

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Никишин Игорь Игоревич

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

1.1.10 Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель (консультант) **Багров Дмитрий Владимирович**
кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты **Батищев Олег Вячеславович**
доктор физико-математических наук, доцент, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, заместитель директора института по научной работе.

Хомутов Геннадий Борисович
доктор физико-математических наук, доцент, МГУ имени М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, профессор.

Быков Виктор Александрович
доктор технических наук, ГК «НТ-МДТ Спектрум Инструментс», почетный Президент.

Защита диссертации состоится «25» октября 2022 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ауд. 5-68. E-mail: info@physics.msu.ru.

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/495250418>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук

А.Э.Сидорова

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении отражена актуальность диссертационной работы, сформулированы цели, задачи и методы исследования, описаны научная новизна и практическая значимость, представлена апробация полученных результатов.

Первая глава представляет собой литературный обзор имеющихся знаний о внеклеточных везикулах, методах их исследования и выделения. Рассматриваются классы внеклеточных везикул, их физиологические свойства и биологическая роль. Обсуждаются источники происхождения ВВ, а также их биохимический состав. В отдельных подразделах описаны различные методы исследования ВВ, использованные в данной работе, прежде всего, методы микроскопии высокого разрешения.

Вторая глава содержит информацию об используемых материалах и методах. Описан наиболее распространенный метод выделения ВВ – дифференциальное ультрацентрифугирование. Затем описаны экспериментальные процедуры, использованные в работе – получение изображений методами ПЭМ и АСМ, основные шаги обработки данных.

Третья глава посвящена результатам и состоит из четырех подразделов.

Первый подраздел посвящен разработке нейронной сети для детекции ВВ и веб-приложению ScanEV на ее основе. Отдельное внимание уделено сбору и разметке датасета, подбору нейросети, тестированию обученной нейросетевой модели и валидации результатов.

Методом ПЭМ с контрастированием 1% ацетатом уранила были получены изображения ВВ различного происхождения – выделенных из асцитов, плазмы крови, кондиционированной среды культивирования клеток различных линий (Skov3, A549, Coco704, Efo21) и первичных клеток (плаценты человека). Кроме того, были получены изображения ВВ, выделенных из сыворотки крови человека и из физиологических жидкостей – смыва из полости матки и асцитической жидкости (рисунок 1). Видно, что независимо от происхождения ВВ имеют характерную морфологию сдутых мячиков (“cup-shaped morphology”). Согласно требованиям MISEV, получение подобных изображений является необходимым шагом при работе с образцами ВВ. Для ускорения и автоматизации обработки подобных изображений в рамках диссертационной работы была создана программа ScanEV (Scanner for Extracellular Vesicles) на основе нейросети, которая обнаруживает подобные частицы на изображениях и измеряет их размеры [3].

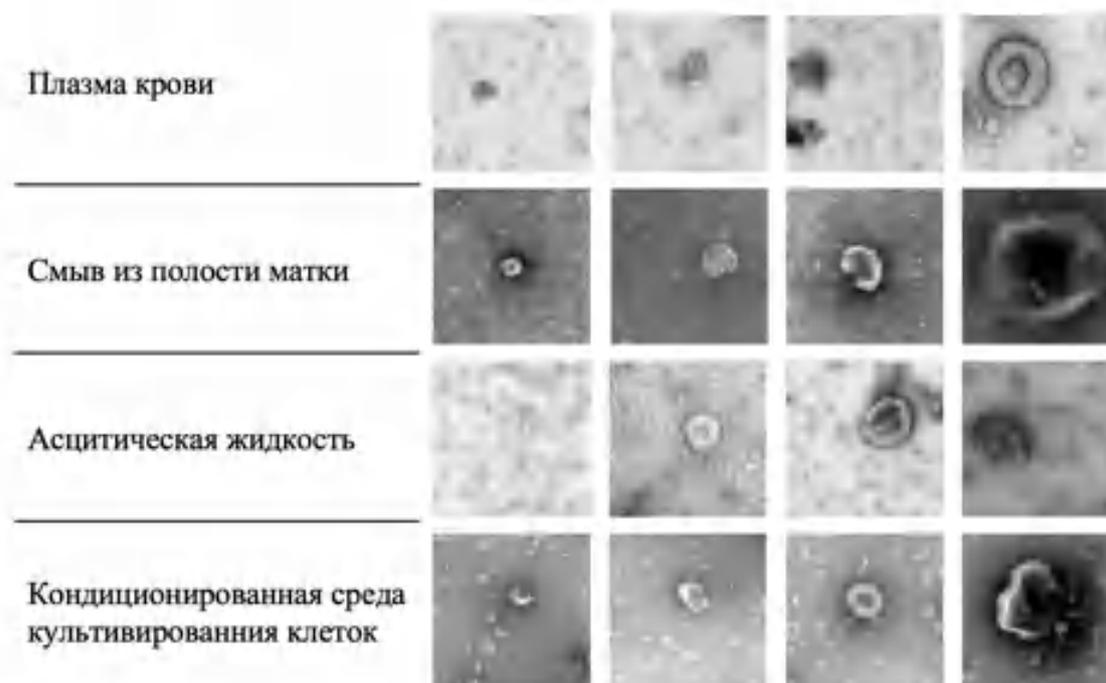


Рис. 1. Снимки ВВ различного происхождения (каждый фрагмент имеет размер 700x700 пикселей).

Для обучения нейросети была проведена разметка полученных нами ПЭМ-изображений. Всего 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 характерную морфологию сдутых мячиков, причем на изображениях с разными увеличениями (рисунок 2). Размеры в пикселях внеклеточных везикул варьировались от образца к образцу от 30 px до 650 px.

