

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА И ТРИГЛИЦЕРИДОВ
В ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ КОММЕРЧЕСКИХ НАБОРОВ***А.А. Яковлев^{1,2*}, В.Д. Антонов³, 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.ru²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, 115419, Москва, ул. Донская, 43³Московский физико-технический институт (государственный университет),
141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9

Экзосомы и микровезикулы, совместно называемые малые экстраклеточные везикулы (мЭВ), представляют собой везикулы со средним размером около 100-150 нм. В настоящее время активно исследуется роль мЭВ в самых разных аспектах сигналинга в организме, кроме того, часто мЭВ могут служить маркерами разных патологий. Продолжается активное изучение состава мЭВ. В данной работе мы показали, что в мЭВ можно определить концентрацию холестерина и триглицеридов с помощью коммерческих наборов, предназначенных для сыворотки крови. Методика была опробована на мЭВ из крови пациентов с диагнозом депрессия и на здоровых добровольцах. Различий в концентрации холестерина и триглицеридов в мЭВ из сыворотки крови пациентов с депрессией и контрольной группы найдено не было. Концентрация холестерина и триглицеридов в образцах в несколько раз превосходит порог чувствительности методов, установленный производителем наборов.

Ключевые слова: малые экстраклеточные везикулы; сыворотка крови; динамическое светорассеяние; холестерин; триглицериды

DOI: 10.18097/BMCRM00148

ВВЕДЕНИЕ

Последнее время продолжается активное изучение малых экстраклеточных везикул (мЭВ). Продемонстрировано вовлечение мЭВ в развитие целого ряда патологий: от нейродегенерации до онкологии [1, 2]. Предполагается, что мЭВ могут быть использованы как в диагностике [3], так и для лечения [4] многих заболеваний. Продолжаются исследования состава мЭВ. В частности, было выполнено довольно много исследований липидного состава мЭВ [5-9]. Можно считать однозначно установленным то, что мембраны мЭВ обогащены холестерином, сфингомиелином и некоторыми ганглиозидами [5-9]. Однако все работы по установлению липидного состава мЭВ были проведены на клеточных культурах, для выделения мЭВ были использованы сложные многостадийные методы, а основным методом детекции липидов мЭВ была масс-спектрометрия [9]. Очевидно, что результаты, полученные на клеточных культурах, довольно сложно перенести на мЭВ из крови человека в силу гораздо большей сложности объекта. Также и метод выделения, для того чтобы быть востребованным в клинике, должен быть максимально простым и высокопроизводительным. Масс-спектрометрия в рутинной практике слишком затратна и пока не может стать методом лабораторного анализа.

Тем не менее, исследования липидного состава мЭВ могут всерьез помочь в диагностике заболеваний. Уникальность мЭВ как объекта исследования обусловлена способностью мЭВ проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [10]. Способность проникать через ГЭБ является не только важным диагностическим преимуществом

мЭВ [3, 11], но и может быть важным звеном патогенеза некоторых заболеваний, связанных с этим свойством мЭВ [12]. Таким образом, исследуя липидный состав мЭВ крови, можно составить косвенное представление о процессах липидного обмена в головном мозге.

Ранее считалось, что при депрессии концентрация холестерина в крови понижается [13, 14]. По крайней мере, это было показано при исследовании депрессивных пациентов, проявляющих склонность к суициду [15], хотя далеко не все работы последних лет подтверждают это утверждение [16]. При несомненной полезности исследований холестерина крови при депрессивном расстройстве истинное положение дел в мозге, конечно, остается неизвестным. С этой точки зрения мЭВ из клеток мозга, проникшие через ГЭБ в кровь, могут служить важным источником информации о метаболизме холестерина (как и других веществ) в структурах мозга.

Давно известно, что при психических заболеваниях, таких как шизофрения, биполярное расстройство, депрессивное и тревожное расстройства, в структурах мозга происходит окислительный стресс [17, 18]. Окислительный стресс характерен также при течении ряда нейродегенеративных заболеваний. Показано, что в плазме крови уже на начальных стадиях болезни Альцгеймера появляются окисленные метаболиты холестерина [19]. Вероятно, мЭВ, поступающие из мозга в биологические жидкости, могут пролить свет на выраженность окислительного стресса в мозге при психических и нейродегенеративных заболеваниях.

