

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭКСТРАКТЕЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
К РАЗЛИЧНЫМ ДЕТЕРГЕНТАМА.А. Яковлев^{1,2*}, Т.А. Дружкова², А.Б. Гехт², Н.В. Гуляева^{1,2}¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,

117485, Москва, ул. Бутлерова, 5А, *e-mail: al_yakovlev@ihna.ru

²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, 115419, Москва, ул. Донская, 43

Экзосомы и микровезикулы, совместно называемые малые экстраклеточные везикулы (мЭВ), представляют собой везикулы размером около 100-150 нм. Малые ЭВ принимают участие в самых разных аспектах сигналинга в организме; кроме того, они могут служить маркерами разных патологий. Для биохимических исследований зачастую требуется солюбилизация везикул. Мы проверили способность различных детергентов растворять мембраны мЭВ. Малые ЭВ выделяли из сыворотки крови здоровых добровольцев с помощью гель-фильтрации на Sepharose CL-2B и пытались их солюбилизировать с помощью анионного детергента DOC (дезоксихолат натрия), неионного детергента Brij 35 (додециловый эфир полиэтиленгликоля), цвиттерионного детергента CHAPS (3-[(3-хлорамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат), катионного детергента СТАВ (цетил триметиламмония бромид). Концентрацию мЭВ в растворе определяли с помощью динамического светорассеяния. Самым эффективным детергентом для солюбилизации мЭВ из сыворотки крови оказался DOC.

Ключевые слова: экзосомы; микровезикулы; сыворотка крови; динамическое светорассеяние; детергенты

DOI: 10.18097/BMCRM00143

Список сокращений: PBS – фосфатно-солевой буфер; SDS – додецил сульфат натрия; DOC – дезоксихолат натрия; Brij 35 – додециловый эфир полиэтиленгликоля; CHAPS – 3-[(3-хлорамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат; СТАВ – цетил триметиламмония бромид; Triton X-100 – терт-октилфеноксиполиэтоксилэтанол; NP-40 – октил феноксиполиэтоксилэтанол; ЭВ – экстраклеточные везикулы

ВЕДЕНИЕ

Малые ЭВ (мЭВ) являются мембранными везикулами, секретируемыми практически всеми клетками организма [1]. Показано, что мЭВ содержат нуклеиновые кислоты, ферменты, рецепторы и многое другое, но детальный анализ состава мЭВ еще не проведен. Размер экзосом составляет 50–150 нм; при этом другой класс ЭВ – микровезикулы – имеет размер 100–200 нм [2]. При изучении мЭВ часто возникает ситуация, когда нужно растворить мембрану везикулы и исследовать растворимую фракцию. Например, можно последовательно биотинилировать вначале поверхностные белки мЭВ, а затем растворить мембрану и с помощью другого реагента биотинилировать внутривезикулярные белки [3]. Это позволяет более подробно охарактеризовать состав мЭВ. Более того, подход с использованием избирательного биотинилирования позволяет более надежно выявлять маркеры различных заболеваний [4]. Известно, что мЭВ проявляют избирательную чувствительность к разным детергентам [5]. Согласно опубликованным данным, для растворения и микровезикул, и экзосом достаточно 0.125% SDS, 0.075% Triton X-100 или 0.1% DOC [5]. Однако большинство предыдущих результатов получено на мЭВ из культуральной жидкости от клеточных культур, а чувствительность мЭВ сыворотки крови к детергентам остается неизвестной. В некоторых работах для лизирования мЭВ из плазмы крови без четкого обоснования используется 3% Triton X-100 [6]. Для лизиса мЭВ из слюны были использованы детергенты

SDS, Triton X-100 и NP-40, каждый в концентрации 1%; при этом неионные детергенты не могли обеспечить полного разрушения частиц [7]. Кроме того, даже с чувствительностью мЭВ из культуральной жидкости от клеточных культур к детергентам не все ясно. Так, некоторые авторы считают, что, по крайней мере, неионные детергенты не растворяют мембрану мЭВ, а снижают дзета-потенциал частиц и таким образом снижают коллоидальную стабильность частиц в растворе, что может приводить, например, к выпадению частиц в осадок [8]. В некоторых работах для разрушения мЭВ из клеточных культур используют заведомо большую концентрацию детергентов, например 2% SDS [9]. По некоторым данным, выделенные из плазмы крови мЭВ можно разрушить 1% Triton X-100, хотя использование разных методов выделения мЭВ приводит к выделению частиц, существенно различающихся по чувствительности к детергенту [10]. При лизисе мЭВ из культуральной жидкости, проведенном в смеси детергентов 1% NP-40, 1% DOC и 0.1% SDS увеличивается число экстрагированных белков по сравнению с лизисом мЭВ в 1% Triton X-100 [11].

