

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.54

## Мембранные ассоциированные везикулы: подходы к выделению и характеристики

О.А. Григорьева<sup>1,\*</sup> Н.А. Басалова<sup>1</sup> М.А. Виговский<sup>1</sup> У.Д. Дьячкова<sup>1</sup> Д.В. Багров<sup>2</sup> О.С. Соколова<sup>2</sup> А.Ю. Ефименко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 10;

<sup>2</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: grigorievaaoa@my.msu.ru

Межклеточная коммуникация является критически важной составляющей поддержания гомеостаза ткани. Одним из способов коммуникации является перенос широкого спектра биологически активных молекул – белков, нуклеиновых кислот (в первую очередь, некодирующих РНК) и липидов – в составе внеклеточных везикул (ВВ). Это позволяет клеткам-продуцентам ВВ изменять метаболическую и транскрипционную активность отдельных популяций клеток-мишеней в широком диапазоне и «настраивать» ее в соответствии с потребностями ткани. Большинство имеющихся работ сконцентрированы на изучении состава и функций секрецируемых во внешнюю среду ВВ, тогда как изучение подкласса везикул, ассоциированного с мембраной (мембранные ассоциированные везикулы, МАВ) затрудняется из-за отсутствия общепринятых методов их выделения из разных типов клеток, в том числе культивируемых, и характеристики. В данной работе мы приводим протокол, позволяющий выделять фракцию МАВ культивируемых мезенхимальных стromальных/стволовых клеток с сохранением морфологии и жизнеспособности самих клеток с помощью обработки гиалуронидазой. Данный протокол показал наиболее высокую эффективность по сравнению с другими протестированными методами и позволяет получить фракцию, значимо обогащенную везикулами, что показано методами анализа траекторий наночастиц и просвечивающей электронной микроскопии. Проведенный сравнительный анализ характеристик МАВ и ВВ, секрецируемых в среду, показал, что предлагаемый протокол выделения МАВ позволяет получить фракцию со схожей концентрацией частиц, однако они обладают меньшим размером по сравнению с ВВ. Таким образом описанный нами метод выделения позволяет получить фракцию МАВ для дальнейшего анализа их состава и функциональных особенностей.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, мембранные ассоциированные везикулы, мезенхимальные стromальные/стволовые клетки, межклеточная коммуникация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-5

### Введение

В последние несколько лет использование внеклеточных везикул (ВВ), продуцируемых мезенхимальными стромальными/стволовыми клетками (МСК), рассматриваются в качестве перспективного терапевтического подхода в лечении и разрешении различных патологических процессов: стимуляции регенерации тканей [1], регуляции иммунной системы [2], лечении фибротических, онкологических и инфекционных заболеваний [3] и др.

Термин «внеклеточные везикулы» относится к частицам, которые высвобождаются из клеток, разграничены липидным бислоем и не могут само-

стоятельно реплицироваться (т.е. не содержат функционального ядра) [4]. В настоящее время выделяют несколько подтипов ВВ (экзосомы, макровезикулы, апоптотические тельца и др.). Однако точное разделение ВВ на подтипы осложнено рядом ограничений, прежде всего связанных с техническими возможностями методов разделений и отсутствием четких молекулярных маркеров различных подтипов (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles, MISEV 2023). На поверхности многих животных клеток существуют мембранные везикулоподобные частицы, размер которых варьируется от сотен нанометров до одного микрона. Эти частицы долгое время рассматри-

вались как предшественники ВВ (в частности, мицровезикул или экзосом), которые прикреплены к мембране до момента высвобождения в межклеточное пространство [5]. В настоящее время не существует научного термина для обозначения этой структуры на русском языке. Группа исследователей под руководством Йон Чена, в исследованиях которой был впервые описан данный класс ВВ, предложила термин «cell-bound membrane vesicles». Ранее нами было предложено использование термина «мембранные-ассоциированные везикулы» (МАВ) [6]. Было показано, что МАВ достоверно являются отдельным классом ВВ, так как у них отсутствует солокализация с поверхностными маркерами ВВ, они устойчивы к обработке детергентами, но растворимы в органических соединениях, а также не высвобождаются с поверхности клеток [5]. На сегодняшний день, однако, структура, белковые/липидные компоненты и функции МАВ остаются малоизученными.

