



Получено: 8.10.2024 г. | Принято: 11.10.2024 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.434.443>

Научная статья

ПРЯМАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ НА МЕМБРАНЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ/СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ КРИОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.В.Моисеенко¹, науч. сотр., ORCID: 0000-0003-1112-2356

Н.А.Басалова², к.б.н., мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-2597-8879

Д.В.Багров¹, к.ф.-м.н., вед. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-6355-7282

Т.С.Трифорова¹, лаборант-исследователь, ORCID: 0000-0003-2042-5244

М.А.Вигровский², лаборант-исследователь, ORCID: 0000-0003-2103-8158

У.Д.Дьячкова², лаборант-исследователь, ORCID: 0000-0002-6119-8976

О.А.Григорьева², к.б.н., ORCID: 0000-0003-2954-2420

Е.С.Новоселецкая², к.б.н., ORCID: 0000-0002-0922-9157

А.Ю.Ефименко², д.м.н., зав. лаб., ORCID: 0000-0002-0696-1369

О.С.Соколова¹, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0003-4678-232X / sokolova@mail.bio.msu.ru

Аннотация. Внеклеточные везикулы (ВВ) играют важную роль в межклеточной коммуникации и влияют на множество физиологических и патологических процессов. Мембранно-ассоциированные внеклеточные везикулы (МАНВ) представляют собой особый малоизученный класс внеклеточных везикул. В данной работе продемонстрировано использование метода крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) для изучения МАНВ, секретируемых мезенхимными стволовыми/стромальными клетками человека (МСК). С помощью крио-ЭМ удалось обнаружить везикулы с диаметром от 50 до 750 нм, расположенные вблизи поверхности клеток. Полученные результаты помогут в дальнейшем изучении физиологической роли МАНВ и установлении их связи с клеточными мембранами.

Ключевые слова: криоэлектронная микроскопия, внеклеточные везикулы, мембранно-ассоциированные везикулы, стволовые клетки

Для цитирования: А.В. Моисеенко, Н.А. Басалова, Д.В. Багров, Т.С. Трифорова, М.А. Вигровский, У.Д. Дьячкова, О.А. Григорьева, Е.С. Новоселецкая, А.Ю. Ефименко, О.С. Соколова. Прямая визуализация внеклеточных везикул на мембране мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека методом криоэлектронной микроскопии. НАНОИНДУСТРИЯ. 2024. Т. 17. № 7–8. С. 434–443. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.434.443>.

Received: 8.10.2024 | Accepted: 11.10.2024 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.434.443>

Original paper

DIRECT VISUALIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES ON THE MEMBRANE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM/STROMAL CELLS BY CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

¹ Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия / Biological Department of Lomonosov MSU, Moscow, Russia

² Медицинский научно-образовательный институт МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия / Medical Research and Education Institute of Lomonosov MSU, Moscow, Russia



A.V.Moiseenko¹, Researcher, ORCID: 0000-0003-1112-2356

N.A.Basalova², Cand. of Sci. (Biology), Junior Research Assistant, ORCID: 0000-0002-2597-8879

D.V.Bagrov¹, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Leading Researcher, ORCID: 0000-0002-6355-7282

T.S.Trifonova¹, Laboratory assistant, ORCID: 0000-0003-2042-5244

M.A.Vigorsky², Laboratory assistant, ORCID: 0000-0003-2103-8158

U.D.Dyachkova², Laboratory assistant, ORCID: 0000-0002-6119-8976

O.A.Grigorieva², Cand. of Sci. (Biology), ORCID: 0000-0003-2954-2420

E.S.Novoselefskaya², Cand. of Sci. (Biology), ORCID: 0000-0002-0922-9157

A.Yu.Efimenko², Doct. of Sci. (Physiology), Head of Laboratory, ORCID: 0000-0002-0696-1369

O.S.Sokolova¹, Doct. of Sci. (Biology), Prof., ORCID: 0000-0003-4678-232X / sokolova@mail.bio.msu.ru

Abstract. Extracellular vesicles (EVs) play an important role in intercellular communication and influence a wide range of physiological and pathological processes. Membrane-associated extracellular vesicles (MAVs) represent a distinct and poorly understood class of EVs. This study demonstrates the application of cryo-electron microscopy (cryo-EM) to investigate MAVs secreted by human mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). Cryo-EM revealed vesicles ranging in diameter from 50 to 750 nm located near the cell surface. The results obtained will facilitate further studies on the physiological role of MAVs and their association with cell membranes.

Keywords: cryo-electron microscopy, extracellular vesicles, membrane-associated vesicles, stem cells

For citation: A.V. Moiseenko, N.A. Basalova, D.V. Bagrov, T.S. Trifonova, M.A. Vigorsky, U.D. Dyachkova, O.A. Grigorieva, E.S. Novoselefskaya, A.Yu. Efimenko, O.S. Sokolova. Direct visualization of extracellular vesicles on the membrane of human mesenchymal stem/stromal cells by cryo-electron microscopy. NANOINDUSTRY. 2024. Vol. 17. No. 7–8. PP. 434–443. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.434.443>.

ВВЕДЕНИЕ

Перенос биологически активных факторов в составе внеклеточных везикул (ВВ), секретируемых мезенхимными стволовыми/стромальными клетками (МСК), согласно современным данным, лежит в основе межклеточной коммуникации при реализации многих механизмов регенераторного действия этих клеток. Использование ВВ МСК рассматривают как перспективный терапевтический подход в лечении различных патологических процессов. Например, ВВ МСК могут стимулировать регенерацию тканей [1, 2], регулировать работу иммунной системы [3, 4], помочь в лечении фибротических, онкологических и инфекционных заболеваний [5, 6].

