



**Бейлерли Озал Арзуман оглы** — к.м.н., старший научный сотрудник, учебно-научный институт нейрохирургии  
[orcid.org/0000-0002-6149-5460](https://orcid.org/0000-0002-6149-5460)

**Щекин Влас Сергеевич** — к.м.н., морфологическая лаборатория Института фундаментальной медицины  
[orcid.org/0000-0001-8339-7135](https://orcid.org/0000-0001-8339-7135)

**Алышов Агаш Беймирза оглы** — отделение анестезиологии и реаниматологии № 2  
[orcid.org/0000-0001-7249-0713](https://orcid.org/0000-0001-7249-0713)

**Нагиев Асим Джалалович** — студент, лечебный факультет  
[orcid.org/0009-0004-5613-4654](https://orcid.org/0009-0004-5613-4654)

**Нуждин Эдуард Николаевич** — студент, лечебный факультет  
[orcid.org/0009-0008-1082-0084](https://orcid.org/0009-0008-1082-0084)

**Гозалова Наргиз** — студент, факультет медицины и здравоохранения  
[orcid.org/0009-0008-6132-1752](https://orcid.org/0009-0008-6132-1752)

**Хонгли Жанг** — младший научный сотрудник, отделение нейрохирургии  
[orcid.org/0009-0001-4036-519X](https://orcid.org/0009-0001-4036-519X)

**Ли Янг** — PhD, профессор, отделение ортопедии  
[orcid.org/0009-0002-0830-0000](https://orcid.org/0009-0002-0830-0000)

**Гареев Ильгиз Фанилевич** — к.м.н., старший научный сотрудник, учебно-научный институт нейрохирургии  
[orcid.org/0000-0002-4965-0835](https://orcid.org/0000-0002-4965-0835)

## Современные методы визуализации внеклеточных везикул

**О.А. Бейлерли<sup>1</sup>, В.С. Щекин<sup>2</sup>, А.Б. Алышов<sup>5</sup>, А.Д. Нагиев<sup>2</sup>, Э.Н. Нуждин<sup>2</sup>, Н. Гозалова<sup>6</sup>, Хонгли Жанг<sup>3,4</sup>, Ли Янг<sup>3</sup>, И.Ф. Гареев<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Россия, Москва

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Россия, Республика Башкортостан, Уфа

<sup>3</sup> Первый аффилированный госпиталь Харбинского медицинского университета, Китай, Харбин

<sup>4</sup> Институт нейронаук провинции Хэйлунцзян, Китай, Харбин

<sup>5</sup> Новоуренгойская центральная городская больница, Россия, Ямало-Ненецкий автономный округ, Новый Уренгой

<sup>6</sup> Карабахский университет, Азербайджан, Ханкенди

\* Контакты: **Гареев Ильгиз Фанилевич**, e-mail: [ilgiz\\_gareev@mail.ru](mailto:ilgiz_gareev@mail.ru)

### Аннотация

Внеклеточные везикулы (ВВ), такие как экзосомы и микровезикулы (МВ), — это наночастицы, заключенные в липидный бислой и высвобождаемые различными клетками. Диаметр ВВ варьируется от 30 нм до нескольких микрометров, и они переносят биологический груз, такой как белки, липиды, РНК и ДНК, для локальной и дистанционной межклеточной коммуникации. Впоследствии было установлено, что ВВ играют роль в развитии и прогрессировании ряда заболеваний человека, в том числе опухолей. ВВ потенциально могут быть использованы в клинической деятельности в качестве транспортеров различных терапевтических агентов и диагностических инструментов различных заболеваний благодаря своей способности преодолевать биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), и специфически нацеливаться на определенные клетки. Для понимания роли ВВ в различных аспектах, от упаковки генетического материала и сигнальных молекул во время биогенеза ВВ внутри клеток-доноров до отслеживания их поглощения клетками-реципиентами и последствий после интернализации, крайне важно уметь ВВ визуализировать. Клиническое применение ВВ в диагностике и терапии по-прежнему ограничено проблемой эффективной визуализации их с высоким разрешением как *in vitro*, так и *in vivo*, главным образом из-за их размера. Для решения этой проблемы исследователи по всему миру разрабатывают инновационные методы маркировки и визуализации ВВ, стремясь раскрыть их полный потенциал. В данном обзоре рассматриваются современные и перспективные стратегии визуализации ВВ для исследований, а также обсуждаются преимущества и недостатки различных стратегий визуализации.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, экзосомы, микровезикулы, терапия, биомаркеры, методы визуализации, микроскопия

**Для цитирования:** Бейлерли О.А., Щекин В.С., Алышов А.Б., Нагиев А.Д., Нуждин Э.Н., Гозалова Н., Хонгли Жанг, Ли Янг, Гареев И.Ф. Современные методы визуализации внеклеточных везикул. *Креативная хирургия и онкология*. 2026;16(1):22–33. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2026-16-1-22-33>

Поступила в редакцию: 12.01.2026

Поступила после рецензирования и доработки: 16.02.2026

Принята к публикации: 20.02.2026

## Modern Methods for Imaging Extracellular Vesicles

Ozal A. Beylerli<sup>1</sup>, Vlas S. Shchekin<sup>2</sup>, Agash B. Alyshov<sup>3</sup>, Asim D. Nagiev<sup>2</sup>,  
Eduard N. Nuzhdin<sup>2</sup>, Nargiz Gozalova<sup>6</sup>, Hongli Zhang<sup>3,4</sup>, Lei Yang<sup>5</sup>, Ilgiz F. Gareev<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>RUDN University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation

<sup>3</sup>The First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, China

<sup>4</sup>Heilongjiang Province Neuroscience Institute, Harbin, China

<sup>5</sup>Novy Urengoy Central City Hospital, Novy Urengoy, Russian Federation

<sup>6</sup>Karabakh University, Khankendi, Azerbaijan

\* Correspondence to: **Ilgiz F. Gareev**, e-mail: [ilgiz\\_gareev@mail.ru](mailto:ilgiz_gareev@mail.ru)

### Abstract

Extracellular vesicles (EVs), such as exosomes and microvesicles (MVs), are lipid bilayer-enclosed nanoparticles released by various cells. Their diameters range from 30 nm to several micrometers, and they carry biological cargo, including proteins, lipids, RNA, and DNA, for local and distant intercellular communication. EVs play important role in the development and progression of numerous human diseases, including cancer. EVs are considered promising candidates for clinical applications as carriers of therapeutic agents and as diagnostic tools, owing to their capacity to cross biological barriers, such as the blood-brain barrier (BBB), and target specific cells. The visualization of EVs is essential to understand their roles, from packaging genetic material and signaling molecules during their biogenesis in donor cells to tracking uptake by recipient cells and downstream signaling following internalization. The clinical translation of EVs in diagnostics and therapy remains limited by challenges associated with their high-resolution visualization both *in vitro* and *in vivo*, primarily due to their small size. Researchers worldwide are developing innovative labeling and visualization strategies to unlock EV full potential. This review covers current and emerging EV visualization approaches in research settings and discusses the advantages and limitations of the major imaging strategies.

