

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК НОСИТЕЛИ ХОЛЕСТЕРИНА, НЕ СВЯЗАННОГО С ЛИПОПРОТЕИНАМИ

Ланда С.Б.<sup>1,2</sup>, Верлов Н.А.<sup>1</sup>, Филатов М.В.<sup>1</sup>, Бурдаков В.С.<sup>1</sup>, Эмануэль В.Л.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский Институт»  
мкр. Орлова роща, д. 1, г. Гатчина Ленинградская обл. 188300, РФ,

<sup>2</sup>СПБГМУ им И.П. Павлова

ул. Льва Толстого 9, г. Санкт-Петербург, 197022, РФ

Поступила в редакцию: 05.07.2021

**Аннотация.** Внеклеточные везикулы (ВВ) – Микрочастицы размером от десятка нанометров до микрона, обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях. К микрочастицам относятся внеклеточные везикулы (ВВ) – частицы размером менее 120 нм, микровезикулы – частицы от 100 до 250 нм и апоптотические тела – частицы крупнее 200 нм. Значительный интерес представляют ВВ, включающие в себя экзосомы и экзомеры, поскольку являются биологическими маркерами состояния клеток, что может быть использовано для диагностики, выполняют регуляторные функции и могут участвовать в межклеточной сигнализации. Номенклатура экзосом остается недостаточно разработанной. Большинство исследователей пытаются классифицировать их, основываясь на способе образования, физико-химических характеристиках (размеру, плотности и т.п.) и наличию тетраспориновых маркеров CD9, CD63 и CD81. Хотя нами еще 2010 году с помощью метода динамического светорассеяния, было показано, что гистограмма распределения экзосом по размерам (PSD) бимодальна: ВВ делятся на две фракции, имеющие средние размеры порядка 25 и 90 нм, только в 2018 г. методом фракционирования в силовом поле (*asymmetric flow field-flow fractionation – a4f*) было выявлено два подтипа экзосом, а также частицы, с размером менее 50 нм, которым дали название «экзомеры», отличаются от экзосом по белковому и липидному составу. Однако, до настоящего времени продолжают споры продуцируются ли экзомеры клетками, или являются продуктом клеточной гибели. Данные изложенные в настоящей работе показывают, что экзомеры хотя и несут биомаркеры, характерные для ВВ, сильно отличаются от экзосом по липидному составу, особенно по содержанию холестерина. Продуцирование экзомеров клетками, как в культуре, так и *in vitro*, связано с синтезом холестерина в клетках и экспрессируется или супрессируется регуляторами синтеза мевалоната – промежуточного продукта метаболизма холестерина. Кроме того, в работе показано, что концентрация ВВ в организме коррелирует с концентрацией холестерина в плазме, но слабо коррелирует концентрацией холестерина в липопротеинах. Это свидетельствует, о том, что не весь холестерин в плазме связан с липопротеинами, как считалось до настоящего момента. Таким образом, экзомеры не являются продуктом клеточной гибели и играют существенную роль в транспорте холестерина в плазме крови.

**Ключевые слова:** Внеклеточные везикулы, экзосомы, экзомеры, тетраспорины, холестерин, липопротеины, метод динамического светорассеяния.

### ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) плазмы крови были открыты в 1967 году английским исследователем Питером Вульфом и названы исходно “тромбоцитарной пылью” [1]. Позднее было показано, что при культивировании ретикулоцитов в среду выделяются везикулы, названные экзосомами, мембрана которых по своему составу и присутствующим на ней рецепторам близка к мембране продуцирующих клеток. Авторы предположили, что основная роль этих частиц заключается в удалении лишних мембранных белков в ходе созревания ретикулоцитов [2].

В настоящее время ВВ охарактеризованы гораздо более подробно. Эти частицы отличаются крайней гетерогенностью и разнообразным происхождением. В настоящее время ВВ, обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях, а также в средах, в которых культивируются клеточные культуры. Клетки млекопитающих способны секретировать два типа ВВ: экзосомы (отщепляемые от мембран внутриклеточных компартментов, 20–100 нм в диаметре) и эктосомы (также называемые микрочастицами, или микровезикулами, отщепляемые от плазматической мембраны, 100–1000 нм в диаметре). [3].

Номенклатура экзосом остается недостаточно разработанной. Большинство исследователей пытаются классифицировать их, основываясь на способе образования, физико-химических характеристиках (размеру, плотности и т.п.) и маркерах [4] В настоящее время к экзосомам относят везикулы, образующиеся внутри мультивезикулярных эндосомальных тел (диаметром от 30–120 нм, несущие тетраспорины CD9, CD63, CD81 [5] и содержащие внутреннюю полость, обнаруживаемую, методами электронной [6] или атомно-силовой микроскопии [7,8].

Однако, еще в 2010 году нами, с помощью метода динамического светорассеяния, было показано, что гистограмма распределения экзосом по размерам (PSD) бимодальна: микровезикулы делятся на две фракции,

имеющие средние размеры порядка 25 и 90 нм. Каждая фракция гомогенна что подтверждено с помощью атомной силовой микроскопии. Иммуноаффинным методом продемонстрировано, что все микровезикулы несут антигенные детерминанты, узнаваемые антителами к главному комплексу гистосовместимости первого типа (HLA-ABC) и экзосомные маркеры CD9 и CD63 [9].

В 2018 г. методом фракционирования в силовом поле (*asymmetric flow field-flow fractionation – a4f*) было выявлено два подтипа экзосом, а также частицы, с размером менее 50 нм, которым дали название «экзомеры» [10]. Кроме того, было показано, что, экзосомы демонстрируют чашевидную морфологию, с диапазоном размеров 50–150 нм, экзомеры же имеют размер менее 50 нм и «точечную» морфологию [11,12]. Наши исследования, выполненные методом атомно-силовой микроскопии, показали, во-первых, наличие центральной полости у экзосом и ее отсутствие у экзомеров, а во-вторых, существенные различия в биомеханических свойствах центральной части экзосом и экзомеров. Центральная часть экзомеров оказалась существенно более жесткой, чем у экзосом. Это косвенно указывает на отсутствие внутренней полости у экзомеров [13].