Термин "внеклеточные везикулы" относится к частицам, которые высвобождаются из клеток, ограниченных липидным бислоем; они не могут самостоятельно реплицироваться (т.е. не содержат функционального ядра) [7]. В настоящее время выделяют несколько классов ВВ (например, экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца). Однако классификация подтипов ВВ осложнена тем, что нет единого консенсуса специалистов из-за ограничений технических возможностей методов разделения разных подтипов [8].

INTRODUCTION

The transfer of biologically active factors in extracellular vesicles (EVs) secreted by mesenchymal stem/stromal cells (MSCs), according to modern data, is the basis of intercellular communication in implementation of many mechanisms of regenerative action of these cells. The use of EVs MSCs is considered as a promising therapeutic approach in various pathological processes treatment. For example, EVs MSCs can stimulate tissue regeneration [1, 2], regulate the immune system [3, 4], help in the treatment of fibrotic, oncological and infectious diseases [5, 6].

The term "extracellular vesicles" refers to particles that are released from cells bounded by a lipid bilayer; they cannot replicate independently (i.e., they do not contain a functional nucleus) [7]. Currently, several classes of EVs are distinguished (e.g., exosomes, microvesicles, and apoptotic cells). However, the classification of EVs subtypes is complicated by the fact that there is no unified consensus of specialists due to the limitations of technical capabilities of methods for separating different subtypes [8].

Membrane vesicle-like particles exist on the surface of many animal cells, ranging in size from tens of nanometres to 1–2 μm . These particles have long been regarded as precursors of EVs (in particular, microvesicles or microparticles), which are attached to the membrane until released into the intercellular



На поверхности многих животных клеток существуют мембранные везикулоподобные частицы, размер которых варьируется от десятков нанометров до 1–2 мкм. Эти частицы долгое время рассматривались как предшественники ВВ (в частности, микровезикул или микрочастиц), которые прикреплены к мембране до момента высвобождения в межклеточное пространство. В настоящее время в русскоязычной литературе нет общепринятого термина для обозначения этих ВВ. Группа исследователей под руководством Йон Чена, в исследованиях которой был впервые описан данный класс ВВ для клеток человека (клетки эндотелия пупочного канатика (HUVEC), клетки гепатомы (HepG-2)), предложила термин *cell-bound membrane vesicles* [9], и далее нами будет использован термин "мембранно-ассоциированные везикулы" (MAV). Было показано, что MAV являются отдельным классом ВВ, так как у MAV отсутствует сококализация с предполагаемыми поверхностными маркерами экзосом (белками CD31, CD63 и другими), они устойчивы к обработке детергентами, но растворимы в органических соединениях, кроме того, отсутствует самопроизвольное высвобождение MAV с поверхности клеток.

На сегодняшний день структура, состав и функции MAV все еще остаются малоизученными. В работах [9, 10] для визуализации MAV использовали метод конфокальной микроскопии с дифференциальным интерференционным контрастом; кроме того, после открепления от мембраны детергентом их исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием и использованием метода динамического рассеяния света. По данным последнего, их средний размер составил 443 ± 6 нм, что находится на пределе разрешения оптической микроскопии и, очевидно, ее использование не всегда позволяет увидеть ВВ. Была высказана гипотеза о применимости атомно-силовой микроскопии для визуализации MAV на высушенных клетках [11], однако при этом могут возникать сложности с идентификацией лопнувших MAV на изображениях. Таким образом, представляется перспективным развитие подходов, предполагающих минимальную обработку образцов и использование электронной микроскопии и, в частности, криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) для визуализации и изучения MAV.

Этот метод подразумевает быструю заморозку образцов, находящихся на специальных

space. At present, there is no generally accepted term for these EVs in the Russian-language literature. The group of researchers led by Yong Chen, in whose studies this class of EVs was first described for human cells (umbilical cord endothelial cells (HUVEC), hepatoma cells (HepG-2)), proposed the term "cell-bound membrane vesicles" [9], and hereinafter we will use the term "membrane-associated vesicles" (MAVs). It was shown that MAVs are a separate class of EVs, as MAVs have no co-localisation with putative surface markers of exosomes (proteins CD31, CD63 and others), they are resistant to detergent treatment but soluble in organic compounds, and there is no spontaneous release of MAVs from the cell surface.

Nowadays, the structure, composition and functions of MAVs are still poorly understood. In [9, 10], the method of confocal microscopy with differential interference contrast was used to visualise MAVs; in addition, after detachment from the membrane with detergent, they were studied by transmission electron microscopy with negative contrast and using the dynamic light scattering method. According to the latter, their average size was 443 ± 6 nm, which is at the resolution limit of optical microscopy and obviously its use does not always allow to see the EVs. The applicability of atomic force microscopy for visualisation of MAVs on dried cells has been hypothesised [11], but there may be difficulties in identifying burst MAVs in images. Thus, it seems promising to develop approaches involving minimal sample processing and the use of electron microscopy and, in particular, cryo-electron microscopy (cryo-EM) to visualise and study MAVs.

This method involves rapid freezing of samples located on special metal grids covered with a thin carbon substrate. Their peculiarity is that there are numerous holes in the substrate; they can be arranged regularly or chaotically. Cryo-EM has been successfully used to visualise individual EVs [12], whole cells [13], as well as to study interactions between eukaryotic cells and viruses, which are close to EVs in size [14]. However, the use of cryo-EM to visualise MAVs directly on cells is a novel approach. The experiments described in this paper may provide a methodological basis for studying physiological role of MAVs. In addition, considering the growing interest of medicine in the application of EVs from human MSCs as therapeutic agents, description of mechanisms and biological properties of various EVs produced by this cell type is an urgent fundamental and applied task.