Для исследования качественного состава мЭВ крови нужен хороший отработанный метод их выделения. В



последнее время все большую популярность приобретает гель-фильтрация как метод выделения мЭВ из биологических жидкостей [20]. Мы долгое время использовали и продолжаем использовать этот метод для анализа мЭВ крови [21, 22]. Однако при использовании этого метода чувствительности для корректного определения в мЭВ холестерина с помощью коммерческих наборов не всегда оказывается достаточно (Яковлев и др., неопубликованные данные). Таким образом, нам потребовалась разработка нового метода выделения мЭВ с увеличенным выходом очищенных мЭВ для того, чтобы определять в этой фракции концентрацию холестерина.

В работе мы использовали комбинацию двух хорошо известных методов выделения мЭВ: преципитацию с помощью PEG 6000 с последующей доочисткой полученной фракции на колонке с Sepharose CL-2B. В полученных таким образом пробах нам удалось без дополнительных процедур измерить концентрацию холестерина и триглицеридов с помощью доступных коммерческих наборов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы фосфатно-солевой буфер (PBS, в таблетках, «Биолот», Россия), PEG 6000 («Fluka», Германия), Sepharose CL-2B («GE Healthcare», США). Все растворы готовили на дважды деионизованной воде сопротивлением 18.2 МОм*см.

Отбор участников исследования

Пациенты были набраны из числа пациентов Научно-практического психоневрологического центра им. З.П. Соловьева ДЗМ (НПЦ). Здоровые добровольцы были найдены среди медицинского персонала НПЦ. В исследование были включены 27 человек, из которых 11 был поставлен диагноз депрессивного расстройства. Критериями включения для пациентов явились: наличие установленного диагноза в рамках F41.2, F32, F33 МКБ-10, возраст от 18 до 45 лет, наличие письменного информированного согласия. Диагноз депрессивного расстройства для каждого пациента подтверждался лечащим врачом-психиатром. Критериями включения для контрольной группы (n=16) явились: возраст от 18 до 45 лет и наличие письменного информированного согласия. Критериями исключения для обеих групп явились: шизофрения; алкоголизм и наркомания в анамнезе; серьезные неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, ушибы мозга, эпилепсия, и т.п.); эндокринные нарушения: сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы и прием тиреотропных препаратов/заместительной терапии; любое инвалидизирующее заболевание внутренних органов; выраженный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки накануне обследования, суточный и ночной графики работы, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период до госпитализации или перед участием в исследовании. Демографическая информация включала возраст, пол, уровень образования, экономический статус, индекс массы тела (ИМТ) и не отличалась между группами.

Количественную оценку симптомов депрессии и тревоги проводили с использованием опросников «Шкала депрессии Бека» для субъективной оценки уровня депрессии; «Шкала тревоги Спилбергера» для оценки уровней ситуативной и личностной тревоги. Состояние пациентов также оценивали

по «Шкале Депрессии Гамильтона», заполняемой их лечащим врачом-психиатром.

Материал для исследования

Материалом для исследования служила сыворотка крови человека. Забор крови у здоровых добровольцев и пациентов проводили из локтевой вены в утренние часы натощак. Известно, что на образование экстраклеточных везикул оказывает влияние множество факторов [23]. 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 с помощью PEG 6000

Пробы сыворотки крови получали и очищали от остатков клеток и высокомолекулярных агрегатов центрифугированием при 4°C в течение 30 мин при 10000 g. К аликвоте образца объемом 500 мкл добавляли равный объем 6% PEG 6000, интенсивно перемешивали и оставляли на 30 мин на льду. Затем образцы центрифугировали при 4°C в течение 30 мин при 1500 g. Осадок однократно промывали 100 мкл PBS и растворяли в 100 мкл PBS при интенсивном перемешивании. Полученную грубую фракцию мЭВ замораживали на -80°C.

Доочистка мЭВ с помощью гель-фильтрации

Колонку заполняли 2 мл смолы Sepharose CL-2B и уравнивали PBS. Грубую фракцию после выделения PEG наносили на колонку в объеме 100 мкл, после добавления пробы наносили 800 мкл PBS, элюат отбрасывали. После этого наносили 200 мкл PBS и собирали элюат для последующего анализа. Перед очередным образцом промывали колонку не менее чем 4 мл PBS [24]. Выделенные мЭВ хранили при -80°C.

