однако ДРС не может различать везикулы и другие похожие по размеру частицы, поэтому для уточнения состава образцов часто необходимы дополнительные функциональные эксперименты.

Метод ДРС хорошо подходит для изучения гетерогенности образцов и особенно полезен для экспериментов в реальном времени. Благодаря высокой производительности, ДРС позволяет обрабатывать десятки образцов в час, что делает его удобным инструментом для быстрой и эффективной оценки размеров частиц в различных средах.

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг — это относительно простой и популярный метод, активно используемый в биохимии для детекции и анализа белков [66]. Сначала белки разделяют методом гель-электро-

фореза, затем переносят на мембрану и обнаруживают с использованием аффинных реагентов, чаще всего антител (рис. 7).

Входные данные обычно нормализуются либо по показателям подготовки ВВ (общий белок, количество частиц), либо по параметрам источника ВВ (объем биологической жидкости, количество клеток в культуре). Первый способ нормализации помогает сравнивать содержание белков в ВВ между похожими группами образцов, в то время как второй позволяет оценить общие различия в продукции и поглощении ВВ в исходной системе.

Для получения достоверных данных при иммуноблоттинге необходима качественная подготовка проб, так как любые нарушения в этом процессе могут повлиять на результаты анализа. Важно отметить, что этот метод не является специфичным для внеклеточных везикул и не может отличить везикулы от других частиц. Поэтому, чтобы подтвердить наличие везикул, необходимы дополнительные функциональные эксперименты.

Одним из преимуществ иммуноблоттинга является высокая производительность: метод позволяет обрабатывать десятки образцов в течение

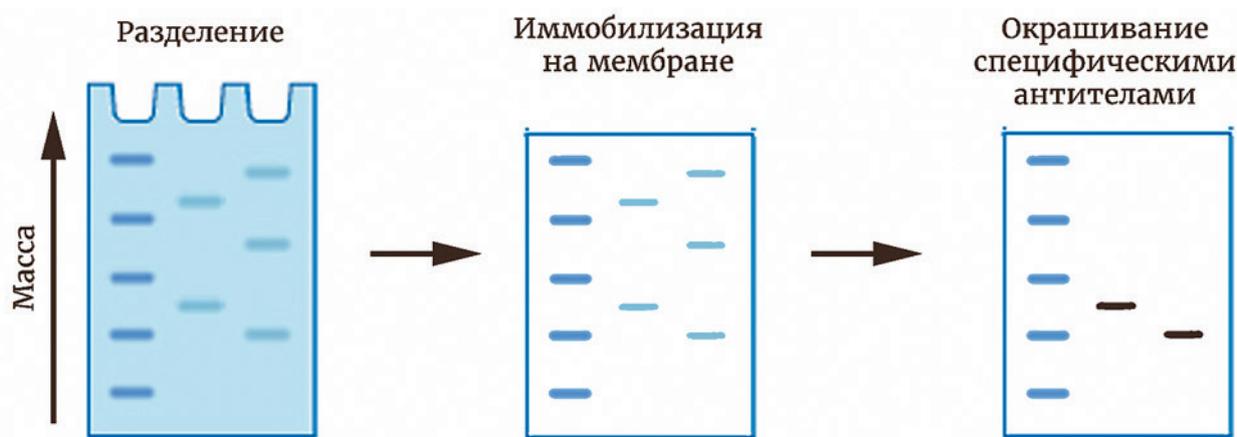


Рис. 7. Принцип работы иммуноблоттинга

Figure 7. The principle of operation of immunoblotting

Метод	Приложение	Разрешение	Чувствительность	Производительность	Простота
Анализ траекторий наночастиц	Концентрация, размер	High	Low	Low	Low
Модифицированная цитофлуориметрия	Концентрация, размер	Low	High	Low	Low
Электронная микроскопия	Морфология, размер	High	Low	High	High
Атомно-силовая микроскопия	Морфология, размер	High	Low	High	High
Динамическое светорассеяние	Размер	High	High	Low	High
Иммуноферментный анализ	Белковые маркеры	Low	Low	High	Low
Иммуноблоттинг	Белковые маркеры	Low	Low	Low	High
Протеомные методы	Белки	High	High	Low	High

Рис. 8. Сравнение методов исследования ВВ

Figure 8. Comparison of extracellular vesicle research methods

дня, что делает его эффективным для задач, требующих анализа большого числа образцов. Благодаря сочетанию простоты, универсальности и высокой пропускной способности, иммуноблоттинг стал практически универсальным методом для изучения белков и применяется во многих областях биохимии и молекулярной биологии [67].

Сравнение методов детекции ВВ представлено на рисунке 8.

Проблемы и вызовы в изучении ВВ

Важность внеклеточных везикул для медицины, особенно для персонализированных подходов, связана с их способностью отражать состояние клеток и тканей-источников, включая различные патологические процессы. ВВ участвуют в межклеточной коммуникации, переносят белки, липиды и РНК и могут быть использованы для диагностики и прогноза широкого спектра заболеваний, от нейродегенеративных до онкологических. В персонализированной медицине ВВ потенциально играют ключевую роль как индикаторы и средства доставки лекарств, однако существующие сложности в стандартизации и воспроизводимости результатов затрудняют их внедрение в клинику. Для того чтобы ВВ стали надежными диагностическими и терапевтическими инструментами, необходимо разработать унифицированные методы их исследования, что позволит интегрировать полученные данные в клинические протоколы.

Одним из наиболее серьезных препятствий в области исследований ВВ является отсутствие стандартизированных протоколов для их выделения, очистки и анализа. В результате отсутствия единого подхода данные, полученные разными лабораториями, часто невозможно воспроизвести или сравнить, что приводит к противоречивым выводам и затрудняет научное понимание механизмов действия ВВ. Протоколы, которые определяют условия преципитации, тип используемых буферов и способы идентификации поверхностных белков, могут существенно повлиять на выход и характеристики выделенных ВВ. Таким образом, отсутствие согласованных методик снижает точность и надежность результатов, что усложняет прогресс в данной области и препятствует клиническому внедрению ВВ как биомаркеров и терапевтических агентов.

Заключение

Несмотря на значительный прогресс, исследования ВВ продолжают сталкиваться с рядом сложностей, связанных с выбором подходящих

методов выделения, идентификации и количественного анализа. На сегодняшний день не существует универсального подхода, который бы обеспечивал высокую воспроизводимость и точность результатов для всех типов ВВ. Каждый метод обладает своими уникальными преимуществами и ограничениями, которые необходимо учитывать в зависимости от конкретных целей исследования. Тщательный выбор методологии с учетом свойств анализируемых везикул и особенностей используемого материала является ключевым условием для получения надежных данных. Внедрение международных стандартов и унифицированных протоколов могло бы существенно упростить сравнение результатов между разными исследованиями и повысить воспроизводимость данных. В дальнейшем совершенствование методов исследования ВВ откроет новые возможности для их применения в биомедицинской науке, в частности, в диагностике, прогнозировании и терапии заболеваний.

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 РФФИ, 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. 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.
2. van Niel G, Carter DRF, Clayton A, et al. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022;23(5):369–82.
3. Mohammadipoor A, Hershfield MR, Linsenhardt HR, et al. Biological function of Extracellular Vesicles (EVs): a review of the field. *Mol Biol Rep*. 2023 Oct;50(10):8639–51.
4. Margolis L, Sadovsky Y. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS Biol*. 2019 Jul 18;17(7):e3000363.
5. Panneerselvam S, Muthukumaran NS, Ghosh D, et al. Extracellular Vesicles in Cell–Cell Communications and Potential in Clinical Interventions. In: Ghosh AR, editor. *Extracellular Vesicles in Human Health and Diseases* [Internet].

Singapore: Springer Nature Singapore; 2024 [cited 2024 Nov 11]. p. 73–92. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-981-97-2494-9_4

6. Quiralte M, Barquín A, Yagüe-Fernández M, et al. Proteomic profiles of peritoneal fluid-derived small extracellular vesicles correlate with patient outcome in ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2024 May 15;134(10):e176161.

7. Delgado-Peraza F, Nogueras-Ortiz C, Simonsen AH, et al. Neuron-derived extracellular vesicles in blood reveal effects of exercise in Alzheimer's disease. *Alz Res Therapy*. 2023 Sep 20;15(1):156.

8. Vreones M, Mustapic M, Moaddel R, et al. Oral nicotinamide riboside raises NAD⁺ and lowers biomarkers of neurodegenerative pathology in plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin. *Aging Cell*. 2023 Jan;22(1):e13754.

9. D'Ascenzo F, Femminò S, Ravera F, et al. Extracellular vesicles from patients with Acute Coronary Syndrome impact on ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Research*. 2021 Aug;170:105715.

10. Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;159:332–43.

11. Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol*. 2021 Jul;16(7):748–59.

12. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *CP Cell Biology* [Internet]. 2006 Mar [cited 2024 Nov 5];30(1). Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb0322s30>

13. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J of Extracellular Vesicle*. 2014 Jan;3(1):23111.

14. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, et al. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J of Extracellular Vesicle*. 2012 Jan;1(1):18397.

15. Jeppesen DK, Hvam ML, Primdahl-Bengtson B, et al. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J of Extracellular Vesicle*. 2014 Jan;3(1):25011.

16. Nordin JZ, Lee Y, Vader P, et al. Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2015 May;11(4):879–83.

17. Mol EA, Goumans MJ, Doevendans PA, et al. Higher functionality of extracellular vesicles isolated using size-exclusion chromatography compared to ultracentrifugation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017 Aug;13(6):2061–5.

18. Böing AN, Van Der Pol E, Grootemaat AE, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J of Extracellular Vesicle*. 2014 Jan;3(1):23430.

19. Giddings JC, Yang FJF, Myers MN. Flow-Field-Flow Fractionation: A Versatile New Separation Method. *Science*. 1976 Sep 24;193(4259):1244–5.

20. Willms E, Cabañas C, Mäger I, et al. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol*. 2018 Apr 30;9:738.

21. Zhang H, Lyden D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exosome and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nat Protoc*. 2019 Apr;14(4):1027–53.

22. Xu R, Greening DW, Rai A, et al. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods*. 2015 Oct;87:11–25.

23. Xu R, Simpson RJ, Greening DW. A Protocol for Isolation and Proteomic Characterization of Distinct Extracellular Vesicle Subtypes by Sequential Centrifugal Ultrafiltration. In: Hill AF, editor. *Exosomes and Microvesicles* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cited 2024 Nov 5]. P. 91–116. (Methods in Molecular Biology; vol. 1545). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6728-5_7

24. Singh AD, Patnam S, Manocha A, et al. Polyethylene glycol-based isolation of urinary extracellular vesicles, an easily adoptable protocol. *MethodsX*. 2023 Dec;11:102310.

25. Kamei N, Nishimura H, Matsumoto A, et al. Comparative study of commercial protocols for high recovery of high-purity mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle isolation and their efficient labeling with fluorescent dyes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2021 Jul;35:102396.

26. Ströhle G, Gan J, Li H. Affinity-based isolation of extracellular vesicles and the effects on downstream molecular analysis. *Anal Bioanal Chem*. 2022 Oct;414(24):7051–67.

27. Nakai W, Yoshida T, Diez D, et al. A novel affinity-based method for the isolation of highly

- purified extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2016 Sep 23;6(1):33935.
28. Gardiner C, Shaw M, Hole P, et al. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. *J of Extracellular Vesicle.* 2014 Jan;3(1):25361.
29. Van Der Pol E, Coumans FAW, Sturk A, et al. Refractive Index Determination of Nanoparticles in Suspension Using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nano Lett.* 2014 Nov 12;14(11):6195–201.
30. Van Der Pol E, Welsh JA, Nieuwland R. Minimum information to report about a flow cytometry experiment on extracellular vesicles: Communication from the ISTH SSC subcommittee on vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2022 Jan;20(1):245–51.
31. Cavallaro S, Hååg P, Viktorsson K, et al. Comparison and optimization of nanoscale extracellular vesicle imaging by scanning electron microscopy for accurate size-based profiling and morphological analysis. *Nanoscale Adv.* 2021;3(11):3053–63.
32. Wu Y, Deng W, Klinke Ii DJ. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst.* 2015;140(19):6631–42.
33. Van Der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2014 Jul;12(7):1182–92.
34. Höög JL, Lötval J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. *J of Extracellular Vesicle.* 2015 Jan;4(1):28680.
35. Bordanaba-Florit G, Royo F, Kruglik SG, Falcón-Pérez JM. Using single-vesicle technologies to unravel the heterogeneity of extracellular vesicles. *Nat Protoc.* 2021 Jul;16(7):3163–85.
36. Obeid S, Sung PS, Le Roy B, et al. NanoBioAnalytical characterization of extracellular vesicles in 75-nm nanofiltered human plasma for transfusion: A tool to improve transfusion safety. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2019 Aug;20:101977.
37. Sharma S, LeClaire M, Gimzewski JK. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology.* 2018 Apr 3;29(13):132001.
38. Cavallaro S, Pevere F, Stridfeldt F, et al. Multiparametric Profiling of Single Nanoscale Extracellular Vesicles by Combined Atomic Force and Fluorescence Microscopy: Correlation and Heterogeneity in Their Molecular and Biophysical Features. *Small.* 2021 Apr;17(14):2008155.
39. Parisse P, Rago I, Ulloa Severino L, et al. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *Eur Biophys J.* 2017 Dec;46(8):813–20.
40. Piontek MC, Lira RB, Roos WH. Active probing of the mechanical properties of biological and synthetic vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects.* 2021 Apr;1865(4):129486.
41. Ridolfi A, Brucale M, Montis C, et al. AFM-Based High-Throughput Nanomechanical Screening of Single Extracellular Vesicles. *Anal Chem.* 2020 Aug 4;92(15):10274–82.
42. Van Der Pol E, Van Gemert MJC, Sturk A, et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2012 May;10(5):919–30.
43. Koliha N, Wiencek Y, Heider U, et al. A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. *J of Extracellular Vesicle.* 2016 Jan;5(1):29975.
44. Wiklander OPB, Bostancioglu RB, Welsh JA, et al. Systematic Methodological Evaluation of a Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay for Detection of Extracellular Vesicle Surface Signatures. *Front Immunol.* 2018 Jun 13;9:1326.
45. Zhu S, Ma L, Wang S, et al. Light-Scattering Detection below the Level of Single Fluorescent Molecules for High-Resolution Characterization of Functional Nanoparticles. *ACS Nano.* 2014 Oct 28;8(10):10998–1006.
46. Morales-Kastresana A, Musich TA, Welsh JA, et al. High-fidelity detection and sorting of nanoscale vesicles in viral disease and cancer. *J of Extracellular Vesicle.* 2019 Dec;8(1):1597603.
47. Sandau US, Duggan E, Shi X, et al. Methamphetamine use alters human plasma extracellular vesicles and their microRNA cargo: An exploratory study. *J of Extracellular Vesicle.* 2020 Nov;10(1):e12028.
48. Welsh JA, Killingsworth B, Kepley J, et al. A simple, high-throughput method of protein and label removal from extracellular vesicle samples. *Nanoscale.* 2021;13(6):3737–45.
49. Kondratov K, Nikitin Y, Fedorov A, et al. Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. *J of Extracellular Vesicle.* 2020 Sep;9(1):1743139.
50. Stoner SA, Duggan E, Condello D, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. *Cytometry Pt A.* 2016 Feb;89(2):196–206.
51. Tian Y, Gong M, Hu Y, et al. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle

- isolation methods by nano-flow cytometry. *J of Extracellular Vesicle*. 2020 Sep;9(1):1697028.
52. Welsh JA, Jones JC, Tang VA. Fluorescence and Light Scatter Calibration Allow Comparisons of Small Particle Data in Standard Units across Different Flow Cytometry Platforms and Detector Settings. *Cytometry Pt A*. 2020 Jun;97(6):592–601.
53. Welsh JA, Van Der Pol E, Bettin BA, et al. Towards defining reference materials for measuring extracellular vesicle refractive index, epitope abundance, size and concentration. *J of Extracellular Vesicle*. 2020 Sep;9(1):1816641.
54. Pleet ML, Cook S, Tang VA, et al. Extracellular Vesicle Refractive Index Derivation Utilizing Orthogonal Characterization. *Nano Lett*. 2023 Oct 25;23(20):9195–202.
55. Van Der Pol E, De Rond L, Coumans FAW, et al. Absolute sizing and label-free identification of extracellular vesicles by flow cytometry. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2018 Apr;14(3):801–10.
56. Van Der Pol E, Sturk A, Van Leeuwen T, et al. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018 Jun;16(6):1236–45.
57. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar;422(6928):198–207.
58. Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. *Cell*. 2020 Aug;182(4):1044–1061.e18.
59. Pocsfalvi G, Stanly C, Vilasi A, et al. Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016 Jan;35(1):3–21.
60. Liebler DC, Zimmerman LJ. Targeted Quantitation of Proteins by Mass Spectrometry. *Biochemistry*. 2013 Jun 4;52(22):3797–806.
61. Nakayasu ES, Gritsenko M, Piehowski PD, et al. Tutorial: best practices and considerations for mass-spectrometry-based protein biomarker discovery and validation. *Nat Protoc*. 2021 Aug;16(8):3737–60.
62. Newman LA, Useckaite Z, Rowland A. Addressing MISEV guidance using targeted LC-MS/MS: A method for the detection and quantification of extracellular vesicle-enriched and contaminant protein markers from blood. *J of Extracellular Bio*. 2022 Sep;1(9):e56.
63. Pocsfalvi G, Stanly C, Fiume I, Vékey K. Chromatography and its hyphenation to mass spectrometry for extracellular vesicle analysis. *Journal of Chromatography A*. 2016 Mar;1439:26–41.
64. Rodrigues AD, Van Dyk M, Sorich MJ, et al. Exploring the Use of Serum-Derived Small Extracellular Vesicles as Liquid Biopsy to Study the Induction of Hepatic Cytochromes P450 and Organic Anion Transporting Polypeptides. *Clin Pharma and Therapeutics*. 2021 Jul;110(1):248–58.
65. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016 Dec;8(4):409–27.
66. Bhatt M, Rai V, Kumar A, et al. SDS-PAGE and Western Blotting: Basic Principles and Protocol. In: Deb R, Yadav AK, Rajkhowa S, Malik YS, editors. *Protocols for the Diagnosis of Pig Viral Diseases* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [cited 2024 Nov 11]. P. 313–28. (Springer Protocols Handbooks). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-2043-4_23
67. Kowal EJK, Ter-Ovanesyan D, Regev A, Church GM. Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. In: Kuo WP, Jia S, editors. *Extracellular Vesicles* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cited 2024 Nov 5]. P. 143–52. (Methods in Molecular Biology; vol. 1660). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7253-1_12

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.

АФФИННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКЗОСОМ С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Моисеева Е. О.¹, Кожевникова Д. Д.¹, Сергеев И. С.¹,
Блиндман М. А.¹, Заборова О. В.², Чернышев В. С.³,
Яковлев А. А.⁴, Горин Д. А.¹, Ященко А. М.¹

¹ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук», Москва, Россия

Контактная информация:

Ященко Алексей Михайлович,
Сколковский институт науки
и технологий,
Большой бул., д. 30, Москва, Россия,
121205.
E-mail: a.yashchenok@skoltech.ru

Статья поступила в редакцию 10.10.2024
и принята к печати 04.12.2024

Резюме

Актуальность. Экзосомы относятся к классу внеклеточных везикул, которые секретируются клетками и циркулируют в биологических жидкостях, опосредуя межклеточную коммуникацию и передачу сигналов в различных патологических процессах, в том числе в модуляции развития раковых опухолей и опухолевого микроокружения. Клетки раковых опухолей продуцируют повышенное количество экзосом уже на начальных стадиях заболевания. Причем характерные для опухоли белковые маркеры могут встречаться в составе генерируемых экзосом, что делает последние перспективным объектом для детекции заболевания методом жидкостной биопсии. Основным препятствием для внедрения экзосом как маркеров развития заболеваний является отсутствие удобного, недорогого и быстрого метода для их выделения и детекции. **Цель.** Разработка платформы для выделения экзосом и детектирования белковых мембранных маркеров, изолированных экзосом. **Материалы и методы.** Разработаны магнитные наночастицы, функционализированные анти-ЕрСАМ аптамером, для избирательного захвата субпопуляции экзосом опухолевых клеток. Эффективность магнитных наночастиц протестирована на экзосомах, полученных из ЕрСАМ-позитивной линии клеток рака кишечника (HT29). Для обеспечения высокой чувствительности анализа экзосом из патологически измененных клеток, везикулы предварительно метили липофильным флуоресцентным красителем (3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин). **Результаты.** Показано, что магнитные наночастицы, связанные с аптамером анти-ЕрСАМ, эффективно захватывали экзосомы из культуральной среды HT29. Методом проточной флуоресцентной цитометрии получен предел обнаружения порядка 10^7 экзосом/мл. **Заключение.** Настоящее исследование демонстрирует эффективный метод избирательного выделения экзосом от конкретного типа клеток, перспективный для современной диагностики и мониторинга онкологических заболеваний.

Ключевые слова: жидкая биопсия, магнитные наночастицы, магнитная сепарация, малые внеклеточные везикулы, молекулярная диагностика, экзосомы

Для цитирования: Моисеева Е.О., Козhevникова Д.Д., Сергеев И.С. и др. Аффинное выделение экзосом с помощью магнитных наночастиц. *Трансляционная медицина*. 2025; 12(1): 67-79. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-67-79. EDN: ZMUOSN

SPECIFIC ISOLATION OF EXOSOMES USING MAGNETIC NANOSPHERES

Ekaterina O. Moiseeva¹, Daria D. Kozhevnikova¹, Igor S. Sergeev¹, Maria A. Blindman¹, Olga V. Zaborova², Vasily S. Chernyshev³, Alexander A. Yakovlev⁴, Dmitry A. Gorin¹, Alexey M. Yashchenok¹

Corresponding author:
Alexey M. Yashchenok,
Skolkovo Institute of Science and
Technology,
Bolshoy Boulevard, 30, p. 1, Moscow,
Russia, 121205.
E-mail: a.yashchenok@skoltech.ru

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

⁴ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Received 10 October 2024; accepted
04 December 2024

Abstract

Background. Exosomes belong to the class of extracellular vesicles that are secreted by cells and circulate in biological fluids, mediating intercellular communication and signaling in various pathological processes, including modulation of cancer development and tumor microenvironment. Exosomes released by cancer cells at early stages of disease progression expressing specific membrane markers, which makes exosomes a promising biomarker of the disease by liquid biopsy. The main obstacle to the use of exosomes as markers of disease development is the lack of a convenient, inexpensive and rapid method for their isolation and detection. **Objective.** The aim of this study was to develop a platform for exosome isolation and detection of exosome protein membrane markers. **Design and methods.** In this work, magnetic nanoparticles functionalized with anti-EpCAM aptamer were developed for selective capture of tumor cell exosomes. The efficiency of magnetic nanoparticles was tested on exosomes derived from EpCAM-positive colon cancer cell line (HT29). To ensure high sensitivity of exosomes from pathologically cells, vesicles were pre-labeled with a lipophilic fluorescent dye (3,3' dioctadecyloxycarbocyanine). **Results.** It was shown that magnetic nanoparticles bound with anti-EpCAM aptamer effectively captured exosomes from the HT29 culture medium. The detection limit of about 10^7 exosomes/ml was obtained using flow cytometry method. **Conclusion.** This study demonstrates an effective method for selective isolation of exosomes from cancer cell, which is promising for diagnostics and monitoring of oncological diseases.