MATERIALS AND METHODS

Cell culturing. Immortalised MSCs isolated from human adipose tissue (ATCC, ASC52telo) were used in this work. The cell line was provided by the biobank



металлических сетках, покрытых тонкой углеродной подложкой. Их особенность состоит в том, что в подложке присутствуют многочисленные отверстия; они могут быть расположены регулярно или хаотическим образом. Крио ЭМ с успехом используют для визуализации отдельных ВВ [12], целых клеток [13], а также изучения взаимодействия между эукариотическими клетками и вирусами, которые близки к ВВ по размерам [14]. Однако, использование крио ЭМ для визуализации МАВ непосредственно на клетках является новым подходом. Эксперименты, описанные в данной работе, могут заложить методическую основу для исследования физиологической роли МАВ. Кроме того, учитывая нарастающую заинтересованность медицины в применении ВВ от МСК человека в качестве терапевтического средства, описание механизмов и биологических свойств различных ВВ, продуцируемых данным типом клеток, является актуальной фундаментальной и прикладной задачей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В данной работе были использованы иммортализованные МСК, выделенные из жировой ткани человека (ATCC, ASC52telo). Линия клеток была предоставлена биобанком из коллекции Центра регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, (<https://human.depo.msu.ru>). МСК были выращены на поверхности перфорированной тонкой углеродной подложки C-flat 1.2/1.3, закрепленной на золотой поддерживающей сеточке для электронной микроскопии (Protochips, США).

Для этого сеточки были размещены в лунках 12-луночного планшета и простерилизованы ультрафиолетом (3 раза по 30 мин в условиях стерильного ламинарного бокса). В каждую лунку планшета были высажены МСК в концентрации 40000 кл/лунка в среде DMEM-F12 (Capricorn, Германия) с добавлением 7% фетальной бычьей сыворотки (Ласора, Россия) и 1х пеницилина-стрептомицина (Gibco, США). Через сутки культивирования была проведена оценка состояния культуры с помощью фазово-контрастной микроскопии (Leica DM IL LED, Германия).

Крио-ЭМ. Перед заморозкой для крио-ЭМ сеточки отмывали в сбалансированном солевом буфере Хенкса (ПанЭко, Россия), после чего замораживали в жидком этане при температуре -180°C в установке EM GP2 (Leica Microsystems, Германия). При этом излишки

from the collection of the Centre for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University, (<https://human.depo.msu.ru>). MSCs were grown on the surface of perforated thin carbon substrate C-flat 1.2/1.3 fixed on a gold support grid for electron microscopy (Protochips, USA).

For this purpose, the grids were placed in the wells of a 12-well plate and sterilised by ultraviolet light (3 times for 30 minutes each in a sterile laminar box). MSCs were planted in each well of the plate at a concentration of 40000 cells/well in DMEM-F12 medium (Capricorn, Germany) supplemented with 7% fetal bovine serum (Lacopa, Russia) and 1x penicillin-streptomycin (Gibco, USA). After a day of cultivation, the culture condition was assessed using phase-contrast microscopy (Leica DM IL LED, Germany).

Cryo-EM. Before freezing for cryo-EM, the grids were washed in Hanks' balanced salt buffer (PanEco, Russia) and then frozen in liquid ethane at -180°C in an EM GP2 unit (Leica Microsystems, Germany). Excess liquid was removed by blotting with Whatman #1 filter paper from the back side of the carbon substrate for 10 s. This allowed minimising probability of cells detachment from the substrate surface due to contact with filter paper. Cryo-EM studies were performed on a transmission electron microscope JEM-2100 (Jeol, Japan) at an accelerating voltage of 200 kV. Images were acquired using a DE-20 direct electron detection detector (Direct Electron, USA) in the accumulation mode (integration), at a nominal defocus of $10\text{ }\mu\text{m}$, a total dose of irradiation of each imaging region not more than $20\text{ e}/\text{A}^2$ and at a microscope magnification corresponding to a pixel size of 5.7 A in the image. Drift correction, Gaussian filtering and contrast correction were performed on the obtained image series.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of these experiments, the protocols for planting MSCs on gold grids and preparing samples for further study by the cryo-EM method were worked out. Photographs were obtained in the process of MSCs cultivation on gold grids (Fig.1a). The cells are spread over the surface of the carbon film covering the gold grid, and their edges are visible in many cells. Next, the meshes with MSCs were subjected to rapid freezing. Figure 1b shows an image of the cell edge obtained by cryo-EM. It can be seen that the carbon substrate is not solid, but contains regularly spaced round holes with a diameter of $1.2\text{ }\mu\text{m}$ filled with ice. In the image, the cell appears darker than the pure substrate, small fragments of crystalline ice are also present, not preventing the study of the peripheral regions of the cells. On a qualitative level, the images we obtained are similar to those reported in the literature for liver cells [15] or neurons [16].