Определение концентрации белка по методу Бредфорда

Пробы смешивали с красителем Кумасси G-250 в соотношении 2:3 в лунках 384-луночного планшета, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин и определяли поглощение при 595 нм с помощью планшетного спектрофлуориметра Hidex Sense («Perkin Elmer», Финляндия). Калибровочную прямую строили по бычьему сывороточному альбумину в концентрации от 0.01 мг/мл до 2 мг/мл.

Определение концентрации холестерина в мЭВ

Определение концентрации холестерина в мЭВ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Lab Aries (Италия) жидким монореагентом («BioSystems SA», Испания), состоящим из PIPES (пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота)) – 35 ммоль/л, холат натрия – 0.5 ммоль/л, фенол – 28 ммоль/л, холестеролэстераза –

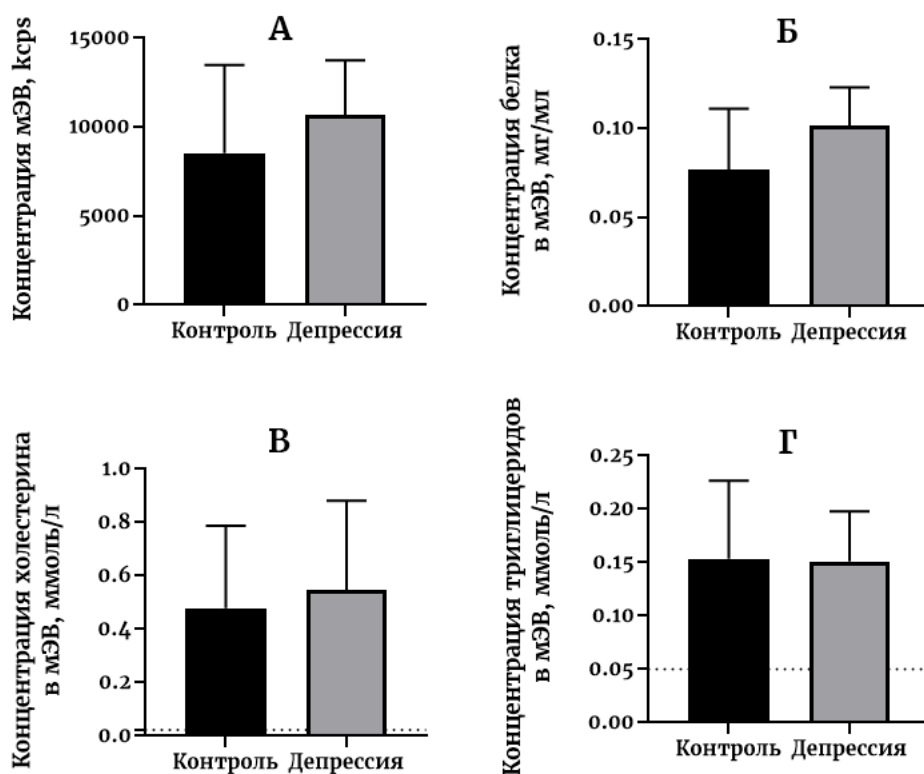


Рисунок 1. Биохимические показатели в группах контроль и депрессия. А) Концентрация частиц по данным динамического светорассеяния; Б) концентрация белка в мЭВ, мг/мл; В) концентрация холестерина в мЭВ, пунктирной линией отмечен предел обнаружения, 0.023 ммоль/л; Г) концентрация триглицеридов в мЭВ, пунктирной линией отмечен предел обнаружения, 0.05 ммоль/л.

0.2 Ед/мл, холестеролоксидаза – 0.1 Ед/мл, пероксидаза – 0.8 Ед/мл, 4-аминоантипирин – 0.5 ммоль/л, рН 7.0. Метод определения – холестеролоксидаза/пероксидаза, конечная точка. Предел обнаружения – 0.023 ммоль/л, предел линейности – 26 ммоль/л.

Определение концентрации триглицеридов в мЭВ

Определение концентрации триглицеридов в мЭВ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе ILab Aries жидким монореагентом («BioSystems SA»), состоящим из PIPES – 45 ммоль/л, ацетат магния – 5 ммоль/л, 4-хлорфенол – 6 ммоль /л, липаза – 100 Ед/мл, глицеролкиназа – 1.5 Ед/мл, глицерол-3-фосфатоксидаза – 4 Ед/мл, пероксидаза – 0.8 Ед/мл, 4-аминоантипирин – 0.75 ммоль/л, АТФ – 0.9 ммоль/л, рН 7.0. Метод определения – глицеролфосфатоксидаза/пероксидаза, конечная точка. Предел обнаружения – 0.05 ммоль/л, предел линейности – 6.78 ммоль/л.

Определение концентрации мЭВ с помощью динамического светорассеяния

Интенсивность динамического светорассеяния мЭВ определяли с помощью прибора Zetasizer Nano S («Malvern Panalytical», Великобритания). В кварцевую кювету с рабочим объемом 100 мкл наливали мЭВ, разбавленные в 100 раз PBS, и определяли светорассеяние на угол 173 градуса на длине волны 633 нм за четыре повтора длительностью по 40 с каждый. Оборудование позволяет вычислить размер наночастиц, а также определить число рассеянных на частицах фотонов, выражаемое в тысячах

фотонов в секунду, кпс. Общее число рассеянных на частицах фотонов служит параметром, отражающим концентрацию мЭВ в образце [21].

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в программе Graphpad Prism ver. 8.0. Результаты представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение. Для выявления взаимосвязи между переменными использовали непараметрический корреляционный анализ, представлен коэффициент корреляции Спирмена и 95% доверительный интервал.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Группа пациентов с диагнозом депрессия характеризовалась средним возрастом 34.3 ± 10.4 года, средним баллом по шкале Бека 19.3 ± 6.5 , средним баллом по шкале Гамильтона 17.4 ± 3.5 и средней длительностью заболевания более восьми лет. Таким образом, группу пациентов, представленных в работе, можно охарактеризовать как людей среднего возраста с умеренно выраженной депрессией. Контрольная группа не отличалась от пациентов с депрессией по возрасту (41.3 ± 9.2 года). Выделенная фракция мЭВ была исследована по нескольким биохимическим показателям. В первую очередь, во фракции мЭВ было измерено число частиц (рис. 1А). Результат значительно превосходит предел детекции метода и, в целом, воспроизводит полученные нами ранее результаты. Столь же воспроизводимым оказался и метод определения концентрации белка в мЭВ, результаты представлены на

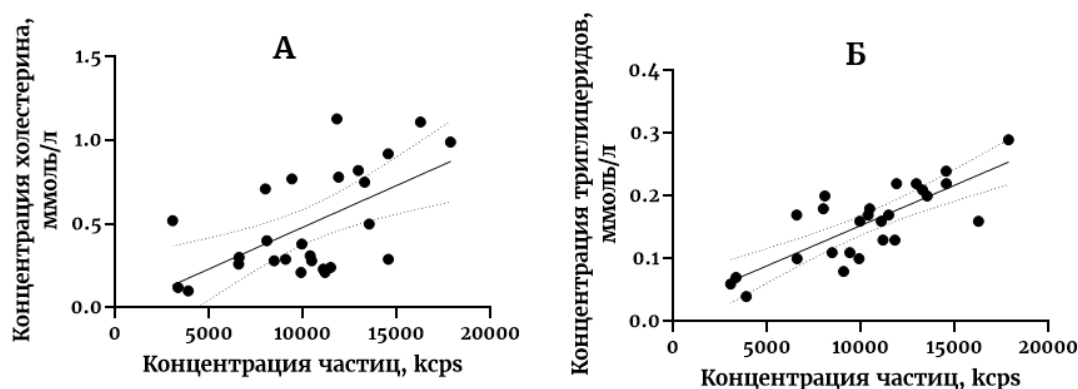


Рисунок 2. Корреляции концентрации частиц с А) концентрацией холестерина и Б) концентрацией триглицеридов в мЭВ. Прямая линия представляет собой линейную регрессию, а пунктирная 95% доверительный интервал.

рисунке 1Б. Эти два показателя были определены нами и раньше. Результаты определения концентрации холестерина во фракции мЭВ представлены на рисунке 1В.

Хорошо видно, что концентрация холестерина и в контрольной группе, и в группе пациентов с депрессией, существенно превосходит предел обнаружения, установленный для используемого метода производителем. Похожая ситуация обнаружена и для концентрации триглицеридов в мЭВ (рис. 1Г). Превышение над пределом обнаружения в этом случае не столь явное, как в случае с холестерином, но, тем не менее, заметное (рис. 1Г).

В ходе работы были обнаружены корреляционные связи между концентрацией частиц и концентрации холестерина и триглицеридов (рис. 2 А,Б). В обоих случаях была обнаружена достоверная корреляция по Спирмену. Концентрация частиц и концентрация холестерина коррелируют с коэффициентом корреляции 0.52, $p=0.0061$. Коэффициент детерминации в этом случае составил 0.348, что является довольно слабым показателем связи. Концентрация частиц и концентрация триглицеридов коррелируют с коэффициентом корреляции 0.72, $p<0.0001$. Коэффициент детерминации в этом случае составил 0.616, что является довольно высоким значением. На графиках (рис. 2 А,Б) хорошо видны и линейность взаимосвязей концентрации частиц и концентрации холестерина или концентрации триглицеридов, и небольшой разброс значений вдоль прямой. Тест серий не выявил неслучайности отклонения от линейности в обоих случаях.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлена комбинация двух методов выделения мЭВ, позволившая провести измерения концентрации холестерина и триглицеридов во фракции мЭВ с помощью коммерчески доступных наборов. Этот результат позволяет существенно упростить биохимический анализ мЭВ. Ранее мы пытались определить концентрацию холестерина во фракции мЭВ, выделенных с помощью одной гель-фильтрации, но безуспешно (результаты не представлены). Комбинация двух методов позволяет выделить примерно такое же количество частиц, как и одна гель-фильтрация, но в концентрации в 3-5 раз больше. Видимо, увеличение концентрации и является залогом успешного применения методов количественного определения холестерина и триглицеридов. При этом

концентрация холестерина в пробах во много раз превосходит предел обнаружения (рис. 1В). Такой результат нельзя объяснить лишь пятикратным увеличением концентрации холестерина при выделении с использованием двух методов. Мы предполагаем, что в процессе очистки происходит избавление от компонентов, мешающих определению холестерина в образцах. Таким образом, комбинация двух методов не только позволяет выделять более концентрированную фракцию мЭВ, но и выделенная фракция оказывается более чистой. Если руководствоваться полученной концентрацией белка (рис. 1Б), то степень обеднения примесными белками при комбинации двух методов выделения составляет примерно два раза.

В работе обнаружена высокодостоверная корреляция между числом мЭВ и концентрациями холестерина (рис. 2А) и триглицеридов (рис. 2Б). Этот результат указывает на то, что все выделяемые с помощью комбинации двух методов частицы однородны по составу и имеют одинаковое соотношение липидов в мембранах мЭВ. Это наблюдение косвенно указывает на чистоту фракции мЭВ и отсутствие в ее составе примеси липопротеинов. Присутствие липопротеинов должно было бы сильно увеличить долю липидов во фракции мЭВ, чего, согласно нашим результатам, не происходит.

Таким образом, в работе представлена новая схема выделения мЭВ, сочетающая в себе преимущества двух методов – преципитации PEG и гель-фильтрации. Каждый из методов сам по себе хорошо охарактеризован и их совместное применение не предполагает никаких сложностей. При некотором увеличении времени эксперимента происходит увеличение концентрации мЭВ и избавление от части примесей. Применение двух методов последовательно позволило определить концентрацию липидов во фракции мЭВ с помощью коммерчески доступных наборов, что позволит в будущем проводить более детальный анализ состава мЭВ и использовать результат для диагностики заболеваний.

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 (ВНД и НФ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, одобрены этическим комитетом Института ВНД и НФ. 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. et al. (2019) Extracellular Vesicle-Mediated Cell-Cell Communication in the Nervous System: Focus on Neurological Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(2), 434. DOI: 10.3390/ijms20020434
2. Hoshino, A. et al. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, **527**(7578), 329-335. DOI: 10.1038/nature15756
3. Fianadca, M. S. et al. (2015) Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers & Dementia*, **11**(6), 600-607. DOI: 10.1016/j.jalz.2014.06.008
4. Kamerkar, S. et al. (2017) Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, **546**(659), 498-503. DOI: 10.1038/nature22341
5. Osteikoetxea, X. et al. (2015) Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties. *Plos One*, **10**(3), e0121184. DOI: 10.1371/journal.pone.0121184
6. Lai, R. C. et al. (2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, **4**(3), 214-222. DOI: 10.1016/j.scr.2009.12.003
7. Wubbolts, R. et al. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes - Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(13), 10963-10972. DOI: 10.1074/jbc.M207550200
8. Record, M., Carayon K., Poirot M., Silvente-Poirot, S. (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1841**(1), 108-120. DOI: 10.1016/j.bbalip.2013.10.004
9. Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K., Llorente, A. (2019) Thematic Review Series: Exosomes and Microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions Exosomal lipid composition and the role of ether

lipids and phosphoinositides in exosome biology. *Journal of Lipid Research*, **60**(1), 9-18. DOI: 10.1194/jlr.R084343

