

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Никишин Игорь Игоревич

**Развитие методов микроскопии высокого разрешения для
исследования внеклеточных везикул**

1.1.10 Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник Багров Д.В.

Москва

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1. Сведения об исследуемых объектах.....	11
2.1.1. Определение и классы везикул.....	11
2.1.2. Физиологические функции и роль	12
2.1.3. Способы выделения везикул	13
2.1.4. Состав внеклеточных везикул	15
2.2. Особенности исследования везикул методом АСМ.....	19
2.2.1. Методики визуализации методом АСМ.....	19
2.2.2. Артефакты метода АСМ.....	23
2.3. Особенности исследования везикул методом ПЭМ.....	25
2.3.1. Методики визуализации методом ПЭМ.....	25
2.3.2. Некоторые подходы к обработке ПЭМ-изображений.....	28
2.4. Дополнительные методы исследования внеклеточных везикул.....	42
2.4.1. Особенности исследования везикул методом АТН.....	42
2.5. Корреляционная микроскопия	42
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
3.1. Выделение везикул	48
3.2. Подготовка образцов для АСМ	49
3.3. Подготовка образцов для ПЭМ	50
3.4. Иммуноблоттинг	50
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
4.1. Разработка программы на основе нейросети по обработке ПЭМ-изображений внеклеточных везикул.....	51
4.1.1. Сбор, подготовка и разметка данных	51
4.1.2. Подбор и обучение нейросетевой модели	53
4.1.3. Тестирование обученной модели и валидация результатов	54
4.2. Исследование стоматина как потенциального экзосомального маркера	60
4.2.1. Характеризация внеклеточных везикул	60
4.2.2. Измерение содержания стоматина во внеклеточных везикулах.....	62
4.3. Методические аспекты исследования везикул методом АСМ	65
4.3.1. Подготовка образцов.....	65
4.3.2. Получение АСМ изображений	66
4.3.3. Сравнение результатов АСМ, ПЭМ и АТН.....	69
4.4. Корреляционная АСМ и ПЭМ изображений везикул	72

4.4.1. Разработка методики исследования везикул с помощью корреляционной микроскопии	72
4.4.2. Обработка изображений, полученных методом корреляционной микроскопии.....	79
4.4.3. Оценка точности совмещения изображений.....	83
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	92
6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	93
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
ПРИЛОЖЕНИЕ А. ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ОБ ИССЛЕДОВАНИИ ВВ МЕТОДОМ АСМ.	110
8. БЛАГОДАРНОСТИ.....	120

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В 2011 году было создано международное общество International Society for Extracellular Vesicles (ISEV, <https://www.isev.org/>), целью которого стало продвижение исследований, связанных с внеклеточными везикулами (ВВ). Создание этого общества отражало растущий интерес ученых к изучению физиологической роли внеклеточных везикул и их диагностическому потенциалу. В 2013 году, после вручения Нобелевской премии по физиологии и медицине Джеймсу Ротману, Рэнди Шекману и Томасу Зюдофу «за открытие системы везикулярного транспорта – основной транспортной системы в наших клетках» этот интерес значительно усилился.

По мере накопления опыта работы с внеклеточными везикулами, сообщество ISEV стало выпускать методические рекомендации MISEV, в которых собраны наиболее современные представления о том, как следует организовывать и проводить исследования, связанные с внеклеточными везикулами, чтобы они были воспроизводимы, корректны и максимально информативны. Первая редакция рекомендаций MISEV вышла в 2014 году [1], вторая – в 2018 [2], а в 2022 ожидается третья. Эти документы подчеркивают необходимость визуализации внеклеточных везикул на уровне отдельных частиц с использованием методов микроскопии высокого разрешения. Визуализация позволяет не только измерить размеры везикул, но и проверить их целостность, оценить чистоту, проверить степень их агрегации, и решить другие задачи. Предпочтительным методом визуализации является просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), но также можно использовать сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) или атомно-силовую микроскопию (АСМ). Эти методы позволяют получать изображения с пространственным разрешением на уровне ~ 1 нм, и его вполне достаточно для визуализации везикул - частиц с размером порядка 10-100 нм, или в некоторых случаях порядка ~ 1 мкм.

Несмотря на длительную историю развития, методы визуализации нанообъектов далеки от автоматизации. Они остаются дорогостоящими, требуют специфической инфраструктуры и высокого профессионализма операторов.

Применительно к ВВ, это означает, что необходимо дальнейшее развитие методик визуализации, использующих ПЭМ и АСМ, которые позволят сделать идентификацию ВВ проще, быстрее и информативнее.

Научная новизна

1. Сформирован оригинальный размеченный (аннотированный) набор ПЭМ-изображений внеклеточных везикул (188 изображений, 1558 индивидуальных частиц) для обучения нейросетей. В него включены изображения образцов ВВ различного происхождения – выделенных из асцитов, плазмы крови, кондиционированной среды культивирования клеток A549, COLO704, EFO21, SKOV3, а также смыва из полости матки.
2. Разработана программа (bioeng.ru/scanev) для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам. По сравнению с ближайшим аналогом, программой FRU-Net, она демонстрирует большую скорость обработки и большее удобство использования за счет веб-интерфейса.
3. Разработанные методики визуализации ВВ помогли обнаружить новый экзосомальный маркер – стоматин (белок ассоциированный с липидными рафтами).
4. Предложена методика исследования внеклеточных везикул методом АСМ, которая позволила радикально сократить время приготовления образца и уменьшить количество адсорбированных примесей. Была впервые показана самосогласованность результатов, получаемых при измерении ВВ методом АСМ.
5. Разработана методика корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ, она впервые применена к образцам ВВ. Впервые показано, что характеристическая морфология ВВ, наблюдаемая на ПЭМ-изображениях, отличается от рельефа их поверхности.

Степень разработанности темы исследования

Исследование выполнялось в рамках рекомендаций MISEV 2018 [2] и предлагает развитие некоторых методик, описанных в этих методических рекомендациях. Несмотря на значительный прогресс в этой области, в период

выполнения диссертационной работы множество важных методических аспектов исследования ВВ оставались неизвестными. Диссертационная работа позволила заполнить существующие пробелы.

Цель исследования

Разработать комплекс методик для характеристики внеклеточных везикул методами микроскопии высокого разрешения.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить и аннотировать массив ПЭМ-изображений ВВ различного происхождения для обучения нейросети.
2. Разработать программу для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам.
3. Использовать методику визуализации экзосом методом ПЭМ в рамках исследования стоматина как потенциального экзосомального маркера.
4. Реализовать методику визуализации ВВ методом АСМ, сопоставить результаты измерения ВВ различными методами – АСМ, ПЭМ и анализа траекторий наночастиц (АТН).
5. Разработать методику корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ для исследования индивидуальных частиц, осажденных на сетку для ПЭМ.

Объект и предмет исследования

Объект исследования – внеклеточные везикулы различного происхождения, т.е. выделенные из различных биологических образцов, включая кондиционированную среду культивирования первичных и перевиваемых клеток, сыворотки крови, клинические образцы асцитической жидкости, смыва из полости матки и других.

Предмет исследования – процедуры получения информации о различных внеклеточных везикулах с использованием микроскопии высокого разрешения.

Методология и методы исследования

Наиболее значимые методы, использованные в рамках данной работы, это методы микроскопии высокого разрешения – ПЭМ и АСМ. Оба они позволяют получать изображения образцов с высоким пространственным разрешением, а

также позволяют реализовать специализированные методики измерений для исследования локальных свойств образцов. Эти методы основаны на разных физических принципах. Метод ПЭМ основан на взаимодействии между пучком электронов и исследуемым образцом, который обычно окрашен солями тяжелых металлов. Метод АСМ основан на взаимодействии между кончиком сверхострой кремниевой иглы (кантилевера) с поверхностью образца.

Подложки, на которые наносят образцы для исследования методами ПЭМ и АСМ, также различны. Для ПЭМ критически важна прозрачность подложки для электронного пучка, поэтому используют тонкие пленки из полимера (формвар, пиолоформ и другие) или углерода, а также пленки из полимера, покрытого углеродом. Для АСМ критически важна низкая шероховатость поверхности, поэтому обычно в качестве подложки используют слюду, кремний или высокоориентированный пиролитический графит, а также поверхности этих материалов, подвергнутые разным модификациям. Одна из особенностей данной работы состоит в том, что методом АСМ проведено исследование образцов, осажденных на сетку для ПЭМ (аморфный углерод).

Для выделения образцов ВВ из различных сред использовали метод поэтапного центрифугирования. Этот метод является наиболее популярным и считается “золотым стандартом” в работе с ВВ. Мы использовали его для всех образцов, описанных в данной работе, с минимальными вариациями в технических деталях (объемах растворов, разведениях, временах центрифугирования и т.п.).

Для обработки изображений использовали специализированные программы (ImageJ/Fiji, FemtoScan Online, Nova), а также две оригинальные программы, написанные на языке Python. Разработка одной из них, ScanEV, составляет значительную часть данной работы. Вторая программа является вспомогательной и используется для оценки точности совмещения изображений, полученных с помощью методики корреляционной микроскопии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Все представленные в работе результаты являются оригинальными и новыми.

1. Набор размеченных (аннотированных) изображений внеклеточных везикул, на котором обучена нейросеть Mask R-CNN, является полностью оригинальным. Программа (веб-приложение) ScanEV для автоматизированного распознавания везикул на ПЭМ-изображении является новой, хотя и создана на базе существовавшей ранее нейросети Mask R-CNN. Эта программа используется исследователями, которые работают с ВВ, для автоматизации обработки ПЭМ-изображений.
2. Последовательная проверка методики визуализации экзосом с помощью АСМ на самосогласованность результатов была выполнена впервые. Эта методика может быть полезна для оценки размеров экзосом различного происхождения.
3. Методика корреляционной микроскопии, которая позволила визуализировать индивидуальные частицы методами АСМ и ПЭМ, является новой. К внеклеточным везикулам такая методика была применена впервые. Эта методика может быть использована для исследования различных по своей физико-химической природе объектов, она позволяет дополнить наши представления о размерах объектов с использованием двух методов и минимизировать артефакты, присущие каждому из них. Кроме того, эта методика поможет обеспечить метрологическую прослеживаемость измерений.
4. Разработанные методики визуализации применимы к различным внеклеточным везикулам вне зависимости от их происхождения. Это показано с использованием ВВ, выделенных из кондиционированной среды культивирования первичных и перевиваемых клеток, сыворотки крови, клинических образцов асцитической жидкости, смыва из полости матки и других.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана программа ScanEV для автоматизированной обработки изображений ВВ, полученных методом ПЭМ с контрастированием тяжелыми металлами. Эта программа представляет собой нейросеть,

- обученную на оригинальном наборе изображений; она позволяет автоматически находить на изображениях ВВ и измерять их размеры.
2. Разработана методика корреляционной микроскопии, которая позволяет получать изображения конкретных индивидуальных объектов, осажденных на сетку для ПЭМ, двумя независимыми методами (АСМ и ПЭМ) последовательно.
 3. Морфология, которую имеют внеклеточные везикулы, при исследовании методом ПЭМ с контрастированием тяжелыми металлами, лишь отчасти связана с деформацией ВВ при их адсорбции на подложку и определяется, прежде всего, затеканием внутрь них контрастирующего агента.
 4. Разработанные методики визуализации универсальны, т.е. применимы к ВВ вне зависимости от их происхождения. Разработанные методики помогли установить новый потенциальный экзосомальный маркер – стоматин.

Степень достоверности

Достоверность экспериментальных данных подтверждена многократными повторами экспериментов. Методические разработки были использованы для образцов различного происхождения – это позволило продемонстрировать воспроизводимость и универсальность результатов. Результаты экспериментов проверялись на отсутствие внутренних противоречий (т.е. самосогласованность) и на соответствие с другими экспериментальными методами.

Результаты исследований опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на конференциях, включая международные.

Личный вклад

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. В работах «*ScanEV – a neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in TEM images*» и «*Detection and characterization of extracellular vesicles in transmission electron microscopy by convolutional neural network*», опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю. В работах «*Application of AFM, TEM, and NTA for*

characterization of exosomes produced by placenta-derived mesenchymal cells», «Влияние нокдауна кавеолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легких» и «Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker» вклад автора заключается в планировании и проведении измерений методами ПЭМ и АСМ, и в написании текстов соответствующих разделов в статьях.

Публикации

Всего опубликовано 12 статей. По теме диссертации опубликовано всего 5 статей, из них 5 статей в научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ.

Апробация результатов

Основные результаты диссертации были представлены автором и обсуждены на 9 всероссийских и международных конференциях (статьи в сборниках – 1, тезисы – 9, доклады – 8).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 145 наименований. Работа содержит 40 рисунков и 4 таблицы (одна из них вынесена в приложение). Диссертационная работа состоит из введения, трех глав и заключения. Третья глава, содержащая результаты и обсуждение, состоит из четырех подразделов, посвященных конкретным задачам исследования.

2. Обзор литературы

2.1. Сведения об исследуемых объектах

2.1.1. Определение и классы везикул

Внеклеточные везикулы (ВВ) – это частицы с диаметром от 30 нм до 5 мкм, окруженные липидным бислоем, секретлируемые клетками во внеклеточное пространство [2]. К синтезу ВВ способны клетки как прокариот, так и эукариот.

В данной работе используется систематика [3] внеклеточных везикул, принимающая во внимание их размеры и механизм происхождения, согласно которой могут быть выделены следующие группы:

- Экзосомы – мельчайшие из внеклеточных везикул, размерами от 30 до 200 нм, образующиеся во внутриклеточных компартментах и секретлируемые во внешнюю среду при слиянии такого мультивезикулярного тела с клеточной мембраной.
- Почкующиеся микровезикулы – частицы, также известные как эктосомы, имеют размеры от 50 до 1000 нм и отделяются непосредственно от плазматической мембраны клетки [4].
- Апоптотические тельца – наиболее крупные объекты, размером до 5 мкм, представляющие собой мембранные пузырьки, формирующиеся в результате апоптоза при разрушении клеток. Внутри них могут содержаться как фрагменты ядер, так и некоторые клеточные органеллы [5].

Внеклеточные везикулы содержат специфический набор белков, в основном происходящих из плазматической мембраны, эндоцитарного пути и цитозоля, с ограниченными количествами белков из других внутриклеточных компартментов (ядро, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи) [2]. МикроРНК получают из экзосом, которые моча, в плазме крови, а также в других физиологических жидкостях [6]. Благодаря липидной оболочке снижается возможность их деградации молекул при транспортировке и хранении образцов. Таким образом РНК внутри экзосом находится в безопасности от внешних неблагоприятных факторов и защищена от агрессивных ферментов. При выделении экзосом, содержащих РНК, можно анализировать состояние клетки.

Это особенно полезно при диагностике заболеваний, так как молекулы РНК служат посредником между ДНК и белками. Выполняя данный анализ, можно не только поставить диагноз, но и оценить эффективность лечения, а также определить стадию заболевания, выяснить, прогрессирует ли оно или вошло в стадию ремиссии.

2.1.2. Физиологические функции и роль

Внеклеточные везикулы играют значительную роль в развитии некоторых заболеваний, в том числе онкологических, а также в регуляции физиологических процессов [7]. К функциям ВВ относят: осуществление межклеточной коммуникации, секреции белков и участие в иммунном ответе, в том числе и при развитии злокачественных опухолей. Так как они широко представлены в биологических секретах организма человека (кровь, моча, молоко, слюна), биомаркеры экзосом могут быть использованы для диагностики различных заболеваний и определения стадии заболевания. Один из возможных способов диагностики описан в статье [8]. В ней подчеркивается, что внеклеточные везикулы (ВВ) являются многообещающими агентами для жидкой биопсии — неинвазивного подхода к диагностике онкологии и оценки эффективности терапии, и данное исследование было направлено на разработку высокочувствительного и простого в использовании иммунохроматографического инструмента на основе магнитных наночастиц для количественного определения ВВ в образцах. Принцип работы продемонстрирован на обнаружении ВВ, выделенных из супернатантов клеточных культур и различных жидкостей организма, с использованием характерных биомаркеров CD9 и CD81 и опухолеассоциированного маркера — молекул адгезии эпителиальных клеток. Предел обнаружения всего $3,7 \times 10^5$ ВВ/мкл — на один-два порядка лучше, чем у наиболее чувствительных традиционных систем латерального потока и коммерческих наборов ELISA.

Одна линия клеток может производить экзосомы разных типов/классов [9], [10]. В организме человека ВВ обнаружены в плазме крови [11], слюне [12], [13], желчи [14], [15], моче [16] и других физиологических жидкостях. В

экспериментах часто работают с внеклеточными везикулами, выделенными из кондиционированной среды культивирования клеток [17]–[19].

2.1.3. Способы выделения везикул

На текущий момент, в исследованиях используются разнообразные протоколы выделения внеклеточных везикул. С их помощью проводят разделение как по биофизическим свойствам частиц, таким как размер, плотность и жесткость липидной мембраны, так и по химическому составу. Исходя из того, что везикулы, принадлежащие к разным субпопуляциям, имеют значительные различия, а также находятся в средах, существенно отличающихся по химическим параметрам и фракциям биомолекул, следует необходимость в оптимизации методов изоляции для каждого конкретного типа экзосом.

Выделение экзосом из физиологических жидкостей человека происходит с помощью поэтапного дифференциального ультрацентрифугирования. Этот метод получил распространение за счёт доступности ультрацентрифуг, а также возможности осаждать экзосомы как из больших объемов, так и из малых. Для выделения экзосом из сред культивирования клеток дифференциального ультрацентрифугирования без предварительных этапов зачастую бывает достаточно. Процедура основана на разделении образца при последовательном увеличении центробежной силы. При малых (300-10000g) оборотах центрифуги в осадок выпадают целые клетки и клеточные останки, далее выделяют микровезикулы (10000-20000g) и экзосомы (~100000g) [20]. Для того, чтобы уменьшить количество белков, которые могут осаждаться вместе с ВВ, иногда используют один или несколько циклов ресуспендирования осадка и повторного осаждения. Кроме ультрацентрифугирования, иногда используют осаждение ВВ коммерчески доступными полимерами – эти процедуры сравнительно быстрые и не требуют использования ультрацентрифуги [21].

Для того чтобы избежать повреждений экзосом, рекомендуется не прикладывать к ним чрезмерную силу во время центрифугирования. Описано, что в результате ультрацентрифугирования при силе в 120000g длительностью 70 минут, экзосомы частично разрушались [22].

Дифференциальное ультрацентрифугирование является удобным способом выделения, но не всегда самым эффективным. Существуют альтернативные методы изолирования экзосом, которые можно применять отдельно или в качестве дополнения к центрифугированию.

Ультрафильтрация – один из таких подходов. Процедуры ультрафильтрации позволяют значительно экономить время выделения, в сравнении с центрифугированием, для того чтобы сконцентрировать 150 мл образца понадобится около 20 минут, в то время как процесс дифференциального ультрацентрифугирования занимает более 90 минут [3]. Преимуществами ультрафильтрации также являются низкая стоимость и возможность выделять частицы из разных объемов.

Еще одним часто используемым методом выделения экзосом служит разделение в градиенте плотности, которым часто дополняют ультрацентрифугирование. Этот способ повышает чистоту получаемых экзосом, поскольку после центрифугирования во фракции всё еще содержатся биомолекулы, которые могут впоследствии оказать негативное влияние на получаемые результаты. Однако с помощью градиента плотности не всегда получается очистить образец полностью, так как некоторые белки, липопротеины высокой и низкой плотности и вирусы, имеют такую же плотность как экзосомы.

В работе [23] проведено сравнение четырех протоколов выделения внеклеточных везикул. Оптимальным оказался тот, в котором использовалось ультрацентрифугирование вместе с разделением в градиенте йодоксанола, применяя этот способ выделения, удалось избежать белковой и РНК контаминации образца, не затронув состав исследуемых экзосом.

В последние годы распространение получают протоколы изоляции с помощью коммерческих наборов преципитации, таких как ExoQuick™ и TEI. Совершенствуются методы иммунопреципитации экзосом, в качестве одной из перспективных технологий было предложено осаждать частицы с помощью иммуномеченых частиц [24].

2.1.4. Состав внеклеточных везикул

В состав внеклеточных везикул входят белки, липиды, молекулы РНК и ДНК (Рисунок 1). Было показано, что от происхождения ВВ, а также от физиологического состояния материнской клетки (здоровая она или больна), сильно зависит их состав, наличие или отсутствие тех или иных липидов, белков, микроРНК, матричных РНК [12]. Важным маркером экзосом являются трансмембранные белки, к ним относят CD63, CD81 и (иногда) CD9 из семейства тетраспанинов. Кроме того, экзосомы, как и клетки, несут на своей мембране белки главного комплекса гистосовместимости (МНС). Данные белки отвечают за распознавание "своих" и "чужих" клеток и тканей, а также участвуют в связывании антигенов. Также на поверхности мембраны находятся белки стресса (HSP60, HSP70 и др.) или, как часто их называют, белки теплового шока. Необходимо отметить, что в экзосомах содержатся аннексины, регулирующие процессы слияния ее собственной мембраны с мембраной клетки; рецепторы, помогающие экзосоме присоединиться к клетке-мишени; молекулы адгезии; ГТФазы Rab, которые позиционируют ВВ на мембране; белки класса ESCRT (эндосомный комплекс сортировки, который предназначен для внутриклеточной транспортировки РНК и белков).

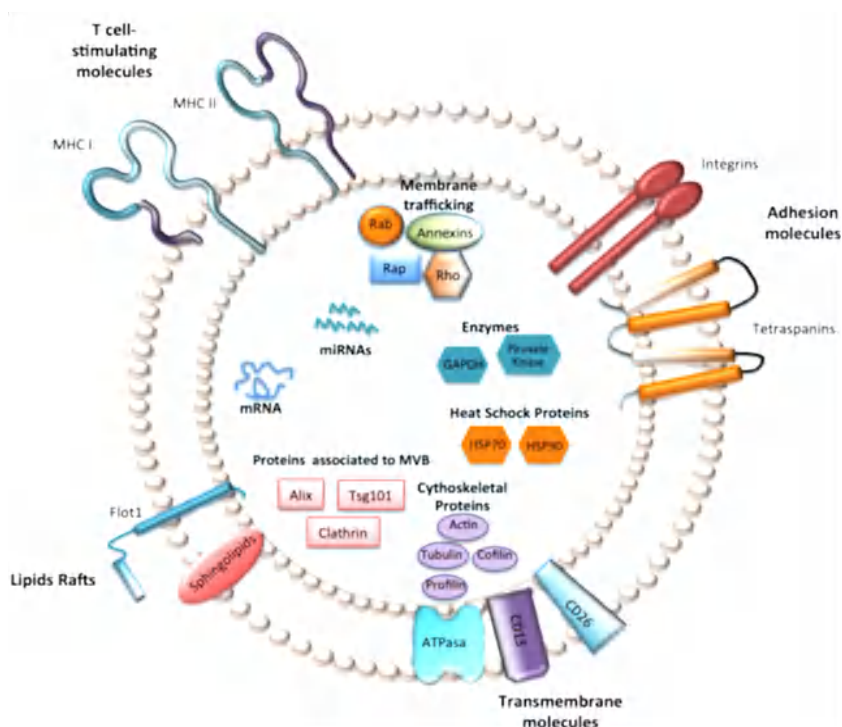


Рисунок 1. Состав внеклеточных везикул.

Вплоть до сегодняшнего момента отбор биомолекул, входящих в состав внеклеточных везикул (карго), а также молекулярные механизмы биогенеза ВВ, в целом, требуют дальнейшего изучения. Процесс отбора биомолекул для дальнейшего включения в состав внеклеточных везикул и экзосом, в частности, неразрывно связан с процессом образования интралюминальных везикул (ИЛВ) – внутриклеточных предшественников ВВ, которые возникают в результате инвагинации мембран эндосом и приводят к формированию мультивезикулярных эндосом. Было показано несколько путей образования ИЛВ. Наиболее изученным является механизм, реализуемый с помощью комплексов, включающих в себя более 20 белков, относящихся к четырем классам ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) – ESCRT-0, -I, -II и -III.

Схематично этот процесс можно описать следующим образом: гетеродимер ESCRT-0 узнает убиквитинированные белки и привлекает их к мембране, тем самым формируя сортировочные микродомены (sorting microdomains) и отвечая за отбор молекулярного состава будущей внеклеточной везикулы. Кроме того, он рекрутирует комплексы ESCRT-I и -II, которые также могут связывать карго (например, ESCRT-II привлекает различные рибонуклеиновые кислоты (РНК), но преимущественно индуцируют инвагинацию участка мембраны с выбранным «грузом»). Помимо этого, они привлекают каркасный белок Alix, который, в свою очередь, рекрутирует комплекс ESCRT-III, в состав которого входят белки, отвечающие за финальные этапы формирования ИЛВ – отделение сформировавшегося пузырька и диссоциацию комплекса от мембраны [25]. Маркерами данного пути биогенеза ИЛВ (и, соответственно, ВВ) считаются компоненты комплекса ESCRT, прежде всего белок TSG101 (tumor susceptibility gene 101), субъединица комплекса ESCRT. Другой механизм, не связанный, по видимому, с убиквитинированием молекул карго, реализуется с помощью трансмембранных белков синдекана и синтенина. Эти белки способны привлекать различные лиганды (хемокины, факторы роста, молекулы адгезии, интегрины и др.). Карго-зависимая олигомеризация синдекана и его связывание с молекулами синтенина приводят, в частности, к рекрутированию тетраспанина CD63 и белка Alix и, в конечном счете, к формированию ИЛВ. Соответственно,

каркасный белок Alix используется в качестве маркера экзосом, биогенез которых проходит с участием обоих названных механизмов. Ряд данных указывает на существование третьего, так называемого рафт-зависимого механизма, при котором основную роль в формировании ИЛВ и селекции молекул карго играют компоненты мембранных липидных микродоменов, или липидных рафтов [26].

Этот тип сортировки карго и формирования ИЛВ изучен менее подробно и связан с изменением липидного состава эндосомальной мембраны, когда липиды кластеризуются в специфические субдомены (рафты), которые, с одной стороны, служат сборочными платформами для белковых комплексов и рекрутинга белков, с другой – вызывают инвагинацию и отпочковывание мембран с помощью процесса, инициируемого церамидом [19], [27].

Механизм сортировки экзосомального содержимого в этом случае [28] остается малоизученным. Предполагается, что в нем могут быть задействованы тетраспанины [29] и флотиллины [28]. Описываемый путь секреции экзосом зависит от нейтральной сфингомиелазы 2-го типа (фермента, катализирующего формирование церамида) [30] и не зависит от подавления продукции компонентов комплексов ESCRT, таких как HRS, Alix или TSG101 [19].

Липидные рафты (ЛР) – это особые участки (микродомены) плазматической мембраны, обогащенные холестерином и гликофинголипидами [31], [32] (Рисунок 2). Выделяют два вида липидных рафтов: кавеоларные и планарные. Планарные липидные рафты не имеют отличительных морфологических особенностей и лежат в плоскости плазматической мембраны (не образуют выпячиваний) [33], [34]. Колбообразные выпячивания, кавеоларные рафты, напротив, формируются в плазматической мембране. В них содержится белок кавеолин, входящий в состав особых углублений мембраны – кавеол. Большинство наблюдаемых липидных рафтов относят к этому типу [35]. Некоторые исследователи в качестве отдельного подтипа липидных рафтов рассматривают тетраспанин-обогащенные микродомены.

Белковый состав ЛР позволяет им играть важную роль в разнообразных клеточных процессах, таких как: эндоцитоз, передача и регуляция клеточных сигналов, выпячивание мембран, клеточная адгезия и др. [36]. Учитывая сходство

процессов с участием липидных рафтов на плазматической мембране (сборка сигнальных комплексов, рафт-зависимый эндоцитоз) и мембранах эндосом (формирование ИЛВ), можно предположить, что белки липидных рафтов задействованы в процессах биогенеза экзосом и селекции карго. Флотиллины (Flot-1, -2) неоднократно показаны в составе экзосом [37]. Есть данные, указывающие и на их участие в продукции экзосом и селекции экзосомального карго [28], [38]. Предполагается, что флотиллины наряду с церамидом можно считать маркерами рафт-зависимого пути биогенеза экзосом [26].

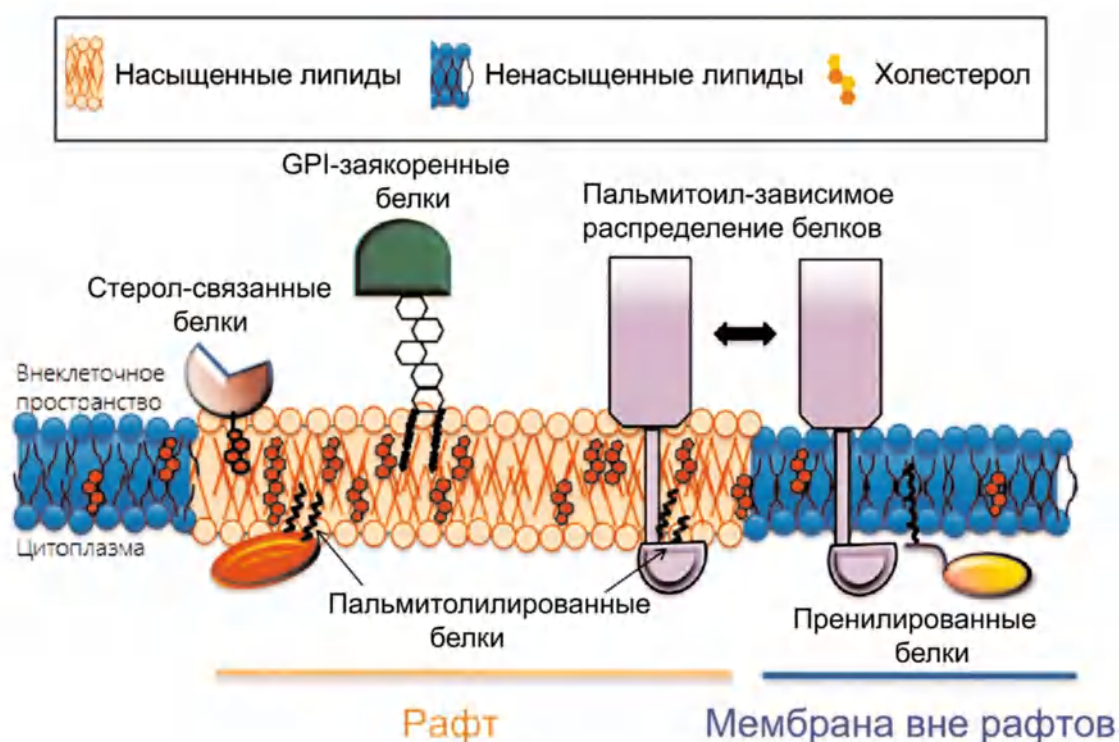


Рисунок 2. Строение липидных рафтов (адаптировано из Levental et al.) [31].

Белки ЛР кавеолин и флотиллин обладают функцией рекрутировать сигнальные молекулы к микродоменам ЛР. Таким образом и реализуется одно из их главных функциональных свойств – осуществлять передачу сигналов, опосредованных нейромедиаторами. Липидные рафты отвечают за пространственную ориентацию сигнальных молекул. В результате, выстраиваются кинетически выгодным взаимодействия, которые чрезвычайно необходимы в задачах передачи сигналов, и таким образом может осуществляться затухание сигнала, за счет подавления ненужных взаимодействий [39].

Рекомендации ISEV подчеркивают необходимость визуализации внеклеточных везикул на уровне отдельных частиц с использованием методов микроскопии высокого разрешения. Визуализация позволяет не только измерить размеры везикул, но и проверить их целостность, оценить чистоту, проверить, не агрегировали ли они, и решить другие задачи. Предпочтительным методом визуализации является просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), но также можно использовать сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) или атомно-силовую микроскопию (АСМ). Эти методы позволяют получать изображения с пространственным разрешением на уровне ~ 1 нм, и его вполне достаточно для визуализации везикул – частиц с размером порядка 10-100 нм. Обсудим некоторые из этих методов более подробно.

2.2. Особенности исследования везикул методом АСМ

2.2.1. Методики визуализации методом АСМ

Метод атомно-силовой микроскопии основан на взаимодействии кончика иглы (кантилевера) с исследуемым образцом, в результате эксперимента формируется изображение рельефа поверхности.



Рисунок 3. Изображение атомно-силового микроскопа Solver-PRO (NT-MDT).