Таким образом, на сегодняшний день нет четких данных о чувствительности мЭВ к детергентам, тем более мЭВ из сыворотки крови человека. Тем не менее, такие данные сейчас востребованы для проведения целого ряда биохимических экспериментов. Нам чувствительность мЭВ к детергентам нужна для планирования экспериментов по определению активности внутривезикулярных ферментов. Мы выбрали основные детергенты, часто используемые в лаборатории, и проверили чувствительность к ним



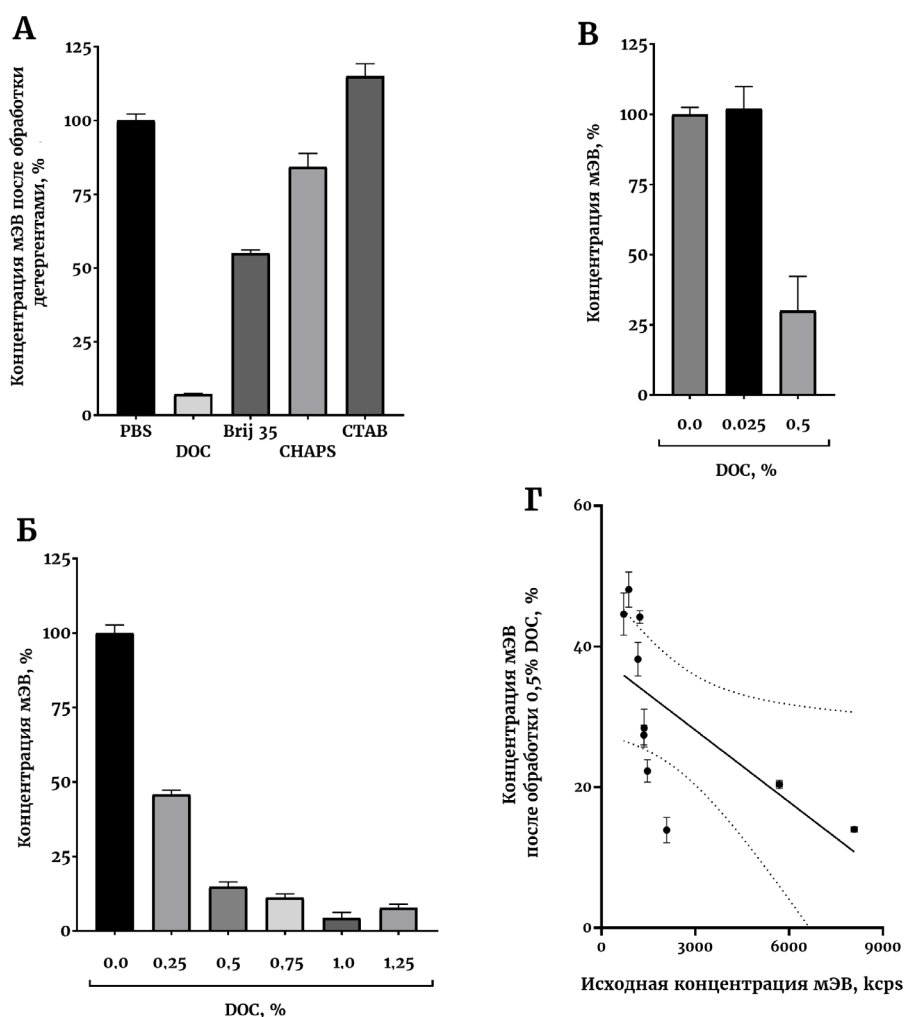


Рисунок 1. Чувствительность мЭВ к детергентам. А) концентрация мЭВ после обработки разными детергентами, среднее \pm стандартное отклонение; Б) концентрация мЭВ после обработки разными концентрациями DOC, среднее \pm стандартное отклонение; В) эффект DOC на солюбилизацию мЭВ, усредненный по восьми образцам, отличающимся по исходной концентрации мЭВ, среднее \pm стандартное отклонение; Г) эффективность солюбилизации 0.5% DOC образцов с различной исходной концентрацией мЭВ среднее \pm стандартное отклонение. Прямая линия – наилучшее приближение, пунктирная – 95% доверительный интервал.