В литературе описаны данные о составе и функциональной активности МАВ, продуцируемых эндотелиальными клетками [5] и лейкоцитами [7]. Однако практически ничего не известно о МАВ стромальных клеток, в том числе МСК. Изучение потенциально нового класса везикул затрудняется отсутствием протоколов их выделения и характеризации для культивируемых стромальных клеток.

Известно, что МАВ плохо выделяются при помощи ряда детергентов, таких как сапонин или SDS (sodium dodecyl sulfate) [8], однако могут быть выделены с помощью обработки Triton X-100 в низких концентрациях [5, 8, 9]. Кроме того, ранее совместно с коллегами из Новосибирского государственного университета нами была показана возможность выделения МАВ с поверхности клеток крови при помощи последовательной обработки растворами ЭДТА и трипсином [10]. Проанализировав литературу, мы предположили механизмы, которые могли бы удерживать МАВ на поверхности клеток. Поскольку выделение МАВ возможно осуществлять с помощью трипсина можно предположить, что везикулы могут удерживаться на поверхности клеток с помощью белок-белковых (например, через рецепторы), взаимодействий. Поскольку для удаления белковых компонентов непосредственно с поверхности ВВ используют протеиназу К – сериновую протеазу, обладающую широким спектром специфичности [11], мы предположили, что данный фермент также может использоваться для выделения МАВ. Другим возможным компонентом, удерживающим МАВ на поверхности клетки, могут стать компоненты внеклеточного матрикса, в частности гиалуроновая кислота. Известно, что гиалуроновая кислота секретируется стромальными клетками в большом количестве, в том числе при развитии ряда патологий, например при развитии

фиброза и канцерогенезе. Кроме того доказано, что поверхность большого числа секретируемых ВВ покрыта гиалуронаном [12–14]. Интересно отметить, что последние работы показывают, что гиалуроновая кислота способна к накоплению и формированию кластеров ВВ на поверхности клеток в области филлоподий и ламеллоподий [14]. Нами при окрашивании стромальных клеток лиофильным красителем РКН26 также было отмечено, что на тонких участках мембраны и филлоподиях клеток формируется большое число липидных структур, напоминающих МАВ (неопубликованные данные). Поэтому использование гиалуронидазы может стать перспективным подходом для выделения МАВ.

Таким образом, целью работы стала разработка способа получения фракции МАВ, производимых культивируемыми клетками, с сохранением их морфологии и жизнеспособности, и сравнительная характеристика концентрации, морфологии и размера МАВ с ВВ, секретируемых в среду, выделенных по стандартному протоколу.

## Материалы и методы

**Клеточные линии.** В работе использовали клеточную линию иммортализованных МСК жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, США). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (Capricorn, Германия) с добавлением 7% фетальной бычьей сыворотки (Lacopa, Россия), 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США) в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Для получения МАВ клетки высаживали на чашки Петри диаметром 100 мм в одинаковой концентрации 5 тыс. кл./см<sup>2</sup>, параллельно для всех способов выделения, все клетки выращивали до плотности 70–90% конфлюентности. Далее объемы приведены для указанной площади и плотности клеток. Параллель экспериментов повторяли трижды, для каждой точки делали два технических повтора.

На основании анализа литературы для выделения МАВ [5, 8–14] были разработаны и протестированы описанные ниже протоколы. Каждый из протоколов включал в себя предварительную обработку раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия) 10 мл 3 раза по 10 мин при 37°C при покачивании. В качестве контроля чашку аналогично инкубировали с 5 мл раствора Хэнкса:

1) *обработка 0,1%-ным раствором Tritona X-100.* Чашку инкубировали в 5 мл 0,1%-ного раствора Tritona X-100 (Sigma, США) на фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C в течение 10 мин, собирали раствор.

2) *обработка 5мM ЭДТА/0,25% TrypLE.* Чашку инкубировали в 1 мл раствора Версена (5 мМ раствор ЭДТА; ПанЭко, Россия) в течение 5 мин, собирали раствор для обработки в центрифужную пробирку, затем добавляли 1 мл TrypLE (Gibco, США) на 5 мин при покачивании при комнатной

температуре, собирали раствор в ту же центрифужную пробирку. Проводили дополнительные 3 промывки 1 мл раствора Версена, добавляя использованный раствор к образцу. После чего открепившиеся клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, супернатант дополнительно центрифугировали при 300 g 10 мин, чтобы осадить клеточный дебрис.

