

©Коллектив авторов

КОНТАМИНАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ЭКЗОСОМ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

*А.Е. Григорьева, Н.С. Дырхеева, О.Е. Брызгунова, С.Н. Тамкович, Б.П. Челобанов, Е.И. Рябчикова**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ),
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; эл. почта: lenryab@yandex.ru

Целью нашей работы было привлечь внимание исследователей к проблеме контаминации препаратов экзосом. Мы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 ("JEOL", Япония) препараты экзосом, выделенные с помощью последовательных центрифугирований по принятым схемам из различных биологических жидкостей: плазмы и мочи здоровых и больных онкологическими заболеваниями людей, сыворотки крупного рогатого скота и культуральной жидкости (клетки линий MDCK, MDA-MB и MCF-7). Все препараты (более 200) содержали экзосомы (везикулы), идентифицированные методом иммунно-электронной микроскопии по связыванию с антителами к тетраспанинам CD63 или CD9. Кроме экзосом, во всех исследованных препаратах присутствовали контаминирующие структуры низкой электронной плотности, не имеющие ограничивающей мембраны и, соответственно, не являющиеся экзосомами ("не-везикулы"). Отмечены два основных типа "не-везикул": имеющие размер 20-40 нм и составляющие 10-40% всех структур препаратов экзосом, и имеющие размер 40-100 нм. Морфология "не-везикул" позволяет отнести их к липопротеинам промежуточной и низкой плотности (20-40 нм) и очень низкой плотности (40-100 нм). Последние идентичны по размеру экзосомам. Наибольший уровень контаминации отмечен в препаратах экзосом крови. Полученные данные указывают на необходимость контролировать состав препаратов экзосом с помощью электронной микроскопии и учитывать присутствие контаминирующих структур при анализе и интерпретации результатов исследования.

Ключевые слова: экзосомы, электронная микроскопия, липопротеины

DOI 10.18097/PBMC20176301091

ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям, молекулярные сигналы в организме переносятся между клетками в основном в виде отдельных молекул и сложных надмолекулярных комплексов. К последним относятся и внеклеточные везикулы, среди которых наибольшее внимание исследователи уделяют экзосомам. В соответствии с международной номенклатурой, к экзосомам относят везикулы размером 40-100 нм, формирующиеся путём инвагинации мембраны поздних эндосом и несущие ряд специфических маркеров. Экзосомы продуцируются всеми эукариотическими клетками и присутствуют во всех биологических жидкостях [1, 2]. Количество публикаций, посвященных экзосомам, в последние годы нарастает; экзосомы изучают и в качестве носителей маркеров заболеваний, и в качестве переносчиков регуляторных молекул между системами организма [1, 3, 4]. Очевидно, что успех исследований экзосом напрямую связан с их выделением и очисткой. Первые исследователи экзосом выделяли эти везикулы методом последовательных центрифугирований [5], который позднее сочетали с ультрафильтрацией. Этот подход к выделению экзосом доминирует и в исследованиях последних лет, несмотря на разработку новых методов, в частности, использующих специфическое связывание экзосом с полиэтиленгликолем, или с так называемым "агентом выделения", химический состав которого фирмы-производители не раскрывают [2, 4]. На фоне сообщений о новых модификациях методов выделения экзосом, каждый из которых провозглашается как "самый оптимальный", вопрос

о чистоте получаемых препаратов отходит на второй план. Отчасти это обусловлено объективной сложностью детекции экзосом, размеры которых лежат в нанометровом диапазоне: увидеть экзосомы и различить ограничивающую их мембрану можно только с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ). Многие опубликованные работы сопровождаются снимками препаратов, на которых отчетливо видны не только везикулы (экзосомы), но и компактные агрегаты вещества низкой электронной плотности [6-8]. Однако, авторы не уделяют внимания этим контаминирующим структурам, лишь в отдельных работах упоминается наличие "микрочастиц", которые не рассматриваются как полноценный компонент препарата.

Между тем, наличие в препаратах экзосом структур, не имеющих мембраны, ставит под сомнение однозначность результатов исследований молекулярного состава и функций экзосом. Очевидно, что такие структуры, взвешенные в крови и других биологических жидкостях, могут, наряду с экзосомами, нести и маркеры заболеваний, и молекулярные сигналы. Возникает вопрос, насколько постоянным компонентом препаратов экзосом являются структуры, не имеющие мембраны, и следует ли учитывать их наличие при интерпретации результатов исследований экзосом. Проведенное нами изучение экзосом слезной жидкости показало, что препараты, полученные сочетанием ультрацентрифугирования и ультрафильтрации, помимо экзосом содержат существенную долю контаминирующих структур (около 20%) [9].

* - адресат для переписки

КОНТАМИНАЦИЯ ПРЕПАРАТОВ ЭКЗОСОМ

Целью данной работы был электронно-микроскопический анализ препаратов экзосом, выделенных из плазмы крови и мочи здоровых и больных онкологическими заболеваниями людей, а также культуральной жидкости клеток линий MCF-7, MDA-MB и MDCK, на предмет присутствия контаминирующих структур. Экзосомы выделяли принятыми в настоящее время методами, включая ультрацентрифугирование, а идентификацию структур в ПЭМ проводили по наличию (везикулы) или отсутствию ограничивающей мембраны (“не-везикулы”). Результаты исследования показали, что “не-везикулы” (20-100 нм) присутствуют во всех препаратах экзосом, выделенных из исследованных биологических жидкостей, что указывает на необходимость ПЭМ контроля препаратов экзосом и оценки “вклада” этих структур в те или иные характеристики экзосом.

МЕТОДИКА

Образцы крови здоровых женщин и больных раком молочной железы были получены из Центральной клинической больницы Сибирского отделения РАН и из Новосибирского областного онкологического диспансера. Образцы мочи здоровых людей и больных раком предстательной железы были получены из НИИ патологии кровообращения им. ак. Е.Н. Мешалкина. Все пациенты дали письменное информированное согласие на использование образцов в данном исследовании, одобренном комитетом по биомедицинской этике ИХБФМ СО РАН.

Эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота (KPC, “Gibco”, США) использовали для выделения экзосом и при культивировании клеток (10%) культур MDCK, MDA-MB и MCF-7 в питательных средах DMEM (культуры MDA-MB и MCF-7) и IMDM (культура MDCK). Клетки культуры MDCK также

культивировали с добавлением сыворотки (10%), обеднённой экзосомами. Культуральную жидкость (КЖ) собирали через 48 ч культивирования клеток.

Все образцы подвергали низкоскоростному центрифугированию для осаждения клеток и клеточного детрита. Для удаления частиц размером более 100 нм использовали шприцевой фильтр с размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, “Sartorius”, Германия). Ультрацентрифугирование образцов проводили при 100000 g в течение 90 мин (Ультрацентрифуга L8-70M, ротор SW-40, “Beckman”, США). Полученные осадки (препараты экзосом) ресуспендировали в 100-150 мкл фосфатного буфера и исследовали в ПЭМ. Образцы мочи дополнительно очищали, насаивая на подушку из 30% сахарозы [10]. С помощью прибора трекового анализа Nanosight NS300 (“Malvern”, Великобритания) определяли концентрацию и размер частиц в препаратах экзосом, выделенных из КЖ и крови. В таблице приведены характеристики препаратов экзосом, изученных в ПЭМ.

Электронная микроскопия

На каплю препарата экзосом на 1 мин помещали медную сетку, покрытую формваровой плёнкой, затем излишки жидкости отбирали фильтровальной бумагой, сетки контрастировали 2%-ным водным раствором фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК). Иммуноцитохимическую идентификацию экзосом крови, мочи или КЖ с помощью моноклональных антител к тетраспанинам CD63 или CD9 проводили, как описано ранее [9].

Сеточки с образцами экзосом изучали в ПЭМ Jem 1400 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Снимки получали с помощью цифровой камеры Veleta (“Olympus Corporation”, Япония). Все измерения проводили на мониторе камеры, используя пакет программ iTEM (“Olympus

Таблица. Характеристика исследованных препаратов экзосом и методы их получения

Источник экзосом		Центрифугирование, g			Фильтр 100 нм	Подушка сахарозы	Иммунно-мечение		Трековый анализ NS-300	Доля примесей (в среднем)
		400	17000	100000 кратность			CD63	CD9		
Плазма	Здоровые	+	+	2/3	+	-	+	+	+	40%
	Рак молочной железы									
Моча	Здоровые	+	+	2	-	+	+	+	не проводили	5%*
	Рак предстательной железы									
Культуральная жидкость	Клетки MCF-7, MDCK, MDA-MB	+	+	2	+	-	+	+	+	20%
Эмбриональная сыворотка KPC	“Gibco”	-	-	1	-	-	не проводили		+	не оценивали
Слёзная жидкость	Здоровые [9] ^a	+	+	2	+	-	+	+	+	20%

Примечание: * - после осаждения на подушку сахарозы; а - данные взяты из нашей предыдущей работы.

Corporation”). Для определения доли частиц различного размера измеряли частицы и подсчитывали их число в 5-8 случайно выбранных полях зрения при увеличении 60000 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Препараты экзосом, выделенные из различных биологических жидкостей, различаются концентрацией везикул, наличием неоформленных белковых примесей,

компактных агрегатов различной морфологии и мелких (до 10 нм) частиц. Все препараты содержали везикулы разного размера; часть везикул (рис. 1А,Ж) имела морфологию, позволявшую идентифицировать их как экзосомы (размеры 40-100 нм, округлая или чашеобразная форма). Связывание везикул с мечеными антителами к специфическим маркерам тетраспанинам CD63 и CD9 (рис. 1Б) подтверждало принадлежность везикул к экзосомам. Следует отметить, что при проведении реакции с тем или иным

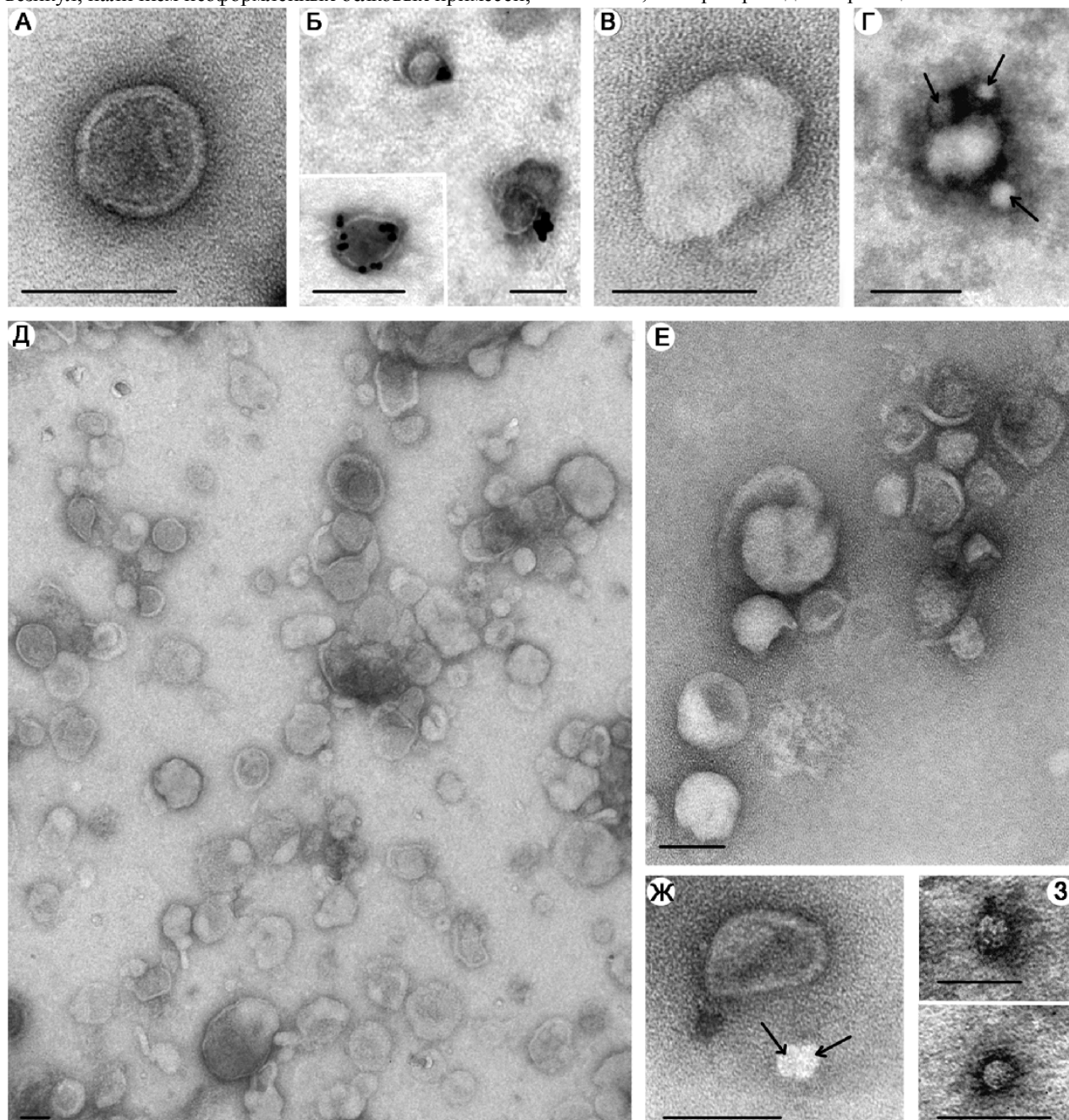


Рисунок 1. Компоненты препаратов экзосом, полученных методом последовательных центрифугирований. А - везикула в препарате экзосом мочи. Б - экзосомы культуральной жидкости клеток MCF-7, меченные антителами к CD63, на врезке - к CD9. В-Г - “не-везикулы” размером 40-100 нм в препаратах экзосом: В - мочи, Г - культуральной жидкости клеток MDCK, стрелками показаны “не-везикулы”, размером 20-40 нм. Д - общий вид образца экзосом, выделенных из мочи. Е - общий вид образца экзосом, выделенных из мочи на подушке сахарозы. Ж - везикула и “не-везикулы”, размером 20-40 нм (показаны стрелками), в препарате экзосом мочи. З - “не-везикулы”, размером 20-40 нм, в препарате экзосом плазмы крови. Длина масштабной линии соответствует: А-Ж - 100 нм, З - 50 нм. Электронная микроскопия, негативное контрастирование ФВК.

антителом не все везикулы оказывались меченными, что может объясняться гетерогенностью экзосом [1]; однако, нельзя исключать и наличия везикул, не являющихся экзосомами. Таким образом, метод последовательных центрифугирований обеспечивает осаждение везикул, которые могут быть отнесены к экзосомам, в соответствии с принятыми критериями [11]. Дополнение процедуры выделения ультрафильтрацией обеспечивает удаление везикул крупнее 100 нм и, соответственно, повышает относительное содержание экзосом в препарате.

Исследователи, выделяющие препараты экзосом, как правило, ограничиваются подтверждением наличия экзосом с помощью ПЭМ, не анализируя состав препарата в целом. Между тем, ПЭМ показывает присутствие в так называемых препаратах экзосом примесей, которые могут искажать получаемые результаты и приводить к ложной их интерпретации. В общей сложности нами было исследовано более 200 препаратов экзосом, выделенных из различных биологических жидкостей, и все они, помимо везикул, содержали мелкие (до 10 нм) частицы, представляющие собой альбумин и другие белки, а также компактные оформленные частицы округлой формы, не имеющие мембраны, – “не-везикулы”. Последние, на наш взгляд, заслуживают особого внимания, поскольку могут составлять значительную долю препаратов.

По морфологии “не-везикулы” всех исследованных жидкостей разделяются на два типа: (I) – чётко структурированные частицы низкой или средней электронной плотности, с отчетливыми границами, размером 20-40 нм, идентифицированные нами ранее как “микрочастицы” [9] (рис. 1Г,Ж-З), и (II) – “не-везикулы” средней электронной плотности, размером 40-100 нм, представляющие собой округлые “рыхлые” структуры, иногда они являются агрегатами “не-везикул” меньшего размера (рис. 1В-Г). В препаратах, не подвергавшихся фильтрации, наблюдались “не-везикулы” размером до 300 нм. Следует отметить, что “не-везикулы” не были связаны с поверхностью экзосом, они располагались отдельно, или формировали скопления.

Кровь наиболее часто используется для выделения экзосом и исследования их молекулярных характеристик. Доля “не-везикул” размером 20-40 нм в препаратах экзосом, выделенных из плазмы здоровых людей и больных раком молочной железы, оцененная с помощью ПЭМ, составляет около 40% после трёхкратного центрифугирования, что сравнимо с содержанием везикул в препаратах. При двукратном центрифугировании содержание “не-везикул” и других белковых примесей в препаратах экзосом плазмы намного выше, чем при трёхкратном.

Доля “не-везикул” в препаратах экзосом мочи здоровых людей и больных раком простаты (рис. 1Д) составляет около 10%, дополнительная очистка с помощью подушки сахарозы привела к её снижению до 5%, однако, не обеспечила получение чистого препарата экзосом (рис. 1Е). Исследованные нами ранее препараты экзосом слёзной жидкости здоровых людей содержат около 20% “не-везикул” [9].

Экзосомы, продуцируемые клетками той или иной культуры, выделяют из КЖ и используют в исследованиях. Для получения препаратов, не содержащих экзосомы КРС, рекомендуется культивировать клетки с сывороткой, предварительно обедненной экзосомами [12]. Однократное ультрацентрифугирование приводит к существенному снижению содержания и везикул, и “не-везикул” в сыворотке КРС: её анализ в ПЭМ не выявил этих структур. Препараты экзосом, выделенных из КЖ, содержали экзосомы, а также “не-везикулы” (20-40 нм), независимо от опухолевой (MDA-MB, MCF-7) или неопухолевой природы клеток (MDCK). Культивирование клеток MDCK с сывороткой КРС, обедненной экзосомами, не привело к исчезновению “не-везикул” из препаратов экзосом.

Серьёзной проблемой исследований экзосом является определение их концентрации в препаратах, для чего используют прибор Nanosight NS300 (“Malvern”), определяющий размеры и концентрацию частиц на основе анализа их траекторий (Nanoparticle Tracking Analysis). Однако, данный метод позволяет получить лишь оценочные параметры, поскольку измеряется не физический, а гидродинамический размер частиц, который может превышать первый в разы, а главное – отсутствует селективность анализа частиц по структуре: прибор фиксирует все частицы и их агрегаты, присутствующие в суспензии. На рисунке 2 приведены данные измерений параметров препаратов экзосом плазмы здорового человека и КЖ, полученной при культивировании клеток MDCK с “нормальной” сывороткой КРС и обеднённой экзосомами. Сопоставление с данными ПЭМ этих же препаратов показывает, что размерные характеристики частиц, полученные с помощью Nanosight NS300, не соответствуют их физическим размерам. В частности, данные графиков показывают присутствие значительного количества частиц крупнее 100 нм, которые при ПЭМ не выявляются, поскольку отсеиваются при фильтрации.

Анализ полученных нами данных однозначно свидетельствует о присутствии в препаратах экзосом существенного количества “не-везикул”, независимо от типа биологической жидкости. По ультраструктурным характеристикам “не-везикулы” размером 20-40 нм наиболее схожи с липопroteинами промежуточной и низкой плотности, а более крупные – с липопroteинами очень низкой плотности [13]. Возможно, ряд частиц размером менее 10 нм, наблюдаемых в препаратах экзосом, представляет собой липопroteины высокой плотности [13]. Контаминация препаратов экзосом, полученных методом последовательных центрифугирований, липопroteинами показана в работе Sodar и соавт. [14]. Авторы установили связь липопroteинов низкой плотности с экзосомами и показали, что они не удаляются из препарата ни одним из известных способов выделения экзосом из биологических жидкостей [14], включая центрифугирование в градиенте плотности, которое применяют для разделения фракций липопroteинов. Во фракции липопroteинов низкой и очень низкой плотности

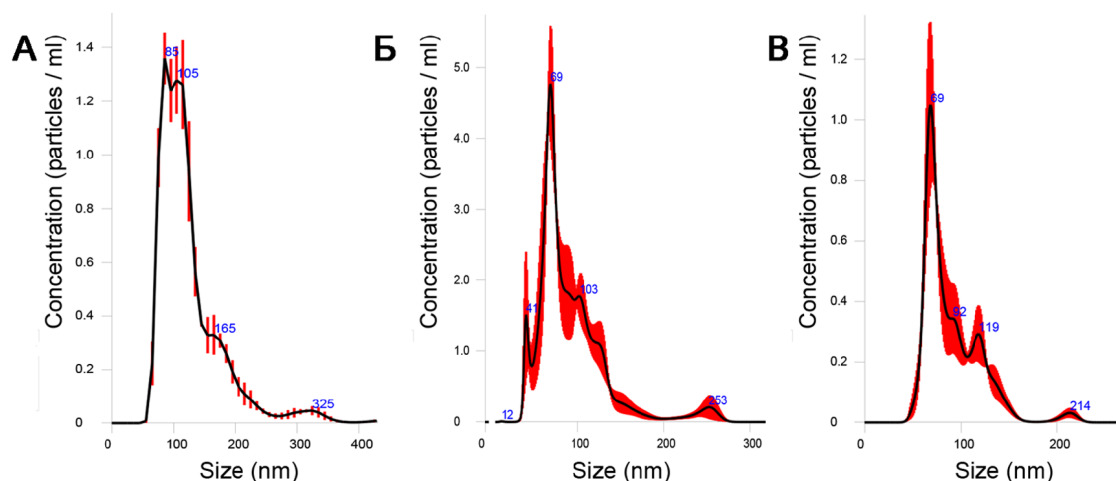


Рисунок 2. Результаты измерений размера и концентрации частиц в образцах экзосом: А - плазмы здорового человека, Б - культуральной жидкости клеток MDCK, культивированных с “нормальной” сывороткой, В - культуральной жидкости клеток MDCK, культивированных с сывороткой, обеднённой экзосомами, полученные на приборе NS-300 (“Malvern”, Великобритания).

обнаружены белки, входящие в состав экзосом: главный комплекс гистосовместимости I класса и белок S100-A8 [14, 15]. Эти данные подтверждают предположение о влиянии присутствия липопротеинов на результаты молекулярно-биологических исследований, в частности, исследований протеома везикул. Контаминация препаратов экзосом липопротеинами может существенно искажать и результаты исследований липидов экзосом, которым придаётся важное значение в поддержании структуры и реализации функций экзосом [14].

Проведённое нами исследование доказывает, что метод последовательных центрифугирований, дополненный ультрафильтрацией, не обеспечивает получение “чистых” препаратов экзосом, а дополнительное применение подушки сахарозы снижает содержание примесей, но не удаляет их полностью. Метод гель-фильтрации, использованный в ряде работ, сохраняет морфологию и биологические свойства экзосом [6, 16]. Оценка содержания примесей в препаратах экзосом, полученных методом гель-фильтрации с помощью ПЭМ не проводилась, однако, существенное снижение количества контаминирующих белков во фракции экзосом [6] указывает на эффективность этого метода. Однако, следует отметить, что гель-фильтрация связана с существенными потерями вещества на колонке, что ставит под вопрос возможность применения этого метода для исследований клинических образцов.

Исследования экзосом позволили поднять на новый уровень понимание многих процессов в организме, включая деятельность иммунной системы [1], однако, задача получения чистых препаратов экзосом остается нерешённой. Невозможность избавиться от сопутствующих “не-везикул” требует от исследователей контроля состава препаратов экзосом, единственным методом которого в настоящее время является ПЭМ. Очевидна также необходимость учитывать присутствие контаминирующих структур при анализе

и интерпретации полученных данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью ПЭМ изучены препараты экзосом, выделенные с помощью последовательных центрифугирований по принятым схемам из плазмы и мочи здоровых и больных онкологическими заболеваниями людей, сыворотки КРС и КЖ клеток MDCK, MDA-MB и MCF-7. Все препараты содержали экзосомы, идентифицированные методом иммуно-электронной микроскопии.

Во всех исследованных препаратах экзосом присутствовали контаминирующие структуры (“не-везикулы”) размером 20-40 нм (10-40%) и размером 40-100 нм, очевидно, представляющие собой липопротеины. Наибольший уровень контаминации отмечен в препаратах экзосом крови.

Результаты проведенного исследования указывают на целесообразность контроля состава препаратов экзосом с помощью ПЭМ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект 16-15-10156 “Биоинспирированные многоуровневые наноконструкции для доставки нуклеиновых кислот в клетки”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yanez-Mo M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borrás F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J. et al. (2015) J. Extracell. Vesicles, **4**, 27066.
2. Torrano V., Royo F., Peinado H., Loizaga-Iriarte A., Unda M., Falcon-Perez J.M., Carracedo A. (2016) Curr. Opin. Pharmacol., **29**, 47-53.
3. Ferguson S.W., Nguyen J. (2016) J. Control Release, **228**, 179-190.

4. Ciardiello C., Cavallini L., Spinelli C., Yang J., Reis-Sobreiro M., de Candia P., Minciocchi V.R., Di Vizio D. (2016) *Int. J. Mol. Sci.*, **17**(2), DOI: 10.3390/ijms17020175E175 ijms17020175
5. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**(19), 9412-9420.
6. Hong C.S., Funk S., Muller L., Boyiadzis M., Whiteside T.L. (2016) *J. Extracell. Vesicles*, **5**, 29289.
7. Nakai W., Yoshida T., Diez D., Miyatake Y., Nishibu T., Imawaka N., Naruse K., Sadamura Y., Hanayama R. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 33935.
8. Oliveira-Rodriguez M., Lopez-Cobo S., Reyburn H.T., Costa-Garcia A., Lopez-Martin S., Yanez-Mo M., Cernuda-Morollon E., Paschen A., Vales-Gomez M., Blanco-Lopez M.C. (2016) *J. Extracell. Vesicles*, **5**, 31803.
9. Григорьева А.Е., Тамкович С.Н., Еремина А.В., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Черных В.В., Власов В.В., Лактионов П.П., Рябчикова Е.И. (2016) *Биомед. химия*, **62**, 99-106. DOI: 10.18097/PBMC20166201099
10. Alvarez M.L., Khosroheidari M., Kanchi Ravi R., DiStefano J.K. (2012) *Kidney Int.*, **82**(9), 1024-1032.
11. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F., Buzas E.I., Di Vizio D., Gardiner C., Gho Y.S., Kurochkin I.V., Mathivanan S., Quesenberry P., Sahoo S., Tahara H., Wauben M.H., Witwer K.W., Thery C. (2014) *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 26913.
12. Shelke G.V., Lasser C., Gho Y.S., Lotvall J. (2014) *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 24783.
13. Yuana Y., Levels J., Grootemaat A., Sturk A., Nieuwland R. (2014) *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 23262.
14. Sodar B.W., Kittel A., Paloczi K., Vukman K.V., Osteikoetxea X., Szabo-Taylor K., Nemeth A., Sperlagh B., Baranyai T., Giricz Z. et al. (2016) *Sci. Rep.*, **6**, 24316.
15. Dashty M., Motazacker M.M., Levels J., de Vries M., Mahmoudi M., Peppelenbosch M.P., Rezaee F. (2014) *Thromb. Haemost.*, **111**(3), 518-530.
16. Monguio-Tortajada M., Roura S., Galvez-Monton C., Pujal J.M., Aran G., Sanjurjo L., Franquesa M., Sarrias M.R., Bayes-Genis A., Borrás F.E. (2017) *Theranostics*, **7**(2), 270-284.

Поступила: 26. 10. 2016.
Принята к печати: 01. 31. 2017.

CONTAMINATION OF EXOSOME PREPARATIONS, ISOLATED FROM BIOLOGICAL FLUIDS

A.E. Grigor'eva, N.S. Dyrkheeva, O.E. Bryzgunova, S.N. Tamkovich, B.P. Chelobanov, E.I. Ryabchikova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS,
8 Lavrentyev av., Novosibirsk, 630090 Russia; e-mail: lenryab@yandex.ru

The aim of our study was to attract the attention of researchers at the problem of contamination of exosome preparations. Using a transmission electron microscope JEM-1400 ("JEOL", Japan) we have examined exosome preparations, isolated according to the conventional scheme of sequential centrifugation from different biological fluids: plasma and urine of healthy persons and patients with oncologic diseases, bovine serum, and culture fluid (MDCK, MDA-MB и MCF-7 cells). All exosome preparations (over 200) contained exosomes, which were identified by immuno-electron microscopy using antibodies to tetraspanins CD63 or CD9. Besides exosomes, all the studied preparations contained contaminating structures: distinct particles of low electron density without limiting membrane ("non-vesicles"). Two main kinds of the "non-vesicles" species were found in exosome preparations: 20-40 nm in size, representing 10-40% of all structures in the preparations; and 40-100 nm in size (identical to exosomes by size). Morphology of the "non-vesicles" allowed to identify them as lipoproteins of intermediate and low density (20-40 nm), and very low density (40-100 nm). The highest level of the contamination was detected in exosome preparations, isolated from blood samples. The results of our study indicate the need to control the composition of exosome preparation by electron microscopy and take into account the presence of contaminating structures in analysis of experimental data.

Key words: exosomes, electron microscopy, lipoproteins