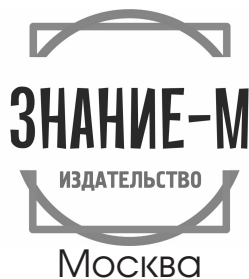


СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ,  
ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Н. В. Юнусова, Д. А. Сваровский, М. Р. Патышева

# ПРАКТИКУМ ПО ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ



2023

УДК 576.54:57.083(035.3)

ББК 28.070

Ю56

**Рецензенты:**

*Головкин А. С.* – доктор медицинских наук, руководитель группы генно-клеточной инженерии  
Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России,  
г. Санкт-Петербург;

*Тамкович С. Н.* – кандидат биологических наук, доцент кафедры клинической биохимии  
Института медицины и психологии им. В. Зельмана

ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный  
университет», г. Новосибирск

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией  
по группе специальностей в области лабораторной медицины 30.05.01 – Медицинская  
биохимия ФГБОУ СибГМУ Минздрава России (протокол № 2 от 29.08.2023)

**Юнусова, Наталья Валерьевна.**

Ю56 Практикум по визуализации внеклеточных везикул методом проточной  
цитометрии : учебное пособие: [Электронный ресурс] / Н. В. Юнусова,  
Д. А. Сваровский, М. Р. Патышева. – Москва : Знание-М, 2023. – 43 с.

ISBN 978-5-00187-655-7

DOI: 10.38006/00187-655-7.2023.1.44

Практикум состоит из пяти тем, касающихся актуальных проблем визуализации внеклеточных везикул методом лазерной проточной цитометрии. Структура пособия соответствует разделам утвержденных рабочих программы по дисциплинам «Молекулярная биология» (направления подготовки 30.05.01 – Медицинская биохимия) и «Медицинские биотехнологии» (направления подготовки 30.05.01 – Медицинская биохимия, 30.05.02 – Медицинская биофизика).

Пособие предназначено для подготовки к практическим занятиям по молекулярной биологии и медицинским биотехнологиям для студентов медико-биологического факультета, для подготовки к процедуре аккредитации специалистов, для аспирантов, а также для ординаторов по специальностям 31.08.05. – Клиническая лабораторная диагностика и 32.08.15 – Медицинская микробиология.

**УДК 576.54:57.083(035.3)**

**ББК 28.070**

**ISBN 978-5-00187-655-7**

© Юнусова Н. В.,  
Сваровский Д. А.,  
Патышева М. Р., 2023  
© Знание-М, 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение.....</b>	<b>4</b>
<b>Список сокращений.....</b>	<b>5</b>
<b>Тема 1. Внеклеточные везикулы: виды, классификация, значение внеклеточных везикул в биологии и медицине .....</b>	<b>6</b>
<b>Тема 2. Понятие «типирование везикул». Общие требования к выделению внеклеточных везикул для визуализации методом проточной цитометрии.....</b>	<b>10</b>
<b>Тема 3. Прямая визуализация ВВ методом лазерной проточной цитометрии (калибровка прибора с подсвеченными частицами, контроли, представление результатов, примеры гейтирования).....</b>	<b>16</b>
<b>Тема 4. Визуализация ВВ, сорбированных на латексных или магнитных частицах.....</b>	<b>25</b>
<b>Тема 5. Сравнение методов визуализации внеклеточных везикул .....</b>	<b>32</b>
<b>Эталоны ответов к тестовым заданиям .....</b>	<b>41</b>
<b>Рекомендуемая литература .....</b>	<b>43</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Данное учебно-практическое пособие является дополнением к практикуму по молекулярной биологии для студентов медико-биологического факультета и соответствует темам рабочих программ по направлениям подготовки 30.05.01 — Медицинская биохимия и 30.05.02 — Медицинская биофизика.

В практикуме изложены современные представления о разновидностях, классификации, значении внеклеточных везикул в биологии и медицине; общие требования к выделению внеклеточных везикул для визуализации методом проточной цитометрии. В пособии подробно представлены методы прямой и непрямой визуализации везикул. Лабораторные работы практикума включают визуализацию везикул плазмы крови в вариантах одно- и многопараметрического окрашивания. В конце пособия приводятся данные собственных исследований по сравнению методов визуализации внеклеточных везикул.

Пособие предназначено для подготовки к практическим занятиям по молекулярной биологии и медицинским биотехнологиям для студентов медико-биологического факультета, для подготовки к процедуре аккредитации специалистов, для аспирантов, а также для ординаторов по специальностям 31.08.05 — Клиническая лабораторная диагностика и 32.08.15 — Медицинская микробиология.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВ — внеклеточные везикулы

мРНК — матричная РНК

миРНК — микроРНК

рРНК — рибосомальные РНК

тРНК — транспортные РНК

lncRNA — длинные некодирующие РНК

MMPs — матриксные металлопротеиназы

HSPs — белки теплового шока

sEVs — малые ВВ

ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия

MFI — медиана интенсивности флуоресценции

NTA — анализ траектории наночастиц

PBS — фосфатно-солевой буфер (от англ. Phosphate buffered saline, PBS)

## ТЕМА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ: ВИДЫ, КЛАССИФИКАЦИЯ, ЗНАЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

*Актуальность.* Внеклеточные везикулы (ВВ) благодаря своим размерам, свойствам адгезии к клеточной поверхности и интернализации являются важными посредниками межклеточной коммуникации. В настоящее время уточняется их диагностический, прогностический и терапевтический потенциал.

*Цель* — приобретение базовых знаний по составу и функциям ВВ, знакомство с основными направлениями использования везикул в биологии и медицине.

### Теоретическая часть

---

ВВ представляют собой бислойные липосомы естественного происхождения, несущие разнообразные белки (мембранные и внутривезикулярные), матричные и некодирующие рибонуклеиновые кислоты (мРНК, миРНК, рРНК, тРНК и их фрагменты, длинные некодирующие РНК (lncRNA), а также внеклеточную ДНК, сорбированную на наружной стороне мембраны. Точный состав и структура зависят от типа клеток, на которых ВВ формируются в результате выпячивания и отрыва участков разных клеточных мембран.

Описаны три основных класса ВВ — это экзосомы, микровезикулы (микрочастицы, эктосомы) и апоптотические тельца. Микровезикулы, или эктосомы, отщепляются от плазматической (то есть внешней) мембраны практически всех клеток (для которых совершались соответствующие исследования) при активации, смерти и просто в ходе их жизни и старения в результате блеббинга. Они имеют размеры от 100 до 1000 нм в диаметре. Их состав по липидам и мембранным

белкам качественно близок к составу плазматической мембраны родительской клетки, но количественно может сильно различаться. По данным ряда работ в микровезикулах обнаружили цитоскелет, представленный актиновыми филаментами и актинсвязывающими белками. Как и плазматическая мембрана, микровезикулярная содержит фосфатидилсерин. Однако в отличие от клеток микровезикулы не имеют АТФ-зависимых механизмов для поддержания мембраны в асимметричном состоянии, поэтому фосфатидилсерин присутствует на внешнем слое мембраны микровезикулы постоянно. Именно микровезикулы являются главным неклеточным источником прокоагулянтной поверхности в плазме крови, соперничая в этом даже с тромбоцитами. Второй главный класс ВВ — экзосомы, отщепляемые от мембран внутриклеточных компартментов, частицы 40–100 нм в диаметре. Разделение на экзосомы и эктосомы достаточно условно. Распределение этих образований по размерам не является дискретным, антигенный состав тоже в значительной степени может быть смешанным, и отделить их друг от друга сложно. Часто применяют термин «малые ВВ — sEVs», к которому обычно относят везикулы размером от 40 до 300 нм. В последние годы выделяют третий тип везикул — апоптотические тельца. Они похожи на микровезикулы по размеру и несколько крупнее их (до 5 мкм), несут фосфатидилсерин. Эти ВВ образуются в ходе запрограммированной клеточной смерти для «упаковки» содержимого клетки и часто включают элементы ядерного материала и органеллы. По этим параметрам и ряду других они заметно отличаются от состава микровезикул, которые отделяются от плазматической мембраны при активации или механическом повреждении клетки.

Формирование ВВ, по-видимому, является универсальным феноменом, сопровождающим функционирование любых биологических мембран: они производятся любыми клетками и содержатся в любых жидкостях организма, ВВ на своей поверхности обычно несут антигены родительской клетки, поэтому, идентифици-

руя эти антигены, можно выделить и физически рассортировать (сортинг) ВВ различного происхождения. В настоящее время охарактеризованы ВВ плазмы крови, культуральной, синовиальной, слезной, цереброспинальной и асцитической жидкостей, слюны и мочи. Наиболее детально изученными являются ВВ плазмы крови. Считается, что в норме кровь содержит только ВВ, произведенные клетками крови или сосудистого русла. Появление ВВ иного происхождения обычно характерно для травм, повреждения ткани (некроз, апоптоз, например, при инфаркте миокарда), при наличии онкологических заболеваний. В плазме крови основными фракциями ВВ являются тромбоцитарные, эритроцитарные и лейкоцитарные ВВ. С помощью проточной цитометрии и иммуноэлектронной микроскопии в плазме крови можно детектировать ВВ эндотелиального, адипоцитарного происхождения, а также другие редкие типы ВВ.

*Основные функции ВВ в норме:*

- 1) межклеточная коммуникация;
- 2) стимуляция ангиогенеза и ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса (обусловлена в основном тетраспанинами CD9, CD63, CD81);
- 3) ВВ обладают иммуномодулирующим действием и участвуют в воспалении;
- 4) презентация антигенов (характерно для ВВ слюны и ВВ от иммунных клеток);
- 5) прокоагулянтная активность (преимущественно для тромбоцитарных ВВ).

Диагностический и прогностический потенциал ВВ обусловлен их составом и происхождением. В настоящее время разрабатываются наборы для упрощенной изоляции ВВ из биологических жидкостей. ВВ наряду с циркулирующими нуклеиновыми кислотами перспективны для диагностики многих злокачественных новообразований как высокоинформативные и легкодоступные маркеры — предикторы радиотерапии, терморадитерапии, химиотерапии, таргетной терапии.