Атомно-силовая микроскопия – одна из разновидностей сканирующей зондовой микроскопии, позволяющая получать изображения рельефа образцов с разрешением в десятки ангстрем. Атомно-силовой микроскоп был впервые

сконструирован в 1986 году [40]. С тех пор метод нашел широкое применение в исследованиях наноматериалов и биологических объектов, а также во многих других научных областях.

Атомно-силовой микроскоп сканирует рельеф с помощью тонкого зонда с малым радиусом кривизны (до 1 нм в случае суперострых зондов), который построчно перемещается над поверхностью образца (Рисунок 3).

Зонд в атомно-силовой микроскопии называется кантилевером, он представляет собой микроскопическую балку (её ширина составляет приблизительно 10-50 мкм, а длина 50-500 мкм), закрепленную на прямоугольном чипе, стандартные размеры которого 2x3,5x0,4 мм, с помощью этого чипа кантилевер закрепляется в держателе микроскопа. Свободный конец балки заканчивается пирамидальной иглой, у которой может быть различный радиус кривизны, именно острие иглы взаимодействует с образцом во время сканирования. Одна из сторон этой балки имеет зеркальное металлическое напыление (обычно это алюминий или золото), для того чтобы лучше отражать лазер (Рисунок 4). Сама балка, как правило, изготовлена из монокристалла кремния или нитрида кремния (Si₃N₄).

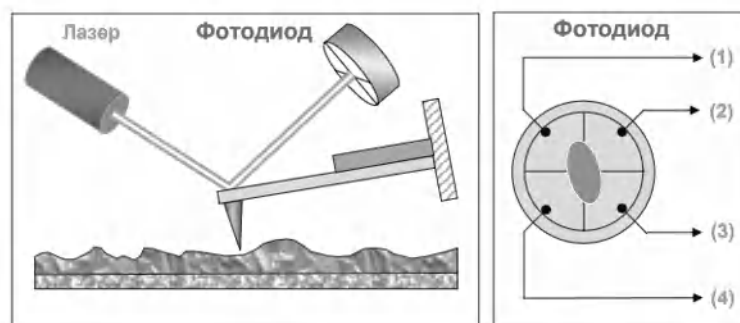


Рисунок 4. Схема оптической регистрации изгиба кантилевера АСМ.

При сканировании поверхности сила взаимодействия с образцом изгибает балку кантилевера. Если в ходе сканирования острие зонда попадает в углубление или на возвышенность, то сила взаимодействия изменяется, вследствие чего происходит изменение величины изгиба балки. Чтобы регистрировать эти отклонения зонда от равновесного положения, существует лазерно-оптическая система. Она состоит из лазера, направленного на зеркальную сторону

кантилевера, и фотодиода с четырьмя секциями, улавливающего отраженный луч лазера. В положении равновесия луч лазера попадает в центр фотодетектора, однако во время сканирования кантилевер отклоняется от равновесия и отраженный луч смещается из центра фотодиода. Наличие четырех секций на фотоприемнике позволяет однозначно определять направление и степень отклонения лазера от центра и регистрировать сдвиги кантилевера с высокой точностью.

Процесс сканирования представляет собой взаимное трёхмерное перемещение образца и кантилевера друг относительно друга. Для этой задачи в атомно-силовом микроскопе используется пьезосканер – трубчатый пьезоэлемент с нанесенными на его поверхность электродами. При подаче напряжения на электроды пьезотрубка сгибается или растягивается в одном из трёх направлений. Эта особенность сканера позволяет организовать систему обратной связи, которая изменяет расстояние по оси Z между острием кантилевера и образцом в ответ на сдвиг лазера, чтобы постоянно поддерживать равновесное положение. Существует несколько режимов работы атомно-силового микроскопа, но их можно разделить на две группы: статические и динамические.

В режиме постоянной силы, относящемуся к статическим, обратная связь работает, чтобы поддерживать стабильное отталкивание иглы зонда от образца, следовательно, сохраняется некоторое среднее расстояние между острием кантилевера и поверхностью. При этом регистрируется изменение силы взаимодействия с образцом, возникающие при отклонениях от среднего расстояния. Несмотря на то, что этот метод обеспечивает наилучшее разрешение и самую высокую скорость сканирования, он не применим для получения изображений биологических объектов, так как быстро разрушает их. На образец в этом режиме еще воздействует латеральная сила, направленная параллельно его поверхности, которая может смещать его по подложке, что является недостатком этого режима работы.

Динамический полуконтактный режим работы, известный также под названиями "semi-contact mode" или "tapping mode", основан на возбуждении колебаний балки на резонансной частоте кантилевера (примерно 100-300

кГц). Отраженный луч лазера колеблется с той же амплитудой, что и кантилевер. Обратная связь в этом режиме работает на поддержание постоянной амплитуды. Сканирование в этом режиме не подвержено воздействию латеральных сил, но имеет меньшее разрешение. Полуконтактный режим часто используется для работы с биологическими объектами как в жидкости, так и на воздухе [41].

Хотя этот метод упоминается в методических рекомендациях по исследованиям ВВ [2], количество работ, выполненных с его использованием сравнительно мало и нами был проведен анализ работ, в которых для исследования внеклеточных везикул использовался метод атомно-силовой микроскопии (Приложение А). В данном сравнении отражены источники везикул, способы выделения везикул, используемая для АСМ подложка, способ приготовления образца, режим сканирования, контрольные эксперименты.

Рассматривая современные работы, применяющие АСМ для характеристики везикул, стоит отметить, что везикулы из некоторых источников встречаются намного чаще. Слюна как среда для выделения ВВ популярна среди исследователей ввиду простоты отбора, содержания маркерных ВВ для злокачественных опухолей, локализованных, в том числе, вне ротовой полости, в дополнение к этому, слюна содержит немного белковых компонентов, следовательно, будущий образец проще от них очистить. Она является источником внеклеточных везикул в ряде работ [42]–[46]. В статье [45] ВВ специфически связывали с подложкой, модифицированной антителами CD63, что значительно повысило эффективность адсорбции.

Модификацию подложек антителами в экспериментах на АСМ применяют не очень часто [45], [47], [48], однако такое изменение подложки дает возможность проводить специфическую адсорбцию везикул, несущих определенные маркеры, и отмывать ненужные частицы. В работе [42] механические свойства везикул исследовали с помощью метода силовой спектроскопии, модифицированным CD63 кантилевером, что увеличивало его адгезию к частицам. Такие эксперименты кажутся перспективными и полезными с точки зрения оценки гетерогенности ВВ и, в целом, развития методик

исследования индивидуальных ВВ. В качестве наиболее распространенного типа подложки использовалась слюда, а наиболее часто используемым методом выделения ВВ является ультрацентрифугирование.

Проводя анализ подходов к приготовлению и исследованию образцов методом АСМ, можно констатировать, что наиболее часто встречаются исследования с высушенными образцами ВВ несмотря на то, что обезвоживание образца скорее всего вызывает нарушение его нативной структуры. В литературе уже описан опыт по сравнению данных о размерах одних и тех же внеклеточных везикул, полученных при сканировании в жидкости и на воздухе, благодаря которому было обнаружено уменьшение размеров [48]. Авторы статьи [49] отмечают, что высоты и латеральные размеры частиц не изменились во время сканирования образцов в жидкости. Следовательно, ВВ после однократного обезвоживания не могут вернуться к первоначальным размерам.

2.2.2. Артефакты метода АСМ

Для метода АСМ характерны артефакты, влияющих на визуализацию внеклеточных везикул. В результате могут появляться ошибки при сканировании образцов. Можно выделить несколько типов артефактов, связанных с образцом, типом подложки, зондом и сканером.

- Изменение формы частицы, вызванное высушиванием при адсорбции образца на подложку;
- Уширение объектов, связанное с конечным размером кантилевера;
- Нелинейность сканера в горизонтальной плоскости – нарушается обратная связь в пьезоэлектрических кристаллах, которые расширяются или сжимаются в зависимости от полярности приложенного к ним напряжения;
- Крип (от англ. creep) пьезотрубки, который вызывается замедленной реакцией пьезокерамики на изменение подаваемого на нее напряжения.

Так вследствие крипа на изображении возникают изменения кривизны объектов. Крип по оси Z приводит к возникновению на изображении, так называемой «террасной» морфологии, вследствие чего нарушается регистрация истинной высоты рельефа поверхности образца.

Ошибки обратной связи по оси Z снижают разрешение получаемых изображений, а недостаточная обратная связь по оси сканирования приводит к возникновению на изображении ошибок учета высоты, после прохождения кантилевером частиц. Кроме обратной связи необходимо учитывать скорость сканирования и амплитуду колебаний.

Также важно отметить, что на наблюдаемую топографию серьезное значение может оказывать термический дрейф кантилевера. Ввиду маленькой массы и теплоемкости, кантилевер довольно легко может разогреться от случайного контакта с образцом или излишнего освещения, вследствие чего он изменяет свое положение и нарушается калибровка лазера. Так эффект термического дрейфа можно минимизировать при достижении термического равновесия в системе, либо при высоких скоростях сканирования [50].

При определении высоты и латеральных размеров большую роль играют настройки системы обратной связи (ОС) атомно-силового микроскопа. На это влияет коэффициент усиления обратной связи. Если он будет достаточно велик, то система может начать осциллировать, за счет генерации высокочастотного шума [50]. Это может происходить на всем исследуемом участке поверхности образца, или может быть локализованным в окрестностях деталей поверхности образцами с большими перепадами рельефа. В результате можно будет наблюдать автоколебания зонда кантилевера, они будут видны в виде артефактов изображения. С другой стороны, значительное уменьшение коэффициента усиления обратной связи может привести к тому, что игла зонда не сможет отследить изменения рельефа поверхности исследуемого образца [51]. Это проявляется в том, что изображение начинает терять свою детализацию, это проявляется в появлении расплывчатости на изображениях.

Сканирование методом атомно-силовой микроскопии, несмотря на все свои преимущества, не всегда позволяет получать безошибочные снимки микрорельефа. В изображениях, полученных методом АСМ данные артефакты, проявляются следующим образом:

- Снижение разрешения изображения;
- Неправильное отображение реальных перепадов рельефа образца;

- Увеличение размеров частиц в плоскости сканирования;
- Проявление на изображении повторяющихся паттернов;
- Смещение изображения;
- Появление «выбитых» строк.

Таким образом, если принимать во внимание особенности метода АСМ, можно получать изображения ВВ с высоким уровнем разрешения.

2.3. Особенности исследования везикул методом ПЭМ

2.3.1. Методики визуализации методом ПЭМ

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) позволяет проводить исследования тонких образцов (~1 нм) с помощью пучка электронов, которые проходят сквозь исследуемый объект (Рисунок 5).

Электроны проходят сквозь образец, а затем фокусируются на устройстве формирования изображения – сенсоре ПЗС-камеры. ПЭМ является наиболее популярным для визуализации ВВ. Он основан на том, что те области образца, которые интенсивно поглощают или рассеивают электроны, выглядят на изображении более темными. Работы [52] и [53] наиболее детально описывают существующие протоколы подготовки образцов ВВ для исследования методом ПЭМ, причем выделяют как минимум три варианта использования этого метода. Во-первых, это крио-ПЭМ, при которой образец замораживают и исследуют во льду [47], [54]. Во-вторых, везикулы можно полимеризовать внутри смолы, срезать с помощью ультрамикротомы и исследовать ультратонкий срез – по аналогии с тем, как исследуют срезы клеток и тканей [24]. Наконец, можно исследовать везикулы, осажденные на подложку – это наиболее популярный подход. Большинство исследований проводимых ранее методом ПЭМ с использованием негативного контрастирования описывают форму экзосом как “сдутые мячики” (deflated football-shaped, cup-shaped, disk shape). Как проиллюстрировано на рисунке 5Б и 5В данная форма характеризуется наличием контрастного центра на изображении исследуемой частицы.

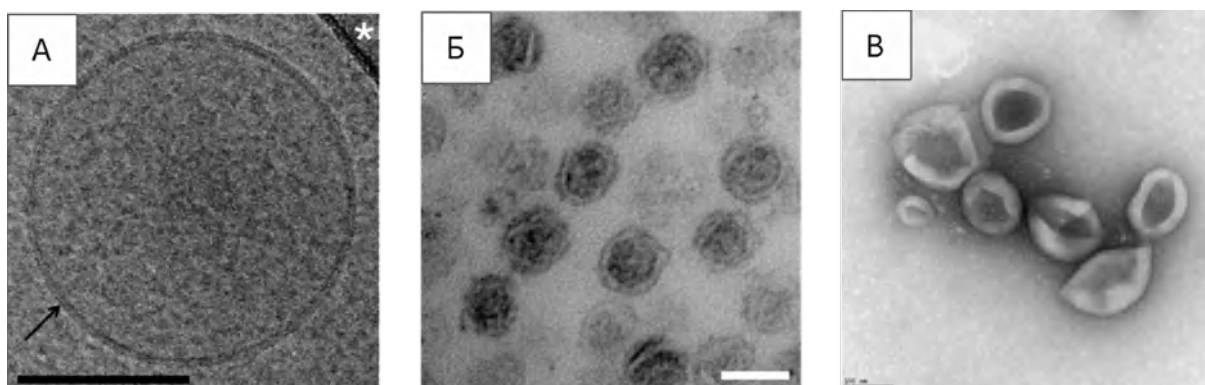


Рисунок 5. ПЭМ в исследованиях внеклеточных везикул. А – Крио-ЭМ, Б – ПЭМ с негативным контрастированием на срезах, В – ПЭМ с негативным контрастированием на целых частицах.

Для каждого из методов существуют свои преимущества и недостатки, их сопоставление представлено в таблице 1.

Таблица 1. Сравнение методов электронной микроскопии.

Методы	Преимущества	Недостатки
крио-ЭМ	Наблюдение в замороженном гидратированном состоянии без высушивания образцов	Высокая стоимость метода
ПЭМ с негативным контрастированием на срезах	Можно наблюдать внутреннюю структуру	Трудоемкая пробоподготовка, возможны искажения структуры при обезвоживании
ПЭМ с негативным контрастированием цельных частицах	Относительная доступность метода	Искажения структуры при адсорбции на подложку и высушивании

Любой из перечисленных выше вариантов ПЭМ может быть совмещен с иммуномечением коллоидным золотом. Это такой способ приготовления образцов, при котором с помощью иммунохимической реакции выявляют распределение определенного антигена в образце. Меткой является монодисперсное коллоидное золото с размером 5-15 нм, которое хорошо заметно на изображениях, полученных методом ПЭМ. При работе с ВВ в качестве целевого белка обычно используют один из маркеров – тетрапсинов (CD9, CD63, CD81, CD82) [9], [37]. Эффективность иммуномечения обычно оценивают по соотношению плотностей специфически связанных меток и тех меток, которые адсорбировались на участки сетки, свободные от везикул.

Несмотря на популярность, некоторые вопросы применения ПЭМ не решены. Например, большинство авторов обрабатывают и классифицируют изображения везикул вручную [10] или с помощью классических алгоритмов компьютерного зрения [47]. Более адекватным и современным представляется подход, использующий для обработки ПЭМ-изображений ВВ искусственный интеллект и, в частности, нейронные сети. Они автоматизируют и ускоряют обработку изображений, а также минимизируют “человеческий фактор”, т.е. ошибки, связанные с действиями оператора [55]. В данной работе планируется разработка программы, которая будет обрабатывать изображения ВВ, полученные методами ПЭМ и СЭМ – находить ВВ на изображениях, определять их границы, вычислять размер и охарактеризовать морфологию.

В заключении данного раздела обсудим возможности СЭМ в исследованиях ВВ. Как и другие обсуждаемые виды микроскопии, он требует иммобилизации ВВ на подложку, причем дополнительно он требует нанесения на поверхность образца тонкого слоя металла с толщиной ~10 нм. Изображение формируется в отраженных и/или вторичных электронах. СЭМ обеспечивает более низкое разрешение чем ПЭМ (обычно ~10 нм), тем не менее, оно достаточно для работы с ВВ, если они расположены на подложке на достаточно большом расстоянии друг от друга, чтобы края каждой везикулы были видны. Большинство авторов используют методики пробоподготовки, которые включают фиксацию везикул

альдегидами и обезвоживание в спиртах восходящей концентрации; подложкой обычно является стекло или кремний.

Итак, ПЭМ – это основной метод визуализации ВВ, который практически необходим как инструмент контроля чистоты препаратов ВВ, измерения размеров ВВ и их классификации. Кроме ПЭМ, для визуализации ВВ иногда используются методы КР-спектроскопии, АСМ и СЭМ, но они менее популярны, и для них отсутствуют общепризнанные процедуры подготовки образцов. Развитие методик визуализации ВВ необходимо для прогресса в исследовании их многообразия и физиологической роли. Примеры ПЭМ-изображений ВВ приведены на рисунке 6 [56].

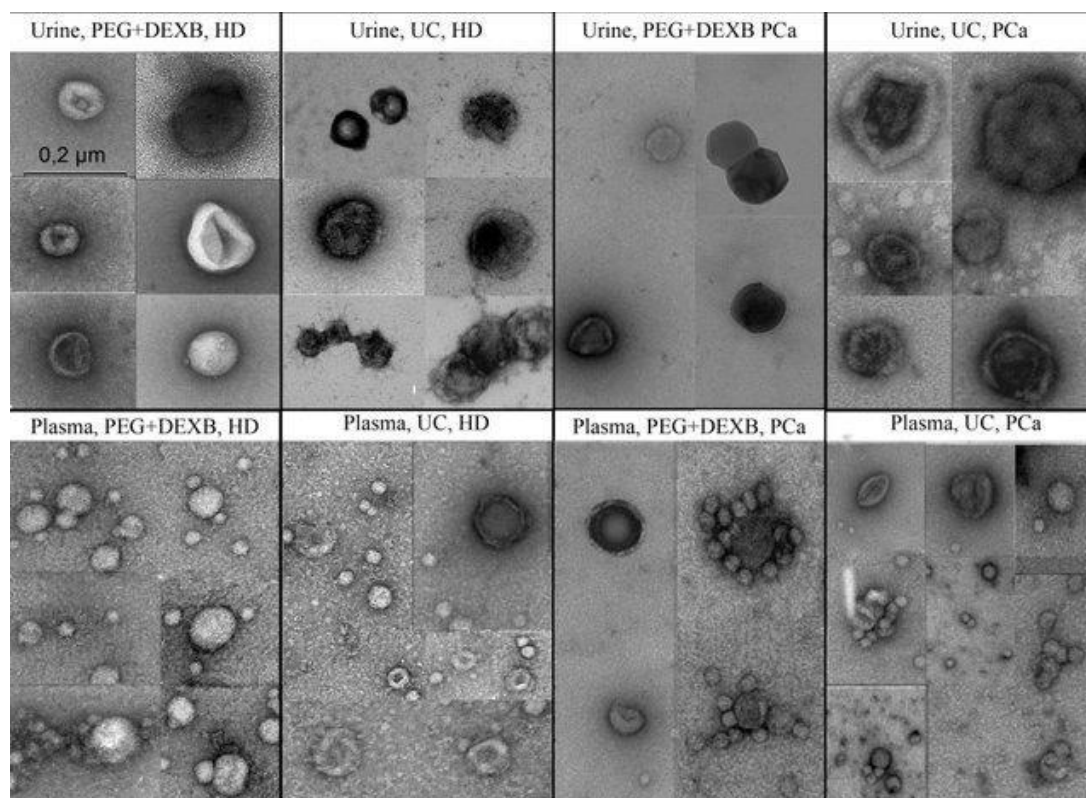


Рисунок 6. Пример изображений везикул с характерной формой различного происхождения.

2.3.2. Некоторые подходы к обработке ПЭМ-изображений

Метод ПЭМ позволяет получать данные о размерах и морфологии ВВ. Несмотря на популярность, некоторые технические вопросы обработки ПЭМ-изображений на уровне анализа отдельных наночастиц не решены.

Наиболее востребованным программным инструментом для определения размеров наночастиц является программа ImageJ [57] или ее современная версия Fiji [58]. Из-за различий в морфологии внеклеточных везикул (Рисунок 6 из [56]) при анализе больших массивов данных, взятых с ограниченных площадей поверхности образца, не получается полностью автоматизировать процесс получения информации о размерах, площадях и морфологии везикул [59]. Но тем не менее, большинство авторов обрабатывают и классифицируют изображения везикул вручную [10].

Для решения этой задачи были предложены специализированные программные продукты, с помощью классических алгоритмов компьютерного зрения [47], [60]. Речь идет о программе TEM Exosome Analyzer – она позволяет в полуавтоматизированном режиме обнаруживать на изображениях частицы и измерять их размеры. Обычно пользователь должен указать точку, вблизи которой программа ищет частицу. Недостаток этой программы в том, что она чрезвычайно медленная – по скорости обработки она практически не отличается от непосредственного измерения всех частиц вручную.

Более адекватным и современным представляется подход, использующий для обработки ПЭМ-изображений искусственный интеллект и, в частности, нейронные сети. Они автоматизируют и ускоряют обработку изображений, а также минимизируют “человеческий фактор”, т.е. ошибки, связанные с действиями оператора [61]. Прежде чем описывать специализированные нейросети, используемые для обработки ПЭМ-изображений, дадим описание технологий искусственного интеллекта, в целом, и нейросетей, в частности.

Нейросети – один из видов машинного обучения, который в свою очередь является разделом области искусственного интеллекта. Под глубоким обучением понимают архитектуру нейросетей, подходы к их построению и обучению. Именно нейросети с глубоким обучением являются предметом нашего интереса.

Существует много способов и видов обучения искусственного интеллекта (ИИ), более того, их количество постоянно растет с развитием технологий в этой области знаний. В одном из фундаментальных трудов, The Master Algorithm, по

тематике ИИ выделяют следующие основные методы машинного обучения (алгоритмы ИИ) [62]:

Первый тип алгоритмов – это компьютерные нейронные сети. Их название напрямую связано с характером функционирования мозга, тем, как последовательность нейронов соединяется между собой синапсами, передавая информацию от одного к другому. Для компьютерных нейросетей характерна многослойная структура. Данные и их зависимости передаются от одного слоя к другому. Таким образом результаты обработки данных достигают конечного, выходного слоя. Результатом работы нейронной сети становится то, что она выдает предположение о том, например, к какому классу принадлежит объект, какой сценарий наиболее вероятен т.п. Нейросетевые подходы широко распространены в науке, медицине, промышленности, народном хозяйстве. Так, например, в науке и здравоохранении их часто применяют в анализе больших объёмов данных, распознавании изображений, анализе диагностических снимков для задачи подбора лекарственной терапии или уточнения диагнозов – основы успешного лечения заболеваний.

Второй тип – это алгоритм "случайного леса" (random forest). Он использует множество решающих деревьев (логических ветвей), созданных случайным образом. Для каждого решающего дерева свойственен свой набор атрибутов, в результате позволяет каждому из них дать рекомендации, какой выбрать класс, тем самым решив задачу классификации. Алгоритм "случайный лес" – используется для обнаружения связей внутри набора данных. Алгоритм универсален и быстро обучаем, так, например, его можно использовать при прогнозировании исходов различных событий на основе исторических данных.

Третий тип – алгоритм "дерево решений". Он позволяет проводить классификацию объектов на основе их признаков или атрибутов. В атрибутах указаны значения целевой функции, а в остальных узлах – признаки, по которым различаются случаи. Для классификации нового входного данного, надо спуститься по дереву и выдать соответствующее значение.

Четвертый, также очень распространенный тип алгоритма – кластеризация. Он позволяет группировать элементы данных с похожими характеристиками.

Данный тип алгоритма основывается на статистических функциях. Кластеризацию можно использовать для решения задач классификации, и особенно этот подход эффективен в случаях и в задачах обнаружения аномалий в больших данных.

Пятый тип алгоритма, который стоит упомянуть – это поиск ассоциативных правил. Он позволяет находить отношения между переменными. Данный подход основывается на правилах, однако при этом генерирует также и новые правила по мере анализа дополнительных данных [62]. Таким образом, из достаточно большого набора данных можно имитировать выделение признаков с помощью данного алгоритма. Поиск ассоциативных правил позволяет выяснить, при каких условиях принимается решение, таким образом можно составить программу рекомендаций и предвидеть дальнейшие шаги пользователя.

Итак, упомянутые нейросети, о которых подробнее пойдет речь ниже, являются одним из типов алгоритмов ИИ. В отличие от других алгоритмов ИИ, нейросети не программируются на выполнение конкретных задач, а настраиваются на изучение информации. Существуют различные подходы к их классификации, например, по способам их обучения и их архитектуре. Одна из классификаций по способам обучения включает пять вариантов [63]:

Первый – это обучение с учителем (Supervised learning). Классическая модель обучения, в которой используется набор размеченных данных, показывающий алгоритму, что и как должно работать. Необходимо передавать на вход алгоритма обучающую выборку (данные в текстовом или графическом виде) в качестве входных параметров. При вариации данных параметров можно добиться определенных требуемых значений и результатов. При валидации и тестировании точности обученной модели есть возможность спрогнозировать результат на данных, которые не использовались в обучении. Обучение с учителем чаще всего применяется в задачах классификации и прогнозирования.

Второй вариант классификации по способу обучения – обучение без учителя. Это вариант машинного обучения, где алгоритмы учатся решать задачу без участия экспериментатора, самостоятельно. Другими словами, при обучении "без учителя" алгоритмы не взаимодействуют со средой, в которой они обучаются.

Для них нет необходимости собирать базу данных и проводить ее разметку, но необходимо давать обратную связь – насколько качественное решение принял алгоритм. Его можно использовать для группирования кластеризации данных, а также выявлять скрытые в них закономерности. В качестве примера можно привести поиск связей между элементами данных, с дальнейшей классификацией объектов.

Третий вариант – это совмещение обучения с учителем и без него, который называется обучением с частичным привлечением учителя (Semi-Supervised learning). Реализуемый в этом способе подход дает возможность работать с частично размеченными данными. Таким образом, сделав разметку лишь небольшой части данных, мы можем дать информацию алгоритму о том, как и каким образом кластеризовать оставшиеся данные. Это существенно экономит ресурсы и время на сбор и разметку данных (датасета). Однако совместно с небольшим количеством размеченных данных, данный способ обучения может дать существенный прирост точности обучаемой модели. Некоторые авторы рассматривают этот вариант как подкласс алгоритмов обучения с учителем [62].

К четвертому способу обучения относят обучение с подкреплением (Reinforcement learning). Алгоритму обучения с подкреплением позволяют взаимодействовать с окружением. В этом случае, алгоритм машинного обучения получает подкрепление при появлении положительного результата. Однако при появлении нежелательных результатов алгоритм получает за допущенные ошибки "наказание". Алгоритм обучается самостоятельно при автоматизированном подсчете "наказаний" и "вознаграждений". Некоторые авторы рассматривают этот вариант как подкласс алгоритмов обучения с учителем [62].

Глубинное обучение (Deep learning) выделяются в качестве пятого способа обучения. Оно может совмещает в себе алгоритмы обучения как с учителем, так и с подкреплением. Глубинное обучение позволяет детально моделировать нелинейные отношения между большими массивами больших данных. Архитектуры моделей глубинного обучения генерируют модели, в которых объект выражается в виде многоуровневой композиции.

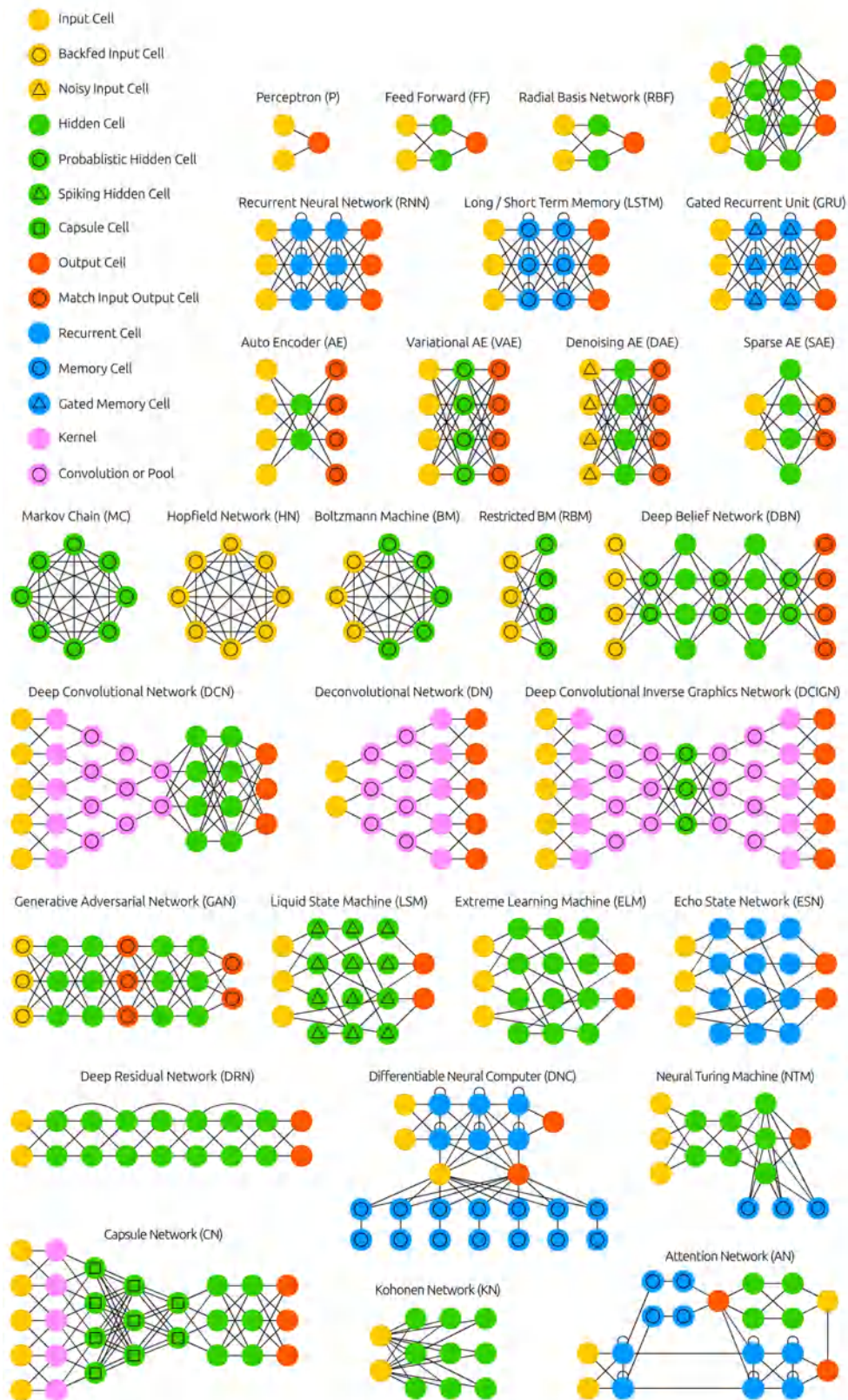


Рисунок 7. Архитектуры нейронных сетей (адаптировано из Jaderberg et al [64]).

За последние десятилетия были разработаны десятки архитектур нейросетей. Наиболее полная классификация приведена в статье Jaderberg Max, et al [64]. Примеры архитектур представлены в виде графов. Приведем описание нескольких на наш взгляд самых интересных архитектур нейронных сетей.

Первая и самая простая архитектура характерна для сетей прямого распространения (Feed forward neural networks, FF или FFNN), их также называют перцептроны (perceptrons, P), которые передают информацию от входа к выходу сети. Нужно отметить, что у нейронных сетей есть слои, каждый из которых состоит из множества входных, скрытых и выходных нейронов. При этом нейроны одного слоя между собой не связаны, при этом каждый нейрон этого слоя связан с каждым нейроном соседнего слоя. В исследовательских и практических задачах использование сетей прямого распространения ограничено, поэтому их чаще всего используют совместно с другими сетями. Так, если сеть обладает достаточным количеством скрытых нейронов, теоретически она всегда сможет установить связь между входными и выходными данными. Сети радиально-базисных функций (radial basis function, RBF) – это сети прямого распространения с радиально-базисной функцией в качестве функции активации.

Нейронная сеть Хопфилда – полносвязная сеть. Под полносвязностью понимают, что каждый нейрон данной сети соединен с каждым. Это значит, что для этого вида сети характерно то, что одни и те же нейроны являются входными перед обучения, скрытыми во время обучения и выходным по итогу обучения. Все "запомненные" вектора являлись бы для нее собственными – условие формирования матрицы. Важно отметить, что каждый нейрон имеет порог активации, так если сумма входных данных превысит этот порог, нейрон может переходить в одно из двух состояний (обычно -1 или 1, иногда 0 или 1). Узловые элементы сети могут обновляться параллельно, но на практике это происходит последовательно. на одном из этапов генерируется случайная последовательность, которая определяет порядок, в котором нейроны будут обновлять свое состояние.

