ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 576:001.891.53

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ РАЗЛИЧНОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Вельмискина А. А.[1], Калинина О. В.[1], Петрова Т. А.[1], Никитин Ю. В.[2], Головкин А. С.[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:
Вельмискина Анастасия Александровна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341.
E-mail: velmiskina96@mail.ru

Статья поступила в редакцию 04.04.2022 и принята к печати 19.04.2022.

РЕЗЮМЕ

Внеклеточные везикулы — это гетерогенная группа частиц, окруженных фосфолипидным бислоем и имеющих диаметр от 30 нм до 5 мкм. В последние годы активно изучается участие внеклеточных везикул в патогенезе многих заболеваний, а также возможности их применения в диагностике и терапии. Известно, что везикулы могут переносить нуклеиновые кислоты, в частности микро-РНК, мРНК и т.д., чем зачастую обусловлено их участие в регуляции многих патологических и физиологических процессов в организме, а также в межклеточной кооперации. Репертуар переносимых везикулами микро-РНК может значительно меняться в зависимости от их клеточного происхождения и функционального состояния клеток. Для изучения роли переносимых внеклеточными везикулами микро-РНК необходимы разработка и валидация новых подходов по целевому получению этих объектов с последующим изучением переносимого ими груза. Целью данного исследования являлось определение возможности использования метода высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортинга для получения единичных внеклеточных везикул с заданным фенотипом из образцов плазмы крови. Из образцов плазмы крови здоровых доноров методом высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортинга получали стандартное количество везикул тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения с фенотипом CD41+CD235a- и CD41-CD235a+, соответственно, с ранжированием от 1 до 15 625 шт. в пробе. Методом количественной ПЦР оценивали уровень miR-451a, miR-199a-3p, miR-21-5p во всех

образцах отсортированных везикул. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для определения уровня микро-РНК во внеклеточных везикулах, независимо от их клеточного происхождения, количество частиц в образце должно быть более 3125. При этом, учитывая высокую вариабельность количества конкретных микро-РНК в зависимости от клеточного происхождения везикул, целесообразно уточнять целевой порог внеклеточных везикул при проведении каждого отдельного эксперимента.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг, микро-РНК, количественная ПЦР.

Для цитирования: Вельмискина А.А., Калинина О.В., Петрова Т.А., Никитин Ю.В., Головкин А.С. Методология исследования единичных внеклеточных везикул различного клеточного происхождения. Российский журнал персонализированной медицины. 2022;2(3):101-110. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-101-110

METHODOLOGY TO STUDY SINGLE EXTRACELLULAR VESICLES OF VARIOUS CELLULAR ORIGIN

Velmiskina A. A.[1], Kalinina O. V.[1], Petrova T. A.[1], Nikitin Yu. V.[2], Golovkin A. S.[1]

[1] Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia
[2] Military Medical Academy named after S. M. Kirov, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:
Velmiskina Anastasia A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia, 197341.
E-mail: velmiskina96@mail.ru

Received 04 April 2022; accepted 19 April 2022.

ABSTRACT

Extracellular vesicles are a heterogeneous group of particles surrounded by a phospholipid bilayer and having a diameter from 30 nm to 5 microns. In recent years, the involvement of extracellular vesicles in the pathogenesis of many diseases, as well as the possibility of their use in diagnosis and therapy, has been actively studied. It is known that vesicles can carry nucleic acids, in particular micro-RNA, mRNA, etc., what often leads to their participation in the regulation of many pathological and physiological processes in the body, as well as in intercellular cooperation. The repertoire of micro-RNAs carried by vesicles can vary significantly depending on their cellular origin and the functional state of the cells. To study the role of micro-RNAs carried by extracellular vesicles, it is necessary to develop and validate new approaches for the targeted production of these objects, followed by the study of the cargo

carried by them. The purpose of this study was to determine the possibilities of using the method of highly sensitive fluorescence-activated sorting to obtain single extracellular vesicles with a given phenotype from blood plasma samples. A standard number of platelet and erythrocyte vesicles with the phenotype CD41+CD235a- and CD41-CD235a+, respectively, with a ranking from 1 to 15,625 pieces per sample were obtained from blood plasma samples of healthy donors by highly sensitive fluorescence-activated sorting. The level of miR-451a, miR-199a-3p, miR-21-5p in all samples of sorted vesicles was assessed by quantitative PCR. The obtained results indicate that to determine the level of micro-RNA in extracellular vesicles, regardless of their cellular origin, the number of particles in the sample should be more than 3125. At the same time, given the high variability of the number of specific micro-RNAs depending on the cellular origin of the vesicles, it is advisable to specify the target threshold of extracellular vesicles during each individual experiment.