Key words: exosomes, liquid biopsy, magnetic nanoparticles, magnetic separation, molecular diagnostics, small extracellular vesicles

For citation: Moiseeva EO, Kozhevnikova DD, Sergeev IS, et al. Specific isolation of exosomes using magnetic nanospheres. *Translational Medicine*. 2025; 12(1): 67-79. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-67-79. EDN: ZMUOSN

Список сокращений: ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия, РЭМ — растровая электронная микроскопия, APTES — 3-аминопропилтриэтоксисилан, BSA — бычий сывороточный альбумин, CANX — кальнексин (интегральный белок эндоплазматической сети), CD9 — мембранный белок семейства тетраспанинов, Cy5 — цианин-5, DIO — 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин, EDX — метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, EpCAM — молекула клеточной адгезии эпителия, FITC — флуоресцеин, GA — глутаровый альдегид, MFI — медиана флуоресценции, MP-SiO₂ — магнитные наночастицы, покрытые диоксидом кремния, NTA — метод анализа траекторий наночастиц, PBS — фосфатно-солевой буфер, SA — стрептавидин.

Введение

Экзосомы представляют собой стабильные мембранные везикулы размером 30–150 нм, которые секретируются практически всеми клетками во внеклеточное пространство организма [1]. Экзосомы являются посредниками в межклеточной коммуникации, доставляя информацию различного вида (нуклеиновые кислоты, белки, метаболиты и т. д.) к клеткам-реципиентам [2]. Более того, последние исследования показали участие экзосом в ряде биологических процессов в организме человека, таких как иммунный ответ, миграция и дифференцировка клеток, а также метастазирование опухолей [3–5]. Экзосомы несут в своей структуре биохимические маркеры, характерные для родительской клетки, так что, учитывая довольно высокую концентрацию экзосом в биологических жидкостях, таких как моча, кровь, лимфа и др., экзосомы могут стать полезными маркерами онкологических заболеваний [6, 7]. Таким образом, выделение субпопуляций экзосом, продуцируемых патологическими клетками, с последующим анализом их поверхностных маркеров и внутреннего содержимого, внесет существенный вклад в прогресс в области диагностики заболеваний на ранних стадиях и поможет в понимании некоторых фундаментальных вопросов, таких как механизмы образования и секреции экзосом.

Современные методы изучения экзосом активно совершенствуются, тем не менее, получение очищенных и биологически активных экзосом из сложных биологических образцов остается весьма актуальной задачей. Ультрацентрифугирование в настоящее время является золотым стандартом для выделения экзосом из культуральной среды, мочи, плазмы крови и т. д. [8, 9]. Кроме этого метода, для выделения экзосом из различных биоло-

гических образцов зачастую применяется ультрафильтрация и осаждение при помощи полимеров [10]. Однако все перечисленные методы не обеспечивают достаточной для последующего анализа чистоты, влияют на физиологическую активность экзосом, требуют больших затрат труда и времени. Эти недостатки отчасти позволяет преодолеть метод гель-фильтрации [11]. Данный метод, хотя и не требует применения сложных инструментов и не приводит к существенному загрязнению белком или потере физиологической активности экзосом, все еще остается дорогостоящим и трудоемким процессом.

Платформы, основанные на иммуномагнитной сепарации отдельных наночастиц или наноструктур, становятся все более востребованными для получения субпопуляций экзосом с минимальным количеством примесей [12, 13]. Этот подход позволяет непосредственно определять количество экзосом с соответствующими мембранными маркерами и совместим с последующими методами анализа, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР) или масс-спектрометрия (МС) [14, 15]. Важным преимуществом магнитной сепарации является то, что после выделения экзосомы без дополнительной пробоподготовки могут быть исследованы с помощью стандартных подходов иммунохимического анализа, таких как выявление белковых маркеров, например, тетраспанинов (CD9, CD63, CD81), или сверхэкспрессируемых опухолями белков (EpCAM, HER2, PSMA, CD24) [16–18]. Таким образом, с помощью магнитной сепарации можно одновременно выделять экзосомы и выявлять целевые маркеры. Как правило, аффинное выделение экзосом из биологических жидкостей достигается за счет биоконъюгации магнитных наночастиц с антителами или аптамерами к тетраспанинам, в то время как определение патологических везикул проводится с помощью нацеливания на онкомаркеры, отличающие экзосомы раковых клеток от нормальных.

Проточная цитометрия является мощным и широко используемым методом для рутинного количественного и качественного анализа клеток, поэтому также рассматривается как перспективный подход к исследованию экзосом [19, 20]. Тем не менее, ее прямое применение в отношении экзосом ограничено, так как классическая проточная цитометрия не может адекватно детектировать рассеяние или флуоресценцию частиц размером менее 300 нм.

Таким образом, разработка методов для выделения и фенотипирования экзосом посредством распознавания белковых мембранных марке-

ров экзосом является актуальной и практически важной задачей. Целью настоящей работы стала разработка платформы на основе магнитных наночастиц с функциональной поверхностью, которые способны селективно связывать субпопуляции экзосом, и верификация связывания экзосом с возможностью фенотипирования их мембранных маркеров методом проточной флуоресцентной цитометрии. Для этого были разработаны магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином для иммобилизации биотин-модифицированного анти-ЕрСАМ аптамера, который способен селективно связывать опухолевые экзосомы из культуральной среды. В качестве модели были использованы экзосомы, секретлируемые клетками линии рака кишечника HT29. Для обеспечения интенсивного флуоресцентного сигнала экзосомы предварительно помечали липофильным красителем, при этом детектирование патологических везикул осуществлялось посредством стандартной проточной цитометрии. Полученные в работе результаты подтверждают эффективность предложенной методики, которая позволяет провести селективное выделение и количественную оценку экзосом опухолевых клеток.

Материалы и методы

Реагенты. Магнитные наночастицы, покрытые диоксидом кремния, со средним диаметром 300 нм (MP-SiO₂, TetraQuant, Россия, <https://tetraquant.ru>). Стрептавидин (SA, Carl Roth GmbH, Германия). Бычий сывороточный альбумин (BSA, Sigma-Aldrich, США). Фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4, HIMEDIA, Индия). Этанол (J. T. Baker, США). Липофильный карбоцианиновый краситель 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин (DiO, Lumiprobe, США), 3-аминопропилтриэтоксисилан (APTES, Sigma-Aldrich, США). Глутаровый альдегид (GA, 25 % водный раствор, CDH, Индия). Полисорбат-20 (Sisco, Индия). Мышинные моноклональные антитела LT9 (CD9) (Катал. № 1006а, 100 тестов, ООО «Сорбент», Россия). Антитела антимышные, меченные флуоресцеином (F(ab)2-FITC, Катал. № 1050, 500 тестов, ООО «Сорбент», Россия). Поликлональное антитело к MRP1 (CD9) (PAB097Hu01, источник — человек, 100 мкг, Cloud-Clone, КНР). Поликлональное антитело к Calnexin (PAA280Hu01, источник — человек, 100 мкг, Cloud-Clone, КНР). Поликлональное антитело к ErbB2 (ЕрСАМ) (PAB867Hu01, источник — человек, 50 мкг, Cloud-Clone, КНР). Анти-ЕрСАМ аптамер (5'-ag-tga-cgc-agc-atg-cgg-cac-aca-ctt-cta-tct-ttg-cgg-aac-tcc-tgc-gg-3', с биотином на 5 конце и Су5 на 3 конце) («Синтол», Россия). В экспериментах

использовали деионизованную воду, очищенную на системе Millipore Milli-Q (Merck, Германия).

Синтез аминок-функционализированных магнитных наночастиц (MP-NH₂). 30 мг наночастиц MP-SiO₂ суспендировали в 100 мл этанола, куда при интенсивном перемешивании добавляли 1 мл APTES в атмосфере аргона. Затем полученную смесь выдерживали при 60 °С в течение 6 часов. По окончании реакции наночастицы трижды промывали этанолом для удаления избытка APTES, ресуспендировали в воде и хранили при температуре 4 °С.

Функционализация магнитных наночастиц стрептавидином (MP-SA). К 1 мг суспензии наночастиц MP-NH₂ в 1 мл воды добавляли 1 мл 25 % раствора глутарового альдегида, после чего полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. По окончании реакции модифицированные наночастицы трижды промывали водой. Затем активированные альдегидной группой наночастицы добавляли к 100 мкг стрептавидина в 1 мл PBS (0,1x) и инкубировали при интенсивном перемешивании при 4 °С в течение 12 часов. Избыток несвязанного белка трижды отмывали PBS, затем наночастицы MP-SA ресуспендировали в PBS (0,1x) и хранили при температуре 4 °С.

Определение размера и элементный анализ наночастиц. Размер исследуемых наночастиц определяли с использованием нескольких методов. Изображения растровой электронной микроскопии (РЭМ) наночастиц получены с помощью микроскопа Quattro (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получены с помощью микроскопа Titan (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного приставкой EDX (США). Энергодисперсионный рентгеновский анализ (ЭДС) был выполнен с помощью просвечивающего электронного микроскопа, оснащенного приставками для проведения элементного анализа с использованием методик энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Super-X EDX детектор) и спектроскопии характеристических потерь энергии электронов (Quantum 965). Зета-потенциал и размер наночастиц также определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Выделение экзосом. Клеточную линию колоректального рака HT29 выращивали в культураль-

ных флаконах площадью 175 см² в среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 5 % L-глутамина, 1 % пирувата натрия, 1 % пенициллина/стрептомицина и 0,1 % гентамицина. После достижения плотности заполнения, превышающей 90 %, питательную среду заменяли на среду без сыворотки, и клетки помещали в инкубатор на 48 часов. Затем культуральную среду отбирали, центрифугировали 10 минут при 400×g для удаления остатков мертвых клеток. Перед хроматографическим выделением 100 мл среды очищали и концентрировали до объема 500 мкл с помощью ультрафильтрации на фильтрах с размером пор 100 кДа (Millipore, Германия). Выделение экзосом из 500 мкл концентрированной среды осуществляли на коммерческой колонке mini PURE-EVs (HansaBioMed, Эстония). Согласно инструкции производителя, фракции (объем одной фракции ~ 100 мкл) с 1 по 7 исключались из рассмотрения, в то время как фракции с 8 по 14 собирали вместе в новую пробирку для последующего определения концентрации везикул и белка в образце.

Получение флуоресцентно-меченных экзосом. Флуоресцентно-меченные экзосомы получали по следующей методике: 200 мкл предварительно выделенных экзосом (2×10^{10} везикул/мл) в PBS помещали в 0,5 мл пробирку со стенками, инертными к адсорбции белков (Eppendorf LoBind Protein Tube), и добавляли 200 мкл липофильного красителя DiO (40 нмоль в смеси ДМСО:PBS (1:1)), после чего инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Далее образец очищали от избытка красителя на коммерческой колонке miniPURE-EVs (HansaBioMed, Эстония). Согласно протоколу производителя, фракции с 1 по 7 не собирались. Фракции с 8 по 14 помещали отдельно в новую пробирку для последующего анализа. Верификацию встраивания красителя в структуру липидного бислоя экзосом проводили методом флуоресцентной томографии с использованием системы преclinical 2D и 3D визуализации *in vivo* с цифровой микротомографией (микроКТ) (IVIS spectrum CT, PerkinElmer, США). Фракции экзосом с 8 по 14 наносили отдельно (2 мкл) на нитроцеллюлозную мембрану и высушивали перед измерениями. Измерение проводили при длинах волн возбуждения и эмиссии 460 нм и 520 нм соответственно.

Характеризация экзосомальной фракции. Размер и концентрацию экзосом оценивали методом анализа траектории наночастиц (NTA) с использованием прибора ZetaView® PMX420-QUATT (Particle Metrix, Германия). Концентра-

цию белка в экзосомальной фракции определяли с помощью бицинхониновой кислоты (набор BCA Protein Assay Kit, FineTest, Китай). Наличие характеристических маркеров экзосом — тетраспанина CD9, EpCAM, и отсутствие кальнексина (CANX) подтверждали методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Bio-Rad, США). Для дот-блоттинга образцы выделенных экзосом наносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью микропипетки. Затем мембраны промывали PBS и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °C с блокирующим буфером (5 % BSA, PBS) и аккуратном перемешивании. Далее для детекции выбранных маркеров (CD9, EpCAM, CANX) мембраны инкубировали с первичными антителами (разведение 1:2500) при температуре 4 °C в течение ночи. После промывки раствором 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA в PBS мембраны инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в 0,05 % Tween-20, 0,1 % BSA в PBS, содержащем вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена, разведенные в соотношении 1:200 000. Затем мембраны промывали и проявляли с использованием субстрата пероксидазы Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Интенсивность люминесценции оценивали на флуоресцентном томографе IVIS Spectrum CT imaging system. Изображения растровой электронной микроскопии (РЭМ) экзосом получены с помощью микроскопа Quattro (Thermo Fisher Scientific, США). Для получения изображений образцы экзосом помещали на медную сетку с углеродным покрытием и оставляли сушиться на ночь при комнатной температуре. После чего проводили измерения.

Иммобилизация анти-EpCAM аптамера. Иммобилизация аптамера с биотином на магнитные наночастицы (MP-SA) осуществляли по следующей методике: 100 мкл MP-SA промывали три раза промывочным буфером (0,1x PBS pH 7,4 и 0,01 % Tween 20). Далее наночастицы ресуспендировали в 500 мкл промывочного буфера и добавляли 500 мкл аптамера (0,2 пикомоль/мкл), после чего инкубировали при комнатной температуре на ротаторе в течение 30 минут. Потом магнитные наночастицы собирали на магнитном штативе и проводили промывку наночастиц от остатков аптамера три раза промывочным буфером. Наночастицы ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера для дальнейших экспериментов. Верификацию посадки аптамера на наночастицы проводили на проточном цитометре, в качестве контроля использовали образец наночастиц без аптамера.

Иммунохимический анализ экзосом. Иммуномагнитную изоляцию HT29 экзосом осуществляли по следующей методике: 10 мкл наночастиц MP-SA с анти-ЕрСАМ аптамером помещали в новую пробирку (2 мл, Eppendorf LoBind Protein Tube), после чего добавляли 100 мкл HT29 экзосом различной концентрации. Далее наночастицы и экзосомы инкубировали на термошейкере на 650 об/мин при 4 °С в течение не менее 12 часов. Затем пробирку помещали на магнитный штатив для концентрирования магнитных наночастиц и отбирали надосадочную жидкость (супернатант). После этого наночастицы ресуспендировали в 400 мкл промывочного буфера (0,1x PBS pH 7,4 и 0,01 % Tween 20) и пробирку вновь помещали на магнитный штатив для концентрирования наночастиц, после чего отбирали супернатант и ресуспендировали в 300 мкл промывочного буфера. Затем добавляли в пробирку 30 мкл LT9 антител и инкубировали 45 минут при комнатной температуре на термошейкере на 950 об/мин. Далее наночастицы собирали на магнитном штативе и промывали в 300 мкл промывочного буфера. Процедуру промывки повторяли трижды, после чего наночастицы вновь ресуспендировали в 300 мкл буфера для выделения (0,1x PBS pH 7,4 и 0,1 % BSA), добавляли 50 мкл F(ab)2-FITC антител (разведение 1:100) и инкубировали на термошейкере на 950 об/мин 30 минут. По завершении инкубации наночастицы собирали на магнитном штативе и промывали трижды в 300 мкл промывочного буфера.

Верификацию образования комплекса «магнитная наночастица–экзосома–антитело» проводили на проточном флуоресцентном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для регистрации флуоресцентного сигнала от антител (меченных красителем FITC) использовали канал флуоресценции FITC (длина волны возбуждения 488 нм, длина волны эмиссии 520 нм). Регистрацию флуоресцентного сигнала от аптамера, меченного красителем Cy5 на магнитных наночастицах, проводили в флуоресцентном канале APC (длина волны возбуждения 638 нм, длина волны эмиссии 660 нм). Регистрацию флуоресцентного сигнала от экзосом, меченных липофильным красителем DiO, проводили в канале флуоресценции FITC (длина волны возбуждения 488 нм, длина волны эмиссии 520 нм). Компенсацию и анализ флуоресцентного сигнала (значение MFI) выполняли с использованием программного обеспечения CytExpert.

Обсуждение и результаты

Магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином (SA), часто используются для магнитной

сепарации биомолекул. В частности, высокоспецифичное взаимодействие SA с биотином стало чрезвычайно полезным инструментом при разработке систем для иммуноаффинного выделения и очистки клеток [21]. Исключительно высокое сродство SA к биотину ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [22]) является одним из сильнейших известных нековалентных взаимодействий белка с лигандом, что позволяет молекулам, содержащим биотин, селективно связываться с конъюгатами стрептавидина. Данный принцип обеспечивает эффективное выделение целевых молекул без предварительной пробоподготовки из сложных смесей, к которым относятся все биологические жидкости. Биотин — это небольшая молекула, которая при введении в биологически активные макромолекулы, как правило, не влияет на их биологическую активность и на способность меченых белков связываться с антителами или аптамерами. Поскольку биотинилированные аптамеры коммерчески доступны и отличаются низкой стоимостью относительно аналогичных антител, магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином, могут быть легко функционализированы аптамером, специфичным к определенному антигену на поверхности мембраны внеклеточных везикул, что позволяет выделять таргетную фракцию экзосом из общей популяции внеклеточных везикул и проводить дальнейшее фенотипирование выделенных экзосом. Ковалентная иммобилизация SA на поверхность твердых носителей имеет ряд преимуществ, так как образование стабильной химической связи между биомолекулами и наночастицей обеспечивает высокую надежность связывания. Важно отметить, что ориентация SA на поверхности наночастицы несущественно влияет на эффективность мобилизации биотинилированных аптамеров. Дело в том, что стрептавидин представляет собой тетрамерный белок [22] и состоит из четырех эквивалентных субъединиц, поэтому независимо от того, какую конформацию SA примет на поверхности наночастицы, всегда будет оставаться свободный сайт для связывания с биотином.

Существует множество способов ковалентного связывания SA с поверхностью наночастиц, наиболее популярными из них являются реакции аминогрупп, которые в достатке присутствуют в молекулах белков с функциональными группами поверхности, такими как изоцианаты, ацилазиды, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, сульфонил хлориды, альдегиды, эпоксиды и др. [23]. В частности, модификация поверхности с помощью 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES) с последующей активацией глутаровым альде-

гидом (GA) является часто используемым методом иммобилизации белка на различные твердые поверхности [24]. Альдегидные группы быстро и необратимо реагируют с первичными аминогруппами молекулы белка в водной среде при физиологическом pH, поэтому GA широко применяется для конъюгации. Силанизация — это хорошо зарекомендовавшая себя реакция модификации поверхности неорганических наночастиц для последующей иммобилизации белков или молекул нуклеиновых кислот, поэтому на первом этапе для функционализации поверхности оксида кремния свободными аминогруппами мы использовали APTES. После чего для пришивки белка поверхность активируется альдегидными группами путем взаимодействия NH_2 -групп с GA, при этом одна альдегидная группа связывается с наночастицей, а вторая остается свободной. В результате именно эти альдегидные группы вступают в реакцию с аминогруппами белка. Все стадии иммобилизации стрептавидина на поверхность наночастиц MP-SiO₂ приведены на схеме 1.

В качестве стартового материала были использованы имеющиеся в продаже магнитные наночастицы, покрытые диоксидом кремния, со средним диаметром 300 нм, которые вводили в реакцию силанизации. Магнитные наночастицы, покрытые APTES, представлены на рисунке 1А. Полученные MP-NH₂ имеют сферическую форму и характеризуются наличием зернистого ядра и оболочки (структура ядро-оболочка “core-shell”). Энергодисперсионный (ЭД) анализ показал, что в ядре наночастиц содержится оксид железа, покрытый слоем оксида кремния с небольшим количеством атомов азота и углерода. Согласно ДРС размер наночастиц увеличился с 300 нм для исходных наночастиц до 360 нм для MP-NH₂ (рис. 1Б). Методом электрофоретического рассеяния света (ЭРС)

было показано, что после реакции с APTES наблюдается изменение дзета-потенциала магнитных наночастиц с отрицательного значения (-38 мВ), характерного для оксида кремния, на положительное значение (+32 мВ), свойственное положительному заряду аминогрупп (рис. 1В). Результаты ЭД, ДРС и ЭРС подтверждают успешную функционализацию поверхности диоксида кремния аminosиланом.

Для связывания со стрептавидином наночастицы MP-NH₂ предварительно активировали 2,5 % глутаровым альдегидом, после чего пришивали белок. В результате реакции конъюгации гидродинамический размер увеличился до 400 нм, а дзета-потенциал снова изменился на отрицательный (-12 мВ), что указывает на связывание белка с поверхностью наночастиц, так как при нейтральном или близком к нейтральному pH стрептавидин имеет отрицательный заряд [25]. Дополнительно методом РЭМ (рис. 1Г) показано, что на поверхности и между наночастицами MP-SA наблюдается полимерная оболочка.

Следующим этапом работы явилось исследование возможности применения полученных MP-SA наночастиц для выделения внеклеточных везикул и их фенотипирования. Для связывания экзосом использовали аптамер, специфичный к EpCAM рецептору, поскольку большинство экзосом, секретируемых клетками рака эпителиального происхождения, к которым, в частности, относится рак кишечника, сверхэкспрессируют EpCAM [26]. Такой выбор обеспечивает избирательный захват экзосом опухолевого происхождения с помощью магнитных наночастиц. На рисунке 2 приведены результаты измерения флуоресценции MP-SA наночастиц методом проточной цитометрии до и после инкубации MP-SA с анти-EpCAM аптамером, содержащим биотин на 5' конце и краситель циа-

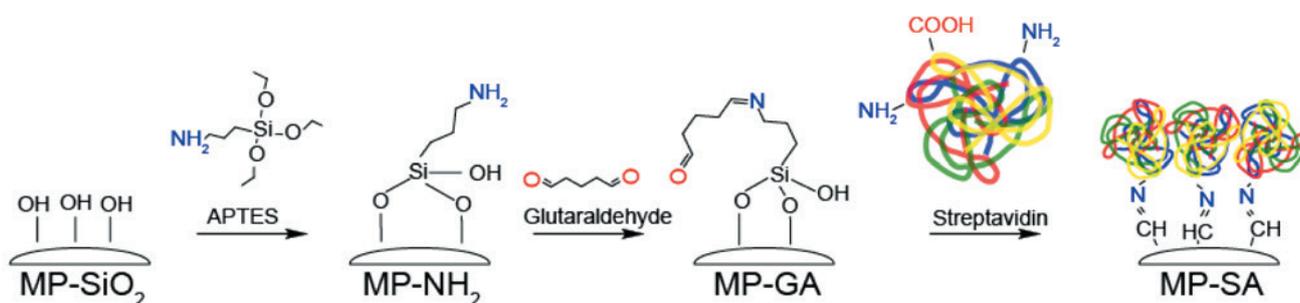


Схема 1. Схематическое изображение получения функционализированных стрептавидином магнитных наночастиц (MP-SA)

Scheme 1. Schematic representation of the production of streptavidin-functionalized magnetic nanoparticles (MP-SA)

нин-5 (Cy5) на 3' конце. В результате наблюдается 1000-кратное увеличение сигнала флуоресценции при связывании аптамера с MP-SA наночастицами по сравнению с MP-SA наночастицами без аптамера (рис. 1А).