Экзомеры сильно отличаются от экзосом по белковому и липидному составу. Экзомеры были значительно обогащены белками, участвующими в метаболизме (например, гексокиназой1 [HK1], глюкозо-6-фосфатизомеразой [GPI], альдолазой A [ALDOA], глутамино-щавелевоуксусной трансаминазой1 [GOT1], GOT2, фуматгидрогеназой [FH]), а также некоторыми белками теплового шока из семейства HSP90. Кроме того, было показано, что среди липидов экзомеров преобладают фосфолипиды и сфинголипиды. Экзомеры по отношению к экзосомам гораздо сильнее обогащены холестерином. Соотношение холестерина в экзомерах к экзосомам составляло приблизительно 4 к 1. Отмечено так же, что экзомеры, в отличие от экзосом, содержат большое количество этерифицированного холестерина [14]. На это указывают и наши данные о различии в биомеханических свойствах мембран экзосом и экзомеров.

Целью настоящей работы являлось выяснение вопроса: являются ли экзомеры продуктами гибели клеток, или целенаправленно продуцируются клетками, и, если да, то каким образом высокое содержание холестерина в ВВ связано с липидным профилем организма.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Биологические жидкости.* В случаях исследований *in vivo* источником ВВ служила сыворотка крови, полученная от 41 донора. Доноры отбирались среди пациентов поликлиники СПбГМУ им. И.П. Павлова, получивших направление лечащего врача на анализ липидного профиля. Все доноры дали информированное согласие на участие в научных исследованиях. Им была разъяснена цель и значимость результатов, которые будут получены в ходе исследований. Исследования были одобрены этическим комитетом ПИЯФ НИЦ Курчатовский институт (протокол № 05-2020/ЛЭК от 30.04.2020). Группа доноров специально была сформирована неоднородной для того, чтобы получить максимальный разброс исследуемых параметров. Единственным условием не включения в группу был прием донором статинов на момент начала исследований. При назначении лечащим врачом донору статиновой терапии (Розувастатин, Rosuvastatin 10 мг/сутки) через 21 день донор сдавал кровь на повторный анализ. Таких оказалось 21 случай.

Взятие крови из вены и проводили в вакуумные пробирки с активатором свертываемости по стандартному алгоритму [15]. Определение содержания в плазме липопротеинов проводили по стандартной методике, для этого, из супернатанта отбирали 0.5 мл для анализа на ДСР.

Перед анализом образцы плазмы центрифугировались в режиме 10000g в течение 30 мин и фильтровалась через одноразовый фильтр Minisart High Flow с полиэфирсульфоновой мембраной с диаметром пор 0,1 мкм (Sartorius, Germany, Кат № 16553K) для удаления мертвых клеток и их обломков.

*Реактивы, антитела и лекарственные формы.* В работе использовались реактивы следующих производителей: поликлональные антитела – Cloud-Cline Corp. (USA) и Abcam ab5690, Кембридж, Массачусетс, США.

*Метод динамического светорассеяния.* Измерения проводились на лазерном корреляционном спектрометре DLS (ООО «ИНТОКС МЕД», Санкт-Петербург, Россия) с гетерогенной схемой измерения [16]. Спектральная плотность мощности измерялась в диапазоне 16 кГц, накапливалось 2500 копий. Реально получаемой из эксперимента по динамическому светорассеянию информацией является распределение  $A(\Gamma)$  интенсивности рассеяния объектов по диффузионным уширениям спектра рассеяния. Однако нас интересует не само это распределение, а связанное с ним распределение интенсивности рассеяния по размерам  $I(R_h)$ . Это распределение представлено в виде гистограммы распределения частиц по размерам  $I(R_h)$ , где абсцисса – гидродинамический радиус ( $R_h$ ), а ордината представляет собой вклад в общее рассеяние частиц заданного размера  $I\%$ . При этом общее рассеяние всех частиц образца принималось за 100%. Математическая обработка полученных данных проводилась с использованием алгоритма [16] с использованием программного пакета QELSSpec 3.2, Гатчина, Россия.

*Идентификация поверхностных биомаркеров внеклеточных везикул.* Для определения наличия специфических поверхностных маркеров на частицах различного размера использовали комбинацию иммуносорбции и DLS, как описано ранее [17]. Вкратце: мы использовали протеин А иммобилизованный на гранулах сефарозы (PrA/S) (Институт Пастера, Санкт-Петербург, Россия). После этого суспензию микросфер с иммобилизованным на них протеином А разводили в 20 раз фосфатным буфером (PBS) и инкубировали с поликлональными антителами к биомаркерам экзосом, такие как Anti-CD9, Anti-CD63, Anti-CD81 и экзомерам

анти-HSP90 (Cloud-Clone Corp., Хьюстон, Техас, США) в соотношении 1 к 100. После 10 мин инкубации при комнатной температуре к конденсированной КС добавляли PrA/S со связанными антителами в соотношении 1 к 10, и инкубировали в течение 20 мин, а затем центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Супернатант собирали и использовали для измерений методом DLS (пять раз для каждого образца). В контрольных образцах использовали без антител и PrA / S с Anti-CD3 (Abcam ab5690, Кембридж, Массачусетс, США).