Key words: extracellular vesicles, highly sensitive fluorescence-activated sorting, micro-RNA, quantitative PCR.

For citation: Velmiskina AA, Kalinina OV, Petrova TA, Nikitin YuV, Golovkin AS. Methodology to study single extracellular vesicles of various cellular origin. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(3):101-110. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-3-101-110

Список сокращений: ВВ — внеклеточные везикулы, ПЭГ — полиэтиленгликоль, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) — раствор Дальбекко.

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы — это гетерогенная группа частиц, окруженных фосфолипидным бислоем и имеющих диаметр от 30 нм до 5 мкм [1]. Данные объекты, обнаруженные во всех биологических жидкостях организма, различаются между собой по размерам, происхождению и молекулярному содержимому [2]. Традиционно выделяют три основных типа внеклеточных везикул: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [3, 4]. Экзосомы — это частицы диаметром 30–100 нм, образованные инвагинацией эндосомальной мембраны внутрь и слиянием мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной. Микровезикулы имеют размер 50–1000 нм и образуются путем отпочковывания непосредственно от плазматической мембраны здоровых клеток. Апоптотические тельца представляют собой фрагменты погибших клеток, образующиеся в результате их разборки на заключительной стадии апоптоза и имеющие диаметр 1–5 мкм. Помимо указанных терминов для обозначения типов внеклеточных везикул в литературе используются такие понятия, как микрочастицы, эктосомы, онкосомы и др. Внеклеточные везикулы несут различные биомолекулы, включая кодирующие и некодирующие РНК, ДНК, белки, липиды, метаболиты [3, 5–7].

В последнее время интерес к изучению внеклеточных везикул повышается в связи с расширением знаний об их функциях и участии в физиологических и патологических процессах [8]. Установлено, что внеклеточным везикулам принадлежит ведущая роль в межклеточной коммуникации [9]. Сигнальную функцию они осуществляют двумя путями: первый связан с передачей информации клеткам-реципиентам путем прямого контакта через поверхностные лиганды, второй — с переносом биологически активных молекул в клетки-мишени [3]. Примерами процессов, в которых задействованы эти механизмы, являются эмбриональное развитие, дифференцировка клеток, поддержание гомеостаза, репарация, иммунный ответ, старение, канцерогенез, развитие сердечно-сосудистых нарушений и т. д. [10]. Таким образом, изучение внеклеточных везикул позволяет получить новые знания о звеньях патогенеза различных заболеваний. Кроме того, все больше исследований раскрывают диагностический и терапевтический потенциал внеклеточных везикул [6].

Особое внимание уделяется роли внеклеточных везикул в патогенезе, диагностике и лечении он-

кологических заболеваний. Установлено, что везикулы поддерживают микроокружение опухоли и способствуют ее прогрессированию посредством участия в ангиогенезе, повышении сосудистой проницаемости, формировании предметастатических ниш, подавлении иммунного ответа, развитии лекарственной устойчивости, эпителиально-мезенхимальном переходе и др. [11]. Анализ маркеров, которые несут внеклеточные везикулы, может быть использован для ранней диагностики и определения прогноза онкологических заболеваний. Например, возможна идентификация характерных для неоплазий различной локализации мутаций в ДНК, содержащихся в везикулах, полученных из материала жидкостной биопсии [11]. Так, в ДНК, содержащихся в экзосомах, циркулирующих в периферической крови пациентов с раком поджелудочной железы, определяются мутации в генах KRAS и TP53, являющихся протоонкогеном и онкосупрессором соответственно [12]. Также показана возможность терапевтического применения внеклеточных везикул для доставки химиотерапевтических препаратов и опухолесупрессорных микро-РНК [11].

Изучается роль внеклеточных везикул при нейродегенеративных заболеваниях. Предполагается, что внеклеточные везикулы являются носителями и распространителями ассоциированных с заболеваниями неправильно свернутых белков [13]. На трансгенных мышах, моделирующих болезнь Альцгеймера, было показано, что распространение гиперфосфорилированного тау-белка, образующего нейрофибриллярные клубки, которые разрушают внутриклеточную архитектуру лимбических и корковых нейронов, происходит за счет высвобождения экзосом, а подавление высвобождения внеклеточных везикул препятствует увеличению уровня этого белка как в клеточной культуре, так и на мышиной модели [14]. Эти знания не только раскрывают дополнительные звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний, но и дают новые возможности для диагностики [13]. Кроме того, активно ведутся разработки терапевтических подходов с применением внеклеточных везикул за счет их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер [6, 15].