3) обработка гиалуронидазой, 40 ед./мл. Чашку инкубировали в 5 мл раствора гиалуронидазы (40 ед./мл; Sigma, США) в ФСБ в течение 15, 30 или 45 мин при 37°C на качалке.

4) обработка протеиназой K, 100 мкг/мл. Чашку инкубировали в 5 мл раствора протеиназы K (100 мкг/мл; Sigma, США) в ФСБ в течение 2 ч при 37°C на качалке.

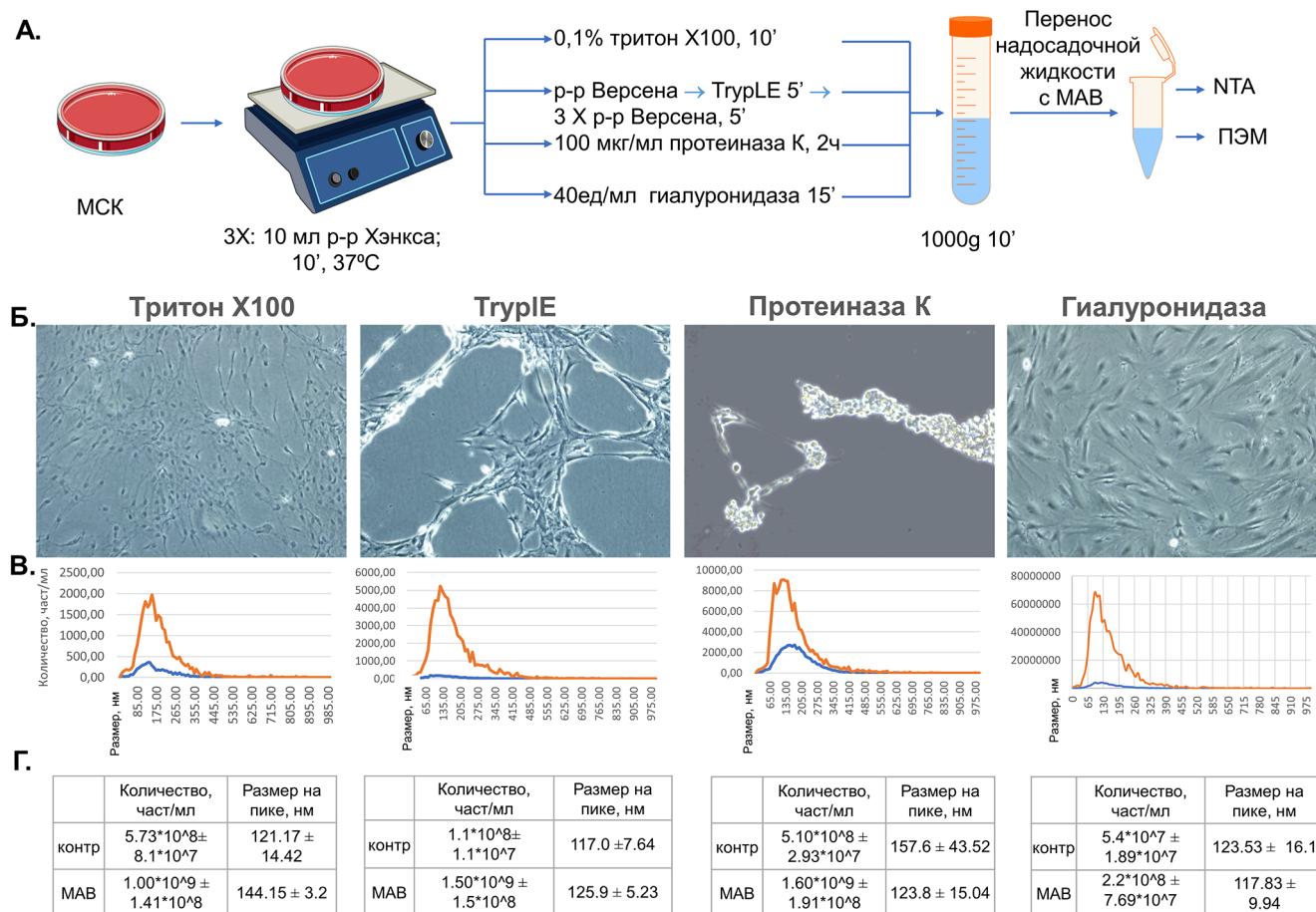
Все пробы центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, чтобы избавиться от клеточного дебриса, переносили около 4,5 мл супернатанта в новую пробирку. Хранили при -20°C. Схема эксперимента приведена на рис. 1A.