жидкости удаляли промакиванием фильтровальной бумагой Whatman #1 с тыльной стороны углеродной подложки продолжительностью 10 с. Это позволило минимизировать вероятность открепления клеток от поверхности подложки вследствие контакта с фильтровальной бумагой. Исследования методом крио-ЭМ производили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения были получены с помощью детектора прямого обнаружения электронов DE-20 (Direct Electron, США) в режиме накопления (integration), при номинальном дефокусе -10 мкм, суммарной дозе облучения каждой области съемки не более 20 е/А² и при увеличении микроскопа, соответствующего размеру пикселя 5.7А на изображении. На полученных сериях изображений произведена коррекция дрейфа, гауссова фильтрация и коррекция контраста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов были отработаны протоколы посадки МСК на золотые сетки и подготовки образцов для дальнейшего изучения методом крио-ЭМ. Были получены фотографии в процессе культивирования МСК на золотых сетках (рис.1а). Клетки распластаны по поверхности углеродной пленки, покрывающей золотую сетку, и их края видны во многих ячейках. Далее, сетки с МСК подвергались быстрой заморозке. На рис.1б показано изображение края клетки, полученное методом крио-ЭМ. Видно, что углеродная подложка не сплошная, а содержит регулярно расположенные круглые отверстия с диаметром 1.2 мкм, заполненные льдом. На изображении клетка выглядит более темной, чем чистая подложка, также присутствуют небольшие фрагменты кристаллического льда, не препятствующие изучению периферийных областей клеток. На качественном уровне полученные нами изображения аналогичны изображениям, которые приводятся в литературе для клеток печени [15] или нейронов [16].

Изображения, полученные методом крио-ЭМ, обладают низким контрастом. Это вызвано тем, что исследуемые объекты состоят из атомов элементов с низким атомным номером, слабо рассеивающих электроны на большие углы. Кроме того, характерная толщина препарата для исследования в ПЭМ составляет порядка 50–100 нм (для аморфных биологических объектов, состоящих из атомов

Images obtained by the cryo-EM method have low contrast. This is caused by the fact that the studied objects consist of atoms of elements with low atomic number, weakly scattering electrons at large angles. In addition, the characteristic thickness of preparation to be studied in TEM is nearby the 50–100 nm (for amorphous biological objects consisting of atoms with low atomic number). Therefore, the excessive thickness of even the peripheral region of cells represents a serious limiting factor. To increase the contrast, we used defocusing of the objective lens of the microscope, which allows us to enhance the phase contrast in the images. Also, for clarity and ease of interpretation of the images, the main structures of interest were manually highlighted in colour.

The most contrast structures visible in the images are holes in the carbon substrate and crystalline ice particles, while the biological structures of interest for analysis have low contrast. In this study, we first imaged MAVs produced by MSCs by cryo-EM. At the edge of the cell, where its thickness is minimal, the cell membrane of MSCs and individual vesicles can be seen (Fig.2). In some cases it was possible to observe elongated characteristic structures inside the cell, bundles of fibres, which were interpreted as actin fibrils. Similar structures were observed by cryo-EM in mouse catecholaminergic neuronal cells [16] and human keratinocytes [17].

Cell membranes have a relatively high contrast in cryo-EM, and this allows us to interpret the particles located near the cells, surrounded by the membrane, as EVs. We were able to observe vesicles of different geometries, ranging in size from 50 nm to 750 nm. These values seem realistic, taking into account the general ideas about the size of EVs [8] and the available data on the size of MAVs [9, 10]. Many EVs contained not one lipid bilayer, but two (Fig.3) or more. The presence of several lipid bilayers may be the cause of MAVs resistance to detergents. However, this assumption should be confirmed by additional experiments. Previously, the cryo-EM method allowed detecting the similar multilayered MAVs isolated from samples of different origin [18, 19]; their physiological role is not completely clear.

Both EVs directly in contact with the membrane (Fig.3) and those close to it, at a distance of less than 50 nm (Fig.2), were encountered in the images obtained. The presence of the observed particles near the MSCs can be interpreted in one of three ways.

Firstly, they may be EVs secreted by a cell that is in the field of view. Secondly, they may be EVs that were secreted by another cell and the cell in the field of view has bound them on its surface. To date, most experimental evidence suggests that EVs are usually

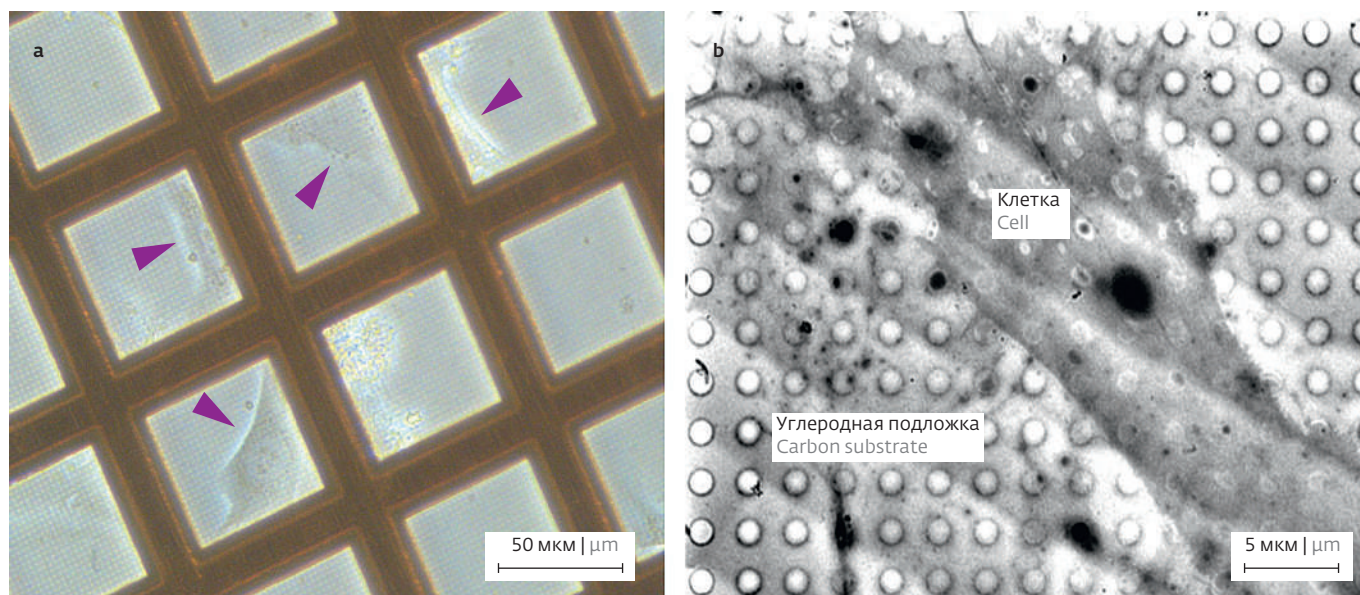


Рис.1. Фотографии МСК на золотой сетке: а – фотография, полученная в процессе культивирования клеток с помощью световой микроскопии (масштабный отрезок 50 мкм), фиолетовые стрелки показывают края клеток, б – крио-ЭМ изображение клетки, замороженной на перфорированной углеродной подложке (масштабный отрезок 5 мкм)

Fig.1. Photographs of MSCs on a gold grid: а – photograph obtained during cell culture using light microscopy (scale bar is 50 μm), the purple arrows indicate the cell edges, б – cryo EM image of a cell frozen on a perforated carbon substrate (scale bar is 5 μm)

с низким атомным номером). Поэтому избыточная толщина даже периферийной области клеток представляет собой серьезный ограничивающий фактор. Для увеличения контраста мы использовали дефокусировку объективной линзы микроскопа, позволяющую усилить фазовый контраст на изображениях. Также для наглядности и удобства интерпретации изображений на них вручную выделяли цветом основные структуры, представляющие интерес.

Наиболее контрастные структуры, видимые на изображениях – это отверстия в углеродной подложке и частицы кристаллического льда, а представляющие интерес для анализа биологические структуры имеют низкий контраст. В данном исследовании нами впервые были получены изображения МАВ, продуцируемые МСК, методом крио-ЭМ. На краю клетки, где ее толщина минимальна, можно увидеть клеточную мембрану МСК и отдельные везикулы (рис.2). В некоторых случаях внутри клетки удавалось наблюдать вытянутые характерные структуры, пучки волокон, которые были интерпретированы как фибриллы актина. Аналогичные структуры наблюдались методом крио-ЭМ в катехоламинергических нейрональных клетках мыши [16] и кератиноцитах человека [17].

internalised into the endosomal compartment by endocytosis. However, the exact mechanisms controlling EVs endocytosis remain highly controversial. Various mechanisms of EV uptake by the recipient cell have been proposed, including clathrin-mediated endocytosis, caveolin-dependent endocytosis, micropinocytosis, and phagocytosis. In addition, the role of lipid raft proteins and specific protein-protein interactions in EVs internalisation has been shown. Typically, docking and subsequent endocytosis of EVs is facilitated by protein-protein interactions with membrane receptors, ligands, or contact proteins of recipient cells. Proteins such as tetraspanins, lectins, proteoglycans, and integrins may be involved in these specific interactions affecting EVs internalisation [20]. Fusion is another pathway of EVs internalisation in which the EV membrane directly fuses with the plasma membrane of the recipient cell. In addition to internalisation, EVs can activate intracellular signalling pathways by direct interaction with surface receptors or ligands of target cells. EVs signalling can influence cell phenotype through membrane-bound morphogens such as Wnt and Notch DII4 ligand. Also, EVs signalling can influence on motility, migration and invasiveness of tumour cells [21].

Finally, the EVs we observed may be MAVs at the moment of biogenesis, bound to the cell surface in the field of view. It is this interpretation that seems most likely, since before freezing the cell culture was

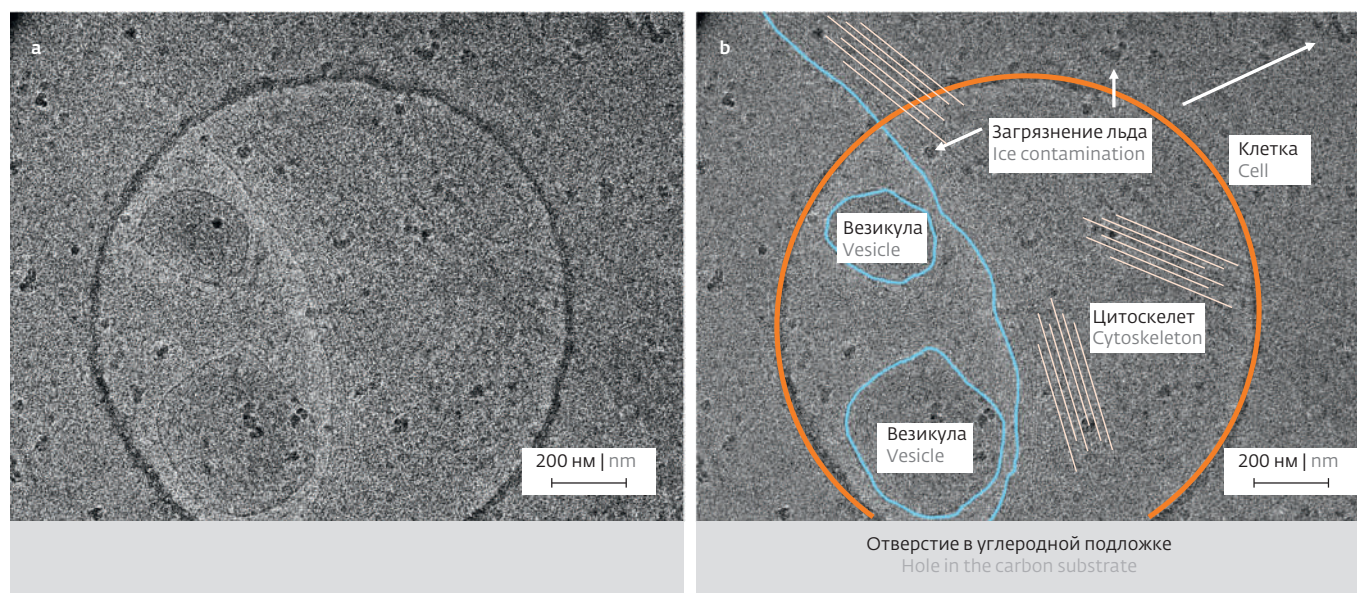


Рис. 2. Микрография края МСК с везикулами, расположенными вблизи нее, полученная методом крио-ЭМ (масштабный отрезок 200 нм). На изображении а контраст увеличен для наглядности. На изображении б отдельные везикулы и элементы цитоскелета выделены цветом: белым – загрязнения льда, голубым – липидные бислои ВВ и края клетки, оранжевым – отверстие в углеродной подложке (диаметр 1,2 мкм), розовым – цитоскелет клетки

Fig. 2. Micrograph of the MSC edge with vesicles located near it, obtained by cryo EM method (scale segment is 200 nm). In image a the contrast is increased for clarity. In image b, individual vesicles and cytoskeleton elements are highlighted in colour: white – ice contamination, blue – lipid bilayers of EVs and cell edge, orange – hole in carbon substrate (diameter is 1.2 μm), pink – cell cytoskeleton

Клеточные мембраны обладают сравнительно высоким контрастом в крио-ЭМ, и это позволяет интерпретировать расположенные вблизи клеток частицы, окруженные мембраной, как ВВ. Нам удалось наблюдать везикулы разной геометрии, размером от 50 до 750 нм. Эти значения представляются реалистичными, с учетом общих представлений о размерах ВВ [8] и имеющихся данных о размерах МАВ [9, 10]. Многие ВВ содержали не один липидный бислой, а два (рис. 3) или более. Наличие нескольких липидных бислоев может являться причиной устойчивости МАВ к детергентам. Однако, данное предположение необходимо подтвердить дополнительными экспериментами. Ранее метод крио-ЭМ позволил обнаружить аналогичные многослойные ВВ, выделенные из образцов различного происхождения [18, 19], их физиологическая роль не до конца ясна.

На полученных изображениях встречались как ВВ, непосредственно контактирующие с мембраной (рис. 3), так и расположенные вблизи нее, на расстоянии менее 50 нм (рис. 2). Наличие наблюдаемых частиц рядом с МСК может быть интерпретировано одним из трех способов.

cleaned from the residues of the culture medium, which could contain freely secreted EVs.

The images obtained in the described experiments do not allow one of these three interpretations to be unambiguously chosen. To prove that the observed particles are indeed MAVs, several experiments seem appropriate. Firstly, it is possible to suppress the secretion of MAVs to exclude them from consideration, but it is extremely difficult to achieve a complete cessation of the cell secretory activity. Secondly, cells can be treated with enzymes or detergents to detach MAV from their surface and the state of the submembrane space after such treatment can be analysed. Third, it may be useful to use colloidal gold immunolabelling, which can help identify particles that have specific protein markers on their surface to clarify the origin of these particles. However, more research is necessary to clarify the protein markers specific to MAVs as a separate subclass of EVs.

CONCLUSIONS

EVs are a challenging subject to study because of their heterogeneity and variability [8], and MAVs appear to be a particularly complex specific class of EVs. High-resolution microscopy techniques have been successfully used in EVs studies, and it is hoped that the use of cryo-EM will provide a better understanding of the origin and physiological role of MAVs.

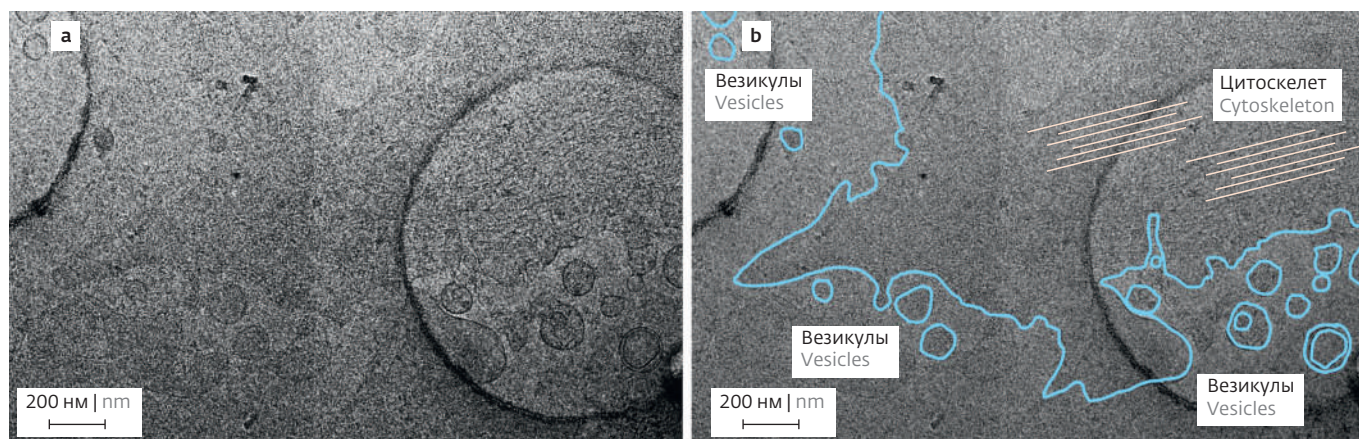


Рис.3. Микрография многослойных ВВ вблизи края клетки МСК, полученная методом крио-ЭМ (масштабный отрезок 200 нм). На изображении а контраст увеличен для наглядности. На изображении б отдельные везикулы, край клетки и элементы цитоскелета выделены цветом: голубым – липидные бислои клетки МСК и ВВ, розовым – цитоскелет

Fig.3. Micrograph of multilayer EVs near the MSC cell edge obtained by cryo EM (scale segment is 200 nm). In image a the contrast is increased for clarity. In image b individual vesicles, cell edge and cytoskeleton elements are highlighted in colour: blue – lipid bilayers of MSC cell and EVs, pink – cytoskeleton

Во-первых, это могут быть ВВ, секретиромые клеткой, которая находится в поле зрения. Во-вторых, это могут быть ВВ, которые были секретированы другой клеткой, а клетка, находящаяся в поле зрения, связала их на своей поверхности. На сегодняшний день большинство экспериментальных данных свидетельствует о том, что ВВ обычно интернализируются в эндосомальный компартмент путем эндоцитоза. Однако точные механизмы, управляющие эндоцитозом ВВ, остаются весьма спорными. Были предложены различные механизмы захвата ВВ клеткой-реципиентом, включая клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин – зависимый эндоцитоз, микропиноцитоз и фагоцитоз. Кроме того, была показана роль белков липидных рафтов и специфических белок-белковых взаимодействий в интернализации ВВ. Как правило, стыковке и последующему эндоцитозу ВВ способствуют белок-белковые взаимодействия с мембранными рецепторами, лигандами или контактными белками клеток-реципиентов. Такие белки, как тетраспанины, лектины, протеоглики и интегрины могут быть вовлечены в эти специфические взаимодействия, влияющие на интернализацию ВВ [20]. Слияние – еще один путь интернализации ВВ, при котором мембрана ВВ непосредственно сливается с плазматической мембраной клетки-реципиента. Помимо интернализации, ВВ могут активировать внутриклеточные сигнальные пути путем прямого

In this study, we first studied feasibility of MAV detection on human MSCs and demonstrated that the cryo-EM method detects EVs located near or directly on the cell surface. For this purpose, cells are cultured on a gold grid for cryo-EM and frozen whole, and studies are carried out on the edges of unfolded cells, where the cytoplasm thickness is relatively small and allows obtaining informative images. Further experiments on the removal of MAVs from the cell surface by enzymatic treatment and analysis of the resulting cell cultures and isolated MAVs by cryo-EM, as well as immunolabelling of these objects, will help to interpret the resulting images more fully.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University "Molecular Technologies of Living Systems and Synthetic Biology" (#24-Sh04-14). The work was performed using a unique scientific facility "Three-dimensional electron microscopy and spectroscopy" of the Biology Department of Moscow State University.

PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

Declaration of Competing Interest. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



взаимодействия с поверхностными рецепторами или лигандами клеток-мишеней. Сигнализация ВВ может влиять на фенотип клеток через мембраносвязанные морфогены, такие как Wnt и лиганд Notch Dll4. Также сигнализация ВВ может влиять на подвижность, миграцию и инвазивность опухолевых клеток [21].

Наконец, наблюдаемые нами ВВ могут быть МАВ в моменте биогенеза, связанные с поверхностью клетки, находящейся в поле зрения. Именно эта интерпретация представляется наиболее вероятной, поскольку перед замораживанием клеточная культура была отмыта от остатков культуральной среды, которые могли бы содержать свободно секретируемые ВВ.

Изображения, полученные в описываемых экспериментах, не позволяют однозначно выбрать одну из этих трех интерпретаций. Чтобы доказать, что наблюдаемые частицы действительно являются МАВ, представляются целесообразными несколько экспериментов. Во-первых, можно подавлять секрецию ВВ, чтобы исключить их из рассмотрения, однако добиться полного прекращения секреторной активности клетки крайне сложно. Во-вторых, можно обработать клетки ферментами или детергентами, чтобы открепить МАВ от их поверхности, и проанализировать состояние примембранного пространства после такой обработки. В-третьих, может быть полезно использование иммуномечения коллоидным золотом, которое поможет выявить частицы, имеющие на своей поверхности специфические белковые маркеры, чтобы уточнить происхождение этих частиц. Однако, для уточнения белковых маркеров специфических для МАВ, как отдельного подкласса ВВ, необходимы дополнительные исследования.

ВЫВОДЫ

ВВ являются сложным для исследования объектом из-за их гетерогенности и вариабельности [8], а МАВ представляются особенно сложным специфическим классом ВВ. Методы микроскопии высокого разрешения с успехом используются в исследованиях ВВ, и можно надеяться, что применение крио-ЭМ позволит лучше понять происхождение и физиологическую роль МАВ.

В данной работе мы впервые изучили возможность детекции МАВ на МСК человека и продемонстрировали, что метод крио-ЭМ

выявляет ВВ, расположенные вблизи поверхности клеток или непосредственно на ней. Для этого клетки культивируют на золотой сетке для крио-ЭМ и замораживают целиком, а исследования проводят на краях распластаных клеток, где толщина цитоплазмы сравнительно мала и позволяет получать информативные изображения. Дальнейшие эксперименты по удалению МАВ с поверхности клеток с помощью ферментативной обработки и анализу полученных клеточных культур и выделенных МАВ методом крио-ЭМ, а также по иммуномечению этих объектов, помогут более полно интерпретировать получаемые изображения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета "Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология" (#24-Ш04-14). Работа выполнена с использованием уникальной научной установки "Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия" Биологического факультета МГУ.

