

**Развитие методики исследования экзосом методом атомно-силовой
микроскопии**

Научный руководитель – Багров Дмитрий Владимирович

Сенковенко Алексей Михайлович

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический
факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

E-mail: senkoven99@gmail.com

Внеклеточные везикулы - это частицы с диаметром от 50 нм до 5 мкм, окруженные липидным бислоем, секретлируемые клетками во внеклеточное пространство [1]. Наибольшее внимание привлекают экзосомы - мельчайшие внеклеточные везикулы, размером от 30 до 100 нм [2]. Интерес к экзосомам связан с их участием в иммунном ответе и развитии злокачественных опухолей, однако их роли не до конца исследованы.

Использование методов микроскопии высокого разрешения критически важно при проведении исследований экзосом; их роль подчеркивается в методических рекомендациях Международного общества по изучению внеклеточных везикул [4]. Просвечивающая электронная микроскопия является стандартом для визуализации экзосом, по ее использованию есть много методических рекомендаций. В то же время, об исследовании экзосом методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), существует только одна методическая статья [3], и она рекомендует неудобный протокол приготовления образцов, который требует ~12 часов. Кроме того, некоторые технические вопросы пока остаются без ответа. Таким образом, целью данной работы будет оптимизация методики визуализации экзосом методом АСМ.

В качестве подложки для образцов использовали очищенную слюду, которую модифицировали раствором 5 мМ NiCl₂. Суспензии экзосом различного происхождения титровали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и наносили на модифицированную слюду. Процесс адсорбции сократили до 5 минут, в отличие от рекомендаций [3].

Полученные данные проходили проверку на самосогласованность по трем критериям. Во-первых, для конкретного образца на конкретной подложке проверяли отсутствие зависимости размера частиц от поля сканирования. Во-вторых, подтверждали независимость поверхностной плотности частиц от поля сканирования. В-третьих, показывали, что для конкретного образца при вариации концентрации количество частиц в поле зрения изменяется, а средний размер частиц остается постоянным.

Отработанная нами методика была успешно применена для трёх образцов экзосом.

Источники и литература

- 1) Colombo M. et al. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles // Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2014, vol. 30, pp. 255–289.
- 2) Johnstone R. M. et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) // J. Biol. Chem., 1987, vol. 262, no. 19, pp. 9412–9420.

- 3) Skliar M. and Chernyshev V. S. Imaging of extracellular vesicles by atomic force microscopy // J. Vis. Exp., 2019, vol. 2019, no. 151.
- 4) Théry C. 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, 2018, vol. 7, no. 1.