ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 57.08:576.5

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ШИРОКО ИСПОЛЬЗУЕМЫХ МЕТОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Костина В. В.[1, 2], **Яковлев А. А.**[1, 3]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук», Москва, Россия
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
[3] Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-практический психоневрологический центр имени З. П. Соловьева Департамента здравоохранения Москвы», Москва, Россия

Контактная информация:
Яковлев Александр Александрович,
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
ул. Бутлерова, д. 5А, Москва, Россия, 117485.
E-mail: al_yakovlev@ihna.ru

Статья поступила в редакцию 18.11.2024 и принята к печати 29.12.2024

Резюме

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

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

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

KEY TECHNIQUES FOR STUDYING EXTRACELLULAR VESICLES

Vasilisa V. Kostina[1, 2], Alexander A. Yakovlev[1, 3]

[1] Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[2] Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, Moscow, Russia
[3] Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z. P. Solovyov, Moscow, Russia

Corresponding author:
Alexander A. Yakovlev,
Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
Butlerova str., 5A, Moscow, Russia, 117485.
E-mail: al_yakovlev@ihna.ru

Received 18 November 2024; accepted 29 December 2024

Abstract

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

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

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

Список сокращений: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ВВ — внеклеточные везикулы, ДРС — динамическое рассеяние света, Крио-ЭМ — крио-электронная микроскопия, мВВ — малые внеклеточные везикулы, МС — масс-спектрометрия, ПЭГ — полиэтиленгликоль, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ТЭМ — просвечивающая электронная микроскопия, ЭМ — электронная микроскопия, A4F — асимметричное фракционирование в полевом потоке, Alix — белок внутриклеточной системы упаковки и транспорта везикул, характерный маркер мВВ, CD63 — белок семейства тетраспанинов, характерный маркер мВВ, ERK1/2 — киназы, регулируемые внеклеточным сигналом, FFF — фракционирование в свободном потоке, NTA — анализ траектории наночастиц.

Введение

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

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

Биологическая значимость ВВ

В биологии ВВ исследуются как один из важнейших механизмов межклеточной коммуникации [3]. В отличие от более традиционных сигналов, таких как нейромедиаторы или гормоны, ВВ обеспечивают прямую доставку сложных молекулярных комплексов, сохраняя их структуру и активность [4]. Процесс доставки может быть избирательным, благодаря белковым маркерам на поверхности ВВ, которые помогают им взаимодействовать только с определенными клетками-мишенями. ВВ участвуют в регуляции множества физиологических процессов, включая иммунный ответ, клеточную пролиферацию, апоптоз и восстановление тканей. Роль ВВ в биологических процессах делает их объектом интереса для изучения механизмов многих заболеваний, поскольку сбои в их производстве, составе или доставке могут быть связаны с патологией.

Медицинская значимость ВВ

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

Методы выделения внеклеточных везикул

Ультрацентрифугирование

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

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

В стандартных процедурах дифференциального центрифугирования, описанных в научных