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Басалова Н.А., Джауари С.С., Юршев Ю.А., Примаков А.Л., Ефименко А.Ю., Ткачук В.А., *et al.* State-of-the-art: применение внеклеточных везикул и препаратов на их основе для нейропротекции. *Нейрохимия*. 2023. Т. 40. No 4. С. 367–80.
2. Williams T., Salmanian G., Burns M., Maldonado V., Smith E., Porter R.M., *et al.* Versatility of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair and regenerative applications International Society for Cellular Therapy. *Biochimie [Internet]*. 2023. Vol. 207. PP. 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.11.011>



3. Wang J., Xia J., Huang R., Hu Y., Fan J., Shu Q., *et al.* Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alter disease outcomes via endorsement of macrophage polarization. *Stem Cell Res Ther.* 2020. Vol. 11. No. 1. PP. 1–12.
4. Guo L., Lai P., Wang Y., Huang T., Chen X., Geng S. International Immunopharmacology Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells prevent skin fibrosis in the cGVHD mouse model by suppressing the activation of macrophages and B cells immune response. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020. Vol. 84. No. 4. P. 106541. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106541>
5. Basalova N., Arbatskiy M., Popov V., Grigorieva O., Vigovskiy M., Zaytsev I., *et al.* Mesenchymal stromal cells facilitate resolution of pulmonary fibrosis by miR-29c and miR-129 intercellular transfer. *Exp Mol Med.* 2023. Vol. 55. No. 7. PP. 1399–412.
6. Manzoor T., Saleem A., Farooq N., Dar L.A., Nazir J., Saleem S., *et al.* Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells – a novel therapeutic tool in infectious diseases. *Inflamm Regen* [Internet]. 2023. Vol. 43. <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00266-6>
7. Welsh J.A., Arkesteijn G.J.A., Giebel B., Bremer M., Cimorelli M., Rond L. De., *et al.* A compendium of single extracellular vesicle flow cytometry. *J Extracell Vesicles.* 2023. Vol. 12. No. 11.
8. Welsh J.A., Buzas E.I., Blenkiron C., Driscoll L.O., Cai H., Bussolati B., *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles.* 2024. Vol. 13. No. 2.
9. Tang Q., Zhang X., Zhang W., Zhao S., Chen Y. Identification and characterization of cell-bound membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* [Internet]. 2017. Vol. 1859. No. 5. PP. 756–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.013>
10. Zhou Y., Qin Y., Sun C., Liu K., Zhang W., Gaman M.-A. Cell-bound membrane vesicles contain antioxidative proteins and probably have an antioxidative function in cells or a therapeutic potential. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2023. Vol. 81.
11. Zhang X., Chen Y., Chen Y. An AFM-based pit-measuring method for indirect measurements of cell-surface membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014. Vol. 446. No. 1. PP. 375–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.114>
12. Linares R., Tan S., Gounou C., Brisson A.R. Imaging and Quantification of Extracellular Vesicles by Transmission Electron Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2017. Vol. 1545. PP. 43–54.
13. Medalia O., Weber I., Frangakis A.S., Nicaastro D., Baumeister W. Macromolecular Architecture in Eukaryotic Cells Visualized by Cryoelectron Tomography. *Science.* 2002. Vol. 298. No. 11. PP. 1209–13.
14. Hampton C.M., Strauss J.D., Ke Z., Dillard R.S., Jason E., Alonas E., *et al.* Correlated fluorescence microscopy and cryo-electron tomography of virus-infected or transfected mammalian cells. *Nat Protoc.* 2017. Vol. 12. No. 1. PP. 150–67.
15. Braet F., Bomans P., Wisse E., Frederik P. The observation of intact hepatic endothelial cells by cryo-electron microscopy. *J Microsc.* 2003. Vol. 212. PP. 175–85.
16. Sartori-rupp A., Cervantes D.C., Pepe A., Gousset K., Delage E., Corroyer-dulmont S., *et al.* Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of TNTs in neuronal cells. *Nat Commun* [Internet]. 2019. Vol. 10. PP. 1–16. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-08178-7>
17. Sartori A., Gatz R., Beck F., Rigort A., Baumeister W., Plitzko J.M. Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol.* 2007. Vol. 160. No. 2. PP. 135–45.
18. Emelyanov A., Shtam T., Kamyshinsky R., Garaeva L., Verlov N., Miliukhina I., *et al.* Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid. *PLoS One.* 2020. Vol. 15. No. 1. PP. 1–11.
19. Skryabin G.O., Komelkov A.V., Zhordania K.I., Bagrov D.V., Enikeev A.D., Galetsky S.A., *et al.* Integrated miRNA Profiling of Extracellular Vesicles from Uterine Aspirates, Malignant Ascites and Primary-Cultured Ascites Cells for Ovarian Cancer Screening. *Pharmaceutics.* 2024. Vol. 16. No. 7.
20. Kwok Z.H., Wang C., Jin Y. Extracellular Vesicle Transportation and Uptake by Recipient Cells: A Critical Process to Regulate Human Diseases. *Process.* 2021. Vol. 9. No. 2.
21. Liu Y.J., Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles - mediated intercellular communication. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2023. Vol. 21. No. 1. PP. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01103-6>