мЭВ. Оказалось, что самым эффективным детергентом, обеспечивающим наиболее полную солюбилизацию мЭВ, является DOC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы фосфатно-солевой буфер (PBS, в таблетках, «Биолот», Россия), додецил сульфат натрия (SDS, «Serva», Германия), дезоксихолат натрия (DOC, «Calbiochem», США), додециловый эфир полиэтиленгликоля (Brij 35, «MP Biomedicals», США), 3-[(3-хлорамидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS, «MP Biomedicals»), цетил триметиламмония бромид (CTAB, «Fluka», Германия), сефароза CL-2В («GE Healthcare», США). Все растворы готовили на дважды деионизованной воде сопротивлением 18.2 Мом х см.

Материал для исследования

Материалом для исследования служила сыворотка крови человека. Забор крови у здоровых добровольцев проводили

из локтевой вены в утренние часы натощак. Известно, что на образование ЭВ оказывает влияние множество факторов [12], поэтому процедура взятия крови и преаналитический этап подготовки проб были максимально стандартизированы. Для всех проб были соблюдены одинаковые условия, а именно: время (не более 30 мин) и способ забора крови; температура в помещении между взятием крови и центрифугированием (22-23°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа.

Выделение мЭВ из сыворотки крови человека

Пробы сыворотки крови получали и очищали от остатков клеток и высокомолекулярных комплексов центрифугированием при 4°C в течение 30 мин при 10000 g. Колонку заполняли 10 мл смолы Сефароза CL-2В и уравнивали PBS. Предварительно центрифугированную сыворотку крови наносили на колонку в объеме 500 мкл, после добавления пробы наносили 2.5 мл PBS, элюат отбрасывали. После этого наносили 1 мл PBS и собирали элюат для последующего анализа. Перед очередной

пробой промывали колонку не менее чем 15 мл PBS [13]. Выделенные мЭВ хранили при -80°C .

Обработка мЭВ детергентами

К образцам мЭВ добавляли детергенты до концентрации 1% из свежеприготовленного 20% стокового раствора. Растворы всех детергентов готовили на PBS, его же использовали в качестве холостой пробы. Через 5 мин после смешивания определяли концентрацию мЭВ с помощью динамического светорассеяния. Все операции проводили на комнатной температуре.

Определение концентрации мЭВ с помощью динамического светорассеяния

Интенсивность динамического светорассеяния экзосом определяли с помощью прибора Zetasizer Nano S («Malvern Panalytical», Великобритания). В кварцевую кювету наливали мЭВ в присутствии заданной концентрации детергента и определяли светорассеяние на угол 173° на длине волны 633 нм за четыре повтора длительностью по 50 с каждый. Оборудование позволяет вычислить размер наночастиц, а также определить число рассеянных на частицах фотонов, выражаемое в тысячах фотонов в секунду (kcps). Общее число рассеянных на частицах фотонов служит параметром, отражающим концентрацию мЭВ в образце [14].

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в программе Graphpad Prism ver. 8.0. Результаты представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Для выявления взаимосвязи между переменными использовали непараметрический корреляционный анализ, представлен коэффициент корреляции Спирмена и 95% доверительный интервал. Для эксперимента по определению чувствительности мЭВ к разным детергентам было использовано 16 образцов, для остальных экспериментов по 10 образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первом эксперименте была продемонстрирована существенно различная чувствительность мЭВ к детергентам (рис. 1А). Все детергенты были использованы в концентрации 1%, что значительно превосходит критическую константу мицеллообразования для каждого из использованных детергентов. Влияние на сольubilизацию мЭВ было проверено еще для двух детергентов - SDS и Triton X-100, но 1% раствор этих детергентов в PBS обладает слишком высоким светорассеянием, так что исследовать в нем какие-либо объекты с помощью динамического светорассеяния не представляется возможным (данные не представлены). Из исследованных детергентов DOC проявил самую высокую эффективность, так что в следующем эксперименте была исследована зависимость эффективности сольubilизации от концентрации DOC (рис. 1Б). Видно, что эффективной сольubilизации можно добиться уже при концентрации DOC 0.5%. Насколько эффективна сольubilизация 0.5% DOC продемонстрировано в следующем эксперименте с использованием образцов, существенно различающихся по числу мЭВ (рис. 1В). В среднем, 0.5% DOC растворяет