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

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

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

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

Ультрацентрифугирование в градиенте плотности

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

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

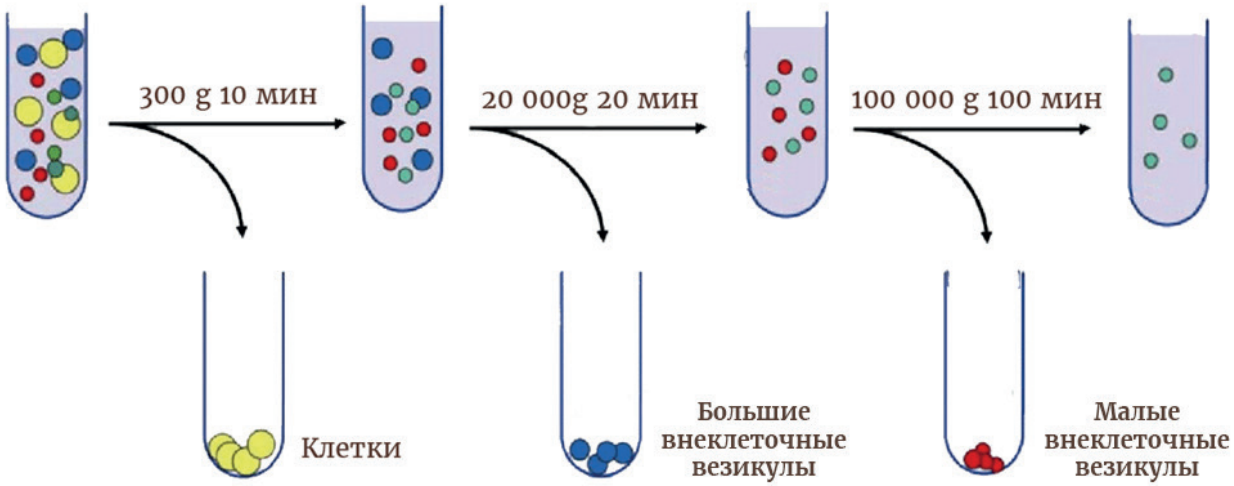

Рис. 1. Принцип выделения ВВ с помощью дифференциального центрифугирования

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

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

Гель-фильтрация

Гель-фильтрация, или эксклюзионная хроматография, представляет собой удобную альтернативу дифференциальному ультрацентрифугированию и центрифугированию в градиенте плотности. Одним из ее главных преимуществ является сохранение целостности ВВ, что позволяет поддерживать их функциональные свойства [17, 18]. Это особенно актуально для биомедицинских исследований, где критически важны структура и функция везикул. Гель-фильтрация широко применяется в исследованиях ВВ, поскольку является простым методом, который помогает избежать проблем, характерных для ультрацентрифугирования, таких как разрушение везикул, их агрегация и контаминация [19]. Процедура проводится с использованием колонки, заполненной пористыми полимерными шариками, которые выполняют роль неподвижной фазы. Когда раствор, содержащий частицы, проходит через колонку, более мелкие частицы задерживаются в порах шариков, а крупные — проходят быстрее и элюируются раньше (рис. 3).

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

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

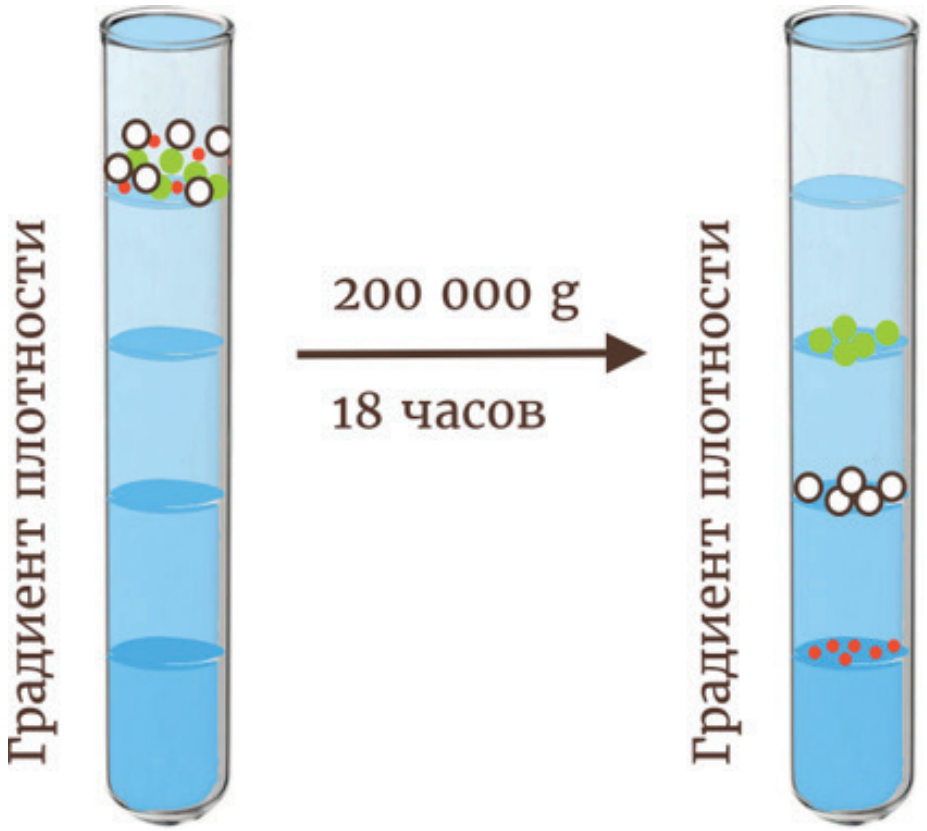

Рис. 2. Принцип выделения ВВ методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности

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

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

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

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

Фракционирование в свободном потоке

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

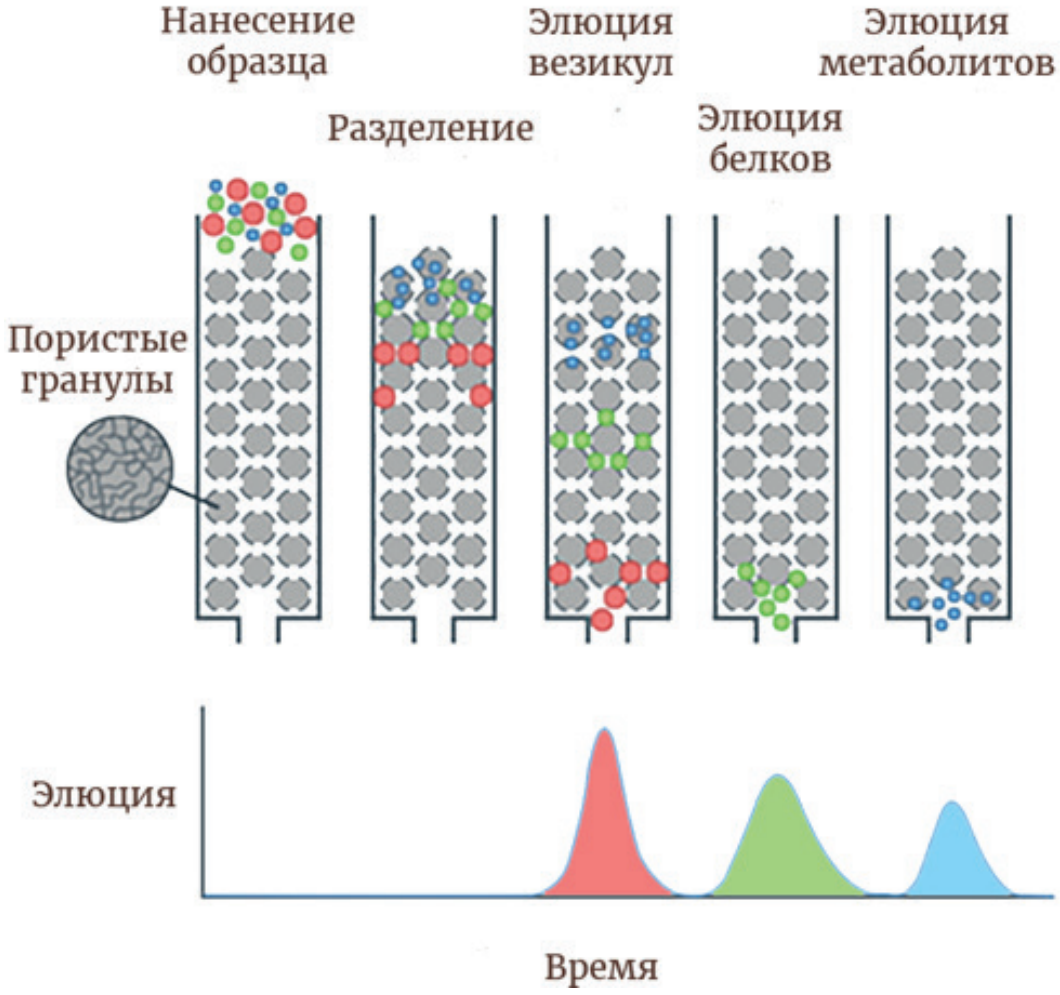

Рис. 3. Принцип выделения ВВ методом гель-фильтрации

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

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

Асимметричное фракционирование в полевом потоке (FFFF, или A4F) является относительно новой техникой в области исследования ВВ и использует одну полупроницаемую мембрану [22]. Метод A4F способен фракционировать отдельные популяции внеклеточных везикул (например, экзосомы, эктосомы и апоптотические тельца), а также их субпопуляции, при этом сохраняя их биофизические свойства неизменными. Также уменьшается вероятность потери везикул из-за прилипания к мембранам (как в случае ультрафильтрации) или к неподвижной фазе (при использовании гель-фильтрации). Тем не менее, для каждого конкретного применения A4F требуется значительная экспериментальная настройка, поскольку универсальных параметров для этого метода не существует [21]. Метод эффективен для выделения до 100 % ВВ и подходит для работы с образцами различного происхождения.