Оптические свойства ВВ как наноразмерных объектов в настоящее время также планируют использовать для целей диагностики и прогнозирования течения рака.

***Вопросы для самоконтроля***

1. Какие типы ВВ существуют?
2. Каковы размеры ВВ и их происхождение?
3. Каковы основные источники ВВ в циркуляции?
4. Чем обусловлен диагностический и прогностический потенциал выделенных из биологических жидкостей ВВ?
5. Охарактеризуйте основные функции ВВ в норме.

## ТЕМА 2. ПОНЯТИЕ «ТИПИРОВАНИЕ ВЕЗИКУЛ». ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ВЫДЕЛЕНИЮ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

*Актуальность.* Большинство исследований, посвященных изучению ВВ, включает их выделение из биологических жидкостей с последующим типированием (характеризацией ВВ для отнесения их к определенному типу ВВ). Альтернативой выделения может быть сортинг ВВ определенного фенотипа с использованием сортера (сортер — проточный цитофлуориметр с функцией физического выделения клеток или ВВ определенного заданного фенотипа). Полезной опцией сортера может быть термостатирование сортируемого образца и отсортированных фракций для поддержания их жизнеспособности. Отсортированные везикулы также нуждаются в типировании.

*Цель* — познакомиться с методами, используемыми для типирования ВВ. Знакомство с общими требованиями к выделению ВВ для их визуализации методом проточной цитометрии.

### Теоретическая часть

---

Выделенные или отсортированные ВВ должны быть охарактеризованы:

1. Как мембранные объекты определенного размера (для этих целей обычно выполняется трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) или сканирующая электронная микроскопия низкого напряжения).

Для анализа размеров и формы везикул чаще используются ТЭМ и криоэлектронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия позволяет по-

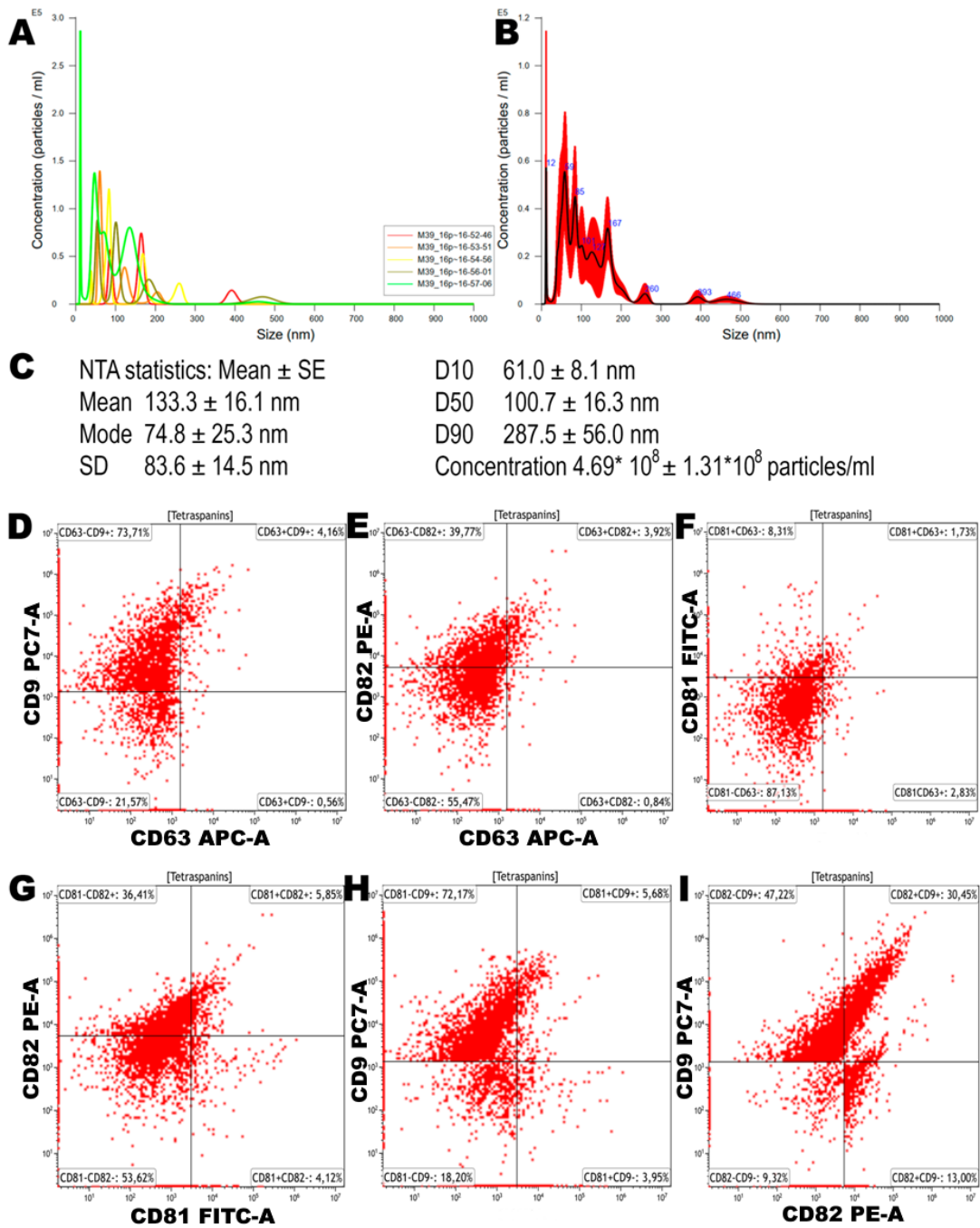
лучать дополнительную информацию о трехмерной структуре ВВ, выделенных из культуральных сред и физиологических жидкостей. Кроме того, этот метод дает возможность изучать процессы формирования и слияния везикул. Метод иммуноэлектронной микроскопии (сочетание ТЭМ и иммуноокрашивания ВВ антителами, сорбированными на частицах золота) позволяет визуализировать ВВ как мембранные объекты, экспрессирующие тетраспанины.

2. Как частицы определенного размера с определенной концентрацией (такую информацию о ВВ возможно получить с помощью анализа траектории наночастиц; нанотрековый анализ — NTA). Анализ траекторий наночастиц — метод визуализации и изучения *наночастиц* в растворах, разработанный компанией Nanosight (Великобритания). В его основе лежит наблюдение за Броуновским движением отдельных наночастиц, скорость которого зависит от вязкости и температуры жидкости, а также размера и формы наночастицы. Это позволяет использовать данный принцип для измерения размера наночастиц в *коллоидных растворах*. Метод позволяет также оценить общую концентрацию частиц.

3. Как частицы, экспрессирующие тетраспанины (CD9, CD63 и CD81), которые являются мажорными (маркерными) белками для ВВ. Для этих целей обычно используют проточную цитометрию (вариант много- или однопараметрического окрашивания) или вестерн-блоттинг.

Принципиально многие методы выделения ВВ приемлемы для их последующей визуализации ВВ методом проточной цитометрии (сорбция на лектинах, изоляция в двухфазной полимерной системе, изоляция в растворах полиэтиленгликоля, различные варианты ультрацентрифугирования) однако наиболее часто для этих целей используют различные варианты ультрацентрифугирования или ультрацентрифугирование в сочетании с ультрафильтрацией.

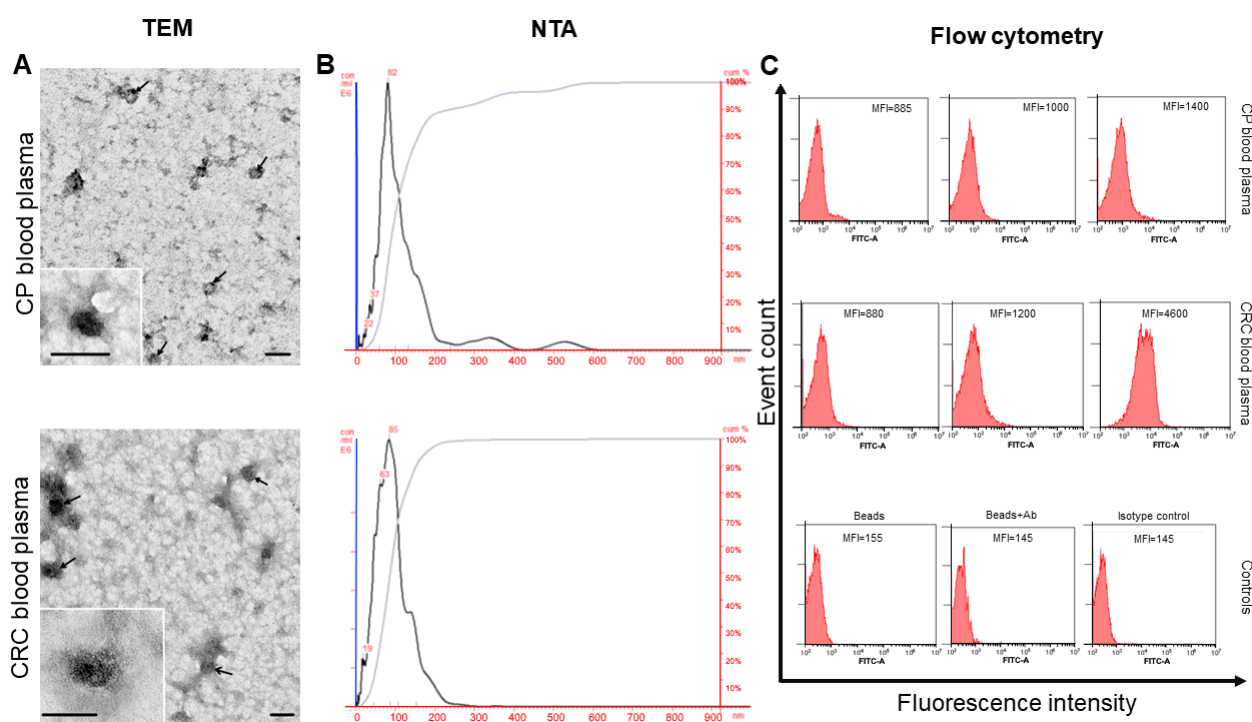
Примеры результатов типирования ВВ представлены на рис. 1 и 2.