Далее MP-SA наночастицы с анти-ЕpСAM аптамером (MP-Арт) были использованы для выделения экзосом. В работе применялись экзосомы, выделенные методом гель-фильтрации из культуральной среды клеточной линии колоректального рака HT29. Чтобы охарактеризовать экзосомы, необходимо оценить их размер, а также важно продемонстрировать экспрессию распространенных экзосомальных белков-маркеров. На рисунке 2Б представлена диаграмма распределения размера полученных экзосом клеточной линии HT29. Средний диаметр экзосом составил 168 ± 24 нм. Концентрация экзосом в образце: $1,4 \pm 0,4 \times 10^{10}$ везикул в мл. Концентрация белка в образце составила 20 ± 4 мкг в мл. На рисунке 2В приведены ПЭМ изображения выделенных HT29 экзосом, анализ которых показал, что экзосомы имеют типичную однородную морфологию округлой фор-

мы с характерной границей липидного бислоя. Мембранные рецепторы HT29 экзосом определяли методом дот-блоттинга (рис. 2Б, вставка). Данные дот-блоттинга свидетельствуют о присутствии характеристичного экзосомального маркера — CD9, а также показывают высокую экспрессию ЕpСAM. Следует отметить, что тетраспанин CD9 является одним из наиболее распространенных белков экзосом, что подтверждает селективность процедуры выделения. Отрицательный результат дот-блоттинга на Calnexin (белок эндоплазматического ретикулума) свидетельствует об отсутствии в образце иных везикул эндосомального происхождения. Полученные результаты подтверждают чистоту экзосомальной фракции и успешное выделение экзосом из культуральной среды HT29.

Фенотипирование экзосом по мембранным маркерам является одной из важных задач для количественного анализа или детектирования субпопуляций экзосом. Поэтому следующим этапом работы стало исследование возможности захвата HT29 экзосом MP-Арт наночастицами за ЕpСAM рецептор, с последующим детектирова-

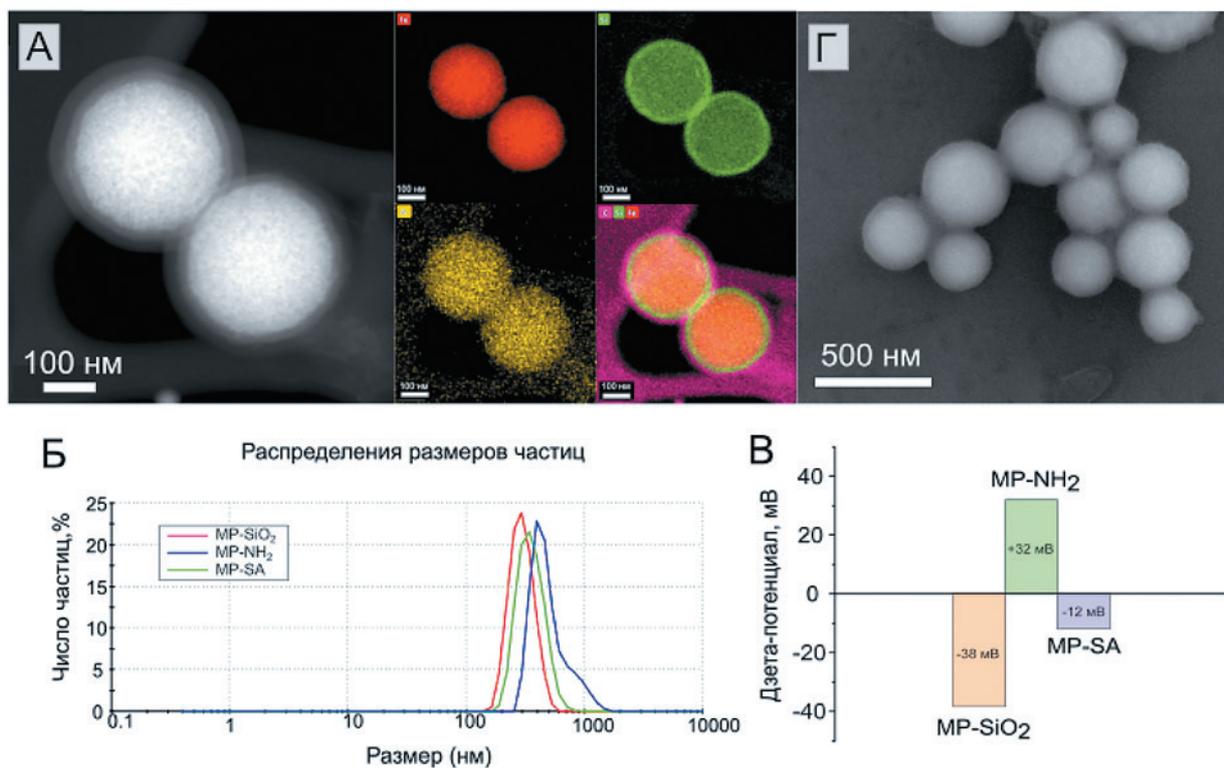


Рис. 1. Характеризация полученных магнитных наночастиц

ПЭМ-изображения (А), гидродинамический диаметр (Б) и дзета-потенциал (В), РЭМ-изображение (Г) магнитных наночастиц.

Figure 1. Characterization of the obtained magnetic nanoparticles

TEM images (A), hydrodynamic diameter (B) and zeta potential (C), SEM image (D) of magnetic nanoparticles.

нием второго мембранного рецептора с помощью антител. В качестве такого рецептора был выбран белок CD9 — классический экзосомальный маркер. На рисунке 3А представлены графики интенсивности флуоресценции магнитных наночастиц, функционализированных анти-EpCAM аптамером после связывания экзосом и окрашивания

антителами. Данные показывают слабое увеличение сигнала флуоресценции по сравнению с фоном, в присутствии экзосом по сравнению с контрольным экспериментом. При этом наблюдается устойчивый тренд на рост сигнала флуоресценции по мере увеличения количества экзосом. Далее была исследована возможность захвата и фено-

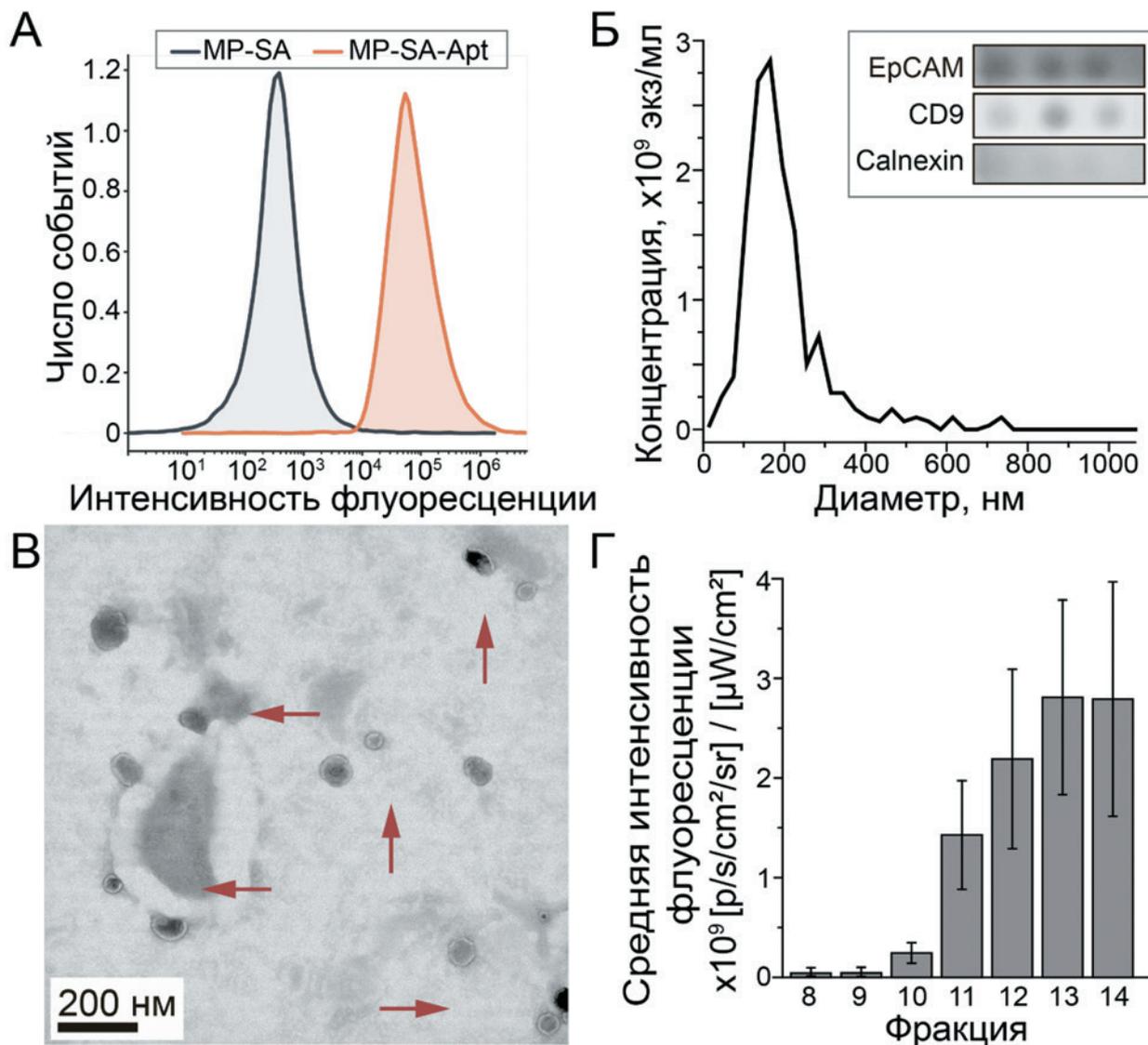


Рис. 2. Характеризация полученных экзосом

Сигнал флуоресценции Cy5 MP-SA наночастиц до и после связывания с биотинилированным Cy5-меченым анти-EpCAM аптамером (А); распределение гидродинамического диаметра (Б); ПЭМ изображения (стрелками показаны экзосомы) (В) экзосом, выделенных из клеточной культуры HT29 колоректального рака. Вставка: дот-блоттинг экзосом HT29. Результаты флуоресцентного анализа очищенных на chromatографической колонке и нанесенных на нитроцеллюлозную мембрану экзосом, меченных липофильным красителем DiO (Г).

Figure 2. Characterization of the obtained exosomes

Cy5 MP-SA Fluorescence Signal of Nanoparticles Before and After Binding to Biotinylated Cy5-Labeled Anti-EpCAM Aptamer (A); distribution of hydrodynamic diameter (B); TEM images (arrows show exosomes) (C) exosomes isolated from HT29 colorectal cancer cell culture. Insert: HT29 exosome dot pillbox. Results of fluorescence analysis purified on a chromatographic column and deposited on the nitrocellulose membrane by exosomes labeled with lipophilic dye DiO (G).

типирования экзосом непосредственно из культуральной среды без предварительной очистки (рис. 3Б). После инкубации наночастиц MP-SA-Apt с первичными антителами к CD9 и вторичными антителами, меченными FITC, также наблюдается увеличение сигнала флуоресценции по сравнению с фоном. Причем интенсивность флуоресценции оказалась выше, чем при анализе выделенных экзосом HT29 с максимальной концентрацией (10^9 везикул в мл). Тем не менее, полученный сигнал все еще оставался низким. Полученные результаты могут быть обусловлены недостаточным количеством свободных сайтов связывания из-за стерических ограничений, так как поверхность наночастиц может препятствовать связыванию антитела с маркером экзосом. Также невысокая чувствительность метода затрудняет определение малых концентраций экзосом.

Чтобы усилить флуоресцентный сигнал экзосом на магнитных наночастицах и обеспечить надежное количественное определение экзосом опухолевых клеток, выделенные экзосомы были модифицированы флуоресцентным липофильным карбоцианиновым красителем. 3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин (DiO) представляет собой симметричную молекулу, состоящую из двух ароматических цианиновых фрагментов, содержащих

по одной алкильной цепи C_{18} , которые и обеспечивают высокую липофильность. Этот краситель, наряду с другими представителями семейства липофильных карбоцианиновых красителей, широко используется для окрашивания клеточных мембран [27]. На рисунке 2Г представлены результаты флуоресцентного анализа фракций (8–14) экзосом после их инкубации с красителем DiO с последующей очисткой на хроматографической колонке. Из проведенных измерений видно, что основная часть флуоресцентно-меченных экзосом находится во фракциях с 11 по 14. На рисунке 2Б также приведены средние значения интенсивности флуоресцентного сигнала для каждой из фракций, которые также подтверждают, что наиболее интенсивный сигнал флуоресценции наблюдался для фракций экзосом с 11 по 14. Таким образом, для последующих экспериментов по взаимодействию экзосом с MP-SA-Apt использовали объединенные фракции экзосом с 11 по 14.

Для оценки эффективности предложенного метода окрашенные липофильным красителем экзосомы от HT29 инкубировали с MP-SA-Apt и проводили анализ интенсивности флуоресценции методом проточной цитометрии. На рисунке 3В представлен график флуоресцентного сигнала меченных DiO HT29 экзосом, связанных с MP-SA-

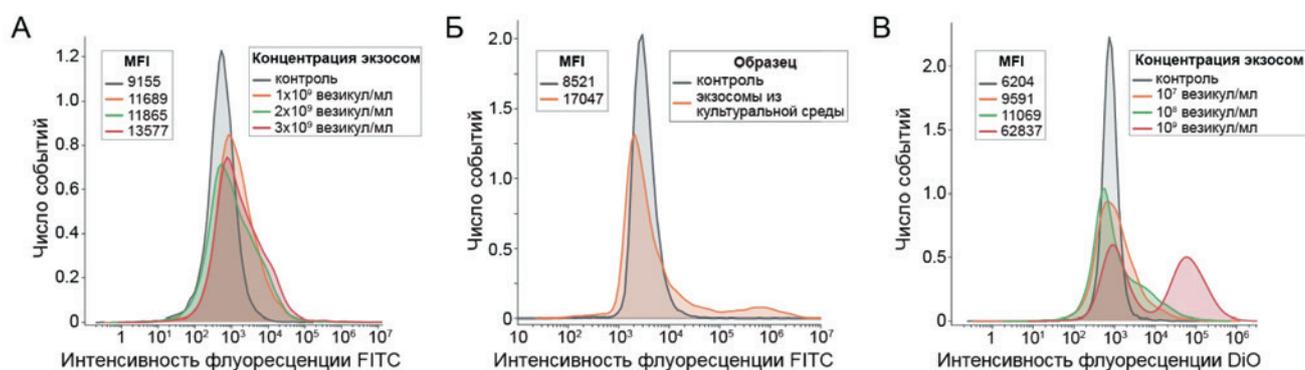


Рис. 3. Графики интенсивности флуоресценции FITC магнитных наночастиц, полученные при помощи проточной цитометрии

Сигнал флуоресценции MP-SA-Apt после инкубации с различным количеством экзосом, выделенных из клеток HT29 (А) и с экзосомами концентрированной культуральной среды клеток HT29 без предварительной очистки (Б), с последующей инкубацией с первичным мышинным анти-CD9 антителом и FITC-меченным вторичным мышинным антителом. Сигнал флуоресценции MP-SA-Apt после инкубации с различным количеством окрашенных липофильным красителем экзосом, выделенных из клеток HT29 (В). На вставке слева даны значения MFI.

Figure 3. Fluorescence intensity plots of FITC magnetic nanoparticles obtained using flow cytometry

Fluorescence signal of MP-SA-Apt after incubation with a different number of exosomes isolated from HT29 cells (A) and with exosomes of concentrated HT29 cell culture medium without prior purification (B), followed by incubation with primary murine anti-CD9 antibody and FITC-labeled secondary murine antibody. MP-SA-Apt fluorescence signal after incubation with varying numbers of lipophilic dye-stained exosomes isolated from HT29(B) cells. The inset on the left shows the MFI values.

Арт. Показано, что при увеличении концентрации экзосом в диапазоне 10^7 , 10^8 , 10^9 везикул в мл наблюдается постепенное увеличение сигнала флуоресценции. При количественном анализе максимальной из исследуемых концентраций везикул в мл — 10^9 , получено 100-кратное увеличение сигнала флуоресценции по сравнению с фоном. Стоит отметить, что при анализе наименьшей концентрации везикул сигнал также был выше фонового, поэтому нижний предел обнаружения флуоресцентных экзосом для данного эксперимента составил 10^7 везикул в мл. Следовательно, на основании полученных результатов можно заключить, что предложенный метод прямого захвата предварительно окрашенных экзосом значительно увеличивает чувствительность метода проточной цитометрии при анализе специфических маркеров, по сравнению с сэндвич-вариантом. Данный факт, вероятно, обусловлен более высокой концентрацией липофильного красителя в липидном бислое экзосом. В клеточную мембрану может встроиться множество молекул липофильного красителя [28], в то время как оптимальным количеством красителя, которое возможно ввести в молекулу антитела без потери аффинности, считается от 4 до 8 [29]. Поэтому с учетом малого количества доступных специфических рецепторов, вероятно, в случае окрашивания липофильным красителем липидного бислоя, количество ответственных за сигнал флуорофоров на иммобилизованных везикулах оказывается выше.

Заключение

Таким образом, в данном исследовании разработана методика селективного захвата опухолевых экзосом и их количественного анализа с помощью флуоресцентной проточной цитометрии. Полученные магнитные наночастицы, покрытые стрептавидином, образуют устойчивый комплекс с биотинилированным анти-ЕрСАМ аптамером и эффективно захватывают экзосомы из культуральной среды клеток рака кишечника HT29. Проведена количественная оценка экзосом, окрашенных липофильным красителем, с помощью проточного цитометра. Показано успешное определение окрашенных ЕрСАМ-положительных экзосом в диапазоне концентраций 10^7 – 10^9 везикул/мл. Данный подход потенциально может быть распространен на исследования экзосом в образцах биологических жидкостей, таких как кровь, слюна или моча. Дополнительно в подходе вместо аптамера могут быть применены первичные антитела, конъюгированные с биотином. Предложенная методика может расширить текущие возможности

по применению жидкостной биопсии и анализа экзосом в качестве циркулирующих онкомаркеров и позволит упростить диагностику онкологических заболеваний на ранних стадиях.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgement

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-00022, <https://rscf.ru/project/23-74-00022/>.

Исследование методом АНТ проводилось с использованием оборудования ЦКП МГУ «Технологии получения новых наноструктурированных материалов и их комплексное исследование», приобретенного МГУ по программе обновления приборной базы в рамках национального проекта «Наука». / The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 23-74-00022, <https://rscf.ru/project/23-74-00022/>. The ANT study was carried out using the equipment of the MSU CCP “Technologies for obtaining new nanostructured materials and their comprehensive study”, acquired by MSU under the instrument base upgrade program as part of the national Science project.

Список литературы / References

1. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581–593. DOI: 10.1038/nri2567.
2. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255–289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
3. Ridder K, Keller S, Dams M, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol.* 2014;12(6):e1001874. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001874.
4. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012;18(6):883–891. DOI: 10.1038/nm.2753.
5. Tenchov R, Sasso JM, Wang X, et al. Exosomes — nature’s lipid nanoparticles, a rising star in drug delivery and diagnostics. *ACS Nano.* 2022;16(11):17802–17846. DOI: 10.1021/acsnano.2c08764.
6. Yang L, Jia J, Li S. Advances in the application of exosomes identification using surface-enhanced Raman spectroscopy for the early detection of cancers.

Front Bioeng Biotechnol. 2022;9:808933. DOI: 10.3389/fbioe.2021.808933.

7. Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 2015;523(7559):177–182. DOI: 10.1038/nature14581.

8. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2:20360. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.

9. Chen BY, Sung CWH, Chen C, et al. Advances in exosomes technology. *Clin Chim Acta*. 2019;493:14–19. DOI: 10.1016/j.cca.2019.02.021.

10. Sunkara V, Park J, Han J, et al. Exosome precipitation by ionic strength modulation: ExoPRISM. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023;15(12):56807–56819. DOI: 10.1021/acsami.3c12345.

11. Baranyai T, Herczeg K, Onódi Z, et al. Isolation of exosomes from blood plasma: Qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. *PLoS ONE*. 2015;10(12):e0145686. DOI: 10.1371/journal.pone.0145686.

12. Yashchenok AM, Chernyshev VS, Konovalova EV, et al. Anti-CD63-oligonucleotide functionalized magnetic beads for the rapid isolation of small extracellular vesicles and detection of EpCAM and HER2 membrane receptors using DARPIn probes. *Anal Sens*. 2023;3:e202200059. DOI: 10.1002/anse.202200059.

13. Boriachek K, Islam MN, Gopalan V, et al. Quantum dot-based sensitive detection of disease specific exosome in serum. *Analyst*. 2017;142(12):2211–2219. DOI: 10.1039/C7AN00672A.

14. Chang M, Wang Q, Qin W, et al. Rational synthesis of aptamer-functionalized polyethylenimine-modified magnetic graphene oxide composites for highly efficient enrichment and comprehensive metabolomics analysis of exosomes. *Anal Chem*. 2020;92(22):15497–15505. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03405.

15. Chen S, Shiesh SC, Lee GB, et al. Two-step magnetic bead-based (2MBB) techniques for immunocapture of extracellular vesicles and quantification of microRNAs for cardiovascular diseases: A pilot study. *PLoS ONE*. 2020;15(12):e0229610. DOI: 10.1371/journal.pone.0229610.

16. Li Q, Lv M, Lv L, et al. Identifying HER2 from serum-derived exosomes in advanced gastric cancer as a promising biomarker for assessing tissue HER2 status and predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy. *Cancer Med*. 2023;12(4):4110–4124. DOI: 10.1002/cam4.5289.

17. Runz S, Keller S, Rupp C, et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM. *Gynecol Oncol*. 2007;107(3):563–571. DOI: 10.1016/j.ygyno.2007.08.064.

18. Kawakami K, Fujita Y, Kato T, et al. Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies. *Sci Rep*. 2021;11:15000. DOI: 10.1038/s41598-021-94532-7.

19. Li W, Shao B, Liu C, et al. Noninvasive diagnosis and molecular phenotyping of breast cancer through microbead-assisted flow cytometry detection of tumor-derived extracellular vesicles. *Small Methods*. 2018;2(10):1800122. DOI: 10.1002/smt.201800122.

20. Suárez H, Gámez-Valero A, Reyes R, et al. A bead-assisted flow cytometry method for the semi-quantitative analysis of extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2017;7:11271. DOI: 10.1038/s41598-017-11264-3.

21. Dose C, Huppert V, Kauling B, et al. Multisort cell separation method. US Patent 10,123,456, filed 15 March 2018, and issued 6 November 2018.

22. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem*. 1991;37(5):625–636. DOI: 10.1093/clinchem/37.5.625.

23. Hermanson GT. The reactions of bioconjugation. In: *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed. Academic Press. 2013:229–258. ISBN: 978-0-12-382239-0.

24. Vashist SK, Lam E, Hrapovic S, et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. *Chem Rev*. 2014;114(21):11083–11130. DOI: 10.1021/cr5000943.

25. van Oss CJ, Giese RF, Bronson PM, et al. Macroscopic-scale surface properties of streptavidin and their influence on aspecific interactions between streptavidin and dissolved biopolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2003;30(1–2):25–36. DOI: 10.1016/S0927-7765(03)00029-5.

26. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*. 2019;3(6):165–180. DOI: 10.15698/cst2019.06.189.

27. Unthank JL, Lash JM, Nixon JC, et al. Evaluation of carbocyanine-labeled erythrocytes for microvascular measurements. *Microvasc Res*. 1993;45(2):193–210. DOI: 10.1006/mvre.1993.1019.

28. Zou P, Chen H, Paholak HJ, et al. Noninvasive fluorescence resonance energy transfer imaging of in vivo premature drug release from polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2013;10(11):4185–4194. DOI: 10.1021/mp400502y.