**Keywords:** extracellular vesicles, exosomes, microvesicles, therapy, biomarkers, imaging methods, microscopy

**For citation:** Beylerli O.A., Shchekin V.S., Alyshov A.B., Nagiev A.D., Nuzhdin E.N., Gozalova N., Hongli Zhang, Lei Yang, Gareev I.F. Modern methods for imaging extracellular vesicles. *Creative Surgery and Oncology*. 2026;16(1):22–33. <https://doi.org/10.24060/2076-3093-2026-16-1-22-33>

Received: 12.01.2026

Revised: 16.02.2026

Accepted: 20.02.2026

**Ozal A. Beylerli** – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Educational and Scientific Institute of Neurosurgery

[orcid.org/0000-0002-6149-5460](https://orcid.org/0000-0002-6149-5460)

**Vlas S. Shchekin** – Cand. Sci. (Med.), Morphology Laboratory, Institute of Fundamental Medicine

[orcid.org/0000-0001-8339-7135](https://orcid.org/0000-0001-8339-7135)

**Agash B. Alyshov** – Anaesthesiology and Intensive Care Unit No.2

[orcid.org/0000-0001-7249-0713](https://orcid.org/0000-0001-7249-0713)

**Asim D. Nagiev** – Student, Faculty of Medicine

[orcid.org/0009-0004-5613-4654](https://orcid.org/0009-0004-5613-4654)

**Eduard N. Nuzhdin** – Student, Faculty of Medicine

[orcid.org/0009-0008-1082-0084](https://orcid.org/0009-0008-1082-0084)

**Nargiz Gozalova** – Student, Faculty of Medicine and Healthcare

[orcid.org/0009-0008-6132-1752](https://orcid.org/0009-0008-6132-1752)

**Hongli Zhang** – Junior Researcher, Neurosurgery Unit

[orcid.org/0009-0001-4036-519X](https://orcid.org/0009-0001-4036-519X)

**Lei Yang** – PhD, Prof., Orthopaedic Unit

[orcid.org/0009-0002-0830-0000](https://orcid.org/0009-0002-0830-0000)

**Ilgiz F. Gareev** – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Educational and Scientific Institute of Neurosurgery

[orcid.org/0000-0002-4965-0835](https://orcid.org/0000-0002-4965-0835)

**ВВЕДЕНИЕ**

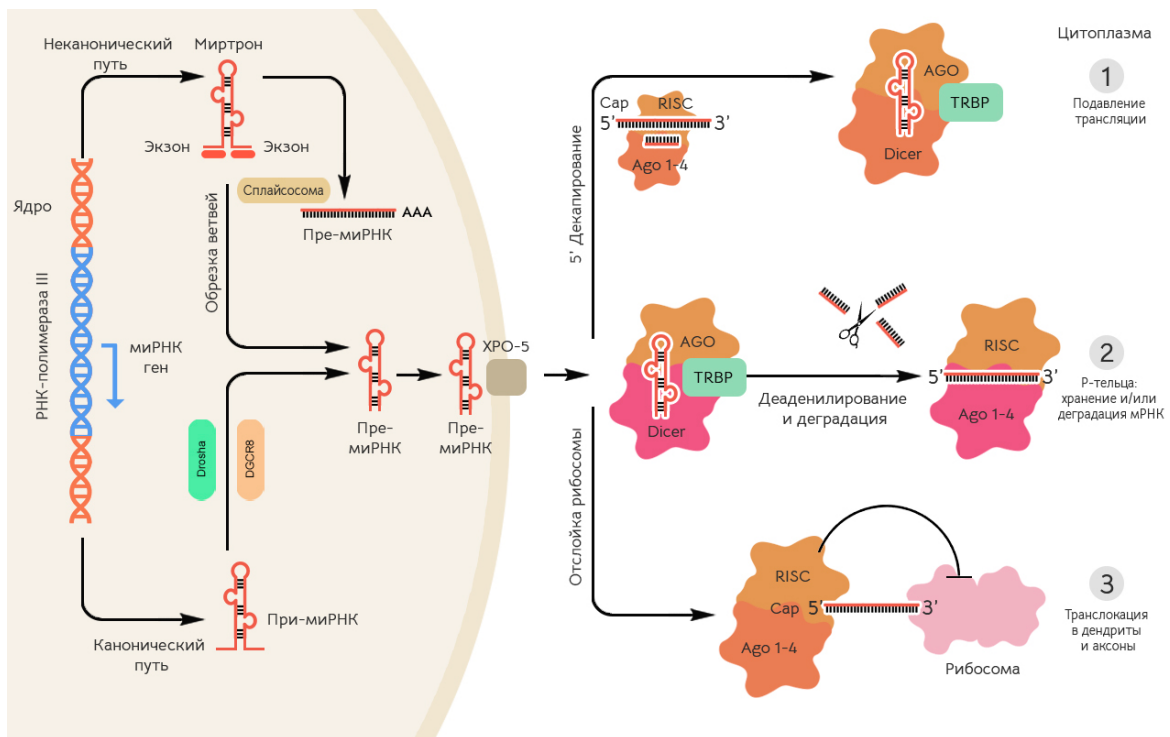
Внеклеточные везикулы (ВВ) – это мембранные частицы, которые представляют собой гетерогенную популяцию по размеру (диаметр от 30 нм до 5 мкм) и происхождению (экзосомы, микровезикулы (МВ), экзосомы или апоптотические тела), играя ключевую роль как в физиологических, так и в патологических процессах. За последние два десятилетия область исследований, связанная с ВВ, экспоненциально выросла, что демонстрирует ее значимость [1]. Эти высокогетерогенные ВВ высвобождаются почти всеми типами клеток и содержат множество биомолекул, таких как белки, РНК, некодирующие РНК (нкРНК), ДНК, шапероны и липиды [2–4]. Состав ВВ варьируется в зависимости от физиологических и патологических состояний, что делает их привлекательными в качестве биомаркеров. ВВ в большом количестве присутствуют в биологических жидкостях, главным образом в крови, моче и слюне. Поэтому анализ ВВ в биологических жидкостях был предложен в качестве неинвазивного/малоинвазивного метода для идентификации новых биомаркеров многих заболеваний, в том числе опухоли [5–9].

ВВ также являются перспективными носителями лекарственных средств благодаря своей биосовместимости и способности преодолевать биологические барьеры, такие как гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [10–12]. Ранее ВВ считались клеточными отходами, пока исследования не показали, что ВВ служат средством межклеточной коммуникации, доставляя биологический груз к соседним и отдаленным участкам организма. С тех пор ВВ активно изучаются в патофизиологических условиях, а также в целях разработки терапевтических и диагностических средств [13]. Например, участие микроРНК во многих биологических процессах хорошо задокументировано, включая пролиферацию клеток, клеточную дифференциацию, миграцию клеток, инициацию и прогрессирование заболеваний (рис. 1) [14, 15].