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

Таблица 1. Характеристики носителей для гель-фильтрации

Table 1. Characteristics of gel filtration media

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

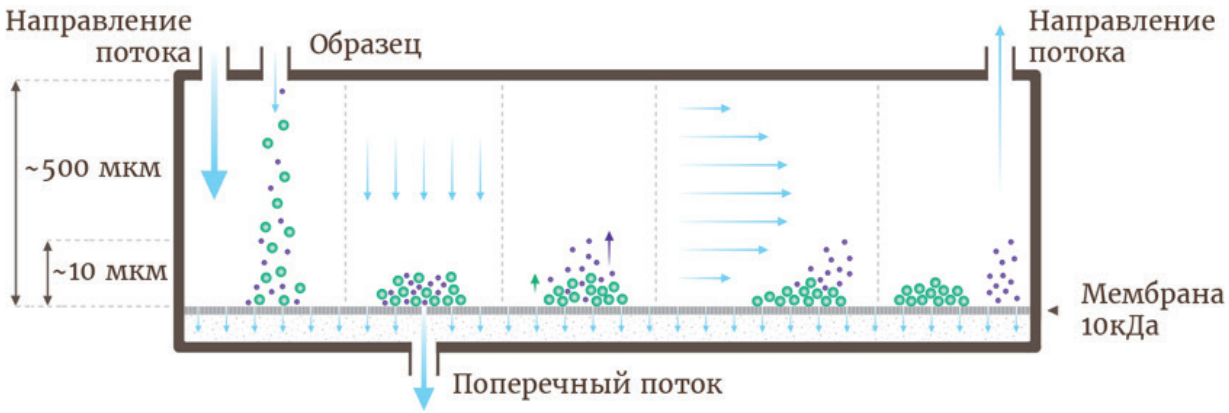

Рис. 4. Принцип выделения ВВ методом FFF

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

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

Ультрафильтрация

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

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

Для выделения внеклеточных везикул ультрафильтрация предоставляет высокую эффективность, позволяя получить от 40 % до 100 % целевых ВВ при использовании мембран с порогом 100 кДа. При применении тангенциальной ультрафильтрации, где поток жидкости направлен вдоль мембраны, можно достичь выхода до 95 % везикул, что значительно повышает эффективность метода. Более того, данный способ позволяет обогатить выделенные везикулы в 20–30 раз по сравнению с белками. Чистота фракции, полученной при ультрафильтрации, зачастую сопоставима с результатами, достигнутыми с помощью ультрацентрифугирования, но при этом метод более быстрый и удобный.