29. Haugland RP. Antibody conjugates for cell biology. *Curr Protoc Cell Biol*. 2000;6:16.15.1–16.15.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb1605s00.

Информация об авторах:

Моисеева Екатерина Олеговна, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Кожевникова Дарья Дмитриевна, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Сергеев Игорь Сергеевич, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Блиндман Мария Александровна, аспирант, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий»;

Заборова Ольга Владимировна, к.х.н., старший научный сотрудник, химический факультет, ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

Чернышев Василий Сергеевич, к.т.н., заведующий лабораторией, ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России;

Яковлев Александр Александрович, д.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»;

Горин Дмитрий Александрович, д.х.н., профессор, Сколковский институт науки и технологий;

Яценко Алексей Михайлович, д.ф.-м.н., доцент, АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий».

Authors information:

Ekaterina O. Moiseeva, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Daria D. Kozhevnikova, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Igor S. Sergeev, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Maria A. Blindman, PhD student, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Olga V. Zaborova, PhD (Chem.), Senior Researcher, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University;

Vasiliy S. Chernyshev, PhD (Tech.), Head of Laboratory, Academician V. I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology;

Alexander A. Yakovlev, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences;

Dmitry A. Gorin, Dr. Sci. (Chem.), Professor, Skolkovo Institute of Science and Technology;

Alexey M. Yashchenok, Dr. Sci. (Phys.-Math.), Associate Professor, Skolkovo Institute of Science and Technology.

ПРИРОДНЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ ЭКЗОСОМЫ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ НАНОМЕДИЦИНЫ

Полищук А. Г., Якубович Е. И., Евтушенко В. И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Полищук Анна Генриховна,
ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова»
Минздрава России,
ул. Ленинградская, 70, пос. Песочный,
Санкт-Петербург, Россия, 197758.
E-mail: polischouka@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 26.12.2024
и принята к печати 15.01.2025*

Резюме

Экзосомы представляют собой сферические внеклеточные нановезикулы эндосомального происхождения, функция которых заключается в инкапсулировании части содержимого родительских клеток, продуцирующих их, и транспортировке этого содержимого к целевым клеткам-реципиентам с помощью биологических жидкостей. Благодаря своим свойствам экзосомы рассматриваются как потенциальные биологические системы доставки лекарственных препаратов (ЛП) в клетки-мишени. Для медицинских целей экзосомы выделяются из различных природных источников. Использование каждого типа экзосом в терапевтических целях имеет свои преимущества, но и сопряжено в той или иной степени с рядом биологических (стабильность, иммуногенность, токсичность) и технических (масштабирование производства, стандартизация выделения, загрузка ЛП) проблем. Экзосомы, полученные из клеток человека, имеют значительный потенциал в качестве средств доставки ЛП благодаря своему эндогенному происхождению. Однако одновременно с доставкой ЛП экзосомы человека могут переносить потенциально опасные биомолекулы. Экзосомы молока сельскохозяйственных животных и экзосомоподобные везикулы, продуцируемые растениями, имеют сами по себе огромный терапевтический потенциал и безопасны в качестве средств доставки ЛП. Однако данные об их воздействии на организм человека ограничены. Искусственные экзосомы, созданные с помощью нанобиотехнологий, позволяют преодолеть многие из технических ограничений, присущих природным экзосомам. В обзоре обсуждаются сильные стороны и ограничения разных типов природных и искусственных экзосом как наноносителей для доставки ЛП, а также проблемы, связанные с их внедрением в клиническую практику.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, внеклеточные экзосомоподобные везикулы растительного происхождения, нановезикулы, тени эритроцитов, экзосомы, экзосомы молока, эритроциты

Для цитирования: Полищук А.Г., Якубович Е.И., Евтушенко В.И. Природные и искусственные экзосомы для трансляционной наномедицины. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 80-93. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-80-93. EDN: YICJVA

NATURAL AND ARTIFICIAL EXOSOMES FOR TRANSLATIONAL NANOMEDICINE

Anna G. Polischouk, Elena I. Yakubovich, Vladimir I. Evtushenko

Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Anna G. Polischouk,
Granov Russian Research Center of
Radiology and Surgical Technologies,
Leningradskaya str., 70, Pesochnyy, Saint
Petersburg, Russia, 197758.
E-mail: polischouka@mail.ru

Received 26 December 2024; accepted
15 January 2025

Abstract

Exosomes are spherical extracellular nanovesicles of endosomal origin, whose function is to encapsulate part of the contents of the parent cells producing them and transport this content to the target recipient cells using biological fluids. Due to their properties, exosomes are considered as potential biological drug delivery systems. For medical purposes, exosomes are isolated from various natural sources. The use of each type of exosome for therapeutic purposes has its advantages and is associated to varying degrees with several biological (stability, immunogenicity, toxicity) and technical (production scaling-up, standardization of isolation protocols, drug loading) problems. Exosomes derived from human cells have significant potential as therapeutic drug (TD) delivery vehicles due to their endogenous origin. However, simultaneously with the delivery of TD, they can carry potentially dangerous biomolecules. Farm animal milk-derived exosomes and exosome-like plant-derived extracellular vesicles have enormous therapeutic potential in themselves and are safe as drug delivery vehicles. However, data on their effects on the human body are limited. Artificial exosomes created with the help of nanobiotechnology can overcome many of the technical limitations inherent in natural exosomes. The review discusses the strengths and limitations of different types of natural and artificial exosomes as drug delivery nanocarriers, as well as challenges associated with their implementation in clinical practice.

Key words: erythrocytes, erythrocyte ghosts, exosomes, extracellular exosome-like plant-derived vesicles, extracellular vesicles, milk-derived exosomes, nanovesicles

For citation: Polischouk AG, Yakubovich EI, Evtushenko VI. Natural and artificial exosomes for translational nanomedicine. Translational Medicine. 2025; 12(1): 80-93. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-80-93. EDN: YICJVA

Сокращения: ВВРП — внеклеточные везикулы растительного происхождения, ВНВ — внеклеточные везикулы, ЛП — лекарственные препараты, МЭКС — экзосомы молока, НВ — нановезикулы, НЭ — наноэритросомы, ОП — осаждение полимерами, УФ — ультрафильтрация, УЦ — ультрацентрифугирование, ЭКС — экзосомы, ЭКСП-нв — экзосомоподобные нановезикулы растений, ЭХ — эксклюзионная хроматография.

Введение

Внеклеточные везикулы (ВНВ) стали предметом исследований с 1983 года, когда было обнаружено их высвобождение из ретикулоцитов овцы во время культивирования клеток *in vitro* [1]. Последующие исследования показали, что ВНВ можно получить из клеток, тканей или жидкостей организма почти всех видов млекопитающих. ВНВ представляют собой гетерогенную группу мембранных структур,

в которой популяции различаются по биогенезу и размеру: экзосомы (30–150 нм) — везикулы эндосомального происхождения; микровезикулы (от 50–500 до 1000 нм) — везикулы, отпочковывающиеся от плазматической мембраны; апоптотические тельца (> 1000 нм) — везикулы, образующиеся в результате гибели клеток. Экзосомы (ЭКС), внеклеточные сферические нановезикулы эндосомального происхождения, обладают однослойной структурой липидного бислоя и содержат клеточные компоненты, ответственные за уникальную биологическую функцию исходной (донорской) клетки (рис. 1).

Молекулярный состав ЭКС включает различные растворимые белки, липиды, нуклеиновые кислоты, локализующиеся в везикулярной полости (cargo), ряд интегринов, встроенных в фосфолипидную мембрану, а также органеллы, такие как митохондрии [2, 3]. Состав биомолекул, содержащихся в ЭКС, зависит от состояния и происхождения клетки, секретирующей их. Функция ЭКС заключается в инкапсуляции части содержимого родительских клеток, продуцирующих ЭКС, для транспортировки его через биологические жидкости и к целевому органу-реципиенту.

Перенос биологически активных молекул из клеток-доноров в клетки-реципиенты, ЭКС играют решающую роль в межклеточной коммуникации. Многие исследования показали, что ЭКС, полученные из опухолевых клеток, способствуют формированию предметастатического микроокружения, росту и прогрессированию опухоли, иммунной супрессии, ангиогенезу, антиапоптотической передаче сигналов и увеличению лекарственной устойчивости [2]. Литературные данные позволяют предположить, что ингибирование процессов синтеза, высвобождения и поглощения ЭКС, полученных из опухолевых клеток, может использоваться в целях терапии рака.

Целью настоящего обзора было описание научных достижений в области получения и исследования свойств внеклеточных везикул, а также рассмотрение областей их практического применения в биомедицине. Задачей данной работы стало описание и сопоставление требований, предъявляемых к носителям, способам адресной доставки наноконъюгатов к биологическим мишеням, выделение преимуществ применения противоопухолевых средств в составе наноконъюгатов на основе внеклеточных везикул. Отдельной задачей явилось

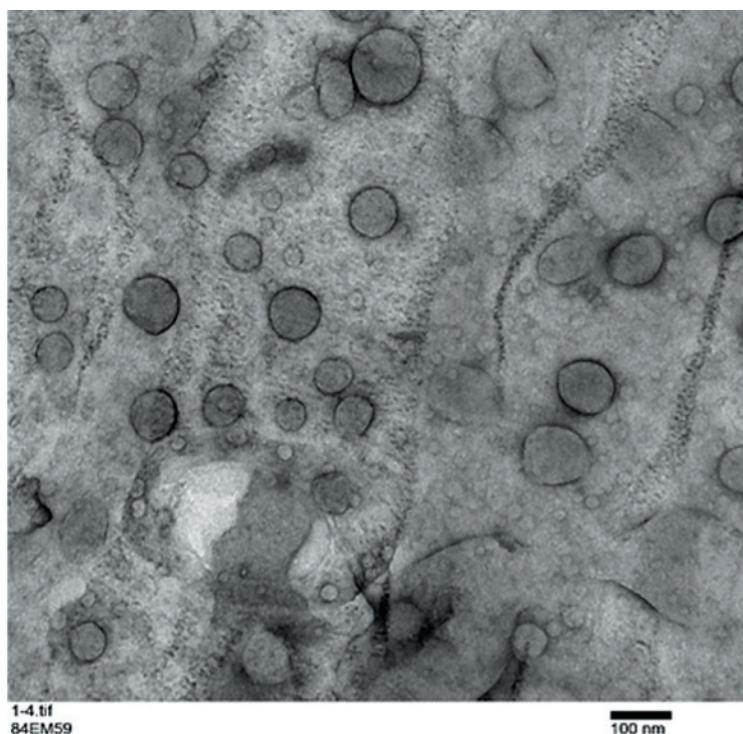


Рис. 1. Экзосомы, выделенные из кондиционной среды клеток поджелудочной железы CRL-4023. Электронная просвечивающая микроскопия. Длина масштабной линии соответствует 100 нм

Figure 1. Exosomes isolated from cell culture conditioned medium from CRL-4023 pancreatic cells. Electron transmission microscopy. The length of the scale line corresponds to 100 nm

обобщение имеющихся на настоящий момент проблем, связанных с применением внеклеточных везикул в биомедицине.

Экзосомы как средства доставки терапевтических молекул

Благодаря своей структуре и эндогенному происхождению, экзосомы имеют значительный потенциал в качестве средств доставки лекарственных средств. Они эффективно перемещаются по организму, биосовместимы, стабильны в кровотоке, обладают низкой иммуногенностью, нетоксичны и могут быть сконструированы для доставки мишень-специфических молекул путем манипулирования их молекулярным содержимым (cargo).

Загрузка экзосом лекарственными препаратами

Лекарственные препараты (ЛП) — это биологически активные соединения, которые часто обладают низкой растворимостью в воде, низкой селективностью распределения к специфическим органам, быстрой деградацией, токсичностью (накоплением в здоровых тканях) и плохой способностью проникать в клетки. В многочисленных

работах сообщалось, что ЭКС хорошо защищают введенные препараты от воздействия окружающей среды, повышая их эффективность, а также улучшают их направленную доставку и проникновение в клетки реципиента [4, 5]. Также было замечено, что, благодаря своей уникальной мембранной структуре и размеру, ЭКС легко проходят через биологический барьер и могут частично избегать иммунного ответа [4]. Однако для загрузки ЛП в существующие стабильные структуры требуются определенные стратегии. На рисунке 2 представлена схема доставки ЛП к злокачественным образованиям с использованием ЭКС. Экзосомы, нановезикулы, секретлируемые клетками, транспортируют лекарства, активно или пассивно в них загруженные, к целевым тканям и органам.

Самым простым методом загрузки ЛП является совместная инкубация лекарственного средства и ЭКС, при этом ЛП диффундирует через мембраны экзосом благодаря градиенту концентрации. Метод позволяет загружать небольшие гидрофобные молекулы (например, куркумин и паклитаксел). Коэффициент пассивной загрузки ЛП низкий (около 1%), и загрузка занимает много времени [4]. Кроме того, этот метод неприменим к гидро-

Природные источники экзосом

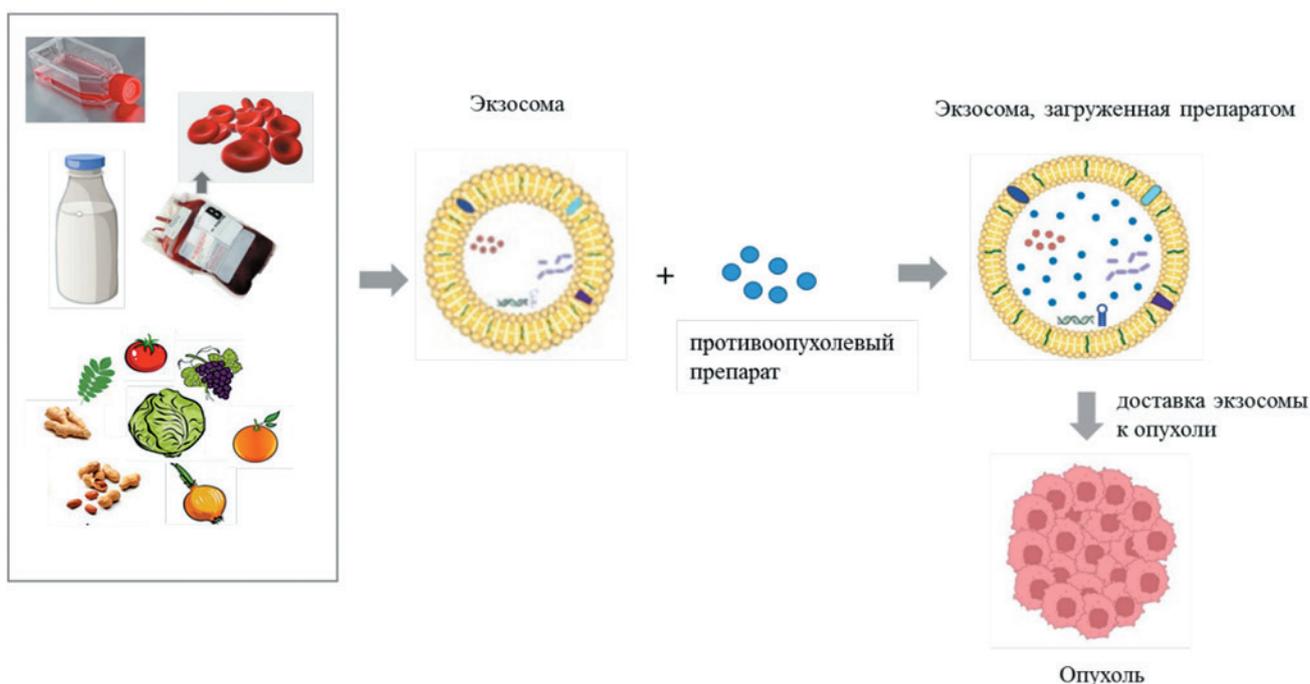


Рис. 2. Схема доставки противоопухолевых препаратов к опухоли с помощью экзосом, выделенных из природных источников

Figure 2. A scheme for the delivery of antitumor drugs to a tumor using exosomes isolated from natural sources

фильным соединениям. В связи с этими проблемами наиболее часто используются методы активной загрузки ЛП в ЭКС, к которым относятся физико-химические методы — соникация, электропорация, экструзия, многократные циклы заморозки, пермеабиллизация сапонином и методы генной инженерии [5, 6]. Принцип загрузки ЛП посредством обработки ультразвуком основан на нарушении целостности мембраны ЭКС под воздействием ультразвуковых волн, что облегчает диффузию ЛП. Этот метод совместим с гидрофильными препаратами и позволяет достичь коэффициента загрузки, близкого к 30 %. Недостатками метода являются процессы агрегации ЭКС и разрушение их мембран. Оба процесса влияют на иммунную толерантность полученных нановезикул. Кроме того, хотя с помощью ультразвукового воздействия ЛП могут проникать внутрь ЭКС, в основном они абсорбируются на поверхности ЭКС [6]. При электропорации кратковременные электрические импульсы создают микропоры в липидной бислоидной мембране, что позволяет химическим веществам проникать внутрь. В этой процедуре размер поглощенной молекулы определяет, сможет ли она успешно проникнуть в ЭКС. ЭКС сохраняет свою морфологию, если поглощенные молекулы превышают размер пор; в противном случае ЭКС могут разбухнуть, а их мембрана — разорваться. Электропорация — это быстрый метод с высокой производительностью (до 60 %). Недостатками метода являются значительная потеря целостности мембраны и разрушение молекул белков. Циклический метод замораживания-оттаивания основан на совместной инкубации ЛП и ЭКС и использует преимущества процесса разрушения и перестройки мембранной структуры ЭКС в буфере для загрузки. Мембрана ЭКС при замораживании разрушается из-за образования кристаллов льда, что позволяет гидрофильным веществам проникать внутрь до восстановления мембраны, а после оттаивания кристаллы льда исчезают, а мембрана ЭКС претерпевает реконструкцию и инкапсулирует ЛП. Загрузка ЛП при помощи сапонины использует его способность открывать поры липидной мембраны удалением из нее холестерина. К недостаткам сапонинов относится их потенциальный цитотоксический эффект. Еще одним перспективным методом загрузки ЛП является метод экструзии, при котором лекарственное средство и ЭКС продавливаются вместе через мембрану с размерами пор от 400 до 100 нм. В ходе этого процесса мембрана ЭКС разрушается, а затем вновь формируется, заключая молекулы ЛП в образующиеся нановезикулы. Кроме того, для загрузки нуклеиновых кислот исполь-

зуются метод трансфекции и методы, основанные на sequence-специфических взаимодействиях. Для загрузки белков применяются методы трансфекции векторами, сконструированными либо для обеспечения повышенной экспрессии целевого белка, либо для увеличения специфичности его доставки [7]. Эффективность загрузки ЛП в ЭКС колеблется для одного и того же метода загрузки в широком диапазоне. Объясняется это разными типами клеток, используемых в экспериментах, разными загружаемыми препаратами, разными индивидуальными протоколами экспериментов, а также сложностью количественного определения ЭКС и оценки того, инкапсулирован препарат или абсорбирован [4–6].

Проблемы производительности выделения экзосом

Кроме проблемы эффективности загрузки ЛП, существует ряд проблем, связанных с производством и очисткой ЭКС. Одной из основных проблем является низкая производительность получения ЭКС. Как правило, одна клетка выделяет всего ~50 ЭКС/мин [8, 9], поэтому для получения клинически значимого количества ЭКС требуется большое количество клеток и длительный период культивирования. Для улучшения продуктивности получения ЭКС было предложено использовать биореакторы или воздействие на клетки физическими либо химическими методами. Использование биореакторов, которые представляют собой трехмерные динамические системы культивирования клеток, повышает выход ЭКС на порядок [11]. Однако это количественное улучшение происходит в ущерб качеству, поскольку получаются везикулы большого размера. При воздействии на родительские клетки стрессами (гипоксия, низкий уровень рН, лекарственные препараты и т. д.) количество продуцируемых ими ЭКС также значительно увеличивается [11]. К сожалению, было продемонстрировано, что в условиях стресса изменяется молекулярный состав как внутри, так и на поверхности ЭКС [12]. Кроме того, стресс увеличивает контаминацию препаратов ЭКС другими везикулами, такими как апоптотические тельца.

Top-down-стратегия для увеличения производительности выделения экзосом

Top-down-стратегия заключается в том, что нечто большое разбивается на элементы меньшего размера. Так, нановезикулы (НВ) получают через разрушение мембран клеток. НВ формируются затем в результате процесса самосборки частей разрушенной мембраны. Полученные таким образом НВ имитируют биологическую сложность

природных ЭКС, но обладают меньшей гетерогенностью. При этом их количество значительно превышает количество ЭКС, полученное из одного и того же количества исходного материала. Были предложены различные методы с использованием top-down-стратегии: фильтрация, микрофлюидные устройства, азотная кавитация, соникация и экструзия. Экструзия — это технология получения НВ продавливанием суспензии клеток через мембранный фильтр с определенным размером пор (рис. 3). Последовательная экструзия через поликарбонатные мембранные фильтры с уменьшающимися размерами пор широко используется для получения НВ. Различные параметры процедуры экструзии, такие как приложенное давление, количество циклов и размер пор, температура и др., влияют на средний диаметр и распределение по размерам (полидисперсность) получаемых НВ [13].

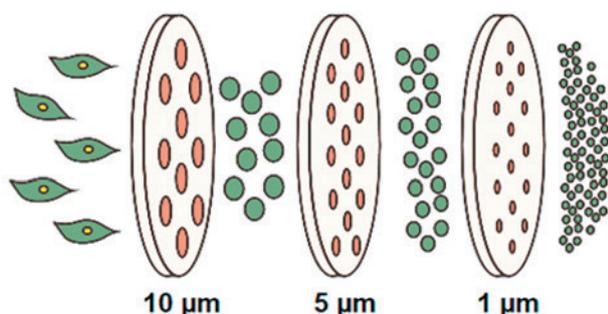


Рис. 3. Принцип получения НВ методом экструзии

Figure 3. The principle of obtaining nanovesicles by extrusion

Пример использования метода экструзии для получения НВ показан в работе Jang и соавторов. В этом исследовании НВ получали из монобластных клеток U937 человека и мышинных макрофагов Raw264.7 путем экструзии через фильтры с диаметром пор 10 мкм, 5 мкм и 1 мкм с последующим центрифугированием в градиенте плотности при 100 000 g [14]. Авторы сообщили, что полученные НВ похожи на природные ЭКС с точки зрения морфологии, размера, белковых маркеров, а также противоопухолевой эффективности после их загрузки химиотерапевтическими препаратами. Выход НВ значительно превышал (в 100 раз) таковой ЭКС. Эта исследовательская группа создала НВ из различных клеток и сообщила об их различных применениях. В том числе о том, что НВ из эмбриональных стволовых клеток могут усиливать пролиферацию клеток; НВ, полученные из мышинных фибробластов NIH3T3, могут быть использованы для эффективной доставки мРНК; НВ,

полученные из фибробластов NIH3T3 и β -клеток поджелудочной железы MIN6, могут индуцировать дифференцировку *in vivo* клеток, продуцирующих инсулин; НВ, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, могут применяться для доставки лекарств к опухолям молочной железы или для лечения повреждений спинного мозга.