Потенциальная роль микроРНК в коммуникации между клетками и тканями убедительно подтверждается тем фактом, что микроРНК могут экспортироваться и импортироваться клетками посредством механизмов, включающих везикулярный транспорт. Передача информации через ВВ считается одним из важных способов межклеточной коммуникации, столь же важным, как и передача сигналов, зависящая от контакта между клетками, и передача сигналов посредством переноса растворимых молекул. Однако малый размер и многоуровневая гетерогенность ВВ затрудняют изучение их биологических свойств с использованием подходящих методов визуализации. Для облегчения этих исследований было разработано множество методов маркировки и свойств ВВ. Каждая стратегия визуализации имеет свои преимущества и недостатки. В данной работе представлен обзор происхождения и классификации ВВ, а также освещены различные методы визуализации, используемые на этапах их происхождения, выделения, динамического поглощения и высвобождения ВВ из клеток. Обсуждаются преимущества и ограничения различных методов визуализации, чтобы предоставить исследователям лучшее понимание наиболее подходящего метода для их конкретного применения.

**БИОГЕНЕЗ И КЛАССИФИКАЦИЯ ВВ**

В 2018 году Международное общество по внеклеточным везикулам (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) обновило рекомендации, выпущенные еще в 2014 году, сосредоточив внимание на необходимости надлежащей номенклатуры при описании ВВ для стандартизации протоколов и отчетов в этой области. В рекомендациях 2018 года по исследованиям ВВ «Минимальный объем информации для исследований внеклеточных везикул» (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018; MISEV2018) термин «ВВ» был рекомендован как наилучшая общая терминология для частицы, состоящей из липидного бислоя, высвобождаемой клетками. «ВВ» счита-



**Рисунок 1.** Биогенез микроРНК  
**Figure 1.** miRNA biogenesis

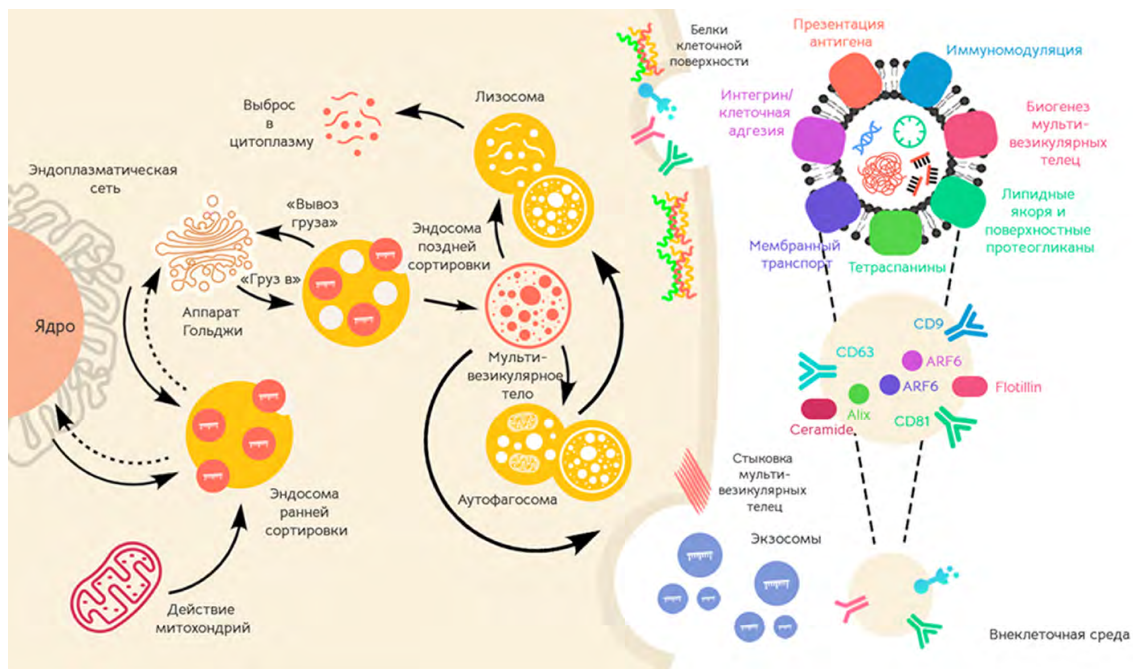
ется собирательным термином, охватывающим различные подтипы высвобождаемых клетками мембранных структур, включая экзосомы, МВ (ранее также известные как микрочастицы), эктосомы, онкосомы, апоптотические тельца и другие, независимо от механизма их биогенеза, высвобождения, молекулярных маркеров, размера, плотности и функции. Инициатива MISEV2018 стандартизирует терминологию, сбор и предварительную обработку образцов, разделение и концентрирование ВВ, их характеристику, функциональные исследования, а также требования к отчетности и исключения из нее [16–20]. ВВ включают в себя различные типы везикул, где состав содержимого ВВ отражает характеристики родительской клетки (рис. 2). По этой причине ВВ, высвобождаемые опухолевыми клетками, могут использоваться в качестве биомаркеров онкологических заболеваний. Для расширения области применения ВВ ряд исследований было посвящено их потенциалу в качестве биомаркеров старения и возрастных заболеваний. Более того, поверхность ВВ имеет специфический набор рецепторов, определяющих их целевую клетку. Таким образом, ВВ имеют специфическую родительскую клетку и специфическую целевую клетку. Эта особенность делает их очень полезными в терапевтических целях и в качестве средств доставки лекарств.

Экзосомы относительно малы по размеру, от 30 до 150 нм, и процесс их образования сложен. Первоначально клеточная мембрана вдавливается внутрь, образуя ранние эндосомы, которые позже созревают в мультивезикулярные тела. Эти тела затем могут сливаться либо с лизосомами, либо с плазматической мембраной, образуя экзосомы [21, 22]. Однако механизм коммуникации, обмена материалами и сортировки между различными внутриклеточными органеллами и эндосомами во время образования экзосом до сих пор полностью не изучен, что приводит к различиям в содержании экзосом из одного и того же клеточного источника [23, 24]. МВ, с другой стороны, образуются путем прямого отпочковывания от плазматической

мембраны клетки и имеют больший размер, от 100 до 1000 нм [25]. Помимо МВ, были идентифицированы и другие ВВ, происходящие из плазматической мембраны и имеющие различную форму, такие как миграционные тельца и везикулы, происходящие из микроворсинок [23–26]. Эти подтипы ВВ обладают схожими биофизическими характеристиками, включая размер, плотность, содержимое и состав мембраны [27]. Однако механизм поглощения и слияния различных подтипов ВВ остается неясным. Кроме того, происхождение, передача, поглощение и другие механизмы процессов ВВ до сих пор неизвестны. Поэтому для исследования и изучения биологических процессов ВВ необходимы передовые и надежные методы выделения (изоляция) и визуализации (табл. 1) [21–27].