Цепи Маркова (Markov Chains, MC или discrete time Markov Chain, DTMC) – это своего рода предшественники сетей Больцмана (BM) и сетей Хопфилда (HN), для которых характерна последовательность случайных событий с конечным или

счётным числом исходов, при этом вероятности наступления событий будет зависеть от состояний, которое было при предыдущем событии. В цепях Маркова пользователь задает вероятности перехода из текущего состояния в соседние. Важно отметить, что цепь Маркова нельзя назвать нейронной сетью, она близка к ним и формирует теоретическую основу для сетей Больцмана и сетей Хопфилда, и при этом часто не являются полносвязными.

Свёрточные нейронные сети (convolutional neural networks, CNN) и глубокие свёрточные нейронные сети (deep convolutional neural networks, DCNN) используются в основном для обработки графических изображений, для аудио и видео входных потоков. Данные сети обычно используют как "сканирующее устройство" не обрабатывающее все данные за один раз, а проходящее по отдельным фрагментам изображения. Например, мы разбиваем изображение на фрагменты и перемещаемся по ним. Рассмотрим изображение 200x200 пикселей, то возможно строить слой сети из 40 тыс. узлов. Но это будет очень ресурсоемкой задачей, вместо этого сеть считает квадрат размера 20x20 (обычно из левого верхнего угла), затем сдвинется на 1 пиксель и считает новый квадрат, и т.д. Эти входные данные затем передаются через сверточные слои, в которых не все узлы соединены между собой, вместо этого каждый узел соединен только со своими ближайшими соседями [62]. По мере работы сети слои начинают сжиматься с глубиной, причём обычно они уменьшаются на какое-либо значение, часто на практике используются степени кратные двум (Рисунок 8). Кроме сверточных слоев в нейронных сетях существуют и, так называемые, слои объединения (pooling layers). Объединение – это способ уменьшить размерность получаемых данных, например, из квадрата 2x2 выбирается и передается наиболее релевантный пиксель.

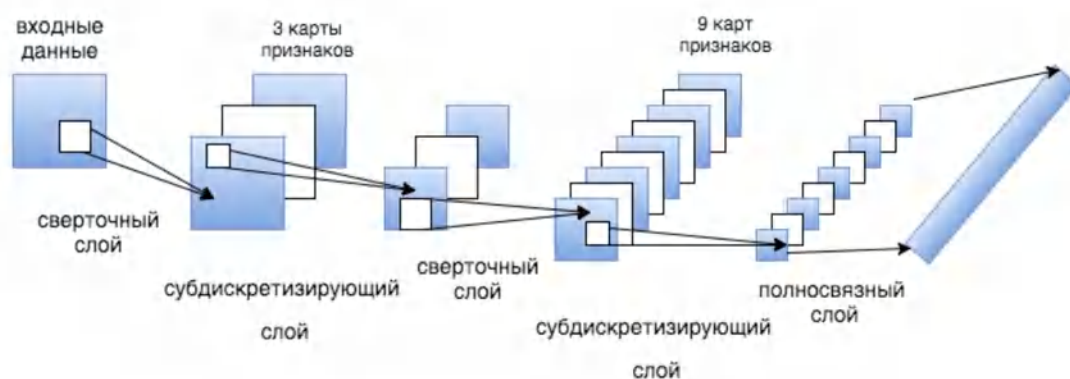


Рисунок 8. Архитектура сверточной нейронной сети.

Рекуррентные нейронные сети (Recurrent neural networks, RNN) ориентированы на анализ временной последовательности состояний локальных. Нейроны данных сетей получают информацию не только от предыдущего слоя, но и от самих себя в результате предыдущего прохода [62]. Следовательно, здесь важен порядок, в котором мы подаем информацию и обучаем сеть: мы получим разные результаты. Основная идея заключается в том, чтобы запоминать некоторые исторические данные, а затем, сохранять внутреннее состояние, которое можно затем применять для анализа текущих (актуальных) данных. Рекуррентные нейронные сети обладают одной особенностью – проблема исчезающего градиента: в зависимости от используемой функции активации информация со временем теряется. Данные сети применяются в анализе временных рядов, при анализе изменения цен на акции, при интерпретации показаний датчиков, машинный переводе, распознавании человеческой речи (перевод речи в текст), обнаружение аномалий на медицинских изображениях, классификации и аннотации текстов, в предсказательной аналитике.

Метод опорных векторов (Support vector machine, SVM) применяется в задачах классификации, в его основе лежит определяемая разделяющая гиперплоскость (линия, прямая, многомерные плоскости) служит для нахождения оптимальных решений в задачах классификации. Данный метод категоризирует линейно разделяемые данные прямой линией так, чтобы с каждой стороны были данные только одного класса, и чтобы расстояние от данных до линии было

максимальным. Таким образом, можно классифицировать данные размерности n , и, как следствие, чем выше размерность, тем больше классов можно классифицировать. Он нашел свое применение в распознавании образов на изображениях, создании спам-фильтров, разработке рекомендательных систем.

Нейронные сети, как и другие алгоритмы искусственного интеллекта, широко применяются для анализа изображений и, в частности, тех, которые получены методом ПЭМ. Например, нейронные сети можно использовать для обнаружения на изображениях наночастиц [65] и отдельных молекул [66], для классификации изображений при крио-электронной томографии [67], [68], выделения на изображениях мембран нейронов [69], [70], и для решения других задач.

Для обнаружения объектов на изображениях их необходимо отделить от фона и распределить по классам. В данном случае класс – это тип объектов, например, если речь идет о бытовой фотографии, то классами могут быть машины, люди, животные, растения и т.д. В специализированных научных задачах классами могут быть, например, клетки различных типов или отдельные субклеточные структуры, специфические частицы, которые видны на микроскопических изображениях и т.п. Сегментация изображения – это задача поиска (определения) групп пикселей, каждая из которых характеризует один смысловой объект. Выделяют два варианта сегментации – семантическая сегментация и сегментация экземпляров.

Семантическая сегментация обнаруживает все объекты, присутствующие на изображении, на уровне пикселей и группирует пиксели по их принадлежности к определенному классу. Разница между этими двумя вариантами проиллюстрирована на рисунке 9. Обычно сегментация экземпляров сложнее, чем семантическая сегментация.

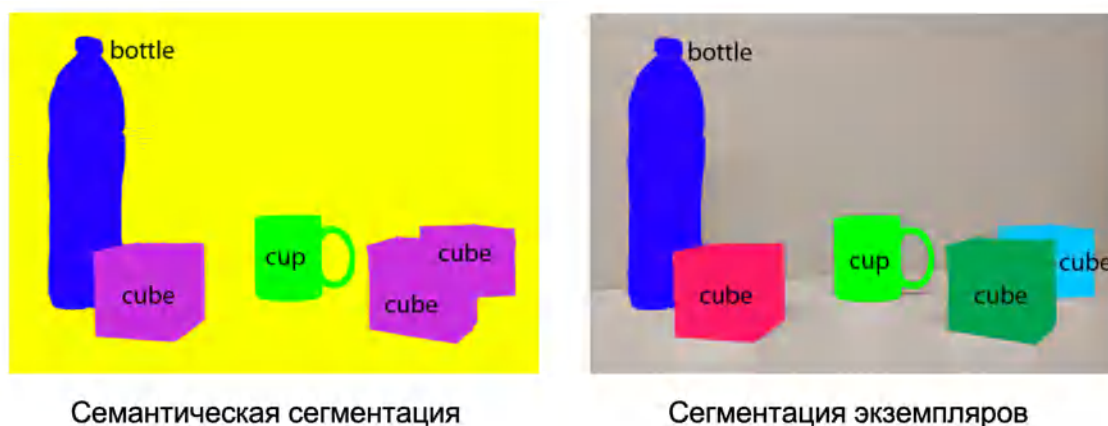


Рисунок 9. Иллюстрация различных типов сегментаций.

Рассмотрим, как обсуждаемые алгоритмы применяются для детекции ВВ. Была предложена специализированная программа FRU-Net на основе известной нейронной сети U-Net [71]–[73]. Эта программа позволяет отделять частицы от фона и измерять их размеры. Из двух описанных выше вариантов сегментации FRU-Net делает семантическую сегментацию (отделяет частицы от фона).

Для пользователей одна из ее особенностей состоит в том, что кроме частиц с типичной морфологией "сдутых мячиков", FRU-Net на изображениях яркие сферические частиц, не имеющих затемнений. По мнению некоторых специалистов, про них без иммуномечения нельзя утверждать, что они действительно являются ВВ [74], [75].

U-Net (основа программы FRU-Net) обладает стандартной архитектурой нейронных сетей, которые применяются для задач сегментации изображений. Они применимы в случае, когда нужно определить не только класс изображения целиком, но и сегментировать его области по классу, т. е. создать маску, которая будет разделять изображение на несколько классов или несколько объектов [71]. Сеть обучается методом стохастического градиентного спуска на основе входных изображений и соответствующих им карт сегментации.

На рисунке 10 приведена схема архитектуры сети U-Net [71]. Сеть содержит свёрточную (слева) и разверточную части (справа), поэтому архитектура похожа на букву U, что и отражено в названии.

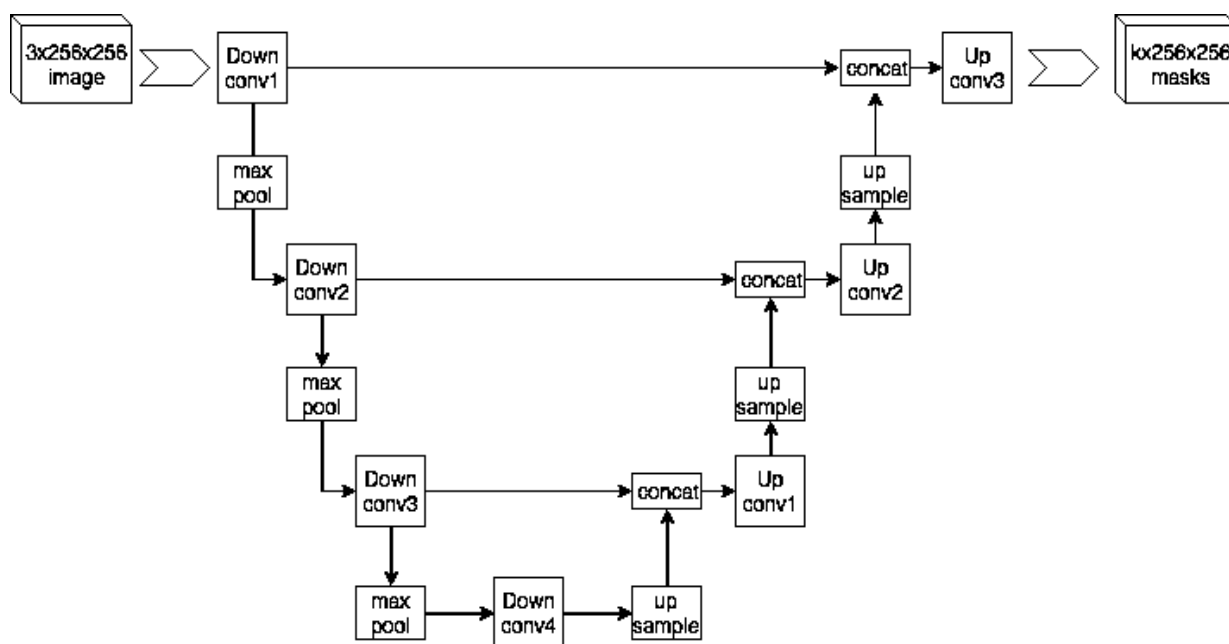


Рисунок 10. Схема архитектуры сети U-Net.

Для данной нейронной сети характерно 23 свёрточных слоя. первая, верточная, часть представляет собой обычную свёрточную сеть. Она содержит два идущих подряд свёрточных слоя 3×3 . Затем идет с функцией максимума 2×2 с шагом 2 слой ReLU и пулинг. На каждом шаге происходит реализация разверточной части, которая содержит слой, обратный пулингу. Этот слой существенно расширяет карту признаков, после нее следует свертка 2×2 , которая уже уменьшает количество каналов признаков. Далее происходит конкатенация с соответствующим образом обрезанной картой признаков из сжимающего пути и две свертки 3×3 , после каждой из которой идет слой ReLU. Мы вынужденно теряем пограничные пиксели в каждой свёртке, поэтому из-за этого нужна обрезка. На последнем слое свертка 1×1 используется для приведения каждого 64-компонентного вектора признаков до требуемого количества классов [71].

В нашей работе используется нейросеть MASK R-CNN, которая выполняет не сематическую сегментацию, а сегментацию экземпляров [76]. Структуру MASK R-CNN можно рассматривать как набор из двух сетей. Первая из них отвечает за построение пирамиды признаков, вторая за предложение областей-кандидатов (Region Proposal Network (RPN)), в которых могут содержаться объекты. Создание пирамиды признаков позволяет нам обнаруживать объекты в

разных масштабах независимо от уровня детализации на основе их характеристик. Вторая часть Mask R-CNN отвечает за распознавание объектов, построение ограничивающих рамок и пиксельных масок.

Матрицей или картой признаков называют числовую матрицу, кодирующую определенную область изображения. Данная карта напрямую связана с архитектурой свёрточной нейронной сети, которая интерпретируется как переход от конкретных особенностей изображения к более абстрактным деталям, причем по мере продвижения от одного слоя нейросети к другому уровень абстракции повышается. На каждом новом слое маловажные детали отбрасываются и выделяются существенные (Рисунок 8).

Исторически Mask R-CNN возникла на основе нейросети Faster R-CNN [77], которую также можно представить в виде композиции двух модулей – предложение гипотез и их обработка/интерпретация. Это позволяет провести обработку изображения целиком, а затем работать с каждой областью интереса (гипотезой), опираясь на ранее созданную карту признаков. Сам процесс работы данной нейросети с изображением можно разделить на несколько этапов:

1. Извлечение карты признаков изображения с помощью нейронной сети;
2. Генерация на основе полученной карты признаков гипотез – определение приблизительных координат и наличие объекта любого класса;
3. Сопоставление координат гипотез с помощью RoI с картой признаков, полученной на первом шаге;
4. Классификация гипотез (уже на определение конкретного класса) и дополнительное уточнение координат.

Как было отмечено выше, Mask R-CNN представляет собой развитие архитектуры нейросети Faster R-CNN за счет добавления ещё одной ветки, которая предсказывает положение маски, покрывающей найденный объект, и, таким образом решает задачу семантической сегментации. Основная модификация Mask R-CNN по сравнению с Faster R-CNN, возникает за счет целесообразности предсказывать маску – замена процедуры RoIPool, которая вычисляет матрицу признаков для региона-кандидата на так называемую RoIAlign (Рисунок 11). Это связано с тем, что карта признаков для

анализируемого изображения, полученная из нейросети Faster R-CNN, имеет меньший размер, чем исходное изображение, при этом регион, охватывающий на изображении целочисленное количество пикселей, не получается отобразить в пропорциональный регион карты с целочисленным количеством признаков [76].

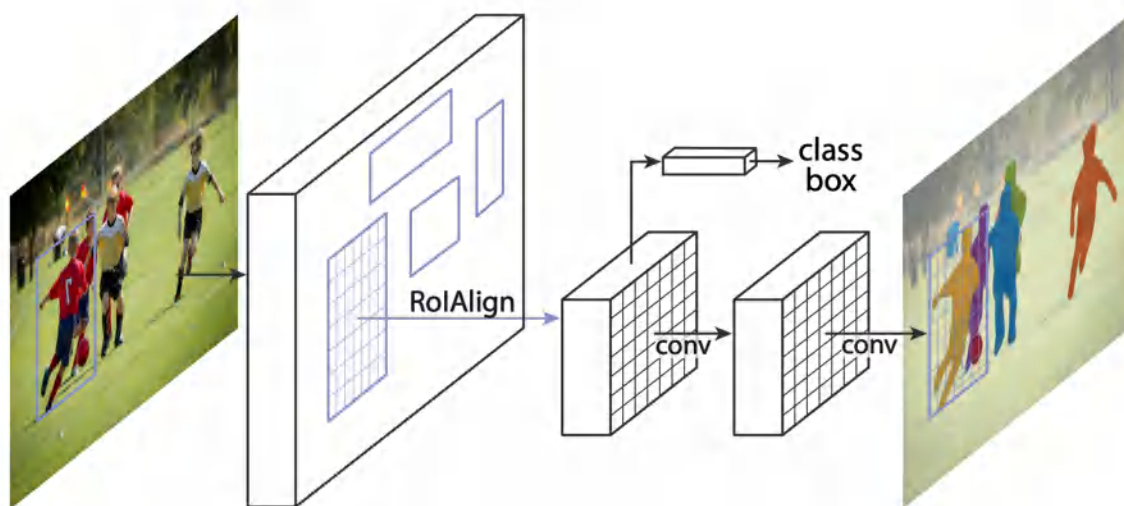


Рисунок 11. Схема архитектуры сети Mask R-CNN [76].

Стоит отметить, что в последнее время получили развитие встраиваемые плагины на основе нейронных сетей, один из них, плагин DeepImageJ для программы ImageJ, который позволяет использовать различные предварительно обученные нейронные сети в ImageJ и Fiji. Плагин способствует обмену предобученными моделями между исследовательскими группами и может иметь большое влияние в различных областях характеристики исследуемых объектов. DeepImageJ состоит из четырех разных модулей [78]:

- 1) DeepImageJ Run (применяет сверточную нейронную сеть к выбранному изображению).
- 2) DeepImageJ BuildBundledModel (реализует управляемый пользовательский интерфейс (GUI) для создания связанных моделей из моделей TensorFlow).
- 3) DeepImageJ Install Model (устанавливает модели, совместимые с DeepImageJ, из моделей BioImage, по указанному URL-адресу или по локальному пути).
- 4) DeepImageJ Validate (дает возможность проводить количественное сравнение результирующего изображения с заданным исходным изображением).

Итак, мы рассмотрели основные подходы к анализу изображений с помощью алгоритмов ИИ. Наиболее значимые для нас алгоритмы – сверточные нейронные сети. На момент написания данной работы для обработки ПЭМ-изображений внеклеточных везикул существовала только одна программа на основе нейронной сети – FRU-Net [79].

2.4. Дополнительные методы исследования внеклеточных везикул

2.4.1. Особенности исследования везикул методом АТН

Анализ траекторий наночастиц (АТН) – метод изучения параметров наночастиц в суспензиях, который был разработан компанией Nanosight (Великобритания). Метод АТН применяется для исследования коллоидных растворов частиц размером (диаметром) от 10 нм до 1 мкм, диапазон измеряемых размеров зависит от природы наночастиц. Метод АТН также позволяет измерять концентрацию наночастиц в суспензии. В основе метода анализа траектории наночастиц лежит прибор – ультрамикроскоп. Он позволяет исследовать не сами частицы, а пятна дифракции света на них, которые больше по размерам, чем сами частицы. Интенсивное боковое освещение создает эффект того, что каждая частица выглядит как яркая точка на темном фоне. Таким образом, ультрамикроскоп не дает оптические изображения исследуемых объектов, с его помощью наблюдаются не сами наночастицы, а пятна дифракции света на них, что позволяет отслеживать перемещение (броуновское движение) наночастиц в поле зрения, которое дает нам возможность определить размер (гидродинамический радиус) частиц в поле зрения, зная вязкость жидкости, в которой они находятся [80].

2.5. Корреляционная микроскопия

Корреляционная микроскопия – это набор способов получения информации об объекте, при которых один и тот же препарат исследуют последовательно двумя методами микроскопии. Подчеркнем, что речь идет об исследовании выбранной области конкретного препарата; эксперименты, в которых из одной и

той же суспензии готовят два препарата для исследования двумя видами микроскопии, не относятся к корреляционной микроскопии.

Эксперименты по корреляционной микроскопии могут выполняться на обычном оборудовании, либо на специализированном. В первом случае мы используем два микроскопа последовательно – и для этого переносим препарат из одного прибора в другой. Во втором случае мы используем специализированные приборы, которые сочетают в себе несколько аналитических методов, например, АСМ и Рамановскую спектроскопию [81], [82]. В первом случае, мы получаем возможность сочетать два метода измерений (две модальности), однако возникают сложности с выбором и поиском полей зрения. На образце необходимо расставить метки и указатели, которые позволят при измерениях выбрать конкретное поле зрения и «не потерять» его при переносе образца из одного прибора в другой. Во втором случае, необходимость использования меток для поиска полей зрения полностью отпадает, однако совмещенные приборы обычно сравнительно сложные в обращении и дорогостоящие.

Существует несколько наиболее востребованных в исследованиях схем корреляционной микроскопии: сочетание оптической и электронной микроскопии (ОМ-ЭМ), атомно-силовой и оптической микроскопии (АСМ-ОМ), атомно-силовой и электронной микроскопии (АСМ-ЭМ) и некоторые другие [83].

Как правило, оба метода дополняют друг друга. Так при совмещении оптического и электронного микроскопов можно проводить исследования мелких объектов в больших объёмах (полях зрения) исследуемого образца с использованием оптики, а высокую детализацию изображения получать с помощью электронной микроскопии. Существенным преимуществом электронной микроскопии является высокое пространственное разрешение, позволяющее получать изображения в нанометровом диапазоне. При этом многие биологические образцы крайне чувствительны к радиационному воздействию, которое оказывает пучок электронов электронного микроскопа. Оптическая же микроскопия позволяет проводить исследования в режиме реального времени с использованием, например, меченых флуорофорами молекул, и таким образом

получать изображения отдельных структур клеток [84]. Впервые в одну корреляционную схему ОМ и ЭМ были успешно объединены для изучения цитоплазматических микротрубочек в клетках PtK2 в 1978 году [85]. Первая сконструированная и полноценно функционирующая корреляционная схема была реализована на базе лазерного оптического микроскопа, к которому через боковой порт под углом 90° к стержню держателя образца была присоединена двойная линза электронного микроскопа. В данной схеме микроскопа меченые флуоресцентными маркерами секции исследуемого образца загружаются в микроскоп под углом 90° относительно направления электронного пучка. Далее с помощью лазерного оптического микроскопа, включённого в схему, есть возможность визуализировать флуоресценцию всех секций в вакуумной камере [86]. Распределение флуоресценции внутри секции сохраняются, после чего держатель с образцом проворачивается таким образом, что он оказывается непосредственно под электронным пучком (Рисунок 12). Таким образом образец картируется и распределение флуоресценции, получаемое на первом этапе работы, служит для определения элементов интересующих исследователя элементов секции. Важно отметить, что при этом исследовании (картировании) распределения флуоресценции необходимо проводить перед воздействием на образец электронов микроскопа, так как после этого уже нельзя будет регистрировать специфическую флуоресценцию на данном участке, это явление носит название фотообесцвечивание [84].

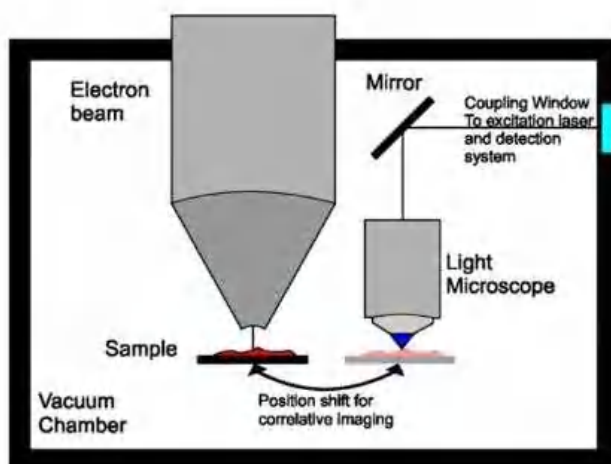


Рисунок 12. Оптическая схема совмещенных сканирующего ЭМ и ОМ.

Мы сосредотачиваемся на корреляционных измерениях, в которых одним из двух методов является АСМ. Есть ряд примеров сочетания АСМ с оптической микроскопией – флуоресцентной, сканирующей конфокальной или Рамановской. Во многих работах АСМ использовался в сочетании с флуоресцентной микроскопией [87]–[91].

Так, например, АСМ-изображения были получены на образцах фибробластов (клеточных линий 3Т3 и NRK), и их совмещали с флуоресцентными изображениями актинового цитоскелета (Рисунок 13).

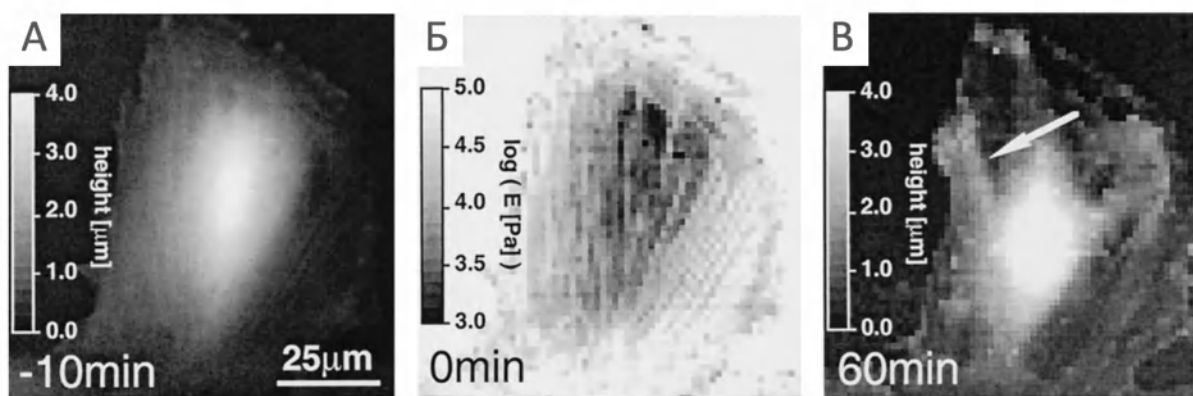


Рисунок 13. Изображения фибробласта NRK, показывающие дезагрегацию актиновой сети под действием 10 мМ цитохалазина D и корреляцию АСМ-изображений с флуоресцентными изображениями. (А) АСМ-изображение. (Б) Карта эластичности. (В) Флуоресцентное изображение [92]

Авторы обрабатывали клетки токсинами (цитохалазин, латрункулин, джасплакинолид, колхицин, колцеид, таксол), которые избирательно действовали на различные структуры цитоскелета и разрушали его, далее измеряли жесткость клеток методом АСМ [92]. Так удалось показать, что актиновые филаменты и состояние их полимеризации сильно влияют на эластичность клеток – под действием цитохалазина В модуль Юнга клеток снижался примерно в 2,6 раза, а при разрушении сети микротрубочек колхицином модуль Юнга клеток не изменяется.

Современные разновидности флуоресцентной микроскопии обладают лучшим пространственным разрешением, чем классическая эпифлуоресценция. Например, был разработан корреляционный подход на основе атомно-силовой и

фотоактивированной локализационной микроскопией (PALM [93]), STORM [91]), который представляет собой метод сверхвысокого разрешения, основанный на случайной активации флуорофоров [90]. Данный подход применим для локализации одиночных молекул, он позволяет обнаруживать определенные меченые белки на АСМ-изображениях с высоким разрешением, например, ширина индивидуального актинового филамента составляла 10 нм и 24 нм для АСМ и PALM, соответственно [93].

В сочетании с атомно-силовой можно использовать электронную микроскопию – сканирующую или просвечивающую [94]. Существуют приборы, в которых совмещены АСМ и СЭМ, они дают возможность проводить эксперименты без переноса образца от одного прибора к другому [95]–[97]. При такой схеме АСМ находится внутри вакуумной камеры, преимуществом данного подхода, является то, что образец не загрязняется. Кроме того, ориентируясь на СЭМ-изображения, кантилевер АСМ можно перемещать с нанометровой точностью до области интереса, что делает получение измерений эффективным по времени и устраняет необходимость в навигационных метках. Также описаны эксперименты, в которых АСМ и СЭМ корреляционная микроскопия реализована на обычных, а не на совмещённых приборах [98], [99]. Данная схема является более доступной, но связана с переносом образца между приборами.

Совмещение АСМ и СЭМ представляется идеологически простым – оба эти метода предназначены для исследования поверхности. Более экзотический случай – это совмещение АСМ и ПЭМ в рамках корреляционной микроскопии [100]–[103].

При этом образец должен находиться на сетке для ПЭМ – для исследования методом ПЭМ она является стандартной подложкой, а для АСМ – экзотической, но тоже применимой. Иногда используют специальные держатели для сеток, которые облегчают их установку на столик АСМ. Например, с помощью такого держателя в работе [101] были визуализированы коллагеновые молекулы. Особенность держателя состояла в том, что он механически прижимал сетку к подложке. Образцы сначала исследовали на воздухе методом АСМ в контактном режиме, а затем методом ПЭМ. Этот подход позволил определить взаимосвязь

между топографией поверхности образца, выявленной с помощью АСМ, и контрастом темных и светлых деталей, обнаруженных с помощью ПЭМ.

Вероятно, первой из работ по корреляционной АСМ-ПЭМ микроскопии была визуализация сферических золотых наночастиц [102]. Эти частицы были приготовлены на медных сетках с углеродным покрытием, модифицированным полилизинном. Сравнение изображений показывает, что высота частиц, определенная с помощью АСМ ($H_{АСМ}=15.8$ нм), очень хорошо согласуется с диаметром частиц, определенным с помощью ПЭМ ($H_{ПЭМ}=16$ нм), но ширина объектов на АСМ-изображении постоянно больше, чем на ПЭМ-изображении. Очевидно, это связано с конечным радиусом кривизны зонда, типичным для АСМ.

В работе [100] описан дизайн корреляционных АСМ-ПЭМ измерений при исследовании актиновых филаментов полученных из мышц кролика в качестве тестового образца. Эксперименты проводились сначала на АСМ, затем сетку переносили на ПЭМ. Чтобы облегчить выбор полей зрения, авторы использовали два специфических приема. Во-первых, использовали сетки с маркированными ячейками. Во-вторых, при исследовании на АСМ сетку располагали на специальном стекле, покрытом золотом, которое помогало выбрать угол поворота сетки и выбрать поле зрения для АСМ.

Учитывая, что количество работ, связанных с корреляционной АСМ-ПЭМ микроскопией сравнительно невелико, то наша работа обладает исключительной новизной. Применений корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ для визуализации ВВ на настоящий момент не описано. При этом развитие различных методов визуализации ВВ с использованием микроскопии высокого разрешения, является критически важным, что подчеркивается рекомендациями MISEV.

3. Материалы и методы

3.1. Выделение везикул

Образцы внеклеточных везикул были предоставлены НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

В работе исследовались внеклеточные везикулы различного происхождения, т.е. выделенные из различных биологических образцов, включая кондиционированную среду культивирования первичных и перевиваемых клеток, сыворотки крови, клинических образцов асцитной жидкости и маточного смыва. Два образца были выделены из сред культивирования раковых клеток линий A549 и Colo704, помимо них использовались препараты экзосом, полученные из клеток плаценты человека.

ВВ выделяли дифференциальным центрифугированием, как описано в [37], с небольшими вариациями. Клетки инкубировали в культуральных флаконах объемом 175 см² с 35 мл DMEM, обедненной экзосомами, в течение 72 часов. После этого культуральную среду объединяли и центрифугировали при 800g в течение 15 минут и 2000g в течение 15 минут при 4°C для удаления мертвых клеток и дебриса (Eppendorf Centrifuge 5810R; ротор A-4-81). Затем полученные супернатанты центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин при 4°C для удаления крупных частиц, таких как апоптотические тельца и микровезикулы (ротор Eppendorf FA-45-6-30). Ультрацентрифугирование проводили на центрифуге L7-35 (Beckman Coulter, США). Супернатанты переносили в полипропиленовые центрифужные пробирки (REF 326823, Beckman Coulter, США) и центрифугировали при 110 000 g в течение 120 мин при 4°C с использованием ротора Swinging Bucket SW-28 (коэффициент k 245,5, Beckman Coulter, США). Супернатанты удаляли, а полученные осадки промывали 5 мл фосфатно-солевого буфера (PBS, Gibco), переносили в полипропиленовые центрифужные пробирки (REF 326819, Beckman Coulter, США) и снова центрифугировали при 110 000g в течение 90 мин при 4°C. С с использованием ротора SW-50.1 Swinging Bucket (коэффициент k 154,5, Beckman Coulter, США). Осадки ресуспендировали в 100 мкл PBS, переносили в пробирки Eppendorf с

белком LoBind (#0030108094), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Выделение ВВ из физиологических жидкостей проводили аналогично, но перед центрифугированием при 10 000 g их разводили PBS. Фактор разведения составлял 5x для плазмы крови и 2x для асцитической жидкости и смывов из полости матки.