*Статистическая обработка результатов измерений.* Статистический анализ проводился в R : язык и среда для статистических вычислений (v. 4.0.4; R Core Team, Австрия) с использованием пакетов: rstatix (v. 0.7.0.; Alboukadel Kassambara, 2021), ggpubr (v. 0.4.0.; Alboukadel Kassambara, 2020), tidyverse (Wickham et al., 2019), PerformanceAnalytics (Brian G. Peterson., 2020). Различия в средних значениях для соседних групп анализировали с использованием критерия Стьюдента. Коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент частной корреляции Пирсона [18] для оценки статистической значимости взаимосвязи между двумя непрерывными переменными. Различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

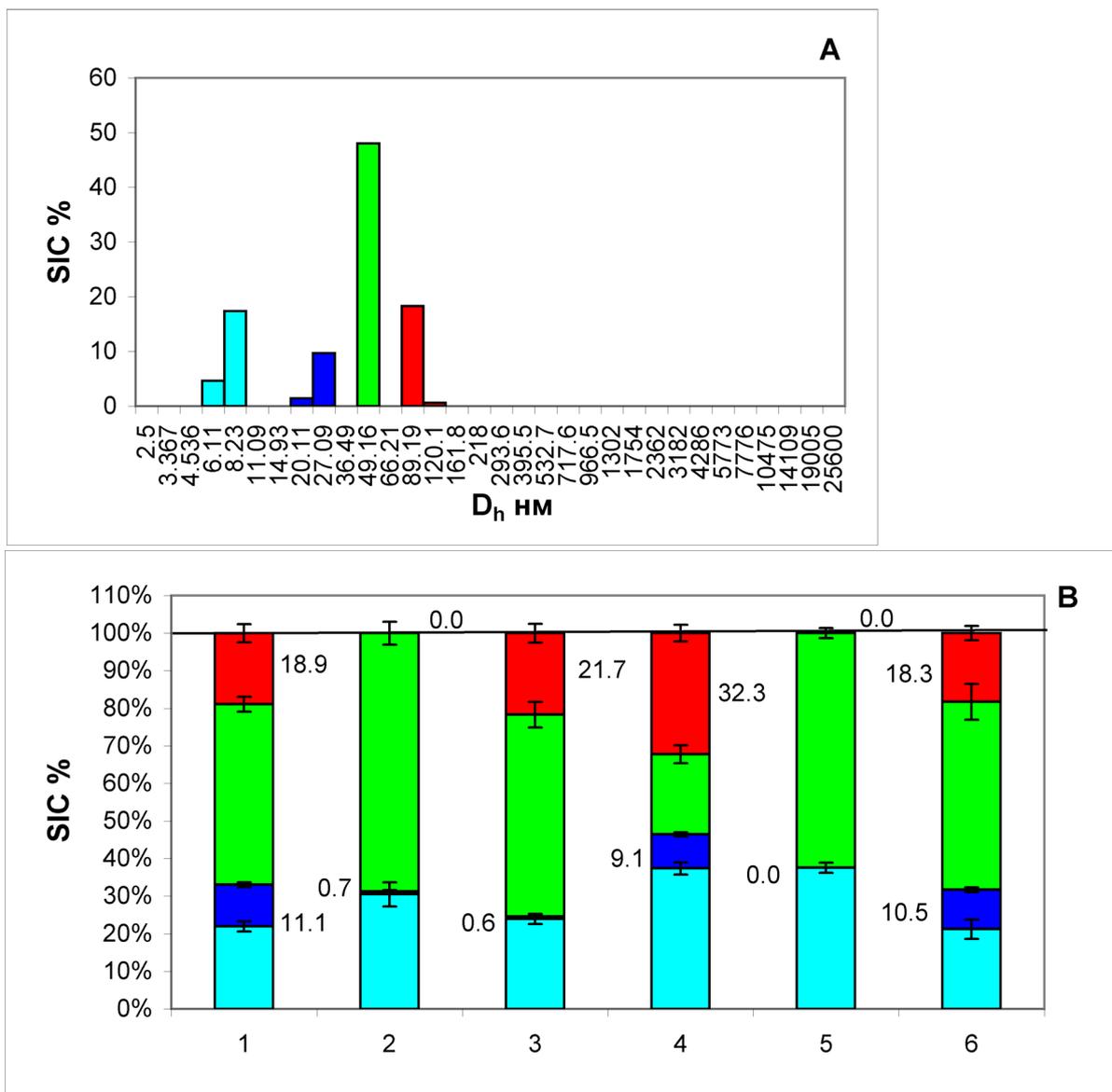
*ВВ и холестерин in vivo.* Ранее нами методом атомно-силовой микроскопии, были обнаружены существенные отличия в биомеханических свойствах мембраны экзосом и экзомеров от клеточной мембраны. Это может быть связано с различиями в липидном составе мембран экзосом и экзосом и клеточной мембраны [13]. Тот факт, что существенную часть липидов мембраны экзосом и особенно экзосом составляет холестерин, позволяет предположить, что эти ВВ, помимо прочего, могут выполнять функцию экскреции избыточного холестерина из клеток. Для подтверждения этого положения нами были исследованы корреляции количества экзосом и экзосом в плазме крови с концентрацией общего холестерина и холестерина, связанного липопротеинами очень низкой (ЛПОНП), низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности.

Мы исследовали методом ДСР плазму 41 донора. Доноры отбирались среди пациентов поликлиники СПбГМУ им. И.П. Павлова, получивших направление лечащего врача на анализ липидного профиля. Группа доноров специально была сформирована неоднородной для того, чтобы получить максимальный разброс исследуемых параметров. Данные статистической обработки приведены в таблице 1.