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

Преципитация

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

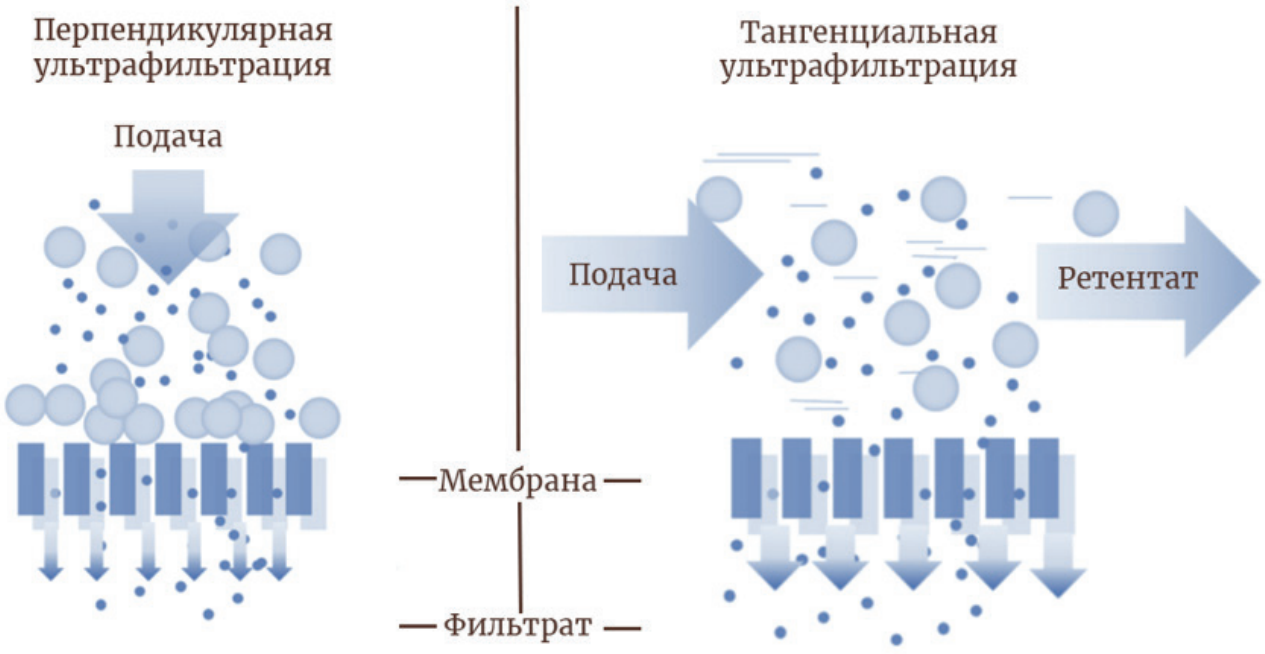

Рис. 5. Принцип выделения ВВ методом ультрафильтрации

Figure 5. The principle of extracellular vesicle extraction by ultrafiltration

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

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

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

Аффинная преципитация

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

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

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

Сравнение методов выделения представлено на рисунке 6.

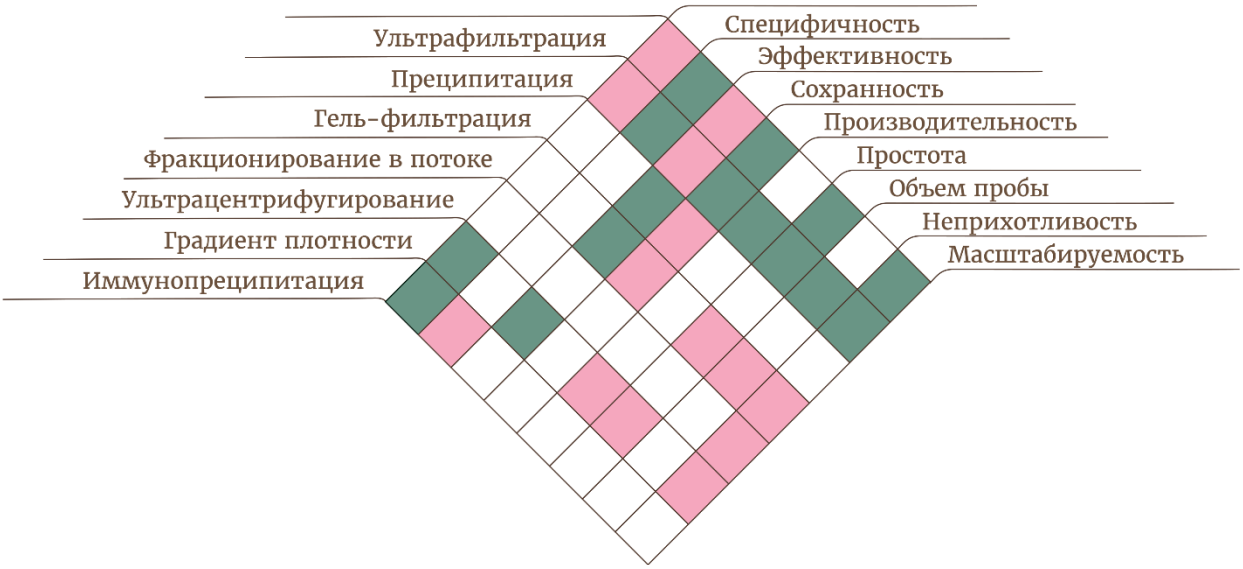

Рис. 6. Сравнение методов выделения ВВ

Figure 6. Comparison of extracellular vesicle isolation methods

Методы анализа внеклеточных везикул

NTA

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

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

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

Электронная микроскопия

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

Хотя для анализа ВВ можно использовать различные методы ЭМ, такие как сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [32, 33], просвечивающая электронная микроскопия (ТЭМ) [34] и крио-ЭМ [35], они не являются взаимозаменяемыми и не всегда обеспечивают одинаковое качество изображения. Например, крио-ЭМ лучше сохраняет структуру липидного бислоя и морфологию ВВ по сравнению с методами дегидратации, применяемыми для ТЭМ, что позволяет получить более точные количественные данные, так как визуализируются все частицы в определенном объеме, а не только те, которые прилипают к поверхности сетки. При использовании ТЭМ необходим адаптированный протокол, включающий контрастирование и встраивание в смесь ураниловых соединений и метилцеллюлозы для сохранения структуры липидного бислоя [13]. СЭМ дает возможность исследовать поверхность ВВ любого размера, но изображения, полученные при максимальном увеличении для мелких ВВ, могут быть сложнее для интерпретации.