**Рис. 1.** Типирование ВВ: *A.* Графики концентрация/размер для наночастиц репрезентативной фракции P16 ВВ плазмы крови. *B.* График усредненной концентрации/размера фракции P16 ВВ плазмы крови. *C.* Статистика размера и концентрации фракции P16 ВВ плазмы крови. *D.* Репрезентативный точечный график интенсивности флуоресценции CD63 по сравнению с CD9, CD63 по сравнению с интенсивностью флуоресценции CD82 (*E*), CD63 флуоресценции против интенсивности флуоресценции CD81 (*F*), флуоресценции CD81 от интенсивности флуоресценции CD82 (*G*), CD81 по сравнению с флуоресценцией CD9 (*H*), CD82 по сравнению с CD9 (*I*), (Kalinina et al., Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 2022, <https://link.springer.com/article/10.1134/S0022093022060151>).

Метод прямой визуализации ВВ.

*Примечание.* Фракцию P16 ВВ плазмы крови получали следующим образом: 500 мкл образца ЭДТА-плазмы крови центрифугировали при 16 000 g в течение одного часа при +4°C, затем собирали 450 мкл супернатанта верхней фракции (далее S16). При этом осадок (далее — P16), содержащий ВВ, ресуспендировали в 100 мкл PBS pH 7,2–7,4 и использовали для проточной цитометрии.



**Рис. 2.** Идентификация изолированных ВВ: *А.* ТЭМ показала наличие везикул с типичной морфологией и отсутствие везикул размером более 100 нм. На вставках показаны ВВ. Масштабные полосы соответствуют 100 нм. Электронная микроскопия, негативная окраска уранилацетатом; *В.* Распределение размеров ВВ плазмы, выделенных из крови больных с колоректальными полипами (СРPs) и колоректальным раком (СRСРs). Данные NTA анализа; *С.* Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных ВВ СРPs и СRСРs плазмы крови. Проточная цитометрия ВВ, сорбированных на латексных частицах покрытых антителами к CD9, представлены репрезентативные средние значения интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescent Intensity, MFI). Каждое исследование проводили трехкратно. Для изотипических контролей (гистограмма справа) меченые комплексы CD9-ВВ инкубировали с мышинным FITC IgG. Показан один из репрезентативных изотипических контролей. Для отрицательного контроля ничего не добавляли к латексным частицам, меченым антителами к CD9 (гистограмма слева), или инкубировали с антителами, мечеными FITC (анти-CD63, анти-CD81 или анти-CD24) в отсутствие ВВ. Показан один из репрезентативных отрицательных контролей (гистограмма в центре).

*Примечание.* ВВ выделяли методом ультрафильтрации (фильтры 100 нм) с двойным ультрацентрифугированием. Краткое описание метода: венозная кровь (около 18 мл) собиралась в одноразовые стерильные вакутейнеры с КЗЭДТА. Фракционирование клеток выполнялось на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором на охлаждении в 4°C в течение 20 мин. при ускорении в 1000 g (TGL-24MC, Drawell, Китай). После этого полученную при первом центрифугировании плазму отбирали в одноразовые конические пластиковые пробирки типа Falcon объемом 15 мл, после чего уравнивали на лабораторных электронных весах с помощью фосфатно-солевого буфера (phosphate buffered saline, PBS).

Дебрис осаждали центрифугированием плазмы крови на высокоскоростной центрифуге с угловым ротором (TGL-24MC, Drawell, Китай) на охлаждении в 4°C в течение 15 мин. при ускорении в 14 000 g. Полученный супернатант разводился PBS до общего объема 33 мл для проведения ультрафильтрации через фильтры с диаметром пор 100 нм (Minisart high flow 16553-K, Sartorius, Германия). Фильтрат подвергался последующему ультрацентрифугированию на ультрацентрифуге с бакет-ротором (Optima XPN 80, Beckman Coulter, США) при охлаждении в 4°C в течение 90 мин. Полученный после ультрацентрифугирования осадок ресуспендировался PBS и центрифугировался при тех же условиях. Полученные аликвоты ВВ замораживались в жидком азоте и хранились при –80°C (суммарный объем препарата — около 700 мкл).

### ***Вопросы для самоконтроля***

1. Что относится к основным параметрам внеклеточных везикул, используемых при их типировании?
2. В чем заключаются различия основных методов выделения внеклеточных везикул?

3. Чем метод ультрацентрифугирования отличается от ультрацентрифугирования с ультрафильтрацией применительно к выделению?
4. Какие методы применяются при определении внеклеточных везикул как частиц определенных размера и концентрации?
5. Какие еще разновидности ультрацентрифугирования, кроме ультрацентрифугирования в чистом виде и ультрацентрифугирования с ультрафильтрацией, используются для выделения ВВ? Опишите принцип метода.

## ТЕМА 3. ПРЯМАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВВ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ (КАЛИБРОВКА ПРИБОРА С ПОДСВЕЧЕННЫМИ ЧАСТИЦАМИ, КОНТРОЛИ, ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПРИМЕРЫ ГЕЙТИРОВАНИЯ)

*Актуальность.* Прямая визуализация ВВ методом лазерной проточной цитометрии возможна на высокочувствительных лазерных цитометрах типа Cytoflex (Beckman Coulter, USA) или их аналогах, оснащенных фиолетовым (405 нм), синим (488 нм) и красным (638 нм) лазерами.

*Цель* — познакомиться с прямой визуализацией ВВ методом проточной цитометрии, особенностями калибровки, контролей и вариантами представления результатов исследования.

### Теоретическая часть

---

В соответствии с современными рекомендациями Международного общества по изучению внеклеточных везикул (International Society for Extracellular Vesicles) 2021 года по визуализации ВВ необходимо придерживаться определенного протокола исследования, а именно:

1. Отчет по преаналитической части должен содержать сведения о типе пробирки для взятия биологической жидкости, манипуляции с образцом, обогащении/изоляции фракций. Должен быть представлен подробный отчет об используемых методах выделения ВВ с описанием приборов, расходных материалов, фильтров, наборов для выделения ВВ, методах хранения образцов ВВ и т. д.



2. Отчет по подготовке образцов должен содержать полную информацию об исходной концентрации ВВ в образце, обо всех используемых красителях и антителах, о времени инкубации, температуре, параметрах отмывки образца.

**Внимание!** Для определения исходной концентрации ВВ в образце как при использовании прямых измерений, так и при сорбции на частицах применяют обычно NTA или определение белка. При этом в связи с низкой концентрацией белка в образцах ВВ используют флюориметрические высокочувствительные методы определения белка с флюорескамином (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/Fluorescamine-protocol.pdf> или с помощью набора NanoOrange Protein Quantitation Kit <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N6666>)

**Внимание!** При детекции ВВ как методом прямых измерений, так и методом сорбции на частицах необходимо центрифугировать используемые антитела, например, при 14 000 g и 40°C в течение 10 мин. для удаления агрегатов антител, которые могут имитировать ВВ.

**Внимание!** После окрашивания ВВ рекомендуется отмывка от несвязавшихся антител, при этом нужно учитывать, что для осаждения ВВ при прямом методе визуализации необходимо использовать высокоскоростные центрифуги или ультрацентрифугу (бакет-ротор) и ту скорость, которая использовалась для выделения ВВ.

3. Отчет по контрольным образцам должен включать проведение следующих контролей: контроль с профильтрованным через фильтр 220 нм буфером, буфер с реагентами, отмывые частицы в буфере (при работе по технологии с сорбцией на частицах), неокрашенные контроли (только ВВ или частицы ВВ), изотипические контроли, контроли единичного красителя.

**Внимание!** Обязательно проведение контроля с детергентами (например, Triton X-100). Такие контроли помогают определить, являются ли обнаруженные события заключенными в мембрану везикулами или другими белковыми комплек-

сами. Обработка детергентом лизирует мембрану ВВ, уменьшая их количество и сигналы. Частицы, устойчивые к детергентам, такие как белковые комплексы, сохраняются после лизиса детергентом, что позволяет отличить их от ВВ.

4. Отчет по настройке цитометра может включать информацию об используемых каналах, о проведении калибровки цитометра с калибровочными частицами (например, TruCount (BD Bioscience), Gigamix или Megamix (Beckman Coulter)) (только для технологии прямого измерения), о скорости потока, о проведении регламентных промывок прибора и их продолжительности, о количестве собираемых событий и т. д.

### ***Вопросы для самоконтроля***

1. Какие требования к предъявляет Международное сообщество по изучению внеклеточных везикул к визуализации ВВ?
2. Каким образом проводится определение исходной концентрации ВВ в образце?
3. Как можно удалить агрегаты антител, имитирующих ВВ?
4. Что входит в перечень контролей, используемых при работе с проточным цитометром для детекции ВВ? Для чего проводится контроль с детергентами?
5. Какие параметры входят в отчет о работе цитометра?

## **Практическая часть**

---

### ***Лабораторная работа № 1***

#### ***Визуализация внеклеточных везикул плазмы крови методом проточной цитометрии (прямая визуализация)***

*Биологический образец:* нативные или замороженные и хранящиеся при  $-80^{\circ}\text{C}$  препараты ВВ плазмы крови или другой биологической жидкости (слюна, ас-

цитическая жидкость). Фракцию P16 ВВ плазмы крови получают следующим образом: 500 мкл образца ЭДТА-плазмы крови центрифугируют при 16 000 g (бакет-ротатор) в течение одного часа при +4°C, затем собирают 450 мкл супернатанта верхней фракции (далее — S16). При этом осадок (далее — P16), содержащий ВВ, ресуспендируют в 100 мкл PBS pH 7,2–7,4 и используют для проточной цитометрии.

*Оборудование:*

- 1) высокочувствительный проточный цитофлюориметр типа Cytotflex S (Beckman Coulter, США), укомплектованный 405 нм (фиолетовым), 488 нм (синим) и 638 нм (красным) лазером или только 488 нм (синим) и 638 нм (красным) лазером;
- 2) высокоскоростная центрифуга или ультрацентрифуга (бакет-ротатор) с функцией охлаждения для работы с различными объемами жидкости.

*Реактивы и расходные материалы:*

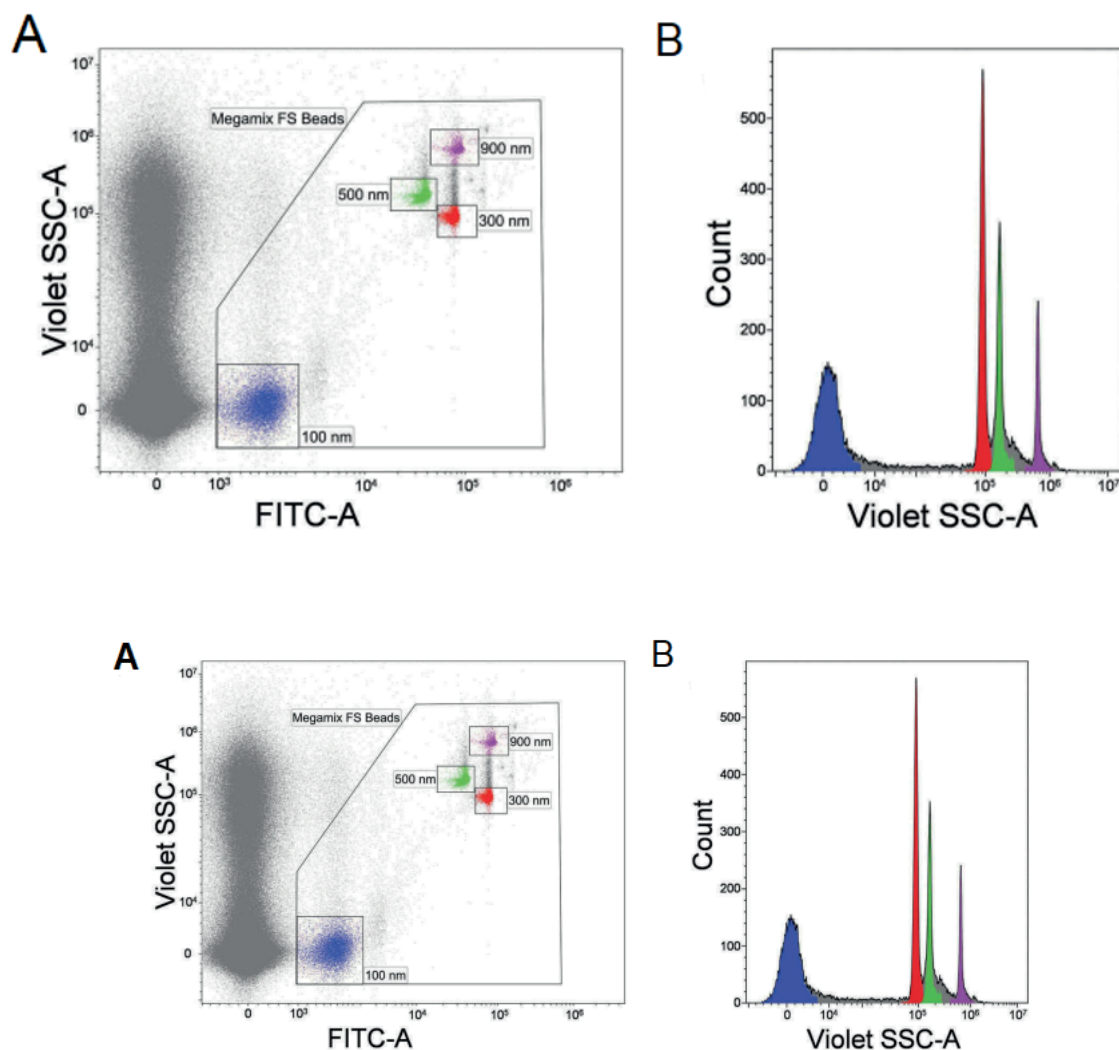
1. Дистиллированная вода для работы с ВВ должна быть дополнительно профильтрована через фильтр 220 нм!
2. Пробирки типа Eppendorf объемом 0,5 мл.
3. Пробирки для проточного цитофлюориметра.
4. Набор антител для окрашивания ВВ (например, CD 235a-PE, CD41-FITC) — для дифференцировки эритроцитарных и тромбоцитарных ВВ плазмы крови.
5. Фосфатно-солевой буфер PBS в таблетках (1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды).
6. Калибровочные частицы Megamix-Plus FSC, Gigamix или др.

*Ход работы:*

1. Откройте программное обеспечение цитометра, выполните ежедневную промывку и калибровку прибора, следуя инструкции производителя.

2. Настройте эксперимент, выполнив необходимые контроли — PBS, PBS с реагентами, неокрашенные контроли (только ВВ), изотипические контроли, контроли единичного красителя.

**Внимание!** При работе с ВВ необходимо использовать высокую скорость потока и выполнять промывки прибора не менее 3–4 мин. после каждой пробы!



**Рис. 3.** Калибровка проточного цитометра Cytoflex S на основе violet SSC с использованием эталонных шариков Megamix-Plus FSC: *A.* Поточечный график FITC-A против VioletSSC-A. События, соответствующие калибровочным шарикам, контролируются в регионе «Megamix FS Beads». Шарик определенного диаметра выделены разными цветами. *B.* График гистограммы VioletSSC-A. Представлены события только из региона «Megamix FS Beads». Фиолетовый SSC представлен в логарифмической шкале (Kondratov et al., *J Extracell Vesicles*. 2020, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32341769>).

3. Подготовьте разведения калибровочных частиц Megamix-Plus FSC в соответствии с рекомендациями производителя. Использование бокового рассеяния на более короткой длине волны 405 нм значительно снизит предел чувствительности для шариков полистирола до 100 нм по сравнению с более длинноволновым лазером. Коэффициенты усиления канала флуоресценции FITC установите таким образом, чтобы были видны гранулы полистирола размером 100 нм. Визуализируйте частицы, проведите гейтирование (рис. 3).

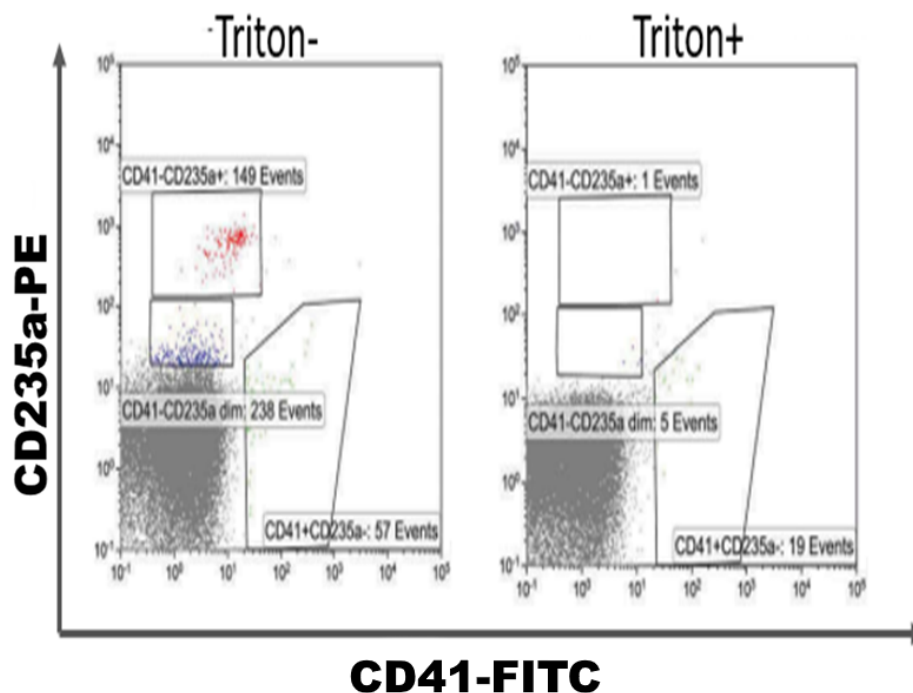
4. Если используется несколько антител или красителей, выполните компенсацию.

5. Возьмите пластиковую пробирку на 500 мкл, добавьте образцы ВВ (около 30 мкг белка), проинкубируйте с антителами в соответствии с рекомендациями производителя в течение 20 мин., в темноте при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин. Затем образцы нужно перенести в пробирки для проточного цитофлюориметра, добавить 1,5–2,0 мл PBS или Wash-буфера, отмыть в соответствии с рекомендациями из подп. 2 теоретической части к этому разделу. Около 300 мкл осадка использовать для цитометрии.

**Внимание!** Обратите внимание на аккуратное пипетирование проб, так как энергичное перемешивание будет способствовать формированию агрегатов ВВ и антител.

6. Одновременно с опытными образцами подготовить контрольный образец для подтверждения везикулярной природы детектируемых частиц. ВВ (около 30 мкг белка) проинкубировать с 4% Triton X100 в PBS (ВВ и тритон должны браться в эквивалентных количествах) в течение 30–40 мин., далее окрасить антителами аналогично пункту 5 и визуализировать.

7. Полученные данные проанализировать с помощью ПО CytExpert v.2.3, данные можно представить в виде точечных графиков, аналогичных представленным на рис. 4.



**Рис. 4.** Проточная цитометрия ВВ плазмы крови. Метод прямой детекции. (Kondratov et al., J Extracell Vesicles. 2020, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7170328/>)

*Примечание.* На рис. 4 видно, что плазма крови содержит как эритроцитарные, так и тромбоцитарные везикулы, отсутствуют смешанные фракции. Можно также выделить 2 фракции эритроцитарных везикул с высокой и низкой экспрессией CD235a. При постановке контролей с тритоном X-100 все фракции не детектировались, что доказывает везикулярную природу детектируемых частиц.

## Тестовые задания

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

1. ПИПЕТИРОВАНИЕ ПРОБ ПО СРАВНЕНИЮ С ЭНЕРГИЧНЫМ ПЕРЕМЕШИВАНИЕМ СПОСОБСТВУЕТ:

- 1) Предотвращению появления агрегатов ВВ и антител.
- 2) Более равномерной абсорбции антител на ВВ.

- 3) Склеиванию ВВ между собой.
- 4) Менее точным результатам измерения.

2. КАКАЯ СКОРОСТЬ ПОТОКА РЕКОМЕНДОВАНА ДЛЯ РАБОТЫ С ВВ НА ЦИТОМЕТРЕ?

- 1) Низкая.
- 2) Высокая.
- 3) Средняя.
- 4) Скорость потока не влияет на измерение.

3. КАКАЯ СКОРОСТЬ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ РЕКОМЕНДОВАНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ P16 ФРАКЦИИ ВВ ПЛАЗМЫ КРОВИ?

- 1) 1500 g.
- 2) 16000 rpm.
- 3) 16000 g.
- 4) 3000 g.

4. КАКИЕ ОСНОВНЫЕ ФРАКЦИИ ВВ В НОРМЕ СОДЕРЖАТСЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ?

- 1) Опухолевые и иммунные.
- 2) Эритроцитарные, тромбоцитарные, лейкоцитарные.
- 3) Эритроцитарные и опухолевые.
- 4) Адипоцитарные и эритроцитарные.

5. КАКОВЫ УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ ВВ С АНТИТЕЛАМИ?

- 1) 30 мин. на шейкере при 400 об/мин.
- 2) 30 мин. на свету.
- 3) 20 мин. в темноте при комнатной температуре на шейкере при 400 об/мин.
- 4) 30 мин. в темноте.

6. В КАКИХ СЛУЧАЯХ РЕКОМЕНДОВАНО ПРОВОДИТЬ КОМПЕНСАЦИЮ?



- 1) При использовании нескольких красителей или антител.
- 2) При первом включении цитометра.
- 3) При выключении цитометра.
- 4) При использовании хотя бы одного красителя.

7. ОБЯЗАТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦЕНТРИФУГ ДЛЯ РАБОТЫ С ВВ:

- 1) Встроенный искусственный интеллект.
- 2) Наличие охлаждения.
- 3) Наличие таймера.
- 4) Автоматическая крышка.

8. ЧТО ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ ЧАСТИЦЫ, ОСТАВШИЕСЯ ПОСЛЕ ЛИЗИСА ВВ TRITON X-100?

- 1) Липопротеины очень низкой плотности.
- 2) Сверхстойчивые ВВ.
- 3) Белковые комплексы.
- 4) Липопротеины высокой плотности.

9. ПОЧЕМУ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА ВВ РЕКОМЕНДОВАНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ?

- 1) При выделении ВВ происходит денатурация белка.
- 2) ВВ экспрессируют белки с низкой молекулярной массой.
- 3) ВВ содержат малое количество белка.
- 4) ВВ не экспрессируют белки.

10. КАКОЙ КОНТРОЛЬ НЕ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВВ?

- 1) Контроль с профильтрованным буфером.
- 2) Контроль единичного красителя.
- 3) Контрольная сыворотка.
- 4) Изотипический контроль.



## ТЕМА 4. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВВ, СОРБИРОВАННЫХ НА ЛАТЕКСНЫХ ИЛИ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦАХ

*Актуальность.* Визуализация ВВ, сорбированных на латексных или магнитных частицах, возможна на любых цитометрах, однако предпочтительно использовать высокочувствительные лазерные цитометрах типа Cytoflex (Beckman Coulter, USA), или их аналогах, оснащенных фиолетовым (405 нм), синим (488 нм) и красным (638 нм) лазером. Возможно использование цитометров с комплектацией синим (488 нм) и красным (638 нм) лазером.

*Цель* — познакомиться с методом визуализации ВВ с предварительной сорбцией на латексных частицах, особенностями калибровки, контролей и вариантами представления результатов исследования.

### Теоретическая часть

---

Визуализация ВВ, специфически сорбированных на латексных частицах, покрытых выбранными антителами к белкам, экспрессирующимся на поверхности ВВ, является исторически более ранним методом исследования ВВ. Первые стандартизированные описания данной методики относятся к 2012 году. Метод позволяет визуализировать ВВ любого размера, включая экзосомы, так как везикулы сорбируются на гранулы размером более 4 мкм, являющиеся классическими объектами для проточного цитофлюориметра. Из достоинств данной методики необходимо отметить возможность выбора антител, пришитых к частицам, что дает возможность визуализации отдельных популяций ВВ, в том числе минорных (например, если латексные частицы проинкубировать с маркером глиальных клеток и немиелинизирующих шванновских клеток GFAP (glial fibrillar acidic protein),

а далее с ВВ, то возможно визуализировать, например, в циркулирующие глиальные ВВ, которые проникают через гематоэнцефалитический барьер) и т. п.

Все вышеприведенные рекомендации Международного общества по изучению внеклеточных везикул (International Society for Extracellular Vesicles) 2021 года актуальны и для этого варианта методики.

**Внимание!** После окрашивания ВВ отмывка от несвязавшихся антител возможна на центрифугах общего назначения при скорости 1500 об/мин.

**Внимание!** Проведения калибровки цитометра с калибровочными частицами типа TruCount, Gigamix или Megamix не требуется.

### ***Вопросы для самоконтроля***

1. Почему для визуализации ВВ необходимо использовать латексные или магнитные частицы?
2. В чем достоинства методики сорбции ВВ на частицах?
3. Как можно визуализировать циркулирующие ВВ?
4. Какие методы используются для удаления несвязавшихся антител?
5. В чем недостатки методики визуализации ВВ на частицах?

## Практическая часть

### Занятие 1

---

### ***Лабораторная работа № 2***

#### ***Вариант однопараметрического окрашивания внеклеточных везикул***

*Биологический образец:* нативные или замороженные и хранящиеся при  $-80^{\circ}\text{C}$  препараты ВВ плазмы крови или другой биологической жидкости (слюна, асцитическая жидкость). Выделение экзосом из плазмы крови производят методом

ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Венозную кровь отбирают в одноразовые стерильные вакутейнеры с КЗ ЭДТА. Клеточную фракцию осаждают в течение 20 мин. при 1000 g и 4°C на центрифуге Labofuge 400R, Thermo Fisher (бакет-ротатор). Для дальнейшего выделения экзосомальной фракции отбирают плазму в одноразовые эппендорфы по 2 мл. Эппендорфы с плазмой подвергают центрифугированию при 14 500g на центрифуге с угловым ротором, 5415R, Eppendorf и 4°C в течение 15 мин.. Для удаления везикул >100 нм супернатант разводят PBS до общего объема 33 мл (10 mM фосфатный буфер, 0,15 M NaCl, pH 7,5) и фильтруют через фильтры с размером пор 100 нм (Minisart high flow, 16553-K, Sartorius). Полученный фильтрат центрифугируют при 100 000 g (поршневой ротор, Optima XPN 80, Beckman Coulter, США) и 4°C в течение 90 мин. Полученный осадок после ультрацентрифугирования ресуспендируют в PBS и дважды центрифугируют в тех же условиях. Аликвоты экзосом замораживают в жидком азоте и хранят при -80°C.

*Оборудование:*

- 1) высокочувствительный проточный цитофлюориметр типа Cytoflex S (Beckman Coulter, США), укомплектованный 405 нм (фиолетовым), 488 нм (синим) и 638 нм (красным) лазером или только 488 нм (синим) и 638 нм (красным) лазером;
- 2) термошейкер BioSan TS-100C с адаптером SC-24NC (Biosan, Latvia) или любой термошейкер для пробирок объемом 1,5/2 мл с функцией охлаждения до 4°C;
- 3) центрифуга типа Eppendorf с функцией охлаждения до 4°C;
- 4) центрифуга общего назначения без охлаждения.

*Реактивы и расходные материалы:*

1. Дистиллированная вода для работы с ВВ должна быть дополнительно профильтрована через фильтр 220 нм!

2. Пробирки типа Eppendorf объемом 0,5 мл.
3. Пробирки для проточного цитофлюориметра.
4. Первичное антитело для сорбции на латексных частицах.
5. Комплект антител, конъюгированных с FITC для однопараметрического окрашивания экзосом.
6. Фосфатно-солевой буфер PBS в таблетках (1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды).
7. Раствор глицина 200 мМ — 150 мг глицина растворить в 10 мл воды.
8. Латексные частицы, 4% раствор, A37304, Invitrogen.
9. MES-buffer: 97,6 г MES (free acid in 800 ml воды) дотитровать рН=5,5 10н NaOH (40 г щелочи на 100 мл, 4 г на 10 мл), долить до литра водой.

*Ход работы:*

1. Приготовьте накануне реактивы.
2. Для типирования на двух антителах берут 2 пробирки по 5 мкл частиц, отмывают два раза MES-буфером по 100 мкл, 3000 g, 15 мин., комнатная температура, и ресуспендируют в 25 мкл MES.
3. Смешать отмываемые частицы с антителами с учетом исходной концентрации антител, например, CD9 (исходная концентрация 0,105 мг/мл) нужно, чтобы было белка 6,25 мкг, итого 62 мкл, то есть примерно 6 аликвот (по 8–9 мкл) +25 мкл частиц в MES. CD24 (Abcam) (исходная концентрация 1 мг/мл) — нужно 6 мкл (1 аликвоту), чтобы белка было 6,25 мкг+25 мкл частиц в MES. Если антитело более концентрированное, то добавить MES до общего объема 50 мкл. Инкубация over night, шейкер 400 об/мин., комнатная температура.
4. Отмыть комплексы частицы-АГ трехкратно PBS (100 мкл, 3000 g, 20 мин. комнатная температура) и растворить в буфере глицин 0,1% на PBS (10 мг на 10 мл) в 50 мкл каждое антитело.

5. Смешать 3 мкл частиц АТ+120 мкл экзосом (если экзосомы выделялись из 18–20 мл крови или асцита по вышеприведенной методике), довести общий объем до 150 мкл PBS и инкубировать over night, шейкер 400 об/мин, +4°C.

6. Блокирование добавлением глицина 200 мМ на воде, добавить 300 мкл глицина в каждую пробу, инкубация 30 мин., 4С, встряхивание.

7. Посадить комплексы при 600 g, 10 мин., 4°C.

8. Отмыть комплексы два раза PBS (по 100 мкл, 600 g, 10 мин., 4°C). Для выявления связавшихся с антителами на поверхности частиц экзосом в пробирки вносили 5 мкл флуоресцентно-меченых антител против CD 63, CD 81 или CD24, общий объем довести до 100 мкл буфером, инкубация 20–30 мин., комнатная температура, темнота.

9. Комплексы дважды отмыть PBS, 1500 об/мин, комнатная температура.

10. Аналогичным образом выполняются многочисленные контроли, представленные в разделе «Отчет по контрольным образцам» темы 3.

Проточная цитометрия выполняется на цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, США). Данные анализируются с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0. При цитометрии первоначально выделяют популяцию частиц со связавшимися везикулами. В выделенной популяции экзосом анализируют медиану интенсивности флуоресценции (MFI) в сравнении с изотипическими и негативным контролем.

Примеры гейтирования при однопараметрическом окрашивании представлены на рис. 2С.

**Внимание!** При работе с ВВ необходимо использовать высокую скорость потока и выполнять промывки прибора не менее 3–4 мин. после каждой пробы до исчезновения событий в гейте “Bead”.

## Занятие 2

---

### *Лабораторная работа № 3*

#### *Вариант многоцветного окрашивания внеклеточных везикул*

*Биологический образец:* нативные или замороженные и хранящиеся при  $-80^{\circ}\text{C}$  препараты ВВ плазмы крови или другой биологической жидкости (слюна, асцитическая жидкость). Выделение экзосом из плазмы крови производится методом, описанным выше.

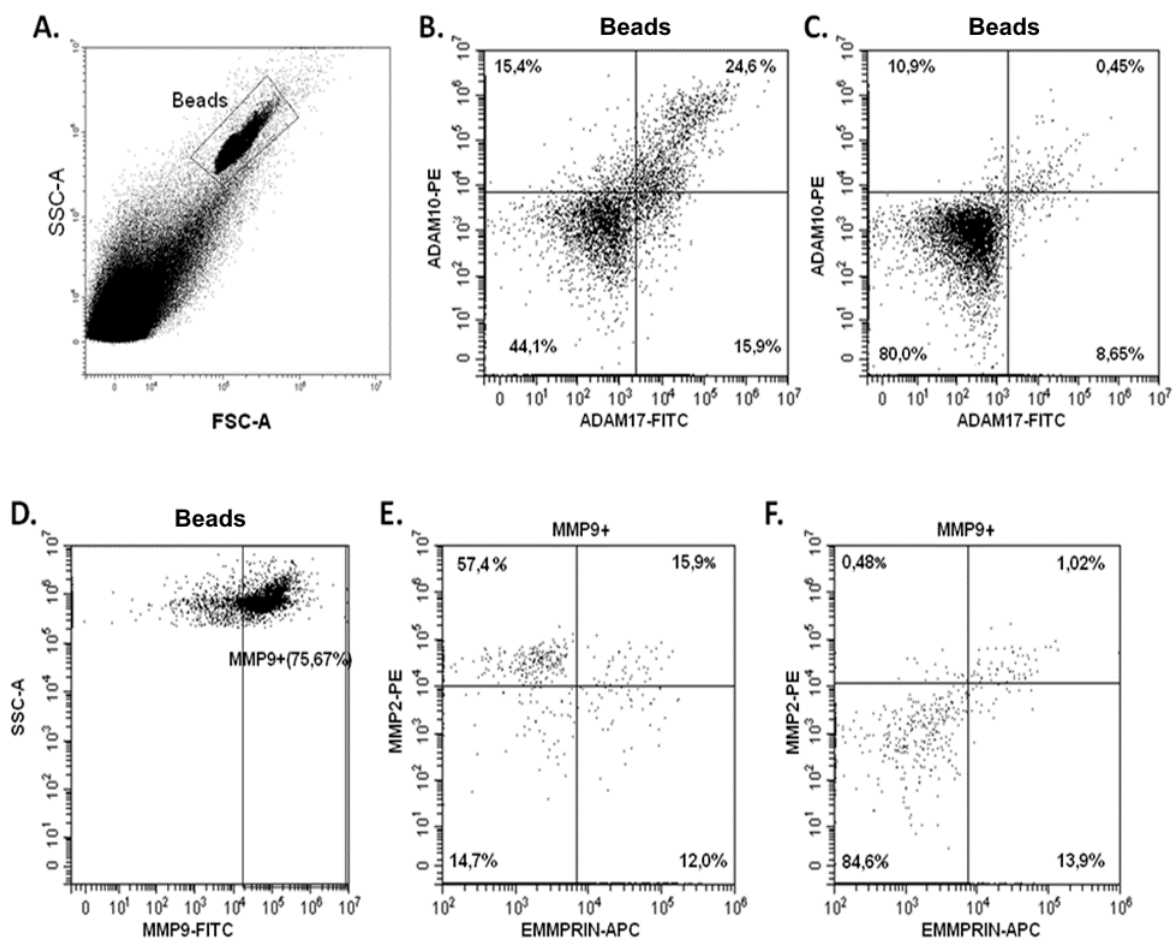
*Оборудование:* аналогично методике, представленной выше.

*Реактивы и расходные материалы:*

1. Дистиллированная вода для работы с ВВ должна быть дополнительно профильтрована через фильтр 220 нм!
2. Пробирки типа Eppendorf объемом 0,5 мл.
3. Пробирки для проточного цитофлюориметра.
4. Первичное антитело для сорбции на латексных частицах.
5. Комплект антител для окрашивания ВВ (например, anti-EMMPRIN (CD147) — APC (5 мкл на тест, MAB5047, Abnova, США), anti-MMP2-PE (0.3–0.5 мкг на тест, ABIN6170380, Antibodies-online, Германия) и anti-MMP9-FITC (1 мкг на тест, ABIN2482809 Antibodies-online, Germany, США; ADAM10-PE и ADAM17-FITC).
6. Фосфатно-солевой буфер PBS в таблетках (1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды).
7. Раствор глицина 200 мМ — 150 мг глицина растворить в 10 мл воды.
8. Латексные частицы 4% раствор, A37304, Invitrogen.
9. Блокирующие антитела Fc-Block любого производителя.
10. MES-buffer: 97,6 г MES (free acid in 800 ml воды) дотитровать pH=5,5 10н NaOH (40 г щелочи на 100 мл, 4 г на 10 мл), долить до литра водой.

*Ход работы:* аналогичен процедуре, описанной выше. Для анализа с многоцветным окрашиванием необходимо выполнение компенсации флуоресценции по общим правилам. После блокирования неспецифического связывания на комплексах частицы-ВВ необходимо проведение дополнительного блокирования с антителами Fc-Block и последующим окрашиванием конъюгированными антителами.

Пример гейтирования при многоцветном окрашивании ВВ представлен на рис. 5.



**Рис. 5.** Анализ субпопуляций экзосом с помощью проточной цитометрии. Детекция экзосом, адсорбированных на альдегид-латексных частицах, на основании параметров прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния (A). Двойное окрашивание протеаз ADAM10 по сравнению с ADAM17 в составе асцитных экзосом больных с пограничными опухолями яичников (B) и раком яичника. Популяция MMP9-положительных везикул плазмы при раке яичника (D). Тройное окрашивание MMP2 по сравнению с EMMPRIN плазменных MMP9+ экзосом больных раком яичника с малоасцитными (E) и большеасцитными опухолями (F).



## ТЕМА 5. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

*Актуальность.* Представленные выше методы визуализации ВВ с помощью проточной цитометрии имеют свои достоинства и недостатки. Возможность использования того или иного метода обусловлена возможностями изоляции ВВ (наличие или отсутствие ультрацентрифуг, например), наличием приборов, позволяющих прямую визуализацию ВВ, в том числе и самых маленьких ВВ (экзосом) (высококчувствительных проточных цитофлуориметров, гибридных моделей типа Amnis Imagestream-X MarkII imaging flow cytometer), навыками оператора, а также поставленными целями и задачами.

*Цель* — сравнить методы визуализации ВВ. На конкретных примерах выявить достоинства и недостатки двух методов визуализации ВВ.

### Теоретическая часть

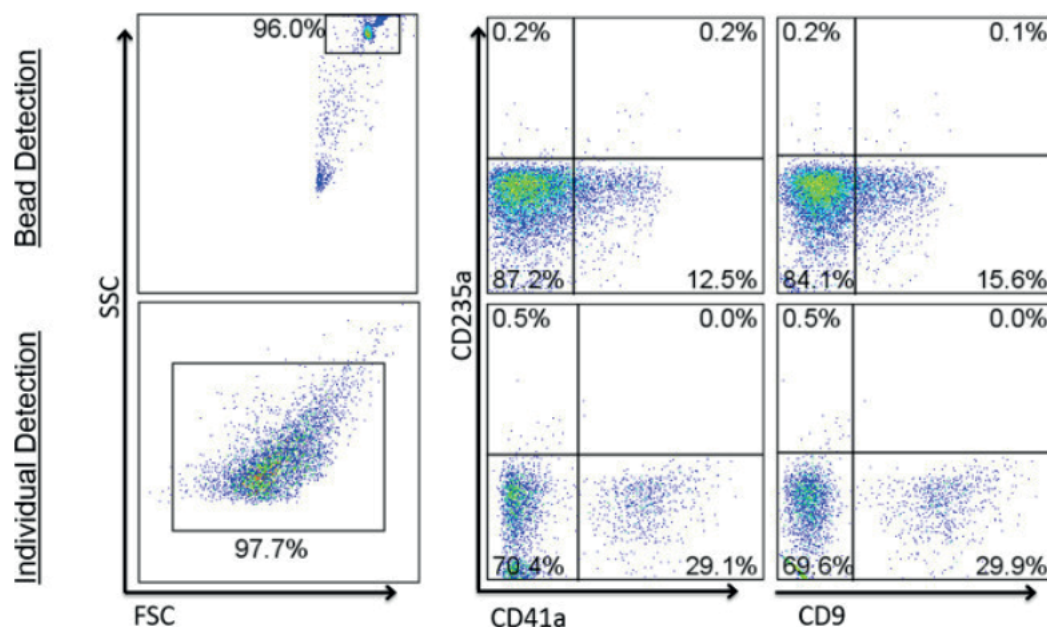
---

Пример сравнения прямого и непрямого методов визуализации ВВ приведен на рис. 6.

*Примечание.* Для выделения ВВ образцы ЭДТА-крови (18–20 мл) центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин. при комнатной температуре, чтобы отделить плазму от лейкоцитарной массы и эритроцитов. Аликвоты 1,2 мл супернатанта плазмы переносили в центрифужные пробирки объемом 1,5 мл, стараясь не повредить нижние слои, содержащие лейкоцитарную пленку и эритроциты. Далее центрифугировали плазму при 13 000 g в течение 10 мин. при 4°C для удаления тромбоцитов и клеточного дебриса. Суммарно 6 мл супернатанта переносили в ультрацентрифужную пробирку, добавляли 28 мл 0,2 мкм филь-



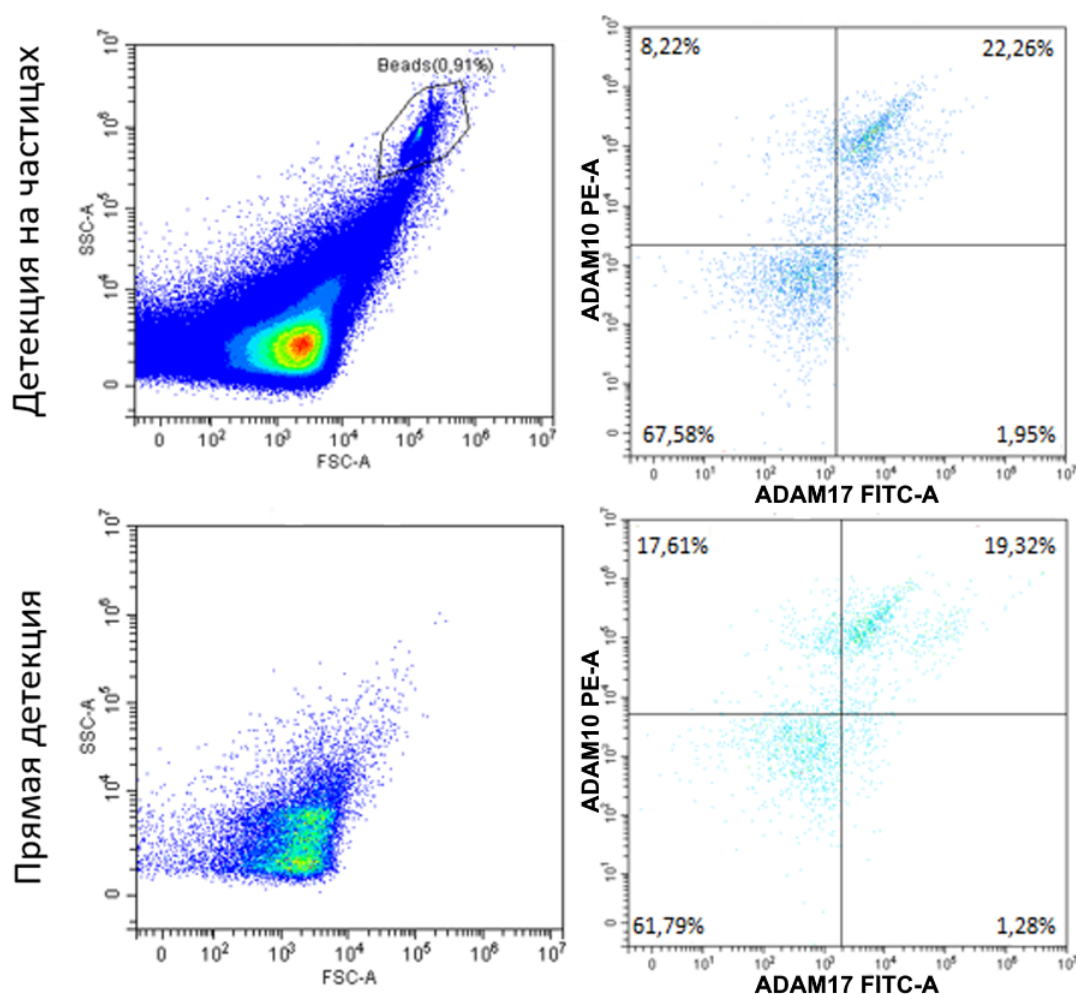
траванного PBS и центрифугировали в течение 60 мин. при 100 000 x g при 4°C, бакет-ротатор.



**Рис. 6.** Сравнение результатов проточной цитометрии ВВ с сорбцией на частицах и при прямой (индивидуальной) детекции. Поточечные диаграммы показывают репрезентативное окрашивание антителами к маркерами CD9, CD41a и CD235a. ВВ, связанные с частицами (верхний ряд) по сравнению с анализом ВВ с использованием индивидуальной детекции (нижний ряд). События, показанные на правых двухпараметрических графиках, находятся в пределах гейта FSC/SSC частиц слева (*H. Inglis et al., J Vis Exp. 2015, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867010>*).

Собственные результаты по сравнению результатов проточной цитометрии ВВ с сорбцией на частицах и при прямой детекции представлены на рис. 7.

*Примечание.* Малые внеклеточные везикулы (sEVs) получали методом, описанным в лабораторной работе № 2 данного пособия, при этом использовали фильтр на 220 нм. В варианте прямой визуализации 100 мкл везикул инкубировали с 5 мкл антител к ADAM 17-FITC и 5 мкл антител к ADAM 10-PE (20 мин., комнатная температура, темнота), предварительно выполнив калибровку проточного цитометра Cytotflex S на основе violet SSC с использованием эталонных шариков Megamix-Plus FSC или других калибровочных частиц. Выполнена компенсация.



**Рис. 7.** Сравнение результатов проточной цитометрии ВВ с сорбцией на частицах и при прямой детекции. Поточечные диаграммы показывают репрезентативное окрашивание антителами к протеазам ADAM10/ADAM17 для обоих подходов. ВВ, связанные с частицами (верхний ряд), по сравнению с анализом ВВ с использованием прямой детекции (нижний ряд).

При окрашивании по методике на латексных частицах 5 мкл частиц отмывают два раза MES-буфером по 100 мкл, 3000 г, 15 мин., комнатная температура и ресуспендируют в 25 мкл MES, далее отмытые частицы смешали с 6,25 мкг антитела к CD9, инкубация over night, шейкер 400 об/мин., комнатная температура, затем комплексы частицы-АТ отмыли трехкратно PBS (100 мкл, 3000 г, 20 мин., комнатная температура) и растворить в буфере глицин 0, 1 % на PBS (10 мг на 10 мл) в 50 мкл. 3 мкл частиц-АТ инкубировали с 120–130 мкл EVs, доводили общий объем до 150 мкл PBS и инкубировали over night, шейкер 400 об/мин, +4°C. Утром

проводили блокирование добавлением глицина 200 мМ на воде (300 мкл глицина в каждую пробу, инкубация 30 мин., 4С, встряхивание), после отмывки комплексов дважды PBS (по 100 мкл, 600 g, 10 мин., 4<sup>0</sup>С) их окрашивали антителами, как указано выше. После однократной отмывки несвязавшихся антител комплексы детектировали.

Приведенные примеры доказывают, что прямая детекция и детекция маркеров ВВ, адсорбированных на частицах, подходят для их анализа с помощью проточной цитометрии (рис. 6, 7). Результаты обоих методов воспроизводимы. Однако при использовании адсорбции на частицах данные о представленности маркеров отличаются от результатов прямой детекции, что может быть связано с избирательным обогащением определенной фракции ВВ. Так, в случае эксперимента, отображенного на рис. 7, анализ с использованием частиц происходит только на CD9 положительных экзосомах.

### ***Метод прямой визуализации***

*Достоинства:* прямая детекция всех ВВ в образце, независимость исследования от связывающей способности ВВ, например, с антителами, пришитыми к латексным или магнитным частицам, методика относительно короткая по времени.

*Недостатки:* необходимость калибровки прибора с калибровочными частицами, необходимость проведения серийных разведения образца для исключения эффекта “coincidence”, сложность процедуры отмывки окрашенных образцов от несвязавшихся антител (в зависимости от размера изучаемых частиц), ограниченные возможности по визуализации экзосом.

### ***Метод визуализации ВВ с сорбцией на латексных или магнитных частицах***

*Достоинства:* легкая процедура первичного гейтирования, так как ВВ сорбаны на частицах, простая процедура отмывки окрашенных образцов от несвя-

завшихся антител для частиц любого размера (используются центрифуги общего назначения), возможна визуализация ВВ любого размера, включая экзосомы, калибровка прибора с калибровочными частицами не нужна, нет необходимости проведения серийных разведения образца для исключения эффекта “coincidence”.

*Недостатки:* визуализируются только те ВВ, которые свяжутся с частицами (зависимость как от представленности антигена на ВВ, так и от связывающей способности пришитых антител, качества препаратов ВВ и других факторов), длительность методики — более двух суток.

### ***Вопросы для самоконтроля***

1. В чем заключается прямой метод визуализации ВВ?
2. В чем заключается непрямой метод визуализации ВВ?
3. Перечислите основные преимущества и недостатки каждого метода.
4. Каковы отличия пробоподготовки препаратов ВВ для каждого метода?
5. Как приведенные графики характеризуют каждый из методов визуализации?

### **Тестовые задания**

---

*Выберите один или несколько правильных ответов.*

1. ИЗНАЧАЛЬНЫМ ГЕЙТОМ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ НЕПРЯМЫМ МЕТОДОМ ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) Гейт “Beads”, так как ВВ сорбированы на частицах.
- 2) Произвольный гейт в области FSC-A, SSC-A.
- 3) Гейт CD9, т.к. ВВ несут мажорные тетраспанины.
- 4) Выделенные ВВ не нуждаются в гейтировании.

2. ДЕТЕКТИРОВАНИЕ СОРБИРОВАННЫХ НА ЧАСТИЦАХ ВВ ОТНОСИТСЯ К МЕТОДУ:

- 1) Прямому.
- 2) Непрямому.
- 3) Сорбционному.
- 4) Высокопроизводительному.

3. НЕДОСТАТКОМ МЕТОДА НЕПРЯМОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) Длительность выполнения.
- 2) Скорость выполнения.
- 3) Определение частиц любого размера.
- 4) Отсутствие калибровки с калибровочными частицами.

4. ДАННЫЕ ОБ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЯМОГО И НЕПРЯМОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВВ:

- 1) Одинаковы.
- 2) Не поддаются сравнению.
- 3) Различаются незначительно.
- 4) Существенно различаются.

5. УДАЛЕНИЕ ДЕБРИСА И ТРОМБОЦИТОВ ИЗ СУПЕРНАТАНТА ПЛАЗМЫ ПРОИСХОДИТ ПРИ:

- 1) Ультрацентрифугировании на 14000 g.
- 2) Центрифугировании на 30000 rpm.
- 3) Центрифугировании на 1000 g.
- 4) Путем фильтрации через фильтр с диаметром пор в 200 нм.

6. НЕДОСТАТКОМ МЕТОДА ПРЯМОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) Необходимость калибровки с калибровочными частицами.
- 2) Использование более ярких флюоресцентных красителей.

3) Более тщательная отмывка пробы.

4) Зависимость исследования от связывающей способности ВВ.

7. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕТОДА ПРЯМОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ:

1) Отсутствует.

2) Сравнима с воспроизводимостью при использовании непрямых методов.

3) Отлична в разных лабораториях.

4) Хуже, чем при непрямой визуализации.

8. РЕПРЕЗЕНТАТИВНОЕ ОКРАШИВАНИЕ АНТИТЕЛАМИ ВОЗМОЖНО

ДЛЯ:

1) Как прямого, так и непрямого метода визуализации.

2) Только прямого.

3) Только непрямого.

4) Зависит от фирмы-производителя антител.

9. ГЕЙТИРОВАНИЕ МНОГОЦВЕТНОГО ОКРАШИВАНИЯ ДЛЯ НЕПРЯ-

МОГО МЕТОДА ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ ДОЛЖНО ПРОВОДИТЬСЯ:

1) От общего количества событий.

2) От общего количества синглетных сигналов.

3) От области дебриса.

4) От гейта "Beads", отображающего ВВ, сорбированные на частицах.

10. КАЧЕСТВЕ ЧАСТИЦ ДЛЯ СОРБЦИИ ВВ ИСПОЛЬЗУЮТСЯ:

1) Только латексные частицы.

2) Калибровочные частицы.

3) Только магнитные частицы.

4) Магнитные и латексные частицы.

11. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНА:

1) Как прямым, так и непрямым методом.

2) Непрямым методом.

- 3) Прямым методом.
- 4) Экзосомы невозможно визуализировать ни одним из методов.

12. ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ОБОГАЩЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФРАКЦИЙ ВВ СПОСОБСТВУЕТ:

- 1) Сходным данным экспрессии маркеров.
- 2) Различию данных экспрессии маркеров.
- 3) Необходимости выделения каждой отдельной фракции ВВ.
- 4) Отсутствию репрезентативности результатов.

13. ВЫБОР МЕТОДА ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ НЕ ОБУСЛОВЛЕН:

- 1) Типом прибора для детекции.
- 2) Наличием ультрацентрифуги.
- 3) Навыками оператора.
- 4) Клиническими характеристиками донора плазмы.

14. ЛЕГКАЯ ПРОЦЕДУРА ПЕРВИЧНОГО ГЕЙТИРОВАНИЯ ХАРАКТЕРНА ДЛЯ:

- 1) Прямого метода визуализации.
- 2) Непрямого метода визуализации.
- 3) Процедура первичного гейтирования сопряжена со сложностями независимо от используемого метода.
- 4) Первичное гейтирование проводится независимо от метода визуализации.

15. РАЗМЕР ИЗУЧАЕМЫХ ЧАСТИЦ НЕОБХОДИМО УЧИТЫВАТЬ ДЛЯ:

- 1) Прямого метода визуализации.
- 2) Непрямого метода визуализации.
- 3) Размер изучаемых частиц не имеет значения при выборе метода.
- 4) Оценки связывающей способности ВВ.

16. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МЕТОДА ПРЯМОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ:

- 1) Отсутствует.

- 2) Сравнима с воспроизводимостью при использовании непрямых методов.
- 3) Отлична в разных лабораториях.
- 4) Хуже, чем при непрямой визуализации.

17. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАТЕКСНЫХ И МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ХАРАКТЕРНО ДЛЯ:

- 1) Узкоспециализированных научных исследований.
- 2) Детектирования металлов на ВВ.
- 3) Детекции ВВ в слюне.
- 4) Непрямого метода визуализации ВВ.

18. СЛОЖНОСТЬ ОТМЫВКИ НЕСВЯЗАВШИХСЯ АНТИТЕЛ ХАРАКТЕРНА ДЛЯ:

- 1) Прямого метода визуализации.
- 2) Не зависит от используемого метода.
- 3) Непрямого метода визуализации.
- 4) Несвязанные антитела не детектируются.

19. В КАЧЕСТВЕ БУФЕРА ДЛЯ ОТМЫВКИ НЕ ИСПОЛЬЗУЮТ:

- 1) PBS.
- 2) MES-буфер.
- 3) Wash-буфер.
- 4) Деионизированную воду.



## ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

Тема 3. Понятие «типирование ВВ». Общие требования к выделению внеклеточных везикул для визуализации методом проточной цитометрии

Номер задания	Номер ответа
1	1)
2	2)
3	3)
4	2)
5	3)
6	1)
7	2)
8	3)
9	3)
10	3)

Тема 5. Сравнение методов визуализации внеклеточных везикул

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	1)	11	2)
2	2)	12	2)

---

<b>Номер задания</b>	<b>Номер ответа</b>	<b>Номер задания</b>	<b>Номер ответа</b>
<b>3</b>	<b>1)</b>	<b>13</b>	<b>2)</b>
<b>4</b>	<b>4)</b>	<b>14</b>	<b>4)</b>
<b>5</b>	<b>1)</b>	<b>15</b>	<b>2)</b>
<b>6</b>	<b>1)</b>	<b>16</b>	<b>1)</b>
<b>7</b>	<b>2)</b>	<b>17</b>	<b>2)</b>
<b>8</b>	<b>1)</b>	<b>18</b>	<b>4)</b>
<b>9</b>	<b>4)</b>	<b>19</b>	<b>1)</b>
<b>10</b>	<b>4)</b>	<b>20</b>	<b>4)</b>

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Практикум по медицинским биотехнологиям с основами молекулярной биологии: учебное пособие / В. Ю. Серебров, Е. В. Кайгородова, Н. В. Юнусова [и др.]; под редакцией В. Ю. Сереброва. — Томск : Изд-во СибГМУ, 2017. — 55 с. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/113508>

2. Практикум по молекулярной биологии: учебное пособие / Н. В. Юнусова, Д. И. Кузьменко, Е. В. Кайгородова [и др.]. — Томск : Изд-во СибГМУ, 2017. — 65 с. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/113509>

3. Чулпанова, Д. С. Практикум по фенотипированию популяций иммунных клеток с помощью проточной цитофлуориметрии: учебно-методическое пособие / Д. С. Чулпанова, И. Ю. Филин, А. А. Ризванов, В. В. Соловьева. — Казань : Изд-во Казан. ун-та, 2022. — 42 с. — Режим доступа: [https://kpfu.ru/portal/ias\\_utils.file\\_download?p\\_table\\_id=4&p\\_file=F1177441177/Uchebno\\_metodicheskoe.posobie.Chulpanova.D.S..pdf](https://kpfu.ru/portal/ias_utils.file_download?p_table_id=4&p_file=F1177441177/Uchebno_metodicheskoe.posobie.Chulpanova.D.S..pdf)

Балалаева, И. В. Проточная цитофлуориметрия: Учебно-методическое пособие. — Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2014. — 75 с. — Режим доступа: [http://www.unn.ru/books/met\\_files/flow\\_cytometry.pdf](http://www.unn.ru/books/met_files/flow_cytometry.pdf)

*Учебное издание*

**Юнусова Наталья Валерьевна,  
Сваровский Дмитрий Андреевич,  
Патышева Марина Ринатовна**

**ПРАКТИКУМ ПО ВИЗУАЛИЗАЦИИ  
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МЕТОДОМ  
ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ**

*Учебное пособие*

*Издано в авторской редакции.*

Компьютерная верстка: *Анастасия Шантурова*

Издательство «Знание-М»

---

Дата согласования макета: 4.10.2023.

Заказ № 1004.

Объем данных – 2,75 Mb

Усл. печ. л. – 2,55

Издано в научных и учебных целях.