В фильтрованной плазме методом ДСР мы зарегистрировали 4 типоразмера рассеивателей (рис. 1А). Частицы наименьшего размера ( $D_h = 7,8 \pm 0,14$  нм) могут быть ассоциированы с альбумином. Рассеиватели, имеющие средний  $D_h 26,2 \pm 0,63$  нм могут состоять из смеси экзосом ( $D_h 26,4 \pm 0,13$  нм) и липопротеинов низкой плотности ( $19,1 \pm 0,18$  нм). Ранее было показано, что эти частицы несут на поверхности биомаркеры CD9, CD63, CD81 и маркер экзосом HSP90 [13;]. О гетерогенности этого типа рассеивателей свидетельствует тот факт, что хотя большинство частиц этого типа (синий цвет на гистограмме рис. 1В) удаляются микросферами с PrA/S, несущими антитела к биомаркерам CD63 и HSP90 (экзомеры) (рис. 1В-2 и рис. 1В-3), другая часть удаляется антителами к биомаркеру липопротеинов низкой и очень низкой плотности – ApoB100 (рис. 1В-4). Полностью же эта группа рассеивателей удаляются смесью маркеров CD63 и ApoB100 (рис. 1В-5). Частицы с  $D_h 90,2 \pm 2,38$  нм идентифицируются как экзосомы, так как ранее было показано [13], что эти частицы несут на поверхности биомаркеры CD9, CD63, CD81 и не несут маркер экзосом HSP90. Они не удаляются антителами к маркеру ApoB100, а удаляются только антителами к маркеру CD63 и смесью антител к маркерам CD63 и ApoB100 (рис. 1В-2 и рис. 1В-5) (красный цвет на гистограмме Рис. 1В). И, наконец, в плазме присутствуют частицы неизвестной природы, имеющие  $D_h 49,2 \pm 2,13$  нм. Они частично удаляются исключительно антителами к маркеру ApoB100, следовательно, содержит в себе липопротеины очень низкой плотности, имеющие близкий размер ( $D_h \approx 36$  нм) и несущие на поверхности этот маркер.

**Таблица 1.** Групповая статистика результатов измерения методом ДСР экзосом и экзосом из образцов плазмы и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследованиях (N=41)

Group	Mean	SD	m %	Min.	Q1	Median	Q3	Max.
Экзомеры $D_h$ нм	25,85	0,64	2,48	24,29	25,41	26,00	26,3	26,89
Экзомеры SIC %	13,85	7,1	51,26	2,85	7,79	12,74	18,19	29,57
Экзосомы $D_h$ нм	91,07	2,25	2,47	89,66	89,75	90,07	90,42	96,91
Экзосомы SIC %	20,15	1,87	9,28	15,88	19,06	20,06	21,8	23,94
Общий холестерин ммоль/л	6,48	1,26	19,44	4,23	5,44	6,54	7,45	9,23
ЛПНП ммоль/л	3,44	0,89	25,87	1,71	2,66	3,51	3,98	6,14
ЛПОНП ммоль/л	0,64	0,3	46,88	0,21	0,35	0,57	0,82	1,34
ЛПВП ммоль/л	2,4	0,57	23,75	1,4	2,03	2,29	2,69	3,9



**Рисунок 1.** Гистограмма распределения частиц по размерам в фильтрованной плазме здорового добровольца (А). Справа те же данные в табулированном виде. Гистограмма распределения вкладов в суммарное рассеяние 4 фракций частиц (В), соответствующих пикам гистограммы (А). 1 – фильтрованный образец исходной плазмы, 2 – он же, после добавления PrA/S с антителами к маркеру CD63, 3 – он же, после добавления PrA/S с антителами к маркеру HSP90, 4 – он же, после добавления PrA/S с антителами к маркеру ApoB100, 5 – он же, после добавления PrA/S со смесью антител к маркерам CD63 и ApoB100, 6 – он же, после добавления PrA/S с без антител. Голубой цвет – альбумин, Синий цвет – экзомеры, Зеленый цвет – частицы неизвестной этиологии, Красный цвет – экзосомы. Цифры на гистограмме – SIC фракций экзомеров и экзосом в %.

Известно, что вклад в рассеяние (SIC) пропорционален 6 степени размера [19], а концентрация рассеивателей пропорциональна кубу SIC, а концентрация рассеивателей пропорциональна  $\sqrt{SIC}$ . Отсюда можно оценить соотношение экзомеров и ЛПНП в суммарной концентрации рассеивателей данного размера. Приняв вклад в рассеяние «синей фракции» составляет 11.1 %, а вклад в рассеяние ЛПНП – 0,7 % (то, что остается после удаления части рассеивателей антителами к CD63), и рассчитав отношение квадратных корней этих величин, получаем, что для ЛПНП в суммарной концентрации «синих рассеивателей» составляет около 25 %. Эту величину можно принять как верхний предел концентрации ЛПНП по отношению к экзомерам.

В таблицах 2 и 3 представлены матрицы пар корреляций параметров экзомеров и экзосом. Сильной корреляцией будем считать корреляцию с  $R \geq 0,45$ , средней, если  $0,25 \leq R < 0,45$ , и слабой корреляцией если  $R < 0,25$ . Наиболее сильная положительная парная корреляция наблюдается для SIC экзомеров с содержанием общего холестерина –  $R = 0,91$   $p = 0,001$  (табл. 2) В то же время частная корреляция между этими параметрами слабее, хотя и остается сильной ( $R = 0,56$   $p = 0,001$ ). Учитывая, что в данном случае, мы имеем не чистые экзомеры, смесь экзомеров с ЛПНП в соотношении 3:1 можно предположить, что снижение R с величины 0.91 до 0.56 связано именно с этим фактом.

**Таблица 2.** Матрица парных и частных корреляций вклада в рассеяния экзомеров и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании (N=41)

		1	2	3	4	5
		ExoM	Cholesterol	LDL	VLDL	HDL
1	ExoM	1,00	0,91	0,82	0,12	0,41
2	Cholesterol	0,56	1,00	0,84	0,25	0,45
3	LDL	0,16	0,59	1,00	0,28	0,08
4	VLDL	-0,21	0,47	-0,17	1,00	-0,33
5	HDL	-0,02	0,63	-0,64	-0,50	1,00

Парные корреляции  
 Частные корреляции  
 0.56 Сильная корреляция  
 0.25 Корреляция средней степени  
 0.08 Слабая корреляция

**Таблица 3.** Матрица парных и частных корреляций вклада в рассеяния экзосом и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании (N=41)

		1	2	3	4	5
		ExoS	Cholesterol	LDL	VLDL	HDL
1	ExoS	1,00	-0,65	-0,62	0,01	-0,35
2	Cholesterol	0,25	1,00	0,84	0,25	0,45
3	LDL	-0,13	0,59	1,00	0,28	0,08
4	VLDL	0,01	0,47	-0,17	1,00	-0,33
5	HDL	-0,14	0,63	-0,64	-0,50	1,00