Атомно-силовая микроскопия

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

Проточная цитометрия

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

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

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

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

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

Масс-спектрометрия: анализ белкового состава ВВ

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

Нецелевой протеомный анализ помогает выявить все присутствующие ионы, включая белки ВВ и загрязнения из матрицы, обеспечивая комплексное понимание белкового состава образца, что особенно полезно для поиска биомаркеров [61]. Для выявления маркеров чистоты ВВ и загрязнений матрицы более подходящим может быть целевой пептидный анализ, который показывает наличие или отсутствие нужных веществ выше порога обнаружения и позволяет количественно определить абсолютное содержание белков.

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

Динамическое рассеяние света

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

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

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

Иммуноблоттинг

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

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

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

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

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

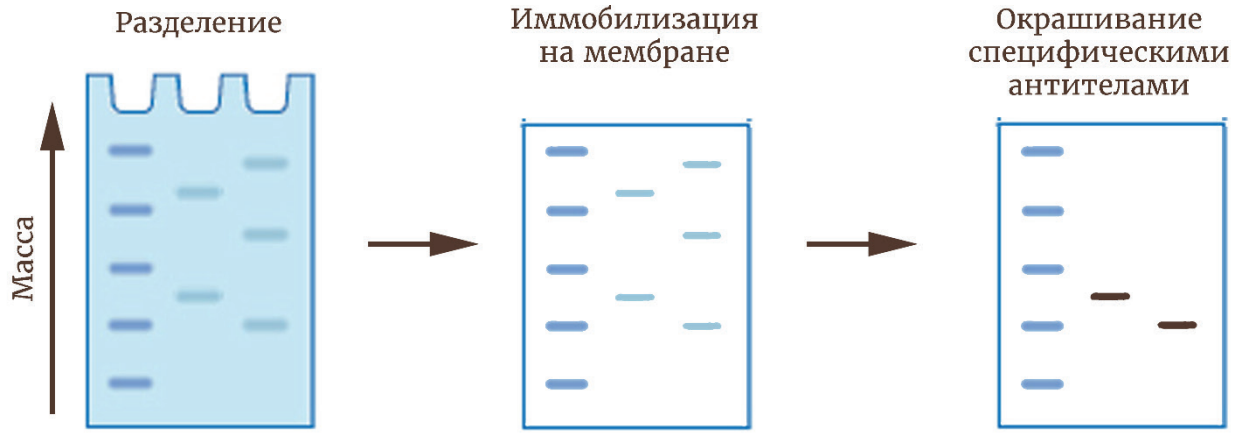

Рис. 7. Принцип работы иммуноблоттинга

Figure 7. The principle of operation of immunoblotting

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

Рис. 8. Сравнение методов исследования ВВ

Figure 8. Comparison of extracellular vesicle research methods

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

Сравнение методов детекции ВВ представлено на рисунке 8.

Проблемы и вызовы в изучении ВВ

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

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

Заключение

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

Конфликт интересов/ Conflict of interest

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

Благодарности / Acknowledgement

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 23-25-00011. / The work was carried out with the financial support of the Russian National Science Foundation, project No. 23-25-00011.

Список литературы / References

1. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. Journal of Extracellular Vesicles. 2024;13(2):e12404.

2. van Niel G, Carter DRF, Clayton A, et al. Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2022;23(5):369–82.

3. Mohammadipoor A, Hershfield MR, Linsenbardt HR, et al. Biological function of Extracellular Vesicles (EVs): a review of the field. Mol Biol Rep. 2023 Oct;50(10):8639–51.

4. Margolis L, Sadovsky Y. The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. PLoS Biol. 2019 Jul 18;17(7):e3000363.

