

УДК 57.088.2

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭКЗОСОМ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *Vitis vinifera*

© 2026 г. М.Р. Сорокина, А.В. Фиалко, Ю.А. Югай, О.В. Грищенко, Ю.Н. Шкрыль*,
академик РАН В.П. Булгаков

Поступило 15.05.2026 г.

После доработки 10.06.2026 г.

Принято к публикации 13.06.2026 г.

Растительные внеклеточные везикулы (экзосомы) рассматриваются как перспективные наноструктуры для биомедицинских и биотехнологических применений, однако методы их получения из клеточных культур растений остаются недостаточно оптимизированными. Целью данной работы являлась оценка эффективности выделения экзосом из каллусной и суспензионной культур *Vitis vinifera*, а также изучение влияния возраста культуры и метода экстракции на выход внеклеточных везикул. Показано, что суспензионная культура обеспечивает более высокий выход экзосом по сравнению с каллусной тканью. Частицы характеризовались размером 90–120 нм и отрицательным дзета-потенциалом, соответствующим типичным свойствам растительных внеклеточных везикул. Установлено, что максимальный выход экзосом наблюдался в двухнедельной суспензионной культуре, соответствующей фазе активного роста клеток. Сравнение методов экстракции показало, что механическая гомогенизация в блендере является наиболее эффективным способом выделения экзосом, обеспечивающим высокий выход частиц без существенного ухудшения чистоты препаратов. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования суспензионной культуры *V. vinifera* в качестве масштабируемой платформы для получения растительных экзосом и могут быть использованы при разработке биотехнологических систем выделения внеклеточных везикул растительного происхождения.

Ключевые слова: *Vitis vinifera*, растительные экзосомы, внеклеточные везикулы, суспензионная культура, выделение экзосом

DOI: 10.7868/S3034505726040157

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, включая экзосомы, представляют собой наноразмерные мембранные структуры, секретируемые клетками во внеклеточное пространство. Они участвуют в межклеточной коммуникации и обеспечивают перенос белков, липидов, метаболитов и нуклеиновых кислот между клетками и тканями [1]. В растениях экзосомы рассматриваются как важные участники клеточного взаимодействия, защитных реакций и межвидовой передачи биологически активных молекул [2, 3, 4].

В последние годы особое внимание уделяется внеклеточным везикулам растительного происхождения благодаря их биосовместимости, низкой

токсичности, биоразлагаемости и способности выступать природными системами доставки биологически активных соединений [2, 5]. Показано, что растительные экзосомы могут проявлять противовоспалительные, антиоксидантные и противоопухолевые свойства, а также использоваться в качестве носителей лекарственных веществ [6, 7].

Среди различных растительных источников особый интерес представляет виноград *V. vinifera*, богатый полифенольными соединениями и стильбенами, обладающими выраженной биологической активностью. Для экзосом винограда описаны противовоспалительные, цитопротекторные и потенциально терапевтические эффекты [8, 9]. Кроме того, экзосомы винограда уже рассматриваются как потенциальные средства для снижения побочных эффектов химио- и лучевой терапии, включая профилактику орального мукозита [10]. Несмотря на высокий потенциал растительных экзосом, использование цельных растений и плодов как источника внеклеточных везикул имеет ряд ограничений. К ним относятся сезонность сырья,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты
Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской
академии наук, Владивосток, Российская Федерация

*E-mail: yn80@mail.ru

вариабельность химического состава, зависимость от условий выращивания и сложность стандартизации получаемых препаратов. В связи с этим клеточные и суспензионные культуры растений представляют собой перспективную альтернативу, поскольку позволяют получать биомассу в контролируемых условиях, независимо от сезона и внешних агроклиматических факторов [11, 12]. Недавно было показано, что экзосомы, выделенные из каллусной культуры винограда, содержат производные транс- δ -виниферина и обладают противоопухолевой активностью в отношении клеток тройного негативного рака молочной железы [8].

Вместе с тем вопросы, связанные с выбором оптимального типа клеточной культуры, возрастом культуры и методом экстракции экзосом, остаются недостаточно изученными. Кроме того, для исследований растительных внеклеточных везикул подчеркивается необходимость стандартизации подходов к выделению, очистке и характеристике препаратов [13].

В связи с этим целью настоящей работы являлась оценка возможности использования каллусной и суспензионной культур *V. vinifera* в качестве источников растительных экзосом, а также изучение влияния возраста суспензионной культуры и метода экстракции на выход и качество препаратов внеклеточных везикул. Полученные результаты могут быть использованы для разработки воспроизводимых и масштабируемых биотехнологических подходов к получению растительных экзосом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выращивание каллусной и суспензионной культур *Vitis vinifera*

Исследования проводили с использованием клеточной культуры *V. vinifera*. Каллусные культуры выращивали на агаризованной среде Уайта, дополненной 2,0 мг/л α -нафтилуксусной кислоты и 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, в темноте при температуре 25 °C. Суспензионные культуры поддерживали в жидкой среде аналогичного состава при тех же температурных условиях. Пересев клеточных культур проводили с интервалом в 3 недели.

Выделение экзосом методом ультрацентрифугирования

Для получения кондиционированной культуральной среды суспензионную культуру отделяли от клеточной биомассы фильтрованием через нейлоновый фильтр с последующим центрифугированием при $3000 \times g$ в течение 15 мин при 4 °C для

удаления клеток и крупных клеточных фрагментов. Полученный супернатант центрифугировали при $10\,000 \times g$ в течение 30 мин при 4 °C с целью удаления крупных везикул, органелл и клеточного детрита.

Дополнительно выделение экзосом проводили непосредственно из биомассы суспензионных клеток, предварительно отделенных от питательной среды. При выделении экзосом из каллусной ткани клетки аккуратно снимали с поверхности питательной среды и очищали от остатков агара с использованием пинцета и скальпеля. В обоих случаях клеточную биомассу гомогенизировали в охлажденном фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH 7,4) с помощью блендера, после чего полученный экстракт последовательно осветляли центрифугированием при $5\,000 \times g$, $10\,000 \times g$ и $20\,000 \times g$ в условиях, описанных выше.

Осветленные супернатанты подвергали ультрацентрифугированию при $120\,000 \times g$ в течение 90 мин при 4 °C с использованием ротора TLA-110 (Beckman Coulter, США). После первого этапа ультрацентрифугирования осадок ресуспендировали в ФСБ и повторно ультрацентрифугировали при $120\,000 \times g$ в течение 90 мин для дополнительной очистки везикул от растворимых белков и компонентов культуральной среды.

Полученный осадок экзосом ресуспендировали в стерильном ФСБ и использовали для дальнейшего анализа.

Определение концентрации и размера частиц методом АТН

Концентрацию и распределение экзосом по размерам определяли методом анализа траекторий наночастиц (АТН) с помощью прибора NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Великобритания) в Центре коллективного пользования ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012200181-4). Перед измерением образцы экзосом разводили в ФСБ до концентрации, обеспечивающей оптимальное количество частиц в поле зрения прибора. Измерения проводили при комнатной температуре. Для каждого образца регистрировали не менее десяти видеозаписей движения частиц, после чего полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения прибора. На основании броуновского движения частиц рассчитывали их гидродинамический диаметр, распределение по размерам и концентрацию частиц в пересчете на 1 г исходного образца. Перед каждым измерением камеру прибора промывали для исключения перекрестной контаминации между образцами. Результаты представляли как среднее значение концентрации

частиц и средний размер с учетом стандартной ошибки между повторами.

Сравнительная оценка методов экстракции экзосом

В качестве исходного материала использовали биомассу суспензионной культуры клеток, предварительно отделенную от питательной среды и промытую охлажденным ФСБ. При использовании метода последовательного замораживания—оттаивания клеточную биомассу суспендировали в ФСБ и подвергали трем циклам замораживания при -80°C с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Метод интенсивного встряхивания заключался в инкубации клеточной биомассы в ФСБ при интенсивном перемешивании на орбитальном шейкере в течение 30–60 мин при 4°C . При гомогенизации в блендере клеточную массу смешивали с охлажденным ФСБ и подвергали механическому разрушению с использованием блендера до получения однородного гомогената. Для обработки методом френч-пресса клеточную суспензию в ФСБ подвергали разрушению под давлением с использованием френч-пресса.

Во всех случаях полученные гомогенаты подвергали последовательному осветлению центрифугированием с последующим осаждением экзосом методом ультрацентрифугирования, как описано выше.

Анализ чистоты препаратов методом световой микроскопии

Степень чистоты препаратов оценивали методом световой микроскопии. Для анализа образцы наносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Наблюдение проводили с использованием светового микроскопа SC33 (WideScopiX, Китай) в проходящем свете при увеличении $\times 100$. В ходе анализа оценивали наличие крупных агрегатов, клеточного детрита и посторонних примесей, а также общую однородность препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка продукции экзосом в каллусной и суспензионной культурах *Vitis vinifera*

Для оценки перспективности различных типов культуры *Vitis vinifera* в качестве источника растительных экзосом был проведен сравнительный анализ выхода внеклеточных везикул из каллусной и суспензионной культур клеток. Дополнительно оценивали возможность выделения экзосом непосредственно из кондиционированной

культуральной среды суспензионной культуры без разрушения клеточной биомассы.

Согласно данным АТН, количество экзосом, выделенных из суспензионной культуры, значительно превышало аналогичный показатель для каллусной ткани (табл. 1). Концентрация внеклеточных везикул, выделенных из суспензионной культуры, составляла $0,4725 \times 10^{10}$ частиц/г свежей массы, тогда как для каллусной ткани данный показатель не превышал $0,0435 \times 10^{10}$ частиц/г свежей массы. Таким образом, выход экзосом из суспензионной культуры оказался примерно в 10–12 раз выше по сравнению с каллусной тканью.

Средний размер частиц в препаратах, выделенных из суспензионной культуры, составлял около 100–120 нм, тогда как для каллусной ткани преобладали частицы размером 90–110 нм, что соответствует типичным размерам растительных экзосомоподобных везикул, описанных ранее для различных видов растений [1, 9]. Следует отметить, что более узкое распределение частиц по размерам в препаратах суспензионной культуры может свидетельствовать о большей однородности популяции выделенных везикул. При этом попытки выделения экзосом непосредственно из кондиционированной культуральной среды суспензионной культуры без разрушения клеток оказались малоэффективными. Концентрация частиц в таких препаратах находилась ниже порога детекции метода АТН, что свидетельствует о крайне низком уровне секреции внеклеточных везикул в культуральную среду в используемых условиях культивирования.

Измерение дзета-потенциала показало, что везикулы обоих типов культур обладали отрицательным поверхностным зарядом: около -25 мВ для суспензионной культуры и -23 мВ для каллусной ткани. Полученные значения указывают на умеренную коллоидную стабильность выделенных препаратов и согласуются с литературными данными о поверхностных свойствах растительных внеклеточных везикул [9, 11]. Незначительные различия в значениях дзета-потенциала могут быть связаны с особенностями липидного состава мембран и различием в содержании поверхностно-ассоциированных белков и полисахаридов.

Более высокий выход экзосом из суспензионной культуры, вероятно, связан с повышенной

Таблица 1. Физико-химические характеристики экзосом

	Суспензионная культура	Каллусная культура
Размер, нм	100–120	90–110
Концентрация, $\times 10^{10}$ /г свежей массы	0,4725	0,0435
Дзета-потенциал, мВ	–25	–23

метаболической активностью клеток, интенсивным клеточным делением и воздействием механических факторов, возникающих при перемешивании и аэрации среды. Такие условия могут индуцировать усиленную продукцию и высвобождение внеклеточных везикул как одного из механизмов межклеточной коммуникации и адаптации к стрессу. В то же время низкая эффективность выделения экзосом из каллусной ткани может быть обусловлена плотной структурой клеточных агрегатов, ограниченной диффузией везикул и их удерживанием компонентами клеточной стенки. Ранее было показано, что физиологическое состояние клеток, стадия роста культуры и стрессовые факторы существенно влияют на секрецию и состав экзосом [11, 14].

Полученные результаты указывают на то, что суспензионная культура *V. vinifera* является более перспективным источником экзосом по сравнению с каллусной тканью и может рассматриваться как основа для разработки масштабируемых биотехнологических систем получения растительных внеклеточных везикул.

Влияние возраста суспензионной культуры на выход экзосом

Для оценки влияния фазы роста суспензионной культуры *V. vinifera* на эффективность выделения экзосом был проведен сравнительный анализ выхода внеклеточных везикул из культур различного возраста (рис. 1). Экзосомы выделяли из клеточной биомассы суспензионной культуры через 1, 2 и 3 недели после пересева.

В процессе культивирования наблюдалось постепенное увеличение биомассы клеточной суспензии (рис. 1а). На первой неделе культура характеризовалась минимальным приростом свежей массы, тогда как ко второй и третьей неделе отмечалось ее значительное увеличение. Максимальный прирост биомассы был зарегистрирован для трехнедельной культуры, однако статистически значимых различий между двух- и трехнедельными культурами выявлено не было (рис. 2б). Морфологически по мере увеличения возраста культуры наблюдалось уплотнение клеточных агрегатов и повышение мутности культуральной среды, что

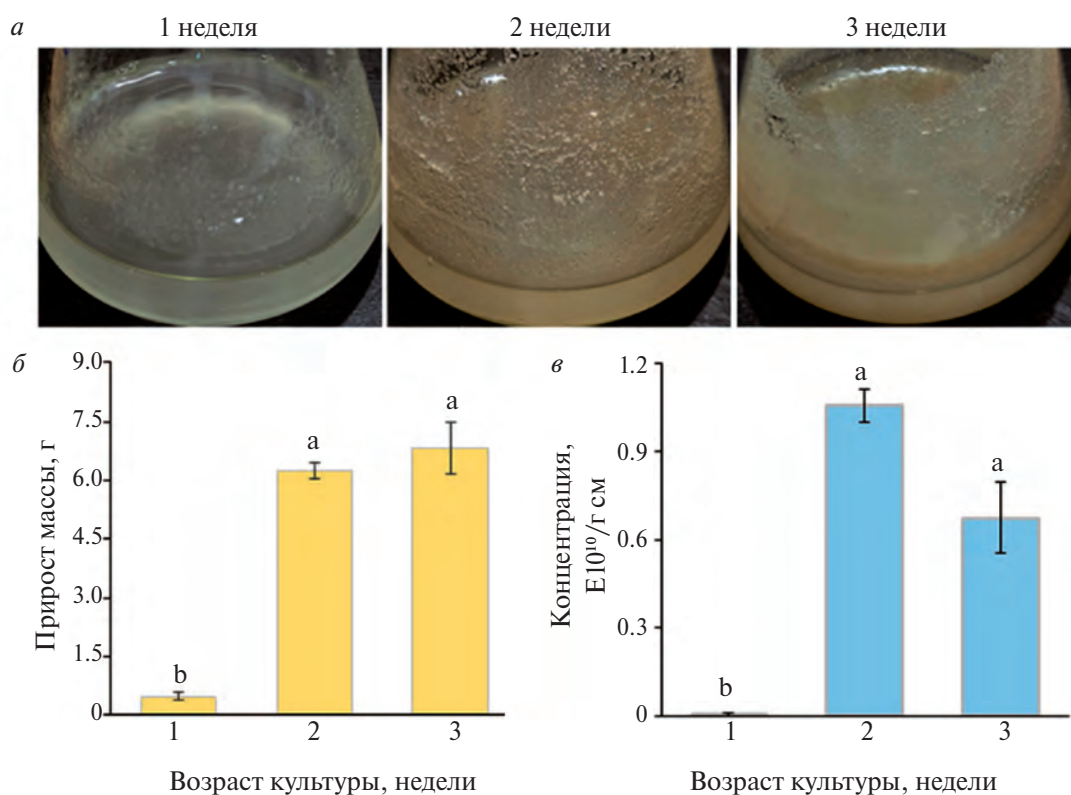


Рис. 1. Влияние возраста суспензионной культуры *V. vinifera* на прирост биомассы и выход экзосом. а – Морфология суспензионной культуры *V. vinifera* на различных стадиях культивирования. б – Прирост свежей массы суспензионной культуры в зависимости от возраста культуры. в – Концентрация экзосом, выделенных из суспензионной культуры различного возраста, в пересчете на 1 г свежей массы. Показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Различные буквы над столбцами обозначают статистически значимые различия между группами при $p < 0,05$.

свидетельствует об активном росте и накоплении клеточной массы.

Согласно данным АТН, максимальный выход экзосом наблюдался для двухнедельной культуры и составлял около $1,0 \times 10^{10}$ частиц на 1 г ткани (рис. 1б). В трехнедельной культуре количество экзосом снижалось примерно на 30–40%, тогда как в недельной культуре содержание частиц находилось на минимальном уровне. Несмотря на дальнейшее увеличение биомассы на третьей неделе культивирования, эффективность выделения внеклеточных везикул в пересчете на единицу свежей массы снижалась, что свидетельствует об отсутствии прямой связи между накоплением биомассы и продукцией экзосом.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной зависимости выхода внеклеточных везикул от возраста клеточной культуры. Поскольку экзосомы во всех вариантах выделяли непосредственно из клеточной биомассы, а не из культуральной среды, наблюдаемое снижение выхода частиц в трехнедельной культуре, вероятно, связано преимущественно с физиологическими изменениями клеток, а не с изменением физико-химических свойств культуральной среды. Ранее было показано, что стрессовые воздействия, изменение уровня питательных веществ и переход клеток к стационарной фазе способны существенно влиять как на количество внеклеточных везикул, так и на их молекулярный состав [15]. Кроме того, известно, что активно пролиферирующие клетки характеризуются более интенсивным мембранным трафиком и повышенной секрецией внеклеточных

везикул, что может объяснять высокий выход экзосом в двухнедельной культуре [16]. Вероятно, именно на данной стадии роста клетки находятся в наиболее метаболически активном состоянии, обеспечивающем максимальную продукцию экзосомоподобных везикул.

Влияние метода экстракции на выход и чистоту препаратов экзосом

Для определения наиболее эффективного способа выделения экзосом из клеточной биомассы *V. vinifera* был проведен сравнительный анализ различных методов экстракции внеклеточных везикул (рис. 2). Были исследованы методы последовательного замораживания—оттаивания, интенсивного встряхивания, гомогенизации в блендере и разрушения клеток с использованием френч-пресса. Эффективность методов оценивали по выходу частиц методом АТН, а также по общей чистоте препаратов с использованием световой микроскопии.

Согласно данным АТН, максимальный выход экзосом наблюдался при использовании гомогенизации в блендере и составлял около $1,0 \times 10^{10}$ частиц на 1 г ткани. Метод интенсивного встряхивания обеспечивал значительно меньший выход везикул, тогда как методы замораживания—оттаивания и френч-пресса оказались наименее эффективными. Различия между вариантами были статистически значимыми, что указывает на выраженное влияние способа разрушения клеток на эффективность высвобождения внеклеточных везикул из растительной ткани. Вероятно, высокая эффективность механической

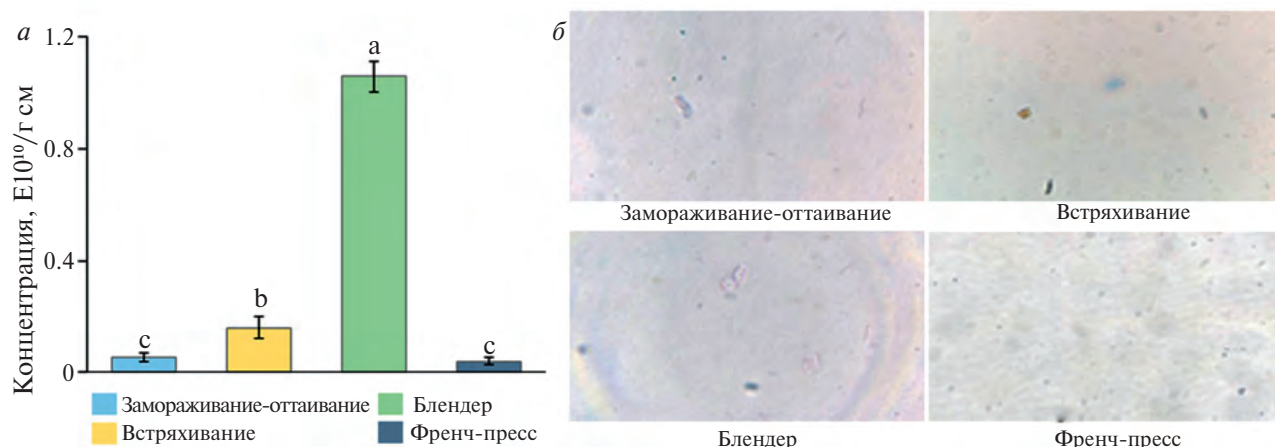


Рис. 2. Влияние метода деструкции клеток суспензионной культуры *V. vinifera* на выход экзосом и чистоту препаратов. *a* — Концентрация экзосом, выделенных после применения различных методов экстракции клеточного содержимого: замораживание—оттаивание, встряхивание, гомогенизация в блендере и обработка с использованием френч-пресса. Концентрация частиц представлена в пересчете на 1 г свежей массы культуры. *б* — Световая микроскопия препаратов, полученных после выделения экзосом различными методами экстракции. Показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение. Различные буквы над столбцами обозначают статистически значимые различия между вариантами при $p < 0,05$.

гомогенизации связана с более полным разрушением клеточных агрегатов и клеточных стенок, что обеспечивает высвобождение везикул, локализованных как в апопластическом пространстве, так и внутри клеток [17]. В то же время методы замораживания—оттаивания и встряхивания обеспечивают лишь частичное нарушение целостности тканей, вследствие чего значительная доля экзосом остается связанной с клеточными структурами. Низкая эффективность френч-пресса может быть обусловлена сочетанием недостаточного разрушения плотных растительных клеточных агрегатов и возможным повреждением части везикул при воздействии высокого давления.

Для сравнительной оценки чистоты получаемых препаратов использовали метод световой микроскопии. Следует отметить, что данный метод не позволяет визуализировать сами экзосомы и использовался исключительно для выявления клеточного дебриса, крупных агрегатов и других примесей. Установлено, что все исследованные методы экстракции обеспечивали получение сравнительно чистых препаратов, содержащих лишь небольшое количество клеточного дебриса и крупных агрегатов. Существенных различий по степени загрязнения между исследованными вариантами выявлено не было. В препаратах, полученных после гомогенизации в блендере, несмотря на наиболее интенсивное разрушение ткани, не наблюдалось заметного увеличения количества крупных фрагментов клеток или выраженной агрегации материала. Таким образом, увеличение выхода экзосом при использовании механической гомогенизации не сопровождалось существенным ухудшением чистоты препарата.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод экстракции оказывает значительное влияние на количество выделяемых внеклеточных везикул, однако в меньшей степени влияет на общую чистоту препаратов после последующей очистки методом дифференциального ультрацентрифугирования. Вероятно, именно этапы многоступенчатой очистки обеспечивают эффективное удаление основной массы клеточного дебриса и крупных примесей независимо от способа предварительного разрушения ткани.

Ранее также отмечалось, что механическая гомогенизация растительного материала позволяет повысить выход экзосом без существенного увеличения содержания примесей при использовании адекватных этапов очистки [18]. Кроме того, для растительных объектов эффективность выделения внеклеточных везикул во многом определяется особенностями клеточной стенки и плотностью тканевой организации, что делает выбор метода деструкции одним из ключевых факторов оптимизации протокола выделения экзосом. В совокупности полученные данные позволяют рассматривать механическую гомогенизацию в блендере как наиболее перспективный подход для получения экзосом

из суспензионной культуры *V. vinifera* с высоким выходом и удовлетворительным уровнем чистоты препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведена сравнительная оценка различных источников и методов выделения растительных внеклеточных везикул из культур клеток *V. vinifera*. Установлено, что суспензионная культура является более эффективным источником экзосом по сравнению с каллусной тканью, обеспечивая более высокий выход частиц при сохранении характерных размеров и отрицательного дзета-потенциала. Концентрация экзосом, выделенных из суспензионной культуры, более чем в 10 раз превышала аналогичный показатель для каллусной ткани. Показано, что возраст культуры существенно влияет на выход внеклеточных везикул. Максимальная концентрация экзосом наблюдалась в двухнедельной суспензионной культуре, соответствующей фазе активного роста клеток. При дальнейшем культивировании количество выделяемых везикул снижалось, несмотря на увеличение биомассы. Сравнение методов экстракции показало, что наиболее эффективным способом выделения экзосом является механическая гомогенизация в блендере, обеспечивающая максимальный выход частиц без существенного ухудшения чистоты препаратов после ультрацентрифугирования.

Полученные результаты подтверждают перспективность использования суспензионной культуры *V. vinifera* в качестве биотехнологической платформы для получения растительных экзосом и могут быть использованы при разработке масштабируемых систем выделения внеклеточных везикул растительного происхождения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-24-00996).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

ВКЛАД АВТОРОВ

ЮЮА, ШЮН — разработка концепции и плана исследования; СМР, ФАВ, ЮЮА, ГОВ — проведение экспериментов; СМР, ЮЮА, ШЮН — анализ данных; ШЮН, БВП — предоставление реагентов и аналитических инструментов; ЮЮА, ШЮН — написание рукописи. Все авторы одобрили ее окончательную версию.

ССЫЛКА ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Сорокина М.Р., Фиалко А.В., Югай Ю.А., Грищенко О.В., Шкрыль Ю.Н., Булгаков В.П. Оптимизация выделения экзосом из клеточных культур *Vitis vinifera*. Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни / Doklady Biological Sciences, 2026, том 529, с. 430.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lian M.Q., Chng W.H., Liang J. et al., Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications // J. Extracell. Vesicles, 2022, vol. 11, no. 12, article e12283.
2. Azizi F., Kazempour-Khabbazi S., Raimondo S. and Dalirfardouei R., Molecular mechanisms and therapeutic application of extracellular vesicles from plants // Mol. Biol. Rep., 2024, vol. 51, no. 1, article 425.
3. Kocholátá M., Malý J., Martinec J. et al., Plant extracellular vesicles and their potential in human health research, the practical approach // Physiol. Res., 2022, vol. 71, no. 3, pp. 327–339.
4. Shkryl Y., Tsydeneshieva Z., Degtyarenko A., et al., Plant exosomal vesicles: Perspective information nanocarriers in biomedicine, // Appl. Sci., 2022, vol. 12, no. 16, article 8262.
5. Alzahrani, F., Khan, M.I., Kameli, N., et al., Plant-derived extracellular vesicles and their exciting potential as the future of next-generation drug delivery, // Biomolecules, 2023, vol. 13, no. 5, article 839.
6. Kim, J., Li, S., Zhang, S., and Wang, J., Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities, // Asian J. Pharm. Sci., 2022, vol. 17, no. 1, pp. 53–69.
7. Zhang, F., Liang, X., Liu, H., et al., Advancements and challenges of plant-derived extracellular vesicles in anti-cancer strategies and drug delivery, // Curr. Drug Deliv., 2025, vol. 22, no. 7, pp. 921–934.
8. Shkryl Y., Tsydeneshieva Z.L., Menchinskaya E., et al., Exosome-like nanoparticles, high in trans- δ -viniferin derivatives, produced from grape cell cultures: Preparation, characterization, and anticancer properties, // Biomedicines, 2024, vol. 12, no. 9, article 2142.
9. Teng Y., He J., Zhong Q. et al. Grape exosome-like nanoparticles: A potential therapeutic strategy for vascular calcification // Front. Pharmacol., 2022, vol. 13, article 1025768.
10. Belfiore E., Di Prima G., Angellotti G. et al. Plant-derived polyphenols to prevent and treat oral mucositis induced by chemo- and radiotherapy in head and neck cancers management // Cancers, 2024, vol. 16, no. 2, article 260.
11. Yugay Y., Tsydeneshieva Z., Rusapetova T. et al. Isolation and characterization of extracellular vesicles from *Arabidopsis thaliana* cell culture and investigation of the specificities of their biogenesis // Plants, 2023, vol. 12, no. 20, article 3604.
12. Verdú-Navarro F., Moreno-Cid J.A., Weiss J. and Egea-Cortines M. The advent of plant cells in bioreactors // Front. Plant Sci., 2023, vol. 14, article 1310405.
13. Pinedo M., de la Canal L. and de Marcos Lousa C. A call for rigor and standardization in plant extracellular vesicle research // J. Extracell. Vesicles, 2021, vol. 10, no. 6, article e12048.
14. Mu J., Zhuang X., Wang Q. et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant-derived exosome-like nanoparticles // Mol. Nutr. Food Res., 2014, vol. 58, no. 7, pp. 1561–1573.
15. Dewi R.S., Sandhiutami N.M.D. and Pratomo I.P. Optimizing plant exosome isolation: A systematic review of PEG-based precipitation, ultracentrifugation and hybrid methodologies for biomedical applications // J. Ilmu Kefarmasian Indones., 2025, vol. 23, no. 2, pp. 237–249.
16. Shen H., Li S., Lin L., et al. Advancements in plant-derived exosome-like vesicles: Versatile bioactive carriers for targeted drug delivery systems // J. Pharm. Anal., 2025, vol. 15, no. 12, article 101300.
17. Tan Z.-L., Li J.-F., Luo H.-M. et al. Plant extracellular vesicles: A novel bioactive nanoparticle for tumor therapy // Front. Pharmacol., 2022, vol. 13, article 1006299.
18. Nueraihemaiti M., Wang C., Abuduwaili A. et al. Plant-derived extracellular vesicles: Biogenesis, isolation, characterization, and biomedical applications // Biology, 2025, vol. 14, no. 4, article 377.

OPTIMIZATION OF EXOSOME ISOLATION FROM *VITIS VINIFERA* CELL CULTURES

**M.R. Sorokina, A.V. Fialko, Y.A. Yugay, O.V. Grishchenko, Y.N. Shkryl*,
Academician of the RAS V.P. Bulgakov**

*Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, Russian Federation*

**E-mail: yn80@mail.ru*

Plant extracellular vesicles (exosomes) are considered promising nanostructures for biomedical and biotechnological applications; however, methods for their isolation from plant cell cultures remain insufficiently optimized. The aim of this study was to evaluate the efficiency of exosome isolation from callus and suspension cultures of *Vitis vinifera* and to investigate the effects of culture age and extraction method on the yield of extracellular vesicles. It was demonstrated that suspension culture provides a higher exosome yield compared to callus tissue. The isolated particles were characterized by a size of 90–120 nm and a negative zeta potential, corresponding to the typical properties of plant extracellular vesicles. The maximum exosome yield was observed in a two-week-old suspension culture corresponding to the phase of active cell growth. Comparison of extraction methods revealed that mechanical homogenization using a blender was the most efficient approach for exosome isolation, providing a high particle yield without significant deterioration in sample purity. The obtained results demonstrate the potential of *V. vinifera* suspension culture as a scalable platform for the production of plant-derived exosomes and may be useful for the development of biotechnological systems for the isolation of plant extracellular vesicles.

Keywords: *Vitis vinifera*, plant exosomes, extracellular vesicles, suspension culture, exosome isolation