Для визуализации клеточных линий использовали приживленную фазово-контрастную микроскопию. Для сравнения характеристик готови-

ли образцы секретируемых в среду ВВ, как было описано ранее [15].

**Измерение размера и концентрации ВВ МСК методом анализа траекторий наночастиц (NTA).** Измерения проводили с помощью ZetaView® Particle Metrix (Германия), регистрирующем броуновское движение частиц в растворе, освещенном лазером, и позволяющем оценить их размер и концентрацию в каждой пробе.

Измерение проводилось в режиме «бокового светорассеяния» при 25°C. Для измерения использовали лазер с длиной волны 488 нм, объектив 10× и высокочувствительную камеру с матрицей КМОП-типа (Tracelength = 30; разведение образцов до диапазона 25–200 частиц на поле зрения). Для дальнейших расчетов использовали образцы, в которых было детектировано не менее 1500 треков. В качестве контроля случайных частиц использовался образец того же раствора, в котором происходила инкубация клеток для отделения МАВ, аликвоту которого отбирали до добавления к клеткам. Такие параметры, как концентрация частиц, а также диаметр концентрация частиц на пике анализировали в каждом из образцов и сравнивали друг с другом.



**Рис. 1.** Характеристика МСК и частиц, полученных с помощью соответствующих протоколов для выделения МАВ. А. Схема получения фракции МАВ в помощь разным протоколам. Б. Репрезентативные изображения клеток после обработки, фазово-контрастная микроскопия, общее увеличение 100×. В. Графики распределения количества частиц в зависимости от их размера, NTA. Оранжевый – образец, предположительно содержащий МАВ, синий – контроль. Г. Таблицы, описывающие количество частиц и их размер на пике, NTA.

**Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием.** Покрытые углеродом ПЭМ-сетки (Ted Pella, США) обрабатывали с помощью прибора тлеющего разряда Emitech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) при токе 25 мА в течение 45 с. Такая обработка делала поверхность углерода гидрофильной и увеличивала адсорбцию везикул. Образцы МАВ ( $n = 3$ ) или ВВ ( $n = 3$ ) в объеме примерно 15 мкл наносили на сетку на 2–3 мин, затем жидкость промакивали фильтровальной бумагой. В качестве контроля наносили чистую среду культивирования DMEM (для ВВ) или раствор гиалуронидазы (для МАВ). Сетки быстро переносили в капли 1%-ного уранилацетата, окрашивали в течение 1–2 мин, промакивали и высушивали. Изображения получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенного камерой Rio-9 (Gatan Inc., США). Диапазон увеличения составлял от 30000 $\times$  до 150000 $\times$ , ускоряющее напряжение составляло 120 кВ.

## Результаты и обсуждение

**Выбор метода получения МАВ.** Были протестированы как описанные в литературе, так и предложенные нами на основе знания о биогенезе и локализации ВВ методы выделения МАВ с помощью Тритона X-100, ЭДТА/ТрутLE, протеиназы К и гиалуронидазы.

На первом этапе отработки протоколов мы проводили визуальную оценку морфологии клеточной линии МСК во время обработки соответствующими растворами с помощью прижизненной фазово-контрастной микроскопии. Помимо этого, мы оценивали количество отделяемых от клеток частиц в неконцентрированных образцах методом анализа траектории наночастиц NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). В качестве контроля для исследуемых образцов, предположительно содержащих МАВ (далее «МАВ»), использовали растворы, применяемые для отделения МАВ от поверхности клеток (далее «контроль»). Полученные результаты проиллюстрированы на рис. 1.

Так, мы показали, что при использовании достаточно хорошо описанного в литературе протокола с использованием Тритона X-100 [5, 8, 9], клетки разрушаются (рис. 1Б). Через 10 мин действия раствора мы наблюдали в микроскоп остатки прикрепленных клеток. Количество частиц на порядок отличалось от контрольного образца, распределение частиц по размеру (пик 144,3 нм) было похоже на распределение в образцах секрецируемых ВВ для данной культуры (пик ≈144,1 нм). Однако обнаруживаемые частицы, вероятно, представляли мелкий клеточный дебрис и апоптотические тельца. В протоколе с использованием протеиназы К также не удавалось сохранить клетки прикрепленными с неизмененной морфологией. При обработке протеиназой К уже через 15 мин после начала инкубации

мы наблюдали открепление клеток от поверхности пластика и сбивание их в группы (рис. 1Б).

Далее были протестированы протоколы с последовательной обработкой раствором Версена (ЭДТА) и trypLE (аналог трипсина, действующий при комнатной температуре). Также была предложена модифицированная версия данного протокола, заключающаяся том, что солевой раствор, использованный для промывки, собирали на всех этапах воздействия. Клетки при такой обработке откреплялись от поверхности чашек, но оставались жизнеспособными. Количество частиц также на порядок отличается от контрольного образца. Следует отметить, что в случае использования как раствора Версена-trypLE, так и протеиназы К пик распределения частиц смешен влево в среднем на 20 нм (пик ≈124,5 нм), по сравнению со стандартным распределением секрецируемых ВВ (пик ≈149 нм).

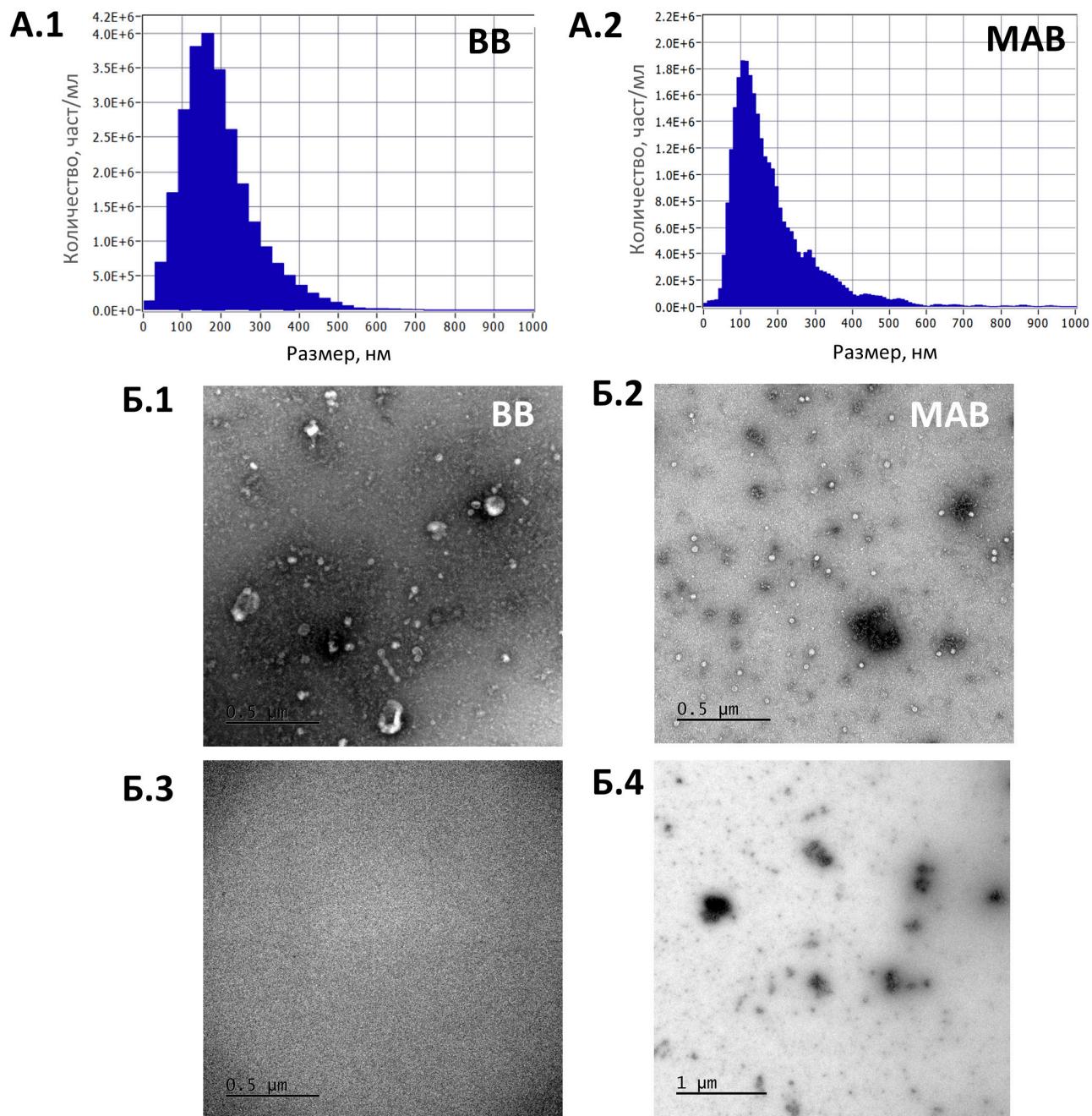
В протоколе с использованием гиалуронидазы клетки оставались прикрепленными к чашке и не меняли морфологию на протяжении всех отмывок и действия фермента (рис. 1Б).

Таким образом, было показано, что при использовании всех протоколов, кроме обработки гиалуронидазой, клетки открепляются от субстрата, что в дальнейшем может быть препятствием для изучения МАВ и клеток, свободных от МАВ в исследованиях.

**Оптимизация протокола выделения МАВ с помощью гиалуронидазы.** Для оптимизации протокола была протестирована обработка с использованием гиалуронидазы в более высокой концентрации (80 ед./мл), а также различное время обработки клеток (для концентрации 40 ед./мл – 15, 30 и 45 мин). Во всех случаях мы не наблюдали изменения морфологии культивируемых клеток. Для определения оптимального протокола мы проводили сравнение концентрации и размеров получаемых частиц.

Так, мы показали, что оптимальным протоколом для выделения МАВ является обработка гиалуронидазой в концентрации 40 ед./мл в течение 15 мин. Именно при такой обработке выделяется количество частиц, сопоставимое по концентрации со свободно секрецируемыми в среду культивирования ВВ. Интересно отметить, что размер выделяемых МАВ существенно меньше размера ВВ и сопоставим с размером МАВ, полученных другими методами на предыдущем этапе работы. Увеличение времени обработки, как и увеличение концентрации фермента приводит к снижению концентрации получаемых частиц и к увеличению их размера, что, вероятно, может говорить об их агрегации.

Полученные МАВ были частично охарактеризованы согласно критериям MISEV 2023. В качестве контроля были использованы образцы ВВ, выделенные по стандартному протоколу [15]. Описание размеров и морфологии частиц было выполнено с помощью методов NTA (рис. 2А, таблица), а также ПЭМ (рис. 2Б). Полученные



**Рис. 2.** А. Репрезентативные графики распределения количества частиц в зависимости от их размера, NTA. А.1 – ВВ, полученные из среды культивирования. А.2 – МАВ, полученные с помощью гиалуронидазы 40 ед./мл, 15 мин. Б. Репрезентативные изображения частиц, ПЭМ с негативным контрастированием. Б.1 – ВВ, полученные из среды культивирования. Б.2 – МАВ, полученные с помощью гиалуронидазы 40 ед./мл, 15 мин. Б.3 – контроль получения ВВ. Б.4 – контроль получения МАВ.

Таблица 1

**Характеристика количества частиц и их размера на пике, полученных по протоколу выделения МАВ с помощью обработки МСК гиалуронидазой в различной концентрации, NTA ( $n \geq 3$ )**

Метод выделения	Время инкубации	Концентрация частиц/мл	Размер частиц на пике, нм
Стандартный протокол для выделения ВВ-МСК [15]	–	$1,3 \times 10^8 \pm 2,36 \times 10^7$	$149,08 \pm 30,74$
Гиалуронидаза 40 ед./мл	15 мин	$2,2 \times 10^8 \pm 7,69 \times 10^7$	$117,83 \pm 9,94$
Гиалуронидаза 40 ед./мл	30 мин	$2,06 \times 10^8 \pm 1,43 \times 10^7$	$116,75 \pm 7,85$
Гиалуронидаза 40 ед./мл	45 мин	$1,5 \times 10^8 \pm 1,55 \times 10^7$	$129,48 \pm 14,92$
Гиалуронидаза 80 ед./мл	15 мин	$1,1 \times 10^8 \pm 5,96 \times 10^7$	$153,80 \pm 16,68$

данные указывают на то, что используемый протокол позволяет получить везикулярную фракцию, морфологически сходную с хорошо описанной фракцией секрецируемых ВВ, однако получаемые МАВ имеют в среднем меньший размер по сравнению с секрецируемыми ВВ.

### Заключение

Таким образом, протокол с воздействием на клетки гиалуронидазы в концентрации 40 ед./мл в течение 15 мин при 37°C позволяет получить везикулярную фракцию, которая предположительно соответствует МАВ. При этом такая обработка сохраняет морфологию культивируемых адгезионных клеток и не приводит к откреплению их от пластика, что позволяет изучать клетки после открепления МАВ методами микроскопии. МАВ обладают размерными и морфологическими харак-

теристиками, присущими ВВ, однако имеют свои особенности в виде меньших размеров. Требуется дальнейшая характеристика выделяемой данным способом фракции, чтобы оценить состав и функциональные характеристики МАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» (№24-Ш04-14). Работа выполнена с использованием уникальной научной установки «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия» биологического факультета МГУ. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Williams T., Salmanian G., Burns M., Maldonado V., Smith E., Porter R.M., Song Y.H., Samsonraj R.M. Versatility of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair and regenerative applications. *Biochimie*. 2023;207:33–48.
- van Griensven M., Balmayor E.R. Extracellular vesicles are key players in mesenchymal stem cells' dual potential to regenerate and modulate the immune system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2024;115203.
- Manzoor T., Saleem A., Farooq N., Dar L.A., Nazir J., Saleem S., Ismail S., Gugjoo M.B., Shiekh P.A. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells – a novel therapeutic tool in infectious diseases. *Inflamm. Regener.* 2023;43(1):17.
- Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J. Extracell. Vesicles*. 2024;13(2):e12404.
- Zhou Y., Qin Y., Sun C., Liu K., Zhang W., Gaman M.A., Chen Y. Cell-bound membrane vesicles contain antioxidative proteins and probably have an antioxidative function in cells or a therapeutic potential. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023;81:104240.
- Моисеенко А.В., Басалова Н.А., Багров Д.В., Трифонова Т.С., Виговский М.А., Дьячкова У.Д., Григорьева О.А., Новоселецкая Е.С., Ефименко А.Ю., Соколова О.С. Прямая визуализация внеклеточных везикул на мемbrane мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека методом криоэлектронной микроскопии. *Наноиндустрия*. 2024;14(7–8):434–443.
- Konoshenko, Zamakhov I.M., Anashkin V.A., Moiseenko A.V., Orlov V.N., Vorobyeva N.N., Sokolova O.S., Baykov A.A. The structure and nucleotide-binding characteristics of regulated cystathionine  $\beta$ -synthase domain-containing pyrophosphatase without one catalytic domain. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(24):17160.
- Tang Q., Zhang X., Zhang W., Zhao S., Chen Y. Identification and characterization of cell-bound membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2017;1859(5):756–766.
- Zhang Y., Liu Y., Zhang W., Tang Q., Zhou Y., Li Y., Rong T., Wang H., Chen Y. Isolated cell-bound membrane vesicles (CBMs) as a novel class of drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnol.* 2020;18(1):69.
- Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A., Grigoreva A., Ryabchikova E., Kirushina N., Vlassov V., Tkachuk V., Laktionov P. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. *Curr. Mol. Med.* 2019;19(4):273–285.
- Petrova T., Kalinina O., Aquino A., Grigoryev E., Dubashynskaya N.V., Zubkova K., Kostareva A., Golovkin A. Topographic distribution of miRNAs (miR-30a, miR-223, miR-let-7a, miR-let-7f, miR-451, and miR-486) in the plasma extracellular vesicles. *ncRNA*. 2024;10(1):15.
- Rilla K., Siiskonen H., Tammi M., Tammi R. Hyaluronan-coated extracellular vesicles—a novel link between hyaluronan and cancer. *Adv. Cancer Res.* 2014;121–148.
- Ragni E., Perucca Orfei C., De Luca P., Lugano G., Vigà M., Colombini A., Valli F., Zucchetti D., Bollati V., de Girolamo L. Interaction with hyaluronan matrix and miRNA cargo as contributors for in vitro potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of human osteoarthritic synoviocytes. *Stem Cell Res. Ther.* 2019;10(1):109.
- Häkkinen K., Oikari S., Kyykkallio H., Capra J., Hakkola S., Ketola K., Thanigai Arasu U., Daaboul G., Malloy A., Oliveira C., Jokelainen O., Sironen R., Hartikainen J.M., Rilla K. CD44s assembles hyaluronan coat on filopodia and extracellular vesicles and induces tumorigenicity of MKN74 gastric carcinoma. *Cells*. 2019;8(3):276.
- Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evushchenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., Efimenko A. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles. *Cells*. 2020;9(5):1272.

Поступила в редакцию 07.07.2025

После доработки 01.09.2025

Принята в печать 05.09.2025

## RESEARCH ARTICLE

**Membrane-associated vesicles: approaches for isolation and characterization**

**O.A. Grigorieva<sup>1,\*</sup> , N.A. Basalova<sup>1</sup> , M.A. Vigovskiy<sup>1</sup> , U.D. Dyachkova<sup>1</sup> ,**  
**D.V. Bagrov<sup>2</sup> , O.S. Sokolova<sup>2</sup> , A.Yu. Efimenko<sup>1</sup> **

<sup>1</sup>*Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University,  
27–10 Lomonosovsky Prospect, Moscow, 119234, Russia;*

<sup>2</sup>*Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia  
\*e-mail: grigorievaoa@my.msu.ru*

Intercellular communication is a critical component of maintaining tissue homeostasis. One of the communication methods is the transfer of a wide range of biologically active molecules – proteins, nucleic acids (primarily non-coding RNA) and lipids – in extracellular vesicles (EV). This allows EV-producing cells to change the metabolic and transcriptional activity of individual target cell populations over a wide range and “tune” it in accordance with tissue needs. Most of the existing studies are focused on the composition and functions of EVs secreted into the external environment, while the study of the membrane-associated vesicle subclass (membrane-associated vesicles, MAV) is hampered by the lack of generally accepted methods for their isolation from different cell types, including cultured ones, and characterization. In this paper, we present a protocol for isolating the MAV fraction of cultured mesenchymal stromal/stem cells while preserving the morphology and viability of the cells themselves using hyaluronidase treatment. This protocol demonstrated the highest efficiency compared to other tested methods and allows one to obtain a fraction significantly enriched in vesicles, as demonstrated by nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscopy. A comparative analysis of the characteristics of MAV and EV secreted into the medium showed that the proposed MAV isolation protocol allows one to obtain a fraction with a similar particle concentration, but they are smaller in size compared to EV. Thus, the isolation method we described allows one to obtain a MAV fraction for further analysis of their composition and functional features.

**Keywords:** *extracellular vesicles, membrane-associated vesicles, mesenchymal stromal/stem cells, intercellular communication*

**Funding:** The research was funded with the financial support of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University “Molecular Technologies of Living Systems and Synthetic Biology” (#24-Sh04-14). The research was carried out using the unique scientific installation “Three-dimensional electron microscopy and spectroscopy” of the Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University.

**Сведения об авторах**

*Григорьева Ольга Александровна* – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: grigorievaoa@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2954-2420>

*Басалова Наталья Андреевна* – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: basalovana@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>

*Виговский Максим Александрович* – лаборант-исследователь лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: vigovskiy\_m.a@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2103-8158>

*Дьячкова Ульяна Денисовна* – лаборант-исследователь лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: dyachkovauliana@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6119-8976>

*Багров Дмитрий Владимирович* – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dbagrov@live.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6355-7282>

*Соколова Ольга Сергеевна* – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3408-3660>

*Ефименко Анастасия Юрьевна* – докт. мед. наук., зав. лаб. репарации и регенерации тканей, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, доб. 3159; e-mail: efimenkoay@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>