В ряде исследований показана роль внеклеточных везикул в развитии метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний [16–19]. Обнаружено, что они переносят метаболиты и облегчают межклеточную коммуникацию путем обмена микро-РНК между β-клетками поджелудочной железы, жировой тканью, скелетными мышцами и печенью [16]. Продемонстрировано участие экзосом в возникновении и прогрессировании таких заболеваний, как атеросклероз, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатии, клапанная болезнь сердца, легочная гипертензия [17, 18]. Например, установлено, что внеклеточные везикулы, образованные из атеросклеротической бляшки, переносят молекулы адгезии (ICAM-1) к эндотелиальным клеткам, что ведет к прогрессированию атеросклеротического поражения артерий за счет рекрутирования моноцитов [19]. Существуют также потенциальные терапевтические подходы, основанные на применении везикул при заболеваниях сердца. Появляется все больше данных, свидетельствующих о защитных и репаративных свойствах экзосом, полученных из стволовых клеток, что указывает на возможность их использования для лечения различных сердечно-сосудистых заболеваний [20].

Возросшая потребность в исследовании внеклеточных везикул привела к разработке различных методов их выделения. Наиболее широко используемым подходом является дифференциальное центрифугирование, основанное на разной скорости оседания частиц, отличающихся по размеру, в процессе которого возрастает на каждом последующем этапе скорость и длительность центрифугирования. Для разделения различных внеклеточных везикул по размеру и плотности применяется метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности, при котором на первом этапе проводят центрифугирование при скорости 10 000 g, на втором этапе — в градиенте плотности какого-либо вещества, например йодиксанола, при скорости более 100 000 g. Методика выделения с использованием ПЭГ заключается в смешивании образца с ПЭГ-содержащим раствором и последующем центрифугировании при 10 000 g. Другим подходом является эксклюзионная хроматография, направленная на разделение частиц в зависимости от их гидродинамического диаметра. Образец пропускают через колонку, содержащую пористую неподвижную фазу, в которой более мелкие частицы (например, липополисахариды высокой плотности) замедляются, а более крупные частицы (например, внеклеточные везикулы) свободно проходят. Существуют другие методы получения внеклеточных везикул (фильтрация, проточное фракционирование в поперечном поле, ионообменные методы, электрофорез, микрофлюидные технологии, аффинная хроматография и иммуноаффинный захват на магнитных шариках), однако большинство из них основаны на физических и физико-химических свойствах частиц и не учитывают их фенотип и клеточное происхождение [21, 22]. В настоящее время золотым стандартом при

выделении ВВ является дифференциальное центрифугирование и ультрацентрифугирование.

Для наиболее информативного анализа состава внеклеточных везикул необходимо их разделение на субпопуляции, в том числе в зависимости от их клеточного происхождения [22]. Самым перспективным методом для этих целей является высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг, основанный на проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченых антител против поверхностных маркеров везикул [23]. Данный подход применялся в нескольких исследованиях для выделения субпопуляций внеклеточных везикул из кондиционированной клеточной среды, спинномозговой жидкости, слез и плазмы крови [24–27]. В одном из этих исследований с помощью данного подхода удалось получить везикулы, несущие на своей поверхности маркер CD9+ и изоформы рецептора эпидермального фактора роста [24]. Основным преимуществом высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортинга является возможность выделения внеклеточных везикул с заданным фенотипом, в том числе несущих более одного поверхностного маркера, и клеточным происхождением [26]. Кроме того, данный метод позволяет собрать заданное количество частиц, что делает возможным исследование даже единичных внеклеточных везикул.

