

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

К. А. Кондратов, А. С. Головкин, А. В. Федоров*

Институт молекулярной биологии и генетики Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341;

** электронный адрес: kondratovk.kirill@yandex.ru*

Внеклеточные везикулы — это объекты нанометровых размеров, которые являются эндогенными носителями биомолекул в межклеточном пространстве. Исследования последних лет значительно расширяют наши знания о многообразии функций внеклеточных везикул и указывают на их важность в реализации ряда физиологических и патологических процессов. По современным представлениям, общую совокупность внеклеточных везикул составляют многие субпопуляции частиц, существенно различающихся по размерам, механизмам образования и внутреннему содержанию. Несмотря на это, свойства и молекулярный состав отдельных субпопуляций внеклеточных везикул изучены крайне слабо. Настоящий обзор посвящен описанию современных методов изучения внеклеточных везикул. Особое внимание уделено методу флуоресцентного анализа траекторий наночастиц, поскольку он позволяет производить одновременное измерение концентрации и размера везикул, несущих определенные молекулярные маркеры в суспензии. Рассмотрены принцип работы этого метода, его возможности и ограничения в сравнении с другими методиками анализа характеристик внеклеточных везикул. Приведены примеры применения флуоресцентного анализа траектории наночастиц для визуализации внеклеточных везикул посредством детекции в их составе билипидных мембран, специфических белковых маркеров и микроРНК.

Ключевые слова: флуоресцентный анализ траектории наночастиц, внеклеточные везикулы, экзосомы, биомаркеры, квантовые точки, микроРНК

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ВВ — внеклеточные везикулы, ГИМ — гелий-ионная микроскопия, ДРС — динамическое рассеяние света, КТ — квантовые точки, КТЭМ криотрансмиссионная электронная микроскопия, ПЦ — проточная цитометрия, САТН — светорассеивающий анализ траектории наночастиц, СИС — считывание импульсов сопротивления, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия, ФАТН — флуоресцентный анализ траектории наночастиц.

Свойства внеклеточных везикул

Внеклеточные везикулы (ВВ) — это окруженные липидным бислоем частицы диаметром менее 2000 нм. Этот класс объединяет объекты, описываемые в литературе как экзосомы, эктосомы, микровезикулы, микрочастицы и апоптотические тела. ВВ попадают во внеклеточное пространство либо путем отпочковывания внешних частей плазматической мембраны клетки, либо происходят из внутриклеточных образований мультивезикулярных тел, либо формируются из плазматической мембраны при гибели клеток (Mateescu et al., 2017). ВВ обнаружены во всех физиологических средах организма — плазме крови (Ibsen et al., 2017), цереброспинальной жидкости (Akers et al., 2016), грудном молоке (Zempleni et al., 2017), слюне (Gallo et al., 2012; Kumeda et al., 2017), сперме (Welch et al., 2017), желудочном соке (Yamamoto et al., 2016), моче (Oosthuyzen et al., 2013), перикардальном

выпоте (Beltrami et al., 2017), желчи (Severino et al., 2017) и слезной жидкости (Григорьева и др., 2016). В настоящее время повышенный интерес к этим структурам определяется тем, что ВВ играют значительную роль в патогенезе различных заболеваний человека (Harrison et al., 2014; Rezaie et al., 2017).

Результаты изучения биогенеза и состава ВВ все убедительнее свидетельствуют о том, что клетки выделяют гетерогенные популяции везикул, которые различаются по механизму образования, размеру и молекулярному составу (Willms et al., 2016; Tkach et al., 2018). Так, с помощью протеомных, транскриптомных и липидомных методов исследования было показано, что субпопуляции ВВ содержат разные наборы кодирующих и некодирующих РНК, включая микроРНК (Palma et al., 2012; Chen, 2016), белков (Kowal et al., 2016), а также различаются по липидному составу (Pienimaeki-Roemer et al., 2015).

Известна регуляторная роль ВВ. Они способны передавать свое содержимое клеткам и таким образом регулировать их функции (Valadi et al., 2007; Skog et al., 2008; Aliotta et al., 2010). Причем различные субпопуляции частиц оказывают разное регуляторное воздействие на клетки-реципиенты (Xu et al., 2015; Willms et al., 2016; Tkach et al., 2018).

При изменении свойств клеток наблюдается изменение количества, размера и молекулярного состава секретруемых ими везикул (Van der Vlist et al., 2012; Giusti et al., 2015). Молекулярный состав циркулирующих в физиологических жидкостях ВВ также динамически меняется в зависимости от состояния организма. Так, показано, что молекулярный состав ВВ плазмы крови человека зависит от возраста и пола (Baek et al., 2016), меняется при метаболическом синдроме и сахарном диабете (Berezin et al., 2015, 2016), системной красной волчанке (Ostergaard et al., 2013), онкологических заболеваниях и повреждении миокарда (Xu et al., 2017). Поэтому ВВ являются перспективными биомаркерами физиологических и патологических процессов.

С учетом гетерогенности популяций ВВ становится очевидным, что для более полного понимания их функций и механизмов биогенеза, а также для разработки на основе их детекции специфических биомаркеров необходимо изучение субпопуляций везикул, т. е. везикул определенного размера, несущих характерный набор молекулярных маркеров. Поскольку ВВ, различающиеся по молекулярному составу, имеют сходные основные биофизические характеристики, такие как размер и плотность, распространенные методы выделения, основанные на этих характеристиках, не позволяют получать гомогенные субпопуляции везикул (Tkach et al., 2018). Поэтому необходимы методы, позволяющие в гетерогенных популяциях объектов нанометрового диапазона детектировать и измерять характеристики отдельной частицы. Важными параметрами ВВ являются размер, присутствие набора характерных молекулярных маркеров (фенотип) и абсолютное количество в образце. Определение этих параметров позволит как исследовать отдельные субпопуляции везикул, так и характеризовать гетерогенность (сложность) всего образца и будет способствовать развитию более глубокого понимания механизмов функционирования внеклеточных везикул.

Методы изучения размеров, количества и фенотипа ВВ

Набор методов для изучения ВВ в первую очередь определяется их способностью детектировать объекты размером в десятки и сотни нанометров. Основные методы определения размера везикул по сути оценивают разные параметры (Mercus, 2009). Так, методы ДРС, САТН и ФАТН оценивают гидродинамический радиус (часто называемый радиусом Стокса) частицы в суспензии. Он рассчитывается из коэффициента диффузии частицы и из допущения, что исследуемый объект в суспензии представляет собой жесткий шар. Тогда как методы ТЭМ, КТЭМ и СЭМ оценивают электронно-плотный радиус везикулы. Эти методические особенности обуславливают различия в размерах везикул, измеренных разными способами (Chernyshev et al., 2015; Almizraq et al., 2017).

Исследование ВВ, иммобилизованных на твердых подложках. Методы микроскопии. Свойства частиц нанометрового диапазона можно изучать, детектируя конкретные частицы с помощью микроскопии. Поскольку размер большинства ВВ меньше дифракционного порога видимого света, для изучения этих частиц применяют методы АСМ (Sharma et al., 2010), СЭМ (Wu et al., 2015), СЭМ низкого напряжения (Кондратов и др., 2017), ТЭМ (Григорьева и др., 2017), КТЭМ (Tatischeff et al., 2012; Yuana et al., 2013), а также ГИМ (Paolini et al., 2016). При изучении методом КТЭМ суспензия ВВ замораживается и исследуется при криогенных температурах, что позволяет получать более нативные структуры, чем при использовании фиксации образца. В остальных методах препарат везикул размещается на твердой подложке, фиксируется и высушивается.