75% везикул. Доля мЭВ, растворенных 0.5% DOC, зависит от исходной концентрации мЭВ в образце (рис. 1Г). Чем выше концентрация мЭВ, тем эффективнее сольubilизация, коэффициент корреляции Спирмена составил -0.93 , $p < 0.0003$. Коэффициент детерминации для данного приближения составил 0.42, что довольно неплохо.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе была решена достаточно важная экспериментальная задача - определение чувствительности мЭВ к детергентам. Задача сольubilизировать мЭВ регулярно возникает в исследованиях. Например, разделение мЭВ на мембранную и растворимую фракцию требуется для изучения внутривезикулярной ферментативной активности. В данной работе мы показали, что анионный детергент DOC в относительно небольших концентрациях способен эффективно растворять мембрану мЭВ. Неионный детергент Brij 35 в концентрации 1% растворяет примерно половину везикул (рис. 1А), что, вероятно, может подойти для определенных экспериментальных задач. Практически неэффективен для сольubilизации мЭВ цвиттерийонный детергент CHAPS, а катионный детергент СТАВ совсем не подходит для сольubilизации мЭВ. Для некоторых методов анализа анионный детергент DOC не подходит, так как существенно денатурирует белки, в таком случае для эксперимента можно рассмотреть альтернативу - Brij 35. Одним из направлений дальнейших исследований является поиск субфракций мЭВ, селективно чувствительных к разным детергентам. Работы на клеточных культурах уже есть [5], теперь можно повторить эксперименты на мЭВ крови, имея в виду, что мЭВ крови значительно устойчивее к действию детергентов, чем мЭВ из культуральной жидкости (рис. 1А). Однако, даже обладая большей устойчивостью к детергентам по сравнению с культурой, мЭВ крови также могут иметь разную чувствительность к детергентам. Например, экзосомы более устойчивы к действию многих детергентов, чем микровезикулы [5]. В работе показан воспроизводимый результат действия 0.5% DOC на образцы с разной концентрацией мЭВ (рис. 1В), но с четкой зависимостью эффективности сольubilизации от концентрации мЭВ (рис. 1Г). Эффективнее всего сольubilизация проходит при большой исходной концентрации мЭВ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность российскому представительству «Malvern Panalytical» и лично С.Л. Васину и Е.О. Дуплякину за помощь в разработке методов регистрации везикул с помощью динамического светорассеяния.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена по теме АААА-А19-119071990046-9 «Нейрогенетика» Государственного задания Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, одобрены локальным этическим комитетом Научно-практического психоневрологического

центра им. З.П. Соловьева ДЗМ (протокол заседания № 42 от 23 августа 2019 г.). От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bavisotto, C. C., Scalia, F., Gammazza, A. M., Carlisi, D., Bucchieri, F., de Macario, E. C., Macario, A. J. L., Cappello, F., Campanella, C. (2019) Extracellular Vesicle-Mediated Cell-Cell Communication in the Nervous System: Focus on Neurological Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(2), Article 434. DOI: 10.3390/ijms20020434
2. Raposo, G., Stoorvogel, W. (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.*, **200**(4), 373-383. DOI: 10.1083/jcb.201211138
3. Diaz, G., Wolfe, L. M., Kruh-Garcia, N. A., Dobos, K. M. (2016) Changes in the Membrane-Associated Proteins of Exosomes Released from Human Macrophages after Mycobacterium tuberculosis Infection. *Sci. Rep.*, **6**, Article 37975. DOI: 10.1038/srep37975
4. Castillo, J., Bernard, V., San Lucas, F. A., Allenson, K., Capello, M., Kim, D. U., Gascoyne, P., Mulu, F. C., Stephens, B. M., Huang, J., Wang, H., Momin, A. A., Jacamo, R. O., Katz, M., Wolff, R., Javle, M., Varadhachary, G., Wistuba, II, Hanash, S., Maitra, A., Alvarez, H. (2018) Surfaceome profiling enables isolation of cancer-specific exosomal cargo in liquid biopsies from pancreatic cancer patients. *Ann. Oncol.*, **29**(1), 223-229. DOI: 10.1093/annonc/mdx542
5. Osteikoetxea, X., Sodar, B., Nemeth, A., Szabo-Taylor, K., Palocz, K., Vukman, K. V., Tamasi, V., Balogh, A., Kittel, A., Pallinger, E., Buzas, E. I. (2015) Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **13**(38), 9775-9782. DOI: 10.1039/c5ob01451d
6. Martelli, F., Macera, L., Spezia, P. G., Medici, C., Pistello, M., Guasti, D., Romagnoli, P., Maggi, F., Giannecchini, S. (2018) Torquetenovirus detection in exosomes enriched vesicles circulating in human plasma samples. *Virology Journal*, **15**, Article 145. DOI: 10.1186/s12985-018-1055-y
7. Kumeda, N., Ogawa, Y., Akimoto, Y., Kawakami, H., Tsujimoto, M., Yanoshita, R. (2017) Characterization of Membrane Integrity and Morphological Stability of Human Salivary Exosomes. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**(8), 1183-1191. DOI: 10.1248/bpb.b16-00891
8. Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lattekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinke, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rinke, T., Fazeli, A. (2020) Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega*, **5**(27), 16701-16710. DOI: 10.1021/acsomega.0c01582
9. Cunnane, E. M., Lorentz, K. L., Ramaswamy, A. K., Gupta, P., Mandal, B. B., O'Brien, F. J., Weinbaum, J. S., Vorp, D. A. (2020) Extracellular Vesicles Enhance the Remodeling of Cell-Free Silk Vascular Scaffolds in Rat Aortae. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **12**(24), 26955-26965. DOI: 10.1021/acsaami.0c06609
10. Tian, Y., Gong, M. F., Hu, Y. Y., Liu, H. S., Zhang, W. Q., Zhang, M. M., Hu, X. X., Aubert, D., Zhu, S. B., Wu, L., Yan, X. M. (2020) Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle isolation methods by nano-flow cytometry. *J. Extracell. Vesicles*, **9**(1), Article 1697028. DOI: 10.1080/20013078.2019.1697028
11. Subedi, P., Schneider, M., Philipp, J., Azimzadeh, O., Metzger, F., Moertl, S., Atkinson, M. J., Tapio, S. (2019) Comparison of methods to isolate proteins from extracellular vesicles for mass spectrometry-based proteomic analyses. *Anal. Biochem.*, **584**, Article 113390. DOI: 10.1016/j.ab.2019.113390
12. Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvald, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., Hochberg, F. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles*, **2**(1), 20360. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360
13. Gamez-Valero, A., Monguio-Tortajada, M., Carreras-Planella, L., Marcel-la, F., Beyer, K., Borrás, F. E. (2016) Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci. Rep.*, **6**, Article 33641. DOI: 10.1038/srep33641
14. Yakovlev, A. A., Druzhkova, T. A., Nikolaev, R. V., Kuznetsova, V. E., Gruzdev, S. K., Guekht, A. B., Gulyaeva, N. V. (2019) Elevated Levels of Serum Exosomes in Patients with Major Depressive Disorder. *Neurochemical Journal*, **13**(4), 385-390. DOI: 10.1134/s1819712419040044

Поступила: 03.12.2020

После доработки: 15.12.2020

Принята к публикации: 15.12.2020

SENSITIVITY OF EXTRACELLULAR VESICLES FROM HUMAN BLOOD SERUM TO VARIOUS DETERGENTS

A.A. Yakovlev^{1,2*}, T.A. Druzhkova², A.B. Guekht², N.V. Gulyaeva^{1,2}

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS,
5A Butlerova str., Moscow, 117485 Russia; *e-mail: al_yakovlev@ihna.ru

²Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z.P. Solovy'ov DZM,
43 Donskaya str., Moscow, 115419 Russia

Blood exosomes and microvesicles, collectively known as small extracellular vesicles (sEV), are vesicles about 100-150 nm in size. Small EV are involved in various aspects of signaling in the body; in addition, they can serve as markers of various pathologies. For biochemical studies, vesicle solubilization is often required. We tested the ability of various detergents to dissolve membranes of the sEV. Small EV were isolated from the blood serum of healthy volunteers by gel filtration on Sepharose CL-2B and tried to solubilize them using the anionic detergent DOC (sodium deoxycholate), non-ionic detergent Brij 35 (polyoxyethyleneglycol dodecyl ether), zwitterionic detergent CHAPS (3 - [(3-chloramidopropyl) dimethylammonio] -1-propanesulfonate), and cationic detergent CTAB (cetyl trimethylammonium bromide). The concentration of sEV in the solution was determined by dynamic light scattering. We find DOC is the most effective for sEV solubilization.

Key words: exosomes; microvesicles; blood serum; dynamic light scattering; detergents

FUNDING

The work was carried out within the topic AAAA-A19-119071990046-9 «Neurogenetics» of the State Assignment of the Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS.

Received: 03.12.2020, revised: 15.12.2020, accepted: 15.12.2020