К числу распространенных методов выделения ВВ относятся ультрацентрифугирование, ультрацентрифугирование в градиенте плотности, фильтрация, а также методы, основанные на изменениях растворимости и/или агрегации ВВ, эксклюзионная хроматография и осаждение с использованием полимеров (рис. 3) [28].

С 2015 года во всем мире предпринимаются многочисленные усилия по разработке и совершенствованию методов количественного определения и характеристики ВВ [29, 30]. В отсутствие одного оптимизированного и подходящего подхода необходимо использовать как минимум две разные методики для количественного определения и/или характеристики морфологии, биокомпозиции и рецепторов ВВ. Выбранные методы выделения, количественного определения и характеристики ВВ могут влиять на интерпретацию результатов. Поэтому крайне важно унифицировать их, чтобы обеспечить возможность сравнения исследований, проведенных разными группами ученых. Например, исследователям необходимо стандартизировать методы выделения и количественного определения ВВ. ВВ можно выделять из биологических жидкостей, таких как плазма и моча, но их также можно получать из клеток, культивируемых *in vitro*.

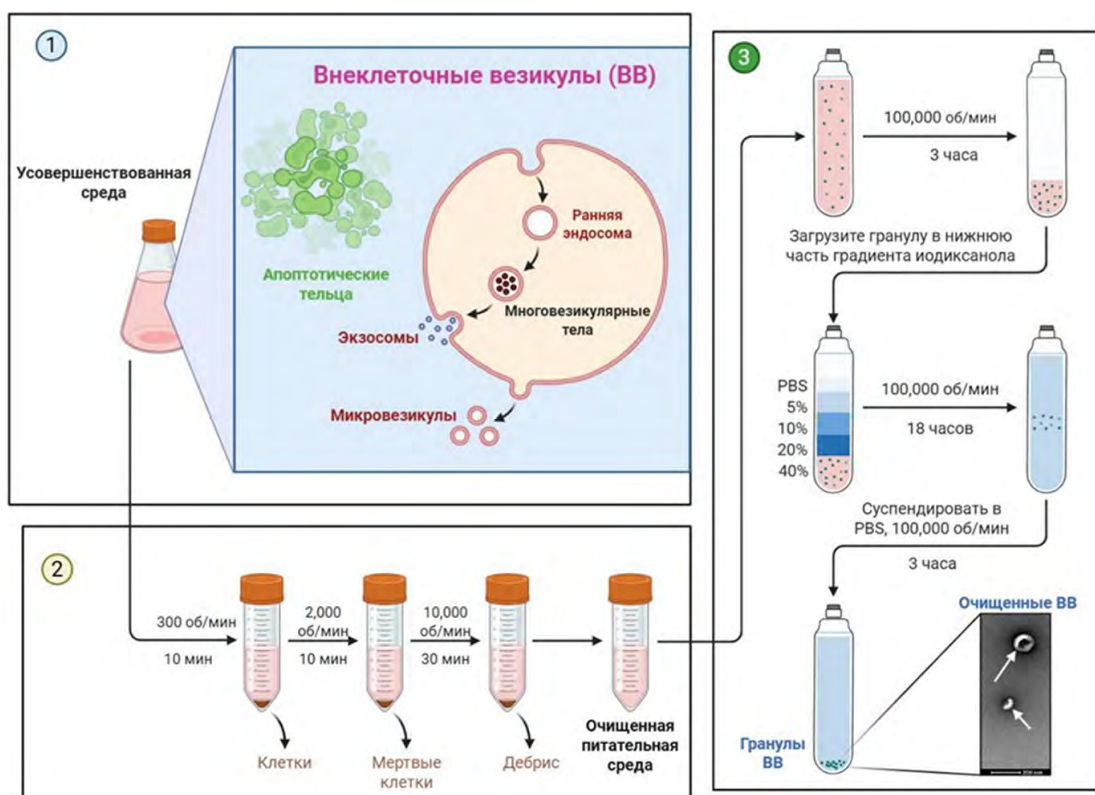


**Рисунок 2.** Схематическое представление процесса биогенеза внеклеточных везикул (ВВ), в частности экзосомы, и их поглощения клетками-мишенями  
**Figure 2.** Schematic of extracellular vesicle (EV) biogenesis, particularly exosomes, and their uptake by target cells

**Таблица 1.** Разновидности внеклеточных везикул (ВВ) и их особенности

**Table 1.** Extracellular vesicle (EV) subtypes and their characteristics

ВВ	Размеры	Описание
Экзосомы	30–100 нм	Образование и высвобождение происходит через эндосомальный путь во внеклеточную среду после слияния с плазматической мембраной. Их содержимое соответствует содержимому эндосомального компартамента
Микровезикулы	100 нм – 1 мкм	Они секретируются за пределы клетки в процессе выпячивания или прорастания плазматической мембраны, который включает в себя: 1) перемещение фосфолипидов во внешней мембране таким образом, чтобы фосфатидилсерин, обычно расположенный на внутренней стороне мембраны клетки, оказался на поверхности везикулы; 2) перестройку цитоскелета; 3) образование кривизны мембраны и 4) высвобождение везикулы
Эктосомы	100–350 нм	Данные ВВ встречаются повсюду в организме и высвобождаются из плазматической мембраны клетки. Их функция аналогична функции экзосом
Апоптотические тельца	1–5 мкм	Высвобождаются в виде везикул после клеточного апоптоза, сопровождающегося повышением проницаемости мембраны, фрагментацией ДНК и изменением митохондриального мембранного потенциала. Они также экспонируют фосфатидилсерин на своей поверхности и содержат клеточные органеллы и генетический материал



**Рисунок 3.** Разделение внеклеточных везикул (ВВ) методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности: 1) ВВ высвобождаются клетками в процессе их нормальной активности; 2) Для выделения ВВ культуральную среду собирают и удаляют основные примеси путем последовательного центрифугирования на низкой скорости; 3) Осветленный супернатант концентрируют ультрацентрифугированием и полученный осадок с концентрацией 100 000 загружают на дно градиента иодиксанола. ВВ всплывают, и обогащенные ВВ фракции собирают и осаждают. Конечный образец богат ВВ и не содержит примесей

**Figure 3.** Extracellular vesicle (EV) isolation by density gradient ultracentrifugation: 1) EVs are released by cells during normal physiological activity; 2) Culture medium is collected, and major contaminants are removed by sequential low-speed centrifugation; 3) Clarified supernatant is concentrated by ultracentrifugation; the resulting pellet (100,000×g) is loaded onto the bottom of an iodixanol density gradient. EVs float upward; enriched fractions are collected and pelleted. The final sample is enriched in EVs and free of contaminants

В обоих случаях множество различных методов выделения и характеристики ВВ могут приводить к различиям в количестве, выходе, степени извлечения и функциях ВВ.

### МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВВ

ВВ и их взаимодействие с клетками-реципиентами представляют собой быстро развивающуюся область исследований. Однако из-за ограничений существующих методологий механизмы этих взаимодействий до сих пор остаются неяс-

ными. Микроскопические исследования ВВ представляют собой сложную задачу, поскольку их типичный диаметр близок к пределу разрешения световой микроскопии, а электронная микроскопия имеет ограниченные возможности для мечения белков.

В последнее время появилось множество методов, позволяющих продемонстрировать поглощение ВВ клетками-реципиентами. К таким методам относятся добавление ВВ с субстратом люциферина для взаимодействия с клетками, экспрессирующи-

ми люциферазу, или использование РНК-интерференции, опосредованной ВВ, для подавления экспрессии генов в качестве доказательства того, что поглощение ВВ происходило путем слияния с плазматической мембраной или через пути после интернализации с эндосомальной мембраной [31]. Наиболее распространенным методом является мечение ВВ флуоресцентным красителем липидной мембраны и их визуализация с помощью конфокального микроскопа, поскольку это позволяет отслеживать все подтипы ВВ [32].

Однако использование липофильных красителей имеет некоторые ограничения, поскольку у этих красителей длительный период полураспада и они могут неточно отражать период полураспада ВВ. В результате флуоресцентные молекулы липофильных красителей переносятся с внеклеточных везикул на клеточные мембраны, создавая псевдокартину пространственно-временной оценки внеклеточных везикул, которая в действительности обусловлена обычной рециркуляцией мембран. Еще одним недостатком методов флуоресцентной маркировки является почти предел разрешения светового микроскопа, что позволяет визуализировать ВВ с относительно низким разрешением [33]. Кроме того, использование широкопольных методов не дает достоверной картины детальной субклеточной локализации сигнала.

В последнее время для получения более подробных данных о биологии ВВ используются передовые методы электронной микроскопии, такие как иммуноэлектронная микроскопия и криосекционирование [34, 35]. Корреляционная световая и электронная микроскопия (КЛЭМ) – это метод, сочетающий оптическую и электронную микроскопию, позволяющий получать изображения высокого разрешения той же структуры, которая наблюдается с помощью флуоресцентных методов. В то время как световая микроскопия обеспечивает эффективную маркировку и локализацию белков, электронная микроскопия показывает ультраструктурные детали интересующих клеточных структур [36]. Клетки, наблюдаемые с помощью световой микроскопии высокого разрешения, коррелируются с электронной микроскопией нанометрового разрешения, которая предоставляет подробные данные о субклеточной локализации и морфологии ВВ и позволяет точно обнаруживать отдельные везикулы.

### Световая микроскопия

Электронная микроскопия за последние 100 лет стала революционной технологией визуализации для ученых и инженеров, открыв мир наноматериалов и позволив характеризовать их уникальные свойства. Возможность электронных микроскопов получать изображения объектов субмикронного размера, вплоть до отдельных атомов, привела к разработке совершенно новых нанотехнологий, а также позволила добиться замечательных результатов в наноинженерии макроскопических компонентов. Электронная микроскопия – это сложная, зрелая технология и включает в себя множество направлений и методологий. Сегодня наиболее распространенным в мире микроскопом является световой микроскоп. Световые микроскопы дешевы, надежны и, как правило, неинвазивны, оставляя изображаемый объект неизменным в процессе получения изображения. Существует множество вариантов световой микроскопии, но обычно есть предел их способности различать объекты и особенности размером менее 100 нм [37, 38].

Использование светового микроскопа позволяет получать изображения ВВ в диапазоне размеров от примерно 30 нм до 1 мкм, используя взаимодействие освещения с наночасти-

цами. Визуализация ВВ обычно основана на методах рассеяния/фазового контраста без использования меток (темное поле и фазовый контраст) или на флуоресцентной маркировке (липидные красители или антитела) для обеспечения специфичности. Световой путь включает в себя освещение, взаимодействие с образцом и детектирование объективом, линзой тубуса и камерой (рис. 4) [39].

Как правило, отдельные экзосомы невозможно увидеть с помощью стандартного светового микроскопа. Их размер составляет 30–100 нм, что значительно меньше дифракционного предела света. Однако их можно визуализировать с помощью световой микроскопии, если их пометить и получить изображение в виде флуоресцентных сигналов, или визуализировать их поглощение клетками. Для непосредственной визуализации фактической структуры экзосом наиболее предпочтительным методом является электронная микроскопия [40].