Большой интерес представляет изучение спектра нуклеиновых кислот, содержащихся во внеклеточных везикулах. Это связано со значительным разнообразием профилей нуклеиновых кислот во внеклеточных везикулах как в зависимости от их клеточного происхождения, так и от активности и состояния определенных клеток [28, 29]. Особое значение имеет исследование репертуара микро-РНК, одного из основных классов малых некодирующих РНК, широко представленного в везикулах. Данные молекулы считаются ключевыми функциональными элементами межклеточной коммуникации, опосредованной внеклеточными везикулами. Они могут напрямую взаимодействовать с матричной РНК (мРНК), регулируя уровень экспрессии генов-мишеней, а также могут выступать в качестве лигандов Toll-like-рецепторов, активируя иммунные клетки, что показано на перитонеальных макрофагах мышей и мононуклеарных клетках периферической крови человека [30, 31]. Установлено их участие не только в физиологических процессах, но и в патогенезе различных заболеваний. Так, повышенный уровень циркулирующей экзосомальной микро-РНК miR-21 ассоциирован с глиобластомой, раком поджелудочной железы, пищевода, толстой кишки, печени, молочной железы и яичников [6]. Исследование профилей микро-РНК в везикулах при различных состояниях открывает потенциал для их применения в качестве диагностических биомаркеров и терапевтических агентов [32]. Специфичность репертуаров микро-РНК в зависимости от источника везикул и от наличия того или иного заболевания подтверждается во множестве исследований, на основе полученных результатов создаются базы данных профилей микро-РНК, содержащихся во внеклеточных везикулах. Например, база данных EVmiRNA создана на основе 462 образцов секвенирования микро-РНК везикул, полученных из 17 различных источников и при разных патологиях. Она предоставляет пользователю возможность ознакомиться с профилями экспрессии микро-РНК в образцах везикул различного происхождения (кровь, кишечник и т.д.) и различного типа внеклеточных везикул (экзосомы, микровезикулы), а также содержит информацию о каждой микро-РНК, включая уровни экспрессии, функции, регуляторные пути, и связанные публикации [33, 34].

Таким образом, значимость и перспективность дальнейшего изучения внеклеточных везикул для разработки алгоритмов диагностики и терапевтических подходов не вызывает сомнений. В связи с этим в последнее время особое внимание уделяется разработкам и апробациям методик исследований единичных внеклеточных везикул различного клеточного происхождения и фенотипа. Целью данного исследования было определение возможности использования метода высокочувствительного флуоресцентно-активированного сортинга для получения единичных внеклеточных везикул с заданным фенотипом из образцов плазмы крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы плазмы крови

Образцы периферической крови собирали натощак из локтевых вен условно здоровых добровольцев (11 мужчин и 11 женщин в возрасте 18–55 лет) в вакуумные пробирки, содержащие K_3ЭДТА (Vacutest KIMA, Италия). Все исследования были проведены в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрены Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Получение фракции плазмы, содержащей внеклеточные везикулы

Фракцию плазмы крови, содержащую внеклеточные везикулы, получали из цельной крови методом трехкратного последовательного центрифуги-

рования на первых двух этапах при 1500 g в течение 10 мин, на третьем, заключительном, этапе при 3000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант пропускали через фильтр (Millex-AA, Merck Millipore, Ирландия) с размером пор 0,8 мкм для удаления возможных клеточных остатков, после чего образцы пулировали и аликвотировали для проведения дальнейшего анализа внеклеточных везикул.

Высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг

Иммунофлуоресцентное окрашивание внеклеточных везикул проводили с использованием антител анти-CD235a (гликофорин A RPE, R7078, Dako (Agilent), США) и анти-CD41-FITC (тромбоцитарный гликопротеин IIb, F7088, Dako (Agilent), США) в качестве маркеров, специфичных для эритроцитов и тромбоцитов соответственно. 100 мкл полученной фракции плазмы окрашивали с 1 мкл соответствующего антитела с концентрацией 1 нг/мкл в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Непосредственно перед проведением сортировки внеклеточных везикул окрашенную плазму разбавляли в 10 раз раствором Дальбекко (DPBS) без Ca и Mg («БиолоТ», Россия).

Высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг везикул осуществляли на клеточном сортере MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, США), оснащенном лазерами 405 нм (55 мВт), 488 нм (200 мВт) и 645 нм (100 мВт), а также стандартным набором фильтров, оптимизированных для каждого лазера. Настройка и дальнейшая сортировка выполнялись с использованием насадки Jet-in-air размером 70 мкм, давления 59,7–60 фунтов на кв. дюйм для проточной жидкости IsoFlow (Beckman Coulter, США) и 60,9–61,1 фунтов на кв. дюйм для подачи образца. Гейты для сортинга строили с учетом контрольных экспериментов, проведенных ранее [35].