Образцы разного происхождения были приготовлены независимо, и интенсивность контрастирования варьировалась между образцами и между изображениями. Таким образом, размеченные наборы данных включали частицы с различной яркостью и контрастностью.

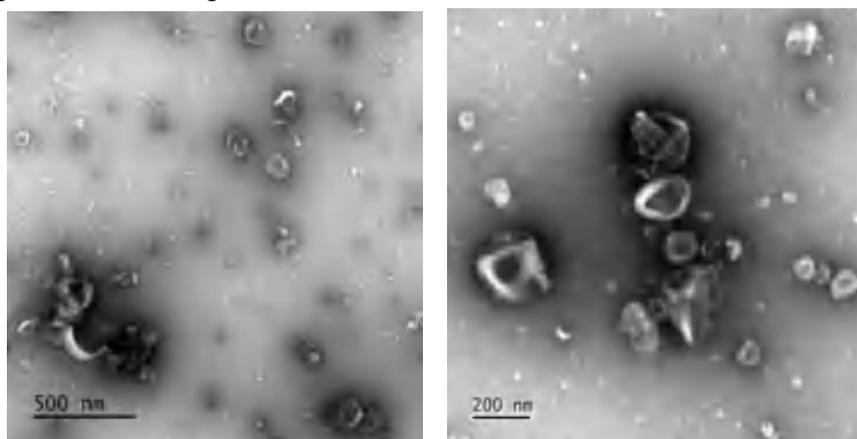


Рис. 2. Примеры ПЭМ-изображений ВВ, используемых в обучении нейросетевой модели.

Выбор обученной модели Mask R-CNN обусловлен тем, что данная нейронная сеть используется для решения задач поиска и классификации объектов на изображениях [4]. Мы использовали нейронную сеть Mask R-CNN с ResNet51 в качестве основы и входным разрешением 1024×1024.

Мы использовали Mask R-CNN, предварительно обученную на наборе данных COCO для инициализации. Обучение нейросети проводилось на компьютере с процессором AMD Ryzen 5, 3600 ГГц и графическим процессором Nvidia RTX 2070 super.

Данную сеть мы обучили, провели валидацию и тестирование результатов обучения, а затем для нее разработали веб-интерфейс, что сделало загрузку и обработку ПЭМ-изображений более удобной и простой для неспециалистов. Однако, из-за наличия интерфейса и необходимости загружать изображения на сайт, скорость обработки изображений уменьшилась по сравнению с работой программы через командную строку. После детектирования везикул, программа определяет их количественные характеристики: площадь, периметр, эллиптичность (сферичность), сумму полуосей аппроксимирующего эллипса (эффективный диаметр), а также логический параметр, определяющий лежит ли частица на границе кадра или нет. Для каждой обнаруженной частицы вычисляется параметр «score», показывающий насколько обнаруженная

частица похожа на ВВ из обучающей выборки. Пример работы разработанной нами программы приведен на рисунке 3.

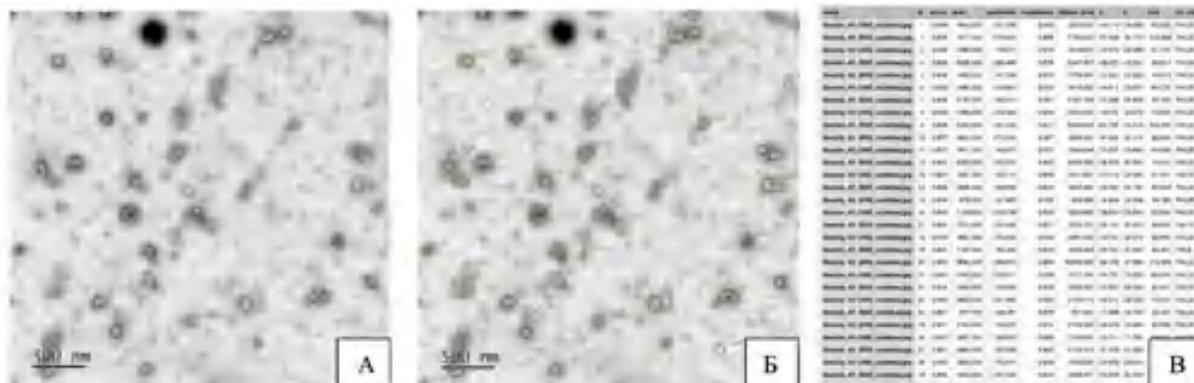


Рис. 3. Входное изображение в оттенках серого цвета (А) и результаты обработки (Б, В).

Мы сравнили результаты работы программы ScanEV с результатами программы FRU-Net – единственного на момент написания нашей работы специализированного инструмента на основе нейронной сети для обнаружения ВВ на ПЭМ-изображениях [5]. Программа FRU-Net, в отличие от ScanEV, основана на семантической сегментации. На рисунке 4 показаны два изображения из нашего тестового набора данных: для каждого изображения приведена разметка, сделанная вручную, и результаты двух программ – нашей и FRU-Net. Когда мы использовали FRU-Net, мы удалили масштабные отрезки с изображений, потому что они вызывали ложное срабатывание.