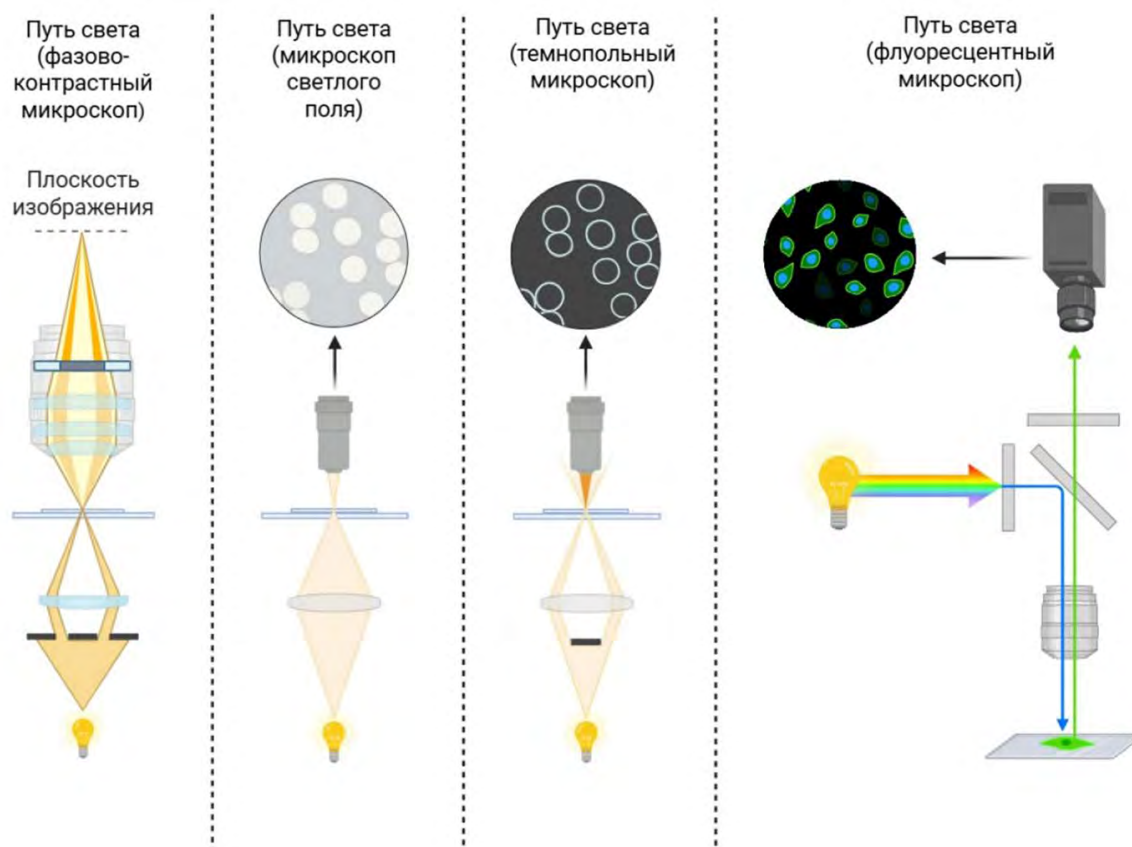
### Электронная микроскопия

Размер многих ВВ из биологических жидкостей ниже разрешения даже самых современных оптических микроскопов. Поэтому для оценки их морфологии используется электронная микроскопия. В целом, существует два типа электронных микроскопов: сканирующие электронные микроскопы (СЭМ) и просвечивающие, или трансмиссионные, электронные микроскопы (ТЭМ) [32]. Оба работают путем облучения образца пучком электронов в условиях высокого вакуума ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$  Па) и используют взаимодействие этих электронов с атомами образца для создания изображения. Таким образом, оба микроскопа состоят из трех основных компонентов: 1) электронного пушки, которая генерирует электронный пучок; 2) магнитных линз и апертур в металлических диафрагмах для формирования электронного пучка и направления его к образцу или детектору и 3) детекторов, которые собирают сигналы, возникающие в результате взаимодействия электронного пучка с образцом, и преобразуют их в изображение или график (табл. 2) [41–43].

### Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ)

В сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) электронный пучок фокусируется в точку и последовательно сканирует образец. В каждой точке из образца испускаются сигналы, которые затем собираются детекторами. Сигнал детектора синхронизируется с известным местоположением пучка на образце, а интенсивность сигнала используется для модуляции соответствующего пикселя изображения. Сигналы, собранные последовательно, объединяются для формирования изображения, размеры/распределение пикселей которого зависят от выбранной схемы сканирования. Типичная энергия электронов составляет 1–30 кэВ (рис. 5) [44].

Для биологических образцов, таких как ВВ, наиболее актуальны детекторы вторичных электронов. Они регистрируют низкоэнергетические электроны, испускаемые только вблизи поверхности образца, и могут предоставить ценную информацию об образце (морфология и состав, текстура поверхности и шероховатость). Для визуализации ВВ с помощью СЭМ, которые являются непроводящими, их необходимо покрыть тонкой металлической пленкой для рассеивания электронов. В целом СЭМ является эффективным методом наблюдения за внешним видом ВВ. Однако внешняя форма ВВ деформируется при их прикреплении к поверхности, и трудно различить разные частицы. Металлическое покрытие также затрудняет наблюдение за внутренней частью фосфолипидного бислоя [45, 46].



**Рисунок 4.** Световая микроскопия при визуализации внеклеточных везикул (ВВ). В микроскопии для анализа ВВ используются специализированные высокочувствительные методы, позволяющие преодолеть малый размер везикул, часто с применением методов рассеяния, флуоресценции или рамановской спектроскопии

**Figure 4.** Light microscopy for extracellular vesicle (EV) visualization. Specialized high-sensitivity optical techniques are employed to overcome the small size of EVs, often using scattering-based methods, fluorescence, or Raman spectroscopy

### Трансмиссионный электронный микроскоп (ТЭМ)

В ТЭМ электронный пучок падает на определенную область образца. Электроны, прошедшие через образец, фокусируются линзами и собираются параллельным детектором для формирования изображения. Энергия электронов в ТЭМ значительно выше, чем в СЭМ, обычно 80–300 кэВ, что позволяет им проникать сквозь материал (рис. 6) [47].

ТЭМ – наиболее распространенный тип электронной микроскопии для визуализации ВВ, используемый в основном для контроля качества и чистоты образцов, содержащих ВВ, поскольку позволяет лучше различать отдельные ВВ от частиц аналогичного размера, не являющихся ВВ. Специфическое распознавание ВВ может быть дополнительно усилено путем присоединения иммунометок, например электронно-непроницаемых золотых наночастиц (диаметром от 1 до 20 нм), функционализированных специфическим антителом, к антигенным участкам на ВВ. Это приводит к так называемой иммуно-ТЭМ-визуализации, которая позволяет функционально изучать структуру и наблюдать положение специфических белков [48]. Главный недостаток использования иммунометки с обычной ТЭМ заключается в том, что образец может быть значительно изменен в процессе необходимой подготовки для его иммобилизации и высушивания. С другой стороны, вместо высушивания биологические образцы могут быть полностью затвердевшими путем замораживания при очень низких температурах во время визуализации (77 К) [49]. Таким

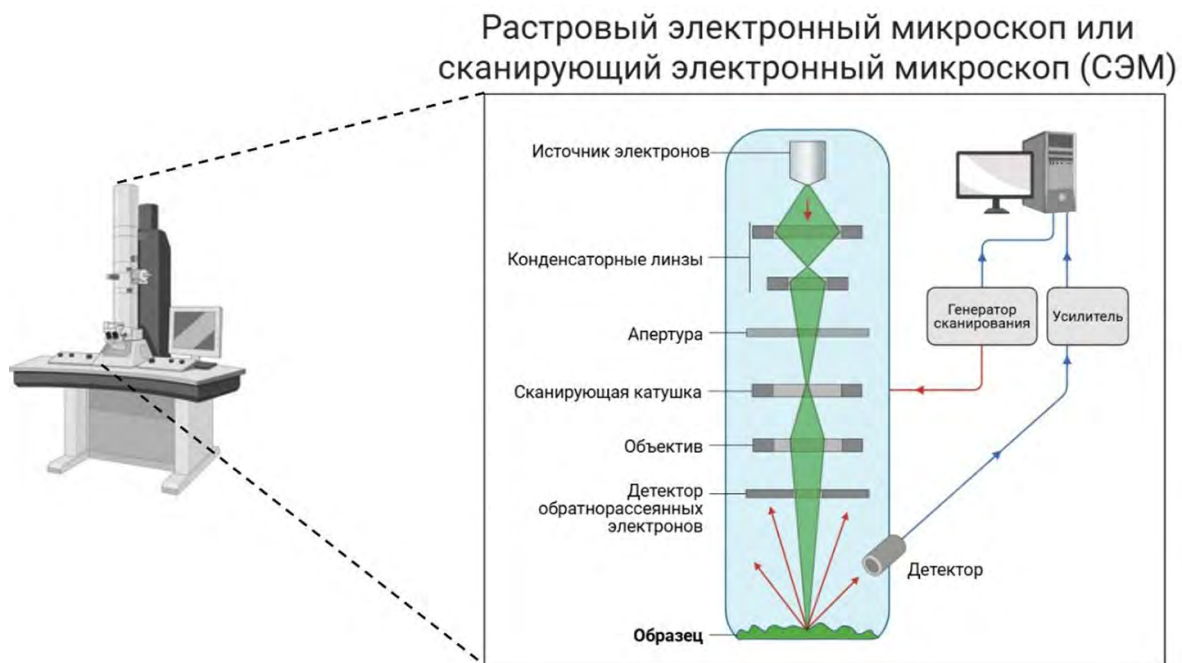
образом, ВВ можно наблюдать в гидратированном состоянии даже при высоком вакууме. Этот метод электронной микроскопии называется криоТЭМ и является мощным инструментом для оценки морфологии внеклеточных везикул [50]. Он сохраняет нативную структуру биологического материала и позволяет избежать изменений или модификаций, обычно встречающихся в традиционных методах электронной микроскопии.

### Атомно-силовая микроскопия (АСМ) и Анализ отслеживания наночастиц (АОН)

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – это инструмент для определения морфологии, структуры и состава, а также биомеханических и биофизических характеристик нанометровых структур. Вкратце: АСМ использует микронетровый кантилевер с нанометровым наконечником, приводимым в движение пьезоэлектрическими кристаллами [51]. При получении сигналов о взаимодействии наконечника с образцом позиционно-чувствительный фотодиод преобразует их в напряжение и передает на пьезоэлектрический актуатор (ПА) [52]. Последний расширяется и сжимается пропорционально приложенному напряжению, позволяя с высокой точностью манипулировать образцом и положением зонда в трех измерениях. ПА может быть соединен с кантилевером или расположен под держателем образца. Вся система регулируется соответствующей управляющей электроникой. В отличие от электронной микроскопии, которая работает только в вакууме и, следовательно,

**Таблица 2.** Основные преимущества и недостатки визуализации с помощью электронной микроскопии  
**Table 2.** Key advantages and limitations of electron microscopy-based visualization

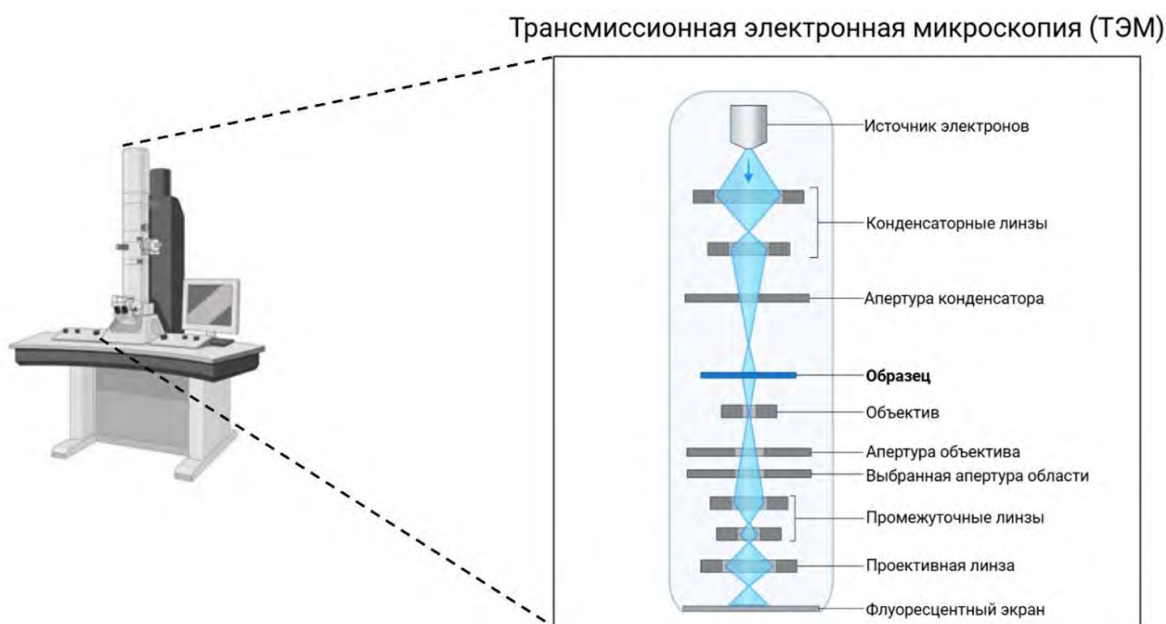
Основные преимущества	Основные недостатки
<p>1) Высокое разрешение. Главное преимущество электронной микроскопии – высокое разрешение изображения по сравнению со световой микроскопией. Современные просвечивающие электронные микроскопы позволяют анализировать положение и химический состав отдельных атомов, хотя на практике разрешение данных зависит от выбранного метода электронной микроскопии и условий работы микроскопа.</p> <p>2) Диапазон увеличения. Электронные микроскопы обеспечивают очень большой диапазон увеличения, обычно в пределах 10–500 000 раз для СЭМ и от 2000 до 1 миллиона раз для ПЭМ. Это позволяет характеризовать микроstructures в различных масштабах, от микро- до наномасштаба, в рамках одной сессии визуализации. Однако важно понимать разницу между увеличением и разрешением. Увеличение изображения – это размер элемента на изображении относительно фактического размера того же элемента на образце. Высокое увеличение бесполезно, если условия работы микроскопа не были оптимизированы для достижения высокого разрешения.</p> <p>3) Электронно-генерируемые сигналы. Главное преимущество использования электронов по сравнению со светом заключается в том, что электроны взаимодействуют с атомами через электромагнитные силы, что определяет химические связи и поведение веществ. Взаимодействие электронов с образцом приводит к широкому спектру явлений, которые генерируют излучение сигналов от образца. Эти сигналы могут быть обнаружены и использованы для формирования структурных и химических изображений определенных областей образца. Таким образом, электронная микроскопия является многофункциональным инструментом, представляя собой одновременно инструмент наноразмерной визуализации и спектроскопии.</p>	<p>1) Вакуум. Сильное взаимодействие электронов с веществом может создавать трудности в методологии. Электроны взаимодействуют с молекулами воздуха, поэтому электронным микроскопам требуется определенная степень вакуума, чтобы гарантировать, что достаточное количество электронов в электронном пучке не будет рассеяно на своем пути от источника электронов через электронную оптику к образцу. Типичные давления, используемые в электронных микроскопах, варьируются от 0,1 до <math>10^{-4}</math> Па для СЭМ (низкий вакуум) и от <math>10^{-4}</math> до <math>10^{-7}</math> Па для ТЭМ (высокий вакуум). Требование вакуумной среды может противоречить природе исследуемого материала. Образцы с высоким давлением пара, такие как биологические материалы и жидкости, будут изменяться из-за потери воды и других летучих веществ в вакууме. Для решения этой проблемы были разработаны специальные электронные микроскопы с переменным давлением и условиями окружающей среды, которые могут работать при пониженном вакууме (до 4 кПа) в непосредственной близости от образца, чтобы сохранить его состояние максимально неизменным.</p> <p>2) Высокая энергия электронов. Взаимодействие электронов с материалами зависит от кинетической энергии падающих электронов. Типичные электронные микроскопы работают с электронами с энергией 1–300 кэВ, в зависимости от используемого микроскопа. Передача энергии в исследуемый материал может привести к изменениям в нем, и этот сценарий должен оцениваться ученым при каждом исследовании с помощью электронной микроскопии. Фактически некоторые изменения материала неизбежны на атомном уровне, но могут варьироваться от незначительных до существенных. Точка, в которой повреждение, вызванное электронным пучком, становится неприемлемым, будет зависеть от исследуемого материала и используемой методологии.</p>