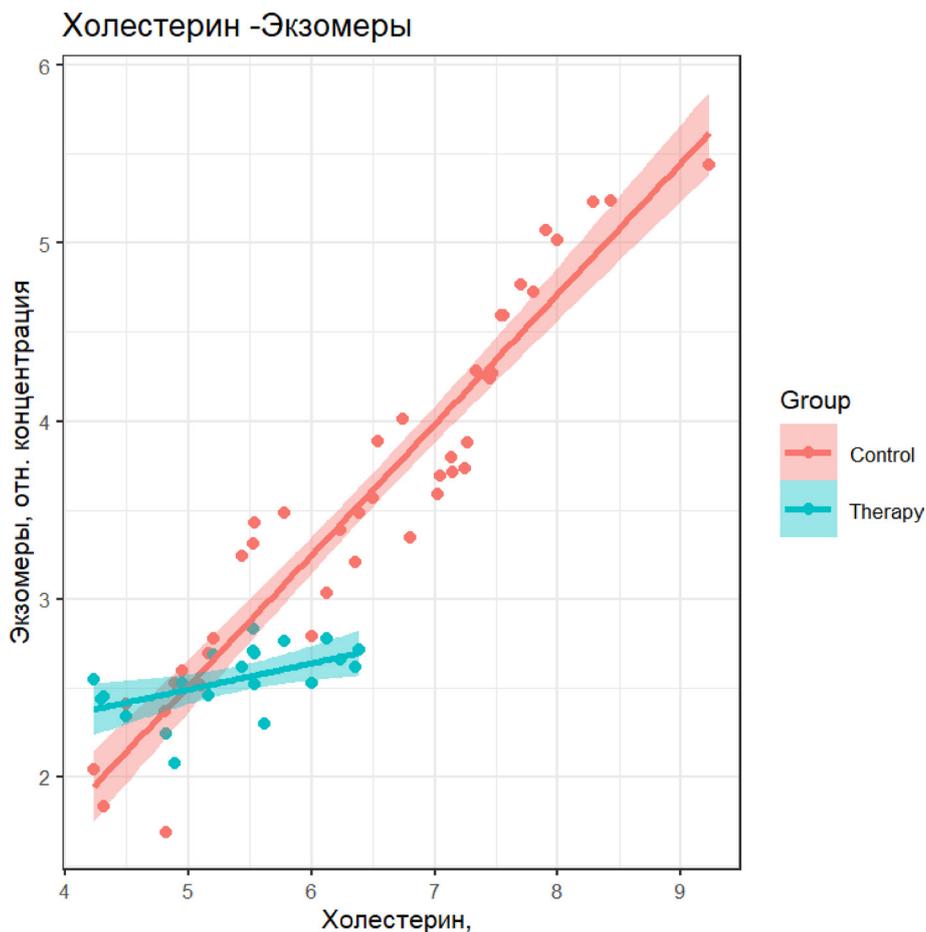
Для экзосом парная корреляция этих параметров остается сильной (табл. 3)  $R = -0,65$ ,  $p = 0,001$ , а частная корреляция уже корреляция средней степени –  $R = 0,25$ ,  $p = 0,01$ . Отметим, что у этой пары параметров, в отличие от экзомеров, парная корреляция отрицательная, а частная корреляция – положительная. Отрицательные значения коэффициента парной корреляции экзосом можно объяснить тем, что значения SIC для экзомеров и экзосом являются взаимосвязанными величинами, и увеличение одной из них автоматически ведет к уменьшению другой. В частной же корреляции влияние связи SIC экзосом и экзомеров нивелированы. Поэтому, как в данном, так и других подобных случаях применение частных корреляций более оправдано.

Сильные частные корреляции между общим холестерином и всеми типами липопротеинов ожидаемы и служат подтверждением корректности метода. Несколько необычен факт отрицательной корреляции между липопротеинами высокой плотности и низкой плотности и липопротеинами высокой плотности и липопротеинами очень низкой плотности, но обсуждение данного феномена выходит за рамки данного исследования.

На рисунке 2 приведена кривая линейной регрессии пары общий холестерин –  $\sqrt{SIC}$  экзомеров (оранжевая прямая). Поскольку, как ранее указывалось, SIC пропорционален квадрату концентрации экзомеров, данная прямая отражает корреляцию концентрации экзомеров с концентрацией общего холестерина. В этом случае коэффициент регрессии –  $R^2 = 0,84$ ,  $p = 0,001$ , что указывает на наличие сильной зависимости динамики холестерина и экзомеров в плазме крови. Через 21 сутки после приема препарата коэффициент регрессии падает до  $R^2 = 0,30$ ,  $p = 0,01$ . Уменьшение  $R^2$  для группы терапия указывает на уменьшение связи между концентрацией холестерина и экзомеров в плазме крови, что в сравнении с данными, полученными для группы контроль позволяет говорить об изменении ответа систем организма на изменение концентрации холестерина на фоне проведения терапии.

Среди обследованных доноров 21 человеку по результатам анализа липидного профиля была назначена статиновая терапия. Эти пациенты принимали розувостатин в дозе 10 мг/сутки. Через 21 день эти пациенты повторно сдавали анализ на липидный профиль и исследование методом DLS. Данные статистической обработки приведены в таблице 4 и на рисунке 3.

Особый интерес представляет индивидуальная динамика терапевтического воздействия. Как видно из данных рисунка, в случаях общего холестерина, экзомеров и, в несколько меньшей степени экзосом и ЛПНП вектора «до-после» однонаправлены, и либо практически параллельны, либо сходящиеся. В случае экзосом имеет место та же тенденция, но направление векторов противоположное (если в случае экзомеров и холестерина имеет место уменьшение величины параметра, то в случае экзосом – увеличение).



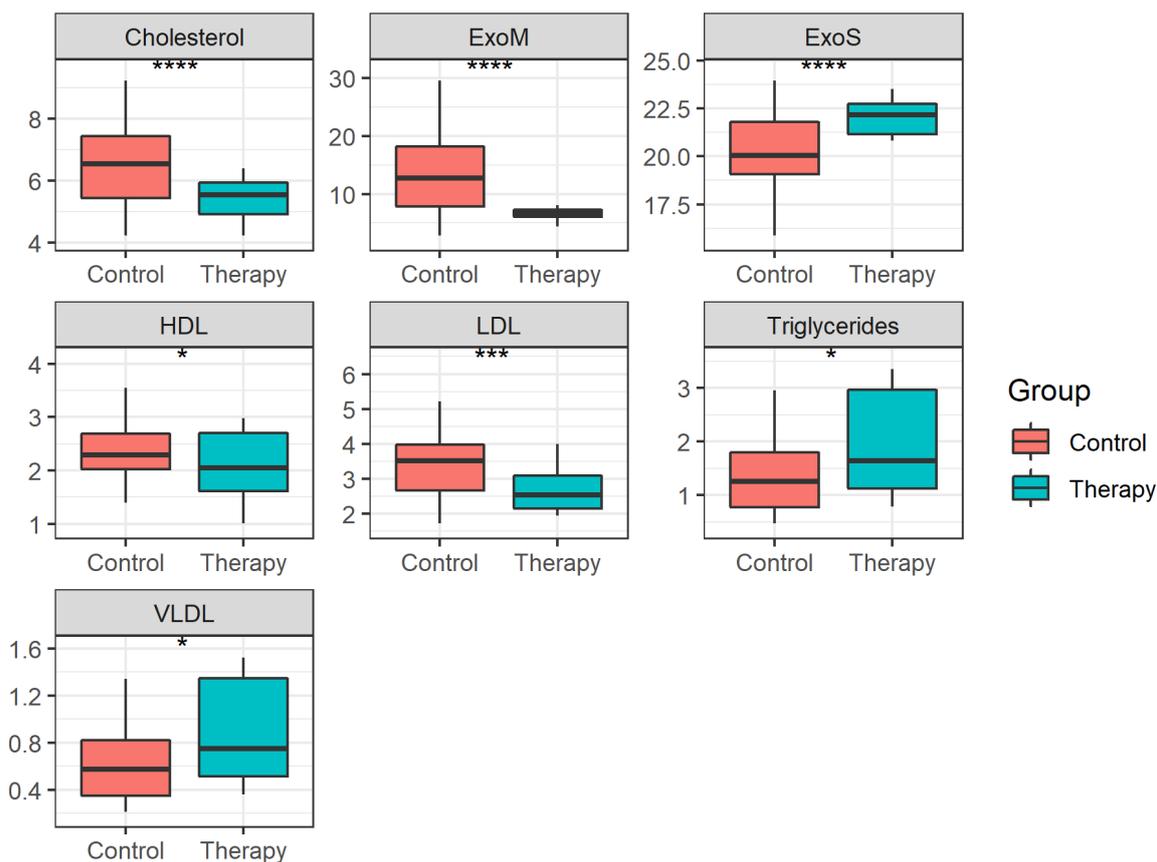
**Рисунок 2.** Кривая линейной регрессии концентрации общего холестерина (Ось X в mM/l) и относительной концентрации экзомеров (Ось Y в отн. ед.  $\sim \sqrt{SIC}$ ) в плазме крови добровольцев, участвовавших в исследовании до (Оранжевая прямая N=41) и после приема розувостатина (Голубая прямая N=21)

**Таблица 4.** Групповая статистика результатов измерения методом ДСР экзомеров и экзосом образцов плазмы и данных липидного профиля у добровольцев, после статиновой терапии (N=21)

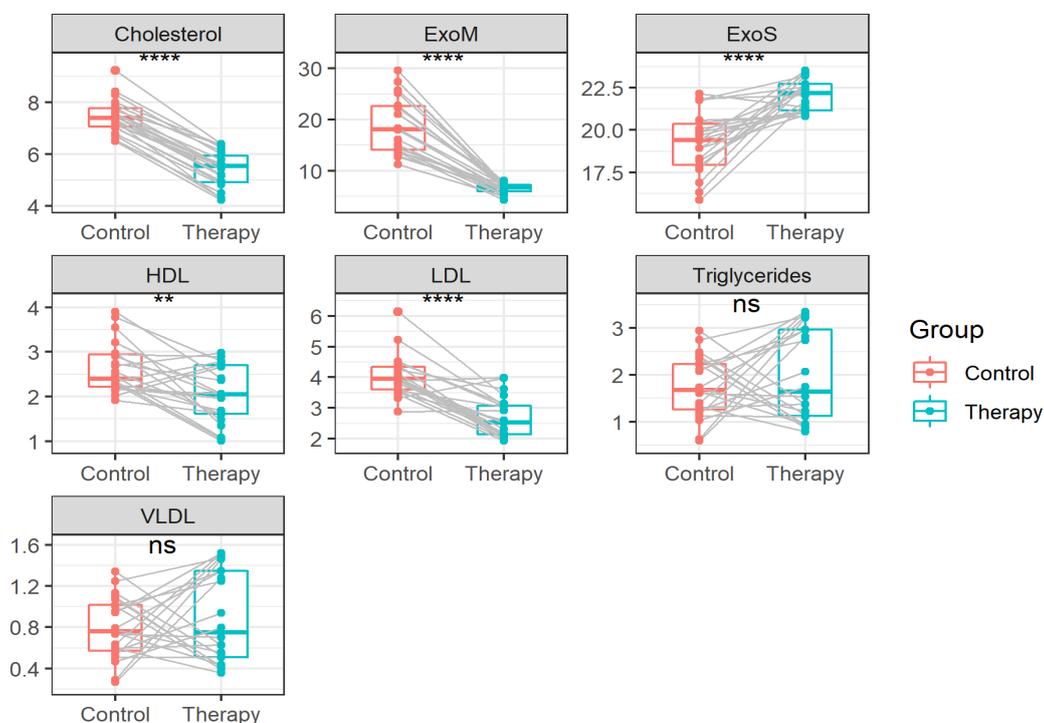
Group	Mean	SD	m %	Min.	Q1	Median	Q3	Макс.
Экзомеры D <sub>h</sub>								
Экзомеры SIC	6,54	0,94	14,37	4,32	6,01	6,66	7,25	8,03
Экзосомы D <sub>h</sub>								
Экзосомы SIC	22,08	0,95	4,30	20,8	21,14	22,17	22,73	23,5
Общий холестерин	5,4	0,7	12,96	4,23	4,9	5,53	5,94	6,39
ЛПНП	2,68	0,65	24,25	1,93	2,14	2,53	3,08	4,00
ЛПОНП	0,91	0,45	49,45	0,36	0,51	0,75	1,35	1,52
ЛПВП	2,06	0,64	31,07	1,01	1,61	2,05	2,71	2,99

Как мы отмечали ранее, это можно объяснить тем фактом, что экзомеров и экзосом не являются независимыми параметрами, и уменьшение SIC экзомеров закономерно приводит к увеличению SIC экзосом. Кроме того, необходимо подчеркнуть, что в случае экзосом имеются 1, а в случае ЛПНП три пациента, у которых терапия дала отрицательный результат (в двух случаях после терапии концентрация ЛПНП не изменилась, а в одном – увеличилась).

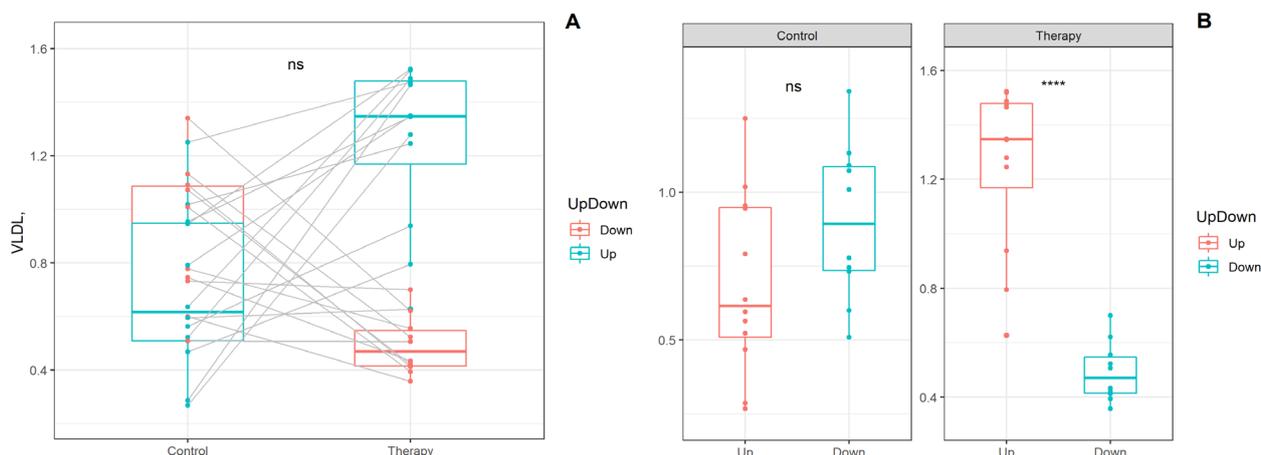
В случаях ЛПВП и ЛПОНП вектора в значительной степени разнонаправлены, особенно в случае ЛПОНП (рис. 5А). Создается впечатление, что в этом случае, мы имеем дело с двумя субпопуляциями: у одной, из которых терапия дает положительный, а у другой, либо не дает результата, либо дает отрицательный результат рисунке 5.



**Рисунок 3.** Описательная статистика вкладов в рассеяние экзосом, экзосом и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании до (оранжевый цвет, N=41) и после (голубой цвет, N=21) приема розувастатина. (ns:  $p > 0,05$ , \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ )



**Рисунок 4.** Динамика изменения вкладов в рассеяние экзосом, экзосом и данных липидного профиля у добровольцев, участвовавших в исследовании до (оранжевый цвет, N=41) и после (голубой цвет, N=21) приема розувастатина



**Рисунок 5.** Динамика изменения ЛПОНП у добровольцев, участвовавших в исследовании до (оранжевый цвет, N=21) и после (голубой цвет, N=21) приема розувостатина (A), и описательная статистика влияния приема розувостатина на концентрацию ЛПОНП у добровольцев, участвовавших в исследовании после приема розувостатина (N=21) (ns:  $p > 0,05$ , \*:  $p \leq 0,0001$ )

Таким образом, можно заключить, что экзосомы и в гораздо большей степени экзомы, играют существенную роль в транспорте холестерина в плазме крови. Об этом свидетельствует супрессирующее действие розувостатина на содержание экзосом в плазме *in vivo*. При этом эти процессы слабо связаны с потоками липопротеинов, о чем свидетельствуют сильная корреляция содержания экзосом и концентрации общего холестерина при относительно слабых корреляциях содержания ВВ и холестерина, связанного с липопротеинами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00011.

#### Список литературы / References:

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.*, 1967, vol. 13, pp. 269-288.
2. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 1987, vol. 262, no. 19, pp. 9412-9420.
3. Cocucci E., Meldolesi J. Exosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.*, 2015, vol. 25, pp. 364-372.
4. van der Pol E., Boing A.N., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol. Rev.*, 2012, vol. 64, no. 3, pp. 676-705.
5. Doyle, L. Wang M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 2019, vol. 8, p. 727.
6. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles*, 2016, vol. 5, p. 32945.
7. Needham D., Nunn R.S. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys J*, 1990, vol. 58, no. 4, pp. 997-1009. Parisse P., Rago I., Ulloa Severino L., Perissinotto F., Ambrosetti E., Paoletti P., Ricci M., Beltrami A.P., Cesselli D., Casalis L. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *Eur. Biophys. J.*, 2017, vol. 46, pp. 813-820.
8. Sharma S., LeClaire M., Gimzewski J.K. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. *Nanotechnology*, 2018, vol. 29, p. 132001.
9. Filatov M.V., Landa S.B., Pantina R.A., Garmai Iu.P. Investigation of exosomes secreted by different normal and malignant cells *in vitro* and *in vivo*. *Klin. Lab. Diagn.*, 2010, vol. 12, pp. 35-43.
10. Zhang H., Freitas D., Kim H.S., Fabijanic K., Li Z., Chen H., Mark M.T., Molina H., Martin A.B., Lyden D. *et al.* Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat. Cell Biol.*, 2018, vol. 20, pp. 332-343.
11. 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.*, 2018 vol. 373, p. 20160479.
12. Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P., Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*, 2015, vol. 65, no. 8, pp. 783-797.
13. Viktor Bairamukov, Anton Bukatin, Sergey Landa, Vladimir Burdakov, Irina Chelnokova, Natalia Fedorova, Michael Filatov, Tatiana Shtam, Maria Starodubtseva Biomechanical Properties of Blood Plasma Extracellular Vesicles Revealed by Atomic-Force Microscopy. *Biology*, 2021, vol. 10, no. 1, p. 4.

14. Zhang Q., Higginbotham J.N., Jeppesen D.K., Yang Y.P., Li W., McKinley E.T., Graves-Deal R., Ping J., Britain C.M., Coffey R.J. et al. Transfer of Functional Cargo in Exomeres. *Cell Rep.*, 2019, vol. 27, pp. 940-954.
15. ГОСТ Р 52623.4 - 2015 Технологии выполнения простых медицинских услуг инвазивных вмешательств. Издание официальное. 2015, Москва, Стандартинформ, с. 53- 67 [GOST R 52623-4 - 2015 Technologies for performing simple medical services of invasive interventions. Official edition. 2015, Moscow, Standartinform, pp. 53-67. (In Russ.)]
16. Lebedev A.D., Ivanova M.A., Lomakin A.V., Noskin V.A. Heterodyne quasi-elastic light-scattering instrument for biomedical diagnostics. *Appl. Opt.*, 1997, vol. 36, pp. 7518-7522.
17. Landa S.B., Korabliov P.V., Semenova E.V., Filatov M.V. Peculiarities of the formation and subsequent removal of the circulating immune complexes from the bloodstream during the process of digestion. *F1000Research* 2018, vol. 7, p. 618.
18. Kim S. ppcor: An R Package for a Fast Calculation to Semi-partial Correlation Coefficients. *Commun. Stat. Appl. Methods*, 2015, vol. 22, no. 6, pp. 665-674.
19. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н. Ломакин А.В. Носкин В.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии*, Киев, Наукова думка, 1987, 256 с. [Lebedev A.D., Levchuk Yu.N., Lomakin A.V., Noskin V.A. *Laser correlation spectroscopy in biology*. Kiev, Naukova Dumka, 1987, 256 p. (In Russ.)]

#### EXTRACELLULAR VESICLES AS CARRIERS OF CHOLESTEROL NOT ASSOCIATED WITH LIPOPROTEINS

Landa S.B.<sup>1,2</sup>, Verlov N.A.<sup>1</sup>, Filatov M.V.<sup>1</sup>, Burdakov V.S.<sup>1</sup>, Emmanuel V.L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov of NRC «Kurchatov Institute»,  
I, Orlova Roshcha, 188300 Gatchina, Russia; e-mail: sergey.landa@gmail.com

<sup>2</sup> St. Petersburg State Medical University. I.P. Pavlova of the Ministry of Health of the Russian Federation.  
9, Lev Tolstoy st, 197022, Saint Petersburg, Russia

**Abstract.** Extracellular vesicles (EVs) are microparticles, ranging in size from tens of nanometers to microns, found in almost all biological fluids. Extracellular vesicles (EVs) include exosomes and exomeres (particles less than 120 nm in size), microvesicles (from 100 to 250 nm), and apoptotic bodies – particles larger than 200 nm. Exosomes and exomeres are of considerable interest since they are biological markers of the state of cells, which can be used for diagnostics, regulatory functions, and can be involved in intercellular signaling. The nomenclature of exosomes remains poorly developed. Most researchers try to classify them based on the mode of formation, physicochemical characteristics (size, density, etc.), and the presence of tetrasporin markers CD9, CD63, and CD81. It was shown in 2010 using the dynamic light scattering method that the histogram of the size distribution of exosomes (PSD) is bimodal: EVs are divided into two fractions with average sizes of about 25 and 90 nm. Despite this fact, only in 2018 by the method of fractionation in a force field (*asymmetric flow field-flow fractionation - a4f*) two subtypes of exosomes were identified, as well as particles which were called "exomeres", with a size less than 50 nm, differ from exosomes in protein and lipid composition. However, to date, the debate continues whether exomeres are produced by cells, or are the product of cell death. The data presented in this work show that although exomeres carry biomarkers characteristic of EVs, they differ from exosomes strongly in lipid composition, especially in cholesterol content. The production of exomeres by cells, both in culture and in vitro, is associated with the synthesis of cholesterol in cells and is expressed or suppressed by regulators of the synthesis of mevalonate, an intermediate product of cholesterol metabolism. In addition, the work shows that the concentration of explosives in the body correlates with the concentration of cholesterol in the plasma, but weakly correlates with the concentration of cholesterol in lipoproteins. This suggests that not all plasma cholesterol is associated with lipoproteins, as previously thought. Thus, exomeres are not a product of cell death and play an essential role in the transport of cholesterol in blood plasma.

**Key words:** *Extracellular vesicles, exosomes, exomers, tetrasporins, cholesterol, lipoproteins, dynamic light scattering method.*