В случае АСМ поверхность препарата сканируется специальным зондом — кантилевером. Силы, с которыми кантилевер взаимодействует с препаратом (в основном это силы Ван-дер-Ваальса), регистрируются аппаратурой, которая строит профиль поверхности образца. В случаях ТЭМ и СЭМ образец везикул подвергается воздействию потока электронов. ГИМ отличается от СЭМ тем, что в этом методе вместо пучка электронов используется пучок ионов гелия и это позволяет несколько увеличить как раз-

Основные методы исследования размеров и количества внеклеточных везикул

Метод	Диапазон размеров везикул, нм	Возможность детекции молекулярных маркеров (фенотипирование)	Способ измерения размеров ВВ	Возможность количественного определения концентрации везикул	Возможность изучения прямо в суспензии
ПЦ	От 150	+	Автоматический	+	+
ДРС	0.5—10000	—	»	+	+
СИС	40—10000	—	»	+	+
САТН	50—2000	—	»	+	+
ФАТН	50—2000	+	»	+	+
АСМ	От 1	+	По фотографиям	—	—
СЭМ	От 0.17	+	То же	—	—
ТЭМ	От 0.4	+	» »	—	—
ГИМ	От 0.25	+	» »	—	—
КЭМ	От 0.4	+	» »	—	—

решающую способность микроскопа, так и глубину резкости (Paolini et al., 2016). Отдельной модификацией СЭМ является СЭМ низкого напряжения (Pawley, Schatten, 2008). Этот метод позволяет детектировать ВВ без напыления на них материала, отражающего электроны (как правило, золота), что дает возможность более точно оценивать размер ВВ и изучать морфологию их поверхности (Кондратов и др., 2017). С помощью данных методик можно определить размер и морфологию отдельных частиц. Кроме этого, все указанные методики микроскопии позволяют детектировать ВВ, несущие на поверхности определенные биохимические маркеры, за счет окраски препарата антителами, конъюгированными с коллоидным золотом (Goldberg, Fiserova, 2010). Однако следует отметить, что эти методы являются достаточно трудоемкими, поскольку требуют долгой пробоподготовки и ручного измерения диаметра частиц на фотоснимках.

Исследование ВВ в суспензиях. Метод проточной цитометрии (ПЦ). Одним из самых распространенных методов исследования суспензий ВВ является ПЦ. В основе методики лежит принцип облучения лазерным лучом суспензии частиц, движущихся через капилляр. При этом считывается несколько показателей потока частиц — прямое светорассеяние (характеризует размер частиц) и боковое светорассеяние (обусловлено внутренним строением или гранулярностью частиц). С помощью этой методики можно изучать объекты, меченные специфическим флуорофором. Ощутимым преимуществом метода является то, что все вышеизложенные показатели могут исследоваться у каждой конкретной частицы. Это позволяет охарактеризовать объекты, несущие несколько специфичных маркеров, а при наличии соответствующего оборудования можно их отсортировать и получить обогащенный препарат.

Однако огромные возможности этой методики сопряжены с целым рядом ограничений. В частности, метод в основном предназначен для выявления субпопуляций объектов, одновременно несущих несколько маркеров, и изучения пропорций этих субпопуляций в образце. Большинство приборов имеет заявленный фирмой-производителем минимальный диаметр детектируемых частиц в 500 нм. До недавнего времени считалось, что минимальный диаметр объектов для изучения методом проточной цитометрии составляет 300 нм (Dragovic et al., 2011; Van der Pol et al., 2013). Однако приборы нового поколения, которые называют проточными цитофлуориметрами высокого разрешения, позволяют детектировать частицы диаметрами 100 и 200 нм (Wisgrill et al., 2016). При этом следует отметить, что определение размеров объектов методом ПЦ проводится с помощью калибраторов, в качестве которых выступают синтетические кремниевые или полистирольные частицы (Nolte't Hoep et al., 2012; Poncelet et al., 2016). Физико-химические характеристики таких калибровочных частиц, в частности коэффициент преломления света, сильно отличаются от подобных характеристик ВВ. Это определяет сложности в точном определении размеров частиц методом ПЦ. Поэтому требуются дополнительные исследования, чтобы выяснить, какому размеру везикул соответствуют минимальные размеры калибровочных частиц, которые уверенно детектируют проточные цитофлуориметры высокого разрешения. Учитывая это, в настоящее время большинство исследователей придерживаются мнения о том, что с помощью ПЦ высокого разрешения можно детектировать и разрешать внеклеточные везикулы диаметром более

150 нм (Wisgrill et al., 2016). При этом известно, что значительная доля ВВ имеет диаметр менее 100 нм (Van der Pol et al., 2013).

Следует упомянуть, что для изучения частиц диаметром менее 150 нм с помощью ПЦ используется сорбция везикул на гранулы, покрытые антителами против маркеров этих структур (Lof et al., 2016). Однако эта методика не позволяет адекватно оценить ни размер ВВ, ни их концентрацию. Качественный и количественный состав частиц, выделенных различными способами, в том числе с использованием гранул, значительно различается (Tripisciano et al., 2017).

Поскольку при проведении проточной цитометрии ключевым аспектом является отражение света от изучаемых объектов, нужно принимать во внимание, что диаметр и площадь поверхности микрочастицы меньше, чем у клетки, и, следовательно, они отражают света значительно меньше, чем традиционные объекты изучения. Следующее ограничение метода также связано с малыми размерами частиц. Если исходить из одинаковой плотности антигенов на поверхности клеток и везикул, то везикулы будут иметь в 10 000 раз меньше поверхностных молекул. Кроме того, аналогичная концентрация содержимого клеток и везикул позволяет предположить, что содержимое везикул будет составлять $1/10^5$ от содержимого клетки (Nolan, Jones, 2017).

Изучаемые ВВ, как правило, имеют меньшие размеры, чем длина волны, при которой происходит детекция флуоресцентных меток. В такой ситуации проблематично «разделить» частицы как разные события, одновременно попавшие в детектирующий луч. В англоязычной литературе такая ситуация получила название «coincidence». В случае клеток есть возможность детектировать дуплеты по параметрам Height и Area, в случае изучения частиц необходимо проводить исследование образцов в серийных разведениях, подбирая адекватное (Nolan, 2015; Nolan, Jones, 2017). Кроме этого, следует упомянуть, что другие методики исследования ВВ в суспензиях (ДРС, САТН, ФАТН и СИС) могут также регистрировать группу частиц как одну, что приводит к искажению результатов измерения и количества и размеров частиц.

В кровотоке присутствует большое количество структур, схожих по размеру с ВВ (липопротеины, хиломикроны, комплексы антител и т. д.). Таким образом, при ПЦ клинических образцов велика вероятность детектировать эти структуры, приняв их за ВВ. Поэтому в качестве контроля необходим анализ образцов, обработанных детергентами (Nolan, Jones, 2017). Буферы и растворители, используемые в процессе пробоподготовки, могут иметь в своем составе какое-то количество мусора нанометрового диапазона, который также может детектироваться и маскировать присутствие везикул. Кроме того, погрешности самого прибора влияют на минимальный размер детектируемых объектов (Nolan, Jones, 2017). Все это требует постановки дополнительных контролей (цитометрия отдельно буферов, растворителей и т. д.), что увеличивает число необходимых манипуляций и настроек, снижая утилитарность и стандартизацию метода именно в отношении детекции ВВ.

Метод ДРС. (Другие названия метода — квазиэластическое рассеяние света и фотонокорреляционная спектроскопия.) Метод основан на оценке изменений спектра рассеяния суспензии частиц в растворе в процессе их броуновского движения (Merkus, 2009). Метод характеризует целую совокупность явлений, происходящих со

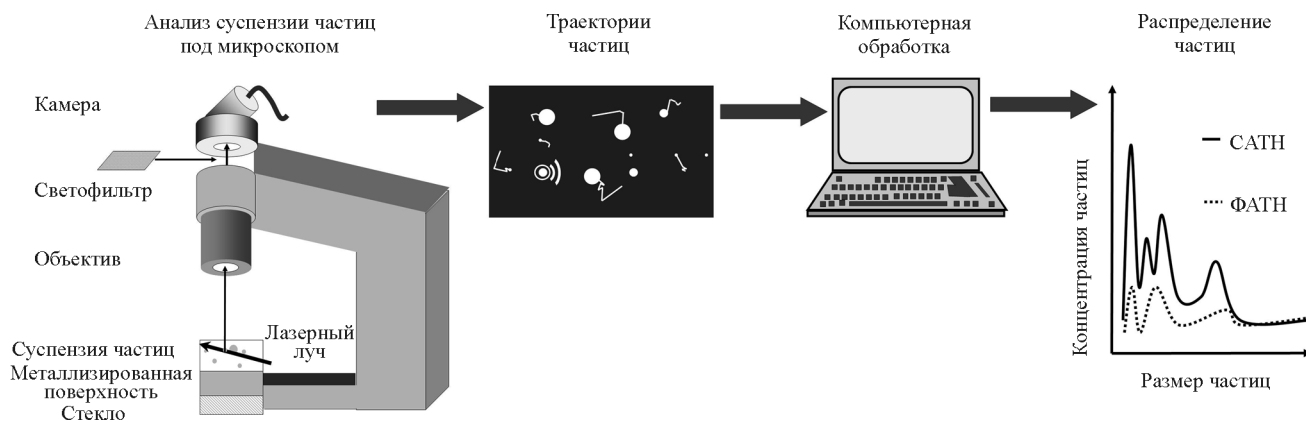


Рис. 1. Принцип детекции везикул методами САТН и ФАТН.

светом при упругом (рэлеевском) рассеивании в суспензии. Главным образом, это смещение длины волны за счет доплеровского сдвига. Кроме этого, оценивается изменение направления света и его интенсивности. Методика позволяет определить долю частиц конкретного размера в суспензии. Диапазон оцениваемых частиц достаточно велик (0.5—10 000 нм). Важно отметить, что в данном методе сигнал регистрируется не от каждой конкретной частицы, а от всего ансамбля объектов в суспензии. Это является существенным ограничением данного метода для характеристики полидисперсных смесей частиц, способных к агрегации, которыми являются препараты ВВ. Кроме того, этот метод не позволяет оценить абсолютную концентрацию частиц в растворе.

Метод СИС основан на изменении электрического сопротивления жидкости при прохождении частиц из суспензии через нанопору (Vogel et al., 2016). При этом чем больше частица, тем большее сопротивление регистрируется. Прокалибровав прибор суспензиями частиц с известными размерами, можно достаточно точно определять размеры частиц, а регулируя скорость потока, можно определять их концентрацию (Coumans et al., 2014; Anderson et al., 2015). Этот метод позволяет оценивать распределение частиц в диапазоне от 40 до 10 000 нм. Метод СИС позволяет оценивать абсолютную концентрацию ВВ.

Метод САТН. В его основе, так же как и в основе ДРС, лежит анализ броуновского движения частиц в коллоидных растворах (Carr et al., 2009; Saveyn et al., 2010). Образец, содержащий суспензию исследуемых частиц, помещается под микроскоп и облучается сбоку лучом тонко сфокусированного лазера (Gardiner et al., 2013) (рис. 1). При этом каждая индивидуальная частица выглядит как светящаяся точка, трепещущая в результате броуновского движения (Van der Meer et al., 2012). Толщина рабочей камеры, в которую помещена суспензия, составляет 0.5 мм. При этом толщина луча лазера в точке наблюдения составляла примерно 20 мкм, что приблизительно соответствует глубине резкости камеры микроскопа. Для анализа характеристик частиц происходит видеозапись их движения со скоростью 30 кадров за 1 с. На основе этой записи строится траектория движения конкретной частицы. Система отслеживает центр каждой частицы и определяет ее перемещение за единицу времени. Из значения этого параметра рассчитывается коэффициент диффузии. Зная этот коэффициент, вязкость среды и температуру препарата, можно рассчитать гидродина-

мический радиус частицы из уравнения Эйнштейна—Стокса:

$$\langle (x, y)^2 \rangle / 4 = Dt = (K_B T_t) / (3\pi\eta d),$$

где $\langle (x, y)^2 \rangle$ — средний квадрат перемещения частицы по двум измерениям, D — коэффициент диффузии, t — длительность одного кадра, K_B — постоянная Больцмана, T_t — температура в кельвинах, η — вязкость среды, d — гидродинамический радиус частицы. Для повышения точности расчета коэффициента диффузии используются только достаточно длинные траектории наночастиц. При этих расчетах исключаются частицы, вокруг которых образовались кольца Ньютона.

В случае полидисперсных систем, к которым относятся практически все биологические жидкости, обычно проводят несколько измерений, а затем усредняют их значения. Минимальный размер частиц, детектируемых методом САТН, определяет показатель преломления частиц (Gardiner et al., 2014). Все ВВ имеют низкий показатель преломления, и по этой причине нельзя детектировать эти частицы, если они меньше 40—50 нм. Следует также упомянуть, что минимальный размер частиц, регистрируемых методом САТН, может различаться для везикул, полученных из разных биологических жидкостей, поскольку эти частицы могут иметь разные коэффициенты преломления (Gardiner et al., 2014). Ввиду того что интенсивность броуновского движения зависит от температуры исследуемого образца, проба подвергается термостатированию в приборе, так же как и в случае ДРС. Метод не требует предварительной калибровки прибора стандартными растворами частиц. Существенным недостатком метода по сравнению с ДРС и СИС является большой размер файла индивидуального измерения (~200 Мб для одиночной записи продолжительностью 30 с), поскольку в процессе измерения записывается видеoinформация.

Таким образом, описанные выше современные методы анализа частиц нанометрового диапазона имеют существенные ограничения для изучения ВВ. Эти методы позволяют либо определить только количество и размер частиц и не дают возможности выделять субпопуляции везикул, несущие специфичные молекулярные маркеры (методы САТН, ДРС и СИС), либо не позволяют исследовать частицы размером менее 150 нм (ПЦ), либо не позволяют количественно определять концентрацию вези-

кул и быстро рассчитывать размеры частиц (АСМ, ТЭМ, КТЭМ, СЭМ и ГИМ). Метод флуоресцентного анализа траекторий наночастиц позволяет производить одновременное измерение концентрации и размера везикул, несущих определенные молекулярные маркеры в суспензии. Поэтому далее подробнее рассматривается принцип работы этого метода, а также приведены примеры его применения для визуализации ВВ.

Принцип работы метода ФАТН

В основе метода лежит модификация метода САТН, которая позволяет дополнительно выделять субпопуляции ВВ, несущих определенный молекулярный маркер. Для этого перед объективом микроскопа, считывающего сигнал от частиц, помещается светофильтр (рис. 1). Это позволяет определять размеры и абсолютную концентрацию только ВВ, флуоресцирующих в определенной части спектра. Перед подобным исследованием везикулы мечаются различными агентами, конъюгированными с флуорофорами. Следует отметить, что метод ФАТН имеет ряд ограничений. Так, облучение частицы лазером в течение сеанса видеозаписи приводит к тому, что флуорофор достаточно быстро выгорает и обсчет частиц делается невозможным. Для борьбы с выгоранием используют два подхода. В первом случае пробу подают в ячейку для исследования с помощью шприцевого насоса. Таким образом, в ячейке создается постоянный ток жидкости. При этом частицы с выгоревшими флуорофорами замещаются другими с еще не выгоревшей меткой (Pasalic et al., 2016; Baldwin et al., 2017). В подобных условиях детекции следует достаточно точно регулировать скорость потока, поскольку при разных скоростях размер частиц будет казаться разным (Tong et al., 2016; Gerritzen et al., 2017). По этой причине для такой процедуры нельзя применять перистальтический насос, так как в этом случае жидкость будет двигаться толчками и это не даст возможности оценить параметры исследуемых частиц. Во многих работах по исследованию распределения частиц методом ФАТН для уменьшения выгорания метки применяется второй подход, когда вместо обычного химического флуорофора (FITC, CY2, CY3 ALEXA и пр.) используют флуорофоры на основе квантовых точек (КТ).

КТ — это нанокристаллы полупроводников, характеризующиеся высокой фотостабильностью. КТ различаются по размерам, спектру испускания и химическому составу. В исследованиях ВВ, меченных КТ, методом ФАТН используют квантовые системы из селенида кадмия, окруженные внутренней оболочкой из сульфата цинка и внешней — из полимера. Спектр испускания КТ зависит от размера их ядра из селенида кадмия. В работах по исследованию ВВ методом ФАТН используют КТ с максимумами испускания 655 нм (Wang et al., 2016), 605 (Dragovic et al., 2011, 2015; Oosthuizen et al., 2013; Carnell-Morris et al., 2017; McNicholas, Michael, 2017; Truong et al., 2017), 585 (Gercel-Taylor et al., 2012) и 565 нм (Zhang et al., 2016). Существуют как наборы для конъюгации КТ с антителами, так и готовые вторичные антитела, конъюгированные с КТ.

Определенную сложность при детекции частиц методом ФАТН также представляет флуоресценция среды, в которой находятся исследуемые ВВ. При высокой флуоресценции этой жидкости, к примеру за счет присутствия несвязавшихся меченых антител, прибор может не детек-

тировать исследуемые частицы. Также исследователю следует учитывать, что ввиду большого размера КТ, которыми мечены антитела, становится актуальным вопрос о том, не будут ли эти крупные частицы оказывать существенное влияние на саму суспензию. В методической статье (McNicholas, Michael, 2017) предлагалось использовать для удаления несвязавшихся антител, конъюгированных с КТ, реагент ExoQuick. Этот реагент позволяет достаточно быстро и эффективно выделять везикулы из биологических жидкостей (Helwa et al., 2017). Однако пока неясно, насколько хорошо ExoQuick позволяет очистить препарат от КТ, не связанных с ВВ, поскольку пока нет работ, сравнивающих распределение частиц в очищенных и неочищенных препаратах. Также предлагается удалять несвязавшиеся антитела с КТ путем отмывки суспензии ВВ на фильтрах в 300 кДа (Gardiner et al., 2013). Однако, по всей видимости, линейные размеры КТ (20 нм) просто находятся ниже предела детекции везикул при применении метода ФАТН (40—50 нм). Другая возможная проблема детекции везикул, окрашенных антителами, конъюгированными с КТ, может быть связана с тем, что из-за большой поверхности квантовой точки на нее может сорбироваться несколько ВВ, которые в этом случае будет невозможно отличить от одной везикулы более крупного размера.

Также следует учесть, что на некоторых ВВ могут быть рецепторы против Fc-фрагментов антител (They et al., 2001), что может привести к неспецифическому мечению этих структур. Для снижения этого эффекта можно применять несколько методик. Это проведение изотипического контроля работы антител, окраска везикул только Fab-фрагментами антител или окраска антителами, в которых флуорофор пришит именно к Fc-фрагменту. В последнем случае уменьшается возможность взаимодействия иммуноглобулина с Fc-рецептором, и это помогает избежать неспецифической конъюгации флуорофора с переменными доменами иммуноглобулинов, что может приводить к ложноположительным результатам при мечении везикул такими антителами. По этой причине выпускаются наборы для конъюгации КТ с углеводами, которые находятся в константных доменах тяжелых цепей иммуноглобулинов (Harlow, Lane, 1988). Отмечают (Gardiner et al., 2013), что для оптимальной окраски везикул желательно увеличивать время их инкубации с антителами по сравнению с окраской для исследования методом ПЦ. Следует также отметить, что сравнение результатов анализа одних и тех же образцов методами ФАТН и САТН дает возможность оценить долю везикул, несущих исследуемый маркер, от общего количества частиц (Carnell-Morris et al., 2017).

Примеры использования методов САТН и ФАТН

Метод САТН и немеченые ВВ. С помощью метода САТН показано более чем трехкратное увеличение количества и двукратное увеличение размера ВВ, циркулирующих в жидкости ротовой полости при онкологических заболеваниях (Zlotogorski-Hurvitz et al., 2016). Также этим методом показано более чем двукратное увеличение количества экзосом в плазме и сыворотке крови при алкогольном гепатите (Momen-Heravi et al., 2015), более чем десятикратное увеличение количества экзосом в плазме крови при травмах (Kuravi et al., 2017) и измене-

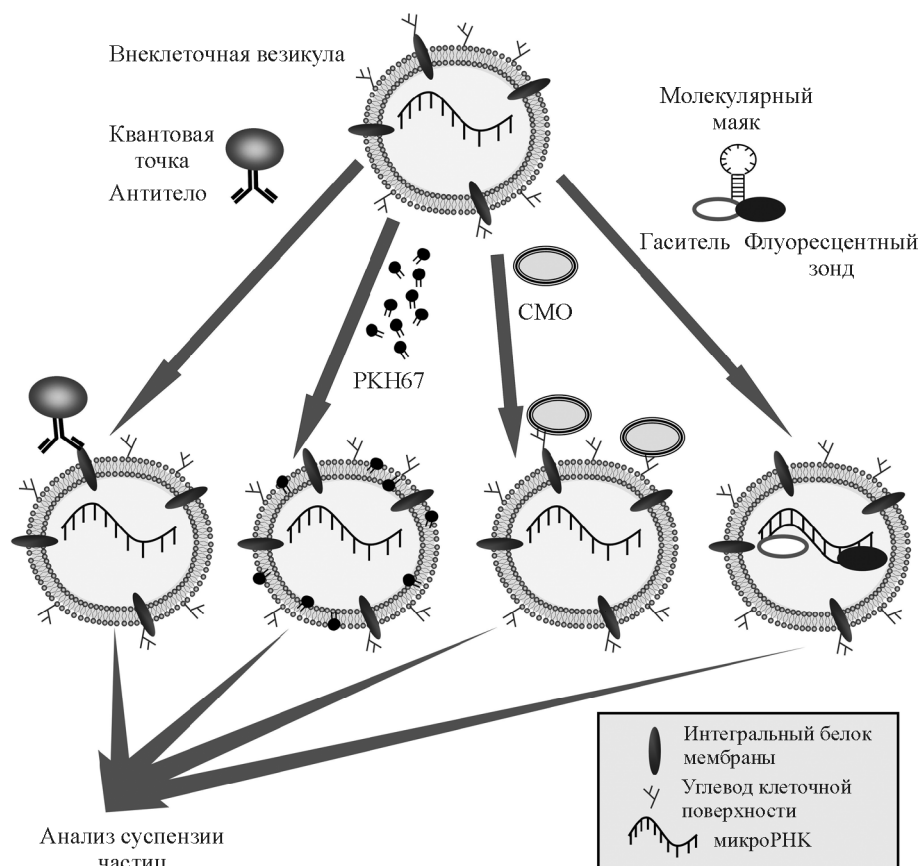


Рис. 2. Основные способы детекции внеклеточных везикул с помощью метода ФАТН.

ние среднего размера экзосом в плазме крови при диабете 1-го типа (Garcia-Contreras et al., 2017). Также метод САТН используется для изучения секреции микровезикул и экзосом иммунными клетками (Soo et al., 2012).

Метод ФАТН с использованием малоспецифичных красителей клеточной мембраны (РКН67 и CellMask Orange). На рис. 2 показаны общие принципы, применяемые для изучения ВВ методом ФАТН. К настоящему моменту не существует общепринятой методики исследования образцов этим методом ввиду пока весьма ограниченного круга работ. Ниже мы более подробно рассмотрим некоторые примеры применения ФАТН.

Одним из часто используемых способов изучения везикул является их мечение красителем РКН67. Этот краситель представляет собой синтетический аналог липидов клеточной мембраны, несущий флуоресцентную метку. В одной из работ (Pascal et al., 2016) везикулы, выделенные из культуральной среды трансформированных ооцитов человека линии HEU, окрашивали красителем РКН67 и анализировали методами ПЦ и ФАТН. Было показано, что детектируемые концентрации меченых ВВ при использовании двух этих методов не различаются.

Другим красителем, позволяющим малоспецифично окрасить клеточную мембрану, является CellMask Orange (СМО). Этот краситель представляет собой лектин, конъюгированный с флуорофором. Лектины — это белки, связывающие углеводы, в том числе находящиеся на поверхности везикул в составе гликопротеинов и гликолипидов (Sharon, Lis, 2007). Опубликованы протоколы (Carnell-

Morris et al., 2017) окраски ВВ красителем СМО. Этим красителем окрашивали везикулы, полученные из плазмы крови человека, и исследовали их методами САТН и ФАТН (Gardiner et al., 2013). Авторы показали, что практически все везикулы плазмы крови метятся СМО.

Отдельный интерес представляет использование красителя кальцеина-АМ. Он добавляется к везикулам в нефлуоресцирующей форме, которая проникает через клеточные мембраны. В клетке или в везикуле под воздействием эстераз кальцеин-АМ превращается во флуоресцирующую форму (кальцеин). Сам кальцеин не способен проникать сквозь мембраны. Таким образом, сочетание этого красителя с красителем РКН67 может дать возможность не только определить количество и размер частиц, имеющих липидную структуру, но и отделить интактные частицы от тех, в которых имеются разрывы мембран. Подобная постановка эксперимента предлагалась в статье Грей с соавторами (Gray et al., 2015). Авторы показали эффективность совместного применения этих двух красителей при изучении ВВ методом ПЦ.

Метод ФАТН с использованием зондов к микроРНК. В качестве зондов для детекции ВВ, содержащих определенные микроРНК, могут быть использованы молекулярные маяки. Молекулярный маяк представляет собой шпильчатую структуру нуклеиновой кислоты, на концах которой находятся флуоресцентная метка и ее гаситель (Tyagi, Kramer, 1996). В присутствии нуклеиновой кислоты мишени молекулярный маяк не может образовывать шпильчатую структуру, в результате чего флуорофор удаляется от гасителя и его флуоресценция под воздействием возбуждающего излучения может быть де-

тектирована. Этот подход был применен для детекции микроРНК-21 в везикулах из культуральной среды клеток A549 (Baldwin et al., 2017). В качестве флуоресцентной метки использовали краситель Cy3. При этом доставка молекулярного маяка внутрь везикулы осуществлялась с помощью липоплекса — смеси липидов и нуклеиновой кислоты (Wu et al., 2013). В работе оценивали наиболее эффективную концентрацию молекулярного маяка для доставки этого агента при детекции частиц, содержащих микроРНК-21.

Следует отметить, что для доставки молекулярных маяков в ВВ могут быть использованы разные методики. Есть работы, в которых везикулы из клеток MCF-7 и СНО обрабатывали с помощью стрептококкового экзотоксина стрептолизина О (Lee et al., 2015; Rhee, Jeong, 2017). Этот токсин представляет собой белок массой 62 кДа, взаимодействующий с молекулами холестерина клеточной мембраны; 45—50 молекул этого белка формируют пору в мембране. При этом не очень понятен механизм, по которому после такой обработки микроРНК-мишень остается в везикуле, так как известно, что стрептолизин О формирует пору размером 25—30 нм, через которую могут выходить белки (в частности, лактатдегидрогеназа) и нуклеиновые кислоты (Yang et al., 2006). Большие размеры поры не только должны позволять выходить молекуле микроРНК из везикулы, но и быть сопоставимыми с линейными размерами мелких везикул — экзосом. Поэтому остается не до конца понятно, насколько воздействие агентов, доставляющих молекулярный маяк в везикулы, сказывается на их целостности.

Следует заметить, что показана возможность одновременной окраски несколькими молекулярными маяками по крайней мере трех разных микроРНК в ВВ (Lee et al., 2016). В перспективе эта окраска в сочетании с методом ФАТН может позволить в одном образце определять количество везикул определенного размера, несущих в себе несколько конкретных микроРНК.

Метод ФАТН с использованием антител к белковым маркерам ВВ. Белковые маркеры, применяемые для изучения ВВ, можно разделить на три группы — маркеры везикул, маркеры клеточных типов, являющихся источниками везикул, и маркеры процессов, например активации клеток. Совместная окраска антителами против белков из этих групп маркеров позволяет выявить субпопуляцию везикул, определить их клеточный источник и его функциональное состояние. К распространённым маркерам ВВ относятся белки группы тетраспанинов (Andreu, Yanez-Mo, 2014). В частности, антителами против одного из этих белков (CD63) ВВ детектировали при исследовании методом ФАТН в трех работах (Wang et al., 2016; McNicholas, Michael, 2017; Truong et al., 2017). Подробная методика окраски везикул антителами, конъюгированными с КТ, приведена в методической работе (McNicholas, Michael, 2017). В ней описана процедура конъюгации КТ QD 605 с антителами против маркера везикул белка CD63 и удаления несвязавшихся антител с помощью реагента EхоQuick. В работе Труонг с соавторами (Truong et al., 2017) с помощью детекции экзосом, несущих белок CD63, показано, что количество таких экзосом в кондиционной среде клеток трофобласта при гипоксии увеличивается более чем в 2 раза. В другой работе (Wang et al., 2016) показана возможность применения метода ФАТН в системе идентификации маркеров на поверхности ВВ. В этой работе выделяли экзосомы из плазмы крови и культуральной среды

эндотелиальных клеток микрососудов мозга человека и предшественников эндотелиальных клеток. Эти везикулы выделяли с помощью гранул, конъюгированных с антителами против CD105 (маркера эндотелиальных клеток) и CD34 (маркера предшественников эндотелиальных клеток). После выделения экзосомы исследовали методом ФАТН, связывая их с первыми антителами против маркеров везикул (CD63 и аннексин V), эндотелиальных клеток (CD144) и предшественников эндотелия (KDR), а затем окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с QD 655. Подобная постановка эксперимента позволяла определять, долю везикул, несущих одновременно несколько белковых маркеров.

В трех работах (Dragovic et al., 2011, 2015; Carnell-Morris et al., 2017) исследуются везикулы, полученные из перфузионной среды синцитиотрофобласта человека. В этих работах методом ФАТН изучали частицы, несущие маркер плацентарной щелочной фосфатазы. Для детекции везикул использовали антитела против этого белка, конъюгированные с КТ, а в качестве изотипического контроля применяли контрольные антитела, конъюгированные с этим же флуорофором. Эти работы показали, что при детекции везикул методом САТН не наблюдали существенных различий между распределением везикул в образцах с контрольными антителами и с антителами против фосфатазы. Однако при детекции частиц в режиме ФАТН в образце, окрашенном контрольными антителами, наблюдали лишь слабую флуоресценцию, тогда как при окраске антителами против щелочной фосфатазы четко детектировались везикулы, несущие этот маркер.

Как попытка применить метод ФАТН для нужд медицины интересна работа, в которой экзосомы выделяли из мочи нормальных доноров и пациентов с несхарным диабетом, а также из культуральной среды клеток mCCDC11 почки мыши (Oosthuyzen et al., 2013). Затем везикулы метили антителами против белков аквапорина 2 и CD24, конъюгированными с QD 605. CD24 является маркером экзосом, выделяемых с мочой (Keller et al., 2007). Аквапорин 2 — трансмембранный белок, который участвует в реабсорбции воды в почечных канальцах в ответ на гормон нейрогипофиза вазопрессин. Протекание несхарного диабета связано с нарушением секреции этого гормона. В результате было показано, что под воздействием десмопрессина (аналога гормона вазопрессина) как в моче, так и в культуральной среде клеток mCCDC11 увеличивается количество внеклеточных везикул, несущих аквапорин 2 (Oosthuyzen et al., 2013).

Кроме вышеупомянутых белков в двух работах (Gercel-Taylor et al., 2012; Zhang et al., 2016) методом ФАТН детектировали везикулы, меченные антителами против часто используемого биомаркера опухолей (Went et al., 2006) белка EpCAM. Антитела были конъюгированы с QD 565. В другой работе (Gercel-Taylor et al., 2012) исследовали окрашенные антителами против CD63 и EpCAM везикулы, полученные из сыворотки крови пациентов, больных раком яичников. Есть данные по изучению экзосом, полученных из среды трех линий клеток опухоли эпителия яичника (OVCAR3, IGROV1 и ES-2) и от эпителиальных клеток яичника человека (HOSEPiC) (Zhang et al., 2016). Следует отметить особую значимость изучения популяции везикул, несущих онкомаркеры, поскольку показано, что концентрация ВВ при онкологических заболеваниях выше, чем в норме (Zlotogorski-Hurvitz et al., 2016).

Заключение

Изучение ВВ в качестве регуляторов состояния клеток и потенциальных биомаркеров заболеваний является активно развивающейся областью исследований. Публикуются все новые данные о гетерогенности молекулярного состава различных субпопуляций ВВ. Применение к биологическим образцам группы методов анализа суспензий на основе изучения колебания частиц в результате их броуновского движения открыло новые возможности для исследования характеристик ВВ. В частности, работы последних лет продемонстрировали, что описываемый в обзоре метод ФАТН пригоден для детекции ВВ в культуральной среде, моче и плазме крови. Использование меченых зондов против нуклеиновых кислот и поверхностных белков позволяет с помощью ФАТН давать характеристику специфичности субпопуляций ВВ. Есть все основания полагать, что использование ФАТН в сочетании с другими современными методами будет способствовать более детальной и полной характеристике субпопуляций ВВ. Это существенно расширит наши знания о фундаментальных механизмах биогенеза и регуляторных функциях этих объектов, а также предоставит новые возможности для диагностики заболеваний, связанных с изменением свойств ВВ, циркулирующих в физиологических жидкостях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-30052).

Список литературы

- Григорьева А. Е., Дырхеева Н. С., Брызгунова О. Е., Тамкович С. Н., Челобанов Б. П., Рябчикова Е. И. 2017. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей. Биомед. химия. 62 : 99—106. (Grigor'eva A. E., Dyrkheeva N. S., Bryzgunova O. E., Tamkovich S. N., Chelobanov B. P., Ryabchikova E. I. 2017. Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids. Biomed. Khim. 63 : 91—96.)
- 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. Экзосомы слезной жидкости здоровых людей: выделение, идентификация и характеристика. Биомед. химия. 62 : 99—106. (Grigor'eva A. E., Tamkovich S. N., Eremina A. V., Tupikin A. E., Kabilov M. R., Chernykh V. V., Vlassov V. V., Laktionov P. P., Ryabchikova E. I. 2016. Characteristics of exosomes and microparticles discovered in human tears. Biomed. Khim. 62 : 99—106.)
- Кондратов К. А., Петрова Т. А., Михайловский В. Ю., Иванова А. Н., Костарева А. А., Федоров А. В. 2017. Изучение внеклеточных везикул, выделенных из плазмы крови, с помощью сканирующей электронной микроскопии низкого напряжения. Цитология. 59 (3) : 169—177. (Kondratov K. A., Petrova T. A., Mikhailovskii V. Yu., Ivanova A. N., Kostareva A. A., Fedorov A. V. 2017. A study of extracellular vesicles isolated from blood plasma conducted by low-voltage scanning electron microscopy. Cell Tissue Biol. 11(3) : 181—190.)
- Akers J. C., Ramakrishnan V., Nolan J. P., Duggan E., Fu C. C., Hochberg F. H., Chen C. C., Carter B. S. 2016. Comparative analysis of technologies for quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF). PLoS ONE. 11 : e0149866. Doi: 10.1371/journal.pone.0149866.
- Aliotta J. M., Pereira M., Johnson K. W., de Paz N., Dooner M. S., Puente N., Ayala C., Brilliant K., Berz D., Lee D., Ramratnam B., McMillan P. N., Hixson D. C., Josic D., Quesenberry P. J. 2010. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. Exp. Hematol. 38 : 233—245.
- Almizraq R. J., Seghatchian J., Holovati J. L., Acker J. P. 2017. Extracellular vesicle characteristics in stored red blood cell concentrates are influenced by the method of detection. Transfus. Apher. Sci. 56 : 254—260.
- Anderson W., Lane R., Korbie D., Trau M. 2015. Observations of tunable resistive pulse sensing for exosome analysis: improving system sensitivity and stability. Langmuir. 31 : 6577—6587.
- Andreu Z., Yanez-Mo M. 2014. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Front. Immunol. 5 : 442. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.
- Baek R., Varming K., Jorgensen M. M. 2016. Does smoking, age or gender affect the protein phenotype of extracellular vesicles in plasma? Transfus. Apher. Sci. 55 : 44—52.
- Baldwin S., Deighan C., Bandeira E., Kwak K. J., Rahman M., Nana-Sinkam P., Lee L. J., Paulaitis M. E. 2017. Analyzing the miRNA content of extracellular vesicles by fluorescence nanoparticle tracking. Nanomed. 13 : 765—770.
- Beltrami C., Besnier M., Shantikumar S., Shearn A. I., Rajakuruna C., Laftah A., Sessa F., Spinetti G., Petretto E., Angelini G. D., Emanueli C. 2017. Human pericardial fluid contains exosomes enriched with cardiovascular-expressed microRNAs and promotes therapeutic angiogenesis. Mol. Ther. 25 : 679—693.
- Berezin A. E., Kremzer A., Berezina T., Martovitskaya Y. 2016. The signature of circulating microparticles in heart failure patients with metabolic syndrome. J. Circ. Biomark. 5 : 1849454416663659. Doi: 10.1177/1849454416663659.
- Berezin A. E., Kremzer A. A., Samura T. A., Berezina T. A., Kruzliak P. 2015. Impaired immune phenotype of circulating endothelial-derived microparticles in patients with metabolic syndrome and diabetes mellitus. J. Endocrinol. Invest. 38 : 865—874.
- Carnell-Morris P., Tannetta D., Siupa A., Hole P., Dragovic R. 2017. Analysis of extracellular vesicles using fluorescence nanoparticle tracking analysis. Methods Mol. Biol. 1660 : 153—173.
- Carr R., Hole P., Malloy A., Nelson P., Smith J. 2009. Applications of nanoparticle tracking analysis (NTA) in nanoparticle research — a mini-review. Eur. J. Parent Pharmaceut. Sci. 14 : 45—50.
- Chen M., Xu R., Ji H., Greening D. W., Rai A., Izumikawa K., Ishikawa H., Takahashi N., Simpson R. J. 2016. Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line. Sci. Rep. 6 : 38397. Doi: 10.1038/srep38397.
- Chernyshev V. S., Rachamadugu R., Tseng Y. H., Belnap D. M., Jia Y., Branch K. J., Butterfield A. E., Pease L. F. 3rd, Bernard P. S., Skliar M. 2015. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. Anal. Bioanal. Chem. 407 : 3285—3301.
- Coumans F. A., van der Pol E., Boing A. N., Hajji N., Sturk G., van Leeuwen T. G., Nieuwland R. 2014. Reproducible extracellular vesicle size and concentration determination with tunable resistive pulse sensing. J. Extracell. Vesicles. 3 : 25922. Doi: 10.3402/jev.v3.25922.
- Dragovic R. A., Collett G. P., Hole P., Ferguson D. J., Redman C. W., Sargent I. L., Tannetta D. S. 2015. Isolation of syncytiotrophoblast microvesicles and exosomes and their characterization by multicolour flow cytometry and fluorescence Nanoparticle Tracking Analysis. Methods. 87 : 64—74.
- Dragovic R. A., Gardiner C., Brooks A. S., Tannetta D. S., Ferguson D. J., Hole P., Carr B., Redman C. W., Harris A. L., Dobson P. J., Harrison P., Sargent I. L. 2011. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. Nanomed. 7 : 780—788.
- Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G. G. 2012. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. PLoS One. 7 : e30679. DOI: 10.1371/journal.pone.0030679.
- Garcia-Contreras M., Shah S. H., Tamayo A., Robbins P. D., Golberg R. B., Mendez A. J., Ricordi C. 2017. Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration type 1 diabetes. Sci. Rep. 7 : 5998. Doi: 10.1038/s41598-017-05787-y.

- Gardiner C., Ferreira Y. J., Dragovic R. A., Redman C. W., Sargent I. L. 2013. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *J. Extracell. Vesicles*. 2. Doi: 10.3402/jev.v2i0.19671.
- Gardiner C., Shaw M., Hole P., Smith J., Tannetta D., Redman C. W., Sargent I. L. 2014. Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 3 : 25361. Doi: 10.3402/jev.v3.25361.
- Gercel-Taylor C., Atay S., Tullis R. H., Kesimer M., Taylor D. D. 2012. Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Anal. Biochem*. 428 : 44—53.
- Gerritzen M. J. H., Martens D. E., Wijffels R. H., Stork M. 2017. High throughput nanoparticle tracking analysis for monitoring outer membrane vesicle production. *J. Extracell. Vesicles*. 6 : 1333883. Doi: 10.1080/20013078.2017.1333883.
- Giusti I., Di Francesco M., Cantone L., D'Ascenzo S., Bollati V., Carta G., Dolo V. 2015. Time-dependent release of extracellular vesicle subpopulations in tumor CABA I cells. *Oncol. Rep*. 34 : 2752—2759.
- Goldberg M. W., Fiserova J. 2010. Immunogold labelling for scanning electron microscopy. *Methods Mol. Biol*. 657 : 297—313.
- Gray W. D., Mitchell A. J., Searles C. D. 2015. An accurate, precise method for general labeling of extracellular vesicles. *Methods*. 2 : 360—367.
- Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. 464 p.
- Harrison P., Gardiner C., Sargent I. L. 2014. *Extracellular vesicles in health and disease*. New York: Pan Stanford Publ. 474 p.
- Helwa I., Cai J., Drewry M. D., Zimmerman A., Dinkins M. B., Khaled M. L., Seremwe M., Dismuke W. M., Bieberich E., Stamer W. D., Hamrick M. W., Liu Y. 2017. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PLoS ONE*. 12 : e0170628. Doi: 10.1371/journal.pone.0170628.
- Ibsen S. D., Wright J., Lewis J. M., Kim S., Ko S. Y., Ong J., Manouchehri S., Vyas A., Akers J., Chen C. C., Carter B. S., Eserer S. C., Heller M. J. 2017. Rapid isolation and detection of exosomes and associated biomarkers from plasma. *ACS Nano*. 11 : 6641—6651.
- Keller S., Rupp C., Stoeck A., Runz S., Fogel M., Lugert S., Hager H. D., Abdel-Bakky M. S., Gutwein P., Altevogt P. 2007. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int*. 72(9) : 1095—1102.
- Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J. P., Prindal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Thery C. 2016. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 113 : E968—E977.
- Kumeda N., Ogawa Y., Akimoto Y., Kawakami H., Tsujimoto M., Yanoshita R. 2017. Characterization of membrane integrity and morphological stability of human salivary exosomes. *Biol. Pharm. Bull*. 40 : 1183—1191.
- Kuravi S. J., Yates C. M., Foster M., Harrison P., Hazeldine J., Hampson P., Watson C., Belli A., Midwinter M., Nash G. B. 2017. Changes in the pattern of plasma extracellular vesicles after severe trauma. *PLoS ONE*. 12 : e0183640. Doi: 10.1371/journal.pone.0183640.
- Lee J. H., Kim J. A., Jeong S., Rhee W. J. 2016. Simultaneous and multiplexed detection of exosome microRNAs using molecular beacons. *Biosens. Bioelectron*. 86 : 202—210.
- Lee J. H., Kim J. A., Kwon M. H., Kang J. Y., Rhee W. J. 2015. *In situ* single step detection of exosome microRNA using molecular beacon. *Biomaterials*. 54 : 116—125.
- Lof L., Ebai T., Dubois L., Wik L., Ronquist K. G., Nlander O., Lundin E., Soderberg O., Landegren U., Kamali-Moghadam M. 2016. Detecting individual extracellular vesicles using a multicolor *in situ* proximity ligation assay with flow cytometric readout. *Sci. Rep*. 6 : 34358. Doi: 10.1038/srep34358.
- Mateescu B., Kowal E. J., van Balkom B. W. et al. 2017. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA — an ISEV position paper. *J. Extracell. Vesicles*. 6 (1) : 1286095. Doi: 10.1080/20013078.2017.1286095.
- McNicholas K., Michael M. Z. 2017. Immuno-characterization of exosomes using nanoparticle tracking analysis. *Methods Mol. Biol*. 1545 : 35—42.
- Merkus H. G. 2009. *Particle size measurements. Fundamentals, practice, quality*. Springer Science+Business Media B. V. 533 p.
- Momen-Heravi F., Saha B., Kodys K., Catalano D., Satisch-handran A., Szabo G. 2015. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J. Transl. Med*. 13 : 261. Doi: 10.1186/s12967-015-0623-9.
- Nolan J. P. 2015. Flow cytometry of extracellular vesicles: potential, pitfalls, and prospects. *Curr. Protoc. Cytom*. 73 : 13.14.1-16. Doi: 10.1002/0471142956.cy1314s73.
- Nolan J. P., Jones J. C. 2017. Detection of platelet vesicles by flow cytometry. *Platelets*. 28 : 256—262.
- Nolte-t Hoen E. N., van der Vliet E. J., Aalberts M., Mertens H. C., Bosch B. J., Bartelink W., Mastrobattista E., van Gaal E. V., Stoorvogel W., Arkesteijn G. J., Wauben M. H. 2012. Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomed*. 8 : 712—720.
- Oosthuyzen W., Sime N. E., Ivy J. R., Turtle E. J., Street J. M., Pound J., Bath L. E., Webb D. J., Gregory C. D., Bailey M. A., Dear J. W. 2013. Quantification of human urinary exosomes by nanoparticle tracking analysis. *J. Physiol*. 591 : 5833—5842.
- Ostergaard O., Nielsen C. T., Iversen L. V., Tanassi J. T., Knudsen S., Jacobsen S., Heegaard N. H. 2013. Unique protein signature of circulating microparticles in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 65 : 2680—2690.
- Palma J., Yaddanapudi S. C., Pigati L., Havens M. A., Jeong S., Weiner G. A., Weimer K. M., Stern B., Hastings M. L., Duelli D. M. 2012. MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. *Nucleic Acids Res*. 40 : 9125—9138.
- 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. Doi: 10.1038/srep23550.
- Pasalic L., Williams R., Siupa A., Campbell H., Henderson M. J., Chen V. M. 2016. Enumeration of extracellular vesicles by a new improved flow cytometric method is comparable to fluorescence mode nanoparticle tracking analysis. *Nanomed*. 12 : 977—986.
- Pawley J., Schatten H. 2008. *Biological low-voltage scanning electron microscopy*. New York: Springer-Verlag. 317 p.
- Pienimaeki-Roemer A., Kuhlmann K., Bottcher A., Konovalova T., Black A., Orso E., Liebisch G., Ahrens M., Eisenacher M., Meyer H. E., Schmitz G. 2015. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion*. 55 : 507—521.
- Poncelet P., Robert S., Bouriche T., Bez J., Lacroix R., Dignat-George F. 2016. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: forward or side scatter? *Cytometry (A)*. 89 : 148—158.
- Rezaie J., Ajezi S., Avci C. B., Karimipour M., Geranmayeh M. H., Nourazarian A., Sokullu E., Rezaabakhsh A., Rahbarghazi R. 2017. Exosomes and their application in biomedical field: difficulties and advantages. *Mol. Neurobiol*. Doi: 10.1007/s12035-017-0582-7.
- Rhee W. J., Jeong S. 2017. Extracellular vesicle mirna detection using molecular beacons. *Methods Mol. Biol*. 1660 : 287—294.
- Saveyn H., De B. B., Thas O., Hole P., Smith J., Van der Mee-ren P. 2010. Accurate particle size distribution determination by nanoparticle tracking analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation. *J. Colloid. Interface Sci*. 352 : 593—600.
- Severino V., Dumonceau J. M., Delhaye M., Moll S., Annesi-Ramseyer I., Robin X., Frossard J. L., Farina A. 2017. Extracellular vesicles in bile as markers of malignant biliary stenoses. *Gastroenterology*. 153 : 495—504.

- 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.
- Sharon N., Lis H. 2007. *Lectins*. Berlin: Springer. 357 p.
- Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D. H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W. T. Jr., Carter B. S., Krichevsky A. M., Breakefield X. O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10 : 1470—1476.
- Soo C. Y., Song Y., Zheng Y., Campbell E. C., Riches A. C., Gunn-Moore F., Powis S. J. 2012. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology*. 136 : 192—197.
- Tatischeff I., Larquet E., Falcon-Perez J. M., Turpin P. Y., Kruglik S. G. 2012. Fast characterisation of cell-derived extracellular vesicles by nanoparticles tracking analysis, cryo-electron microscopy, and Raman tweezers microspectroscopy. *J. Extracell. Vesicles*. Doi: 10.3402/jev.v1i0.19179.
- Thery C., Boussac M., Veron P., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Garin J., Amigorena S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* 166 : 7309—7318.
- Tkach M., Kowal J., Thery C. 2018. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 373. Pii: 20160479. Doi: 10.1098/rstb.2016.0479.
- Tong M., Brown O. S., Stone P. R., Cree L. M., Chamley L. W. 2016. Flow speed alters the apparent size and concentration of particles measured using NanoSight nanoparticle tracking analysis. *Placenta*. 38 : 29—32.
- Tripisciano C., Weiss R., Eichhorn T., Spittler A., Heuser T., Fischer M. B., Weber V. 2017. Different potential of extracellular vesicles to support thrombin generation: contributions of phosphatidylserine, tissue factor, and cellular origin. *Sci. Rep.* 7 : 1—11.
- Truong G., Guanzon D., Kinhal V., Elfeky O., Lai A., Longo S., Nuzhat Z., Palma C., Scholz-Romero K., Menon R., Mol B. W., Rice G. E., Salomon C. 2017. Oxygen tension regulates the miRNA profile and bioactivity of exosomes released from extravillous trophoblast cells — liquid biopsies for monitoring complications of pregnancy. *PLoS ONE*. 12 : e0174514. Doi: 10.1371/journal.pone.0174514.
- Tyagi S., Kramer F. R. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14 : 303—308.
- Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J. J., Lotvall J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9 : 654—659.
- Van der Meeren P., Kasinos M., Saveyn H. 2012. Relevance of two-dimensional Brownian motion dynamics in applying nanoparticle tracking analysis. *Methods Mol. Biol.* 906 : 525—534.
- Van der Pol E., Coumans F., Varga Z., Krumrey M., Nieuwland R. 2013. Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J. Thromb. Haemost.* 11. Suppl. 1 : 36—45.
- Van der Vlist E. J., Arkesteijn G. J., van de Lest C. H., Stoorvogel W., Nolte-'t Hoen E. N., Wauben M. H. 2012. CD4(+) T cell activation promotes the differential release of distinct populations of nanosized vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 1. Doi: 10.3402/jev.v1i0.18364.
- Vogel R., Coumans F. A., Maltesen R. G. et al. 2016. A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J. Extracell. Vesicles*. 5 : 31242. Doi: 10.3402/jev.v5.31242.
- Wang J., Guo R., Yang Y., Jacobs B., Chen S., Iwuchukwu I., Gaines K. J., Chen Y., Simman R., Lv G., Wu K., Bihl J. C. 2016. The novel methods for analysis of exosomes released from endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Stem Cells Int.* 2639728. Doi: 10.1155/2016/2639728.
- Welch J. L., Madison M. N., Margolick J. B., Galvin S., Gupta P., Martinez-Maza O., Dash C., Okeoma C. M. 2017. Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity. *Sci. Rep.* 7 : 45034. Doi: 10.1038/srep45034.
- Went P., Vasei M., Bubendorf L., Terracciano L., Tornillo L., Riede U., Kononen J., Simon R., Sauter G., Baeuerle P. A. 2006. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br. J. Cancer*. 94 : 128—135.
- Willms E., Johansson H. J., Mager I., Lee Y., Blomberg K. E., Sadik M., Alaarg A., Smith C. I., Lehtio J., Andaloussi S., Wood M. J., Vader P. 2016. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci. Rep.* 6 : 22519. Doi: 10.1038/srep22519.
- Wisgrill L., Lamm C., Hartmann J., Preißing F., Dragosits K., Bee A., Hell L., Thaler J., Ay C., Pabinger I., Berger A., Spittler A. 2016. Peripheral blood microvesicles secretion is influenced by storage time, temperature, and anticoagulants. *Cytometry A*. 89 : 663—672.
- Wu Y., Deng W., Klink D. J. 2nd. 2015. Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*. 140 : 6631—6642.
- Wu Y., Kwak K. J., Agarwal K., Marras A., Wang C., Mao Y., Huang X., Ma J., Yu B., Lee R., Vachani A., Marcucci G., Byrd J. C., Muthusamy N., Otterson G., Huang K., Castro C. E., Paulaitis M., Nana-Sinkam S. P., Lee L. J. 2013. Detection of extracellular RNAs in cancer and viral infection via tethered cationic lipoplex nanoparticles containing molecular beacons. *Anal. Chem.* 85 : 11265—74. Doi: 10.1021/ac401983w.
- Xu J. Y., Chen G. H., Yang Y. J. 2017. Exosomes: a rising star in falling hearts. *Front Physiol.* 8 : 494. Doi: 10.3389/fphys.2017.00494.
- Xu R., Greening D. W., Rai A., Ji H., Simpson R. J. 2015. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods*. 87 : 11—25.
- Yamamoto H., Watanabe Y., Oikawa R., Morita R., Yoshida Y., Maehata T., Yasuda H., Itoh F. 2016. BARHL2 methylation using gastric wash DNA or gastric juice exosomal DNA is a useful marker for early detection of gastric cancer in an *H. pylori*-independent manner. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 7 : e184. Doi: 10.1038/ctg.2016.40.
- Yang W. S., Park S. O., Yoon A. R., Yoo J. Y., Kim M. K., Yun C. O., Kim C. W. 2006. Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol. Cancer Ther.* 5 : 1610—1619.
- 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*. Doi: 10.3402/jev.v2i0.21494.
- Zempleni J., Aguilar-Lozano A., Sadri M., Sukreet S., Manca S., Wu D., Zhou F., Mutai E. 2017. Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. *J. Nutr.* 147 : 3—10.
- Zhang W., Peng P., Kuang Y., Yang J., Cao D., You Y., Shen K. 2016. Characterization of exosomes derived from ovarian cancer cells and normal ovarian epithelial cells by nanoparticle tracking analysis. *Tumour Biol.* 37 : 4213—4221.
- Zlotogorski-Hurvitz A., Dayan D., Chaushu G., Salo T., Vered M. 2016. Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142 : 101—110.

METHODS FOR INVESTIGATION OF EXTRACELLULAR VESICLE SUBPOPULATIONS

K. A. Kondratov, A. S. Golovkin, A. V. Fedorov*Institute of Molecular Biology and Genetics, V. A. Almazov National Medical Research Centre,
St. Petersburg, 197341;

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

Extracellular vesicles represent objects of nanometer size, which are endogenous carriers of biomolecules in the intercellular space. Studies of recent years significantly expand our knowledge of the variety of extracellular vesicles functions, and emphasize their important role in a number of physiological and pathological processes. According to modern concepts, the whole set of extracellular vesicles consists of many subpopulations of particles that have significant differences in their size, mechanisms of biogenesis and cargo. However, the properties and molecular composition of individual subpopulations of extracellular vesicles have been very poorly studied. This review is devoted to the description of methods for investigation of extracellular vesicles. Particular attention is paid to the method of fluorescence nanoparticle tracking analysis (fNTA), since it allows in a suspension to simultaneously measure the concentration and size of vesicles bearing certain molecular markers. Principle of the fNTA method, its capabilities and limitations in comparison with other techniques for the characterization of extracellular vesicles as well as examples of fNTA application for the visualization of extracellular vesicles via detection of bilipid membranes, specific protein markers and microRNAs are discussed.

Key words: fluorescent nanoparticle tracking analysis, extracellular vesicles, exosomes, biomarkers, quantum dots, microRNA