Проблемы выделения и очистки экзосом

Другая проблема связана с отсутствием метода выделения ЭКС, который бы сочетал в себе все характеристики, необходимые для получения функционально активных ЭКС в производственных масштабах. Классический метод выделения ЭКС основан на ультрацентрифугировании (УЦ). Однако при УЦ препараты ЭКС загрязняются липопротеинами, что обусловлено схожестью их размеров и плотности с ЭКС. Кроме того, ЭКС часто агрегируют в условиях экстремальных физических нагрузок [15]. Другие методы выделения ЭКС, такие как эксклюзионная хроматография (ЭХ), ультрафильтрация (УФ) или осаждение полимерами (ОП), более приспособлены для крупномасштабного производства ЭКС, но и они имеют недостатки: ЭХ — низкая производительность, высокое разбавление образцов; УФ — низкая чистота; ОП — низкая чистота, сильная агрегация ЭКС. Недавняя техническая эволюция методов выделения ЭКС связана с микрофлюидикой [16]. Имеющиеся в продаже наборы для выделения ЭКС обеспечивают удобный и простой метод выделения, но обычно имеют низкий уровень чистоты препаратов ЭКС и используются для выделения ЭКС в небольших масштабах. Однако некоторые производители утверждают, что их наборы значительно превосходят по качеству имеющиеся на сегодняшний день технологии выделения ЭКС. Например, набор ExoQuick® ULTRA EV Isolation System от System Biosciences 9 (технология осаждения ЭКС полимерами), в соответствии с описанием производителя, обеспечивает в 400 раз больший выход ЭКС по сравнению с УЦ, высокий уровень чистоты и эффективное выявление биомаркеров ЭКС. Набор позволяет изолировать ЭКС менее чем за 20 мин. [17]. Эти характеристики метода могли бы сделать его пригодным для промышленного производства, если бы его можно было соответствующим образом масштабировать. Надо учесть, однако, что существенным недостатком всех коммерческих наборов является их высокая стоимость.

Еще одна проблема связана с тем, что состав и размер ЭКС зависят от метода выделения. Это может быть объяснено метод-зависимым обогащением препаратов экзосомами различных субпо-

пуляций, контаминирующими молекулами или разными белками, адсорбирующимися на поверхности ЭКС в процессе их выделения/очистки [18].

Таким образом, необходима оптимизация методов выделения ЭКС для сохранения их свойств, повышения производительности и снижения риска побочных эффектов, вызванных контаминирующими молекулами или специфическими субпопуляциями.

Природные источники нановезикул

Эритроциты

Интерес к использованию эритроцитов для доставки лекарств объясняется наличием у них ряда преимуществ по сравнению с существующим арсеналом способов и систем доставки ЛП [19, 20]. Во-первых, они присутствуют в кровотоке в большом количестве, что обеспечивает легкость получения и выделения значительного числа клеток и возможность масштабирования производства. Во-вторых, зрелые эритроциты лишены ядра и других органелл, что обеспечивает значительное внутриклеточное пространство для реагентов и делает процесс извлечения мембран и очистки более удобным. Эти клетки удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к системам доставки. Носители ЛП, полученные из эритроцитов, не вызывают токсических побочных эффектов, поскольку они биосовместимы. Старые или поврежденные эритроциты утилизируются естественным образом в селезенке (биodeградируемость). Также они характеризуются длительным временем циркуляции в кровотоке (время жизни лекарства в кровотоке определяется временем жизни нагруженных лекарством клеток) и снижением побочных эффектов препаратов (поскольку в кровотоке отсутствуют высокие пиковые концентрации свободного препарата).

В зависимости от вида препарата эритроцит может быть использован как носитель с постепенным высвобождением ЛП, как биореактор или как система направленной доставки препарата, в первую очередь к тканевым макрофагам, печени и селезенке [20]. В первом случае в эритроцит загружается препарат, способный медленно диффундировать сквозь клеточную мембрану в кровотоки, либо недиффундирующее пролекарство, которое в эритроците превращается в диффундирующие через мембрану активные компоненты, обладающие терапевтическим эффектом. Механизм работы эритроцитов-биореакторов основан на инкапсуляции в эритроцит ферментов, способных элиминировать токсические вещества и метаболиты, циркулирующие в кровотоке, при условии, что эти метаболиты-субстраты проникают внутрь эритроцита, нагруженного ферментом, где происходит их рас-

щепление на безопасные продукты. Эритроциты являются хорошим средством доставки лекарств к внутрисосудистым мишеням, но многие другие важные терапевтические мишени (например, солидные опухоли, внесосудистые компоненты тканей, ЦНС) обычно недоступны для эритроцитов [19]. Терапевтический препарат может быть включен внутрь эритроцита или связан с его поверхностью. Для инкапсуляции ЛП в эритроциты используются электропорация и гипотонический гемолиз. Гипотонический гемолиз демонстрирует большую эффективность инкапсуляции ЛП, чем электропорация [21]. В гипотонических растворах эритроциты набухают, образуя сферу, и увеличенные отверстия в мембранах позволяют проходить терапевтическим молекулам. Затем в изотонических буферах эритроциты возвращаются к своей обычной двояковогнутой форме, и поры мембраны закрываются. Этот новый подход потенциально может обеспечить замену ферментов, утраченных при определенных заболеваниях, таких, например, как митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефалопатия [22]. Иммобилизация терапевтических агентов на поверхности эритроцитов является многообещающим методом повышения стабильности взаимодействия клетки с лекарственным средством и может быть достигнута путем нековалентного связывания и ковалентной конъюгации. Нековалентная модификация поверхности включает адсорбцию терапевтических агентов на поверхности клеток посредством межмолекулярных водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, гидрофобного контакта или других взаимодействий [4]. Например, показано, что стабильность в крови прикрепленных к эритроцитам путем нековалентной адсорбции сферических наночастиц полистирола (диаметром 200 или 500 нм) увеличивается в 3 раза, а накопление в легких — в 7 раз по сравнению с неприсоединенными наночастицами [23]. Дальнейшее увеличение направленности доставки наночастиц достигалось присоединением антител против ICAM-1 на открытую поверхность наночастиц, которые были прикреплены к эритроцитам. Нековалентная модификация поверхности относительно проста, но обладает низкой стабильностью. Ковалентное связывание ЛП с мембраной клеток возможно, в свою очередь, поскольку большинство клеток имеют на своей поверхности функциональные группы, такие как тиолы, амины и остатки сиаловой кислоты, которые могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами посредством ковалентных связей. Преимущества этих функциональных групп в том, что они доступны для мечения и обладают низкой токсичностью.

N-гидроксисукцинимидные и N-гидроксисульфосукцинимидные сшивающие агенты являются наиболее распространенными реагентами для первичной модификации аминов с помощью карбодимидных реакций. Тиольные группы цистеинсодержащих мембранных белков могут быть соединены посредством конъюгации малеимид-тиол. С помощью ковалентного связывания, например, присоединяют гиперразветвленные полиглицерины к мембранам эритроцитов для дальнейшего их использования в целях клинической визуализации при мечении флуоресцентными маркерами [24].

Наноэритросомы

Из биомиметических носителей, созданных на основе клеток крови, наноэритросомы (НЭ), полученные из эритроцитов, обладают многими преимуществами с точки зрения биodeградации, профилей высвобождения ЛП и эффективности таргетной терапии [25, 26]. У НЭ очень высокое отношение площади поверхности к объему (~ в 80 раз выше, чем у родительских эритроцитов), что способствует увеличению времени их циркуляции в крови [26]. Размеры НЭ могут достигать 100 нм, и они могут перемещаться по организму, нагруженные ЛП в высокой дозировке [27, 28]. Для введения терапевтических агентов в эритроциты необходимо удалить гемоглобин и цитоплазматическое содержимое клеток с помощью опосредованного гипотоническим раствором лизиса (гемолиза). При этом образуются НВ, образованные слоями клеточной мембраны и лишённые компонентов цитозоля (ghosts) [26, 29]. Процесс удаления не должен разрушать плазматическую мембрану клеток, но должен позволять клеткам образовывать наноразмерные капсулы. Было подсчитано, что один эритроцит может быть фрагментирован на 4000–5000 НЭ [26, 29]. Для получения НЭ используется обработка ультразвуком, экструзия и электрические импульсы. Из этих способов экструзия является наиболее эффективным методом получения однородных по размерам НЭ с минимальной потерей клеток. Благодаря биомиметическим свойствам НЭ используются для инкапсуляции ферментов, пептидов, токсинов, генетических материалов и контрастных веществ [19, 26, 27]. Целесообразность использования НЭ в качестве носителей лекарственных средств для лечения заболеваний печени, селезенки, лимфатических узлов и различных видов опухолей оценивалась во многих исследованиях. Показано, что ЛП, конъюгированные с НЭ, увеличивают эффект терапевтического воздействия на опухоли [26, 28]. Насколько нам известно, ни одно лекарственное

средство с низкой молекулярной массой не было инкапсулировано непосредственно в НЭ без конъюгации.

Экзосомы молока сельскохозяйственных животных

Полученные из молока экзосомы (мЭКС) являются перспективными терапевтическими кандидатами благодаря своим уникальным свойствам и универсальным функциям. Они были впервые выявлены в 1971 году и интенсивно изучаются с 2007 года. В процессе изучения мЭКС на клеточных и животных моделях были продемонстрированы иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства мЭКС, их способность модулировать состав кишечной микробиоты, стимулировать заживление ран, а также омолаживающие эпителий свойства и способность защищать клетки кожи от повреждения ультрафиолетом [29]. Многочисленные исследования молекулярного состава мЭКС выявили, что эти везикулы чрезвычайно богаты информационными молекулами. Например, в одном исследовании показано, что мЭКС из коровьего молока содержат более 16 000 мРНК и более 800 микроРНК [30]. В другом — в мЭКС свиной было идентифицировано 176 известных и 315 новых микроРНК, а в молозиве крупного рогатого скота обнаружены повышенные уровни микроРНК, связанных с иммунитетом [31]. В мЭКС быка обнаружено более 2100 белков, многие из которых играют важную роль в регулировании процессов функционирования кишечника, клеточного роста и воспаления [32]. Еще одним уникальным свойством мЭКС является их устойчивость к низким pH, кипячению и замораживанию [33]. Гликопротеины XDH, BTN и MUC1 и поверхностные белки FLOT1, ICAM1, ALIX и EpCAM мЭКС делают их устойчивыми к пепсину [34]. Очевидно, что пероральное введение ЛП является предпочтительным методом по сравнению с внутримышечным, подкожным и внутривенным введением. Однако доставка ЛП при его пероральном введении сопряжена с огромными трудностями. Неблагоприятная среда желудочно-кишечного тракта, богатая желудочной кислотой и пищеварительными ферментами, затрудняет попадание лекарств в организм через желудок и приводит к их низкой биодоступности. Ожидается, что ЭКС молока станут новым средством пероральной доставки лекарств [35].

Компоненты молока состоят из трех основных фаз: жир, диспергированный в эмульсии «масло-в-воде» с образованием глобул молочного жира, казеины, организованные в мицеллы, и сывороточные белки [36]. мЭКС могут быть выделены из раз-

личных фаз молока, преимущественно из фракции молочной сыворотки. Однако мЭКС сложно характеризовать из-за отсутствия стандартизированных методов предварительной обработки молока, его хранения и выделения ЭКС [37]. В настоящее время для выделения мЭКС в основном используют ультрацентрифугирование (УЦ), эксклюзионную хроматографию и центрифугирование в градиенте плотности. УЦ является наиболее распространенным методом выделения мЭКС [38]. Экзосомы молока были исследованы в качестве носителей для различных лекарственных и биологических препаратов, включая противоопухолевые средства. Например, вводимый перорально паклитаксел, содержащийся в мЭКС, показал значительное ингибирование роста опухоли в ксенотрансплантах при раке легких с уменьшением системных и иммунологических побочных эффектов по сравнению с неинкапсулированным паклитакселом. мЭКС, содержащие доксорубицин, в сочетании с гиалуроновой кислотой индуцировали гибель опухолевых клеток молочной железы, а, будучи конъюгированными с доксорубицином посредством рН-расщепляемой связи, демонстрировали орган-селективное высвобождение лекарственных средств и ингибирующий эффект на клетки плоскоклеточного рака полости рта [39].

Таким образом, использование экзосом животного происхождения в качестве средства доставки ЛП имеет хорошую перспективу для применения в клинике. Но существуют опасения, связанные с безопасностью их применения. Есть доказательства того, что одновременно с доставкой терапевтических средств ЭКС человека могут доставлять потенциально опасные материалы, включая молекулы опухолевого происхождения [40], чужеродные нуклеиновые кислоты [41] и инфекционные агенты [42]. В этом плане внеклеточные везикулы растительного происхождения, обладая многими общими чертами с ЭКС человека, рассматриваются как более безопасные.

Экзосомоподобные нановезикулы растительного происхождения

Растения использовались на протяжении веков для лечения заболеваний либо целиком, либо в виде экстрактов активных соединений, таких как полисахариды, фенолы и терпеноиды. Тем не менее, только недавно исследователям удалось выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы из растительного сырья. Исследования показали, что экзосомоподобные нановезикулы (ЭКСПнв) из различных съедобных растений (грейпфрута, имбиря, винограда, моркови и др.) имеют проти-

вовоспалительное, противоопухолевое, антибактериальное, противогрибковое и антиоксидантное действие [43]. Они оказывают эти эффекты с помощью различных механизмов, таких как регуляция генной экспрессии, влияние на микробиоту кишечника, изменение активности макрофагов, и действия специфических биоактивных соединений [44]. Нановезикулы растительного происхождения по определению обладают высоким уровнем биосовместимости, поскольку они содержатся в потребляемых в настоящее время пищевых продуктах. По сравнению с наноносителями, изготовленными химическим путем, растительные ЭКСПнв неиммуногенны и нетоксичны, могут проходить через гематоэнцефалический барьер и, что удивительно, доставлять лекарства беременной матери, не оказывая влияния на плод [45]. У ЭКСПнв есть еще одно преимущество: их можно получать непрерывно и непосредственно из свежих фруктов и овощей, не прибегая к гигантским клеточным фабрикам, таким, как те, которые необходимы для получения ЭКС из клеток человека. Причем ЭКСПнв могут быть получены из различных частей растения: из его сока, мякоти, корней или семян, а также из высушенного растительного сырья [45].

Так же, как и ЭКС животного происхождения, внеклеточные везикулы растительного происхождения (ВВРП) представляют собой мембранные структуры из липидных бислоев, в полости которых содержатся белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Отличительная особенность ВВРП заключается в том, что они содержат ряд антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион, супероксиддисмутаза-1, каталаза и др.) и вторичные метаболиты, такие как флавоноиды, хлорофиллы и куркуминоиды (в зависимости от происхождения и вида растения) [46]. Размеры ВВРП схожи с размерами ЭКС животного происхождения и обычно колеблются в пределах 30–500 нм, при этом везикулы, выделенные из моркови, достигают 1500 нм. ВВРП могут иметь сферическую, овальную или чашеобразную форму и отрицательный поверхностный заряд, в зависимости от вида растения и процедуры экстракции. ВВРП проявляют высокий уровень стабильности в различных условиях окружающей среды и способны противостоять разрушению под действием определенных пищеварительных ферментов [47].

Исследования ВВРП в первую очередь сосредоточены на их терапевтическом потенциале при лечении заболеваний. Данные свидетельствуют о том, что ВВРП играют важную роль в поддержании кишечного гомеостаза. Например, было показано, что нановезикулы (НВ) из винограда способны мигрировать через кишечный барьер и стимулиро-

вать пролиферацию стволовых клеток кишечника [48]. В том же исследовании было установлено, что у мышей, которых кормили виноградными НВ, снижался уровень смертности и прогрессирование колита, вызванного декстран сульфатом натрия (ДСН). ВВРП могут также изменять микробный состав кишечника. Например, введение мышам НВ, полученных из имбиря, приводит к увеличению популяции кишечной микрофлоры *Lactobacillaceae* и *Bacteroidaceae*, в то время как популяция *Clostridaceae* снижается [49]. В других исследованиях продемонстрированы противоопухолевые свойства ВВРП. ЭКСПнв из цитрусовых, лимона и винограда в разной степени ингибируют рост клеточных линий A375 (меланома), A549 (аденокарцинома легких) и MCF-7 (рак молочной железы) [50]. ЭКСПнв чайных цветков после внутривенной инъекции или перорального приема накапливаются в опухолях молочной железы и метастазах в легких, подавляют рост и распространение рака молочной железы [51]. ЭКСПнв, полученные из лимона, также могут специфически достигать места опухоли и активировать апоптотический процесс, опосредованный TRAIL, подавляя хронический миелоидный лейкоз *in vivo* [52]. ВВРП могут оказывать непосредственное влияние на иммунную систему [43]. Также продемонстрированы регенеративные свойства ВВРП. Так *in vitro* тесты на заживление ран показали, что ЭКСПнв из aloe vera могут усиливать миграцию кератиноцитов и фибробластов к месту раны, что указывает на их потенциал для терапии регенерации кожи [53].

Помимо того, что ЭКСПнв могут использоваться в целях терапии заболеваний сами по себе, поскольку переносят свои собственные биоактивные молекулы к органам-мишеням, они также могут применяться в качестве систем доставки ЛП [43–45]. Например, было продемонстрировано, что химиотерапевтические препараты, такие как паклитаксел, могут быть доставлены к опухолям толстой кишки с помощью ЭКСПнв из грейпфрута [54]. ЭКСПнв из грейпфрута, загруженные микроРНК miR18a, вызывают ингибирование развития метастазов в печени, а загруженные противовоспалительным препаратом метотрексатом — усиливают терапевтический эффект при колите мышей, вызванном декстран сульфатом натрия, по сравнению с ЛП в свободной форме. В другом исследовании ЭКСПнв из грейпфрута, загруженные доксорубицином или куркумином, были покрыты мембранами активированных лейкоцитов, что обеспечило эффективную доставку этих препаратов к очагам воспаления, что, в свою очередь, приводило к ингибированию роста опухолей толстой кишки и молочной железы, а также

к терапевтическому эффекту при колите, вызванном ДСН [55]. Аналогичным образом, результаты другого исследования показывают, что везикулы, полученные из грейпфрута, могут доставлять ДНК и белки, включая антитела, к клеткам-мишеням, не вызывая цитотоксической реакции. Например, ЭКСПнв, выделенные из грейпфрута и покрытые фолиевой кислотой, увеличивали таргетность доставки микроРНК miR17 (одной из мишеней miR17 являются молекулы главного комплекса гистосовместимости первого типа (МНС-1), экспрессирующиеся опухолевыми клетками) к GL-26 (фолатный рецептор) позитивным опухолям головного мозга мышей. У мышей, которым интраназально вводили этот конструктор, рост опухоли головного мозга замедлялся [56]. ЭКСПнв могут не только транспортировать различные молекулы препаратов для терапии клинических заболеваний, но и служить переносчиками для лечения заболеваний растений, вызванных грибковыми инфекциями. Например, ЭКСПнв, экстрагированные из листьев тропического растения семейства молочаевых Филлантуса нирури (лат. *Phyllanthus niruri*), при нагревании после смешивания с раствором AgNO₃, показали эффективность в лечении рака цитрусовых, вызванного бактерией *Xanthomonas axonopodis pv.allii* [44]. Эти исследования подчеркивают потенциал применения ЭКСПнв в качестве носителей ЛП.

Хотя ЭКСПнв обладают многочисленными преимуществами и потенциалом для применения в будущем, существует множество причин, по которым они еще не используются в широких масштабах. Эти причины включают в себя не только технические проблемы, связанные с их выделением и масштабированием производства, но и пробелы в знаниях, которые пока остаются в этой области. Одной из основных проблем (как и в случае с экзосомами животного происхождения) является стандартизация протокола выделения ЭКСПнв. В настоящее время нет единого идеального способа выделения ЭКСПнв, в том числе и с учетом возможности крупномасштабного промышленного производства. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, поэтому их использование и актуальность зависят от их последующего применения. Для выделения ЭКСПнв используются ультрацентрифугирование (УЦ), ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, фильтрация, осаждение полиэтиленгликолем и эксклюзионная хроматография. Если разделить эти методы на две основные категории, в зависимости от начального этапа выделения ЭКСПнв, то в большинстве исследований (примерно в 60 %) используется центрифугирование в градиенте плотности,

в то время как остальные 40 % базируются на дифференциальном центрифугировании/фильтрации/ультрацентрифугировании [44]. УЦ в градиенте плотности сахарозы является наиболее часто используемым методом, который позволяет получать ЭКСПнв с высоким уровнем чистоты. Однако это довольно трудоемкий процесс, который занимает значительное время. Кроме того, это один из наиболее дорогостоящих методов выделения. В настоящее время его коммерческая жизнеспособность не кажется многообещающей, поскольку данный метод очень трудно масштабировать, не говоря уже о том, что его воспроизводимость невысока и зависит от условий центрифугирования, включая тип используемого ротора. Осаждение полиэтиленгликолем (ПЭГ) — это неспецифичный метод выделения ЭКСПнв. Хотя он и обеспечивает относительно низкие уровни выхода и чистоты, метод достаточно прост в эксплуатации, характеризуясь при этом экономичностью и высокой скоростью выделения. Его коммерческая жизнеспособность может быть многообещающей, если удастся повысить уровень выхода и сочетать его с экономически выгодными методами дополнительной очистки осажденных ПЭГом ЭКСПнв. Эксклюзионная хроматография является одним из лучших методов выделения, поскольку она обеспечивает очень высокий уровень выхода при относительно высоком уровне чистоты, а также высокий уровень функциональной биологической активности ЭКСПнв. Однако метод чрезвычайно трудоемкий, что делает его коммерческую жизнеспособность маловероятной, если только не удастся его эффективно масштабировать.

Второй большой проблемой являются пробелы в знаниях о составе и структурных особенностях ЭКСПнв. Как, известно, большинство методов обнаружения ЭКС основаны на белковых маркерах ЭКС. В клетках млекопитающих тетраспонины CD63, CD81 и CD9 являются одними из наиболее распространенных маркеров экзосом, в то время как везикулы бактерий могут быть идентифицированы с помощью таких маркеров, как белок внешней мембраны A (OmpA) и липотейхоевая кислота. Тем не менее, существует значительно меньше информации о маркерных белках растительных везикул [57]. В одном исследовании изучалось наличие поверхностных белков на везикулах, полученных из цитрусовых, и удалось успешно идентифицировать некоторые распространенные белки-маркеры, в том числе белки, подобные пателлину-3, и белки с тяжелой цепью клатрина [58]. Однако в других работах были получены противоречивые результаты, поэтому необходимы дополнительные исследования по данному вопросу.

Заключение

В настоящем обзоре были детально рассмотрены научные достижения в области получения и исследования свойств везикул, механизмов их действия и практического применения таких структур в биомедицине. Было показано, что экзосомы, полученные из клеток человека, могут стабильно и направленно доставлять лекарственные препараты в клетки-мишени, вызывая желаемый терапевтический эффект. Были рассмотрены основные требования, предъявляемые к носителям, способам адресной доставки наноконъюгатов к биологическим мишеням. Выделены ограничивающие факторы применения вышеописанных структур, обусловленные их биологической сущностью, такие как высокая иммуногенность и потенциальный риск переноса опасных биомолекул. Отдельно было показано, что искусственные экзосомы имеют коммерческие преимущества благодаря своей высокой производительности. Можно сделать вывод о том, что искусственные аналоги экзосомоподобных нановезикул растительного происхождения и экзосом молока сельскохозяйственных животных обладают множеством преимуществ, таких как низкая иммуногенность, стабильность в желудочно-кишечном тракте и возможность широкомасштабного производства. Однако их использование на сегодняшний день ограничено недостатком фактических данных о воздействии экзогенных экзосом на организм человека и/или методов их характеристики.

Таким образом, выбор наиболее подходящих для доставки лекарств наноносителей экзосомального типа будет зависеть от того, насколько успешно будут преодолены ограничения, связанные с каждым типом экзосом, а также решены общие для всех видов экзосом проблемы технологического плана, такие как стандартизация методов выделения и очистки экзосом, пригодных для массового производства, контроль качества и совершенствование методов загрузки лекарственных препаратов.

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование финансировалось в рамках государственного задания Минздрава РФ № 124021600040–2. / The study was funded under the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 124021600040–2.

Список литературы / References

- Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–978. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- Von Schulze A, Deng F. A review on exosome-based cancer therapy. *J Cancer Metastasis Treat*. 2020;6:42. DOI:10.20517/2394-4722.2020.79.
- Gomzikova MO, James V, Rizvanov AA. Mitochondria Donation by Mesenchymal Stem Cells: Current Understanding and Mitochondria Transplantation Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 7;9:653322. DOI: 10.3389/fcell.2021.653322.
- Poinsot V, Pizzinat N, Ong-Meang V. Engineered and Mimicked Extracellular Nanovesicles for Therapeutic Delivery. *Nanomaterials (Basel)*. 2024 Apr 6;14(7):639. DOI: 10.3390/nano14070639.
- Liu C, Su C. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics*. 2019 Jan 30;9(4):1015–1028. DOI: 10.7150/thno.30853.
- Donoso-Quezada J, Ayala-Mar S, González-Valdez J. State-of-the-art exosome loading and functionalization techniques for enhanced therapeutics: a review. *Crit Rev Biotechnol*. 2020 Sep;40(6):804–820. DOI: 10.1080/07388551.2020.1785385.
- Ferguson SW, Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release*. 2016 Apr 28;228:179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.02.037.
- Caradec J, Kharmate G, Hosseini-Beheshti E, et al. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clin Biochem*. 2014 Sep;47(13–14):1286–1292. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011.
- Wen Y, Chen Y, Wang G, et al. Factors influencing the measurement of the secretion rate of extracellular vesicles. *Analyst*. 2020 Aug 24;145(17):5870–5877. DOI: 10.1039/d0an01199a.
- Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Mol Ther*. 2018 Dec 5;26(12):2838–2847. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.09.015.
- Syromiatnikova V, Prokopenko A, Gomzikova M. Methods of the Large-Scale Production of Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 10;23(18):10522. DOI: 10.3390/ijms231810522.
- Harmati M, Tarnai Z, Decsi G, et al. Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells. *J Oral Pathol Med*. 2017 Apr;46(4):259–266. DOI: 10.1111/jop.12486.
- Wen Y, Fu Q, Soliwoda A, Zhang S, et al. Cell-derived nanovesicles prepared by membrane extrusion are good substitutes for natural extracellular vesicles. *Extracell Vesicle*. 2022 Dec;1:100004. DOI: 10.1016/j.vesic.2022.100004.
- Jang SC, Kim OY, Yoon CM, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano*. 2013 Sep 24;7(9):7698–7710. DOI: 10.1021/nn402232g.
- Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biologicheskie membrany`=biological membranes*. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*. 2022;16(2):115–126. DOI: 10.1134/S1990747822030096. In Russian [Якубович Е.И., Полищук А.Г., Евтушенко В.И. Принципы и проблемы выделения экзосом из биологических жидкостей. *Биологические мембраны*. 2022;39(3):172–185].
- Wang J, Ma P, Kim DH, et al. Towards Microfluidic-Based Exosome Isolation and Detection for Tumor Therapy. *Nano Today*. 2021 Apr;37:101066. DOI: 10.1016/j.nantod.2020.101066.
- ExoQuick® ULTRA EV Isolation System. System Biosciences. Available from: <https://www.systembio.com/products/exosome-research/exosome-isolation/exoquick-ultra/serum-and-plasma-0/the-purest-and-highest-yielding-ev-isolation-system> (Accessed [10.12.2024]).
- Grigorieva AE, Dyrkheeva NS, Bryzgunova OE, et al. Contamination of exosome preparations isolated from biological fluids. *Biomedical chemistry*. 2017;63(1):91–96. In Russian [Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е. и др. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей. *Биомедицинская химия*. 2017;63(1):91–96]. DOI:10.18097/PBMC2017630191.
- Muzykantov VR. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010 Apr;7(4):403–27. DOI: 10.1517/17425241003610633.
- Koleva LD, Ataullakhanov FI, Sinauridze EI. Erythrocyte as an ideal carrier for intravascular drug delivery. *Voprosy` gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii=Issues of hematology/oncology and immunopathology in pediatrics*. 2020;19(4):234–242. In Russian [Колева Л.Д., Атауллаханов Ф.И., Синауридзе Е.И. Эритроцит как идеальный носитель для внутрисосудистой доставки лекарств. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2020;19(4):234–242]. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-4-234-242>.
- Bustamante López SC, Meissner KE. Characterization of carrier erythrocytes for biosensing applications. *J Biomed Opt*. 2017 Sep 1;22(9):91510. DOI: 10.1117/1.JBO.22.9.091510.
- Levene M, Bain MD, Moran NF, et al. Safety and Efficacy of Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase in Mitochondrial Neurogastrointestinal

Encephalomyopathy. *J Clin Med*. 2019 Apr 5;8(4):457. DOI: 10.3390/jcm8040457.

23. Anselmo AC, Gupta V, Zern BJ, et al. Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells. *ACS Nano*. 2013 Dec 23;7(12):11129–11137. DOI: 10.1021/nn404853z.

24. Rossi NA, Constantinescu I, Kainthan RK, et al. Red blood cell membrane grafting of multi-functional hyperbranched polyglycerols. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):4167–4178. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.137.

25. Pouliot R, Saint-Laurent A, Chypre C, et al. Spectroscopic characterization of nanoErythroosomes in the absence and presence of conjugated polyethyleneglycols: an FTIR and (31)P-NMR study. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Aug 31;1564(2):317–324. DOI: 10.1016/s0005-2736(02)00465-0.

26. Hu CM, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems. *Adv Healthc Mater*. 2012 Sep;1(5):537–547. DOI: 10.1002/adhm.201200138.

27. Kim SH, Kim EJ, Hou JH, et al. Oposonized erythrocyte ghosts for liver-targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):959–967. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.031.

28. Mishra PR, Jain NK. Folate conjugated doxorubicin-loaded membrane vesicles for improved cancer therapy. *Drug Deliv*. 2003 Oct-Dec;10(4):277–282. DOI: 10.1080/drd_10_4_277.

29. Gupta N, Patel B, Ahsan F. Nano-engineered erythrocyte ghosts as inhalational carriers for delivery of fasudil: preparation and characterization. *Pharm Res*. 2014 Jun;31(6):1553–1565. DOI: 10.1007/s11095-013-1261-7.

30. Barathan M, Ng SL, Lokanathan Y, et al. Milk-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Perspective on Comparative Therapeutics and Targeted Nanocarrier Application. *Vaccines (Basel)*. 2024 Nov 15;12(11):1282. DOI: 10.3390/vaccines12111282.

31. Ishikawa H, Rahman MM, Yamauchi M, et al. mRNA Profile in Milk Extracellular Vesicles from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *Viruses*. 2020 Jun 20;12(6):669. DOI: 10.3390/v12060669.

32. Li J, Shang X, Zhang S, et al. Breed-Related Differential microRNA Expression and Analysis of Colostrum and Mature Milk Exosomes in Bamei and Landrace Pigs. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 4;25(1):667. DOI: 10.3390/ijms25010667.

33. García-Martínez J, Pérez-Castillo ÍM, Salto R, et al. Beneficial Effects of Bovine Milk Exosomes in Metabolic Interorgan Cross-Talk. *Nutrients*. 2022 Mar 30;14(7):1442. DOI: 10.3390/nu14071442.

34. Adriano B, Cotto NM, Chauhan N, et al. Milk exosomes: Nature's abundant nanoplatform for theranostic applications. *Bioact Mater*. 2021 Feb 2;6(8):2479–2490. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.009.

35. Tian MY, Hao DX, Liu Y, et al. Milk exosomes: an oral drug delivery system with great application potential. *Food Funct*. 2023 Feb 6;14(3):1320–1337. DOI: 10.1039/d2fo02013k.

36. Roy D, Ye A, Moughan PJ, et al. Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species-A Review. *Front Nutr*. 2020 Oct 6;7:577759. DOI: 10.3389/fnut.2020.577759.

37. Wijenayake S, Eisha S, Tawhidi Z, et al. Comparison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk. *PLoS One*. 2021 Sep 30;16(9):e0257633. DOI: 10.1371/journal.pone.0257633.

38. Li X, Su L, Zhang X, et al. Recent Advances on the Function and Purification of Milk Exosomes: A Review. *Front Nutr*. 2022 Jun 9;9:871346. DOI: 10.3389/fnut.2022.871346.

39. Zhang Q, Xiao Q, Yin H, et al. Milk-exosome based pH/light sensitive drug system to enhance anticancer activity against oral squamous cell carcinoma. *RSC Adv*. 2020 Jul 29;10(47):28314–28323. DOI: 10.1039/d0ra05630h.

40. Lugini L, Valtieri M, Federici C, et al. Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31):50086–50098. DOI: 10.18632/oncotarget.10574.

41. Cossetti C, Lugini L, Astrologo L, et al. Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes. *PLoS One*. 2014 Jul 3;9(7):e101629. DOI: 10.1371/journal.pone.0101629.

42. Canitano A, Venturi G, Borghi M, et al. Exosomes released in vitro from Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs. *Cancer Lett*. 2013 Sep 1;337(2):193–199. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.05.012.

43. Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, et al. The Potentiality of Plant-Derived Nanovesicles in Human Health-A Comparison with Human Exosomes and Artificial Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 28;23(9):4919. DOI: 10.3390/ijms23094919.

44. Karamanidou T, Tsouknidas A. Plant-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutic Nanocarriers. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 24;23(1):191. DOI: 10.3390/ijms23010191.

45. Alzahrani FA, Khan MI, Kameli N, et al. Plant-Derived Extracellular Vesicles and Their Exciting Potential as the Future of Next-Generation Drug Delivery. *Biomolecules*. 2023 May 15;13(5):839. DOI: 10.3390/biom13050839.

46. Woith E, Guerriero G, Hausman JF, et al. Plant Extracellular Vesicles and Nanovesicles: Focus on Secondary Metabolites, Proteins and Lipids with Perspectives on Their Potential and Sources. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 2;22(7):3719. DOI: 10.3390/ijms22073719.

47. Rome S. Biological properties of plant-derived extracellular vesicles. *Food Funct*. 2019 Feb 20;10(2):529–538. DOI: 10.1039/c8fo02295j.

48. Ju S, Mu J, Dokland T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol Ther*. 2013 Jul;21(7):1345–57. DOI: 10.1038/mt.2013.64.

49. Teng Y, Ren Y, Sayed M, et al. Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota. *Cell Host Microbe*. 2018 Nov 14;24(5):637–652.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2018.10.001.

50. Stanly C, Alfieri M, Ambrosone A, et al. Grapefruit-Derived Micro and Nanovesicles Show Distinct Metabolome Profiles and Anticancer Activities in the A375 Human Melanoma Cell Line. *Cells*. 2020 Dec 21;9(12):2722. DOI: 10.3390/cells9122722.

51. Chen Q, Li Q, Liang Y, et al. Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation. *Acta Pharm Sin B*. 2022 Feb;12(2):907–923. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.08.016.

52. Raimondo S, Naselli F, Fontana S, et al. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*. 2015 Aug 14;6(23):19514–19527. DOI: 10.18632/oncotarget.4004.

53. Kim MK, Choi YC, Cho SH, et al. The Antioxidant Effect of Small Extracellular Vesicles Derived from Aloe vera Peels for Wound Healing. *Tissue Eng Regen Med*. 2021 Aug;18(4):561–571. DOI: 10.1007/s13770-021-00367-8.

54. Wang B, Zhuang X, Deng ZB, et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Mol Ther*. 2014 Mar;22(3):522–534. DOI: 10.1038/mt.2013.190.

55. Wang Q, Ren Y, Mu J, et al. Grapefruit-Derived Nanovectors Use an Activated Leukocyte Trafficking Pathway to Deliver Therapeutic Agents to Inflammatory Tumor Sites. *Cancer Res*. 2015 Jun 15;75(12):2520–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3095.

56. Zhuang X, Teng Y, Samykutty A, et al. Grapefruit-derived Nanovectors Delivering Therapeutic miR17 Through an Intranasal Route Inhibit Brain Tumor Progression. *Mol Ther*. 2016 Feb;24(1):96–105. DOI: 10.1038/mt.2015.188.

57. Kameli N, Dragojlovic-Kerkache A, Savelkoul P, et al. Plant-Derived Extracellular Vesicles: Current Findings, Challenges, and Future Applications. *Membranes (Basel)*. 2021 May 29;11(6):411. DOI: 10.3390/membranes11060411.

58. Pocsfalvi G, Turiák L, Ambrosone A, et al. Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *J Plant Physiol*. 2018 Oct; 229:111–121. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.07.006.

Информация об авторах:

Полищук Анна Генриховна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России;

Якубович Елена Игоревна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России;

Евтушенко Владимир Иванович, д.б.н., руководитель лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России.

Authors information:

Anna G. Polischouk, PhD, senior researcher, laboratory of genetic engineering, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies;

Elena I. Yakubovich, PhD, leading researcher, laboratory of genetic engineering, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies;

Vladimir I. Evtushenko, Dr.habil., head of the laboratory of genetic engineering, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies.

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В ФОРМИРОВАНИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И УКЛОНЕНИИ ОТ ИММУННОГО НАДЗОРА

Плеханов К. Н., Моисеева А. М., Головкин А. С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Головкин Алексей Сергеевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: golovkin_a@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 29.10.2024
и принята к печати 09.12.2024*

Резюме

В настоящее время антибиотикорезистентность представляет одну из растущих серьезных проблем мирового здравоохранения. Появляется все больше исследований, сообщающих о новых способностях бактерий уклоняться как от воздействия антибиотиков, так и от иммунного надзора макроорганизма. Одним из таких инструментов является использование бактериальных внеклеточных везикул, опосредующих выживаемость бактерий в условиях антибиотического и иммунного стресса. Цель настоящего обзора — проанализировать имеющиеся данные об участии бактериальных везикул в развитии антибиотикорезистентности и уклонении от иммунного надзора. Везикулы грамположительных и грамотрицательных бактерий имеют ряд структурных различий, а также отличные друг от друга механизмы реализации своих функций. Антибиотикорезистентность бактерий достигается за счет использования везикул как мишеней для антибиотиков, горизонтального переноса генов, удаления «клеточного мусора», а также переноса ферментов, разрушающих антибактериальные агенты. Реализуя стратегию уклонения от иммунного надзора, бактериальные везикулы могут участвовать в создании биопленок, провоцировать про- и противовоспалительные реакции, влиять на выделение цитокинов иммунными клетками, создавая для себя более выгодные условия для колонизации и развития. Таким образом, внеклеточные везикулы играют важную роль в реализации бактериями стратегий уклонения от иммунного надзора и антибиотикорезистентности. Однако все еще остаются малоизученными молекулярные механизмы развития различных реакций со стороны макроорганизма, а также процессы образования бактериальных везикул, что открывает возможности для дальнейших исследований.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, бактериальные внеклеточные везикулы, бактериальные инфекции, биопленки, горизонтальный перенос генов, иммунный стресс

Для цитирования: Плеханов К.Н., Моисеева А.М., Головкин А.С. Роль бактериальных внеклеточных везикул в формировании антибиотикорезистентности и уклонении от иммунного надзора. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 94-107. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-94-107. EDN: YSZLOU

BACTERIAL EXTRACELLULAR VESICLES: THEIR ROLE IN ANTIBIOTIC RESISTANCE AND IMMUNE EVASION

Kirill N. Plekhanov, Alesya M. Moiseeva, Alexey S. Golovkin

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Alexey S. Golovkin,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: golovkin_a@mail.ru

Received 29 October 2024; accepted
09 December 2024

Abstract

Antibiotic resistance is a rapidly escalating global healthcare crisis. Bacteria employ diverse strategies to evade both antibiotics and the host immune system. One of these tools is the use of bacterial extracellular vesicles that mediate bacterial survival under antibiotic and immune stress. This review analyzes the impact of bacterial extracellular vesicles on antibiotic resistance and immune evasion.

Bacterial extracellular vesicles of gram-positive and gram-negative bacteria have a number of structural differences, as well as different mechanisms for implementing their functions. Bacterial extracellular vesicles contribute to antibiotic resistance by acting as antibiotic targets, carrying resistance genes (horizontal gene transfer), and removing/degrading antibacterial agents. By implementing the strategy of evading immune surveillance, bacterial extracellular vesicles can participate in the formation of biofilms, provoke pro- and anti-inflammatory reactions, influence the secretion of cytokines by immune cells, creating more favorable conditions for colonization and development. Therefore, bacterial extracellular vesicles significantly contribute to bacterial survival under antibiotic and immune stress. However, the molecular mechanisms underlying bacterial extracellular vesicles biogenesis and host responses to bacterial extracellular vesicles remain poorly understood, highlighting the need for further research to combat antibiotic resistance and bacterial infections.

Key words: antibiotic resistance, bacterial extracellular vesicles, bacterial infections, biofilms, horizontal gene transfer, immune stress

For citation: Plekhanov KN, Moiseeva AM, Golovkin AS. Bacterial extracellular vesicles: their role in antibiotic resistance and immune evasion. Translational Medicine. 2025; 12(1): 94-107. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-94-107. EDN: YSZLOU

Список сокращений: АБ — антибиотик(и), АГ — антиген(ы), БВВ — бактериальные внеклеточные везикулы, ВВМ (EOMV) — взрывные везикулы наружной мембраны, ВНВМВ (EOIMV) — взрывные наружно-внутренние мембранные везикулы, ВМ (OMV) — везикула наружной мембраны, ВЦМВ (ECMV) — взрывные цитоплазматические мембранные везикулы, ПГ — пептидогликан, ФНО (TNF- α) — фактор некроза опухоли альфа, CD — кластер дифференцировки, IL — интерлейкин, NOD — нуклеотид олигомеризующий домен, Omp — белок внешней мембраны, Th — Т-хелперы, TLR — Toll-like receptor (Toll-подобный рецептор).

Бактериальные внеклеточные везикулы (БВВ) — продуцируемые бактериями сферические наночастицы, размером 20–250 нм, заключенные в липидный бислой и содержащие в своем составе структуры, опосредующие важные функции [1–4]. В последнее время изучению БВВ уделяется значительное внимание: предполагают их активное участие в патогенезе инфекционных заболеваний и в реализации механизмов антибиотикорезистентности бактерий. Таким образом, понимание причин и условий продукции БВВ, участия их во взаимоотношениях с клетками макроорганизма, а также формирования устойчивости к антибактериальным препаратам открывает перспективы терапии целого ряда инфекционных и аутоиммунных заболеваний.

Цель настоящего обзора — проанализировать имеющиеся данные об участии бактериальных везикул в развитии антибиотикорезистентности и уклонении микроорганизмов от иммунного надзора.

Механизмы образования бактериальных внеклеточных везикул

В зависимости от особенностей строения бактерий БВВ могут продуцироваться различными путями.

У грамотрицательных бактерий описано два основных механизма образования БВВ: блеббинг наружной мембраны и взрывной лизис клеток.

Блеббинг (пузырение) наружной мембраны

В настоящее время известно о четырех моделях высвобождения везикул по пути блеббинга:

1. Нарушение связывания наружной мембраны клеточной стенки бактерий с пептидогликаном (ПГ), при этом происходит выпячивание мембраны и организация ее в везикулы с захватом периплазматического содержимого [1–3, 5, 6] (рис. 1А).
2. Накопление белков в периплазматическом пространстве оказывает давление на мембрану изнутри. Это вызывает изменение в свойствах мембраны, вызывая ее искривление [2, 3, 5, 6] (рис. 1В).
3. Увеличение концентрации молекул искривления на мембране ведет к разрыву связей внешней мембраны и ПГ, что, в свою очередь, способствует образованию везикулы (например, у синегнойной

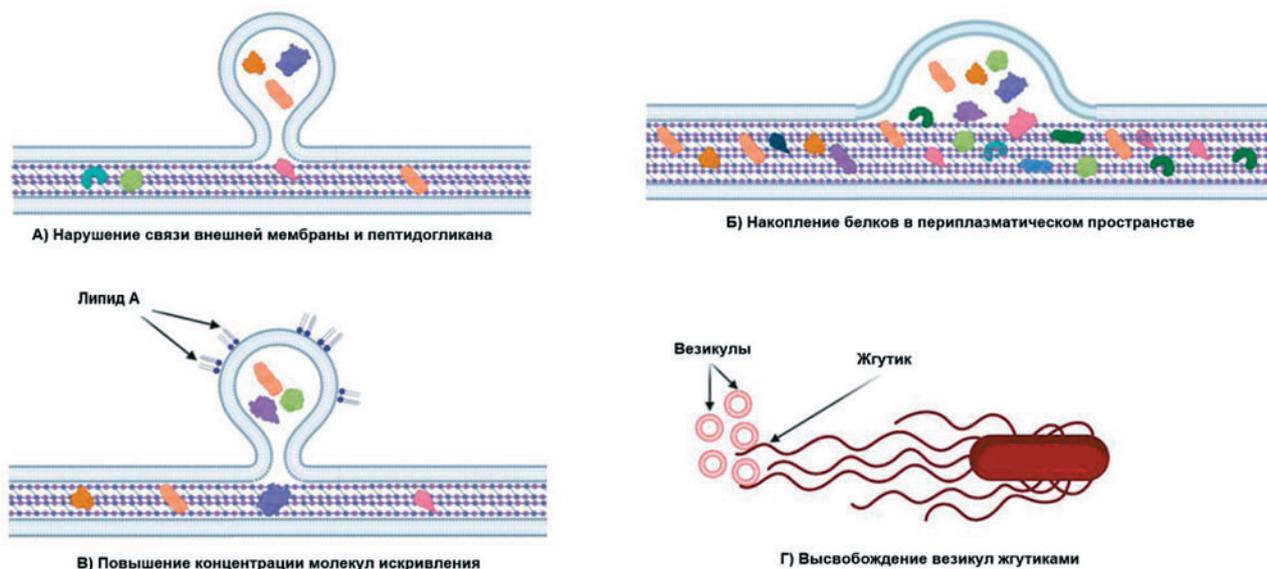


Рис. 1. Механизмы высвобождения бактериальных внеклеточных везикул

Примечание: Рисунок выполнен с использованием BioRender.com (2024).

Figure 1. Mechanisms of bacterial extracellular vesicle release

Note: Figure created using BioRender.com (2024).

палочки имеется небольшая молекула с хелатирующей и связывающей железо активностью, так называемый сигнал хинолона псевдомонады (англ. PQS — pseudomonas quinolone signal), которая связывается с липидом А и накапливает отрицательный заряд, изменяя кривизну мембраны пропорционально концентрации молекул [2, 5, 6] (рис. 1С).

4. Высвобождение БВВ жгутиками. Жгутики окружены оболочкой из внешней мембраны, и мембранные пузырьки, находящиеся вдоль жгутиков, могут выделяться при их вращении [3] (рис. 1D).

Взрывной лизис клеток

Данный механизм реализуется благодаря эндолизинам, аутолизинам или антибиотикам. Процесс заключается в высвобождении компонентов клетки в окружающую среду и организации их в везикулы. Такие объекты получили название — взрывные везикулы наружной мембраны (ВВНМ, англ. EOMV — explosive outer-membrane vesicle). Везикулы, имеющие двойной слой мембраны, называются наружно-внутренними мембранными везикулами (НВМВ, англ. OIMV — outer-inner membrane vesicle). Они образуются в результате взаимного выпячивания наружной и внутренней цитоплазматической мембраны через поры в ПГ [7].

У грамположительных бактерий механизмы образования везикул не изучены полностью. На их формирование и состав влияют различные по природе стрессоры [1, 2]. Важно отметить, что образование везикул грамположительными бактериями происходит только у метаболически активных микроорганизмов [2]. Эндолизины профага, гидролазы бактерий, антибиотики способны образовывать поры в ПГ клеточной стенки грамположительных бактерий, через которые выталкивается цитоплазматическая мембрана. Такие везикулы могут содержать в себе цитоплазматические компоненты [2, 3, 5]. Было обнаружено, что для образования везикул грамположительные бактерии могут снижать концентрацию липопротеинов, что ведет к повышению тягучести мембраны и увеличенному образованию везикул [5].

Структура бактериальных внеклеточных везикул

Различия в структуре везикул грамотрицательных и грамположительных бактерий объясняются не только их биогенезом, но и строением микробной оболочки. В везикулах грамположительных микроорганизмов естественным образом будут отсутствовать компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий, такие как липополисахарид (ЛПС), белки наружной мембраны и другие,

и, наоборот, присутствовать липотейхоевые кислоты клеточной стенки [2, 3, 5].

Существует два типа БВВ в зависимости от механизма их образования.

Везикулы В-типа образуются в результате блеббинга мембраны [1, 2, 7, 8]. У грамотрицательных бактерий чаще происходит блеббинг наружной мембраны, у грамположительных — вытеснение внутренней цитоплазматической мембраны через поры в клеточной стенке [1, 2, 7, 8]. При образовании везикул В-типа клетка сохраняет жизнеспособность [1, 2, 7, 8] (рис. 2).

Везикулы Е-типа образуются в результате лизиса клетки [1, 2, 7, 8]. Лизис микробной клетки происходит после активации умеренного фага и продукции им эндолизинов, действия антибиотиков или аутолизинов [1, 2, 7, 8]. Данный тип везикул свойственен как грамотрицательным, так и грамположительным бактериям [1, 2, 7, 8]. При этом грамотрицательные бактерии полностью подвергаются лизису, а грамположительные оставляют после себя так называемые клетки-тени из-за массивной клеточной стенки [1, 2, 7, 8].

Таким образом, тип везикул зависит от свойств бактерии-продуцента и механизма образования [3, 5, 7, 8]. Разные типы везикул значительно отличаются по своему содержанию, что в дальнейшем обуславливает специфические реакции на них со стороны макроорганизма.

Везикулы наружной мембраны (ВНМ, англ. OMV — outer membrane vesicle) происходят из наружной мембраны грамотрицательных бактерий и образуются путем блеббинга [1, 5, 7, 8]. Такие везикулы сохраняют структуру микроорганизма, могут содержать белки наружной мембраны, а также различные факторы вирулентности, в том числе белки-порины, играющие важную роль в антибиотикорезистентности к бета-лактамам. Внутри везикул иногда наблюдаются компоненты, вытесненные из ПГ или цитоплазмы, например, неправильно свернутые белки, гидрофобные молекулы и другие компоненты, которые должны быть удалены из клетки [1, 5, 7, 8] (рис. 2).

Наружно-внутренние мембранные везикулы образованы наружной и внутренней цитоплазматической мембраной, в их состав входят как компоненты самих мембран (белки-порины, ферменты), так и содержимое периплазматического пространства и цитоплазмы: ДНК и РНК бактерий, токсины, факторы вирулентности, опосредующие функции везикул и их способы взаимодействия с макроорганизмом [1, 5, 7, 8] (рис. 2).

Цитоплазматические мембранные везикулы (ЦМВ, англ. CMV — cytoplasmic membrane

vesicle) — везикулы грамположительных бактерий, которые состоят из фрагмента цитоплазматической мембраны материнской клетки и могут содержать в себе цитозольные компоненты [1, 5, 7, 8] (рис. 2).

ВНМ, НВМВ и ЦМВ относятся к В-типу везикул. Аналогичные по структуре и компонентам взрывные везикулы Е-типа (ВВНМ, ВНВМВ, ВЦМВ), помимо названных выше составляющих, содержат фрагменты фагов, эндолизины, фаговые белки и ряд других литических компонентов [5, 7, 8].

Функции бактериальных внеклеточных везикул

БВВ являются универсальной консервативной системой секреции, распространяющей эффектор-ные молекулы в окружающую среду, передавая их

как другим бактериям, так и клеткам макроорга-низма [1, 7, 8].

Они способны поддерживать жизнедеятель-ность бактерий разными способами: служить пере-носчиками факторов антибиотикорезистентности, формировать микробные биопленки и повышать адаптивные способности бактерий, подавлять ак-тивность системы иммунитета макроорганизма.

Модуляция иммунного ответа обеспечивается переносимыми в БВВ факторами вирулентности, лигандами для рецепторов клеток-хозяина, фер-ментами адгезии и инвазии. Доставка факторов агрессии при помощи БВВ может происходить не только по месту адгезии бактериальной клетки, но и в отдаленные участки макроорганизма, что способствует прогрессированию бактериальных

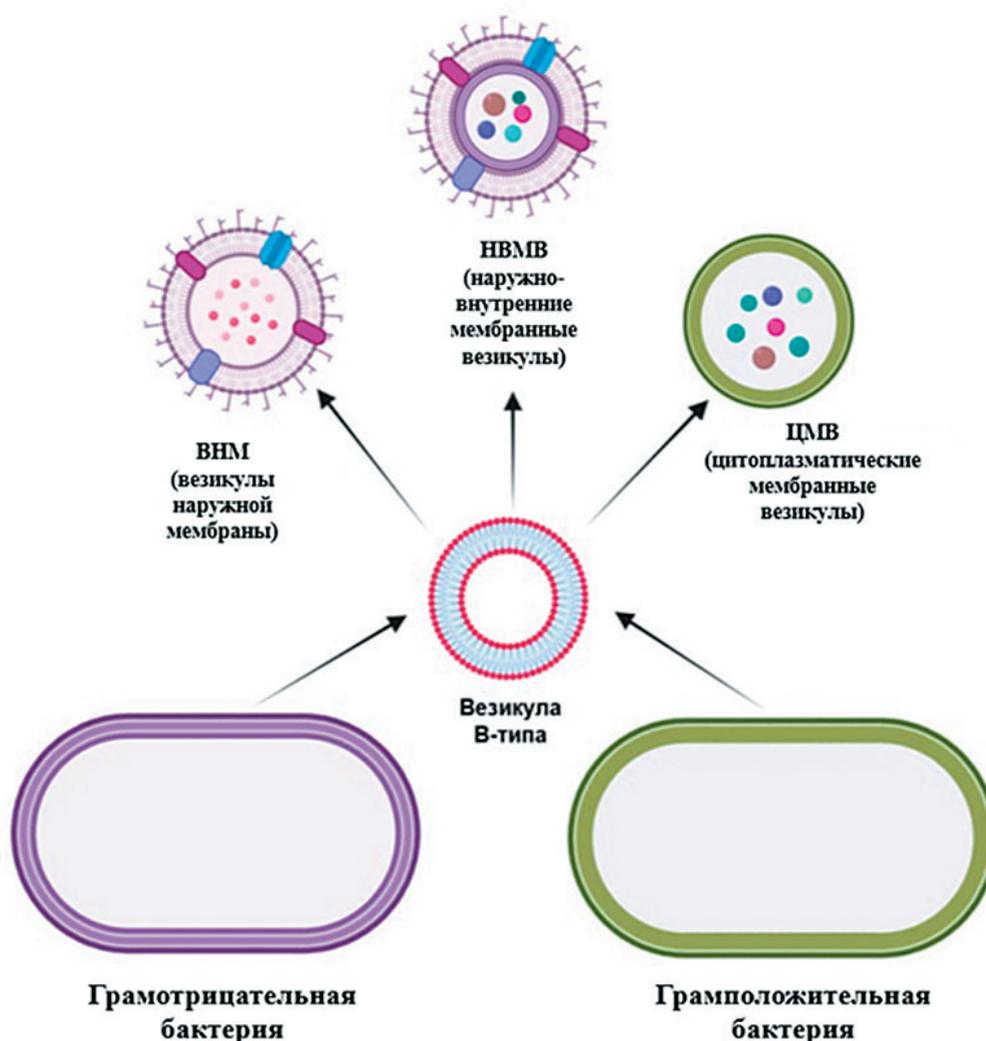


Рис. 2. Виды везикул В-типа

Примечание: Рисунок выполнен с использованием BioRender.com (2024).

Figure 2. Types of B-type vesicles

Note: Figure created using BioRender.com (2024).

инфекций [3, 9]. Было отмечено, что бактерии способны регулировать экспрессию факторов воспаления и выделение их с везикулами, что обуславливает прямое влияние на регуляцию иммунного ответа. Ферменты агрессии и инвазии, такие как коллагеназа, гиалуронидаза, сериновые протеазы и эксфолиативные токсины, помогают преодолевать физические барьеры [3, 9, 10] (рис. 3). На примере *Clostridium perfringens* было продемонстрировано, что бактерия, выделяя везикулы со специфическими белками, вызывает усиление секреции провоспалительных цитокинов, в особенности фактора некроза опухолей α (ФНО- α), клетками системы иммунитета [11, 12]. Вместе с тем, в другом исследовании наблюдали и обратные эффекты при взаимодействии везикул с клетками организма хозяина. В частности, везикулы *Borrelia burgdorferi* ингибировали выработку супероксида в нейронах, способствуя распространению возбудителя [12, 13].

Немалую роль играет инициация бактериями воспалительных реакций и регуляция активности клеток хозяина. Так, в исследовании, изучавшем влияние везикул грамположительной бактерии *Propionibacterium acnes* в формировании акнеподобных фенотипов, было выявлено, что везикулы, помимо стимулирования секреции провоспалительных цитокинов, нарушают регуляцию эпидермальной дифференцировки кератиноцитов, хотя молекулярные механизмы данных явлений изучены недостаточно [9, 14].

Первоначальная адгезия

Везикулы несут на себе специфические адгезины, лиганды и другие факторы, которые могут повышать проницаемость барьерных тканей организма для бактерий [3, 9]. Изменение проницаемости клеточных барьеров может быть связано как с их агрессивным разрушением (продукция ферментов агрессии, ассоциированных с везикулами, приводит к гибели клеток), так и опосредовано взаимодействием лигандов на поверхности везикул с рецепторами на мембране клеток, что приводит к нарушению межклеточных контактов [3, 9]. Так, было отмечено, что везикулы *Helicobacter pylori* несут на себе важный фактор вирулентности микроорганизма — цитотоксин CagA, который, в свою очередь, проникает в клетку, связывается с белком плотных контактов ZO-1, способствует повреждению цитоскелета и, как следствие, связи клеток друг с другом [3].

Определенные белки могут опосредовать адгезию бактериальных клеток к клеткам макроорганизма. Например, БВВ *Moraxella catarrhalis* несут патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП) — белки MID и UspA1, троп-

ные к Toll-подобным рецепторам (англ. TLR — toll-like receptors) эпителиальных клеток альвеол. При таком взаимодействии рецептор TLR2 организует сборку липидных рафтов, особых участков мембраны, обогащенных гликофинголипидами и холестерином, причем белок MID способствует адгезии бактерии, а UspA1 в основном нацелен на подавление секреции цитокинов [3, 9].

Бактерии способны изменять физиологические процессы, например, ингибировать мукоцилиарный клиренс в организме хозяина [3]. Некоторые виды используют везикулы, нагруженные антигеном, для провокации иммунной реакции организма и разрушения эпителиального барьера, что, в свою очередь, способствует усиленной колонизации [3].

Проникновение везикул в клетку макроорганизма

После адгезии бактериальные клетки могут продуцировать для последующей колонизации различные токсины, ферменты и другие макромолекулы, ассоциированные с везикулами. Токсины, обладающие цитотоксическим действием, доставляются в клетки-мишени посредством 5 механизмов:

1. слияния мембран везикул с мембраной клетки-мишени [3, 5, 7];
2. микропиноцитоза с образованием вогнутостей на поверхности мембраны клетки, реализуемых за счет перестройки цитоскелета [3, 5, 7];
3. клатрин-зависимого эндоцитоза с образованием ямок на поверхности мембраны клетки-хозяина, окаймленных белком клатрином [3, 5, 7];
4. кавеолин-опосредованного эндоцитоза с аналогичным механизмом, но большей эффективностью в сравнении с клатрин-опосредованным [3, 5];
5. эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами: данный вид независим от других белков и менее энергозатратен, однако кинетика механизма зависит от ЛПС и других молекул [3, 5, 7].

Важно отметить, что везикулы одного вида бактерий могут использовать разные механизмы проникновения в зависимости от различий в структуре самих везикул, в переносимом грузе на поверхности и внутри БВВ, а также от наличия определенных видов рецепторных молекул [3, 5].

Стратегии использования везикул в уклонении от иммунного надзора

БВВ дают большое преимущество бактериальным клеткам, обеспечивая различные формы взаимодействия бактерий с компонентами иммунной системы. Они направлены на уклонение от им-

мунного надзора, замедление элиминации патогена и колонизацию тканей [3, 5, 15]. В частности, БВВ могут стимулировать воспаление посредством активации макрофагов, эпителиальных клеток, нейтрофилов, а также презентацию антигена дендритными клетками, опосредуя формирование специфического иммунитета [3, 5, 15].

Эпителиальные клетки. Выше была описана адгезия БВВ к TLR2 эпителия альвеол и вызываемые при этом биологические эффекты. Кроме TLR, везикулы могут взаимодействовать с другими образ-распознающими рецепторами (OPR, англ. PRR — pattern recognition receptors) эпителиальных клеток [3, 5, 7, 15], что приводит к последующей продукции цитокинов [3, 5, 7]. Так, везикулы *Pseudomonas aeruginosa*, содержащие фрагменты пептидогликана, могут поглощаться эпителиальными клетками и взаимодействовать с рецепторами NOD-1, стимулировать выделение интерлейкинов (ИЛ), в частности хемокина ИЛ-8, и антимикробных пептидов, что ведет к усиленной элиминации патогенов.

Staphylococcus aureus посредством переноса ДНК и РНК в везикулах способен инициировать реакции, связанные с взаимодействием ПАМП с TLR7, TLR8, TLR9 [3, 5, 7].

Другое исследование показало, что грамположительные кокки *Enterococcus faecium* продуцировали везикулы в большем количестве в условиях антибиотического стресса, и их выделение вызывало продукцию провоспалительных цитокинов, а также они обладали цитотоксическим эффектом по отношению к используемым в исследовании клеточным линиям [12, 16]. Интересно и то, что везикулы, выделяемые бактериями, выращенными вне антибиотического стресса, имели иной протеом [12, 16], что предопределяло различие в оказываемых эффектах. Присутствие в структуре везикулы метиониновой tРНК ведет к снижению эффективности врожденной иммунной системы из-за ингибирования выделения эпителиальными клетками ИЛ-8 и, как следствие, снижению агрегации нейтрофилов и макрофагов в очаге инфекции [3, 5].

Была также описана способность *Helicobacter pylori* ингибировать секрецию цитокинов эпителиальными клетками желудка посредством аналогичного переноса малых некодирующих РНК (sncRNA) с помощью везикул [3, 5].

Макрофаги. Макрофаги одними из первых реагируют на вторжение чужеродных микроорганизмов. Они поглощают бактерии и их везикулы, опосредуя дальнейшие иммунные реакции. Известно, что некоторые бактерии используют макрофаги

в роли клеток-хозяев [3]. Проникая в клетки, они взаимодействуют с NOD-1 и NOD-2 рецепторами, обеспечивая продукцию провоспалительных цитокинов [3, 5]. Везикулы ранее упомянутых *S. aureus* и *P. aeruginosa* могут взаимодействовать с рецептором NLRP3 в макрофагах, запускать сборку инфламмосомы с продукцией ИЛ-1 и ИЛ-18 [3, 5]. Кроме того, везикулы могут стимулировать продукцию ИЛ-1 через TLR2 макрофагов [3, 5]. Важную роль играет и выделение самими макрофагами везикул, содержащих компоненты бактериальных клеток, что также стимулирует иммунный ответ [3, 5]. Везикулы инфицированных макрофагов могут содержать бактериальные компоненты и активировать дендритные клетки и другие макрофаги через TLR4, стимулируя выделение фактора некроза опухолей. Причем данный эффект свойственен только макрофагам, так как аналогичные везикулы инфицированных дендритных клеток не приводили к подобной активности [3, 5].

Везикулы менингококков *Neisseria meningitidis* могут стимулировать экспрессию костимулирующих молекул CD80 (англ. cluster of differentiation — кластер дифференцировки), CD86, молекул межклеточной адгезии ICAM-1, HLA-DR, что усиливает элиминацию патогена [3, 5]. Интересные результаты были продемонстрированы в исследовании с полирезистентным штаммом *Klebsiella pneumoniae*, который при применении имипицема увеличивал секрецию везикул с мембранной презентацией белка GroEL, что способствовало поглощению везикул макрофагами, активации в них программы пироптоза и выделению провоспалительных цитокинов и медиаторов (ИЛ-1 β , ИЛ-18 и ФНО- α). Данный механизм приводил к более выраженному повреждению тканей [12, 17].

Помимо активации провоспалительных реакций бактериальные клетки могут выделять везикулы, замедляющие выведение патогенных бактерий из организма за счет ингибирования воспаления. Например, макрофаги, зараженные *Mycobacterium tuberculosis*, могут продуцировать экзосомы с бактериальными компонентами, одним из которых является липоарабиноманнан (ЛАМ) [3, 5, 18]. В совокупности эти экзосомы подавляют способность других макрофагов реагировать на интерферон- γ , ингибируют активацию CD4⁺ Т-клеток, а также подавляют экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости II (ГКГ, англ. MHC — major histocompatibility complex) [3, 5, 18].

В другом исследовании сообщалось, что везикулы *Neisseria gonorrhoeae* и *P. aeruginosa* при взаимодействии с макрофагами могут вызывать у них апоптоз по митохондриальному пути [12, 19].

Противовоспалительные эффекты наблюдались у *Porphyromonas gingivalis*, которая выделяет с везикулами фермент — арг-гингипаин [3, 5]. Данная протеаза расщепляет корецептор CD14 на поверхности макрофагов, уменьшая при этом выработку ФНО, а сфинголипиды подавляют цитокиновые реакции в иммунных клетках [3, 5, 7].

Вместе с тем, несмотря на имеющиеся результаты, остаются малоизученными механизмы стимуляции БВВ про- и противовоспалительных реакций, которые, как предполагается, зависят от вида бактерии и стадии инфекционного процесса.

Дендритные клетки. Дендритные клетки играют очень важную роль в формировании иммунного ответа и во взаимодействии факторов адаптивного и врожденного иммунитета [3, 15].

Бактериальные внеклеточные везикулы *Bacteroides fragilis* стимулируют выделение провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-12), а везикулы *M. tuberculosis* повышают экспрессию МНС I, МНС II и костимуляторной молекулы для Т-клеток CD86 дендритными клетками [3, 15].

В зависимости от возбудителя и рецептора, с которым взаимодействуют БВВ, эффект может быть различным. Так, стрептококковые везикулы индуцировали выделение ИЛ-10, что приводило к снижению экспрессии МНС II, ингибированию презентации антигена и препятствовало дифференцировке Т-клеток [3, 15].

В другом исследовании сообщалось о роли везикул в формировании перекрестной антигенпрезентации CD8+ Т-клеткам [15, 20]. Была выдвинута гипотеза, что компоненты поверхности бактериальных везикул предпочтительнее активируют CD8+ Т-клетки, а внутреннее содержимое БВВ — CD4+ Т-клетки. Таким образом, вид везикулярного груза и его локализация играют важную роль в формировании иммунного ответа, влияют на активацию различных эффекторов и путей осуществления иммунной защиты [15, 21].

Нейтрофилы. Взаимодействие бактериальных везикул с нейтрофилами можно разделить на 2 направления: модуляция иммунного ответа и эффекты, связанные с нетозом.

1. Модуляция иммунного ответа (про- и противовоспалительное влияние).

Как и в случае с макрофагами, БВВ могут инициировать как про-, так и противовоспалительные эффекты при взаимодействии с нейтрофилами. Было отмечено, что при прямой стимуляции Toll-подобных рецепторов бактериальными везикулами могут выделяться провоспалительные цитокины ИЛ-1, ФНО, ИЛ-8, ИЛ-6 и др. [3, 5].

Так, БВВ *Acinetobacter baumannii* могут взаимодействовать с рецепторами TLR2 и TLR4, опосредуя при этом выделение ИЛ-6 [3, 5]. В других исследованиях введение БВВ *S. aureus* в дыхательные пути мышей приводило к выделению ФНО, ИЛ-12, ИЛ-6 в подавляющем большинстве через взаимодействие с TLR2, а повторный контакт приводил к инфильтрации легких, в первую очередь нейтрофилами, а также Т-хелперами 1 типа и Т-хелперами 17 типа [3, 5, 22].

С другой стороны, бактерии способны ингибировать реакции иммунного ответа, опосредованные нейтрофилами. Некоторые штаммы *Escherichia coli* продуцировали цитотоксический некротизирующий фактор 1 (ЦНФ1), который при переносе в везикулах к нейтрофилам ингибировал полимеризацию актина и кластеризацию рецептора комплемента, что приводило к снижению эффективности фагоцитоза [3, 5].

2. Эффекты, связанные с нетозом нейтрофила.

К данной группе можно отнести выделение везикул с упакованной в них ДНКазой, необходимой для разрушения нейтрофильных ловушек и избегания гибели бактерий в них [3, 5]. Такие везикулы продуцировались *P. aeruginosa*, *N. meningitidis* [3, 5].

Гуморальные факторы адаптивного иммунитета. Как было указано выше, БВВ могут взаимодействовать с дендритными клетками, опосредуя при этом реакции адаптивного иммунного ответа. На основании этого факта выдвигаются новые гипотезы, связанные с этиологией и механизмами развития различных заболеваний. Так, было высказано предположение, что везикулы *V. burgdorferi* участвуют в липидном обмене, перенося холестерин из мембраны клеток макроорганизма [5]. В клетки хозяина могут внедряться иммуногенные липиды везикул, провоцирующие образование специфических антител [5]. Также было высказано предположение о роли бактериальных везикул в развитии ревматоидного артрита (РА). Пациенты с РА более склонны к развитию заболеваний пародонта, а в полости рта у них может присутствовать повышенное количество *P. gingivalis* [5]. Этот вид способен упаковывать и переносить с везикулами аргининдеиминазу — фермент, участвующий в цитруллировании белков, к которым формируются антитела при РА [5].

Клеточные факторы адаптивного иммунитета. Было выявлено, что после инкубации везикул, обогащенных овалбумином, с дендритными клетками у последних наблюдалось увеличение экспрессии МНС I, CD80, CD86, CD70, что приводило к активации CD8+ Т-клеток, нацеленных

на овальбумин [5, 21]. В другом исследовании оценивали влияние микробиома кишечника на формирование противоопухолевого иммунитета. *B. fragilis* продуцировали ВНМ, несущие капсульный полисахарид. Было показано, что дендритные клетки распознают ВНМ-ассоциированный полисахарид посредством TLR2 и стимулируют дифференцировку регуляторных Т-клеток, которые ингибируют воспалительные реакции [5, 23]. В этом же исследовании было установлено, что везикулы, обогащенные овальбумином, также стимулировали перекрестное праймирование и клональную экспансию CD8⁺ Т-клеток, нацеленных на мышинные опухолевые клеточные линии, тоже экспрессирующие овальбумин [5, 23].

В исследовании с *P. aeruginosa* было показано, что продуцируемые везикулы увеличивали ответ регуляторных Т-клеток и снижали активность Т-хелперов 2 типа [24, 25].

Участие бактериальных внеклеточных везикул в реализации резистентности бактерий к антибиотикам

Разрушение антибиотика

Структура везикул влияет на реализацию функций и активность груза, который она несет. Так, в одном из исследований сообщалось о важности поринов в составе наружной мембраны для реализации функций бета-лактамаз в контексте механизмов антибиотикорезистентности у грамотрицательных бактерий [1, 7, 26]. Многие антибиотики, включая бета-лактамы, для осуществления своего действия и достижения внутриклеточных мишеней используют порины в мембране клеток [1, 7, 26]. Так, в одном из исследований мембрана везикул *E. coli*, продуцирующей бета-лактамазу, была обогащена поринами OmpC и OmpF, что позволяло этим везикулам активно поглощать и инактивировать бета-лактамы антибиотики [1, 7, 26]. При этом модифицированные везикулы, не содержащие даже одного вида поринов, показали более низкие результаты в данном механизме антибиотикорезистентности [1, 7, 26]. Кроме того, порины могут выполнять функции как факторов вирулентности, так и факторов адгезии [1, 7] (рис. 3).

БВВ как на мембране, так и во внутренней фазе могут нести ферменты, расщепляющие антибиотики. Посредством этого механизма *S. aureus* с бета-лактамазной активностью защищал чувствительные виды бактерий от действия ампициллина [1, 2, 8, 27]. Аналогичные результаты были получены в другом исследовании, когда бактерии под воздействием сублетальных доз бета-лактамов выделяли везикулы с бета-лактамазами и повы-

шенной способностью поглощать и гидролизовать антибиотики [28].

Включение в БВВ ферментов, разрушающих антибиотики, вероятно, является случайным процессом. Ферменты находятся в периплазматическом пространстве и захватываются во время образования везикул. Например, липидный якорь может прикреплять фермент карбопенамазу к внутреннему слою липидной мембраны в месте образования везикулы [1, 2, 7]. В другом исследовании *Bacillus subtilis* продуцировала везикулы с белком Sun1, придающим ей устойчивость к антибиотику субланцину [9, 29].

Удаление продуктов жизнедеятельности и токсинов

В результате как внешних воздействий, так и физиологических процессов в периплазматическом пространстве микробной клетки могут накапливаться неправильно свернутые белки ПГ, активные формы кислорода (АФК) и другие токсичные продукты. Продукция бета-лактамаз также может быть токсичной для некоторых бактерий [1, 7]. В местах накопления таких продуктов сшивки наружной мембраны и ПГ более редкие, из-за чего происходит выпячивание и отпочкование везикулы от бактерии с токсичным грузом, без ущерба для самой бактерии [1, 7]. Было отмечено, что у штамма *E. coli* с низкой продукцией везикул отмечался более медленный рост, что дает основания предполагать, что выделение везикул — один из жизненно важных механизмов избавления клетки от токсичных веществ [1, 30]. Антибиотики также ведут к накоплению токсичных продуктов, способных нарушать структуры ПГ, ДНК, наружной и внутренней мембран бактерий [1, 31]. Целый ряд антибактериальных препаратов (бета-лактамы, хинолоны и аминогликозиды) вызывают развитие окислительного стресса, окисления нуклеотидов, двуцепочечных разрывов и т. д. Вследствие серьезных повреждений ДНК запускается SOS-ответ, который представляет собой комплекс защитных реакций, направленных на репарацию наследственного материала, и включает образование внеклеточных везикул [1, 2]. Предполагается, что образование ВНМ происходит за счет задержки клеточного деления, которая вызывает изменение структуры оболочки, что приводит к образованию БВВ [1, 2, 8, 31].

Антибиотики, воздействующие на оболочку, также могут способствовать появлению БВВ. Например, полимиксины связываются с ЛПС внешней мембраны, вызывая ее дестабилизацию, утечку содержимого и гибель клеток. Полимиксиновые антибиотики теряют эффективность при выработ-

ке бактерией внеклеточных везикул возможно из-за того, что их эффект связан с образованием нестабильных областей в мембране. Вследствие удаления этих областей при формирования везикул эффективность данной группы антибиотиков снижается [1, 2, 8].

Устойчивость к полимиксинам достигается также за счет модификации ЛПС [1, 7, 8]. Было отмечено, что *Vibrio cholerae* увеличивал продукцию везикул при нарушении ретроградного транспорта фосфолипидов во время инфекции. Причем повышалась элиминация немодифицированного ЛПС, а модифицированный сохранялся, ремоделируя поверхность и увеличивая устойчивость к полимиксиновым антибиотикам [1, 8].

Отвлекающий эффект

Везикулы могут отвлекать на себя бактерицидные вещества и бактериофаги благодаря сходству строения с родительской бактериальной клеткой [2, 7] (рис. 3). Причем защитное действие распространяется и на соседние микроорганизмы. Например, везикулы, выделенные у *M. catarrhalis*, защищали от воздействия полимиксинов *Haemophilus influenzae*, *A. baumannii*, и *P. aeruginosa* [1, 2, 8].

Грамположительные бактерии продуцировали везикулы, подавляющие активность ванкомицина [1]. Было показано, что его воздействие ведет к повышенному выделению БВВ у *S. aureus*, а совместная инкубация антибиотика, везикул и микроорганизмов повышала резистентность последних в 2–4 раза [1]. БВВ, содержащие более 50 % пептидогликана, связывают антибиотик ванкомицин посредством взаимодействия препарата с D-Ala-D-лактатом ПГ — данный пептид является клеточной мишенью для ванкомицина [1, 7]. Также было отмечено, что бактерии могут защищаться от фагов, производя БВВ, богатые рецепторами для фагов на своей поверхности [1, 2, 7].

При этом патогенные бактерии способны передавать представителям нормобиоты рецепторы к специфическим фагам, из-за чего реципиентные штаммы становятся чувствительными к специфичному для патогена фагу. Например, рецептор *B. subtilis* SPP1 переносится посредством везикул [1]. Существуют и другие пути передачи рецепторов к фагам. Например, *P. aeruginosa* не способна передавать с везикулами чувствительность к фагу КТ28 [1, 2, 8].

Также есть предположения о том, что везикулы могут действовать как ловушки не только для антибиотиков, но и для антител, белков комплимента и других бактерицидных веществ. Они несут на себе специфические молекулы для последующего связы-

вания и изоляции в просвете везикул, а также для заякоривания на своей поверхности [2, 7, 8].

Передача генов устойчивости

Перенос генов устойчивости может опосредовать стойкую резистентность к определенным группам антибиотиков. В отличие от классических мутаций, которые происходят относительно медленно и ограничиваются только клоном, горизонтальный перенос генов (ГПГ) — более быстрый способ передачи генетического материала и, как следствие, резистентности среди разных видов. В результате ГПГ могут переноситься ДНК, РНК или мобильные генетические элементы, такие как плазмиды и транспозоны [1, 7, 32].

Перенос происходит в результате ассоциации везикул с нуклеотидными последовательностями, которые могут находиться как в самой везикуле, так и на ее поверхности. В одном из исследований *N. gonorrhoeae* передавала плазмидную устойчивость к пенициллину и хромосомную устойчивость к стрептомицину чувствительным штаммам того же вида посредством БВВ. После обработки этих везикул ДНКазой устранялась передача устойчивости к стрептомицину, что позволяет предположить, что плаزمида была защищена везикулой, то есть находилась внутри нее, а хромосомная ДНК находилась на поверхности БВВ [1, 7]. Аналогичные результаты были получены при передаче устойчивости к эритромицину через везикулы от *P. gingivalis* к восприимчивому штамму [1, 33]. В другом исследовании было показано развитие резистентности к бета-лактамам антибиотикам у *E. coli* в результате передачи через везикулы генов метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA). Данные исследования доказывают факт ГПГ между грамотрицательными и грамположительными бактериями посредством внеклеточных везикул [34].

Антибиотики могут непосредственно влиять как на количество продуцируемых везикул, так и на концентрацию ДНК в них. Например, везикулы *E. coli* при обработке гентамицином в 10 раз эффективнее опосредовали резистентность у чувствительных бактерий по сравнению с необработанными клетками [1, 35]. В другом исследовании дикий тип *E. coli* с нарушенным синтезом пептидогликана увеличивал как количество выделяемых везикул, так и количество копий плазмидной ДНК в них [12, 36].

Механизмы попадания нуклеотидных последовательностей в везикулы полностью не изучены. Предполагается, что они попадают туда в результате одного из трех процессов: блеббинг мембраны и попадание генетического материала из периплазматического пространства; захват

цитоплазматической ДНК во время образования НВМВ; захват ДНК во время образования везикул E-типа, после лизиса клеток [1, 7].

Само проникновение генов устойчивости бактерии-донора в везикулы может быть как активным, так и случайным. Проникновение ДНК в клетку-реципиент может быть результатом взаимодействия со специальными белками после лизиса везикулы (*Acinetobacter baylyi*, *Streptococcus thermophilus*) или благодаря механизму слияния мембран (*E. coli*) [1, 7, 35].

Инкубация разных видов бактерий (*Enterobacter cloacae*, *Aeromonas veronii*, *Chromobacterium violaceum*, *E. coli*, *P. aeruginosa*) с везикулами, несущими гены резистентности, приводила к появлению устойчивости у всех бактерий-реципиентов [1–3, 9, 37] (рис. 3).

Участие в создании биопленок

Бактериальные биопленки представляют собой сложные микробные сообщества, формируемые бактериями [1, 8]. В состав биопленок входят ли-

пиды, обеспечивающие их гидрофобные свойства, экзополисахариды, ДНК, белки и другие макромолекулы [1, 8].

Основная функция биопленок — защита микробных сообществ от агрессивных факторов внешней среды, таких как pH, дефицит питательных веществ, антибиотики, защита от иммунного ответа, опосредованного клетками врожденной и адаптивной иммунной системы [1, 3, 8].

Везикулы составляют весомую часть биопленок бактерий. Более 20 % белков от общего протеома биопленок ассоциированы с бактериальными везикулами [1]. Одним из примеров таких белков могут быть бета-лактамазы [1, 8].

Влияние антибиотиков может способствовать продукции везикул с измененными свойствами, а именно повышенными гидрофобными свойствами их мембраны, что впоследствии приводит к улучшению процессов формирования биопленок [1, 8]. БВВ обеспечивают формирование и созревание биопленок, а впоследствии и их структурную целостность [1, 3, 8]. Так, было продемонстрировано, что бе-

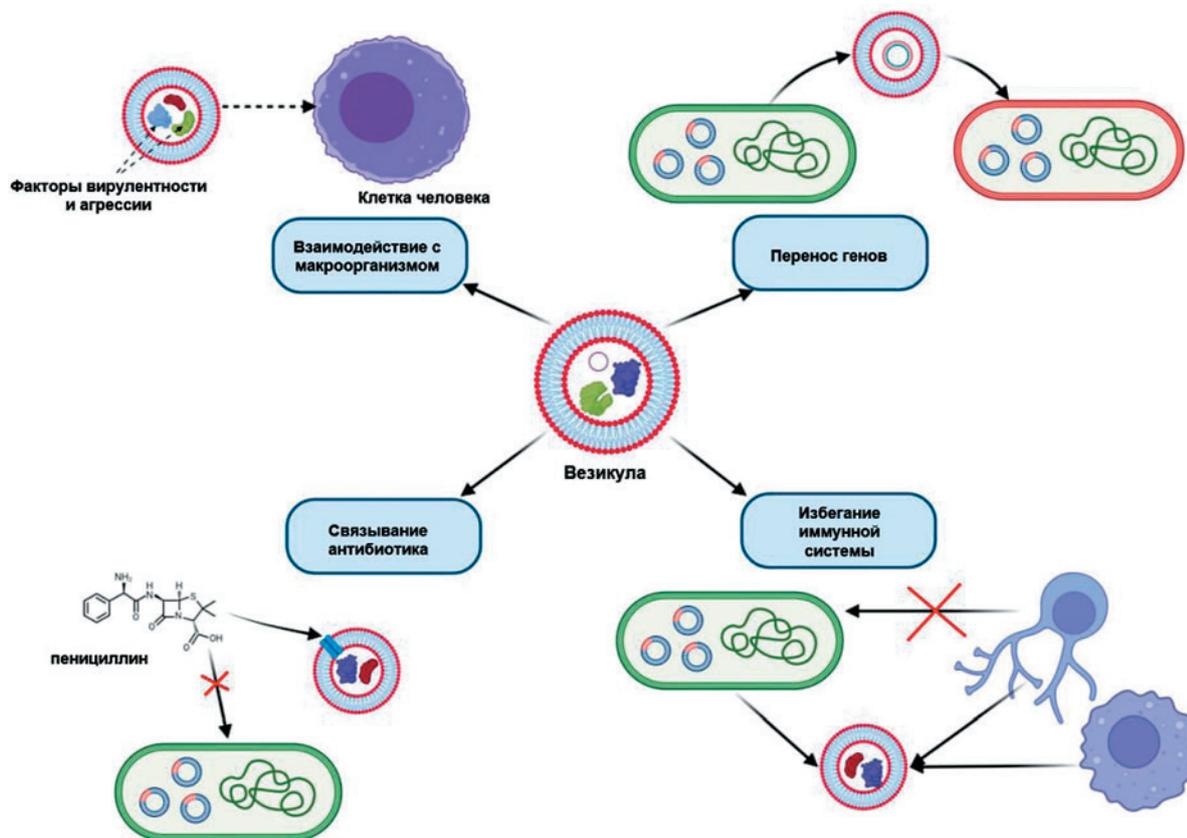


Рис. 3. Основные функции бактериальных внеклеточных везикул

Примечание: Рисунок выполнен с использованием BioRender.com (2024).

Figure 3. Main functions of bacterial extracellular vesicles

Note: Figure created using BioRender.com (2024).

та-лактамы антибиотики посредством продукции везикул с повышенной гидрофобностью вызывают образование биопленок у штамма MRSA [12, 34].

Везикулы могут поставлять бактериальным сообществам ЛПС и ДНК в период образования биопленок [1, 8]. Находясь на поверхности везикул, ДНК защищена от действия ДНКаз [8, 38]. Было отмечено, что ДНК, ассоциированная с везикулами, играет важную роль в инициации создания и поддержания биопленок посредством обеспечения взаимодействий «везикула–везикула» и «везикула–бактериальная клетка» [3, 8, 38].

Заключение

Продуцируемые бактериями внеклеточные везикулы могут обладать достаточно сложной структурой, которая напрямую зависит от вида клетки-продуцента, а также от механизмов образования. БВВ участвуют в уклонении бактерии от иммунного надзора, иницируя при этом про- или противовоспалительную активность клеток иммунной системы и влияя на факторы как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Участие БВВ в реализации антибиотикорезистентности может включать в себя разрушение антибиотика, удаление ненужных продуктов из бактериальной клетки, формирование отвлекающего эффекта, участие в горизонтальном переносе генов. Изучение БВВ позволит уточнить тонкие механизмы патогенеза инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также выработать новые подходы к преодолению антибиотикорезистентности патогенных штаммов бактерий.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-20076. <https://rscf.ru/project/19-75-20076/> / The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 19-75-20076. <https://rscf.ru/project/19-75-20076/>

Список литературы / References

- MacNair CR, Tan MW. The role of bacterial membrane vesicles in antibiotic resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2023;1519(1):63–73. DOI: 10.1111/nyas.14932.
- Liu X, Xiao J, Wang S, et al. Research Progress on Bacterial Membrane Vesicles and Antibiotic Resistance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19). DOI: 10.3390/ijms231911553.
- Gan Y, Zhao G, Wang Z, et al. Bacterial Membrane Vesicles: Physiological Roles, Infection Immunology, and Applications. *Adv Sci.* 2023;10(25):1–23. DOI: 10.1002/adv.202301357.
- Uddin MJ, Dawan J, Jeon G, et al. The role of bacterial membrane vesicles in the dissemination of antibiotic resistance and as promising carriers for therapeutic agent delivery. *Microorganisms.* 2020;8(5):1–23. DOI: 10.3390/microorganisms8050670.
- Doré E, Boilard E. Bacterial extracellular vesicles and their interplay with the immune system. *Pharmacol Ther.* 2023;247. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2023.108443.
- Liu H, Zhang Q, Wang S, et al. Bacterial extracellular vesicles as bioactive nanocarriers for drug delivery: Advances and perspectives. *Bioact Mater.* 2022;14(November 2021):169–81. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.12.006
- Toyofuku M, Schild S, Kaparakis-Liaskos M, et al. Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(7):415–30. DOI: 10.1038/s41579-023-00875-5.
- Yang J, Jia F, Qiao Y, et al. Correlation between bacterial extracellular vesicles and antibiotics: A potentially antibacterial strategy. *Microb Pathog.* 2023;181(April):106167. DOI: 10.1016/j.micpath.2023.106167.
- Bose S, Aggarwal S, Singh DV, et al. Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microb Cell.* 2021;7(12):312–22. DOI: 10.15698/MIC2020.12.737.
- Surve MV, Anil A, Kamath KG, et al. Membrane Vesicles of Group B Streptococcus Disrupt Feto-Maternal Barrier Leading to Preterm Birth. *PLoS Pathog.* 2016;12(9):1–23. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005816.
- Jiang Y, Kong Q, Roland KL, et al. Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *Int J Med Microbiol [Internet].* 2014 May;304(3–4):431–43. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.02.006.
- Villageliu DN, Samuelson DR. The Role of Bacterial Membrane Vesicles in Human Health and Disease. *Front Microbiol.* 2022;13(March). DOI: 10.3389/fmicb.2022.828704.
- Wawrzeniak K, Gaur G, Sapi E, et al. Effect of *borrelia burgdorferi* outer membrane vesicles on host oxidative stress response. *Antibiotics.* 2020;9(5). DOI: 10.3390/antibiotics9050275.
- Choi EJ, Lee HG, Bae IH, et al. Propionibacterium acnes-Derived Extracellular Vesicles Promote Acne-Like Phenotypes in Human Epidermis. *J Invest Dermatol.* 2018;138(6):1371–9. DOI: 10.1016/j.jid.2018.01.007.
- Zhu Z, Antenucci F, Villumsen KR, et al. Bacterial outer membrane vesicles as a versatile tool in vaccine research and the fight against antimicrobial resistance. *MBio.* 2021;12(4). DOI: 10.1128/mBio.01707-21.

16. Kim MH, Kim SY, Son JH, et al. Production of Membrane Vesicles by *Enterococcus faecium* Cultured With or Without Subinhibitory Concentrations of Antibiotics and Their Pathological Effects on Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(August):1–11. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00295.
17. Ye C, Li W, Yang Y, et al. Inappropriate use of antibiotics exacerbates inflammation through OMV-induced pyroptosis in MDR *Klebsiella pneumoniae* infection. *Cell Rep.* 2021;36(12):109750. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109750.
18. Singh PP, LeMaire C, Tan JC, et al. Exosomes released from *M. tuberculosis* infected cells can suppress $\text{IFN-}\gamma$ mediated activation of naïve macrophages. *PLoS One.* 2011;6(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0018564.
19. Deo P, Chow SH, Han ML, et al. Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation. *Nat Microbiol.* 2020;5(11):1418–27. DOI: 10.1038/s41564-020-0773-2.
20. Lee DH, Kim SH, Kang W, et al. Adjuvant effect of bacterial outer membrane vesicles with penta-acylated lipopolysaccharide on antigen-specific T cell priming. *Vaccine.* 2011;29(46):8293–301. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.102.
21. Schettters STT, Jong WSP, Horrevorts SK, et al. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8+ T cells. *Acta Biomater.* 2019;91:248–57. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.04.033.
22. Kim MR, Hong SW, Choi EB, et al. *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles induce neutrophilic pulmonary inflammation via both Th1 and Th17 cell responses. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2012;67(10):1271–81. DOI: 10.1111/all.12001.
23. Tomasi M, Caproni E, Benedet M, et al. Outer Membrane Vesicles From The Gut Microbiome Contribute to Tumor Immunity by Eliciting Cross-Reactive T Cells. *Front Oncol.* 2022;12(June):1–17. DOI: 10.3389/fonc.2022.912639.
24. Ding FX, Liu B, Zou WJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-derived exosomes ameliorates allergic reactions via inducing the T reg response in asthma. *Pediatr Res.* 2018;84(1):125–33. DOI: 10.1038/s41390-018-0020-1.
25. Chen J, Zhang H, Wang S, et al. Inhibitors of Bacterial Extracellular Vesicles. *Front Microbiol.* 2022;13(February). DOI: 10.3389/fmicb.2022.835058.
26. Kim SW, Park S Bin, Im SP, et al. Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–13. DOI: 10.1038/s41598-018-23656-0.
27. Lee J, Lee EY, Kim SH, et al. *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2589–95. DOI: 10.1128/AAC.00522-12.
28. Kim SW, Seo JS, Park S Bin, et al. Significant increase in the secretion of extracellular vesicles and antibiotics resistance from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by ampicillin stress. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–14. DOI: 10.1038/s41598-020-78121-8.
29. Brown L, Kessler A, Cabezas-Sanchez P, et al. Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Mol Microbiol [Internet].* 2014 Jul 4;93(1):183–98. DOI: 10.1111/mmi.12650.
30. Schwechheimer C, Kuehn MJ. Synthetic effect between envelope stress and lack of outer membrane vesicle production in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2013;195(18):4161–73. DOI: 10.1128/JB.02192-12.
31. Sato K, Marzioni M, Meng F, et al. Ductular Reaction in Liver Diseases: Pathological Mechanisms and Translational Significances. *Hepatology [Internet].* 2019 Jan;69(1):420–30. DOI: 10.1002/hep.30150.
32. Domingues S, Nielsen KM. Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.* 2017;38:16–21. DOI: 10.1016/j.mib.2017.03.012.
33. Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(1):13–24. DOI: 10.1038/s41579-018-0112-2.
34. Lee AR, Park S Bin, Kim SW, et al. Membrane vesicles from antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* transfer antibiotic-resistance to antibiotic-susceptible *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 2022;132(4):2746–59. DOI: 10.1111/jam.15449.
35. Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, et al. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(11):3469–83. DOI: 10.1128/AEM.04248-13.
36. Aktar S, Okamoto Y, Ueno S, et al. Incorporation of Plasmid DNA Into Bacterial Membrane Vesicles by Peptidoglycan Defects in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2021;12(November):1–11. DOI: 10.3389/fmicb.2021.747606.
37. Tran F, Boedicker JQ. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–10. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
38. Grande R, Di Marcantonio MC, Robuffo I, et al. *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 Outer Membrane Vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Front Microbiol.* 2015;6(DEC). DOI: 10.3389/fmicb.2015.01369.

Информация об авторах:

Плеханов Кирилл Николаевич, студент лечебно-го факультета Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Моисеева Алеся Михайловна, к.м.н., заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., заведующий лабораторией микровезикулярного сигналинга Института молекулярной биологии и генетики, профессор кафедры микробиологии и вирусологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Kirill N. Plekhanov, student of Institute of medical education, Almazov National Medical Research Centre;

Alesya M. Moiseeva, PhD, Head of the Department of Microbiology and Virology, Institute of Medical Education, Almazov National Research Medical Center, Ministry of Health of the Russian Federation;

Alexey S. Golovkin, MD, PhD, DrSci, head of laboratory of microvesicular signaling, Institute of molecular biology and genetics, professor of microbiology and virology department, Institute of medical education, Almazov National Medical Research Centre.