3.2. Подготовка образцов для АСМ

Измерения проводили на атомно-силовом микроскопе Solver PRO-M в полуконтактном режиме на воздухе, при частоте 1 Гц и разрешении получаемых изображений – 512x512. В эксперименте использовались кремниевые кантилеверы NSG (NT-MDT, Россия) с радиусом кривизны 6 нм. Обработка полученных данных осуществлялась в программах SPMImageMagic, Nova v3.4.0, ImageAnalysis и FemtoScan Online.

Для каждого эксперимента на АСМ использовали серии разведений образцов экзосом в однократном фосфатно-солевом буфере (PBS). В качестве подложек использовали свежесколотую слюду и сетки для электронной микроскопии.

В качестве подложки применяли свежесколотую слюду, рабочую сторону которой модифицировали 5мМ NiCl_2 , в течение двух минут, для того чтобы изменить отрицательный заряд на её поверхности, на положительный. Такая модификация предполагает снижение электростатических взаимодействий, препятствующих адсорбции экзосом. Излишки жидкости быстро высушивали потоком сжатого воздуха.

Приготовленные разведенные суспензии экзосом наносили на подложки каплями по 40 мкл. В каждом эксперименте в качестве контрольного образца использовали аналогичную модифицированную подложку, обработанную 40 мкл PBS. После 5 минут адсорбции, образцы отмывали от неадсорбированных частиц в трех каплях дистиллированной воды в течение 15 минут.

Высушивание образцов проводилось сжатым воздухом, чтобы не допустить неравномерного распределения везикул при естественном высыхании в комнатной температуре и налипания посторонних частиц на образцы.

Решетки ПЭМ (Ted Pella, США) с углеродным покрытием Formvar обрабатывали с использованием устройства тлеющего разряда Emitech K100X (Quorum Technologies, Великобритания) для гидрофилизации углеродной поверхности и увеличения адсорбции. Появлялась одна рабочая сторона, на которую наносили раствор ВВ. Адсорбция происходила в течение 1 минуты и далее излишки убирали фильтровальной бумагой и сушили образец. Мы использовали две экспериментальные процедуры, которые отличались способом подготовки образцов и последовательностью применения аналитических методов. Один из них предусматривал обработку ацетатом уранила сразу после нанесения образца, другой – после исследования на АСМ.

3.3. Подготовка образцов для ПЭМ

Образцы везикул наносили на обработанные в тлеющем разряде сетки и адсорбировали в течение 1 минуты. Образцы разбавляли PBS, и для каждого образца готовили несколько сеток для достижения удобной поверхностной плотности адсорбированных частиц. Экзосомы осаждали на сетки в течение 3 мин, контрастировали 1% ацетатом уранила и сушили. Получение изображений проводили с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Japan) при 80 кВ. Изображения сохранялись в виде 16-битных файлов TIFF с разрешением 2048 × 2048.

3.4. Иммуноблотинг

На 15% полиакриламидный гель для электрофореза наносили 20 мкг клеточного лизата и 10 мкг экзосомального белка. Для гибридизации использовали следующие антитела: anti-flo-tillin-1 (BD, 610821), anti-caveolin-1 (BD, 610407), anti-stomatin (Santa Cruz Biotech, sc-134554), anti-Alix (Cell Signaling, 2171S), anti-CD9 (Cell Signaling, 13174S), anti-TSG101 (Abcam, ab125011), anti- β -actin (Abcam, ab8227).

Денситометрический анализ был выполнен с использованием данных полосовой кумулятивной оптической интенсивности. Уровни присутствия белков оценивались с помощью длительной экспозиции в системе Kodak GelLogic 2200 Imaging.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Разработка программы на основе нейросети по обработке ПЭМ-изображений внеклеточных везикул

4.1.1. Сбор, подготовка и разметка данных

Нейросеть должна отличить пиксели, принадлежащие ВВ, от пикселей фона. В терминологии нейросетей это означает, что каждый пиксель будет относиться к одному из двух классов – ВВ или фон. Для обучения нейросети необходимо иметь набор изображений, на которых отмечены все присутствующие на них ВВ, чтобы алгоритм определил и “запомнил” характеристические признаки каждого из двух классов. Такие наборы изображений называют размеченными или аннотированными.

Для обучения нейросети использовались ПЭМ-изображения образцов ВВ различного происхождения – выделенных из асцитов, плазмы крови, кондиционированной среды культивирования клеток Scov3, A549, Coco704, Efo21, а также смыва из полости матки. Образцы разного происхождения были приготовлены независимо, и интенсивность контрастирования варьировалась между образцами и между изображениями. Примеры изображений отдельных внеклеточных, используемых в обучении приведены на рисунке 14.

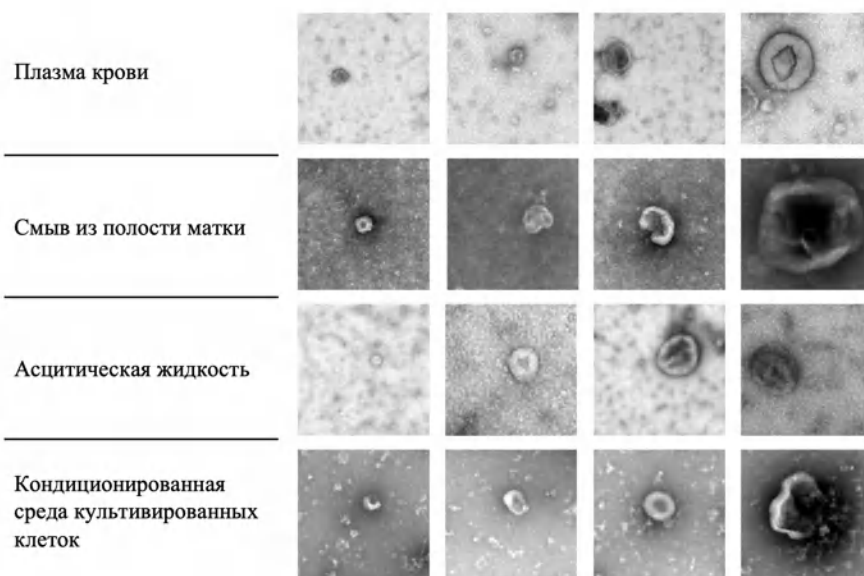


Рисунок 14. Снимки ВВ различного происхождения (каждый фрагмент имеет размер 700x700 пикселей).

Мы провели разметку полученных нами ПЭМ-изображений – мы разметили 188 изображений, из них 138 вошли в обучающий набор (training dataset), 25 в проверочный набор (validation dataset) и 25 в тестовый набор (test dataset). Разметка проводилась с использованием ПО CVAT (<https://github.com/opencv/cvat>). Всего нами вручную было размечено 1558 внеклеточных везикул. В обучающую выборку попадали только частицы, имеющие характеристическую морфологию сдутых мячиков. На рисунке 15 проведено распределение размеров частиц из трех наборов изображений – обучающего, валидационного и тестового. На рисунке 15А показано распределение до масштабирования, на рисунке 15Б после масштабирования. Все три распределения размеров выглядели единообразно; они были негауссовыми, с острым пиком в области 4000–8000 пикселей и длинным хвостом справа. Для валидационного набора данных кривая распределения имела несколько дополнительных максимумов; они могли появиться из-за относительно небольшого количества внеклеточных везикул в этом наборе данных. Сходство этих распределений представляет является иллюстрацией сходства ПЭМ-изображений ВВ независимо от их происхождения.

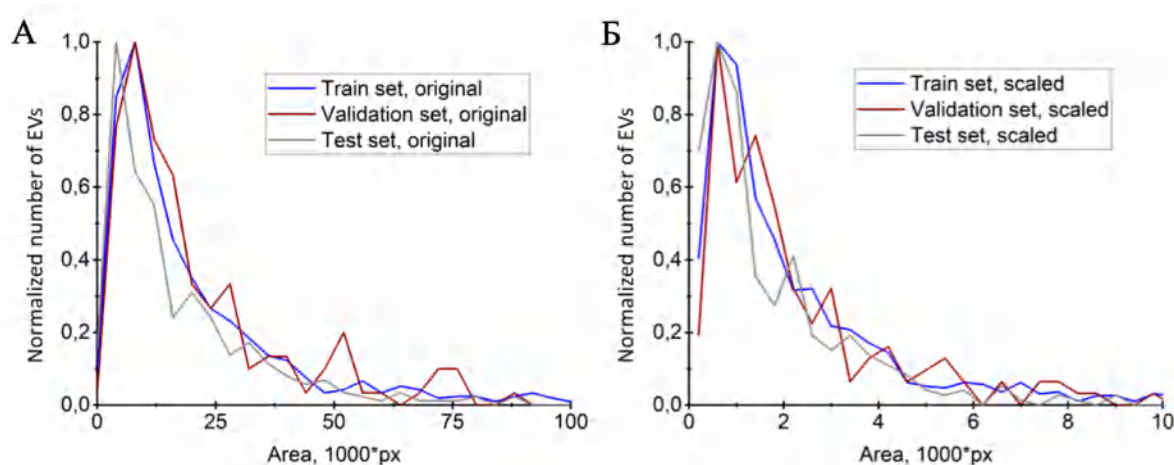


Рисунок 15. Распределение размеров ВВ в трех наборах данных до (А) и после (Б) масштабирования. Наборы данных содержат ограниченное количество везикул с большими площадями, которые не отображаются на текущих графиках. По крайней мере 95% ВВ в каждом наборе данных попадают в указанный диапазон.

4.1.2. Подбор и обучение нейросетевой модели

Как было указано в литературном обзоре для обнаружения объектов на ПЭМ изображениях, наиболее подходящими нейросетевыми алгоритмами представляются семантическая сегментация и сегментация экземпляров.

Выбор обученной нами модели Mask R-CNN обусловлен тем, что данная нейронная сеть, используется для решения задач поиска и классификации объектов на изображениях [76]. Мы использовали нейронную сеть Mask R-CNN с ResNet51 в качестве основы и входным разрешением 1024×1024 . Сеть была обучена и оптимизирована для сегментации внеклеточных везикул с использованием наших наборов данных.

Изображения подаются в нейросеть в цветовом пространстве RGB. Если загруженное изображение является 8-битным черно-белым, оно преобразуется в RGB путем повторения одного и того же изображения в красном, зеленом и синем каналах. Если входное изображение 16-битное, оно преобразуется в 8-битное. Программа нормализует интенсивность изображений, чтобы она соответствовала всему 8-битному диапазону (от 0 до 255). Наконец, размеры изображений изменяются, чтобы они поместились в кадр размером 1024×1024 пикселей. Если входное изображение не является квадратом, часть результирующего кадра заполняется черными пикселями. При выдаче результатов пользователю размеры изображений восстанавливаются, поэтому маски применяются к изображениям с исходными размерами.

Мы использовали Mask R-CNN, предварительно обученную на наборе данных COCO для инициализации [76]. Мы проводили обучение в два этапа. На первом этапе скорость обучения составляла 0,001, и мы обучали нейронную сеть на протяжении 40 эпох. На втором этапе мы уменьшили скорость обучения до 0,0005, изменили вес потери маски на 0,1 и обучили нейросеть на протяжении 6 эпох. Обучение проводилось на нейросеть с процессором AMD Ryzen 5, 3600 ГГц и графическим процессором Nvidia RTX 2070 super.

После обучения и валидации, мы разработали веб-интерфейс, чтобы сделать загрузку и обработку ПЭМ-изображений более удобной и простой для неспециалистов. При этом из-за наличия интерфейса и необходимости загружать

изображения на сайт, скорость обработки изображений уменьшилась по сравнению с работой программы через командную строку. Зато появилась возможность использования нашей программы с любого компьютера или ноутбука, подключенного к сети интернет - нейросеть доступна по адресу <https://www.bioeng.ru/scanev> (она работает на сервере кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ). Программа получила название ScanEV – scanner for extracellular vesicles.

После детектирования везикул, программа ScanEV определяет параметры частиц: площадь, периметр, сумму полуосей аппроксимирующего эллипса, сферичность (циркулярность), а также логический параметр; определяющий лежит ли частица на границе кадра или нет. Пример работы приведен на рисунке 16. Наиболее адекватной мерой размера нам представляет сумма полуосей аппроксимирующего эллипса. Подчеркнем, что все перечисленные параметры (за исключением сферичности и последнего логического параметра) измеряются в пикселях, а не в единицах длины. Соответственно, пользователь должен самостоятельно откалибровать полученные значения, т.е. перевести пиксели в нанометры или другие удобные единицы.

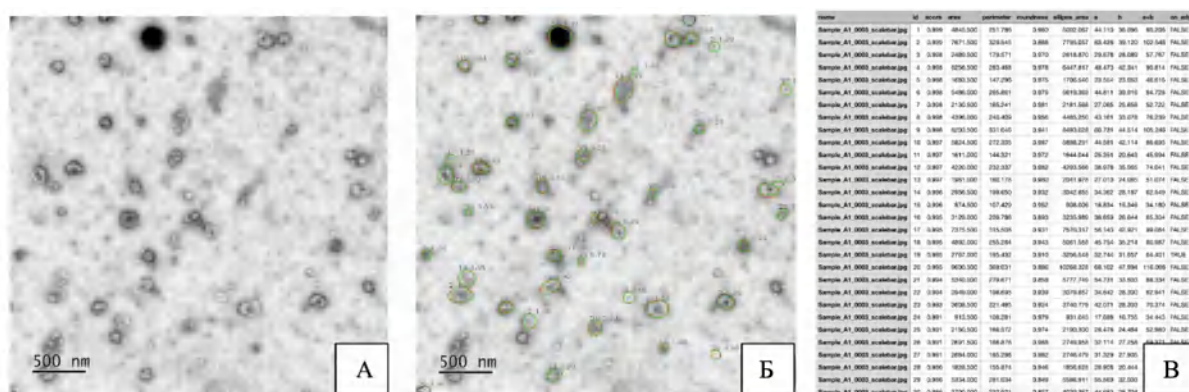


Рисунок 16. Входное изображение в оттенках серого цвета (А) и результаты обработки (Б, В).

4.1.3. Тестирование обученной модели и валидация результатов

Эффективность работы нейросети (эффективность обнаружения объектов и сегментации) можно измерить с помощью нескольких показателей, основными являются точность (precision), полнота (recall). Точность – это доля правильно

обнаруженных объектов среди всех обнаруженных, а полнота — количество правильно определенных частиц по отношению ко всем частицами. В качестве входных параметров для оценки точности модели используются: true positive (TP), false positive (FP), false negative (FN), true negative (TN) (Рисунок 17).

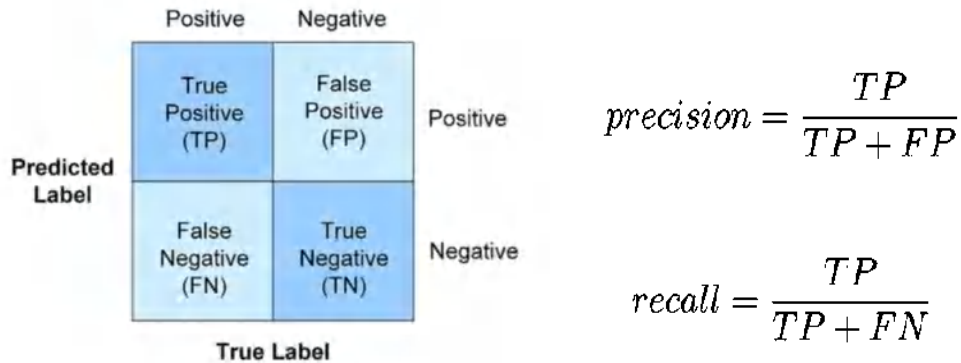


Рисунок 17. Метрики точности нейросети.

В качестве других метрик оценки точности используются: average precision (AP) и mean average precision (mAP). AP (среднее значение точности) – равно площади под кривой точность-полнота (Рисунок 18). Кривая точность-полнота дает значение точности по отношению к полноте для различных пороговых значений доверительного интервала. mAP – это среднее значение AP, мы вычисляем AP для каждого датасета и усредняем их.

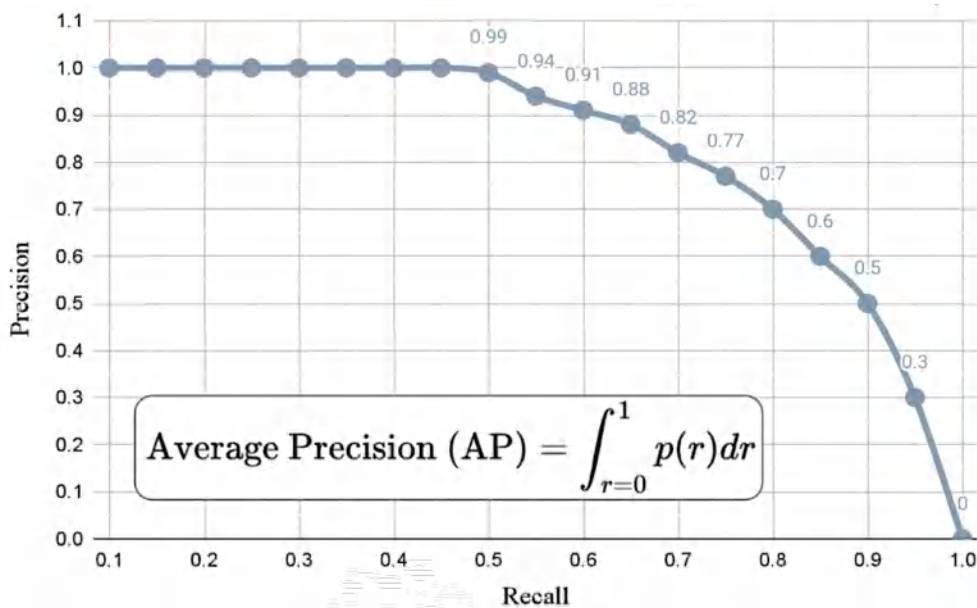


Рисунок 18. Метрика точности average precision (AP).

Точность и полнота зависят от двух пороговых параметров - минимального пересечения по объединению (Intersection over Union, IoU), при котором частица считается правильно обнаруженной, и минимальной достоверности, при которой учитываются прогнозы сети (мы использовали 0,6 для вывода). mAP можно рассчитать, как описано в [104].

IoU измеряет перекрытие между двумя областями. Это используется для определения процента перекрытия предсказанной областью нахождения объекта его реальной области нахождения. Мы рассчитали эти показатели для ScanEV при $\text{IoU} = 0,75$ и $\text{IoU} = 0,5$ (Таблица 2). Показатели, рассчитанные по валидационному набору данных, были немного выше, чем показатели, рассчитанные с использованием тестового набора данных. Однако большинство из них выше 0.8, что является формальным показателем общей высокой эффективности ScanEV.

Как эффективность ScanEV зависит от размера частиц, которые она обнаруживает? Чтобы ответить на этот вопрос, мы разделили наш тестовый (проверочный) набор на три подгруппы, содержащих “крупные”, “средние” и “мелкие” частицы и вычислили точность и полноту для каждой из них. Границы этих подгрупп выбирались таким образом, чтобы в них участвовало почти равное число частиц. Так, тестовая подгруппа малых ВВ включала 115 частиц площадью 44–716 пикселей, тестовая подгруппа средних ВВ включала 114 частиц площадью 716–1931 пикселей, тестовая подгруппа крупных ВВ включала 115 частиц площадью 1931–11446 пикселей. Принципиальное отличие этой процедуры от описанного выше деления изображений на наборы в том, что в данном случае мы разделяли не целые изображения, а отдельные частицы. В данном случае размеры частиц, измеренные как площади в пикселях, более уместны, чем линейные размеры, измеренные в единицах длины, т.к. Mask R-CNN (основа ScanEV) обрабатывает изображение с 1024x1024 пикселей независимо от масштаба.

Мы вычислили метрики для трех типов частиц из тестового набора (Таблица 2). Оказалось, что ScanEV лучше всех работает с крупными частицами – для подгруппы крупных частиц метрики оказались выше, чем для других двух подгрупп. Это может быть следствием шума – по мере того, как частицы

становятся меньше, шум, который неизбежен на изображениях, становится более вредным. Более того, даже на этапе разметки изображений, когда мы вручную выделяли границы частиц, мы могли допускать менее точную ручную разметку, когда частицы были относительно маленькими и зашумленными.

Нами проведено сравнение результатов работы, обученной нами нейросети ScanEV с результатами программы FRU-Net, основанной на семантической сегментации (Таблица 2). На рисунке 19 показаны два изображения из нашего тестового набора данных: для каждого изображения приведена разметка, сделанная вручную, и результаты двух нейросетей – ScanEV и FRU-Net. Когда мы использовали FRU-Net, мы удалили масштабные отрезки с изображений, потому что они вызывали ложное срабатывание.

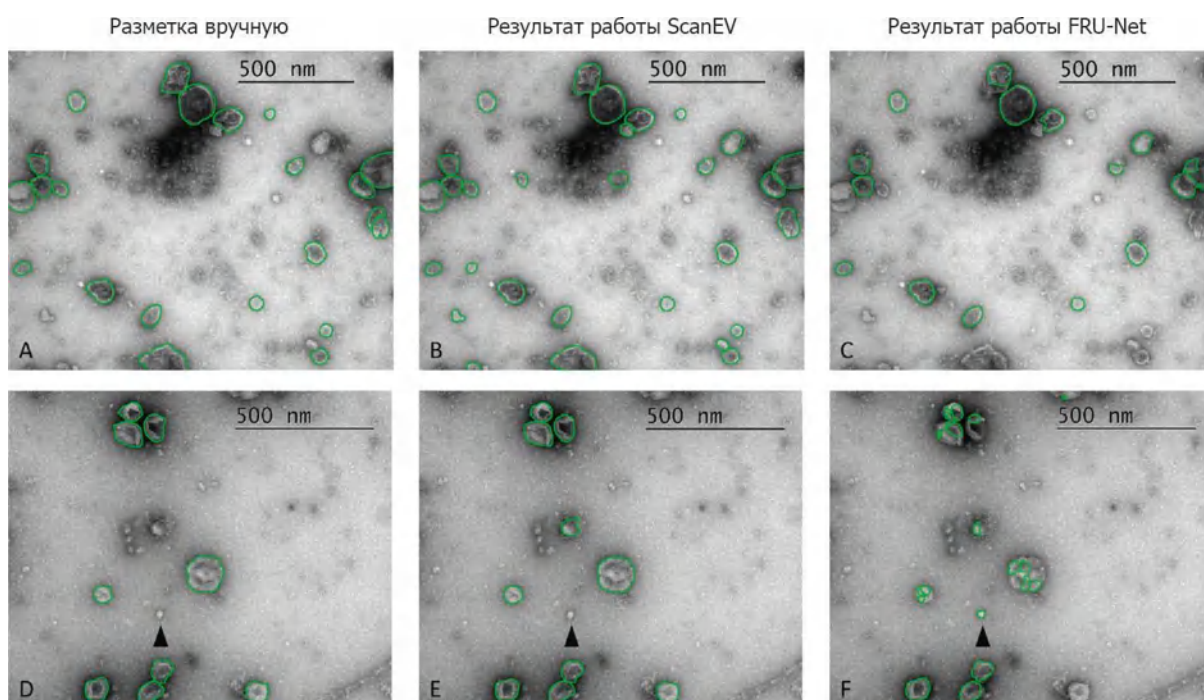


Рисунок 19. Сравнение обученной нами нейросети ScanEV и FRU-Net [79].

Две сети показывают разные результаты, и это является следствием как минимум двух факторов. Во-первых, наша нейронная сеть была обучена с использованием только частиц с определенной характеристической морфологией, «cup-shaped morphology», а FRU-Net была обучена обнаруживать частицы с относительно разнообразной морфологией, в том числе яркие сферические частицы. Одна такая частица отмечена черным треугольником на рисунке 19. Мы

считаем, что такие частицы детектировать не следует, т.к. они могут представлять собой липоротейны [74], [75], [105]. Во-вторых, две обсуждаемые нейросети применяют разные подходы - семантическую сегментацию и сегментацию экземпляров. FRU-Net делает семантическую сегментацию (отделяет частицы от фона), а затем с помощью преобразования Радона разделяет близко расположенные частицы. Преобразование Радона – интегральное преобразование функции многих переменных, родственное преобразованию Фурье. Используемая нами сеть Mask R-CNN позволяет сразу выделять частицы, используя попиксельные маски (она выполняет сегментацию экземпляров).

Таблица 2. Метрики при сравнении ScanEV на основе Mask R-CNN и FRU-Net [79].

CNN	Датасет, используемый в обучении	Датасет, используемый в расчете метрик	mAP	mAP@ IoU=0.75	mAP@ IoU=0.5	Recall@ IoU=0.75	Recall@ IoU=0.5
Mask R-CNN	Наш обучающий	Наш валидационный	0.75	0.897	0.953	0.912	0.978
Mask R-CNN	Наш обучающий	Наш тестовый	0.68	0.817	0.858	0.843	0.892
Mask R-CNN	Наш обучающий	Подгруппа малых частиц	0.504	0.628	0.7	0.794	0.817
Mask R-CNN	Наш обучающий	Подгруппа средних частиц	0.658	0.798	0.846	0.816	0.913
Mask R-CNN	Наш обучающий	Подгруппа крупных частиц	0.776	0.909	0.924	0.928	0.944
FRU-Net	Из статьи (Gómez-de-Mariscal et al., 2019)	Наш тестовый	0.288	0.329	0.389	0.476	0.545

FRU-Net	Из статьи (Gómez-de-Mariscal et al., 2019)	Тестовый для CBIA	0.597	0.661	0.715	0.794	0.832
Mask R-CNN	Обучающий для CBIA	Тестовый для CBIA	0.65	0.795	0.82	0.775	0.859

Поскольку нейросети FRU-Net и ScanEV были обучены на разных наборах, они формально решают немного разные задачи – ScanEV ищет только частицы, обладающие морфологией cup-shaped, а FRU-Net ищет практически все частицы. Чтобы сделать сравнение эффективности двух нейросетей более корректным, их следует обучить на одном и том же наборе данных. Это позволит сосредоточиться на том, как архитектура нейросети влияет на ее эффективность в решении конкретной задачи. Можно либо обучить FRU-Net на нашем обучающем наборе, либо обучить Mask R-CNN на том наборе данных, который был использован авторами работы [79]. Мы выбрали второй из этих путей – использовали наборы из статьи [79] в качестве обучающего и тестового. Соответствующие значения точности и полноты сопоставлены в двух последних строках.

Как отмечено в таблице 2 в качестве датасетов, используемых в расчете метрик мы выделяли: тестовый для CBIA (из статьи [79], наш вариационный, и наши тестовые разделенные на три выборки (малая, средняя, большая). Границы этих выборок были выбраны таким образом, чтобы в них участвовало почти равное количество частиц. Так, тестовая подгруппа малых ВВ включала 115 частиц площадью 44–716 пикселей, тестовая подгруппа средних ВВ включала 114 частиц площадью 716–1931 пикселей, тестовая подгруппа крупных частиц включала 115 частиц. частицы площадью 1931–11460 пикселей. Две частицы тестового набора не вошли ни в одно из подмножеств. Видно, что по всем параметрам, кроме $\text{Recall@IoU}=0.75$, сеть Mask R-CNN показывает более высокий результат. Это подтверждает, что выбор “ядра” для программы ScanEV был оправдан.

Итак, нами была разработана нейросеть, которая позволяет автоматизировать обработку изображений ВВ, полученных методом ПЭМ. Практика показала, что эта нейросеть используется не только для изображений ВВ [106], [107], но и для других изображений, например, вирусных частиц [107].

4.2. Исследование стоматина как потенциального экзосомального маркера

В этом разделе описаны результаты, опубликованные в статьях [108], [109]. Измерения методами АТН и иммуноблотинга были проведены сотрудниками Лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

4.2.1. Характеризация внеклеточных везикул

Нами были исследованы внеклеточные везикулы, выделенные из кондиционированной среды культивирования клеточных линий А549, Н460, Н1299. В нашей работе впервые было показано присутствие в экзосомах стоматина – представителя SPFH-семейства белков плоских липидных рафтов. Более того, по ряду характеристик этот белок можно рассматривать в качестве нового экзосомального маркера [108]. Его относят к классу рафт-белков, которые играют важную структурно-функциональную роль, поскольку они организуют и стабилизируют жидкостно-упорядоченные участки мембраны и участвуют в процессах внутриклеточной сигнализации. Стоматин локализуется на клеточной мембране красных кровяных телец (эритроцитов) и других типов клеток, где он участвует в регуляции ионных каналов.

Препараты экзосом верифицировали согласно последней редакции требований международной ассоциации по исследованию внеклеточных везикул (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) [2]. Мы проводили биохимическую и структурную характеризацию образцов везикул методами анализа траекторий наночастиц (АТН), ПЭМ и иммуноблотинга.

На рисунке 20А изображены диаграммы распределений частиц по размерам на основе данных, полученных методом АТН. Средние размеры ВВ, выделенных из кондиционированных клеточных сред, по данным АТН составили: А549,

114±20 нм; Н1299, 122±17 нм; Н460, 111±10 нм. Эти размеры соответствуют ожидаемым размерам ВВ. Статистически значимых различий между размерами ВВ, выделенных из исследованных клеточных линий, мы не обнаружили (ANOVA; P > 0,05).

Анализ морфологии и размеров частиц проводился с помощью ПЭМ, как описано выше – образцы ВВ адсорбировали на подложку и контрастировали с помощью 1% ацетата уранила. На рисунке 20Б представлены ПЭМ-изображения препаратов ВВ, на них видна характеристическая морфология частиц (чашеобразная форма или форма «сдутых мячиков»), которая соответствует внеклеточным везикулам при их визуализации методом ПЭМ. Средние размеры ВВ по данным ПЭМ составили: А549, 103±42 нм; Н1299, 115±45 нм; Н460, 103±36 нм. Для каждого образца средний размер ВВ, измеренный методом АТН, оказывался приблизительно на ~10 нм больше, чем по данным ПЭМ. Разница гипотетически может объясняться влиянием сольватной оболочки везикул или их частичной агрегацией в растворе. Кроме того, эта разница может быть связана с различной калибровкой измерительных приборов (АТН и ПЭМ).

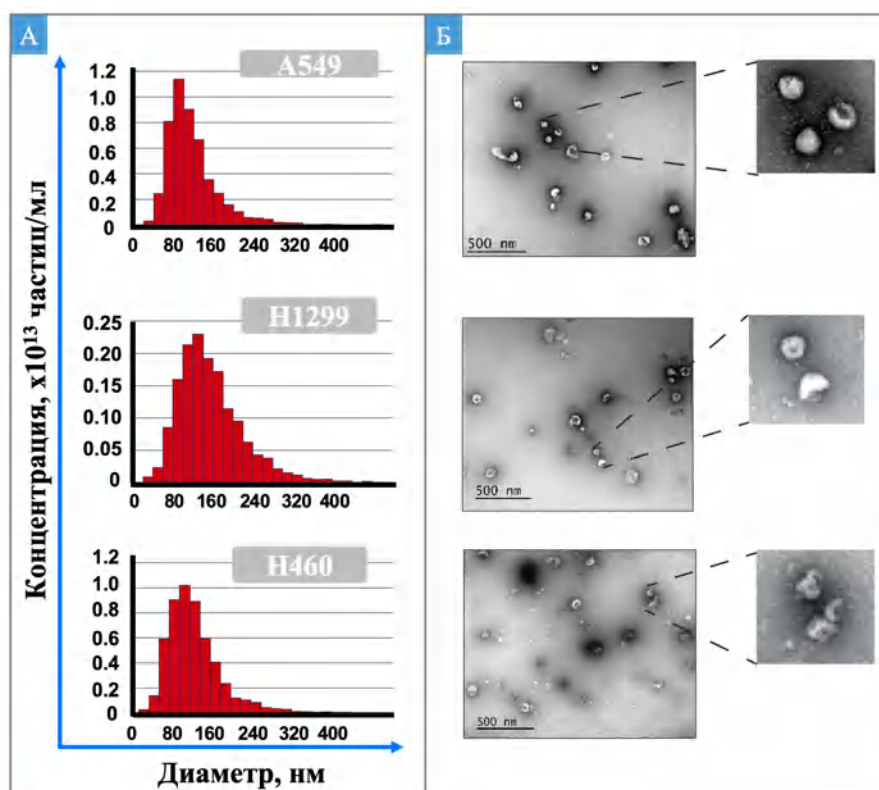


Рисунок 20. Среднечисловое размерное распределение по результатам анализа траекторий движения внеклеточных везикул.