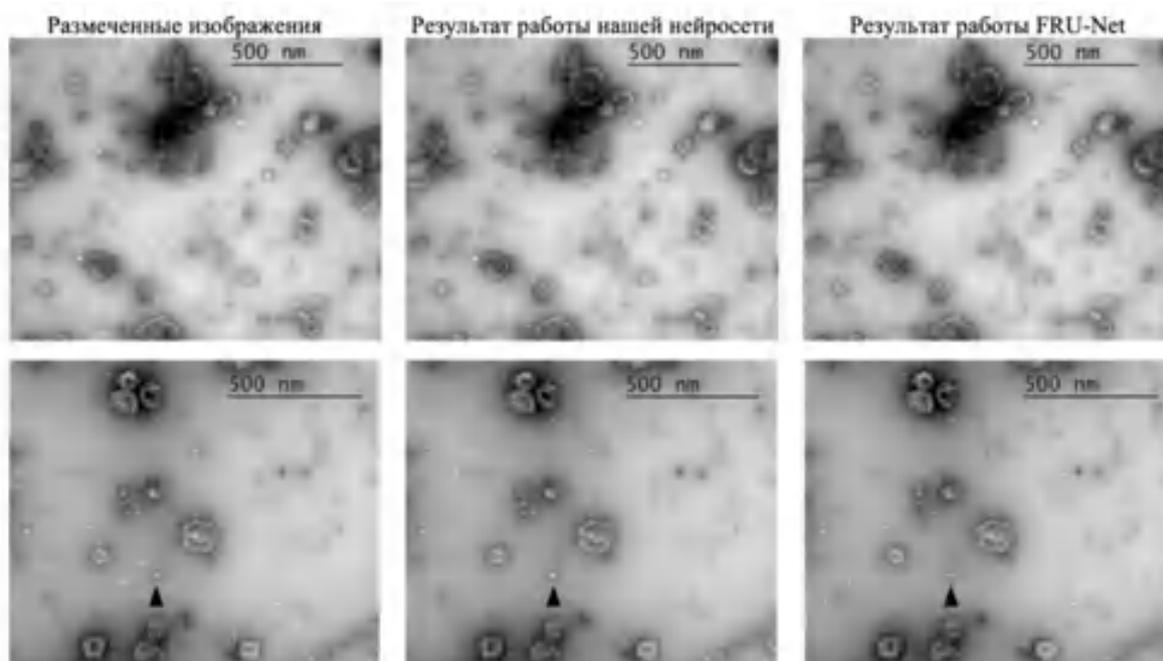


Рис. 4. Сравнение обученной нами нейросети и FRU-Net.

Две сети показывают разные результаты, и это является следствием как минимум двух факторов. Во-первых, нейронная сеть Mask R-CNN (ScanEV) 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 4. Мы считаем, что такие частицы детектировать не следует, т.к. они могут представлять собой липопотеины [6] или другие примеси [7] в образцах ВВ. Во-вторых, применяются разные подходы: семантическая сегментация и сегментация экземпляров. FRU-Net делает семантическую сегментацию (отделяет частицы от фона) и с помощью преобразования Радона разделяет близко расположенные частицы. Используемая нами сеть Mask R-CNN позволяет сразу выделять частицы, используя попиксельные маски (сегментацию экземпляров).

Результаты количественного сравнения нейросетей приведены в таблице 1. Мы вычисляли два параметра – точность (precision) и полноту (recall), которые обычно используются для оценки качества работы нейросетей. Оказалось, что нейросеть ScanEV показала высокие значения этих параметров, (среднее значение средней точности 0.909 при IoU 0.75, полноты 0.928 при IoU 0.75), что является формальным параметром ее эффективности.

Таблица 1. Метрики при сравнении ScanEV на основе Mask R-CNN и FRU-Net [4].

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 (ScanEV)	Наш обучающий	Наш валидационный	0.75	0.897	0.953	0.912	0.978
Mask R-CNN (ScanEV)	Наш обучающий	Наш тестовый	0.68	0.817	0.858	0.843	0.892
FRU-Net	Из статьи [5]	Наш тестовый	0.288	0.329	0.389	0.476	0.545
FRU-Net	Из статьи [5]	Тестовый из статьи [5]	0.597	0.661	0.715	0.794	0.832
Mask R-CNN	Из статьи [5]	Тестовый из статьи [5]	0.65	0.795	0.82	0.775	0.859

Второй подраздел посвящен применению предложенных методик визуализации в рамках исследования стоматина как потенциального экзосомального маркера. В

липидных мембранах присутствуют рафты – субмикронные домены с размером до ~200 нм, которые по своему составу и свойствам отличаются от окружающей мембраны. Обычно они обогащены холестерином и сфинголипидами, а также некоторыми специфическими белками, например, белками семейства SPFH и кавеолинами. В составе экзосом различного происхождения наблюдались флотиллины и кавеолины (прежде всего, кавеолин-1), и было выдвинуто предположение, что другие рафт-ассоциированные белки также могут быть представлены в экзосомах.

Нами были исследованы экзосомы, выделенные из кондиционированной среды культивирования клеточных линий А549, Н460, Н1299. Образцы экзосом были охарактеризованы методом ПЭМ – и было показано, что на ПЭМ-изображениях частицы имели характеристическую морфологию «сдутых мячиков» (рисунок 5Б).

Измерение размеров экзосом производилась методами АТН и ПЭМ. На рисунке 5А изображены диаграммы распределений частиц по размерам на основе данных, полученных методом АТН. Средние размеры составили: для клеток А549 - 114 ± 20 нм; для клеток Н1299 - 122 ± 17 нм; для клеток Н460 - 111 ± 10 нм. По данным ПЭМ, средние размеры оказались немного ниже и составили: для клеток А549 - 103 ± 42 нм; для клеток Н1299 - 115 ± 45 нм; для клеток Н460 - 103 ± 36 нм (Рисунок 5Б). 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).

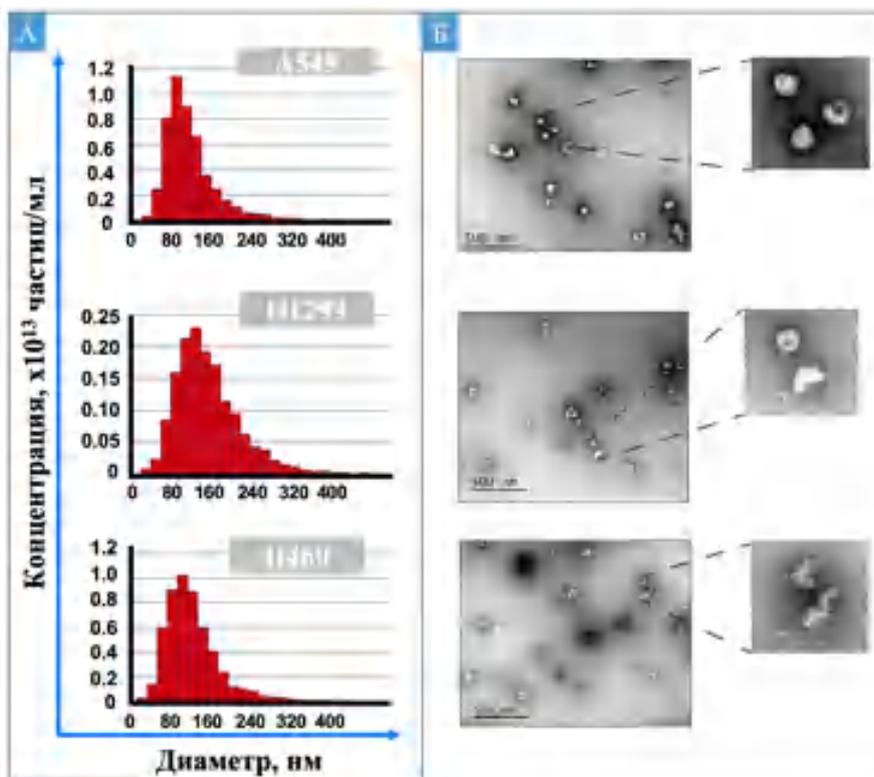


Рис. 5. Распределение ВВ по размерам по данным АТН (А), ПЭМ-изображения внеклеточных везикул (Б).

Наличие белков определяли методом иммуноблотинга. Эксперименты по иммуноблотингу были проведены сотрудниками лаборатории регуляции клеточных и

вирусных онкогенов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России. На рисунке 6 показано, что стоматин обнаруживается в образцах ВВ, полученных из трех клеточных линий А549, Н460, Н1299. В качестве отрицательного контроля использовали белок CRABP2 – как и ожидалось, он обнаруживался в клеточном лизате, но не в образцах экзосом.

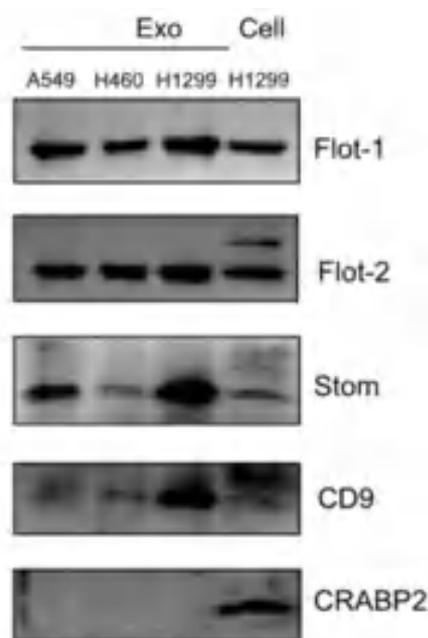


Рис. 6. Анализ стоматина и других белков в образцах внеклеточных везикул, секретируемых клетками А549, Н460, Н1299. Контроль – лизат клеток Н1299 [8].

Впоследствии было обнаружено присутствие стоматина в экзосомах, продуцируемых различными раковыми клетками (немелкоклеточный рак легкого, клетки рака груди и яичников), а также в экзосомах из биологических жидкостей, включая плазму крови, асцитические жидкости и смыв из полости матки [8]. Высокое содержание стоматина в экзосомах различного происхождения делает его многообещающим экзосомальным маркером.

Третий подраздел посвящен разработке методики атомно-силовой микроскопии (АСМ) для исследования ВВ. Метод АСМ, как и ПЭМ, позволяет получать изображения отдельных ВВ. При этом он используется значительно реже — это может объясняться двумя факторами. Во-первых, при исследовании методом АСМ, осажденные на подложку ВВ не имеют характерной морфологии, и их сложно отличить от примесей, содержащихся в образцах [9]. Во-вторых, это связано с недостатком методик: фактически единственная методическая работа по исследованию ВВ с помощью АСМ [10] предлагает проводить адсорбцию на подложку в течение 12 часов, что крайне неудобно.

При подготовке образцов для АСМ мы сократили время инкубации суспензии ВВ на подложке до 5-15 минут. Это стало возможным благодаря тому, что мы работали с суспензиями, концентрации которых составляли $\sim 10^{11}$ частиц/мл и выше (по данным АТН), а авторы работы [10] 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.

ВВ, осажденные на слюду, модифицированную ионами никеля, выглядят как глобулярные объекты (рисунок 7). Для проверки самосогласованности получаемых данных было предложено три критерия (в общем случае они применимы не только к АСМ-изображениям, но и к изображениям, получаемым другими методами микроскопии).

1. Отсутствие зависимости размера частиц (высоты H и диаметра D) от выбора поля зрения.
2. Независимость поверхностной плотности частиц σ от поля сканирования.
3. Увеличение поверхностной плотности частиц σ при увеличении концентрации суспензии, из которой частицы наносят на подложку, при одинаковом времени их адсорбции.

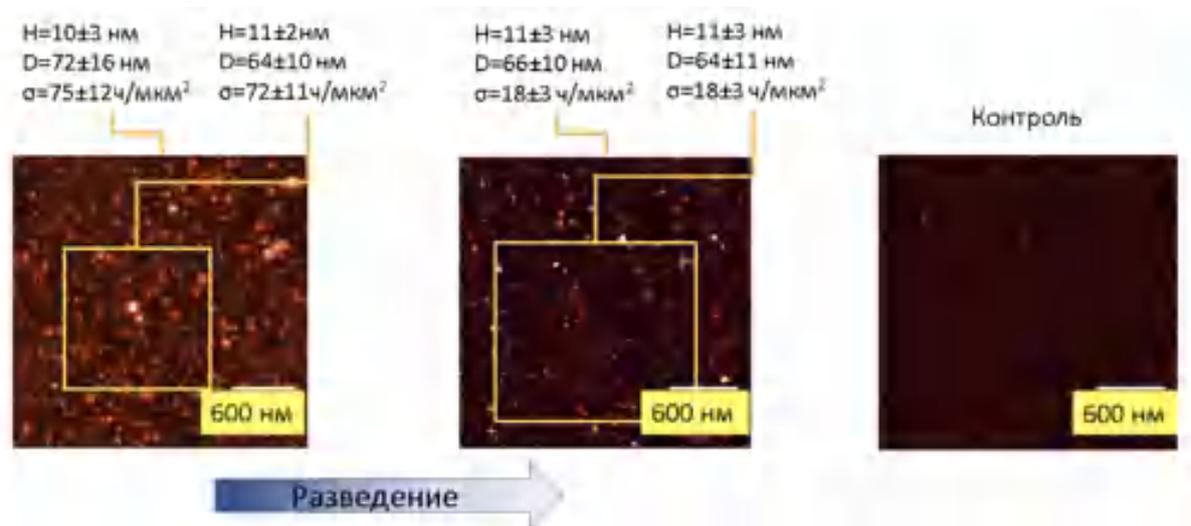


Рис. 7. Изображения ВВ из клеток A549 на слюде, модифицированной никелем, а также контрольное изображение (PBS на слюде). В верхней части представлены значения средней высоты частиц над подложкой H , среднего диаметра D и средней поверхностной плотности σ .

Измерения методом АСМ были проведены с ВВ, выделенными из среды культивирования клеток линий Colo704 и A549, а также из среды культивирования клеток плаценты. Во всех случаях все три критерия выполнялись.

На примере ВВ, выделенных из среды культивирования клеток плаценты человека, было показано, что размеры, измеренные методами ПЭМ, АСМ и АТН, совпадают в пределах погрешности (75 ± 34 нм, 76 ± 18 нм, 94 ± 7 нм соответственно). В целом, эксперименты, выполненные с использованием АСМ, позволяют надеяться, что этот метод будет более активно использоваться для работы с ВВ.

Четвертый подраздел представляет собой описание методики корреляционной микроскопии. Данная методика позволяет получать АСМ и ПЭМ изображения одних и тех же индивидуальных внеклеточных везикул. В основе методики лежит идея о том, что стандартная сетка для ПЭМ может использоваться как подложка для АСМ.

Выше было показано, что при исследовании ВВ методом ПЭМ с контрастированием солями тяжелых металлов частицы имеют характерную морфологию “сдутых мячиков”. Многие авторы указывают, что она возникает в результате деформации ВВ при их адсорбции на сетку, но так ли это? Предложенная нами методика корреляционной микроскопии позволяет ответить на этот вопрос.

В качестве подложки, на которую наносили внеклеточные везикулы, использовали медные сетки для электронного микроскопа с углеродным покрытием (рисунок 8). Их диаметр равен 3,05 мм; толщина покрытия – 10-20 нм. Везикулы сорбировали на подложки из аморфного углерода, обработанного в тлеющем разряде. Были сопоставлены разные варианты организации эксперимента - сначала АСМ, затем ПЭМ или наоборот (рисунок 8). Если исследование методом АСМ предшествовало исследованию методом ПЭМ, то его можно было проводить до или после обработки образца ацетатом уранила. Из трех возможных последовательностей (рисунок 8) нами была выбрана такая: образец наносили на сетку, контрастировали ацетатом уранила, исследовали методом АСМ, затем методом ПЭМ.

Для совмещения изображений, полученных двумя методами, необходимо найти площадку с размером приблизительно $\sim 1 \times 1 \text{ мкм}^2$ (это типичный размер поля зрения, исследуемого методами ПЭМ или АСМ для получения изображений ВВ) на сетке с площадью $\sim 7 \text{ мм}^2$.

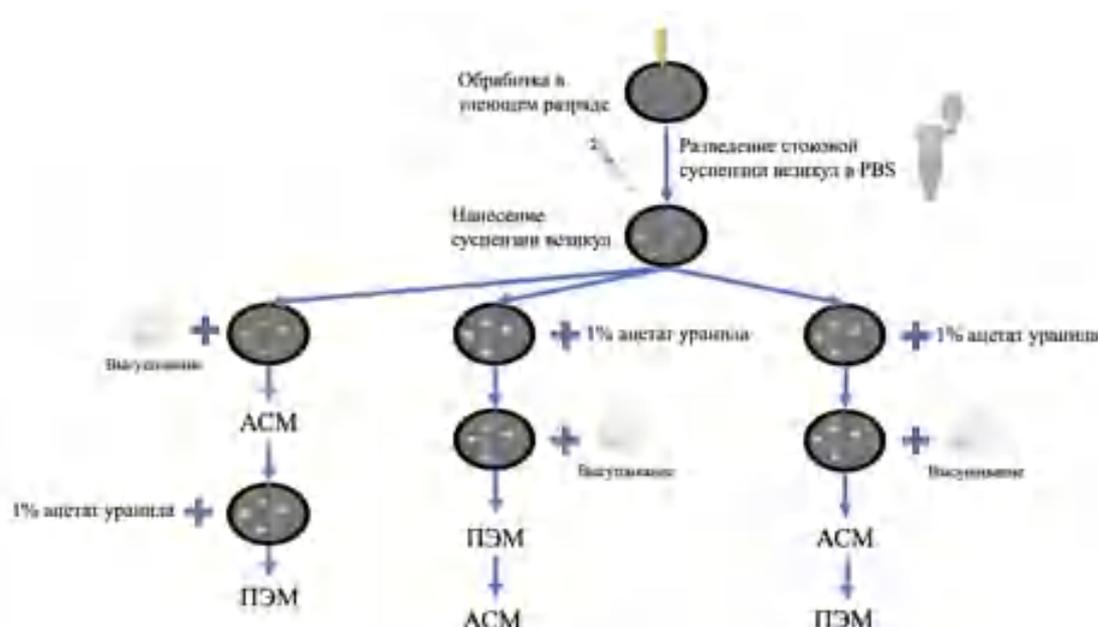


Рис. 8. Схема эксперимента по исследованию образцов с использованием корреляционной микроскопии. Образец наносят на сетку, затем эту сетку исследуют методами АСМ и ПЭМ.

Чтобы это стало возможным, была предложена процедура “навигации”, то есть выбора поля зрения относительно центра сетки или заметных на ней дефектов. Для поиска общих полей зрения на АСМ и на ПЭМ использовали следующую последовательность действий:

1. При исследовании методом АСМ использовали совмещенный с АСМ оптический микроскоп и получали изображения образца с малым увеличением. Можно ориентироваться относительно дефектов, краев ячеек, и агрегатов частиц, осажденных на подложку.
2. 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 9. Обычно использовали диапазон размеров от 5×5 мкм² до 50×50 мкм².
3. Выбирали несколько частиц, для которых получали изображения с наилучшим разрешением (шаг сканирования не более 4 нм).
4. После получения изображений методом АСМ переходили к исследованию методом ПЭМ. При этом мы ориентировались на особенности, найденные на АСМ-снимках (сгустки, агрегаты частиц, границы ячеек).

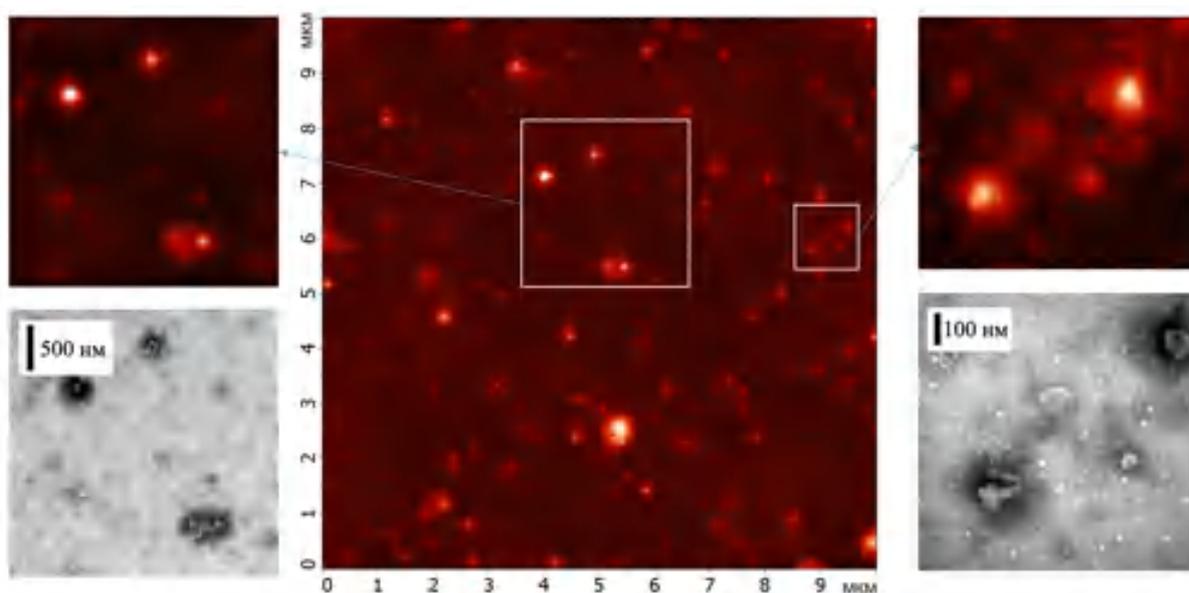


Рис. 9. Изображение общих полей зрения на АСМ (в оттенках красного) и на ПЭМ (в оттенках серого).

В результате экспериментов были собраны пары изображений двадцати частиц, полученных методами АСМ и ПЭМ — это были изображения ВВ, выделенных из сред культивирования клеток MCF-7 и SKOV3, а также из маточного аспирата.

В результате эксперимента были получены изображения одних и тех же частиц, которые можно было попарно обрабатывать и сравнивать (рисунок 10). 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. Таким образом, характеристическая морфология ВВ «cup-shaped

morphology», которая для ПЭМ является типичной и общепринятой, не соответствует рельефу поверхности на АСМ. Некоторые частицы действительно имеют углубление в центральной части или на краю, однако, их доля на общем фоне невелика. Таким образом, деформация не является главным фактором, который приводит к возникновению морфологии «cup-shaped morphology» на ПЭМ-изображениях. Можно предположить, что более важным фактором является затекание контрастирующего агента (ацетата уранила) внутрь ВВ. Можно провести аналогию с адено-ассоциированными вирусами – на ПЭМ-изображениях они имеют или не имеют затемнение в центральной области в зависимости от того, проник ли внутрь них контрастирующий агент [11], [12].

Разработанная методика корреляционной микроскопии была использована для ВВ, но, очевидно, она может применяться для других объектов.

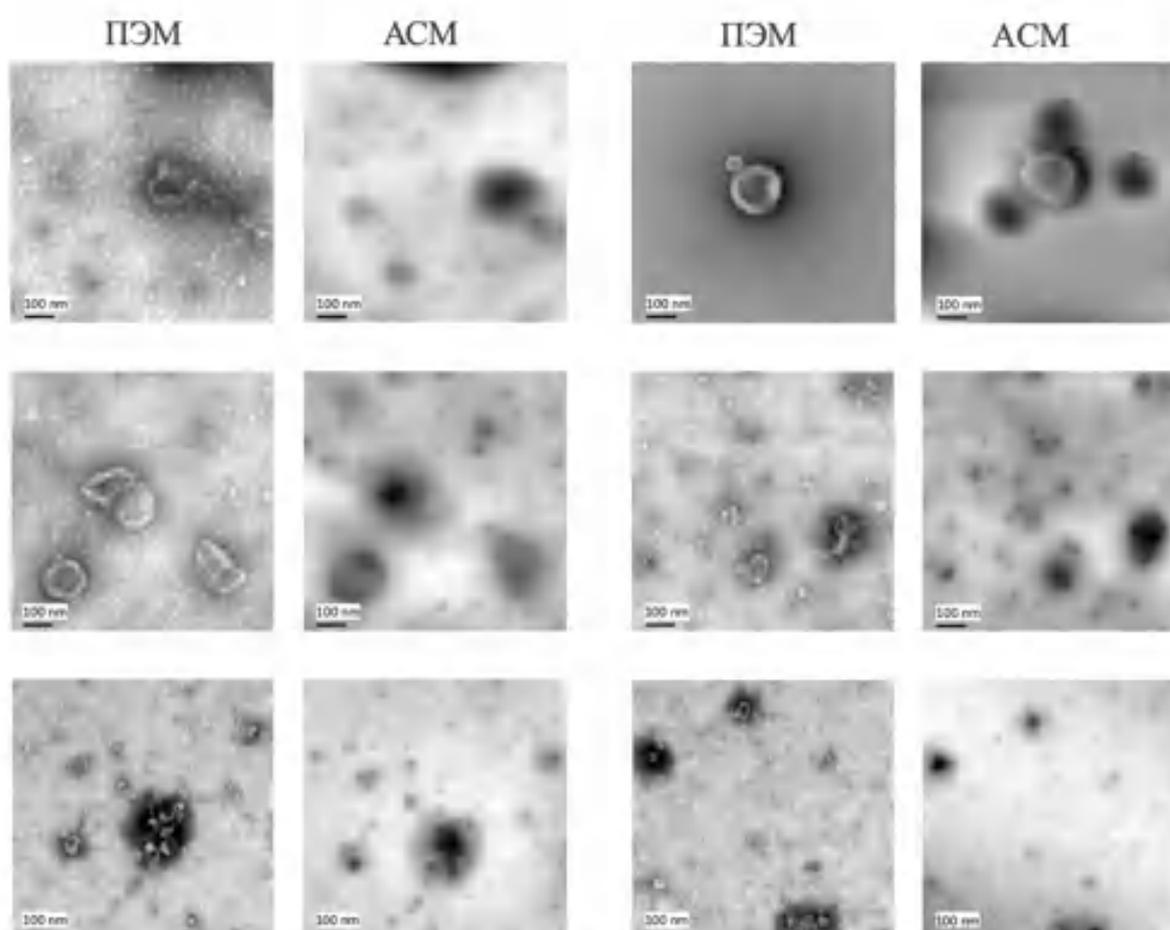


Рис. 10. ПЭМ и АСМ изображения внеклеточных везикул, АСМ изображения представлены в инвертированной серой палитре.

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, например вирусов [13]. 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/с. Методика корреляционной микроскопии также может быть значительно ускорена за счет использования “быстрого” АСМ.

Во всем мире активно развиваются коммерческие компании, которые разрабатывают диагностические процедуры, основанные на анализе экзосом и других ВВ. Можно надеяться, что данная работа будет способствовать продвижению этого направления медицины.

Основные 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.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] J. Lötvall *et al.*, “Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles,” *J Extracell Vesicles*, vol. 3, no. 1, p. 26913, Jan. 2014, doi: 10.3402/jev.v3.26913.
- [2] C. Théry *et al.*, “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*, vol. 7, no. 1, p. 1535750, Dec. 2018, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [3] I. Nikishin *et al.*, “ScanEV – A neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in TEM images,” *Micron*, vol. 145, p. 103044, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.micron.2021.103044.
- [4] K. He, G. Gkioxari, P. Dollar, and R. Girshick, “Mask R-CNN,” in *2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV)*, Oct. 2017, pp. 2980–2988. doi: 10.1109/ICCV.2017.322.
- [5] E. Gómez-de-Mariscal *et al.*, “Deep-Learning-Based Segmentation of Small Extracellular Vesicles in Transmission Electron Microscopy Images,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 13211, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49431-3.
- [6] L. Zhang *et al.*, “Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy,” *J Lipid Res*, vol. 52, no. 1, pp. 175–184, Jan. 2011, doi: 10.1194/jlr.D010959.
- [7] L. G. Rikkert, R. Nieuwland, L. W. M. M. Terstappen, and F. A. W. Coumans, “Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent,” *J Extracell Vesicles*, vol. 8, no. 1, p. 1555419, Dec. 2019, doi: 10.1080/20013078.2018.1555419.
- [8] G. O. Skryabin *et al.*, “Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker,” *J Cell Biochem*, vol. 122, no. 1, pp. 100–115, Jan. 2021, doi: 10.1002/jcb.29834.
- [9] B. W. Sódar *et al.*, “Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection,” *Sci Rep*, vol. 6, no. 1, p. 24316, Jul. 2016, doi: 10.1038/srep24316.
- [10] M. Skliar and V. Chernyshev, “Imaging of Extracellular Vesicles by Atomic Force Microscopy,” *Journal of Visualized Experiments*, no. 151, Sep. 2019, doi: 10.3791/59254.
- [11] E. D. Horowitz *et al.*, “Biophysical and Ultrastructural Characterization of Adeno-Associated Virus Capsid Uncoating and Genome Release,” *J Virol*, vol. 87, no. 6, pp. 2994–3002, Mar. 2013, doi: 10.1128/JVI.03017-12.
- [12] X. Fu *et al.*, “Analytical Strategies for Quantification of Adeno-Associated Virus Empty Capsids to Support Process Development,” *Hum Gene Ther Methods*, vol. 30, no. 4, pp. 144–152, Aug. 2019, doi: 10.1089/hgtb.2019.088.
- [13] D. V. Bagrov *et al.*, “Structural characterization of β -propiolactone-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) particles,” *Microsc Res Tech*, vol. 85, no. 2, pp. 562–569, Feb. 2022, doi: 10.1002/jemt.23931.

**ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в журналах,
индексируемых в базах данных WoS, РИНЦ, Scopus RSCI:**

1. **Igor Nikishin**, Ruslan Dulimov, Gleb Skryabin, Sergey Galetsky, Elena Tchevkina, and Dmitry Bagrov. Scanev – a neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in tem images. *Micron*, 145:103044, 2021. DOI: j.micron.2021.103044. IF SCOPUS - 2.251.
2. **Igor Nikishin**, Dmitry Bagrov, Elena Tchevkina, Gleb Skryabin, and Ruslan Dulimov. Detection and characterization of extracellular vesicles in transmission electron microscopy by convolutional neural network. *International Journal of Biomedicine*, 9(S16), 2019. DOI: 10.21103/IJBM.9.Suppl/_1.OR24. IF SCOPUS - 0.260.
3. D. V. Bagrov, A. M. Senkovenko, **I. I. Nikishin**, G. O. Skryabin, P. B. Kopnin, and E. M. Tchevkina. Application of afm, tem, and nta for characterization of exosomes produced by placenta-derived mesenchymal cells. *Journal of Physics: Conference Series*, 1942(1):012013, 2021. DOI: 10.1088/1742-6596/1942/1/012013. IF SCOPUS - 0.55.
4. Г. О. Скрябин, А. В. Комельков, П. Б. Копнин, **И. И. Никишин**, С. А. Кузьмичев и Е. М. Чевкина. Влияние нокдауна кавеолина-1 на белковый состав экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легких. *Успехи молекулярной онкологии*, 8(1):41–46, 2021. DOI: 10.17650/2313-805x2021-8-1-41-46. ИФ РИНЦ - 0.5.
5. Gleb O. Skryabin, Andrei V. Komelkov, Sergey A. Galetsky, Dmitry V. Bagrov, Evgeniy G. Evtushenko, **Igor I. Nikishin**, Kirill I. Zhordaniia, Elizaveta E. Savelyeva, Maria E. Akselrod, Iulia G. Paianidi, and Elena M. Tchevkina. Stomatin is highly expressed in exosomes of different origin and is a promising candidate as an exosomal marker. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(1):jcb.29834, 2021. DOI: 10.1002/jcb.29834. IF SCOPUS - 4.429.

**СПИСОК КОНФЕРЕНЦИЙ, НА КОТОРЫХ БЫЛИ ПРЕДСТАВЛЕНЫ
РЕЗУЛЬТАТЫ ДАННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ:**

1. XXIX Российская конференция по электронной микроскопии “Современные методы электронной, зондовой микроскопии и комплементарных методов исследования наноструктур и наноматериалов”, Москва, 29-31 августа 2022.
2. Конференция “X Всероссийская научная молодежная школы-конференция “Химия, физика, биология: пути интеграции”, Москва, 20 апреля 2022.
3. Конференция “Ломоносовские чтения-2022”, Москва, 15 апреля 2022.
4. Конференция “Молодых ученых и студентов, посвященная 100-летию МГМСУ им. А.И. Евдокимова “Физиология и физика в современной медицине”, Москва, 14 апреля 2022.
5. VI Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, Москва, Россия, 21-23 декабря 2021.
6. 3-я Международная школа-конференция “Сканирующая зондовая микроскопия для биологических систем – 2021”, Москва, Россия, 24-26 ноября 2021.
7. XXVIII Российская конференция по электронной микроскопии “Современные методы электронной, зондовой микроскопии и комплементарных методов исследований наноструктур и наноматериалов”, Черноголовка, Россия, 7-10 сентября 2020.
8. Международный молодежный научный форум Ломоносов-2020, Москва, 18 ноября 2020.
9. Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy 2019 (RICSEM-2019, Moscow, June 2-5), Moscow, Россия, 2-5 июня 2019.