10. Banks, W. A., Sharma, P., Bullock, K. M., Hansen, K. M., Ludwig, N., Whiteside, T. L. (2020) Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(12), 4407. DOI: 10.3390/ijms21124407
11. Goetzl, E. J. et al. (2016) Cargo proteins of plasma astrocyte-derived exosomes in Alzheimer's disease. *Faseb Journal*, **30**(1), 3853-3859. DOI: 10.1096/fj.201600756R
12. Morad, G. et al. (2019) Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood-Brain Barrier via Transcytosis. *ACS Nano*, **13**(12), 13853-13865. DOI: 10.1021/acsnano.9b04397
13. Jow, G. M., Yang, T. T., Chen, C. L. (2006) Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. *Journal of Affective Disorders*, **90**(1), 21-27. DOI: 10.1016/j.jad.2005.09.015
14. Liu, T. et al. (2015) A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *Plos One*, **10**(10), e0138904. DOI: 10.1371/journal.pone.0138904
15. Sarchiapone, M. et al. (2001) Cholesterol and serotonin indices in depressed and suicidal patients. *Journal of Affective Disorders*, **62**(3), 217-219. DOI: 10.1016/s0165-0327(99)00200-1
16. Lalovic, A. et al. (2004) Investigation of completed suicide and genes involved in cholesterol metabolism. *Journal of Affective Disorders*, **79**(1-3), 25-32. DOI: 10.1016/s0165-0327(02)00453-6
17. Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A. I. (2008) Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, **11**(6), 851-876. DOI: 10.1017/s1461145707008401
18. Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S., Berk, M. (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **35**(3), 676-692. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.004
19. Lutjohann, D. et al. (2000) Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *Journal of Lipid Research*, **41**(2), 195-198.
20. Liu, D. S. K. et al. (2020) Size-Exclusion Chromatography as a Technique for the Investigation of Novel Extracellular Vesicles in Cancer. *Cancers*, **12**(11), 3156. DOI: 10.3390/cancers12113156
21. Yakovlev, A. A. et al. (2019) Elevated Levels of Serum Exosomes in Patients with Major Depressive Disorder. *Neurochemical Journal*, **13**(4), 85-390. DOI: 10.1134/s1819712419040044
22. Yakovlev, A. A., Druzhkova, T. A., Guekht A. B., Gulyaeva, N. V. (2020) Sensitivity of Extracellular Vesicles from Human Blood Serum to Various Detergents. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **3**(4), e00143. DOI: 10.18097/BMCRM00143
23. Witwer, K. W. et al. (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
24. 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**, 3641. DOI: 10.1038/srep33641

Поступила: 18.05.2021
 После доработки: 24.05.2021
 Принята к публикации: 04.06.2021

**DETERMINATION OF CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDE CONCENTRATIONS
IN SERUM EXTRACELLULAR VESICLES USING COMMERCIAL KITS**

A.A. Yakovlev^{1,2}, V.D. Antonov³, 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

³Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow region, Russia

Exosomes and microvesicles, collectively referred to as small extracellular vesicles (sEV) are vesicles with an average size of about 100-150 nm. Currently, the role of sEV in various aspects of signaling in the body is being actively investigated; in addition, sEV can often serve as markers of various pathologies. The active study of the sEV composition is continuing. In this study we have demonstrated that in sEV it is possible to determine cholesterol and triglycerides concentration by using commercial kits designed for serum. The technique was tested on sEV from the blood of patients diagnosed with depression and on healthy volunteers. No differences were found in the concentration of cholesterol and triglycerides in mEV from the blood serum of depressed patients and the control group. The concentration of cholesterol and triglycerides in the samples is several times higher than the sensitivity threshold of the methods set by the manufacturer of the kits.

Key words: small extracellular vesicles; blood serum; dynamic light scattering; cholesterol; triglycerides

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: 18.05.2021, revised: 24.05.2021, accepted: 04.06.2021