С помощью АТН нами также был исследован контрольный образец, для которого концентрация частиц была в 1000 раз более низкой. Это была среда DMEM с добавлением сыворотки, прошедшая через все этапы выделения ВВ (последовательное центрифугирование с постепенным увеличением ускорения вплоть до 110000 g). Естественно, некоторые частицы некзосомальной природы обнаруживались, но их концентрация составила $\sim 10^{10}$ шт/мл, что приблизительно на 2-3 порядка ниже, чем концентрация ВВ в аналогичных образцах (Рисунок 21).

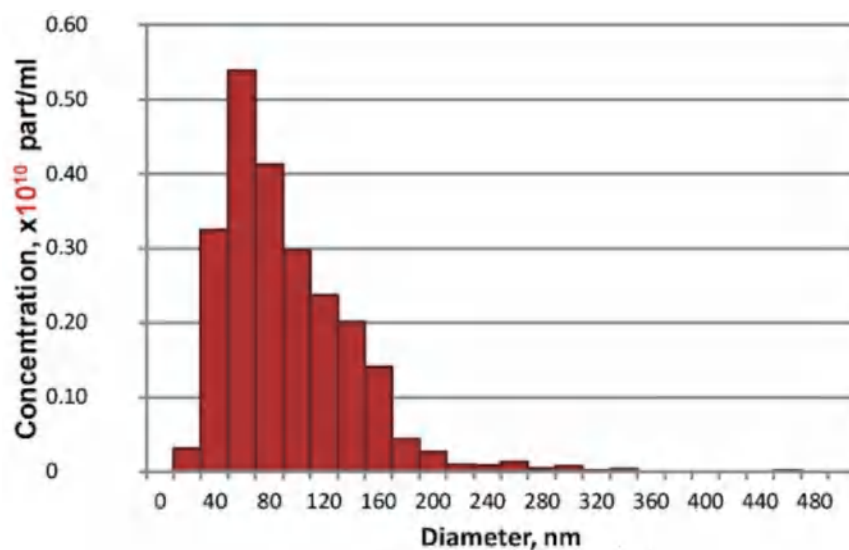


Рисунок 21. Распределение частиц по размерам в контрольном образце DMEM после центрифугирования – по результатам АТН.

4.2.2. Измерение содержания стоматина во внеклеточных везикулах

Наличие белков (стоматина, флотилинов, CRABP2, CD9) в образцах ВВ определяли методом иммуноблотинга [108].

На рисунке 22 представлены результаты иммуноблотинга образцов ВВ, полученных из трех клеточных линий А549, Н460, Н1299, а также для лизатов соответствующих клеток, причем уровень стоматина в экзосомах выше чем в лизате для каждой их трех пар образцов.

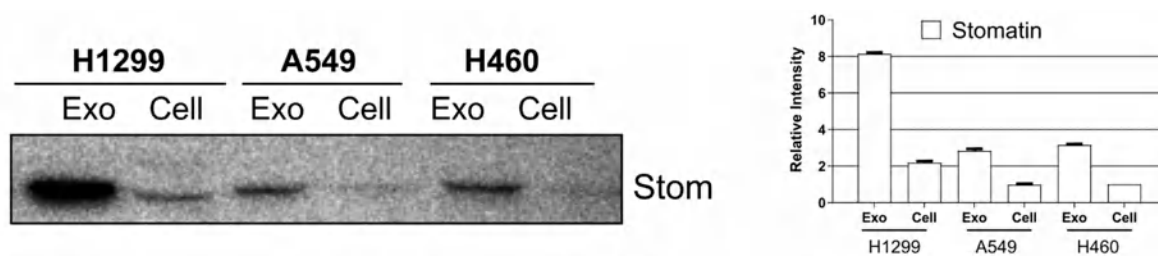


Рисунок 22. Анализ содержания стоматина в образцах внеклеточных везикул, секретируемых раковыми клетками различного происхождения *in vitro*. Справа – результаты денситометрии.

Проследим, как соотносится стоматин с другими белками экзосом (Рисунок 23). В исследованных образцах экзосом, содержащих стоматин, были также обнаружены известные экзосомальные маркеры – флотилины-1 и -2 и тетрапсин CD9. В качестве отрицательного контроля, подтверждающего отсутствие невезикулярных белков, использовали белок CRABP2. В начале подраздела 4.2.1 было указано, что мы характеризовали экзосомы в соответствии с рекомендациями ISEV[2]. Совокупность данных о размерах, морфологии частиц и наличии или отсутствию в них определенных маркеров позволяет нам утверждать, что мы действительно работаем с препаратом экзосом.

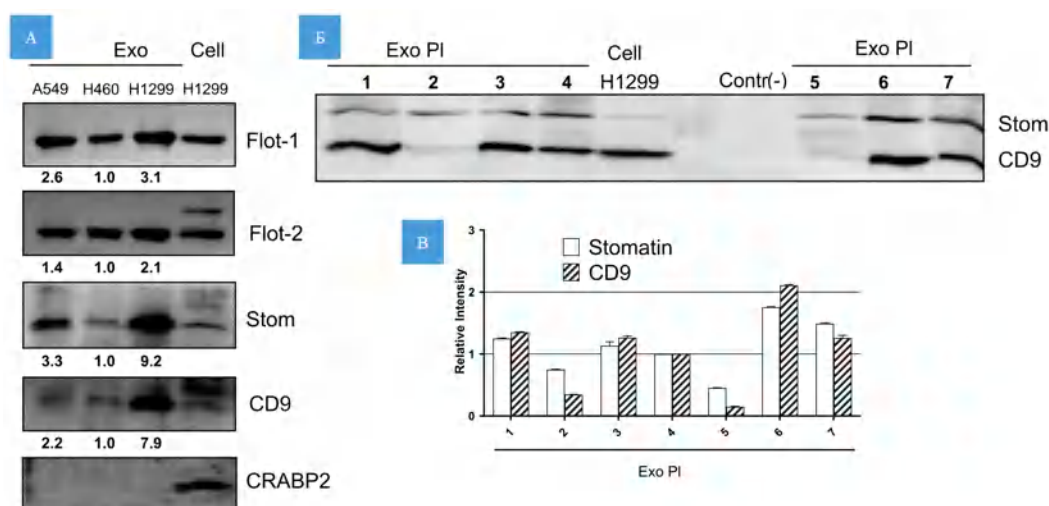


Рисунок 23. Анализ содержания стоматина и других белков (флотилинов-1 и -2, CD9, CRABP2) в образцах внеклеточных везикул различного происхождения.

(А) секретируемых раковыми клетками различных линий (контроль: лизат клеток H1299). (Б и В) Стоматин и CD9 в экзосомах, выделенных из плазмы крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого (дорожки 1-7); DMEM – отрицательный контроль. Лизат клеток H1299 – положительный контроль.

Эксперименты, описанные выше, проводились также и на клинических образцах, полученных из плазмы крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого (Рисунок 23Б). Эксперименты были проведены с образцами экзосом из крови семи пациентов (дорожки 1-7). Видно, что во всех образцах был обнаружен стоматин и CD9. В контрольном образце (DMEM с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки) эти белки обнаружены не были. В качестве положительного контроля использован лизат клеток H1299.

Столбцы на рисунке 23В представляют собой среднее изменение яркости полос на геле для трех независимых измерений. Видно, что интенсивности стоматина и CD9 связаны друг с другом, что позволяет рассматривать стоматин как потенциальный экзосомальный маркер.

Приведем примеры нескольких работ, в которых метод ПЭМ использовался в комплексе биохимических и биофизических методов при изучении состава и свойств ВВ – аналогично тому, как он использовался в нашей работе со стоматинном. В статье [110] проведено исследование роли экзосом в переносе нуклеиновых кислот между клетками рака груди различных линий. Исследование было сосредоточено вокруг гена PIK3CA, который имеет мутацию в клетках MCF7, и не имеет ее в клетках MDA-MB-231. Было показано, что экзосомы, выделенные из клеток линии MCF7, несут в себе мутантную кДНК гена PIK3CA, и они могут сливаться с клетками MDA-MB-231. Методом ПЦР в реальном времени небольшое количество мутантной ДНК гена PIK3CA обнаруживалось в клетках MDA-MB-231 после их обработки экзосомами, выделенными из MCF7. На этапе выделения экзосом их чистоту и размеры контролировали методом ПЭМ с негативным контрастированием, наличие экзосомальных маркеров проверяли с помощью иммуноблотинга (CD9, CD81, а также отсутствие маркера Vcl-2).

В упоминавшийся выше работе [8] предложен высокочувствительный анализ, выявляющий содержание маркера EpcAM – молекулы клеточной адгезии эпителия. Процедура анализа аналогична обычным иммуноаналитическим тест-полоскам, но отличается методом детекции. Вместо коллоидного золота, которое обычно используется в качестве проявляющего агента, в работе [8] использованы магнитные наночастицы и магнетометр для детекции сигнала. В отличие от

обычных тест-полосок, эта система не позволяет проводить детекцию невооруженным глазом, но зато обеспечивает высокую чувствительность (на 1-2 порядка лучше, чем ИФА). На этапе выделения экзосом их чистоту и размеры контролировали методами ПЭМ и АТН.

Аналогичных примеров можно найти множество ([38], [111], [112] и др.) – во многих работах ПЭМ используют как необходимый шаг в характеристике и валидации образцов экзосом и других ВВ.

Итак, было обнаружено присутствие стоматина в экзосомах, продуцируемых раковыми клетками (немелкоклеточный рак легкого, A549, H460, H1299), а также в экзосомах из плазмы крови. Кроме того, стоматин был обнаружен в других экзосомах – из клеток рака груди и яичников, а также из некоторых физиологических жидкостей – асцитической жидкости и смыва из полости матки [108]. Высокое содержание стоматина в экзосомах различного происхождения делает его многообещающим экзосомальным маркером. Этот вывод стал возможен, в частности, благодаря тому, что образцы экзосом охарактеризованы методами ПЭМ и АТН.

4.3. Методические аспекты исследования везикул методом АСМ

4.3.1. Подготовка образцов

В литературном обзоре было показано, что количество работ, в которых для визуализации ВВ использован метод АСМ, несравненно меньше, чем количество работ, в которых для решения этой задачи использован ПЭМ. И нам удалось найти только одну работу [113], которая посвящена методическим вопросам характеристики ВВ с помощью АСМ – именно ее мы и взяли за основу при разработке методики.

Для каждого эксперимента на АСМ использовали серии разведений образцов внеклеточных везикул в однократном фосфатно-солевом буфере (PBS). В качестве подложки применяли свежесколотую слюду, рабочую сторону которой модифицировали 5мМ NiCl₂ в течение двух минут, для того чтобы изменить отрицательный заряд на её поверхности, на положительный. Такая модификация предполагает снижение электростатических взаимодействий,

препятствующих адсорбции ВВ. Аналогичная подложка используется для визуализации ДНК [114], [115], ДНК-белковых комплексов и мембранных белков [115], [116].

Приготовленные разведенные суспензии ВВ наносили на подложки каплями по 40 мкл. В каждом эксперименте в качестве контрольного образца использовали аналогичную модифицированную подложку, обработанную 40 мкл PBS. После 5 минут адсорбции, образцы отмывали от неадсорбированных частиц в трех каплях дистиллированной воды в течение 15 минут. В отличие от единственной методической статьи по этой теме [113], мы проводили короткую адсорбцию, а не длительную (~12 часов). Мы считаем, что это стало возможным благодаря более высокой концентрации экзосом в суспензии. Мы работали с суспензиями, концентрации которых составляли $\sim 10^{11}$ частиц/мл и выше, а авторы работы [113] использовали концентрации между 4×10^9 и 4×10^{10} частиц/мл.

Стадия отмывки образца от избытка солей критически важна. Соль легко кристаллизуется, и уже при концентрации порядка ~ 10 мМ и времени инкубации ~ 10 с, если образец не отмывать, на нем можно обнаружить нанокристаллы. Если же речь идет о сравнительно высокой ионной силе, на уровне 150 мМ, как в физиологическом растворе или в PBS, то отмывка необходима, иначе адсорбированные на подложку объекты будут покрыты кристаллами соли.

После отмывки высушивание образцов проводили сжатым воздухом, чтобы не допустить неравномерного распределения везикул при естественном высыхании в комнатной температуре и налипания посторонних частиц на образцы. Эта рекомендация имеется в работе [113] и, кроме того, она соответствует практике рутинных измерений на АСМ [117].

4.3.2. Получение АСМ изображений

Исследование образцов внеклеточных везикул методом АСМ сопровождалось получением серии изображений с изменением размера поля зрения, но при фиксированном числе точек/строк сканирования (512 x 512). Сначала проводили сканирование сравнительно крупных полей зрения (до 10 x 10 мкм), для оценки общего рельефа образца и настройки режима (выбора

амплитуды свободных колебаний кантилевера и рабочей амплитуды, выбора частоты сканирования, настройки обратной связи). Внутри крупных полей зрения с достаточной концентрацией ВВ снимали несколько кадров с размером 3 x 3 мкм, и для каждого из этих меньших полей сканирования получали еще 1-2 изображения с размером 1,5 x 1,5 мкм (Рисунок 24), настройки режима при необходимости оптимизировали. Стандартными полями зрения, для которых проводилась обработка данных во всех экспериментах являются 1,5 x 1,5 мкм и 3 x 3 мкм – именно эти поля зрения использовались для вычислений.

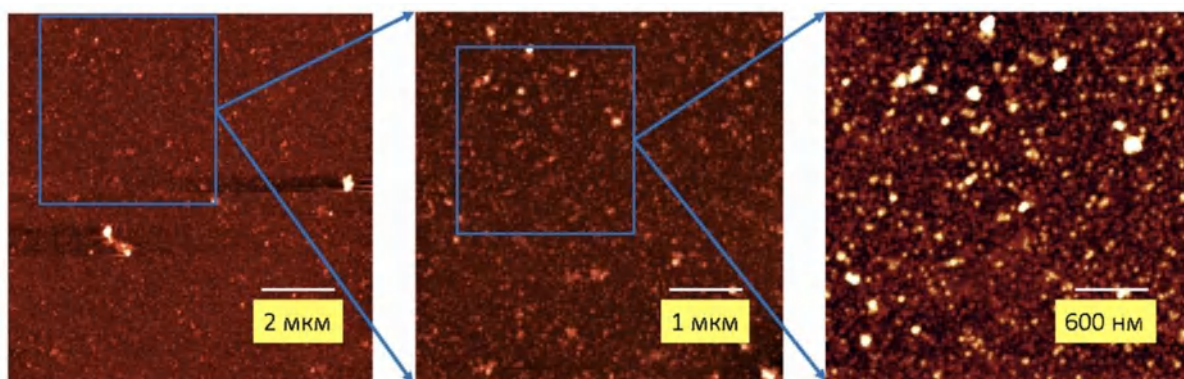


Рисунок 24. Изображение экзосом, выделенных из A549, на слюде, модифицированной ионами никеля.

Полученные данные обрабатывали с помощью средств обработки изображений: Nova, Femtoscan online, ImageAnalysis. С использованием перечисленных программ устраняли общий наклон и сдвиги строк друг относительно друга, при необходимости с помощью медианной фильтрации удаляли шумы. Затем с помощью SPMImageMagic проводили автоматизированный подсчет везикул и измерение их размеров. Частицы, расположенные на краях кадра, исключали из выборки, так как они не входили в исследуемую область целиком, и оценка их размеров была затруднена. Аналогично поступали и с частицами, у которых на изображении были недостаточно четкие границы.

Для проверки самосогласованности получаемых после обработки данных было предложено три критерия:

1. Отсутствие зависимости размера частиц от выбора поля зрения;
2. Независимость поверхностной плотности частиц от поля сканирования;

3. Вариация количества частиц в поле зрения, в зависимости от концентрации образца, при постоянстве средних размеров частиц.

Эти правила не являются специфическими для ВВ – их можно применять к изображениям белков или, например, неорганических наночастиц. Более того, они не специфичны для метода АСМ и могут быть также необходимы для работ, описывающих объекты с помощью различных видов оптической микроскопии или ПЭМ. Однако в исследованиях ВВ на АСМ такие проверки редки, мы надеемся, что выполнение этих критериев позволит избежать характерных для этого метода артефактов [118].

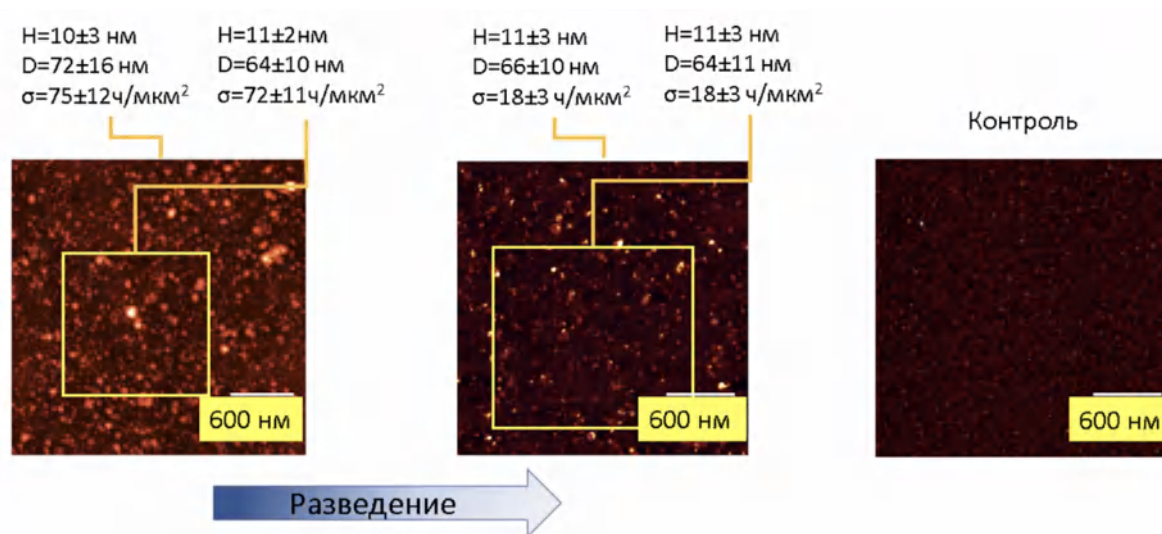


Рисунок 25. Пример проверки соответствия АСМ-изображений предложенным критериям. В верхней части представлены значения средней высоты частиц над подложкой H , среднего диаметра D и средней поверхностной плотности.

На рисунке 25 приведен пример проверки соответствия образца, полученного из среды культивирования раковых клеток линии А549, критериям самосогласованности. Во-первых, средние размеры частиц (высота 11 ± 3 нм и латеральный размер 68 ± 12 нм по 14 кадрам) не изменяются при переходе между полями зрения. Во-вторых, средняя поверхностная плотность частиц также не зависит от выбора рассматриваемого поля. Для полей зрения с размером $1,5 \times 1,5$ и 3×3 мкм шаг сканирования составлял приблизительно 3 и 6 нм соответственно. Эти значения значительно меньше типичного диаметра частиц ($D > 60$ нм), поэтому погрешность дискретизации не влияет на измерения. В-третьих, как визуально, так и при количественной обработке заметно изменение среднего

количества частиц в поле зрения при изменении концентрации наносимого образца (Рисунок 26).

Подобным образом мы исследовали 3 образца (выделенные из сред культивирования A549 и Colo704, а также клеток плаценты человека) и убедились, что благодаря нашей методике мы можем получать воспроизводимые и непротиворечивые результаты.

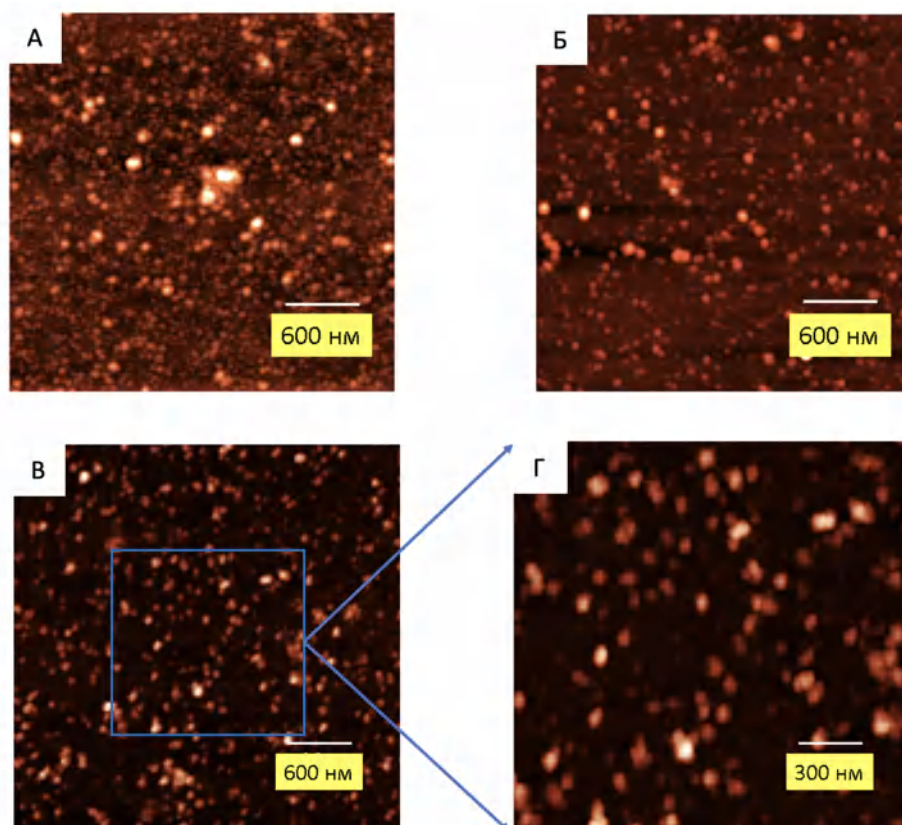


Рисунок 26. АСМ изображения образцов ВВ. А, Б – ВВ, выделенные из среды культивирования клеток Colo704. В, Г – ВВ, выделенные из среды культивирования клеток плаценты человека.

Таким образом, при достаточно высокой концентрации образца можно радикально сократить время инкубации везикул на подложке, по сравнению с ~12 ч, которые рекомендованы в работе [113].

4.3.3. Сравнение результатов АСМ, ПЭМ и АТН

Образцы внеклеточных везикул, выделенные из клеточных культур Colo704 и A549, исследовали тремя методами: ПЭМ, АТН и АСМ. Это позволило

сопоставить данные о размерах частиц, полученные с помощью методов, основанных на разных принципах (Рисунок 27).

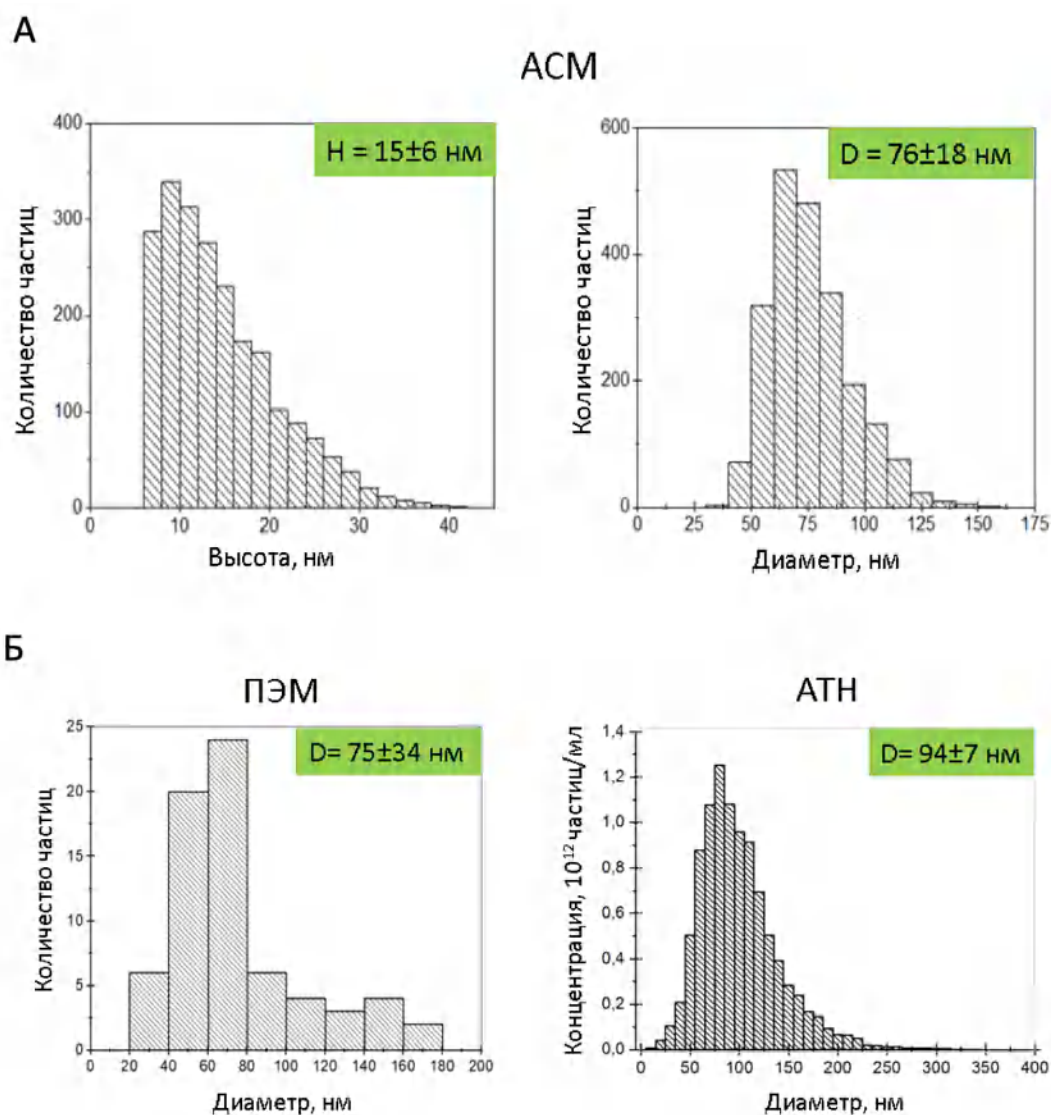


Рисунок 27. Сопоставление результатов, полученных разными методами.

А – измерения на АСМ, Б – диаметры ВВ по данным ПЭМ и АТН.

АСМ позволяет измерять не только латеральные размеры адсорбированных частиц, но и их высоту над подложкой. Она составляет 15 ± 6 нм оказывается значительно меньше ширины, как это часто бывает; расхождение между высотой и латеральным размером является следствием, как минимум, двух факторов – расплющивания частиц на подложке при их адсорбции и аппаратного уширения, связанного с конечным радиусом кривизны кантилевера. Сравнить высоту, измеренную АСМ, с данными других методов практически бесполезно, но

полезно сверить её с ранее полученными результатами на АСМ. Наши результаты согласуются с данными из статьи [119], в которой было показано, что для крупных везикулы, изолированных с помощью разных протоколов.

Латеральный размер, измеренный АСМ, составляет 76 ± 18 нм, что отлично совпадает с размером, измеренным ПЭМ 75 ± 34 нм (Рисунок 27). Можно было ожидать, что размер, определенный АСМ, будет больше из-за уширения объектов кантилевером. Вероятно, этого не наблюдается, так как среди адсорбированных объектов присутствуют сравнительно мелкие примеси невезикулярной природы, которые попадают в выборку и смещают распределение по размерам влево. Наблюдаемый эффект «компенсирует» сдвиг распределения вправо из-за уширения.

Как можно заметить, диаметры ВВ, полученные с помощью анализа траекторий наночастиц 94 ± 7 нм значительно отличаются от полученных другими методами. Такое расхождение уже наблюдалось в литературе при сравнении методов характеристики внеклеточных везикул [113]. Возможно, это связано с объединением частиц в агрегаты, что сдвигает средние размеры частиц по выборке в сторону больших значений.

В ходе работы показано, что предложенная нами методика исследования внеклеточных везикул методом АСМ, позволяет добиться высокой воспроизводимости результатов экспериментов. В дополнение к этому, данный протокол значительно сокращает время приготовления образца, по сравнению с ранее описанными в литературе (20 минут против 12 часов). С помощью этого подхода мы исследовали на АСМ три образца ВВ различного происхождения. Анализ экспериментальных данных показал их самосогласованность, так как размерные характеристики частиц не зависели от выбора поля зрения, а средняя поверхностная плотность варьировала при изменении концентрации исследуемого образца. Для образца, выделенного из клеток плаценты человека, проведено сопоставление размеров, измеренных методами АСМ, ПЭМ и АТН. Анализ АСМ-изображений выявил, что данные о размерах частиц хорошо соотносятся с данными, полученными другими методами.

4.4. Корреляционная АСМ и ПЭМ изображений везикул

4.4.1. Разработка методики исследования везикул с помощью корреляционной микроскопии

Морфология «сдутых мячиков» (cup-shaped morphology) позволяет отличать внеклеточные везикулы от других частиц по наличию контрастного центра. На полученных нами АСМ-изображениях внеклеточных везикул, мы наблюдали, что большая часть визуализированных на АСМ частиц не имеет такой морфологии. Поэтому нами было сделан вывод, что данная морфология является артефактом метода ПЭМ [120]. При этом, как нами уже было отмечено в литературном обзоре, морфология сдутых мячиков является характерной при исследовании внеклеточных везикул методом ПЭМ с применением негативного контрастирования, а при исследовании методом криоэлектронной микроскопии и методом просвечивающей электронной микроскопии на срезах данный артефакт не воспроизводится. Априори любые артефакты мешают проведению измерений и искажают результаты, но в данном случае морфология «сдутых мячиков» является характеристической и позволяет отличать внеклеточные везикулы от других частиц, адсорбированных на подложку.

Для изучения механизма возникновения характеристической морфологии ВВ на ПЭМ-изображениях, мы разработали методику АСМ-ПЭМ корреляционной микроскопии. Данная методика позволяет получать АСМ и ПЭМ изображения одних и тех же внеклеточных везикул на различных микроскопах. С ее помощью мы можем учитывать артефакты каждого из методов визуализации ВВ, таких как изменение формы частиц, вызванное адсорбцией на подложку и высушиванием; уширение объектов, связанное с конечным размером кантилевера, при сканировании на АСМ; возможное влияние ацетата уранила, связанное с неравномерным контрастированием и другие. Кроме того, мы получаем возможность напрямую сравнить размеры индивидуальных объектов с учетом возможных различий в калибровке микроскопов.

В качестве подложки, на которую наносили внеклеточные везикулы, использовали сетки для электронного микроскопа с углеродным покрытием

(Рисунок 28). Их диаметр равен 3,05 мм; с характерным размером ячейки 204 мкм. Везикулы оказывались на подложке из аморфного углерода, обработанного в тлеющем разряде.

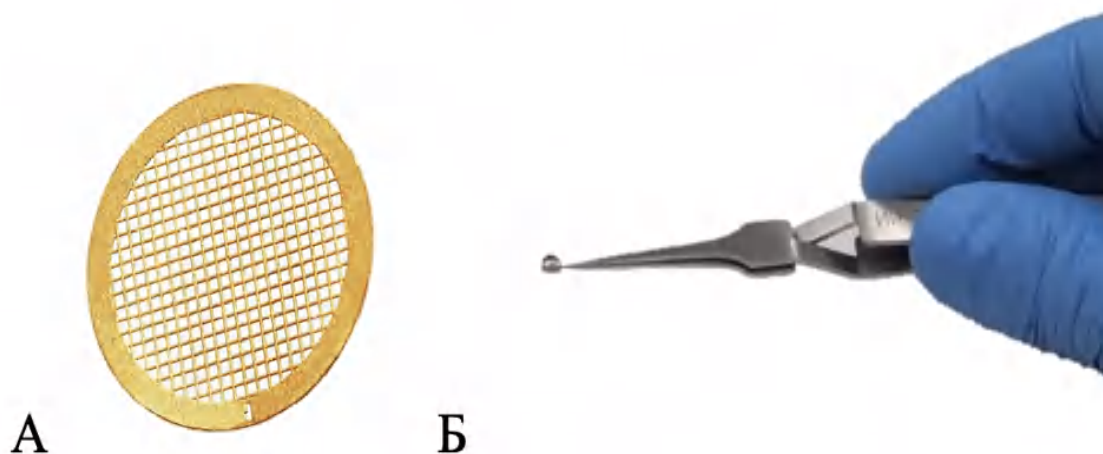


Рисунок 28. Изображение сетки для просвечивающего электронного микроскопа. А – сетка для электронного микроскопа, Б – пинцет для электронной микроскопии и сетка для электронного микроскопа.

Последовательность исследования образцов внеклеточных везикул на АСМ и на ПЭМ может быть различной. Можно сначала проводить измерения на АСМ, а затем ПЭМ или наоборот (Рисунок 29). Процесс нанесения ВВ на подложку состоит из стандартных шагов этапов – обработки сетки в тлеющем разряде, адсорбции ВВ из суспензии, контрастирования с помощью ацетата уранила, высушивания образца.

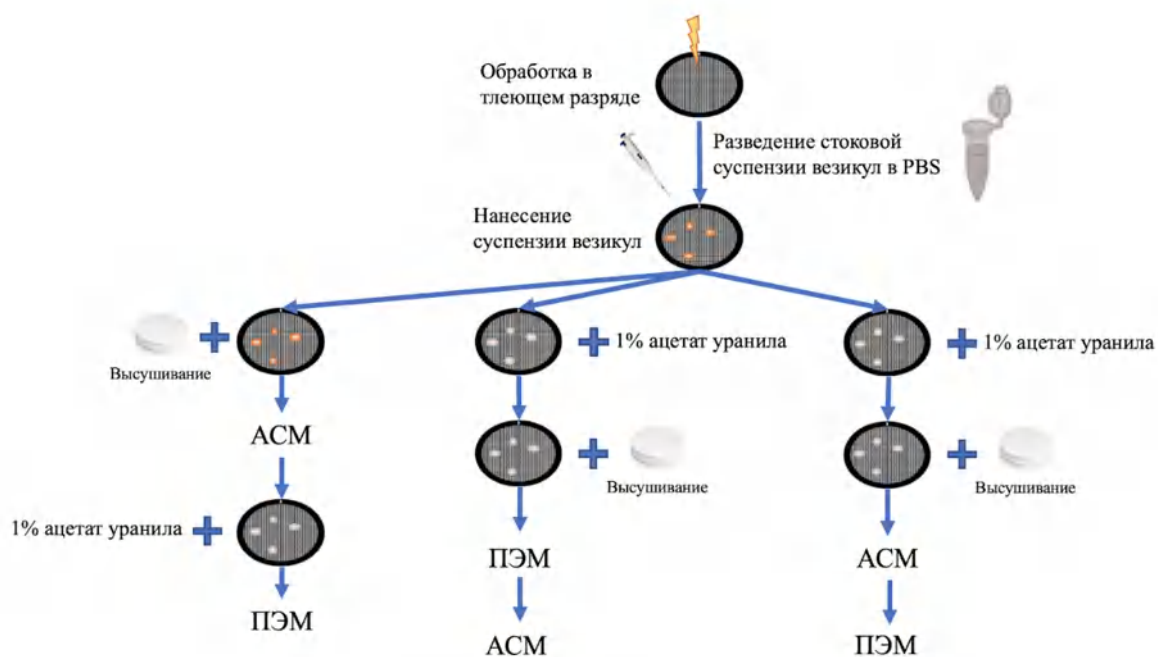


Рисунок 29. Схема эксперимента по исследованию образцов с использованием корреляционной микроскопии. Образец наносят на сетку, затем эту сетку исследуют методами АСМ и ПЭМ.

Нами было обнаружено, что если сначала использовать ПЭМ, а потом АСМ микроскопию, то на некоторых АСМ изображениях наблюдались такие структуры, которые на ПЭМ не были видны. Они были интерпретированы как радиационные повреждения образца; они появлялись даже в том случае если при съемке на ПЭМ использовали низкую интенсивность пучка электронов (пучок разводили, чтобы снизить яркость, а время экспозиции увеличивали). Это явление проиллюстрировано на рисунке 30, на нём видно, что вокруг внеклеточной везикулы наблюдаются контрастные частицы, выступающие над подложкой, а на АСМ-изображениях вокруг везикулы находятся темные круги – радиационные повреждения образца. Основываясь на этих наблюдениях, мы пришли к выводу, что предпочтительнее сначала использовать АСМ, затем ПЭМ.

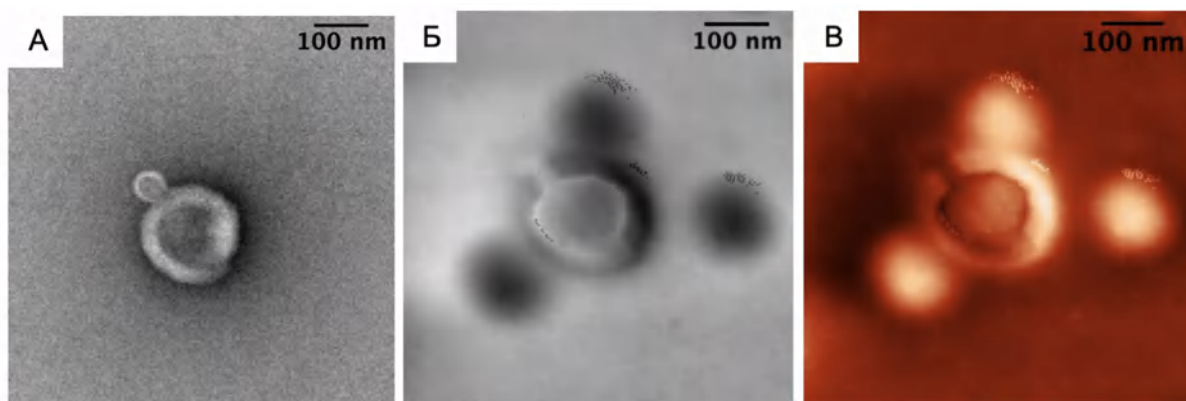


Рисунок 30. Изображение внеклеточных везикул, иллюстрирующее радиационные повреждения образца. А – ПЭМ изображение везикулы; Б и В – АСМ изображения везикулы и дефектов в оттенках серого в инвертированной шкале и в оттенках красного.

Как проиллюстрировано на рисунке 29, можно наносить ацетат уранила на образец как до исследования на АСМ, так и после. В первом случае он может исказить изображения, получаемые на АСМ, так как ацетат уранила может создать дополнительный слой адсорбата на подложке. Во втором случае необходим дополнительный цикл обработки сетки в тлеющем разряде – после исследования на АСМ, который также может привести к повреждению образца. Обычно мы использовали первый вариант, т.е. наносили ацетат уранила до исследования методом АСМ. Действительно, типичная размер зерна ацетата уранила на подложке составляет менее 1 нм [121], что заметно меньше характерного размера экзосом.

Для совмещения изображений, полученных двумя методами, нам необходимо найти площадку с размером приблизительно $\sim 1 \times 1$ мкм² (это типичный размер поля зрения, исследуемого методами ПЭМ или АСМ для получения изображений ВВ) на сетке с площадью ~ 7 мм². Чтобы это стало возможным, мы предложили процедуру “навигации”, то есть выбора поля зрения относительно центра сетки или заметных на ней дефектов. Для поиска общих полей зрения на АСМ и на ПЭМ мы использовали следующую последовательность действий.

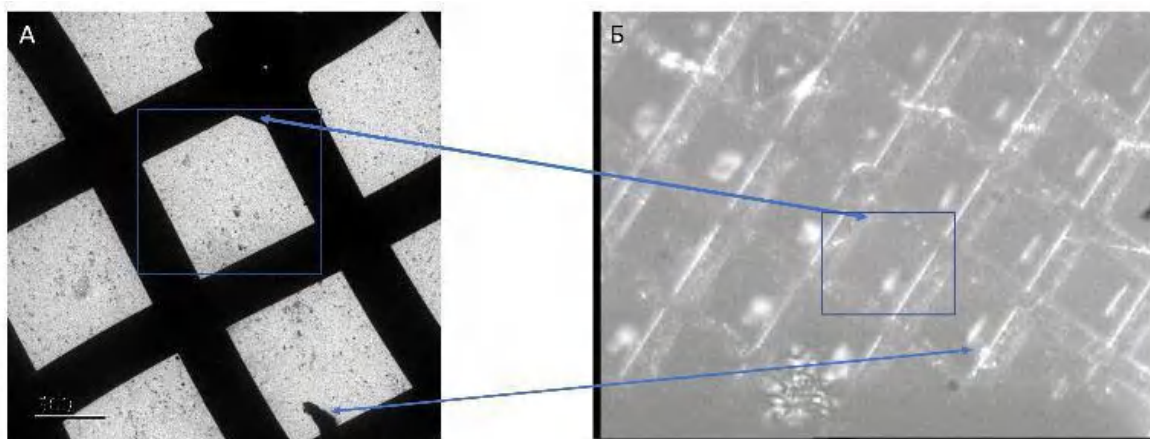


Рисунок 31. Изображение центральной части сетки для просвечивающего электронного микроскопа, полученное с помощью ПЭМ (А) и оптического микроскопа (Б). Стрелки указывают соответствие между одними и теми же объектами – краем центрального «зерна» и крупным дефектом – на двух изображениях.

При исследовании методом АСМ использовали совмещенный с АСМ оптический микроскоп и получали изображения образца с малым увеличением. Сетки для электронной микроскопии (Ted Pella) имеют характерную структуру повторяющихся ячеек, а центр сетки имеет форму зерна. Таким образом, каждая из четырех центральных ячеек имеет характерный контур, который легко обнаружить как на ПЭМ, так и на АСМ (Рисунок 31). Эти особенности позволяли нам выбрать для исследования определенную ячейку сетки, а не случайную, как это обычно бывает при повседневных исследованиях. Мы могли ориентироваться относительно сгустков контрастирующего агента (ацетата уранила), краев ячейки, дефектов и агрегатов частиц, осажденных на подложку. Иногда таких «ячеек для детального анализа» выбирали несколько, до трех штук на одной сетке. Дальнейшая работа включала следующие основные шаги:

1. В пределах выбранной ячейки получали серию полей зрения с разным размером (с разным увеличением) так, чтобы одно поле зрения находилось внутри другого. Пример такой серии представлен на рисунке 32. Обычно использовали диапазон размеров от $5 \times 5 \text{ мкм}^2$ до $50 \times 50 \text{ мкм}^2$.
2. На изображении с размером в диапазоне $5 \times 5 \text{ мкм}^2$ – $10 \times 10 \text{ мкм}^2$ выбирали несколько частиц, для которых получали изображения с наилучшим

разрешением. Обычно размер поля зрения составлял не более 2×2 мкм², а шаг сканирования не более 4 нм.

3. После получения изображений нескольких частиц методом АСМ переходили к исследованию методом ПЭМ. В начале эксперимента уделяли большое внимание тому, какой стороной поместить сетку в держатель. Метод ПЭМ позволяет получать изображения значительно быстрее, чем АСМ, и найти нужную область сравнительно легко. При получении ПЭМ-изображений мы ориентировались на особенности, найденные на АСМ-снимках. Таким особенностями являлись сгустков контрастирующего агента, агрегаты частиц, группы частиц. Отдельные частицы везикул видны плохо, однако интенсивно окрашенные объекты, которые на ПЭМ выглядят черным, и обычно были видны на АСМ в виде возвышенностей. Выступы на АСМ хорошо совпадали с черными сгустками контрастирующего агента и агрегатами частиц на полученных с использованием ПЭМ-изображениях (Рисунок 32).

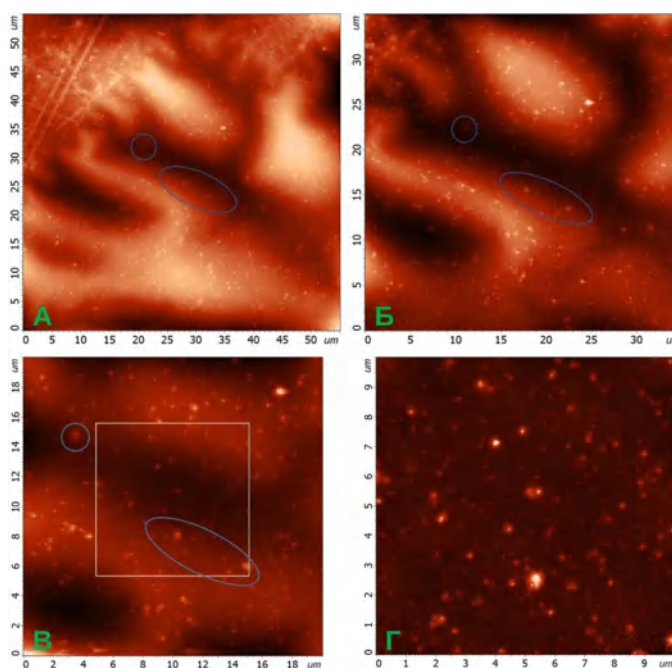


Рисунок 32. Серия АСМ-изображений ВВ из клеток MCF-7 на сетке для ПЭМ. На кадре А видны края ячейки. Синие линии выделяют характерные элементы на кадрах А-В. Рамка показывает положение кадра Г относительно кадра В.

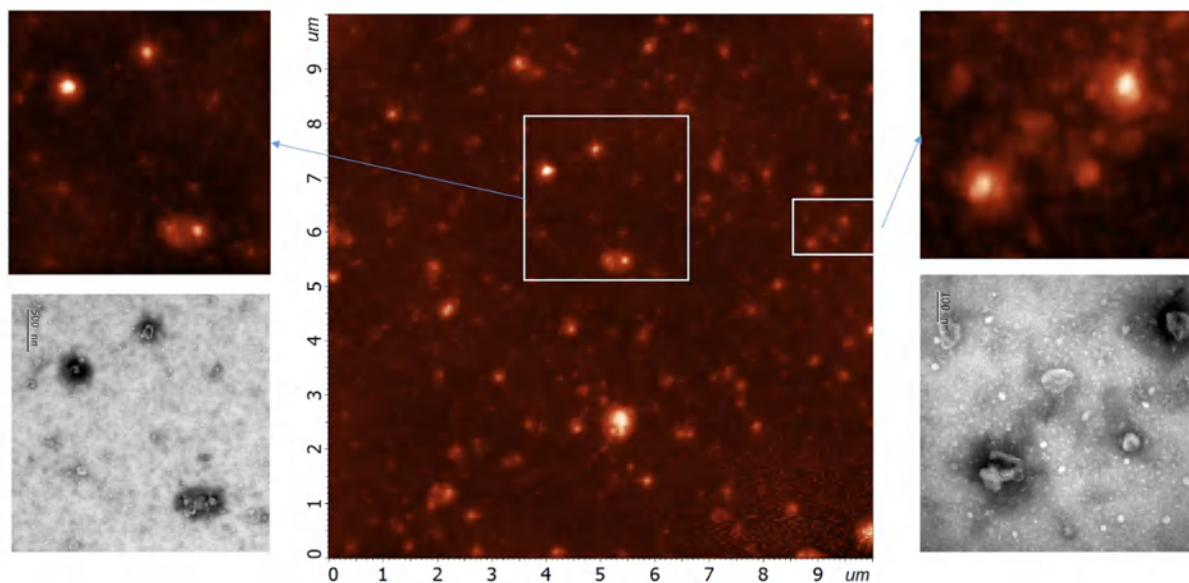


Рисунок 33. Изображение общих полей зрения на АСМ (в оттенках красного) и на ПЭМ (в оттенках серого).

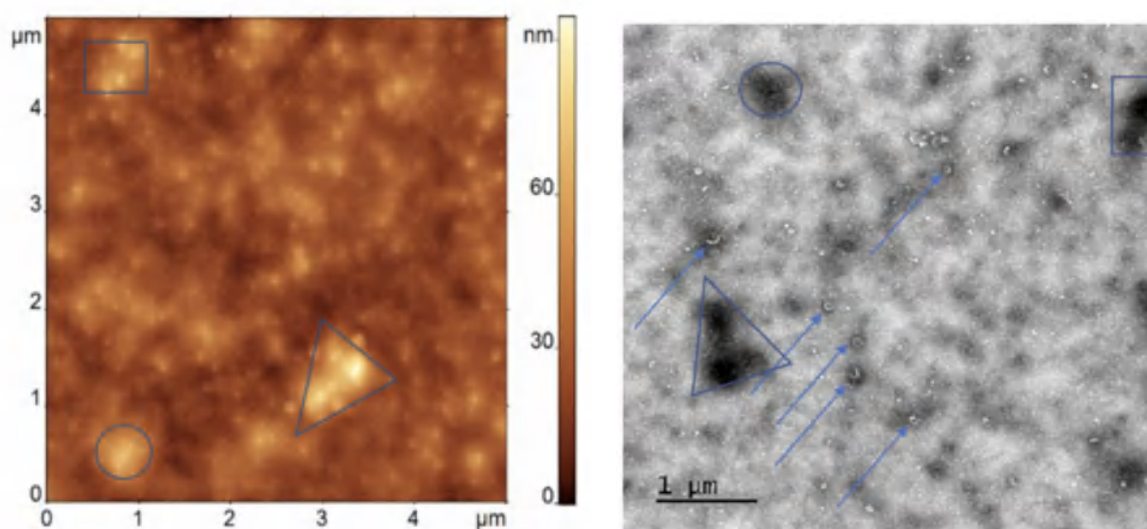


Рисунок 34. Изображение, полученное с использованием АСМ и ПЭМ, с отмеченными артефактами (сгустками ацетата уранила, агрегатами частиц).

Итак, в результате эксперимента мы получали изображения одних и тех же частиц, которые можно было попарно обрабатывать и сравнивать. Используемая нами методика проведения измерений оказалась трудоемкой – обычно измерения занимали, как минимум, два дня. В нескольких аспектах методика может быть оптимизирована для ускорения работы:

1. Использование более современного и быстрого атомно-силового микроскопа позволит значительно быстрее получать АСМ-изображения. Именно измерения на АСМ являются наиболее затратным по времени этапом.
2. Использование моторизованного столика для АСМ может ускорить выбор поля зрения.

4.4.2. Обработка изображений, полученных методом корреляционной микроскопии

В результате экспериментов мы собрали пары изображений двадцати частиц, полученных методами АСМ и ПЭМ, для которых размер пикселя на каждом изображении из пары составлял не более 1 нм. Это были изображения экзосом, выделенных из сред культивирования клеток MCF-7 и SKOV3, а также из маточного аспирата. При обработке и анализе изображений мы не учитывали происхождения экзосом. Две пары изображений для примера представлены на рисунке 35.

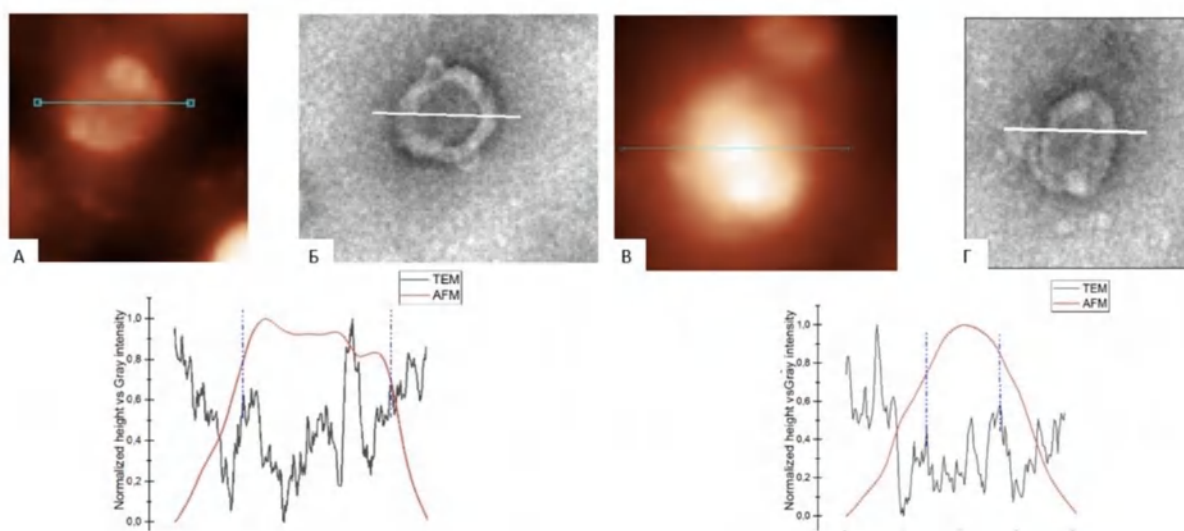


Рисунок 35. Снимки одного и того же поля зрения, содержащего несколько ВВ, полученные с использованием разных микроскопов (А, В – АСМ; Б, Г – ПЭМ).

По данным ПЭМ, все 20 частиц имели морфологию “сдутых мячиков”, однако по данным АСМ она характерна только для 2 из 20 частиц, а остальные 18 из 20 не имели видимого на ПЭМ углубления (Рисунок 36). Итак, можно сделать

вывод, что морфология ВВ «сдутые мячики» (cup-shaped morphology), которая для ПЭМ является типичной и общепринятой, не соответствует рельефу поверхности на АСМ.

Судя по данным, полученным методом АСМ, некоторые частицы действительно деформируются и имеют углубление в центральной части и на краю. Однако, их доля на общем фоне невелика, и деформация не является главным фактором, который приводит к возникновению «cup-shaped morphology» на ПЭМ-изображениях. Можно предположить, что более важным фактором является затекание сгустками контрастирующего агента (ацетата уранила) внутрь ВВ. Можно провести аналогию с аденоассоциированными вирусами – на ПЭМ-изображениях они имеют или не имеют затемнение в центральной области в зависимости от того, затек ли внутрь них контрастирующий агент [122], [123]. Эти вирусы имеют большое значение для генотерапии; ПЭМ позволяет вычислить долю частиц, внутри которых содержится генетический материал, и отличить их от пустых капсидов. Внутри пустых капсидов ацетат уранила проникает – и соответствующие частицы имеют затемнение в центральной области.

Обсудим количественные измерения размеров индивидуальных частиц (Рисунок 36). По графикам сечений мы измеряли и сопоставляли размеры индивидуальных частиц. Как было отмечено в литературном обзоре, высоты адсорбированных частиц могут меняться в зависимости от типа подложки, ею может быть, например, слюда, стекло, металл и тд. Это явление также связано с влиянием сил поверхностного натяжения, которые варьируются в зависимости от типа подложки. Высота внеклеточных везикул над углеродной подложкой по данным АСМ составила 10-32 нм, высота аналогичных частиц над поверхностью слюды, модифицированной ионами никеля, составила 10-20 нм. Литературных данных о высотах внеклеточных везикул, адсорбированных на сетки для электронного микроскопа, мы не обнаружили. Для внеклеточных везикул, выделенных из раковых клеток и адсорбированных на слюду, высота над подложкой составила 30-48 нм [48], [49]. Для везикул, выделенных из клеток носоглоточной карциномы человека, линии 5-8F, и адсорбированных на слюду,

модифицированную АРТЕС, высота над подложкой составила 21-50 нм [124]. Для везикул, выделенных из слюны здоровых пациентов, и адсорбированных на слюду, высота над подложкой составила 3-5 нм [45].

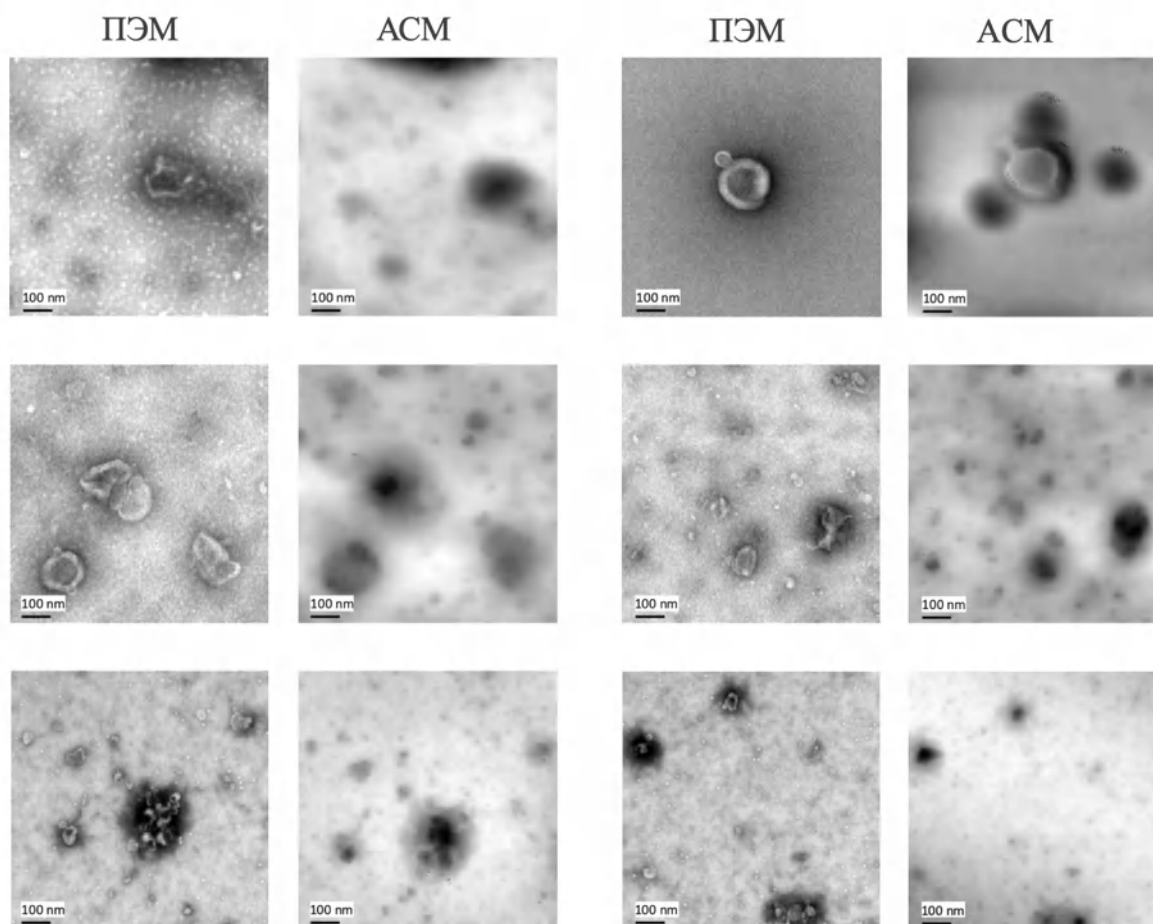


Рисунок 36. ПЭМ и АСМ изображения внеклеточных везикул, АСМ изображения представлены в инвертированной серой палитре.

Нами было проведено попарное сравнение диаметров для выборки из 20 внеклеточных везикул: размеры ВВ на АСМ и ПЭМ изображениях также отличались друг от друга (Таблица 3). Данный результат может быть связан с множеством факторов, например, разная калибровка микроскопов, уширение объектов на АСМ из-за кантилевера, вклада слоя ацетата уранила, которым окрашены ВВ. Однако, эта разница может быть связана и с более важными структурными факторами ВВ. Например, белки, которые присутствуют в составе большинства физиологических жидкостей и могут налипать на поверхность внеклеточных везикул, на ПЭМ кажутся прозрачными для электронного пучка, так как мы не различаем структуры отдельных молекул. При этом на АСМ они

видны и вносят некоторый вклад в размер частицы. Более того, отсутствие углубления в центре некоторых внеклеточных везикул на АСМ, в сравнении с изображениями ПЭМ, на которых везде виден контрастный центр, также подтверждает эту гипотезу, связанную с налипанием молекул белков на поверхность ВВ.

Таблица 3. Таблица с попарным сравнением диаметров изображений отдельных внеклеточных везикул, полученных различными методами.

Название кадра	Номер частицы	Размер вдоль оси x, нм (АСМ)	Размер вдоль оси y, нм (АСМ)	Размер вдоль оси x, нм (ПЭМ)	Размер вдоль оси y, нм (ПЭМ)
18cm frame03 left	1	169	171	123	125
18cm frame03 left	2	145	187	138	146
13cm frame01	3	192	202	190	189
05scov3 image12	4	368	282	324	235
18cm image11	5	151	188	108	133
18cm image11	6	121	104	87	97
18cm image11	7	59	43	38	39
18cm image11	8	58	59	54	56
18cm image11	9	94	96	88	90
MCF-7-TR image02 1	10	120	192	116	181
MCF-7-TR image02 1	11	147	137	103	113

MCF-7-TR image02 1	12	139	89	130	86
MCF-7-TR image02 1	13	68	62	59	50
MCF-7-TR frame10	14	128	186	125	180
MCF-7-TR frame10	15	80	79	78	71
MCF-7-TR frame10	16	194	162	179	140
MCF-7-TR frame10	17	101	117	95	101
MCF-7-TR frame10	18	172	146	170	143
MCF-7-TR frame10	19	99	129	91	116
MCF-7-TR frame10	20	114	82	90	59

4.4.3. Оценка точности совмещения изображений

Методы АСМ и ПЭМ очень различны по своей технической реализации, и погрешности измерений, выполняемых этими методами, определяются разными факторами. Результаты измерений методами АСМ и ПЭМ, хотя и близки, но не совпадают строго – и возникает вопрос о количественной оценке этого совпадения [125], [126].

Для АСМ наибольший вклад в погрешность вносят следующие факторы:

- уширение объектов, связанное с конечным размером кантилевера;
- нелинейность, крип и гистерезис сканера;
- шумы блока электроники и лазерно-оптической системы;
- механические шумы.

При работе с органическими образцами, такими как ВВ, также можно отметить возможную деформацию образцов под действием силы со стороны зонда. Для ПЭМ наибольший вклад в погрешность вносят следующие факторы:

- электрические и механические шумы;
- стабильность и астигматизм магнитных линз;
- хроматические аберрации магнитных линз (электроны с разными длинами волн фокусируются в разные плоскости);
- шумы детектирующей системы.

Кроме того, вклад в погрешность вносит слой ацетата уранила, которым окрашены образцы. Оба обсуждаемых метода, АСМ и ПЭМ, чувствительны к дрейфам, прежде всего, к термическим дрейфам, которые приводят к изменению положения образца относительно держателя и микроскопа в целом. Каждый из обсуждаемых методов имеет погрешность калибровки, но, очевидно они калибруются по разным эталонам. Для ПЭМ обычно используют специализированные углеродные реплики, ВТМ или кристаллы каталазы. Для АСМ используют кремниевые периодические структуры с рельефом известного размера.

По данным таблицы 3, мы можем вычислить размеры индивидуальных частиц по данным АСМ и ПЭМ, и вычислить разности этих размеров. Оказывается, что они составляют 17 нм и 18 нм по осям X и Y соответственно. Могут ли эти числа считаться адекватной оценкой точности совмещения изображений, полученных двумя методами? Вероятно, нет, т.к. эти числа учитывают лишь малую долю информации, содержащейся на каждом изображении. Количество пикселей, которое используется для отображения типичной экзосомы, составляет порядка ~ 100 , и логично использовать максимально возможное количество для оценки точности совмещения. Более того, можно попытаться использовать не только пиксели экзосом, но и пиксели фона.

Для этого можно использовать инструменты совмещения пары изображений путем максимизации корреляции [127]–[129]. Они позволяют построить матрицу деформаций исходного изображения, которая «подгонит» его под целевое, а

также вычислить обратное преобразование. Сдвиг и поворот в этом не участвуют, т.к. эти деформации сохраняют все попарные расстояния между любыми пикселями изображения. В англоязычной литературе используют термин «image registration» (регистрация изображений), который при переводе на русский оказывается неудачным, т.к. словом «регистрация» можно обозначить процесс получения изображений – съемки на ПЭМ или сканирования на АСМ.

Мы использовали bUnwarpJ [128] – плагин для программы Fiji [58], который, наверное, является наиболее удобным и доступным инструментом для совмещения изображений. Опишем его работу, а затем использование в контексте корреляционной микроскопии.

На вход bUnwarpJ мы подаем пару изображений, одно из которых называется исходным (source), а второе целевым (target). Алгоритм ищет два преобразования g^+ и g^- , которые позволят приблизить исходное изображение к целевому, а целевое – к исходному соответственно (Рисунок 37).

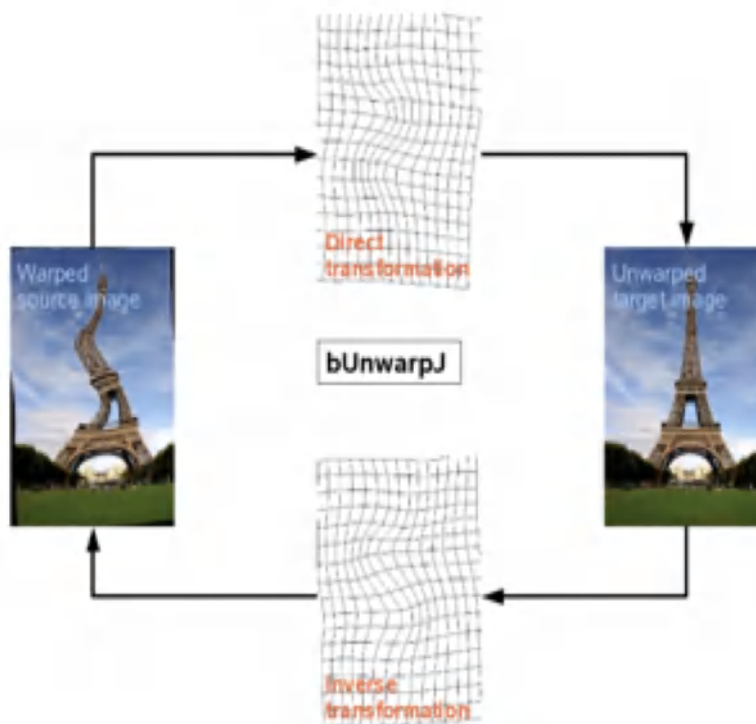


Рисунок 37. Схема работы плагина bUnwarpJ в ImageJ.

Алгоритм совмещения изображений основан на минимизации энергетического функционала E :

$$E = w_i E_{img} + w_\mu E_\mu + (w_d E_{div} + w_r E_{rot}) + w_c E_{cons}$$

который включает в себя следующие составляющие. E_{img} – это основная мера сходства изображений, ее можно представить себе, как сумму квадратов разностей цветов всех пикселей двух изображений (для восьмибитных изображений цвет пикселя – это число в диапазоне от 0 до 255). При совмещении изображений можно расставить метки на каждом из них, и потребовать, чтобы алгоритм совместил положения этих меток. E_μ – это мера успешности совмещения меток, она растет, если после применения деформации метки не совпадают. Параметры E_{div} и E_{rot} – это меры вклада дивергенции и ротора в поля деформаций g^+ и g^- . Наконец, последнее слагаемое E_{cons} – это мера обратимости, которая растет, если результат последовательного применения g^+ и g^- к изображению X отличается от X . Алгоритм подразумевает, что преобразования g^+ и g^- могут не обеспечивать обратимости, т.е. в общем случае $g^+(g^-(X)) \neq X$. При запуске `bUnwarpJ` мы выбираем коэффициенты w_i , w_μ , w_d , w_r и w_c – при задаем вклады разных слагаемых в величину E .

В результате работы `bUnwarpJ` мы получаем матрицы прямого и обратного преобразований g^+ и g^- , которые совмещают пару изображений, полученных методами АСМ и ПЭМ (Рисунок 38А и Б). Сами преобразования g^+ и g^- можно визуализировать как векторные поля (Рисунок 38В и Г). Одна из особенностей этой процедуры состоит в том, что эти изображения имеют разное количество пикселей. Действительно АСМ-изображение обычно состоит из 512x512 пикселей, а ПЭМ-изображение – из 2048x2048 или более. Размер пикселя на ПЭМ-изображении обычно в несколько раз меньше, чем на АСМ-изображении той же самой области сетки. Мы считали, что точность совмещения изображений ограничена размерами пикселей, причем АСМ ограничивает ПЭМ, а не наоборот. В связи с этим, перед тем как загружать изображения в `bUnwarpJ`, мы огрубляли ПЭМ-изображение, т.е. снижали количество пикселей до того, которое было на АСМ-изображении. Причем обычно мы работали не с целыми изображениями, а

с их фрагментами, поэтому типичное количество пикселей тех изображений, которые поступали в bUnwarpJ, было не 512x512, а меньше и лежало в диапазоне 300x300 – 400x400.

Перед тем, как загружать АСМ-изображения в bUnwarpJ, их переводили в палитру из инвертированных градиентов серого. Это придавало изображениям общее сходство, но естественно, детали все равно оказывались различными, и это не связано с деформациями изображений или их искажениями в плоскости XY. Некоторые детали структуры были заметны одним методом и незаметны другим, некоторые элементы выглядели принципиально по-разному (например, некоторые ВВ не имели «вмятинки» на поверхности, как описано выше) и т.п. Не говоря уже о том, что АСМ и ПЭМ создают изображения с принципиальной разной природой контраста. С учетом всех этих факторов, мы не можем ожидать идеального совпадения изображений – даже при идеальном совпадении положений всех элементов в плоскости XY и при нулевом уровне шумов (Рисунок 38).

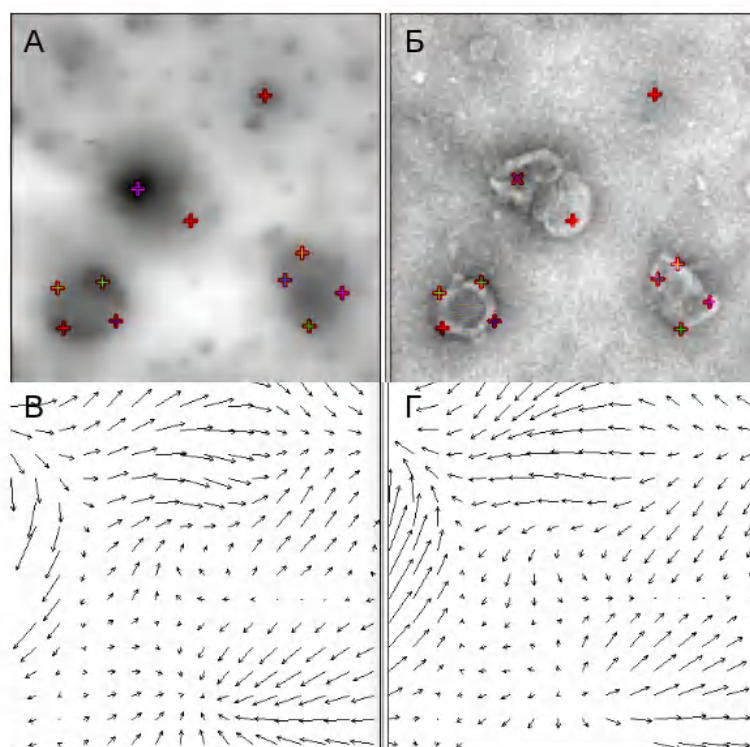


Рисунок 38. Пример использования плагина bUnwarpJ. А и Б – изображения, полученные методами АСМ и ПЭМ соответственно, с расставленными на них метками. В и Г – поля деформаций, построенные плагином bUnwarpJ.

Примеры применения полей деформаций к каждому из двух изображений представлены на рисунке 39. На нем показан результат совмещения пары изображений, Рисунок 39А и В, полученных методами ПЭМ и АСМ соответственно. Изображение, Рисунок 39Б, получено в результате трансформации АСМ-изображения и попытки «приблизить» его к ПЭМ-изображению. Аналогично, изображение, Рисунок 39Г, получено при попытке «приблизить» ПЭМ-изображение к АСМ-изображению. На краях деформированных изображений видны черные области – они обычно появляются при деформации. Масштабная метка, расположенная на ПЭМ-изображении, была исключена из рассмотрения.

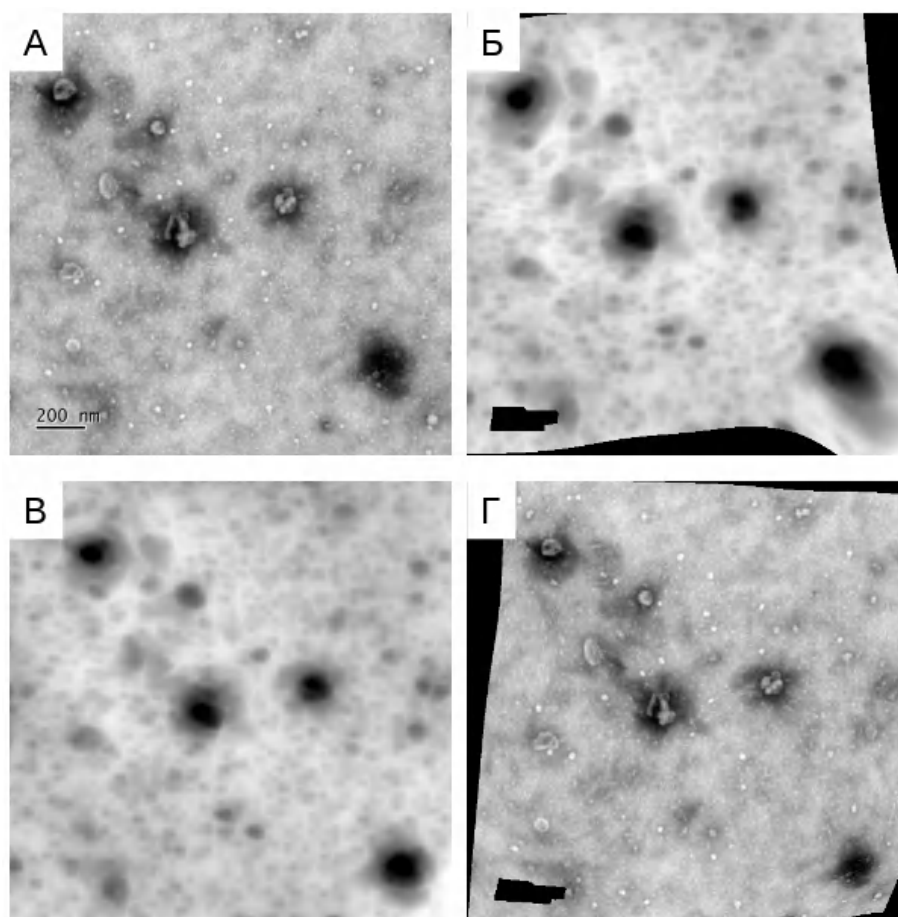


Рисунок 39. Пример использования плагина `bUnwarperJ`. А и В – изображения, полученные методами АСМ и ПЭМ соответственно, с расставленными на них метками. Б и Г – поля деформаций, построенные плагином `bUnwarperJ`.

Имея матрицы преобразований g^+ и g^- , мы оценивали точность совмещения изображений. Если преобразование g подразумевает существенные деформации (растяжения, сжатия, скручивания), то это говорит о принципиальной разнице между сопоставляемыми изображениями. Если же деформации в преобразовании g малы, то изображения хорошо совпадают.

Как оценить деформацию количественно? Эта оценка делалась следующим образом. Каждое из этих двух преобразований содержит не только компоненту деформации, но также и компоненты сдвига (параллельного переноса) и поворота, которые сохраняют расстояния между точками [130]. Эти компоненты нам неинтересны, они не характеризуют соответствие изображения, а зависят от аккуратности экспериментаторов и от того, как выбирались кадры для совмещения. Чтобы оценить вклад деформации в векторное поле g , необходимо подобрать поле u , которое обладает следующими свойствами:

1. Поле u является суперпозицией сдвига и поворота, т.е. сохраняет попарные расстояния между точками.
2. Разность $\|u-g\|$ должна быть минимальна. Речь идет о сумме модулей всех элементов векторного поля $(u-g)$.

Если поле u известно, то можно использовать различные метрики, основанные на $u-g$ для оценки точности совмещения изображений. Например, сумма модулей всех векторов поля $u-g$ может использоваться как параметр для минимизации, а средний модуль вектора поля $u-g$ может использоваться как та самая мера точности совмещения изображений, к вычислению которой мы стремимся.

Для вычисления поля u и последующей оценки среднего модуля поля $(u-g)$ нами был написан скрипт на языке Python. В результате его работы для каждой пары изображений была вычислена точность совмещения (мы считаем, что эту величину также можно назвать погрешность совмещения).

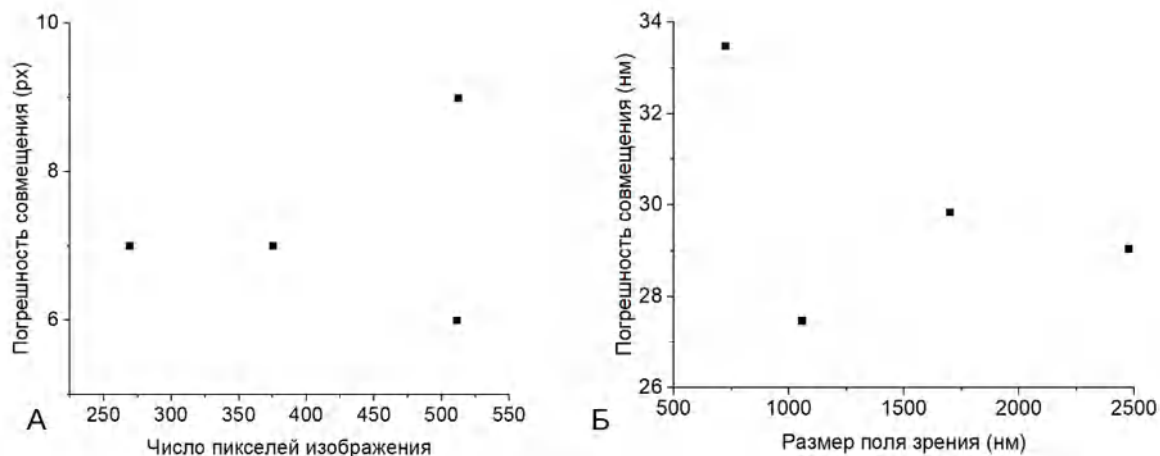


Рисунок 40. Значения погрешностей совмещения, вычисленные для четырех пар изображений разных размеров. А – измеренные в пикселях, Б – измеренные в нанометрах.

Оказалось, что если проводить вычисления по прямому преобразованию g^+ и по обратному g^- , то разница в результирующей точности составляет не более 5% этой величины, поэтому далее мы будем обсуждать только результаты, полученные по прямым преобразованиям g^+ .

На рисунке 40 представлены значения погрешностей совмещения, вычисленные для четырех пар изображений разных размеров. Эти погрешности можно выразить в пикселях или в нм. Оказывается, что во втором случае они неожиданно большие – до 34 нм. Вероятно, такие большие значения объясняются объективной разницей между сопоставляемыми изображениями. Действительно, на каждой паре изображений (Рисунок 36) есть участки, значительно отличающиеся друг на друга. Когда мы пытаемся совместить их, алгоритм `bUnwarpJ` неизбежно делает ошибки и пытается добиться совмещения за счет значительных деформаций.

Итак, мы получили две оценки точности совмещения изображений. Одна из них, основанная на измерениях одиночных частиц, составляет 17 нм и 18 нм по осям X и Y соответственно. Вторая, основанная на корреляционном анализе изображений, лежит в диапазоне 27-34 нм. Первая из них более «практическая», т.к. в реальных измерениях мы заинтересованы прежде всего в измерениях

частиц. Вторая оценка является оценкой сверху – и она завышена тем, что сопоставляемые изображения заметно отличаются друг от друга.

Таким образом, нами была отработана методика навигации на сетке для электронного микроскопа, которая обеспечивает возможность исследования одной и той же области методами АСМ и ПЭМ. Как отмечено в литературном обзоре, нам удалось найти лишь четыре работы, описывающие аналогичные эксперименты.

Разработанная нами методика обеспечивает возможность исследования одной и той же единичной наночастицы методами АСМ и ПЭМ последовательно. С помощью этой методики показано, что морфология экзосом “сдутые мячики” (cup-shaped morphology), которая является типичной и общепринятой при исследовании ВВ на ПЭМ с негативным контрастированием, не соответствует рельефу поверхности, измеренному методом АСМ. Кроме того, мы наблюдали различия в размерах ВВ, полученных методами АСМ и ПЭМ.

Данный результат может быть связан с множеством факторов, например, разная калибровка микроскопов, уширение объектов на АСМ из-за кантилевера, вклада слоя ацетата уранила, которым окрашены ВВ. Однако, эта разница может быть связана и с более важными структурными факторами ВВ. Например, белки, которые присутствуют в составе большинства физиологических жидкостей и могут налипать на поверхность внеклеточных везикул, на ПЭМ кажутся прозрачными для электронного пучка, так как мы не различаем структуры отдельных молекул. При этом на АСМ они видны и вносят некоторый вклад в размер частицы. Более того, отсутствие углубления в центре некоторых внеклеточных везикул на АСМ, в сравнении с изображениями ПЭМ, на которых везде виден контрастный центр, также подтверждает эту гипотезу, связанную с налипанием молекул белков на поверхность ВВ. Размеры, полученные методом АСМ в среднем, оказались больше, чем методом ПЭМ.

5. Заключение

Возможность экспериментальной работы с любым объектом определяется доступностью методов исследования его свойств. Для исследования экзосом, как и для других внеклеточных везикул, критически важны методы микроскопии высокого разрешения. В данной работе мы использовали два таких метода, АСМ и ПЭМ, и развивали специализированные методики, чтобы ускорить обработку получаемых изображений и сделать данные более полными. Использование нашего методического опыта позволило создать новый программный инструмент для обработки изображений, оптимизировать существующие процедуры исследования частиц методом АСМ, установить особенности возникновения контраста на ПЭМ-изображениях ВВ, а также помогли обнаружить новый потенциальный экзосомальный маркер – стоматин.

С учетом того, что интерес к изучению ВВ непрерывно растет, можно ожидать, что все разработанные методики будут активно использоваться. Некоторые из них могут применяться не только для ВВ, но и для других объектов. Например, разработанная программа ScanEV в некоторых случаях позволяет строить распределения частиц по размерам не только для изображений ВВ, но и для изображений других объектов, схожей морфологии. Методика корреляционной микроскопии АСМ-ПЭМ может использоваться практически для любых объектов, исследуемых методом ПЭМ.

Естественно, разработанные методики подразумевают дальнейшее развитие и улучшение. Аннотированный набор изображений ВВ может быть использован для обучения других нейросетей, которые, возможно, будут работать стабильнее и быстрее, чем ScanEV. Методика исследования ВВ с помощью АСМ может существенно выиграть от использования современных «быстрых» АСМ, которые позволяют получать изображения со скоростью 10-100 строк/сек. Методика корреляционной микроскопии также может быть значительно ускорена за счет использования «быстрого» АСМ.

Во всем мире активно развиваются коммерческие компании, которые развивают диагностические процедуры, основанные на анализе экзосом и других

ВВ. Можно надеяться, что данная работа будет способствовать развитию этого направления медицины.

6. Результаты и выводы

1. Сформирован размеченный вручную набор ПЭМ-изображений внеклеточных везикул (188 изображений, 1558 индивидуальных частиц) для обучения нейросетей. В него включены изображения образцов ВВ различного происхождения – выделенных из асцитической жидкости, плазмы крови, кондиционированной среды культивирования клеток (Skov3, A549, Coco704, Efo21), а также смыва из полости матки.
2. Разработана программа на основе нейронной сети для автоматизированной обработки ПЭМ-изображений везикул и получения распределений частиц по размерам. Программа позволяет с высокой точностью проводить распознавание частиц (среднее значение средней точности 0.817 при IoU 0.75, полноты 0.843 при IoU 0.75) за характерное время 1 кадр/сек на графическом процессоре и 0.1 кадр/сек на CPU. Разработанная программа совмещает в себе высокую доступность за счет наличия веб-интерфейса (bioeng.ru/scanev), и высокую скорость обработки и автоматизации.
3. Развитые в рамках работы методики помогли обнаружить новый потенциальный экзосомальный маркер – стоматин. Он обнаружен в образцах экзосом, выделенных из кондиционированной среды культивирования клеток A549, H460, H1299.
4. Предложена методика исследования внеклеточных везикул методом АСМ, которая позволила радикально сократить время приготовления образца. Показано, что результаты измерений корректны и самосогласованы по трем критериям: размеры частиц сохраняются при вариации поля зрения или концентрации образца, поверхностная плотность адсорбированных частиц увеличивается при увеличении концентрации.
5. Разработана оригинальная методика корреляционной микроскопии, которая обеспечивает возможность исследования одной и той же единичной наночастицы методами АСМ и ПЭМ последовательно. С ее

помощью показано, что морфология экзосом “сдутые мячики” (cup-shaped morphology), которая является типичной и общепринятой при исследовании ВВ на ПЭМ с негативным контрастированием, отличается от рельефа поверхности, измеренного методом АСМ.

7. Список литературы

- [1] J. Lötvald *и др.*, «Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles», *J Extracell Vesicles*, т. 3, вып. 1, с. 26913, янв. 2014, doi: 10.3402/jev.v3.26913.
- [2] C. Théry *и др.*, «Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines», *J Extracell Vesicles*, т. 7, вып. 1, с. 1535750, дек. 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [3] M. I. Ramirez *и др.*, «Technical challenges of working with extracellular vesicles», *Nanoscale*, т. 10, вып. 3, сс. 881–906, 2018, doi: 10.1039/C7NR08360B.
- [4] A. R. Brisson, «Extracellular vesicles from blood plasma : determination of their morphology , size , phenotype and concentration», сс. 614–627, 2014, doi: 10.1111/jth.12554.
- [5] M. Battistelli и E. Falcieri, «Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication», *Biology (Basel)*, т. 9, вып. 1, с. 21, янв. 2020, doi: 10.3390/biology9010021.
- [6] B. Mateescu *и др.*, «Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper», *J Extracell Vesicles*, т. 6, вып. 1, с. 1286095, дек. 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1286095.
- [7] S. I. L. Harrison P., Gardiner C., *Extracellular vesicles in health and disease*. New York: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2014.
- [8] V. A. Bragina *и др.*, «Highly Sensitive Nanomagnetic Quantification of Extracellular Vesicles by Immunochromatographic Strips: A Tool for Liquid Biopsy», *Nanomaterials*, т. 12, вып. 9, с. 1579, май 2022, doi: 10.3390/nano12091579.
- [9] M. Tkach, J. Kowal, и C. Théry, «Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, т. 373, вып. 1737, с. 20160479, янв. 2018, doi: 10.1098/rstb.2016.0479.
- [10] D. Zabeo, A. Cvjetkovic, C. Lässer, M. Schorb, J. Lötvald, и J. L. Höög, «Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology», *J Extracell Vesicles*, т. 6, вып. 1, с. 1329476, дек. 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1329476.

- [11] S. D. Ibsen *и др.*, «Rapid Isolation and Detection of Exosomes and Associated Biomarkers from Plasma», *ACS Nano*, т. 11, вып. 7, сс. 6641–6651, июл. 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b00549.
- [12] D.-S. Choi, D.-K. Kim, Y.-K. Kim, и Y. S. Gho, «Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes», *Proteomics*, т. 13, вып. 10–11, сс. 1554–1571, май 2013, doi: 10.1002/pmic.201200329.
- [13] Y. Yuana *и др.*, «Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma», *J Extracell Vesicles*, т. 2, вып. 1, с. 21494, янв. 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.21494.
- [14] A. Slonchak, B. Clarke, J. Mackenzie, A. A. Amarilla, Y. X. Setoh, и A. A. Khromykh, «West Nile virus infection and interferon alpha treatment alter the spectrum and the levels of coding and noncoding host RNAs secreted in extracellular vesicles», *BMC Genomics*, т. 20, вып. 1, с. 474, дек. 2019, doi: 10.1186/s12864-019-5835-6.
- [15] U. Fascio и A. Sartori-Rupp, «A Correlative Microscopy: A Combination of Light and Electron Microscopy», в *Optical Fluorescence Microscopy*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, сс. 231–238. doi: 10.1007/978-3-642-15175-0_14.
- [16] T. A. Shtam *и др.*, «Isolation of extracellular micro-vesicles from cell culture medium: comparative evaluation of methods», *Biomeditsinskaya Khimiya*, т. 64, вып. 1, сс. 23–30, янв. 2018, doi: 10.18097/PBMC20186401023.
- [17] K. Nag, J. G. Munro, S. A. Hearn, J. Rasmusson, N. O. Petersen, и F. Possmayer, «Correlated Atomic Force and Transmission Electron Microscopy of Nanotubular Structures in Pulmonary Surfactant», *J Struct Biol*, т. 126, вып. 1, сс. 1–15, июн. 1999, doi: 10.1006/jsbi.1999.4089.
- [18] V. Dozio и J.-C. Sanchez, «Characterisation of extracellular vesicle-subsets derived from brain endothelial cells and analysis of their protein cargo modulation after TNF exposure», *J Extracell Vesicles*, т. 6, вып. 1, с. 1302705, дек. 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1302705.
- [19] K. Trajkovic *и др.*, «Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes», *Science (1979)*, т. 319, вып. 5867, сс. 1244–1247, фев. 2008, doi: 10.1126/science.1153124.
- [20] B. Mateescu *и др.*, «Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper», *J Extracell Vesicles*, т. 6, вып. 1, с. 1286095, дек. 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1286095.

- [21] M. F. Peterson, N. Otoc, J. K. Sethi, A. Gupta, и Т. J. Antes, «Integrated systems for exosome investigation», *Methods*, т. 87, сс. 31–45, окт. 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2015.04.015.
- [22] B. Fendl, R. Weiss, M. B. Fischer, A. Spittler, и V. Weber, «Characterization of extracellular vesicles in whole blood: Influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry», *Biochem Biophys Res Commun*, т. 478, вып. 1, сс. 168–173, сен. 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.073.
- [23] J. van Deun *и др.*, «The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling», *J Extracell Vesicles*, т. 3, вып. 1, с. 24858, янв. 2014, doi: 10.3402/jev.v3.24858.
- [24] M. P. Oksvold *и др.*, «Expression of B-Cell Surface Antigens in Subpopulations of Exosomes Released From B-Cell Lymphoma Cells», *Clin Ther*, т. 36, вып. 6, сс. 847–862.e1, июн. 2014, doi: 10.1016/j.clinthera.2014.05.010.
- [25] Y. H. Soung, T. Nguyen, H. Cao, J. Lee, и J. Chung, «Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis», *BMB Rep*, т. 49, вып. 1, сс. 18–25, янв. 2016, doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.1.239.
- [26] C. Villarroya-Beltri, F. Baixauli, C. Gutiérrez-Vázquez, F. Sánchez-Madrid, и M. Mittelbrunn, «Sorting it out: Regulation of exosome loading», *Semin Cancer Biol*, т. 28, сс. 3–13, окт. 2014, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.04.009.
- [27] S. Stuffers, C. Sem Wegner, H. Stenmark, и A. Brech, «Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs», *Traffic*, т. 10, вып. 7, сс. 925–937, июл. 2009, doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
- [28] S. Phuyal, N. P. Hessvik, T. Skotland, K. Sandvig, и A. Llorente, «Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins», *FEBS Journal*, т. 281, вып. 9, сс. 2214–2227, май 2014, doi: 10.1111/febs.12775.
- [29] G. van Niel *и др.*, «The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis», *Dev Cell*, т. 21, вып. 4, сс. 708–721, окт. 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
- [30] K. Yuyama, H. Sun, S. Mitsutake, и Y. Igarashi, «Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia», *Journal of Biological Chemistry*, т. 287, вып. 14, сс. 10977–10989, мар. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.324616.

- [31] I. Levental, M. Grzybek, и К. Simons, «Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts», *Biochemistry*, т. 49, вып. 30, сс. 6305–6316, авг. 2010, doi: 10.1021/bi100882y.
- [32] Y. A. Chizmadzhev, «The mechanisms of lipid–protein rearrangements during viral infection», *Bioelectrochemistry*, т. 63, вып. 1–2, сс. 129–136, июн. 2004, doi: 10.1016/j.bioelechem.2003.10.016.
- [33] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, и C. Eggeling, «The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts», *Nat Rev Mol Cell Biol*, т. 18, вып. 6, сс. 361–374, июн. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.16.
- [34] D. Lingwood и К. Simons, «Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle», *Science (1979)*, т. 327, вып. 5961, сс. 46–50, янв. 2010, doi: 10.1126/science.1174621.
- [35] E. J. Smart и др., «Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction», *Mol Cell Biol*, т. 19, вып. 11, сс. 7289–7304, ноя. 1999, doi: 10.1128/MCB.19.11.7289.
- [36] S. Staubach и F.-G. Hanisch, «Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells and their roles in cancer», *Expert Rev Proteomics*, т. 8, вып. 2, сс. 263–277, апр. 2011, doi: 10.1586/epr.11.2.
- [37] C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, и A. Clayton, «Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids», *Curr Protoc Cell Biol*, т. 30, вып. 1, мар. 2006, doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- [38] T. Kajimoto, T. Okada, S. Miya, L. Zhang, и S. Nakamura, «Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes», *Nat Commun*, т. 4, вып. 1, с. 2712, дек. 2013, doi: 10.1038/ncomms3712.
- [39] P. Fu и др., «The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma», *Oncotargets Ther*, т. Volume 10, сс. 819–835, фев. 2017, doi: 10.2147/OTT.S123912.
- [40] G. Binnig, C. F. Quate, и Ch. Gerber, «Atomic Force Microscope», *Phys Rev Lett*, т. 56, вып. 9, сс. 930–933, мар. 1986, doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [41] I. v. Yaminsky и A. I. Akhmetova, «The role of scanning probe microscopy in bacteria investigations and bioremediation», в *Abatement of Environmental*

- Pollutants*, Elsevier, 2020, сс. 287–312. doi: 10.1016/B978-0-12-818095-2.00014-X.
- [42] S. Sharma *и др.*, «Structural-Mechanical Characterization of Nanoparticle Exosomes in Human Saliva, Using Correlative AFM, FESEM, and Force Spectroscopy», *ACS Nano*, т. 4, вып. 4, сс. 1921–1926, апр. 2010, doi: 10.1021/nn901824n.
- [43] A. Zlotogorski-Hurvitz, D. Dayan, G. Chaushu, T. Salo, и M. Vered, «Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals», *J Cancer Res Clin Oncol*, т. 142, вып. 1, сс. 101–110, янв. 2016, doi: 10.1007/s00432-015-2005-3.
- [44] A. Zlotogorski-Hurvitz *и др.*, «Human Saliva-Derived Exosomes», *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, т. 63, вып. 3, сс. 181–189, мар. 2015, doi: 10.1369/0022155414564219.
- [45] V. Palanisamy, S. Sharma, A. Deshpande, H. Zhou, J. Gimzewski, и D. T. Wong, «Nanostructural and Transcriptomic Analyses of Human Saliva Derived Exosomes», *PLoS One*, т. 5, вып. 1, с. e8577, янв. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0008577.
- [46] S. Iwai *и др.*, «Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes», *PLoS One*, т. 11, вып. 11, с. e0166104, ноя. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0166104.
- [47] P. Cizmar и Y. Yuana, «Detection and Characterization of Extracellular Vesicles by Transmission and Cryo-Transmission Electron Microscopy», 2017, сс. 221–232. doi: 10.1007/978-1-4939-7253-1_18.
- [48] J. Hardij *и др.*, «Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: comparison of air-tapping-mode AFM and liquid Peak Force AFM», *J Extracell Vesicles*, т. 2, вып. 1, с. 21045, янв. 2013, doi: 10.3402/jev.v2i0.21045.
- [49] N. Sebaihi, B. de Boeck, Y. Yuana, R. Nieuwland, и J. Pétry, «Dimensional characterization of extracellular vesicles using atomic force microscopy», *Meas Sci Technol*, т. 28, вып. 3, с. 034006, мар. 2017, doi: 10.1088/1361-6501/28/3/034006.
- [50] F. Gołek, P. Mazur, Z. Ryszka, и S. Zuber, «AFM image artifacts», *Appl Surf Sci*, т. 304, сс. 11–19, июн. 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.149.

- [51] R. Changhai и S. Lining, «Hysteresis and creep compensation for piezoelectric actuator in open-loop operation», *Sens Actuators A Phys*, т. 122, вып. 1, сс. 124–130, июл. 2005, doi: 10.1016/j.sna.2005.03.056.
- [52] A. F. Hill, Ред., *Exosomes and Microvesicles*, т. 1545. New York, NY: Springer New York, 2017. doi: 10.1007/978-1-4939-6728-5.
- [53] A. I. Masyuk, Т. v Masyuk, и N. F. Larusso, «Clinical Application of Basic Science Exosomes in the pathogenesis , diagnostics and therapeutics of liver diseases Clinical Application of Basic Science», *J Hepatol*, т. 59, вып. 3, сс. 621–625, 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.028.
- [54] M. Avella-Oliver, R. Puchades, S. Wachsmann-Hogiu, и A. Maquieira, «Label-free SERS analysis of proteins and exosomes with large-scale substrates from recordable compact disks», *Sens Actuators B Chem*, т. 252, сс. 657–662, ноя. 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.06.058.
- [55] T. Pisitkun, R.-F. Shen, и M. A. Knepper, «Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, т. 101, вып. 36, сс. 13368–13373, сен. 2004, doi: 10.1073/pnas.0403453101.
- [56] M. Y. Konoshenko, E. A. Lekchnov, O. E. Bryzgunova, E. Kiseleva, I. A. Pyshnaya, и P. P. Laktionov, «Isolation of Extracellular Vesicles from Biological Fluids via the Aggregation–Precipitation Approach for Downstream miRNAs Detection», *Diagnostics*, т. 11, вып. 3, с. 384, фев. 2021, doi: 10.3390/diagnostics11030384.
- [57] J. Broeke, Mateos Pérez, José María, и J. Pascau, *Image Processing with ImageJ - 2nd Edition*. 2015.
- [58] J. Schindelin *и др.*, «Fiji: an open-source platform for biological-image analysis», *Nat Methods*, т. 9, вып. 7, сс. 676–682, июл. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
- [59] L. Doyle и M. Wang, «Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis», *Cells*, т. 8, вып. 7, с. 727, июл. 2019, doi: 10.3390/cells8070727.
- [60] A. Kotrbová *и др.*, «TEM ExosomeAnalyzer: a computer-assisted software tool for quantitative evaluation of extracellular vesicles in transmission electron microscopy images», *J Extracell Vesicles*, т. 8, вып. 1, с. 1560808, янв. 2019, doi: 10.1080/20013078.2018.1560808.

- [61] T. Wagner *и др.*, «SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM», *Commun Biol*, т. 2, вып. 1, с. 218, дек. 2019, doi: 10.1038/s42003-019-0437-z.
- [62] Pedro Domingos, *The Master Algorithm: How the Quest for the Ultimate Learning Machine Will Remake Our World*. 2015.
- [63] L. Alzubaidi *и др.*, «Review of deep learning: concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions», *J Big Data*, т. 8, вып. 1, с. 53, дек. 2021, doi: 10.1186/s40537-021-00444-8.
- [64] M. Jaderberg, K. Simonyan, A. Zisserman, и К. Kavukcuoglu, «Spatial Transformer Networks», июн. 2015.
- [65] A. B. Oktay и A. Gurses, «Automatic detection, localization and segmentation of nano-particles with deep learning in microscopy images», *Micron*, т. 120, сс. 113–119, май 2019, doi: 10.1016/j.micron.2019.02.009.
- [66] T. Wagner *и др.*, «SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM», *Commun Biol*, т. 2, вып. 1, с. 218, дек. 2019, doi: 10.1038/s42003-019-0437-z.
- [67] S. T.-Y. Chuo, J. C.-Y. Chien, и C. P.-K. Lai, «Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods», *J Biomed Sci*, т. 25, вып. 1, с. 91, дек. 2018, doi: 10.1186/s12929-018-0494-5.
- [68] Z. Chen, K. Wu, Y. Li, M. Wang, и W. Li, «SSD-MSN: An Improved Multi-Scale Object Detection Network Based on SSD», *IEEE Access*, т. 7, сс. 80622–80632, 2019, doi: 10.1109/ACCESS.2019.2923016.
- [69] E. Jurrus *и др.*, «Detection of neuron membranes in electron microscopy images using a serial neural network architecture», *Med Image Anal*, т. 14, вып. 6, сс. 770–783, дек. 2010, doi: 10.1016/j.media.2010.06.002.
- [70] E. Jurrus *и др.*, «Semi-Automated Neuron Boundary Detection and Nonbranching Process Segmentation in Electron Microscopy Images», *Neuroinformatics*, т. 11, вып. 1, сс. 5–29, янв. 2013, doi: 10.1007/s12021-012-9149-y.
- [71] O. Ronneberger, P. Fischer, и T. Brox, «U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation», май 2015.
- [72] V. Badrinarayanan, A. Kendall, и R. Cipolla, «SegNet: A Deep Convolutional Encoder-Decoder Architecture for Image Segmentation», *IEEE Trans Pattern*

- Anal Mach Intell*, т. 39, вып. 12, сс. 2481–2495, дек. 2017, doi: 10.1109/TPAMI.2016.2644615.
- [73] M. Futrega, A. Milesi, M. Marcinkiewicz, и P. Ribalta, «Optimized U-Net for Brain Tumor Segmentation», окт. 2021.
- [74] L. Zhang *и др.*, «Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy», *J Lipid Res*, т. 52, вып. 1, сс. 175–184, янв. 2011, doi: 10.1194/jlr.D010959.
- [75] L. G. Rikkert, R. Nieuwland, L. W. M. M. Terstappen, и F. A. W. Coumans, «Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent», *J Extracell Vesicles*, т. 8, вып. 1, с. 1555419, дек. 2019, doi: 10.1080/20013078.2018.1555419.
- [76] K. He, G. Gkioxari, P. Dollár, и R. Girshick, «Mask R-CNN», мар. 2017.
- [77] S. Ren, K. He, R. Girshick, и J. Sun, «Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks», июн. 2015.
- [78] E. Gómez-de-Mariscal *и др.*, «DeepImageJ: A user-friendly environment to run deep learning models in ImageJ», *Nat Methods*, т. 18, вып. 10, сс. 1192–1195, окт. 2021, doi: 10.1038/s41592-021-01262-9.
- [79] E. Gómez-de-Mariscal, M. Maška, A. Kotrbová, V. Pospíchalová, P. Matula, и A. Muñoz-Barrutia, «Deep-Learning-Based Segmentation of Small Extracellular Vesicles in Transmission Electron Microscopy Images», *Sci Rep*, т. 9, вып. 1, с. 13211, дек. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49431-3.
- [80] M. J. H. Gerritzen, D. E. Martens, R. H. Wijffels, и M. Stork, «High throughput nanoparticle tracking analysis for monitoring outer membrane vesicle production», *J Extracell Vesicles*, т. 6, вып. 1, с. 1333883, дек. 2017, doi: 10.1080/20013078.2017.1333883.
- [81] P. Dorozhkin, «Combined AFM and confocal Raman investigation of polymer blend of PS/PVAC», 2012, doi: 10.13140/RG.2.1.3108.4001.
- [82] V. Panchal *и др.*, «Confocal laser scanning microscopy for rapid optical characterization of graphene», *Commun Phys*, т. 1, вып. 1, с. 83, дек. 2018, doi: 10.1038/s42005-018-0084-6.
- [83] S. Jadavi, P. Bianchini, O. Cavalleri, S. Dante, C. Canale, и A. Diaspro, «Correlative nanoscopy: A multimodal approach to molecular resolution», *Microsc Res Tech*, т. 84, вып. 10, сс. 2472–2482, окт. 2021, doi: 10.1002/jemt.23800.

- [84] C. Loussert Fonta и В. М. Humbel, «Correlative microscopy», *Arch Biochem Biophys*, т. 581, сс. 98–110, сен. 2015, doi: 10.1016/j.abb.2015.05.017.
- [85] M. Osborn, R. Webster, и К. Weber, «Individual microtubules viewed by immunofluorescence and electron microscopy in the same PtK2 cell», *Journal of Cell Biology*, т. 77, вып. 3, с. R27, июн. 1978, doi: 10.1083/jcb.77.3.R27.
- [86] F. J. Timmermans и C. Otto, «Contributed Review: Review of integrated correlative light and electron microscopy», *Review of Scientific Instruments*, т. 86, вып. 1, с. 011501, янв. 2015, doi: 10.1063/1.4905434.
- [87] Y. Suzuki *и др.*, «High-speed atomic force microscopy combined with inverted optical microscopy for studying cellular events», *Sci Rep*, т. 3, вып. 1, с. 2131, дек. 2013, doi: 10.1038/srep02131.
- [88] H. Gump, S. W. Stahl, M. Strackharn, E. M. Puchner, и Н. Е. Gaub, «Ultrastable combined atomic force and total internal fluorescence microscope», *Review of Scientific Instruments*, т. 80, вып. 6, с. 063704, июн. 2009, doi: 10.1063/1.3148224.
- [89] S. Fukuda *и др.*, «High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope», *Review of Scientific Instruments*, т. 84, вып. 7, с. 073706, июл. 2013, doi: 10.1063/1.4813280.
- [90] P. D. Odermatt *и др.*, «High-Resolution Correlative Microscopy: Bridging the Gap between Single Molecule Localization Microscopy and Atomic Force Microscopy», *Nano Lett*, т. 15, вып. 8, сс. 4896–4904, авг. 2015, doi: 10.1021/acs.nanolett.5b00572.
- [91] J. V. Chacko, F. C. Zanicchi, и А. Diaspro, «Probing cytoskeletal structures by coupling optical superresolution and AFM techniques for a correlative approach», *Cytoskeleton*, т. 70, вып. 11, сс. 729–740, ноя. 2013, doi: 10.1002/cm.21139.
- [92] C. Rotsch и M. Radmacher, «Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study», *Biophys J*, т. 78, вып. 1, сс. 520–535, янв. 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76614-8.
- [93] E. Betzig *и др.*, «Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution», *Science (1979)*, т. 313, вып. 5793, сс. 1642–1645, сен. 2006, doi: 10.1126/science.1127344.
- [94] S. Janel, E. Werkmeister, A. Bongiovanni, F. Lafont, и N. Barois, «CLAFEM», 2017, сс. 165–185. doi: 10.1016/bs.mcb.2017.03.010.

- [95] T. Uruma *и др.*, «Development of atomic force microscopy combined with scanning electron microscopy for investigating electronic devices», *AIP Adv*, т. 9, вып. 11, с. 115011, ноя. 2019, doi: 10.1063/1.5125163.
- [96] V. Novotna *и др.*, «AFM-in-SEM as a Tool for Comprehensive Sample Surface Analysis», *Micros Today*, т. 28, вып. 3, сс. 38–46, май 2020, doi: 10.1017/S1551929520000875.
- [97] D. Sobola *и др.*, «Complementary SEM-AFM of Swelling Bi-Fe-O Film on HOPG Substrate», *Materials*, т. 13, вып. 10, с. 2402, май 2020, doi: 10.3390/ma13102402.
- [98] M.-H. Choi *и др.*, «Characterization of Ligand Adsorption at Individual Gold Nanocubes», *Langmuir*, т. 37, вып. 25, сс. 7701–7711, июн. 2021, doi: 10.1021/acs.langmuir.1c00694.
- [99] Y. Hou, C. Zhao, B. Xu, Y. Huang, и C. Liu, «Effect of docetaxel on mechanical properties of ovarian cancer cells», *Exp Cell Res*, т. 408, вып. 1, с. 112853, ноя. 2021, doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112853.
- [100] Y. Yamada, H. Konno, и K. Shimabukuro, «Demonstration of correlative atomic force and transmission electron microscopy using actin cytoskeleton», *Biophys Physicobiol*, т. 14, вып. 0, сс. 111–117, 2017, doi: 10.2142/biophysico.14.0_111.
- [101] A. C. Lin и M. C. Goh, «A novel sample holder allowing atomic force microscopy on transmission electron microscopy specimen grids: repetitive, direct correlation between AFM and TEM images», *J Microsc*, т. 205, вып. 2, сс. 205–208, фев. 2002, doi: 10.1046/j.0022-2720.2001.00978.x.
- [102] P. Mulvaney и M. Giersig, «Imaging nanosized gold colloids by atomic force microscopy: a direct comparison with transmission electron microscopy», *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, т. 92, вып. 17, с. 3137, 1996, doi: 10.1039/ft9969203137.
- [103] K. Nag, J. G. Munro, S. A. Hearn, J. Rasmusson, N. O. Petersen, и F. Possmayer, «Correlated Atomic Force and Transmission Electron Microscopy of Nanotubular Structures in Pulmonary Surfactant», *J Struct Biol*, т. 126, вып. 1, сс. 1–15, июн. 1999, doi: 10.1006/jsbi.1999.4089.
- [104] R. Padilla, S. L. Netto, и E. A. B. da Silva, «A Survey on Performance Metrics for Object-Detection Algorithms», в *2020 International Conference on Systems, Signals and Image Processing (IWSSIP)*, июл. 2020, сс. 237–242. doi: 10.1109/IWSSIP48289.2020.9145130.

- [105] B. W. Sódar *u др.*, «Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection», *Sci Rep*, т. 6, вып. 1, с. 24316, июл. 2016, doi: 10.1038/srep24316.
- [106] L. A. Ovchinnikova *u др.*, «Reprogramming Extracellular Vesicles for Protein Therapeutics Delivery», *Pharmaceutics*, т. 13, вып. 6, с. 768, май 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13060768.
- [107] D. V. Bagrov *u др.*, «Structural characterization of β -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles», *Microsc Res Tech*, т. 85, вып. 2, сс. 562–569, фев. 2022, doi: 10.1002/jemt.23931.
- [108] G. O. Skryabin *u др.*, «Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker», *J Cell Biochem*, т. 122, вып. 1, сс. 100–115, янв. 2021, doi: 10.1002/jcb.29834.
- [109] G. O. Skryabin, A. v. Komelkov, P. B. Kopnin, I. I. Nikishin, S. A. Kuzmichev, и E. M. Tchekina, «Effect of caveolin-1 knockdown on the protein composition of extracellular vesicles secreted by non-small cell lung cancer cells», *Advances in Molecular Oncology*, т. 8, вып. 1, сс. 41–46, май 2021, doi: 10.17650/2313-805X2021-8-1-41-46.
- [110] O. E. Andreeva *u др.*, «Secretion of Mutant DNA and mRNA by the Exosomes of Breast Cancer Cells», *Molecules*, т. 26, вып. 9, с. 2499, апр. 2021, doi: 10.3390/molecules26092499.
- [111] S. Semina *u др.*, «Exosome-Mediated Transfer of Cancer Cell Resistance to Antiestrogen Drugs», *Molecules*, т. 23, вып. 4, с. 829, апр. 2018, doi: 10.3390/molecules23040829.
- [112] A. Zlotogorski-Hurvitz, D. Dayan, G. Chaushu, T. Salo, и M. Vered, «Morphological and molecular features of oral fluid-derived exosomes: oral cancer patients versus healthy individuals», *J Cancer Res Clin Oncol*, т. 142, вып. 1, сс. 101–110, янв. 2016, doi: 10.1007/s00432-015-2005-3.
- [113] M. Skliar и V. S. Chernyshev, «Imaging of Extracellular Vesicles by Atomic Force Microscopy», *Journal of Visualized Experiments*, вып. 151, сен. 2019, doi: 10.3791/59254.
- [114] D. Jeon, C. Kim, J. M. Son, N. J. Lee, C. J. Kang, и Y.-S. Kim, «Electrostatic Force Microscopy of Metallic Ion-Intercalated DNA», *Jpn J Appl Phys*, т. 45, вып. 1B, сс. 513–514, янв. 2006, doi: 10.1143/JJAP.45.513.

- [115] A. Sanchez-Sevilla, J. Thimonier, M. Marilley, J. Rocca-Serra, и J. Barbet, «Accuracy of AFM measurements of the contour length of DNA fragments adsorbed on mica in air and in aqueous buffer», *Ultramicroscopy*, т. 92, вып. 3–4, сс. 151–158, авг. 2002, doi: 10.1016/S0304-3991(02)00128-6.
- [116] Д. В. Багров *и др.*, «Исследование липодисков, содержащих комплекс сенсорного родопсина II с родственным белком-трансдьюсером из *Natronomonas pharaonis*», *Биофизика*, т. 61, вып. 6, сс. 1139–1148, 2016.
- [117] K. Kirat, I. Burton, V. Dupres, и Y. F. Dufrene, «Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy», *J Microsc*, т. 218, вып. 3, сс. 199–207, июн. 2005, doi: 10.1111/j.1365-2818.2005.01480.x.
- [118] J. Canet-Ferrer, E. Coronado, A. Forment-Aliaga, и E. Pinilla-Cienfuegos, «Correction of the tip convolution effects in the imaging of nanostructures studied through scanning force microscopy», *Nanotechnology*, т. 25, вып. 39, с. 395703, сен. 2014, doi: 10.1088/0957-4484/25/39/395703.
- [119] J. Woo, S. Sharma, и J. Gimzewski, «The Role of Isolation Methods on a Nanoscale Surface Structure and its Effect on the Size of Exosomes», *J Circ Biomark*, т. 5, с. 11, янв. 2016, doi: 10.5772/64148.
- [120] M. Tschuschke *и др.*, «Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes», *J Clin Med*, т. 9, вып. 2, с. 436, фев. 2020, doi: 10.3390/jcm9020436.
- [121] C. A. Scarff, M. J. G. Fuller, R. F. Thompson, и M. G. Iadaza, «Variations on Negative Stain Electron Microscopy Methods: Tools for Tackling Challenging Systems», *Journal of Visualized Experiments*, вып. 132, фев. 2018, doi: 10.3791/57199.
- [122] E. D. Horowitz *и др.*, «Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Uncoating and Genome Release», *J Virol*, т. 87, вып. 6, сс. 2994–3002, мар. 2013, doi: 10.1128/JVI.03017-12.
- [123] X. Fu *и др.*, «Analytical Strategies for Quantification of Adeno-Associated Virus Empty Capsids to Support Process Development», *Hum Gene Ther Methods*, т. 30, вып. 4, сс. 144–152, авг. 2019, doi: 10.1089/hgtb.2019.088.
- [124] M. Harmati *и др.*, «Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells», *Journal of Oral Pathology & Medicine*, т. 46, вып. 4, сс. 259–266, апр. 2017, doi: 10.1111/jop.12486.

- [125] G. Dai, L. Koenders, J. Fluegge, и Н. Bosse, «Two approaches for realizing traceability in nanoscale dimensional metrology», *Optical Engineering*, т. 55, вып. 9, с. 091407, мар. 2016, doi: 10.1117/1.OE.55.9.091407.
- [126] A. Delvallée, N. Feltin, S. Ducourtieux, M. Trabelsi, и J.-F. Hochepléd, «Comparison of nanoparticle diameter measurements by Atomic Force Microscopy and Scanning Electron Microscopy», в *16th International Congress of Metrology*, окт. 2013, с. 06007. doi: 10.1051/metrology/201306007.
- [127] G. E. Christensen и J. He, «Consistent nonlinear elastic image registration», в *Proceedings IEEE Workshop on Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis (MMBIA 2001)*, сс. 37–43. doi: 10.1109/MMBIA.2001.991697.
- [128] I. Arganda-Carreras, C. O. S. Sorzano, R. Marabini, J. M. Carazo, C. Ortiz-de-Solorzano, и J. Kybic, «Consistent and Elastic Registration of Histological Sections Using Vector-Spline Regularization», 2006, сс. 85–95. doi: 10.1007/11889762_8.
- [129] C. O. S. Sorzano, P. Thevenaz, и M. Unser, «Elastic Registration of Biological Images Using Vector-Spline Regularization», *IEEE Trans Biomed Eng*, т. 52, вып. 4, сс. 652–663, апр. 2005, doi: 10.1109/TBME.2005.844030.
- [130] P. C. Ribeiro, H. F. de Campos Velho, и H. Lopes, «Helmholtz–Hodge decomposition and the analysis of 2D vector field ensembles», *Comput Graph*, т. 55, сс. 80–96, апр. 2016, doi: 10.1016/j.cag.2016.01.001.
- [131] D. B. Nguyen *и др.*, «Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells», *Cellular Physiology and Biochemistry*, т. 38, вып. 3, сс. 1085–1099, 2016, doi: 10.1159/000443059.
- [132] S. Sharma, B. M. Gillespie, V. Palanisamy, и J. K. Gimzewski, «Quantitative Nanostructural and Single-Molecule Force Spectroscopy Biomolecular Analysis of Human-Saliva-Derived Exosomes», *Langmuir*, т. 27, вып. 23, сс. 14394–14400, дек. 2011, doi: 10.1021/la2038763.
- [133] P. Beekman *и др.*, «Immuno-capture of extracellular vesicles for individual multimodal characterization using AFM, SEM and Raman spectroscopy», *Lab Chip*, т. 19, вып. 15, сс. 2526–2536, 2019, doi: 10.1039/C9LC00081J.
- [134] Y. Yuana *и др.*, «Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles», *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, т. 8, вып. 2, сс. 315–323, фев. 2010, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03654.x.

- [135] V. Palmieri *u др.*, «Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool», *Journal of Nanoparticle Research*, т. 16, вып. 9, с. 2583, сен. 2014, doi: 10.1007/s11051-014-2583-z.
- [136] H. Zhang *u др.*, «Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation», *Nat Cell Biol*, т. 20, вып. 3, сс. 332–343, мар. 2018, doi: 10.1038/s41556-018-0040-4.
- [137] L. Paolini *u др.*, «Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity», *Sci Rep*, т. 6, вып. 1, с. 23550, сен. 2016, doi: 10.1038/srep23550.
- [138] D. Raghu *u др.*, «Nanoplasmonic pillars engineered for single exosome detection», *PLoS One*, т. 13, вып. 8, с. e0202773, авг. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0202773.
- [139] K. Iwai, T. Minamisawa, K. Suga, Y. Yajima, и K. Shiba, «Isolation of human salivary extracellular vesicles by iodixanol density gradient ultracentrifugation and their characterizations», *J Extracell Vesicles*, т. 5, вып. 1, с. 30829, янв. 2016, doi: 10.3402/jev.v5.30829.
- [140] A. Calò *u др.*, «Force measurements on natural membrane nanovesicles reveal a composition-independent, high Young's modulus», *Nanoscale*, т. 6, вып. 4, с. 2275, 2014, doi: 10.1039/c3nr05107b.
- [141] F. Caponnetto *u др.*, «Size-dependent cellular uptake of exosomes», *Nanomedicine*, т. 13, вып. 3, сс. 1011–1020, апр. 2017, doi: 10.1016/j.nano.2016.12.009.
- [142] R. Samsonov *u др.*, «Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic», *Prostate*, т. 76, вып. 1, сс. 68–79, янв. 2016, doi: 10.1002/pros.23101.
- [143] M. P. Monopoli *u др.*, «Endogenous exosome labelling with an amphiphilic NIR-fluorescent probe», *Chemical Communications*, т. 54, вып. 52, сс. 7219–7222, 2018, doi: 10.1039/C8CC02135J.
- [144] T. Tian, Y. Wang, H. Wang, Z. Zhu, и Z. Xiao, «Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy», *J Cell Biochem*, т. 111, вып. 2, сс. 488–496, июн. 2010, doi: 10.1002/jcb.22733.

[145] T. Pietrangelo *u* *dp.*, «Extracellular Guanosine 5'-Triphosphate Induces Human Muscle Satellite Cells to Release Exosomes Stuffed With Guanosine», *Front Pharmacol*, т. 9, мар. 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00152.

Приложение А. Основные публикации об исследовании ВВ методом АСМ.

Ссылка на статью	Источник везикул	Способ выделения везикул	Подложка для АСМ	Способ приготовления образца	Режим сканирования	Контрольные эксперименты
[131]	Эритроциты человека, подвергнутые стимуляции реагентом А23187.	Ультрацентрифугирование.	Стекло.	Фиксация в растворе 2%-ого глutarальдегида в. Полученную суспензию нанесли на подложку на 1 час, дегидратацию проводили в спиртах восходящей концентрации.	Полуконтактный режим на воздухе.	Контроль – на уровне клеток: RBCs в PBS. (нет активного выделения отдельных групп МВ и изменения формы эритроцита).
[132]	Слюна здоровых людей и пациентов с плоскоклеточной карциномой шеи.	Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Образец наносили на подложку, отмывали водой и высушивали.	Полуконтактный режим на воздухе.	Нет.
[113]	Клетки аденокарциномы молочной железы, линия MCF-7	Набор для осаждения (ExoQuick-TC)	Слюда с покрытием NiCl ₂	После нанесения экзосом на подложку инкубация в закрытой чашке Петри при 4 °С, в течение 12-18 часов После инкубации 80-90% образца аспирируется.	1. Для влажных образцов: полуконтактный режим в жидкости. 2. Для высушенных: полуконтактный на воздухе или в	Контроль АСМ: Сканирование подложки после модификации (чтобы показать отсутствие зерен на поверхности).

				Гидратированные МВ промываются трижды однократным раствором PBS. Осушенные МВ промываются трижды дистиллированной водой, аспирируются и высушиваются в потоке азота.	бесконтактном режиме.	Контроль концентрации экзосом на NTA перед нанесением на подложку.
[44]	Слюна здоровых людей.	Набор для осаждения ExoQuick-TC (EQ, System Biosciences Inc.; Mountain View, CA). Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Высушивание азотом.	Полуконтактный режим на воздухе.	Нет.
[42]	Слюна здоровых людей.	Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Промывание дистиллированной водой и высушивание азотом.	Полуконтактный режим на воздухе (обычный AM-AFM и режим PM-AFM с обратной связью по фазе) и в жидкости,	В экспериментах по силовой спектроскопии - контроль отсутствием

					а также силовая спектроскопия с использованием кантилеверов, модифицированных антителами против CD63.	специфических антител на чипе.
[48]	Клетки аденокарциномы молочной железы, линия MDA-MB-231. Кровь здорового человека.	Ультрацентрифугирование.	Слюда, покрытая антителами против белка CD142 (TF), а также антителами против CD 41 – в качестве контроля Модификация подложки включала нанесение слоев этаноламина и глутарового альдегида.	Осаждение в течение часа при комнатной температуре. Образец PBS для просмотра в жидкости. Промывание дист. водой и высушивание на воздухе.	В жидкости: Peak force tapping. На воздухе: полуконтактный режим.	Контроль: отрицательный – раствор PBS; подложка с антителами против белка, которого нет на микровезикулах. Получение изображений подложки на разных стадиях модификации.
[133]	Клетки аденокарциномы	Приготовление: клетки отмыли трижды в PBS и	Нержавеющая сталь, покрытая монослоем	Суспензия MB наносится в канал, инкубация в течение часа.	Полуконтактный на воздухе.	Контроли: i: без EDC/NHS активации антител

	простаты человека, линия LNCaP.	FBS-free RPMI среде с добавлением 1 unit/mL пенициллина и 1 µg/mL стрептомицина. Через 48 часов собрали супернатант и центрифугировали при 1000g 30 минут.	CDPA с Anti-EpCAM антителами.	Промывается в PBS. Задержавшиеся МВ фиксируются 1%-ным раствором PFA. Промывание дист. водой, затем 70% этанол ь и чистый этанол.		ii: без антител iii: без МВ.
[134]	Кровь здоровых людей и кровь пациентов, больных раком. Из крови вначале выделяли плазму, обогащенную тромбоцитами, затем из нее выделяли везикулы.	Pefabloc SC.	Слюда, покрытая антителами против CD41. Для нанесения антител слюду модифицировали этаноламином и EGTA.	Суспензию наносят на подложку. После инкубации дважды промывается HEPES и хранится в закрытом виде.	Полуконтактный на воздухе.	Контроль: подложку модифицировали неспецифическим и антителами IgG1. Съемка чистой подложки и модифицированной CD41, но без связывания

[135]	Три линии клеток карциномы толстой кишки человека: HT29, HCT116, и SW480	Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Выделенные МВ, разводят в PBS и наносят на подложку. Образцы сушат в потоке воздуха в течение 2х часов, после чего их промывают дистиллированной водой и снова высушивают	Полуконтактный на воздухе.	Нет.
[136]	B16-F10 (кожная меланома мыши), AsPC-1 (аденокарцинома поджелудочной человека), MDA-MB-231-4175 (<i>человеческий рак груди с тройным негативным фенотипом, при этом какой-то экзотический</i>)	Ультрацентрифугирование.	Для топографии: Слюда. Для измерения жесткости: слюда модифицированная поли-L-лизином.	Промывание дист. водой и высушивание азотом. Жесткость: образцы адсорбируют 45 минут на подложке, промывают в дист. воде и трижды в PBS.	Полуконтактный на воздухе. Измерение жесткости.	Нет.
[119]	Человеческая глиобластома, U87.	1. Выделение с помощью аффинных	Для Peak force. Слюда,	На подложку наносят 50 мкл суспензии и	1. Peak force в жидкости.	Нет.

		<p>магнитных микрочастиц. Используются антитела против маркеров CD9, CD63, CD81 и ErCAM.</p> <p>2. Ультрацентрифугирование.</p>	<p>модифицированная 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTES). Методика: 10 мкл 10% APTES наносят на очищенную слюду. Подложку на ночь оставляют в вакуумной камере, затем хранят в азотной.</p> <p>TM. Слюда.</p>	<p>оставляют на 10 минут, после чего четырехкратно промывают дист. водой и добавляют 50 мкл её же перед съемкой.</p>	<p>2. Полуконтактный на воздухе.</p>	
[137]	<p>Сыворотка крови здоровых людей и больных множественной миеломой.</p>	<p>1. Ультрацентрифугирование (P3)</p> <p>2. Разделение в градиенте плотности сахарозы</p> <p>3. Разделение в градиенте плотности йодиксанола</p> <p>4. Набор для осаждения экзосом Echo PK.</p>	<p>Слюда.</p>	<p>Экзосомы суспендировали в буфере, разводили дист. водой. Суспензию экзосом нанесли на подложку и высушили при комнатной температуре.</p>	<p>Полуконтактный на воздухе.</p>	<p>Нет.</p>

[138]	Клетки аденокарциномы молочной железы, MCF-7.	ExoQuick-TC.	Слюда.	Экзосомы развели до концентрации 10^9 на мл в 0.1 PBS, суспензию нанесли на подложку.	Peak force.	Есть отрицательный контроль.
[139]	Слюна здоровых людей и клетки аденокарциномы толстой кишки человека HT-29.	Для слюны: Ультрацентрифугирование, совмещенное с разделением в градиенте плотности сахарозы, йодиксанола или йогексола. Для кондиционированной среды культивирования клеток: Ультрацентрифугирование.	Слюда, модифицированная APTES.	Инкубация идет 15 часов при температуре 4°C.	Полуконтактный в жидкости.	Нет

[140]	Клетки дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Химическое разрушение клеток, разделение в градиенте плотности сахарозы, центрифугирование.	Стекло.	Суспензию нановезикул наносят на стекло на 15 минут, затем трижды промывают PBS и дальнейшую съемку ведут в буфере.	Силовая спектроскопия. Полуконтактный в жидкости.	Сравнение свойств нановезикул и липосом
[141]	Стволовые клетки глиомы человека (GASC) и человеческие клетки глиобластомы линии A172.	ExoQuick. Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Суспензию экзосом в PBS нанесли на подложку и высушили.	Полуконтактный на воздухе.	Нет
[45]	Слюна здоровых людей.	Ультрацентрифугирование.	Слюда. <i>(В примечании к картинке сказано, что слюда модифицирована агглютинином пшеничных зародышей (WGA), что не отражено в методах)</i>	Суспензию экзосом нанесли на подложку на 10 минут. Отмывание в дист. воде. Высушивание в потоке азота.	Магнитный полуконтактный режим в жидкости.	Отрицательный контроль – подложка без экзосом
[124]	Клетки носоглоточной	Ультрацентрифугирование.	Слюда с APTES.	Нанесение экзосом на подложку, связывание с	Полуконтактный в жидкости.	Нет.

	карциномы человека, линии 5-8F.			подложкой через глутаральдегидные сшивки.		
[112]	Образцы жидкости из ротовой полости здоровых людей и болеющих раком ротовой полости.	Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Нанесение: суспензия разведена в дистиллированной воде на 2 минуты; Высушивание: в токе азота.	Полуконтактный на воздухе.	Нет.
[142]	Линии рака предстательной железы HeLa, PC-3, DU-145. <i>(Для эксперимента на АСМ)</i>	Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Суспензию нанесли на подложку, зафиксировали 0,5% глутаральдегидом, промыли дист. водой и высушили на воздухе.	Полуконтактный на воздухе.	Нет.
[143]	Линия клеток человеческой нейробластомы, KellyCis83.	Ультрацентрифугирование.	Слюда.	Образцы экзосом и NIR-экзосом ресуспендировали в PBS и нанесли на подложку. После чего их высушили при комнатной температуре.	Полуконтактный на воздухе.	Сравнение экзосом меченых NIR-AZA экзогенно и эндогенно
[144]	PC12 (линия феохромоцитомы)	Ультрацентрифугирование	Слюда.	Каплю образца разведенного в PBS	Контактный режим на воздухе.	Нет.

	мозгового вещества надпочечника крысы)			инкубировали на подложке 10 минут, после чего её высушили током азота.		
[145]	МРС (предшественники мышечных клеток)	Ультрацентрифугир ование	Не указана.	Не указано.	Полуконтактный режим на воздухе.	Контроль – СТР- недифференциро ванные.

8. БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою искреннюю благодарность своему научному руководителю заведующему лабораторией атомно-силовой микроскопии кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, кандидату физико-математических наук Багрову Дмитрию Владимировичу, за помощь в организации экспериментов, за обучение новым методам исследования, постоянную поддержку и внимание.

Особую благодарность выражаю заведующей лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, доктору биологических наук, Чевкиной Елене Максимовне, а также научному сотруднику данной лаборатории, Скрыбину Глебу Олеговичу, за предоставление образцов внеклеточных везикул для исследования и предоставление результатов по иммуноблотингу, а также за обработку и интерпретацию полученных результатов.

Выражаю особую благодарность сотрудникам кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за дружественное отношение и внимание к нашей работе.