Для настройки порогового значения FSC использовали наборы эталонных полистироловых шариков, меченных FITC, Megamix-Plus FSC (100, 300, 500 и 900 нм) (Ref.7802, BioCytex, Франция) и Megamix-Plus SSC (160, 200, 240 и 500 нм) (Ref.7803, BioCytex, Франция). Минимальный детектируемый размер шариков составил 200 нм. Сортировку каждой субпопуляции внеклеточных везикул производили, линейно увеличивая их концентрацию от минимума (1 событие) до максимума (15 625 событий). Для каждой клеточной популяции внеклеточных везикул было отсортировано семь различных количеств событий (1, 5, 25, 125, 625, 3125 и 15 625 событий) в четырехкратных технических повторах. После сортировки объемы полученных образцов доводили DPBS до 100 мкл и замораживали при -80 °C для выделения РНК.

Идентификация микро-РНК методом количественной RT-PCR в реальном времени

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента Trizol LS (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительно в качестве универсального внутреннего контроля на первом этапе выделения РНК в лизирующий буфер добавляли РНК-олигонуклеотид synth-cel-miR-39-3p (5’-ucaccggguguaaaucagcuug-3’, 5 фмоль/мл, «Синтол», Россия). Осадок тотальной РНК растворяли в 20 мкл деионизированной воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (D5758, Sigma Aldrich, США).

Реакцию обратной транскрипции выполняли с использованием набора TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies; каталожный номер 4366596) в термоциклере Veriti (Applied Biosystems, США) при 42 °C в течение 30 мин. В качестве праймеров в реакционную смесь добавляли микро-РНК-специфические петлевые праймеры из набора TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, США) к следующим целевым микро-РНК: miR-39-3p (ID зонда: 000200), miR-451a (ID зонда: 001141), miR-199a-3p (ID зонда: 002304), miR-21-5p (ID зонда: 000397).

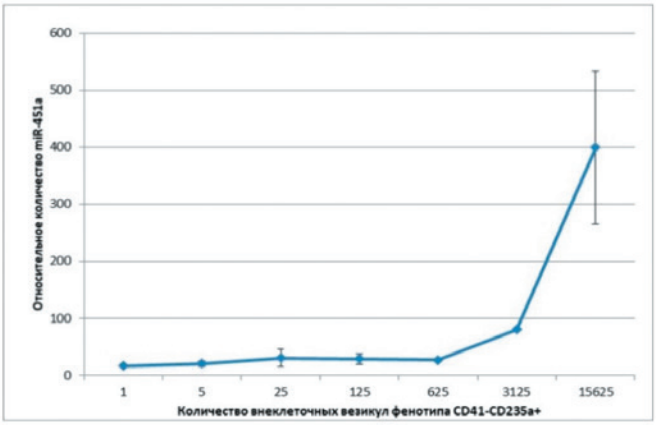
Количественную ПЦР проводили с использованием реагента TaqMan Universal Master Mix II (Life Technologies, США; каталожный номер 4440040), прямого и обратного праймера и гидролизного зонда из набора TaqMan MicroRNA Assay (Life Technologies, США), согласно инструкции производителя, на приборе 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, США).

Данные по Cq (quantification cycle), полученные для каждого образца, были нормализованы по данным Cq РНК-олигонуклеотида synth-miR-39-3p. Каждое нормализованное значение Cq рассчитывали по формуле:

$$Cq\ miR_norm = Cq\ miR - (Cq\ miR\text{-}39 - Cq\ miR\text{-}39_median),$$

где Cq miR — это Cq целевой микро-РНК в этом образце, Cq miR-39 — Cq miR-39-3p в этом образце, а Cq miR-39_median — медианное значение Cq miR-39-3p по всем образцам. Относительные уровни целевой микро-РНК рассчитывали по формуле: $2^{(Cq\ no_template - Cq\ sample)}$, где Cq no_template — это Cq в реакции без добавления образца, а Cq sample — это Cq в реакции с соответствующим образцом.

a



b

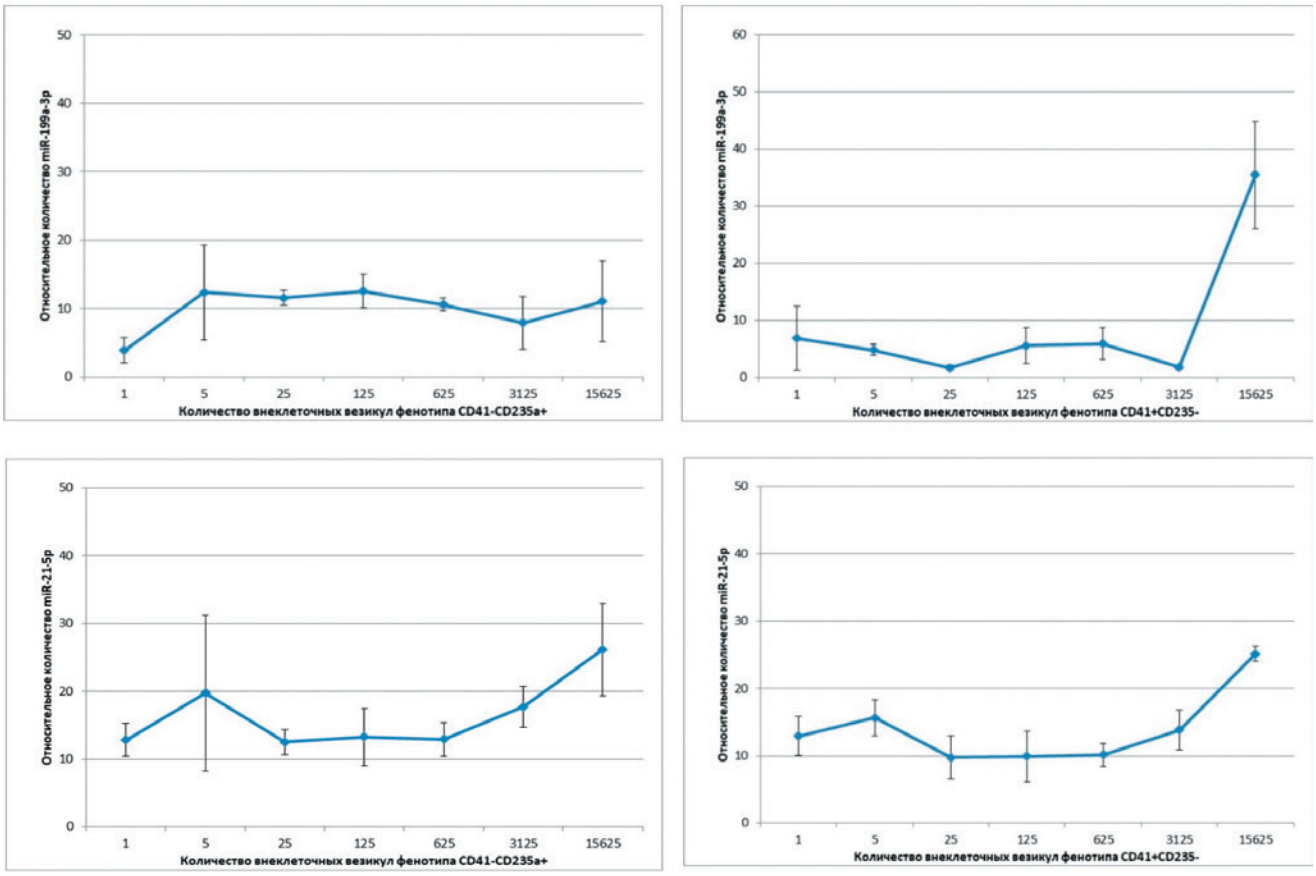


Рис. 1. Относительное количество микро-РНК miR-451a, miR-199a-3p, miR-21 в о внеклеточных везикулах различного фенотипа:

a) CD41-CD235+ эритроцитарного;

b) CD41+CD235- тромбоцитарного происхождения

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты представлены в виде среднего, рассчитанного на основании не менее трех технических повторов, и стандартной ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нашей группой было проведено изучение спектра нуклеиновых кислот отдельных субпопуляций внеклеточных везикул плазмы крови, полученных методом высокочувствительного флуоресцент-

но-активированного сортинга на основании 40 000 событий, каждое из которых соответствовало одному из фенотипов CD41+CD235a- или CD41-D235a+ [35]. В результате была выявлена гетерогенность состава нуклеиновых кислот во ВВ, имеющих разное клеточное происхождение. Субпопуляция ВВ CD41+CD235- тромбоцитарного происхождения по сравнению с таковой CD41-CD235a+ эритроцитарного происхождения содержала значительно большее количество miR-21-5p (в 4 раза, p = 0,004), miR-223-3p (в 38 раз, p = 0,004) и miR-199a-3p (в 187 раз, p = 0,004), митохондриальной ДНК, но меньшее количество miR-451a [35].

Такое значительное количество событий, используемое для получения фенотип-специфических субпопуляций ВВ, не всегда может быть достигнуто в каждом изучаемом образце, что обусловливает ограничения при изучении малых количеств некодирующих РНК в определенных субпопуляциях ВВ, имеющих низкую презентацию в циркуляции.

В данном исследовании серия проб с линейно возрастающим количеством событий, используемых для выделения ВВ, дала возможность определить количество событий при сортировке ВВ плазмы крови, позволяющее детектировать наличие микро-РНК в образце. Исходя из ранее полученных результатов по количеству разных микро-РНК в субпопуляциях ВВ CD41+CD235- и CD41-CD235a+ тромбоцитарного и эритроцитарного происхождения, соответственно [35], для анализа динамики изменения относительного количества микро-РНК в отсортированных ВВ были выбраны три микро-РНК: miR-451a, miR-199a-3p, miR-21-5p. Как видно из рисунка 1, относительное количество miR-451a в обеих субпопуляциях ВВ как CD41-CD235a+ эритроцитарного, так и CD41+CD235a- тромбоцитарного происхождения в образцах, содержащих от 1 до 625 частиц (событий), изменяется незначительно и нелинейно, однако заметно возрастает в образце, содержащем 3125 частиц, и имеет значительный подъем в образце, содержащем 15 625 событий. Динамика изменения относительного количества miR-199a-3p в субпопуляции CD41+CD235a- тромбоцитарного происхождения в образцах, содержащих от 1 до 625 частиц, аналогична динамике miR-451a; тогда как значительное увеличение наблюдается только в образце, содержащем 15 626 частиц. При этом в субпопуляции CD41-CD235a+ эритроцитарного происхождения не наблюдалось динамики изменений относительного уровня miR-21 в зависимости от количества частиц в исследуемом образце. В свою очередь, динамика изменений относительного количество miR-21 в обеих субпопуляциях ВВ была сопоставима во всех образцах. Значительное увеличение, как и в случае с miR-451a, регистрировалось только в образце, содержащем 15 625 частиц.

Расхождение по уровню микро-РНК в зависимости от количества ВВ и клеточного происхождения, вероятно, связано с тем, что частицы, имеющие одинаковое клеточное происхождение и, соответственно, определенный фенотип, могут нести разные биомаркеры, количество которых может варьировать в зависимости от процессов, протекающих как внутри клетки, так и на организменном уровне. Индивидуальный профиль везикул различается не только в зависимости от клеточного происхождения, но и от состояния клеток [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высокочувствительный флуоресцентно-активированный сортинг является перспективным методом выделения единичных внеклеточных везикул с заданным фенотипом. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для определения уровня микро-РНК во внеклеточных везикулах, независимо от их клеточного происхождения, количество частиц в образце должно быть более 3125. При этом, учитывая высокую вариабельность количества конкретных микро-РНК в зависимости от клеточного происхождения везикул, целесообразно уточнять целевой порог внеклеточных везикул при проведении каждого отдельного эксперимента.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ /REFERENCES

1. Harrison P, Gardiner C, Sargent IL. Extracellular vesicles.

2. Willms E, Johansson HJ, Mäger I, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. Sci Rep; 6. Epub ahead of print 2 March 2016. DOI: 10.1038/SREP22519.

3. Teng F, Fussenegger M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. Adv Sci 2021; 8: 2003505.

4. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell vesicles; 7. Epub ahead of print 1 January 2018. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.

5. Gurunathan S, Kang MH, Qasim M, et al. Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, nd Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. Int J Nanomedicine 2021; 16: 3357.

6. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science; 367. Epub ahead of print 7 February 2020. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAU6977.

7. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. Biology (Basel); 9. Epub ahead of print 1 January 2020. DOI: 10.3390/BIOLOGY9010021.

8. Niel G Van, Angelo GD, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. Nat Publ Gr. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.

9. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. Nat Cell Biol 2019; 21: 9–17.

10. Simeone P, Bologna G, Lanuti P, et al. Extracellular Vesicles as Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. Int J Mol Sci; 21. Epub ahead of print 1 April 2020. DOI: 10.3390/IJMS21072514.

11. Abhange K, Makler A, Wen Y, et al. Small extracellular vesicles in cancer. Bioact Mater 2021; 6: 3705.

12. Yang S, Che SPY, Kurywchak P, et al. Detection of mutant KRAS and TP53 DNA in circulating exosomes from healthy individuals and patients with pancreatic cancer. Cancer Biol Ther 2017; 18: 158.

13. Hill AF. Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. J Neurosci 2019; 39: 9269.

14. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. Nat Neurosci 2015; 18: 1584.

15. Cooper JM, Wiklander PBO, Nordin JZ, et al. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. Mov Disord 2014; 29: 1476.

16. Guay C, Regazzi R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. Diabetes Obes Metab 2017; 19 Suppl 1: 137–146.

17. Zhang Y, Hu YW, Zheng L, et al. Characteristics and Roles of Exosomes in Cardiovascular Disease. https://home.liebertpub.com/dna 2017; 36: 202–211.

18. Jadli AS, Parasor A, Gomes KP, et al. Exosomes in Cardiovascular Diseases: Pathological Potential of Nano-Messenger. Front Cardiovasc Med 2021; 0: 1483.

19. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. Circ Res 2011; 108: 335–343.

20. Yuan Y, Du W, Liu J, et al. Stem Cell-Derived Exosome in Cardiovascular Diseases: Macro Roles of Micro Particles. Front Pharmacol 2018; 9: 547.

21. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Andresen TL, et al. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer 2019; 1871: 109–116.

22. Liangsupree T, Multia E, Riekkola ML. Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. J Chromatogr A 2021; 1636: 461773.

23. Kormelink TG, Arkesteijn GJA, Nauwelaers FA, et al. Prerequisites for the analysis and sorting of extracellular vesicle subpopulations by high-resolution flow cytometry. Cytometry A 2016; 89: 135–147.

24. Higginbotham JN, Zhang Q, Jeppesen DK, et al. Identification and characterization of EGF receptor in individual exosomes by fluorescence-activated vesicle sorting. J Extracell Vesicles; 5. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.3402/jev.v5.29254.

25. Cao Z, Li C, Higginbotham JN, et al. Use of Fluorescence-activated Vesicle Sorting for Isolation of Naked2-associated, Basolaterally Targeted Exocytic Vesicles for Proteomics Analysis. Mol Cell Proteomics 2008; 7: 1651.

26. Atkin-Smith GK, Paone S, Zanker DJ, et al. Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. Sci Reports 2017 71 2017; 7: 1–7.

27. Pieragostino D, Lanuti P, Cicalini I, et al. Proteomics characterization of extracellular vesicles sorted by flow cytometry reveals a disease-specific molecular cross-talk from cerebrospinal fluid and tears in multiple sclerosis. J Proteomics; 204. Epub ahead of print 30 July 2019. DOI: 10.1016/J.JPROT.2019.103403.

28. Tkach M, Kowal J, Théry C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci; 373. Epub ahead of print 5 January 2018. DOI: 10.1098/RSTB.2016.0479.

29. Ferguson SW, Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. J Control Release 2016; 228: 179–190.

30. Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. Genomics Proteomics Bioinformatics 2015; 13: 17.

31. Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109: E2110.

32. Veziroglu EM, Mias GI. Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. Front Genet; 11. Epub ahead of print 17 July 2020. DOI: 10.3389/FGENE.2020.00700.

33. Murillo OD, Thistlethwaite W, Rozowsky J, et al. ExRNA Atlas Analysis Reveals Distinct Extracellular

RNA Cargo Types and Their Carriers Present Across Human Biofluids. Cell 2019; 177: 463.

34. Liu T, Zhang Q, Zhang J, et al. EVmiRNA: a database of miRNA profiling in extracellular vesicles. Nucleic Acids Res 2019; 47: D89.

35. 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 Extracell Vesicles; 9. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1080/20013078.2020.1743139.

Информация об авторах:

Вельмискина Анастасия Александровна, лаборант-исследователь Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Калинина Ольга Викторовна, д.б.н., профессор кафедры лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Петрова Татьяна Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Никитин Юрий Владимирович, ассистент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Минобороны России;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Velmiskina Anastasia A., Research Assistant, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Kalinina Olga V., Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Medical Education Institute, Almazov National Medical Research Centre Leading Researcher of the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine;

Petrova Tatyana A., Ph.D., Senior Researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Nikitin Yury V., assistant of the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Military Medical Academy named after S. M. Kirov;

Golovkin Aleksey S., Doctor of Medical Sciences, Head of the Genetic Cell Engineering Group of the Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre.