

УДК 616-092

DOI: 10.25557/GM.2018.4.9747

## Размеры внеклеточных везикул, секретиремых разными видами стволовых клеток

Алчинова И.Б.<sup>1,2</sup>, Полякова М.В.<sup>1</sup>, Сабурова И.Н.<sup>1</sup>, Карганов М.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт космической медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России. 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

Механизм терапевтического действия мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) на облученный организм в последнее время вызывает повышенный интерес исследователей. В качестве активного участника паракринного механизма реализации этого эффекта предлагают рассматривать внеклеточные везикулы, секретиремые практически всеми клетками живого организма. **Цель работы:** выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы, продуцируемые стволовыми клетками различной природы. **Материалы и методы.** Суспензии внеклеточных везикул, выделенных по модифицированному протоколу дифференциального центрифугирования из культуральных жидкостей от культур ММСК костного мозга человека 2-го пассажа и ММСК жировой ткани крысы 4-го пассажа, были проанализированы методом просвечивающей электронной микроскопии и методом анализа траекторий наночастиц. **Результаты.** Исследование показало наличие в обоих образцах микрочастиц размерами до и около 100 нм, однако процентное содержание частиц разных размеров в суспензии различалось для двух анализируемых типов клеток. **Заключение.** Полученные результаты могут свидетельствовать о специфике секреции, обусловленной клеточным типом.

**Ключевые слова:** стволовые клетки, внеклеточные везикулы, анализ траекторий наночастиц, просвечивающая электронная микроскопия.

**Для цитирования:** Алчинова И.Б., Полякова М.В., Сабурова И.Н., Карганов М.Ю. Размеры внеклеточных везикул, секретиремых разными видами стволовых клеток. Патогенез. 2017; 15 (2): 38—42

**Для корреспонденции:** Полякова Маргарита Вячеславовна, e-mail: nedzумы@bk.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность Московскому Государственному Университету им. М.В. Ломоносова и лично Е.Г. Евтушенко, Н.А. Никитину и Е.А. Трифоновой за проведение измерений.

**Поступила:** 20.08.2017

## The size of extracellular vesicles secreted by different types of stem cells

Alchinova I.B.<sup>1,2</sup>, Polyakova M.V.<sup>1</sup>, Saburina I.N.<sup>1</sup>, Karganov M.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute for Space Medicine of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies, Orekhovyi Blvd. 28, Moscow 115682, Russian Federation

A mechanism of the therapeutic effect of multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) on irradiated body has recently arisen much interest of researchers. Extracellular vesicles (EVs) secreted by almost all cells of a living organism were suggested to actively contribute to the paracrine mechanism of this effect. The aim of the study was isolation and characterization of extracellular vesicles produced by various types of stem cells. Materials and methods. Suspensions of EVs were isolated from culture media of passage 2 human bone marrow-derived MMSC and passage 4 rat adipose tissue-derived MMSC using a modified protocol of differential centrifugation and then studied using transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis. Results. The study showed the presence of microparticles with a size of  $\geq 100$  nm in the examined samples. However, the percent content of particles with different sizes in the suspension was different in two analyzed types of cell culture. Conclusion. The study results might reflect a specificity of secretion determined by the cell type.

**Key words:** stem cells, extracellular vesicles, nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy.

**For citation:** Alchinova I.B., Polyakova M.V., Saburina I.N., Karganov M.Yu. The size of extracellular vesicles secreted by different types of stem cells. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15 (2): 38—42 (in Russian)

**For correspondence:** Polyakova Margarita Vyacheslavovna, e-mail: nedzумы@bk.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** The authors are grateful to MV Lomonosov Moscow State University and personally E.G. Evtushenko, N.A. Nikitin and E.A. Trifonova for conducting measurements.

**Received:** 20.08.2017

## Введение

В настоящее время существует острая необходимость в разработке новых способов терапии последствий действия ионизирующего излучения на живой организм. Одним из предложенных исследователями вариантов подобной терапии является трансплантация мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга (КМ). В предыдущей работе [1] нами было показано, что даже однократная внутривенная инъекция ММСК КМ человека облученным мышам способствовала частичному восстановлению их физиологических параметров. Однако механизм реализации такого терапевтического эффекта до сих пор полностью не изучен. В настоящее время в качестве эффекторов паракринного механизма терапевтического действия ММСК на облученный организм интенсивно изучают внеклеточные везикулы (ВВ), которые секретируются практически всеми клетками организма [2, 3]. Полагают, что эти частицы являются активными участниками процессов межклеточной коммуникации и взаимодействия клеток с микроокружением. *Целью настоящей работы* было выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы, продуцируемые стволовыми клетками различной природы.

## Материалы и методы исследования

В работе были использованы культуральные жидкости от двух клеточных линий: ММСК КМ человека 2-го пассажа (клетки, использованные ранее в качестве терапии облученных животных; КЖ-1) и ММСК жировой ткани (ЖТ) крысы 4-го пассажа (КЖ-2; для сравнения). Суспензии внеклеточных везикул, выделенных из культуральных жидкостей, были проанализированы методом просвечивающей электронной микроскопии и методом анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle tracking analysis, NTA).

### Выделение и культивирование культур клеток

Выделение и культивирование ММСК КМ человека проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [1]. Для выделения клеток ЖТ крысы в процессе операции брали фрагменты ткани подкожного жира и выделяли по стандартному протоколу [4]. Полученные фрагменты ткани в стерильных условиях измельчали, получали суспензию мелких фрагментов и проводили их инкубацию в растворах коллагеназы 1-го типа (0,07%) («ПанЭко», Россия) и диспазы (0,025%) («ПанЭко», Россия) в течение 25–30 мин. После окончания инкубации в раствор с ферментами и ткань добавляли полную питательную среду и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант сливали, а полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и пропускали через нейлоновый фильтр, для того чтобы избавиться от крупных фрагментов ткани. Полученную суспензию клеток высевали на чашки Петри и культивировали в течение 7–10 дней. Среду меняли каждые 3 дня. Полная питательная среда имеет следующий состав: DMEM/F12 с глутамином («ПанЭко», Россия), 1% пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия), 10% FCS (Fetal Calf Serum). При достижении монослоем клеток 80–90% конfluence осуществляли пассирование культуры. В эксперименте использовали культуру клеток 4-го пассажа.

## Характеристика культур стволовых клеток

Для определения иммунофенотипа полученных клеток проводили иммунофенотипирование по следующим маркерам: CD90, CD105, CD29, CD133, CD19, CD45, CD34, CD11b, CD49b, CD73, CD14 (антитела фирмы «BD Biosciences», США).

Клетки отмывали от ростовой среды раствором Версена, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, пипетировали и центрифугировали в течение 5 минут при 300g. Полученный осадок ресуспендировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) и аликвотировали. Каждую пробу инкубировали в темноте при +25°C, 15 минут с антителами. Полученные образцы анализировали на точном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США).

Исследуемые культуры экспрессировали характерные поверхностные маркеры культуры ММСК и не экспрессировали маркеры клеток гемопоэтического и лимфоцитарного рядов. Результаты иммунофенотипирования представлены на рис. 1.

### Выделение внеклеточных везикул

Выделение ВВ производили методом дифференциального центрифугирования при +4°C по модифицированному протоколу [5]. Все используемые инструменты и посуда были предварительно промыты в течение 2 часов в специально очищенной воде («Медиана», Россия). Чистоту воды оценивали по величине сопротивления, которая составила 15 МОм. КЖ центрифугировали 10 мин при 300g для осаждения клеток. Супернатант центрифугиро-

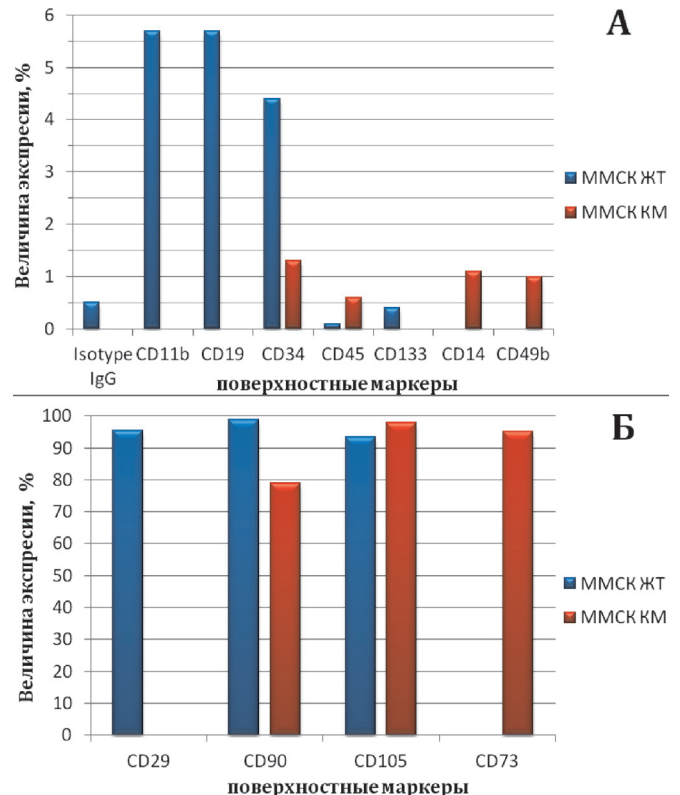


Рис. 1. Результаты иммунофенотипического анализа ММСК КМ человека и ММСК ЖТ крысы: величина экспрессии поверхностных маркеров клеток (%). А — показатели поверхностных маркеров клеток с низкой экспрессией. Б — показатели поверхностных маркеров клеток с высокой экспрессией.



вали 20 минут при 16500g (Ultracentrifuge Optima L-90K, «Beckman coulter» angular rotor) для более полного удаления клеток и дебриса. Супернатант пропускали через фильтр 0,2 мкм (Millipore Millex-GN Nylon filter, Германия), чтобы удалить частицы размером больше 200 нм, и центрифугировали 2 ч при 100000g для осаждения ВВ. Осадок ресуспендировали в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера (phosphate buffered saline, PBS) («ЭкоСервис», Россия), который был предварительно пропущен через фильтр 0,2 мкм и отцентрифугирован в течение 1 часа при 100000g при +4°C. Для ультрацентрифугирования использовали пробирки «Polyallomer» («Beckman», Германия) со стальными крышками, также предварительно отмытые в специально очищенной воде. Ресуспендированные пробы хранили при -20°C вплоть до начала всех последующих манипуляций.

#### Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Адсорбцию препаратов проводили в течение 30 секунд на медных сетках для электронной микроскопии IGC 200 («PELCO», США), покрытых формваровой пленкой (при нанесении пленки использовали 0,5% раствор формвара в

дихлорэтано), с последующим негативным контрастированием препаратов в 2% растворе уранил ацетата. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 («JEOL», Япония) с цифровой фотокамерой Quemesa («Olympus», Япония) и программного обеспечения («Olympus Soft Imaging Solutions GmbH», Мюнстер, Германия) при 40000-кратном увеличении. Размеры исследуемых объектов оценивали с помощью программы ImageJ («Национальный институт здоровья», США).

#### Анализ траекторий наночастиц (NTA)

Метод NTA («Nanosight LM10-HSFB», Великобритания) использовали для измерения среднего размера и концентрации частиц в исследуемых образцах. Согласно заявленным производителем характеристикам, «NanoSight» позволяет обнаруживать и идентифицировать растворенные частицы размером в пределах от 10 до 2000 нм. Во время анализа через суспензию проходит сфокусированный луч лазера, который освещает содержащиеся в ней микрочастицы. Свет, рассеянный каждой отдельной частицей в регистрируемом поле зрения, фокусируется микроскопом на датчик изображения видеокамеры. Программное обеспечение NTA идентифицирует и отслеживает каждую частицу, что позволяет измерять ее среднеквадратичное смещение в процессе Броуновского движения. Этот параметр, а также данные о температуре и вязкости анализируемой суспензии, позволяют рассчитать теоретический гидродинамический диаметр исследуемых микрочастиц по уравнению Эйнштейна—Стокса [6]. Имея данные об объеме анализируемой суспензии с помощью метода NTA также возможно оценить концентрацию исследуемых частиц в образце.

В нашей работе было необходимо оценить размеры внеклеточных везикул, секретируемых разными культурами клеток. Большинство этих везикул имеют субмикронный размер (30–1000 нм), среди них особый интерес вызывают экзосомы, которые являются самыми маленькими представителями ВВ (от 30 до 150 нм) [6]. Исходя из этого, при измерении методом NTA был установлен минимальный ожидаемый размер детектируемых частиц — 30 нм. Каждый образец был разведен в 1000 раз, чтобы достичь рекомендуемой производителем для корректности измерений концентрации анализируемых частиц ( $1-10 \times 10^8$  частиц/мл) [7]. В качестве контроля был выбран образец PBS, используемый для разведения. Измерения суспензий ВВ, полученных от анализируемых культур клеток, проводили в 12 повторах, контрольной пробы — в 4. Среднее количество отслеженных траекторий составило 145, 155 и 52 за проход для образцов из КЖ-1, КЖ-2 и контроля соответственно.

#### Результаты исследования и обсуждение

В ходе анализа суспензий ВВ с помощью ПЭМ в КЖ-1 были выявлены частицы с формой, близкой к сферической, и размерами в диапазоне от 36 до 45 нм (рис. 2, А). Других частиц в этом образце обнаружено не было. В КЖ-2 присутствовало два типа частиц: размером от 79 до 106 нм с морфологическими признаками внеклеточных везикул и от 37 до 53 нм, соответствующими, по-видимому, липопротеинам очень низкой плотности, присутствующими в сыворотке, добавляемой в культуральную среду (рис. 2, Б).

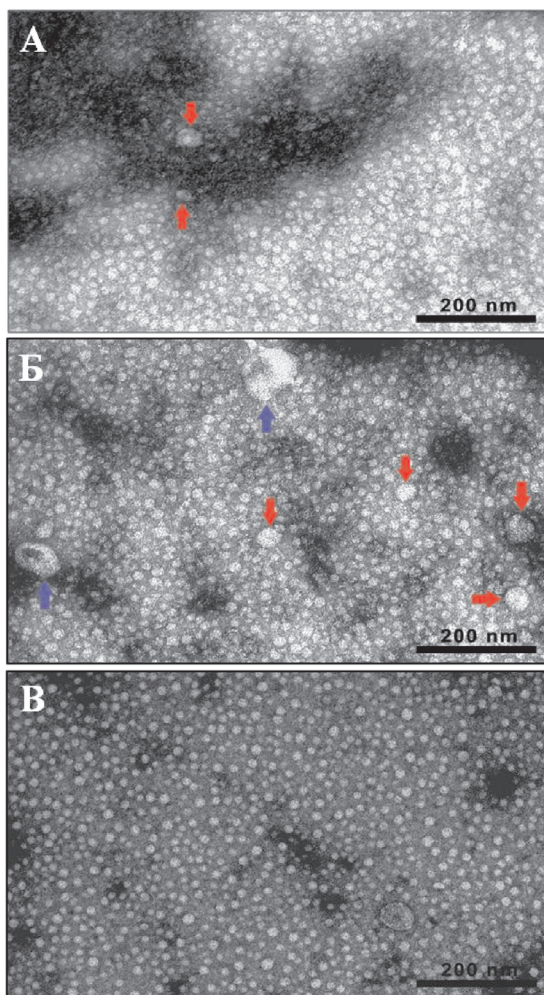


Рис. 2. Изображение ВВ в анализируемых суспензиях, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии, при 40000-кратном увеличении. А — ПЭМ ВВ от ММСК КМ человека, частицы размером 36–45 нм обозначены красными стрелками. Б — ПЭМ ВВ от ММСК ЖТ крысы, частицы размером 79–106 нм обозначены синими стрелками, а частицы размером 37–53 нм — красными стрелками. В — ПЭМ контрольного образца PBS.

В контрольном образце (PBS), подвергнутом такой же процедуре, микрочастиц близких размеров не обнаружили (рис. 2, В). Мелкая зернистость, которая присутствует и в препаратах, и в контроле, вероятно, представляет собой структуру формваровой подложки.

По результатам НТА средний размер частиц в образце КЖ-1 составил 86 нм при концентрации  $6,6 \times 10^{10}$  частиц/мл, а в образце КЖ-2 — 101 нм при концентрации  $7,9 \times 10^{10}$  частиц/мл (рис. 3). В контрольных образцах сред (без культивирования в них клеток) а также в образце буфера, используемого для разведения, концентрация микрочастиц не превышает  $10^8$  частиц/мл (данные не представлены).

Исследуя такой объект, как внеклеточные везикулы, необходимо помнить, что получаемые данные о размере микрочастиц не являются истинной величиной. Для проведения ПЭМ исследуемый образец необходимо предварительно фиксировать и регидратировать, а сам процесс получения изображения проводится в условиях вакуума. Многоступенчатая пробоподготовка и условия проведения наблюдений могут вызывать изменения формы и размеров исследуемых частиц [8]. Однако данный метод находит широкое применение, позволяя проводить анализ структурных и биологических характеристик внеклеточных везикул.

В случае НТА-анализа имеет место обратная ситуация. Вокруг везикул, находящихся в водном растворе, образуется гидратная оболочка, поэтому методы, основанные на детекции частиц в подобных условиях (НТА, методы динамического светорассеяния), позволяют определить только теоретический гидродинамический размер исследуемых микрочастиц. Тем не менее, эти методы позволяют получить довольно точную информацию о концентрации и распределении частиц по размеру в анализируемой суспензии.

Результаты нашего исследования согласуются с изложенным выше. Размеры микрочастиц, определенные методом НТА, были несколько большими, чем полученные при исследовании методом просвечивающей электронной микроскопии. Подобные различия также характерны для размеров биомолекул, определяемых в сухом и растворенном состоянии, например, с помощью рентгеноструктурного анализа и лазерной корреляционной спектроскопии [9]. Количество отслеженных траекторий в ходе НТА-анализа каждого образца также косвенно свидетельствует о различии в концентрациях частиц, содержащихся в суспензиях ВВ от разных клеточных культур.

### Заключение

Полученное в нашем исследовании различие в процентном содержании микрочастиц разного гидродинамического радиуса в анализируемых суспензиях ВВ, выделенных из культуральных жидкостей от двух разных культур клеток, может свидетельствовать о специфике секреции, обусловленной клеточным типом, что согласуется с известными данными литературы [10, 11].

### Список литературы

1. Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. Long-Term Effects of Stem Cells on Total-Body Irradiated Mice. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*,

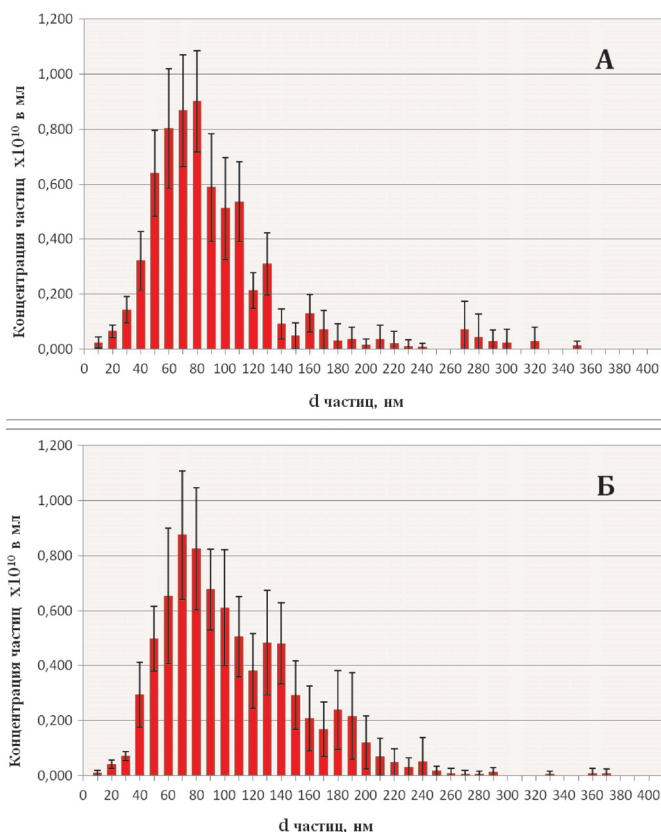


Рис. 3. Содержание частиц разных размеров в анализируемых суспензиях ВВ, полученных из двух разных культуральных жидкостей. А — ММСК КМ человека, Б — ММСК ЖТ крысы.

2017; 784(1): 012015. DOI: 10.1088/1742-6596/784/1/012015. Режим доступа: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/784/1/012015/pdf>/ Дата обращения: 19.08.2017

2. Schoefinius J.-S., Brunswig-Spickenheier B., Speiseder T., Krebs S., Just U., Lange C. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Survival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem Cells*. 2017. DOI: 10.1002/stem.2716. Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2716/epdf>/ Дата обращения: 19.08.2017

3. Wen S., Dooner M., Cheng Y., Papa E., Del Tatto M., Pereira M., Deng Y., Goldberg L., Aliotta J., Chatterjee D., Stewart C., Carpanetto A., Collino F., Bruno S., Camussi G., Quesenberry P. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016; 30(11): 2221-31. DOI: 10.1038/leu.2016.107

4. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 7(2): 211-28. DOI: 10.1089/107632701300062859

5. Lasser C., Eldh M., Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012; (59): e3037. DOI: 10.3791/3037. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369768/> Дата обращения: 19.08.2017

6. Gardiner C., Ferreira Y.J., Dragovic R.A., Redman C.W., Sargent I.L. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles*. 2013; 2(1): 196-71. DOI: 10.3390/ijms18061153. Режим доступа: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1153/> Дата обращения: 19.08.2017

7. Vestad B., Llorente A., Neurauder A., Phuyal S., Kierulf B., Kierulf P., Skotland T., Sandvig K., Haug K.B.F., Ovstebo R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *Journal of extracellular vesicles*. 2017; 6(1): 1344087. DOI: 10.1080/20013078.2017.1344087. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20013078.2017.1344087/> Дата обращения: 19.08.2017



8. Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6): 1153. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19671.1 Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3402/jev.v2i0.19671/> Дата обращения: 19.08.2017

9. Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Ковалева О.И., Медведева Ю.С., Вялкина М.В. Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии в лабораторной медицине. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (9): 533-4. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-9

10. Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Адриевская С.Г., Шевлягина Н.В. Микрочастицы тромбоцитов: образование и свойства. *Патогенез*. 2017; 15(2): С. 4-13. DOI: 10.25557/GM.2017.2.7296

11. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V., Khaspekova S.G., Yakushkin V.V., Aksuk S.A., Alchinova I.B., Karganov M.Yu., Mazurov A.V. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: impact of active tissue factor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2017; 28(5): 373-82. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000609

### References

1. Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. Long-Term Effects of Stem Cells on Total-Body Irradiated Mice. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*, 2017; 784(1): 012015. DOI: 10.1088/1742-6596/784/1/012015. Available at: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/784/1/012015/pdf> Retrieved: 19.08.2017

2. Schoefinius J.-S., Brunswig-Spickenheier B., Speiseder T., Krebs S., Just U., Lange C. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Survival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem Cells*. 2017. DOI: 10.1002/stem.2716. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2716/epdf> Retrieved: 19.08.2017

3. Wen S., Dooner M., Cheng Y., Papa E., Del Tatto M., Pereira M., Deng Y., Goldberg L., Aliotta J., Chatterjee D., Stewart C., Carpaneto A., Collino F., Bruno S., Camussi G., Quesenberry P. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation

damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016; 30(11): 2221-31. DOI: 10.1038/leu.2016.107

4. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 7(2): 211-28. DOI: 10.1089/107632701300062859

5. Lasser C., Eldh M., Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012; (59): e3037. DOI: 10.3791/3037. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369768/> Retrieved: 19.08.2017

6. Gardiner C., Ferreira Y.J., Dragovic R.A., Redman C.W., Sargent I.L. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles*. 2013; 2(1): 196-71. DOI: 10.3390/ijms18061153. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1153/> Retrieved: 19.08.2017

7. Vestad B., Lorente A., Neurauder A., Phuyal S., Kierulf B., Kierulf P., Skotland T., Sandvig K., Haug K.B.F., Ovstebo R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *Journal of extracellular vesicles*. 2017; 6(1): 1344087. DOI: 10.1080/20013078.2017.1344087. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20013078.2017.1344087/> Retrieved: 19.08.2017

8. Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6): 1153. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19671.1 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3402/jev.v2i0.19671/> Retrieved: 19.08.2017

9. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Kovaleva O.I., Medvedeva Yu.S., Vyalkina M.V. [Use of laser correlation spectroscopy in laboratory medicine]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(9): 533-4. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-9 (in Russian)

10. Kubatiev A.A., Borovaya T.G., Zhukhovitsky V.G., Adreevskaya S.G., Shevlyagina N.V. [Platelet Microparticles: Formation and Properties]. *Patogenez [Pathogenesis (Russian Federation)]*. 2017; 15(2): 4-13. (in Russian)

11. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V., Khaspekova S.G., Yakushkin V.V., Aksuk S.A., Alchinova I.B., Karganov M.Yu., Mazurov A.V. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: impact of active tissue factor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2017; 28(5): 373-82. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000609

### Сведения об авторах:

Алчинова Ирина Борисовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии<sup>1</sup>, заведующая лабораторией космической патофизиологии<sup>2</sup>.

Полякова Маргарита Вячеславовна — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии<sup>1</sup>.

Сабурина Ирина Николаевна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития<sup>1</sup>.

Карганов Михаил Юрьевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии<sup>1</sup>.