5. Panneerselvam S, Muthukumaran NS, Ghosh D, et al. Extracellular Vesicles in Cell–Cell Communications and Potential in Clinical Interventions. In: Ghosh AR, editor. Extracellular Vesicles in Human Health and Diseases [Internet].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

purified extracellular vesicles. Sci Rep. 2016 Sep 23;6(1):33935.

28. Gardiner C, Shaw M, Hole P, et al. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. J of Extracellular Vesicle. 2014 Jan;3(1):25361.

29. Van Der Pol E, Coumans FAW, Sturk A, et al. Refractive Index Determination of Nanoparticles in Suspension Using Nanoparticle Tracking Analysis. Nano Lett. 2014 Nov 12;14(11):6195–201.

30. Van Der Pol E, Welsh JA, Nieuwland R. Minimum information to report about a flow cytometry experiment on extracellular vesicles: Communication from the ISTH SSC subcommittee on vascular biology. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2022 Jan;20(1):245–51.

31. Cavallaro S, Hååg P, Viktorsson K, et al. Comparison and optimization of nanoscale extracellular vesicle imaging by scanning electron microscopy for accurate size-based profiling and morphological analysis. Nanoscale Adv. 2021;3(11):3053–63.

32. Wu Y, Deng W, Klinke Ii DJ. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. Analyst. 2015;140(19):6631–42.

33. Van Der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2014 Jul;12(7):1182–92.

34. Höög JL, Lötvall J. Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy. J of Extracellular Vesicle. 2015 Jan;4(1):28680.

35. Bordanaba-Florit G, Royo F, Kruglik SG, Falcón-Pérez JM. Using single-vesicle technologies to unravel the heterogeneity of extracellular vesicles. Nat Protoc. 2021 Jul;16(7):3163–85.

36. Obeid S, Sung PS, Le Roy B, et al. NanoBioAnalytical characterization of extracellular vesicles in 75-nm nanofiltered human plasma for transfusion: A tool to improve transfusion safety. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2019 Aug;20:101977.

37. Sharma S, LeClaire M, Gimzewski JK. Ascent of atomic force microscopy as a nanoanalytical tool for exosomes and other extracellular vesicles. Nanotechnology. 2018 Apr 3;29(13):132001.

38. Cavallaro S, Pevere F, Stridfeldt F, et al. Multiparametric Profiling of Single Nanoscale Extracellular Vesicles by Combined Atomic Force and Fluorescence Microscopy: Correlation and Heterogeneity in Their Molecular and Biophysical Features. Small. 2021 Apr;17(14):2008155.

39. Parisse P, Rago I, Ulloa Severino L, et al. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. Eur Biophys J. 2017 Dec;46(8):813–20.

40. Piontek MC, Lira RB, Roos WH. Active probing of the mechanical properties of biological and synthetic vesicles. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects. 2021 Apr;1865(4):129486.

41. Ridolfi A, Brucale M, Montis C, et al. AFM-Based High-Throughput Nanomechanical Screening of Single Extracellular Vesicles. Anal Chem. 2020 Aug 4;92(15):10274–82.

42. Van Der Pol E, Van Gemert MJC, Sturk A, et al. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012 May;10(5):919–30.

43. Koliha N, Wiencek Y, Heider U, et al. A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. J of Extracellular Vesicle. 2016 Jan;5(1):29975.

44. Wiklander OPB, Bostancioglu RB, Welsh JA, et al. Systematic Methodological Evaluation of a Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay for Detection of Extracellular Vesicle Surface Signatures. Front Immunol. 2018 Jun 13;9:1326.

45. Zhu S, Ma L, Wang S, et al. Light-Scattering Detection below the Level of Single Fluorescent Molecules for High-Resolution Characterization of Functional Nanoparticles. ACS Nano. 2014 Oct 28;8(10):10998–1006.

46. Morales-Kastresana A, Musich TA, Welsh JA, et al. High-fidelity detection and sorting of nanoscale vesicles in viral disease and cancer. J of Extracellular Vesicle. 2019 Dec;8(1):1597603.

47. Sandau US, Duggan E, Shi X, et al. Methamphetamine use alters human plasma extracellular vesicles and their microRNA cargo: An exploratory study. J of Extracellular Vesicle. 2020 Nov;10(1):e12028.

48. Welsh JA, Killingsworth B, Kepley J, et al. A simple, high-throughput method of protein and label removal from extracellular vesicle samples. Nanoscale. 2021;13(6):3737–45.

49. Kondratov K, Nikitin Y, Fedorov A, et al. Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. J of Extracellular Vesicle. 2020 Sep;9(1):1743139.

50. Stoner SA, Duggan E, Condello D, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles. Cytometry Pt A. 2016 Feb;89(2):196–206.

51. Tian Y, Gong M, Hu Y, et al. Quality and efficiency assessment of six extracellular vesicle

isolation methods by nano-flow cytometry. J of Extracellular Vesicle. 2020 Sep;9(1):1697028.

52. Welsh JA, Jones JC, Tang VA. Fluorescence and Light Scatter Calibration Allow Comparisons of Small Particle Data in Standard Units across Different Flow Cytometry Platforms and Detector Settings. Cytometry Pt A. 2020 Jun;97(6):592–601.

53. Welsh JA, Van Der Pol E, Bettin BA, et al. Towards defining reference materials for measuring extracellular vesicle refractive index, epitope abundance, size and concentration. J of Extracellular Vesicle. 2020 Sep;9(1):1816641.

54. Pleet ML, Cook S, Tang VA, et al. Extracellular Vesicle Refractive Index Derivation Utilizing Orthogonal Characterization. Nano Lett. 2023 Oct 25;23(20):9195–202.

55. Van Der Pol E, De Rond L, Coumans FAW, et al. Absolute sizing and label-free identification of extracellular vesicles by flow cytometry. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2018 Apr;14(3):801–10.

56. Van Der Pol E, Sturk A, Van Leeuwen T, et al. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2018 Jun;16(6):1236–45.

57. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 2003 Mar;422(6928):198–207.

58. Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, et al. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. Cell. 2020 Aug;182(4):1044–1061.e18.

59. Pocsfalvi G, Stanly C, Vilasi A, et al. Mass spectrometry of extracellular vesicles. Mass Spectrometry Reviews. 2016 Jan;35(1):3–21.

60. Liebler DC, Zimmerman LJ. Targeted Quantitation of Proteins by Mass Spectrometry. Biochemistry. 2013 Jun 4;52(22):3797–806.

61. Nakayasu ES, Gritsenko M, Piehowski PD, et al. Tutorial: best practices and considerations for mass-spectrometry-based protein biomarker discovery and validation. Nat Protoc. 2021 Aug;16(8):3737–60.

62. Newman LA, Useckaite Z, Rowland A. Addressing MISEV guidance using targeted LC-MS/MS: A method for the detection and quantification of extracellular vesicle-enriched and contaminant protein markers from blood. J of Extracellular Bio. 2022 Sep;1(9):e56.

63. Pocsfalvi G, Stanly C, Fiume I, Vékey K. Chromatography and its hyphenation to mass spectrometry for extracellular vesicle analysis. Journal of Chromatography A. 2016 Mar;1439:26–41.

64. Rodrigues AD, Van Dyk M, Sorich MJ, et al. Exploring the Use of Serum-Derived Small Extracellular Vesicles as Liquid Biopsy to Study the Induction of Hepatic Cytochromes P450 and Organic Anion Transporting Polypeptides. Clin Pharma and Therapeutics. 2021 Jul;110(1):248–58.

65. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophys Rev. 2016 Dec;8(4):409–27.

66. Bhatt M, Rai V, Kumar A, et al. SDS-PAGE and Western Blotting: Basic Principles and Protocol. In: Deb R, Yadav AK, Rajkhowa S, Malik YS, editors. Protocols for the Diagnosis of Pig Viral Diseases [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [cited 2024 Nov 11]. P. 313–28. (Springer Protocols Handbooks). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-2043-4_23

67. Kowal EJK, Ter-Ovanesyan D, Regev A, Church GM. Extracellular Vesicle Isolation and Analysis by Western Blotting. In: Kuo WP, Jia S, editors. Extracellular Vesicles [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cited 2024 Nov 5]. P. 143–52. (Methods in Molecular Biology; vol. 1660). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7253-1_12

Информация об авторах:

Костина Василиса Васильевна, бакалавр, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России;

Яковлев Александр Александрович, д.б.н., внештатный научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии нервной системы, ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН».

Authors information:

Vasilisa V. Kostina, Bachelor's degree, Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov;

Alexander A. Yakovlev, Ph.D., Senior Researcher, Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences.