

ИЗУЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ, С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ НИЗКОГО НАПРЯЖЕНИЯ

© К. А. Кондратов,^{1,*} Т. А. Петрова,^{1,2} В. Ю. Михайловский,³
А. Н. Иванова,^{4,5} А. А. Костарева,¹ А. В. Федоров¹

¹Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Институт молекулярной биологии и генетики, Санкт-Петербург, 197341,

²Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034,

³Междисциплинарный ресурсный центр по направлению «Нанотехнологии»

С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034,

⁴Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376, и

⁵Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий»

С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: kondratovk.kirill@yandex.ru

Внеклеточные везикулы представляют собой секретируемые клетками околосферические мембранные структуры, обогащенные различными типами биологических молекул. Количество и молекулярный состав этих структур зависят как от физиологического состояния организма, так и от сопутствующих заболеваний. Несмотря на то что внеклеточные везикулы играют важную роль в межклеточной коммуникации, а также являются потенциальными биомаркерами патологических процессов, механизмы их формирования, функции и морфологические характеристики изучены недостаточно. Сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения является перспективным методом для изучения внеклеточных везикул, поскольку не требует нанесения слоя токопроводящего покрытия и поэтому позволяет с высоким разрешением визуализировать детали морфологии объектов в нанометровом диапазоне. В настоящей работе представлены результаты исследования морфологии и размеров объектов из фракций плазмы крови с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, микровезикулы, экзосомы, сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения, трансмиссионная электронная микроскопия, плазма крови, белок CD9.

Принятые сокращения: СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, СЭМНН — СЭМ низкого напряжения, ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия.

В последние годы все больше внимания уделяется изучению спектра биомолекул, выделяемых клетками во внешнюю среду в составе окруженных липидным бислоем структур (Harrison et al., 2014). К таким структурам относят экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела. Размер этих образований колеблется в диапазоне от нескольких десятков до нескольких тысяч нанометров (Gyorgy et al., 2011b; Raposo, Stoorvogel, 2013). Полностью устоявшейся терминологии, используемой для классификации этих объектов, различающихся по своим размерам, механизмам формирования и молекулярному составу, до сих пор не выработано. Поэтому в настоящее время всю совокупность внеклеточных мембранных структур рекомендуют называть термином «внеклеточные везикулы» (extracellular vesicles) (Van der Pol et al., 2016). Интерес к изучению внеклеточных везикул обусловлен тем, что эти частицы выполняют регуляторные функции и могут участвовать в межклеточной сигнализации (Ramachandran,

Palanisamy, 2012; Кореньков и др., 2014). Кроме этого, внеклеточные везикулы являются перспективными мишенями для поиска новых биомаркеров заболеваний, так как их количество в биологических жидкостях и молекулярный состав могут изменяться при развитии патологий (Штам и др., 2012; Gangoda et al., 2015; Kourembanas, 2015).

Для прояснения фундаментальных механизмов формирования внеклеточных везикул, а также определения их роли в нормальном функционировании организма и при развитии патологий необходимо получать очищенные препараты везикул определенного типа. Однако из-за сходства физико-химических характеристик выделяемые препараты не являются абсолютно гомогенными популяциями внеклеточных везикул и содержат большее или меньшее количество везикул других типов и прочих компонентов физиологических жидкостей или культуральных сред. Особенно актуально проблема примесей стоит

при выделениях (и очистке) из плазмы крови, так как эта среда содержит различные везикулы от клеток многих типов, а также сами циркулирующие клетки. Кроме этого, плазма богата биомолекулами, способными формировать комплексы, которые при очистке будут выделяться совместно с внеклеточными везикулами. Так, препараты внеклеточных везикул, получаемые из плазмы с помощью наиболее популярного метода выделения — дифференциального центрифугирования (Lacroix et al., 2012), могут содержать комплексы белков, в частности иммуноглобулинов (Rood et al., 2010; Gyorgy et al., 2011a), липопротеины (Yuana et al., 2015), фрагменты клеточных мембран и органелл, хроматин, а также вирусы и бактерии (Gluschankof et al., 1997; Witwer et al., 2013). Присутствие этих примесей искажает изучаемые характеристики внеклеточных везикул, включая их молекулярный состав и регуляторные свойства (Paolini et al., 2016).

Поэтому для повышения достоверности результатов при анализе препаратов внеклеточных везикул необходимо применение методов, которые способны отличать субпопуляции везикул определенного типа друг от друга и от частиц примесей. Эти методики позволяют проводить оценку качества препаратов, а также изучать ряд характеристик внеклеточных везикул даже при наличии в образце примесей. Такие задачи могут быть решены с помощью электронной микроскопии, позволяющей в нанометровом диапазоне визуализировать индивидуальные объекты и одновременно получать информацию об их размере, морфологии и содержании специфичных молекулярных маркеров. Трансмиссионная (ТЭМ), сканирующая (СЭМ) и криоэлектронная микроскопия успешно применяются для анализа препаратов внеклеточных везикул. Так, для анализа размеров и формы везикул используются ТЭМ (Van der Pol et al., 2010) и криоэлектронная микроскопия (Yuana et al., 2013). СЭМ позволяет получать дополнительную информацию о трехмерной структуре внеклеточных везикул, выделенных из культуральных сред (Sokolova et al., 2011; Zhou et al., 2016) и физиологических жидкостей (Masyuk et al., 2010; Mrvar-Brecko et al., 2010; Sharma et al., 2010; Peramo, Diaz, 2011; Enderle et al., 2015). Кроме того, этот метод дает возможность изучать процессы формирования и слипания везикул, а также связанные с этими процессами изменения в ультраструктуре поверхности клеток (Hughes et al., 2000; Nguyen et al., 2016).

Во всех упомянутых выше работах для сканирования внеклеточных везикул применялась классическая СЭМ, которая требует нанесения на поверхность образцов дополнительного токопроводящего покрытия (как правило, золота) толщиной 2—10 нм, которое обеспечивает стекание заряда с непроводящих биологических объектов (Goldstein et al., 2003). Однако слой металла обладает собственной морфологией поверхности и может значительно исказить изображение исследуемых объектов, особенно когда их размеры становятся сопоставимы с толщиной напыляемого слоя. Современные сканирующие электронные микроскопы приобрели возможность работать при низких ускоряющих напряжениях (менее 1 кВ), т. е. выполнять СЭМ низкого напряжения (СЭМНН), что дает ряд преимуществ для исследования биологических объектов.

Во-первых, нет необходимости нанесения токопроводящего покрытия, так как удается избежать накопления заряда на образце (Cazaux, 2012). Во-вторых, отсутствие токопроводящего слоя металла открывает возможность

производить иммунодетекцию биомолекул с использованием антител, конъюгированных с частицами коллоидного золота (Schroeder-Reiter et al., 2003), тогда как классическая СЭМ требует для этого напыления контрастного с золотом металла — обычно хрома (Goldberg, Fiserova, 2010). В-третьих, использование низких ускоряющих напряжений уменьшает радиационное повреждение чувствительных объектов электронным пучком и поэтому позволяет выполнять менее жесткую химическую фиксацию образца, сохраняя исследуемые биологические объекты в более нативном состоянии. С помощью СЭМНН был визуализирован достаточно широкий круг биологических объектов, включая клетки животных, дрожжей, растений и бактерий (Osumi et al., 1989; Wang et al., 1998; Pawley, Schatten, 2008). Однако авторам настоящей работы неизвестны исследования внеклеточных везикул, которые проводились бы методом СЭМНН без напыления токопроводящего покрытия.

В настоящей работе, подобрав условия пробоподготовки препаратов и режимы сканирования, мы адаптировали методику СЭМНН для визуализации, определения размеров и анализа морфологии объектов нанометрового диапазона из фракций плазмы крови крысы и человека.

Материал и методика

Получение плазмы крови. Плазму получали от здоровых доноров и самцов крыс линии Wistar массой 250—350 г по методике, описанной ранее (Konдратов et al., 2016).

Выделение внеклеточных везикул. После разморозки образцы плазмы человека и крысы (объемом 1 мл) центрифугировали 10 мин при 5000 g для отделения возможных остатков клеточного дебриса. Далее супернатант переносили в новые пробирки и центрифугировали при 16 000 g 10 мин, затем супернатант переносили в ультрацентрифужные пробирки, разводили фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, pH 7.4: 137 mM NaCl и 2.7 mM KCl) до 25 мл и центрифугировали при 100 000 g 2 ч. Полученные осадки дважды промывали PBS путем повторного центрифугирования с ресуспендированием и удалением супернатанта. Промытые осадки ресуспендировали в 30 мкл PBS. Суспензии осадков, а также супернатант, полученный после первого ультрацентрифугирования, замораживали и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования.

Иммуноблоттинг. Пробы плазмы, фракций осадков, а также супернатанта, полученного после первого ультрацентрифугирования, смешивали с буфером Лэммли (Laemmli, 1970), инкубировали при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин и наносили на 12%-ный полиакриламидный гель. После проведения электрофоретического разделения белков и их переноса на нитроцеллюлозную мембрану, последнюю окрашивали антителами против белка CD9 (ab65230, Abcam, Великобритания). Далее мембрану инкубировали с соответствующими вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Cell Signaling, США), и проводили детекцию с помощью набора ECL Plus (GE Healthcare, Великобритания). Сигнал регистрировали с помощью системы документации Gel Doc System XRS (Bio-Rad, США). В качестве стандарта молекулярных масс использовали маркер Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc. США).

СЭМНН. Для визуализации объектов из фракций плазмы крови адаптировали протокол СЭМНН, разработанный для изучения морфологии внутриядерных структур (Kulikova et al., 2016). А именно: предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Scientific, США) протравливали хромовой смесью в течение ночи и затем мыли 2%-ным раствором 7X Cleaning solution (Хеликон, Россия) для удаления всех посторонних частиц. Затем стекла промывали деионизированной водой и высушивали. Некоторые эксперименты проводили на стеклах с напыленным с помощью прибора Gatan PECS 682 (США) слоем углерода толщиной около 4 нм. По 5 мкл суспензий осадков, полученных из 1 мл плазмы с помощью центрифугирования при 16 000 или 100 000 g, наносили на высушенные предметные стекла. Прямо на стекле суспензию осадка смешивали с равным объемом 5%-ного глутаральдегида, приготовленного на PBS, и инкубировали 0.5 ч во влажной камере для фиксации материала на стекле. Затем пробу последовательно обезвоживали в растворах этанола 70, 80 и 95 % и высушивали на воздухе. В качестве отрицательного контроля все вышеописанные процедуры проводили в капле PBS объемом 5 мкл, нанесенной на стекло. Регистрацию изображений проводили при помощи растрового электронного микроскопа с автоэмиссионным катодом Zeiss Merlin (Германия) при ускоряющем напряжении 200—400 В и токе пучка 100 пА. Давление в камере микроскопа составляло около $7 \cdot 10^{-5}$ Па.

ТЭМ. По 10 мкл суспензий осадков, полученных из 1 мл плазмы с помощью центрифугирования при 16 000 или 100 000 g, смешивали с равным объемом 5%-ного глутаральдегида. На полученную каплю сверху накладывали медные сетки 300 mesh (Electron Microscopy Sciences, США) с формваровым покрытием, напыленным углеродом, и инкубировали в течение 5 мин. Затем сетки промывали, перекадывая на поверхность каплю деионизированной воды. После этого препараты контрастировали 1 мин в 1%-ном растворе ацетата урана, избыток контрастера удаляли фильтровальной бумагой. Регистрацию изображений проводили на просвечивающем электронном микроскопе Jeol JEM-1400 (Япония) при ускоряющем напряжении 90 кВ и токе пучка 50 мА с помощью камеры бокового крепления Olympus Veleta (Япония) при увеличении в 100—250 тыс.

Измерение размеров внеклеточных везикул выполняли с помощью инструмента «Stored vector profile» программы Smart SEM Zeiss. Обработку и визуализацию результатов измерений проводили с помощью программного пакета R версии 2.15.2.

Результаты и обсуждение

Биохимическая характеристика препаратов внеклеточных везикул. Из образцов плазмы человека и крысы с помощью дифференциального центрифугирования были получены фракции супернатанта, а также материала, осаждающегося при 16 000 или 100 000 g. С помощью иммуноблотинга в полученных фракциях анализировали присутствие белка CD9, который описан как маркер внеклеточных везикул, осаждающихся после центрифугирования и при ~16 000, и при ~100 000 g (Bobrie et al., 2012; Crescitelli et al., 2013).

Как видно на рис. 1, белок CD9 выявляется во фракциях осадков после центрифугирования при 16 000 и 100 000 g, что подтверждает присутствие в этих фракци-

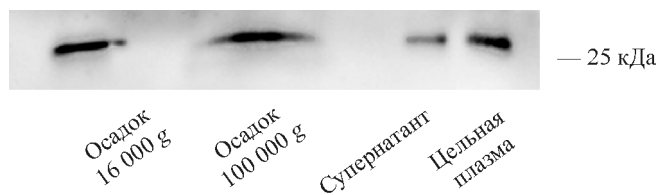


Рис. 1. Иммуноблотинг белковых препаратов фракций плазмы крови с антителами против CD9.

Белок с молекулярной массой, соответствующей массе CD9, выявляется в цельной плазме, фракциях осадков после центрифугирования при 16 000 или 100 000 g, а также в супернатанте. Справа указано положение маркера молекулярной массы.

ях внеклеточных мембранных везикул. Наблюдаемый сигнал в супернатанте согласуется с данными литературы о том, что часть внеклеточного CD9 присутствует во фракции, не осаждаемой центрифугированием при 150 000 g (Vyasa et al., 2014).

Адаптация методики приготовления препаратов для визуализации объектов во фракциях плазмы крови с помощью СЭМНН. Адаптацию производили с использованием фракции осадка из плазмы крови крысы после центрифугирования при 16 000 g. На первом этапе с помощью ТЭМ подтвердили присутствие в этой фракции круглых и овальных объектов диаметром 100—300 нм (не показано). Наиболее оптимальной оказалась процедура пробоподготовки, описанная в разделе «Материал и методика». Этот метод включал в себя промывки предметных стекол и последовательные этапы фиксации препаратов глутаральдегидом и обезвоживании в растворах этанола. При применении этой методики пробоподготовки на микрофотографиях препаратов из фракций плазмы, но не контрольного раствора PBS, наблюдалось наибольшее число объектов. Следует отметить, что на части микрофотографий наблюдали области избыточной засветки, особенно при многократных циклах съемки конкретной области препарата. Подобные артефакты были обусловлены накоплением заряда статического электричества в исследуемой области. Поскольку подложка представляла собой диэлектрический материал (стекло), мы решили, что напыление проводящего слоя углерода толщиной около 5 нм может обеспечить стекание заряда, что приведет к уменьшению этих нежелательных искажений изображения.

Сравнение изображений, полученных без и с напылением углеродной пленки, показало, что слой углерода значительно снижает заряд статического электричества на наблюдаемом объекте (данные не приведены). Однако слой углерода имеет собственную зернистую структуру, размеры отдельных элементов которой сравнимы с размерами экзосом. Таким образом, можно заключить, что мелкие объекты типа экзосом лучше наблюдать на подложке из чистого стекла без напыления. Также следует отметить более темный фон изображений препаратов с напылением углерода. Это обусловлено более низким коэффициентом вторичной электронной эмиссии из углерода и более высокой работой выхода по сравнению со стеклом. Кроме перечисленных эффектов, напыление тонкой пленки углерода не оказало существенного положительного влияния на качество изображений. Поэтому далее в настоящей работе для СЭМНН использовали стекла без напыления.

Визуализация объектов во фракциях плазмы крови с помощью СЭМНН. Микрофото-

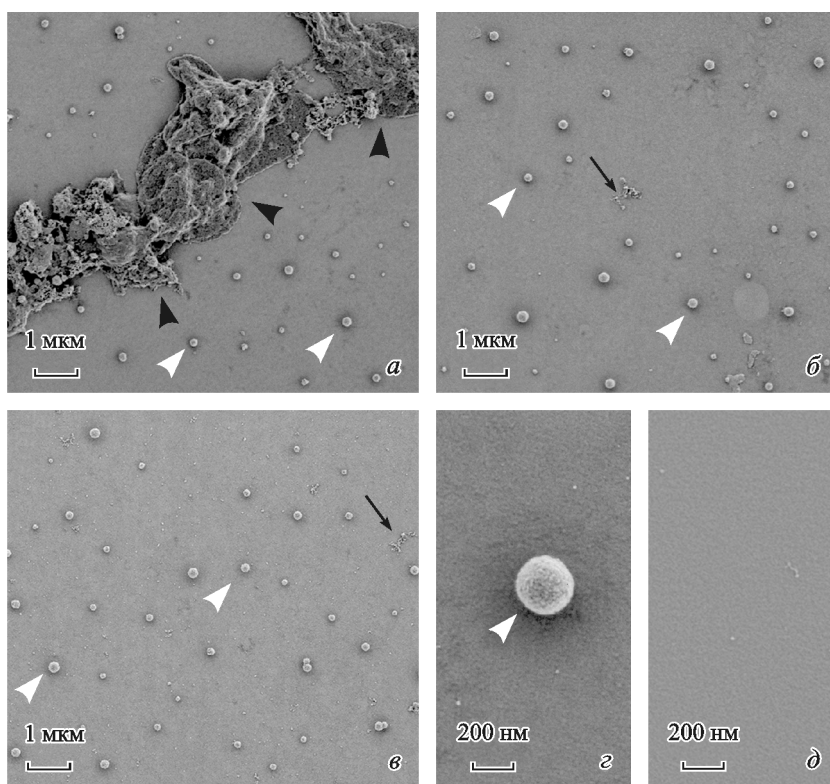


Рис. 2. Визуализация с помощью СЭМН объектов из фракции осадка после центрифугирования плазмы крови крысы при 16 000 g.

a—c — микрофотографии образцов, полученных из плазмы крови крысы; *d* — изображение поверхности стекла при использовании в качестве контроля раствора фосфатно-солевого буферного раствора. Околосферические объекты диаметром более 40 нм показаны белыми головками стрелок, агрегаты мелких частиц — черными стрелками, фрагменты клеток — черными головками стрелок.

графии на рис. 2 демонстрируют примеры объектов, выявляемых с помощью СЭМН в фракции осадка после центрифугирования плазмы крови крысы при 16 000 g. Наиболее часто на этих препаратах встречались околосферические частицы диаметром от 40 до 500 нм (рис. 2, *a—c*, белые головки стрелок). Также на препаратах присутствовали агрегаты более мелких частиц (рис. 2, *b*, *v*, черные стрелки). Редко на препаратах встречались одиночные фрагменты клеток (рис. 2, *a*, черные головки стрелок).

На следующем этапе работы СЭМН использовали для визуализации объектов во фракциях осадка после центрифугирования плазмы крови человека при 16 000 и 100 000 g. Микрофотографии на рис. 3 демонстрируют примеры объектов, выявляемых с помощью СЭМН во фракции осадка после центрифугирования плазмы крови человека при 16 000 g. На препаратах выявлены сферические (рис. 3, *b*), околосферические (рис. 3, *v*) и эллипсоидные (рис. 3, *a*) частицы диаметром от 40 до 500 нм. Чаще встречались одиночные частицы (рис. 3, *a—в*), однако были обнаружены и агрегаты из 2—5 частиц (рис. 3, *z*, *d*). Следует отметить, что на препаратах фракции осадка после центрифугирования при 16 000 g встречались также и частицы размером менее 40 нм (рис. 3, *a*, *v*, стрелки).

Микрофотографии на рис. 4 демонстрируют примеры объектов, выявляемых с помощью СЭМН во фракции осадка после центрифугирования плазмы крови человека при 100 000 g. Наиболее часто на этих препаратах встречались околосферические частицы диаметром менее 40 нм (рис. 4, *a—в*, стрелки). Наряду с одиночными час-

тицами на препаратах присутствовали и агрегаты таких частиц (рис. 4, *b*, головки стрелок).

Анализ результатов визуализации компонентов фракций плазмы позволяет заключить, что применяемый метод пробоподготовки позволяет иммобилизовать на стеклах достаточное количество объектов, при этом разрешение метода СЭМН позволяет получать данные о размере и форме объектов, а также о морфологии поверхности частиц. На основе этих характеристик среди компонентов плазмы можно различить несколько типов структур, а именно: фрагменты клеток, индивидуальные околосферические и эллипсоидные частицы диаметром от 10 до 500 нм, а также агрегаты таких частиц. Однако при интерпретации результатов визуализации внеклеточных везикул следует учитывать, что процедура пробоподготовки может оказывать существенное влияние на морфологию и размеры наблюдаемых объектов (Chernyshev et al., 2015). Кроме этого, результаты анализа присутствия конкретного типа внеклеточных везикул в образцах могут искажаться вследствие того, что популяции везикул, различающиеся по размерам и характеристикам своих оболочек, могут селективно удерживаться или, наоборот, смываться с поверхности стекла.

Применение СЭМН для определения размеров частиц из фракций плазмы крови. СЭМН не требует нанесения на исследуемый образец слоя токопроводящего покрытия и при этом обладает достаточным разрешением для визуализации частиц в нанометровом диапазоне. Поэтому полученные этим методом изображения могут быть использованы для определения размеров популяций внеклеточных везикул. В настоящей

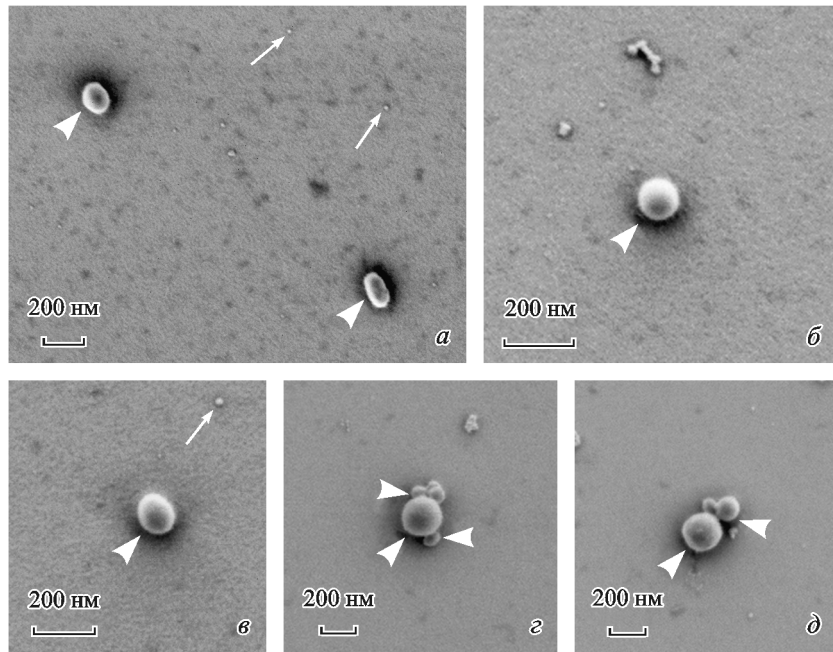


Рис. 3. Визуализация с помощью СЭМНН объектов из фракции осадка после центрифугирования плазмы крови человека при 16 000 g.

a—в — примеры одиночных частиц размером более 40 нм; *г, д* — видны агрегаты таких частиц. Сферические и эллипсоидные объекты диаметром более 40 нм показаны *головками стрелок*, сферические объекты диаметром менее 40 нм — *стрелками*.

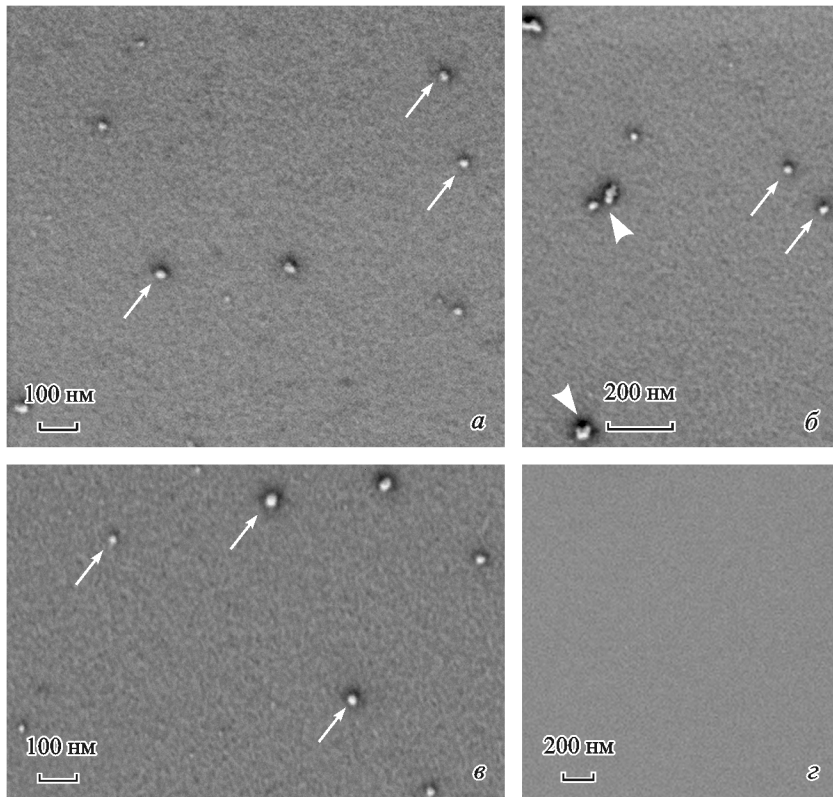


Рис. 4. Визуализация с помощью СЭМНН объектов из фракции осадка после центрифугирования плазмы крови человека при 100 000 g.

a—в — микрофотографии образцов; *г* — изображение поверхности стекла при использовании в качестве контроля раствора фосфатно-солевого буферного раствора. Одиночные сферические частицы диаметром менее 40 нм показаны *стрелками*, агрегаты таких частиц — *головками стрелок*.

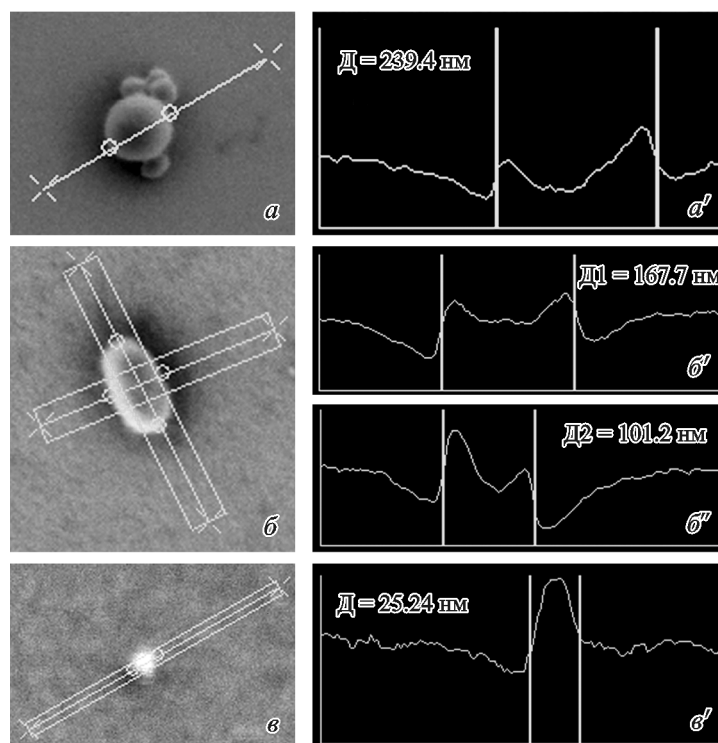


Рис. 5. Пояснение к методике измерения размеров частиц на микрофотографиях, полученных методом СЭМНН. *a, в* — примеры околосферических частиц; *б* — пример эллипсоидной частицы; *а', б', в'* — денситометрические профили исследуемых структур, полученные с помощью программы Smart SEM Zeiss, и измеренные диаметры (*D*) частиц.

работе измерение диаметра частиц проводили с помощью программы Smart SEM Zeiss, входящей в пакет программного обеспечения микроскопа, используя инструмент «Stored vector profile». Методика измерения размеров частиц проиллюстрирована на рис. 5. Границы частиц определяли через построение профиля интенсивности сигнала вторичных электронов вдоль линии, проведенной через центр структуры (рис. 5, *а'*). Измерения диаметра проводили как на одиночных частицах, так и на частицах (рис. 5, *б, в*), находящихся на поверхности кластера

(рис. 5, *а*). Для эллипсоидных частиц (рис. 5, *б*) измеряли их сопряженные диаметры (рис. 5, *б', б''*), а затем рассчитывали средний диаметр.

Описанную выше методику применили для определения распределения по размерам околосферических и эллипсоидных частиц из фракций осадков плазмы крови человека после центрифугирования при 16 000 и 100 000 *g*.

Как видно на рис. 6, размеры частиц диаметром более 40 нм из фракции 16 000 *g* находятся в диапазоне от 40 до

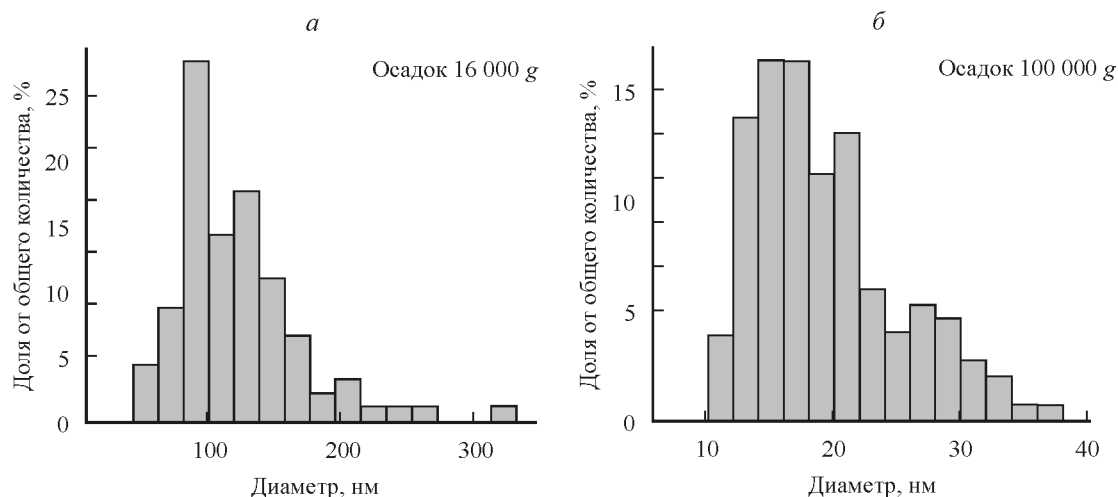


Рис. 6. Распределение по размерам околосферических и эллипсоидных частиц из фракций осадков после центрифугирования плазмы крови человека при 16 000 (*a*) и 100 000 (*б*) *g*. Измерения проведены на микрофотографиях, полученных с помощью СЭМНН.

a — частицы диаметром более 40 нм; *б* — частицы диаметром менее 40 нм. Диапазон размеров каждой из частиц разбит на 11 участков.

350 нм, причем более 50 % частиц имеет размеры от 80 до 140 нм (рис. 6, а). Размеры частиц диаметром менее 40 нм из фракции 100 000 g находятся в диапазоне от 10 до 38 нм, причем более 60 % частиц имеет размеры от 12 до 22 нм (рис. 6, б).

Сопоставляя результаты визуализации компонентов фракций плазмы с данными литературы, можно предположить, что наблюдаемую популяцию околосферических и эллипсоидных частиц диаметром 40—350 нм, выявляемых во фракции осадка после центрифугирования плазмы крови при 16 000 g, составляют мембранные структуры, называемые микровезикулами (Guorgy et al., 2011a). Недавно было показано, что высокоскоростное центрифугирование может вызывать агрегацию внеклеточных везикул (Linages et al., 2015). Поэтому, вероятно, именно агрегация частиц диаметром менее 40 нм друг с другом или с более крупными частицами может быть причиной присутствия этих более мелких частиц во фракции осадка после центрифугирования при 16 000 g. Наши данные показывают, что фракция плазмы, получаемая после центрифугирования при 16 000 g, может содержать как агрегаты частиц, так и фрагменты клеток. Этот факт подчеркивает актуальность применения методов микроскопии, в частности СЭМНН, для проверки качества препаратов внеклеточных везикул перед их анализом с помощью методов биохимии и проточной цитометрии.

Наблюдаемые нами околосферические и эллипсоидные частицы во фракции осадка после центрифугирования плазмы крови при 100 000 g имели диаметр от 10 до 38 нм. Подобные условия центрифугирования обычно используют для получения мембранных структур, называемых экзосомами, размеры которых лежат в диапазоне 30—100 нм (Guorgy et al., 2011b). Расхождение наших результатов с данными литературы может быть связано с тем, что наблюдаемый размер мембранных везикул зависит от параметров пробоподготовки. В частности, было показано, что различные режимы высушивания препаратов могут приводить к изменению наблюдаемого размера экзосом от 40—90 до 10—40 нм (Chernyshev et al., 2015). Кроме этого, нельзя исключать, что часть околосферических частиц диаметром менее 30 нм являются не мембранными везикулами, а, например, липопротеинами или комплексами белков (Rood et al., 2010; Yuana et al., 2015). Последнее предположение может быть также проверено с помощью СЭМНН, посредством визуализации объектов после их предварительного иммуноокрашивания антителами к маркерным белкам различных типов структур нанометрового диапазона.

Заключение. Адаптированная методика приготовления препаратов позволяет использовать метод СЭМНН для изучения внеклеточных везикул из фракций плазмы крови. С помощью этого метода можно получать высококачественные изображения биологических объектов, пригодные как для изучения формы и размера структур нанометрового диапазона, так и для выявления в образцах примесей неvesicularных объектов. Отсутствие слоя токопроводящего покрытия позволяет визуализировать детали морфологии поверхности, а также делает возможным иммунодетекцию специфичных антигенов.

Работа выполнена с использованием оборудования междисциплинарного ресурсного центра по направлению «Нанотехнологии» и ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» С.-Петербургского государственного университета и при финансовой

поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-34-60170 мол_а_дк).

Список литературы

- Кореньков Д. А., Овчинникова О. М., Сельков С. А., Соколов Д. И. 2014. Роль микрочастиц в межклеточной коммуникации. Цитология. 56 (7) : 480—488. (Koren'kov D. A., Ovchinnikova O. M., Sel'kov S. A., Sokolov D. I. 2014. Role of microparticles in intercellular communication. Tsitologiya. 56 (7) : 480—488.)
- Штам Т. А., Нарыжный С. Н., Ланда С. Б., Бурдаков В. С., Артамонова Т. О., Филатов М. В. 2012. Получение и анализ экзосом, секретируемых злокачественно трансформированными клетками человека в системах *in vitro*. Цитология. 54 (5) : 430—438. (Shtam T. A., Naryzhny S. N., Landa S. B., Burdakov V. S., Artamonova T. O., Filatov M. V. 2012. Isolation and proteomic analysis of exosomes secreted by human cancer cells *in vitro*. Tsitologiya. 54 (5) : 430—438.)
- Bobrie A., Colombo M., Krumeich S., Raposo G., Thery C. 2012. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. J. Extracell. Vesicles. 16. Doi: 10.3402/jev.v1i0.18397.
- Cazaux J. 2012. From the physics of secondary electron emission to image contrasts in scanning electron microscopy. J. Electron Microsc. 61 : 261—284.
- Chernyshev V. S., Rachamadugu R., Tseng Y. H., Belnap D. M., Jia Y., Branch K. J., Butterfield A. E., Pease L. F., Bernard P. S., Skliar M. 2015. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. Anal. Bioanal. Chem. 407 : 3285—3301.
- Crescitelli R., Lasser C., Szabo T. G., Kittel A., Eldh M., Dianzani I., Buzas E. I., Lotvall J. 2013. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. J. Extracell. Vesicles. 12. Doi: 10.3402/jev.v2i0.20677.
- Endlerle D., Spiel A., Coticchia C. M., Berghoff E., Mueller R., Schlumpberger M., Sprenger-Haussels M., Shaffer J. M., Lader E., Skog J., Noerholm M. 2015. Characterization of RNA from exosomes and other extracellular vesicles isolated by a novel spin column-based method. PLoS ONE. 10 : e0136133.
- Gangoda L., Boukouris S., Liem M., Kalra H., Mathivanan S. 2015. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? Proteomics. 5 : 260—271.
- Gluschkof P., Mondor I., Gelderblom H. R., Sattentau Q. J. 1997. Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations. Virology. 230 : 125—133.
- Goldberg M. W., Fiserova J. 2010. Immunogold labelling for scanning electron microscopy. Methods Mol. Biol. 657 : 297—313.
- Goldstein J., Newbury D. E., Joy D. C., Lyman C. E., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J. R. 2003. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York: Springer. 233 p.
- Guorgy B., Modos K., Pallinger E., Palocz K., Pasztoi M., Misjak P., Deli M. A., Sipos A., Szalai A., Voszka I., Polgar A., Toth K., Csete M., Nagy G., Gay S., Falus A., Kittel A., Buzas E. I. 2011a. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes due to shared biophysical parameters. Blood. 117 : e39—e48.
- Guorgy B., Szabo T. G., Pasztoi M., Pal Z., Misjak P., Aradi B., Laszlo V., Pallinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzas E. I. 2011b. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell. Mol. Life Sci. 68 : 2667—2688.
- Harrison P., Gardiner C., Sargent I. L. (eds). 2014. Extracellular vesicles in health and disease. New York: Pan Stanford Publ. 474 p.

- Hughes M., Hayward C. P., Warkentin T. E., Horsewood P., Chorneyko K. A., Kelton J. G. 2000. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 96 : 188—194.
- Kondratov K., Kurapeev D., Popov M., Sidorova M., Minasian S., Galagudza M., Kostareva A., Fedorov A. 2016. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol. Detect. Quantif.* 8 : 9—14.
- Kourembanas S. 2015. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu. Rev. Physiol.* 77 : 13—27.
- Kulikova T., Khodyuchenko T., Petrov Y., Krasikova A. 2016. Low-voltage scanning electron microscopy study of lampbrush chromosomes and nuclear bodies in avian and amphibian oocytes. *Sci. Rep.* 6 : 36878. (DOI: 10.1038/srep36878).
- Macroix R., Judicone C., Poncelet P., Robert S., Arnaud L., Sampol J., Dignat-George F. 2012. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J. Thromb. Haemost.* 10 : 437—446.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680—685.
- Linares R., Tan S., Gounou C., Arraud N., Brisson A. R. 2015. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 4 : 29509.
- Masyuk A. I., Huang B. Q., Ward C. J., Gradilone S. A., Banales J. M., Masyuk T. V., Radtke B., Splinter P. L., LaRusso N. F. 2010. Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 : G990—G999.
- Mrvar-Brecko A., Sustar V., Jansa V., Stukelj R., Jansa R., Mujagic E., Krulje P., Igljic A., Hagerstrand H., Kralj-Igljic V. 2010. Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells Mol. Dis.* 44 : 307—312.
- Nguyen D. B., Ly T. B., Wesseling M. C., Hittinger M., Torge A., Devitt A., Perrie Y., Bernhardt I. 2016. Characterization of microvesicles released from human red blood cells. *Cell Physiol. Biochem.* 38 : 1085—1099.
- Osumi M., Yamada N., Kobori H., Taki A., Naito N., Baba M., Nagatani T. 1989. Cell wall formation in regenerating protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*: study by high resolution, low voltage scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc.* (Tokyo). 38 : 457—468.
- Paolini L., Zandrini A., Di Noto G., Busatto S., Lottini E., Radeghieri A., Dossi A., Caneschi A., Ricotta D., Bergese P. 2016. Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity. *Sci. Rep.* 6 : 23550.
- Pawley J., Schatten H. (Eds.). 2008. Biological low-voltage scanning electron microscopy. New York: Springer-Verlag. 317 p.
- Peramo A., Diaz J. A. 2011. Physical characterization of mouse deep vein thrombosis derived microparticles by differential filtration with nanopore filters. *Membranes (Basel)*. 2 : 1—15.
- Ramachandran S., Palanisamy V. 2012. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 3 : 286—293.
- Raposo G., Stoorvogel W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200 : 373—383.
- Rood I. M., Deegens J. K., Merchant M. L., Tamboer W. P., Wilkey D. W., Wetzels J. F., Klein J. B. 2010. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 78 : 810—816.
- Schroeder-Reiter E., Houben A., Wanner G. 2003. Immunogold labeling of chromosomes for scanning electron microscopy: a closer look at phosphorylated histone H3 in mitotic metaphase chromosomes of *Hordeum vulgare*. *Chromosome Res.* 11 : 585—596.
- Sharma S., Rasool H. I., Palanisamy V., Mathisen C., Schmidt M., Wong D. T., Gimzewski J. K. 2010. Structural-mechanical characterization of nanoparticle exosomes in human saliva, using correlative AFM, FESEM, and force spectroscopy. *ACS Nano*. 4 : 1921—1926.
- Sokolova V., Ludwig A. K., Hornung S., Rotan O., Horn P. A., Epple M., Giebel B. 2011. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 87 : 146—150.
- Van der Pol E., Boing A. N., Gool E. L., Nieuwland R. 2016. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* 14 : 48—56.
- Van der Pol E., Hoekstra A. G., Sturk A., Otto C., van Leeuwen T. G., Nieuwland R. 2010. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* 8 : 2596—2607.
- Vyas N., Walvekar A., Tate D., Lakshmanan V., Bansal D., Lo Cicero A., Raposo G., Palakodeti D., Dhawan J. 2014. Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties. *Sci. Rep.* 4 : 7357.
- Wang J., Yang C., Hans R., Zhai Z. 1998. Fine structure and assembly *in vitro* of nuclear lamina in plant cells. *Sci. China C. Life Sci.* 41 : 71—79.
- Witwer K. W., Buzas E. I., Bemis L. T., Bora A., Lasser C., Lotvall J., Nolte-'t Hoen E. N., Piper M. G., Sivaraman S., Skog J., Thery C., Wauben M. H., Hochberg F. 2013. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J. Extracell. Vesicles*. 27 : 2.
- Yuana Y., Boing A. N., Grootemaat A. E., van der Pol E., Hau C. M., Czimmer P., Buhr E., Sturk A., Nieuwland R. 2015. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 4 : 29260.
- Yuana Y., Koning R. I., Kuil M. E., Rensen P. C., Koster A. J., Bertina R. M., Osanto S. 2013. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma. *J. Extracell. Vesicles*. 2 : doi: 10.3402/jev.v2i0.21494.
- Zhou J., Ghoroghi S., Benito-Martin A., Wu H., Unachukwu U. J., Einbond L. S., Guariglia S., Peinado H., Redenti S. 2016. Characterization of induced pluripotent stem cell microvesicle genesis, morphology and pluripotent content. *Sci. Rep.* 6 : 19743.

EXTRACELLULAR VESICLES FROM BLOOD PLASMA STUDIED BY LOW
VOLTAGE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

K. A. Kondratov^{1,*} *T. A. Petrova*^{1,2} *V. Yu. Mikhailovskii*³ *A. N. Ivanova*^{4,5}
*A. A. Kostareva*¹ *A. V. Fedorov*¹

¹ Federal V. A. Almazov North-West Medical Research Centre, Institute of Molecular Biology and Genetics,
St. Petersburg, 197341,

² St. Petersburg State University, Department of Cytology and Histology, St. Petersburg, 199034,

³ St. Petersburg State University, Interdisciplinary Resource Center for Nanotechnology, St. Petersburg, 199034,

⁴ V. L. Komarov Botanical Institute RAS, St. Petersburg, 197376, and

⁵ St. Petersburg State University, Research Resource Center for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg, 199034;

* e-mail: kondratovk.kirill@yandex.ru

Extracellular vesicles are subspherical membranous structures secreted by cells and enriched with different types of biological molecules. The number and the molecular content of these structures depend on pathological conditions and the physiological state of the organism. Extracellular vesicles play an important role in intercellular communication and represent potential disease biomarkers. However, mechanisms of formation, functions and morphological characteristics of extracellular vesicles are still studied insufficiently. Low voltage scanning electron microscopy is a promising method to investigate extracellular vesicles, since it does not require conductive coating and therefore enables a high-resolution visualization of morphological details of nanosized objects. This paper presents the results of low voltage scanning electron microscopy study of morphology and size of objects from blood plasma fractions.

Key words: extracellular vesicles, microvesicles, exosomes, low-voltage scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, blood plasma, CD9.