**Рисунок 5.** Схематическое изображение основных компонентов сканирующего электронного микроскопа (СЭМ)  
**Figure 5.** Schematic of the main components of a scanning electron microscope (SEM)

влияет на морфологию поверхности, АСМ может работать в нормальных условиях и в двух средах: воздухе или жидкости [53]. Воздушная среда подразумевает сушку образца в слабом потоке азота, и было показано, что анализируемые на воздухе

ВВ сжимаются и приобретают характерную чашеобразную форму в процессе испарения из-за сжатия центральной более мягкой области относительно окружающих частей. Напротив, жидкая среда чаще всего ближе к физиологическим условиям,



**Рисунок 6.** Схематическое изображение основных компонентов трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ)  
**Figure 6.** Schematic of the main components of a transmission electron microscope (TEM)

в которых находятся ВВ, чем осушённые или поверхностно модифицированные образцы. В растворе сохраняется более естественные структуры и динамика ВВ, и не требуется наносить покрытия, что уменьшает риск искажений в размере, составе поверхностной мантии и межчастичных взаимодействий. Это особенно полезно для мониторинга в реальном времени и для аналитических техник, работающих в жидкой фазе. Это лучше сохраняет сферическую форму ВВ, но усложняет оптимизацию положения лазера и снижение шума. Следовательно, визуализация на воздухе полезна при проверке наличия везикул и качества образца. Однако визуализация в жидкости является оптимальным выбором, поскольку она сохраняет свойства ВВ и отражает их естественное состояние [54–56]. Определить исключительное влияние среды на форму наночастиц сложно, это скорее сложная комбинация факторов, таких как различные силы, подложка, используемая для прикрепления образца, и протоколы подготовки образца.

АОН — это универсальный метод, позволяющий анализировать концентрацию, размер и субпопуляции биомаркеров посредством селективной флуоресцентной маркировки. Подобно динамическому рассеянию света, АОН оценивает размер ВВ по их броуновскому движению в среде [57]. Однако эти два метода различаются по подходу к анализу. АОН — это подход «снизу вверх», который отслеживает диффузию отдельных частиц и обобщает данные по отдельным частицам на целые группы, тогда как динамическое рассеяние света — это метод ансамблевого анализа «сверху вниз», который наблюдает флуктуационные сигналы целых частиц и анализирует автокорреляционные функции [58]. В АОН рассеянный сигнал отдельных частиц регистрируется в соответствии с временным интервалом каждого кадра, а затем сигналы связываются с помощью алгоритма ближайшего соседа. Анализ отслеживания динамических одиночных ВВ зависит от полученных изображений. Поэтому наиболее важным фактором для повышения точности отслеживания является получение четкого сигнала от частиц с высоким отношением сигнал/шум. Свет от ВВ рассеивается

в области рэлеевского рассеяния, и интенсивность пропорциональна шестой степени диаметра. Измеренный размер частиц для АОН варьируется от 50 нм до 1 мкм [59, 60]. Для точной визуализации и анализа необходимо подготовить частицы относительно однородного и подходящего размера, чтобы избежать помех от других сигналов из-за исключительно сильного рассеянного света крупных или агрегированных частиц. Кроме того, образцы с чрезмерно высокой концентрацией приводят к тому, что обнаруженные частицы не совпадают с сигналами от других частиц вокруг них, что создает проблемы для анализа отслеживания, требующего связывания частиц на нескольких кадрах [61]. Для получения высокого отношения сигнал/шум в коммерческой технологии АОН используется сильнонаклонное тонкое освещение для падающего луча, чтобы минимизировать разницу между толщиной лазера и глубиной резкости и уменьшить внефокусный шум [62].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внеклеточные везикулы — это наноносители в организме, которые выступают в качестве медиаторов межклеточной коммуникации и прогрессирования ряда заболеваний, в том числе онкологических. С момента первого открытия ВВ особенно известны своим потенциалом в доставке лекарств и клинической диагностике. ВВ не только имеют различные компоненты в зависимости от клеточной линии, но и обладают гетерогенными характеристиками в популяции ВВ, полученных из одной и той же клеточной линии. Они по своей природе сложны, учитывая разнообразие выполняемых ими функций. Поэтому необходимо различать эти гетерогенные ВВ и выявлять их роли.

Методы электронной микроскопии, АСМ или АОН, являются мощными инструментами для визуализации ВВ. Однако как сами ВВ, так и аспекты, связанные с микроскопией, могут существенно влиять на конечные результаты визуализации и, следовательно, требуют детальной и целенаправленной оптимизации. С одной стороны, существует среда, содержащая ВВ, которые необходимо визуализировать. Среда может представ-

лять собой либо биологическую жидкость, либо буфер после выделения ВВ. Каждый тип среды, содержащей ВВ, может иметь специфическую кислотность, солевой состав и концентрацию, которые могут существенно влиять на последующую процедуру подготовки образцов для микроскопических методов. С другой стороны, протоколы и методы подготовки образцов для существующих методов одинаково возможны в бесчисленных вариантах и не стандартизированы, что делает микроскопическую характеристику ВВ вариабельной и ненадежной. Эта вариабельность обусловлена несколькими факторами, и для описания вариаций формы, морфологии, структуры и топографии

ВВ используется различная терминология. Особое внимание следует уделить этапам протоколов подготовки образцов и контролю образования артефактов. Наряду со стандартным применением электронной микроскопии и атомно-силовой микроскопии для выявления наличия структур, подобных внеклеточным везикулам, и примесей следует внедрить подход, основанный на иммунодетекции отдельных внеклеточных везикул, чтобы снизить уровень неопределенности. Источники вариации следует оценивать до проведения каких-либо последующих анализов, чтобы предотвратить неверные интерпретации в ходе исследований биологических функций ВВ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- 1 Tkach M., Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*. 2016;164(6):1226–32. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043
- 2 Zhang X., Yuan X., Shi H., Wu L., Qian H., Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol*. 2015;8:83. DOI: 10.1186/s13045-015-0181-x
- 3 Abels E.R., Breakefield X.O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301–12. DOI: 10.1007/s10571-016-0366-z
- 4 Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9–17. DOI: 10.1038/s41556-018-0250-9
- 5 Van Deun J., Mestdagh P., Agostinis P., Akay Ö., Anand S., Anckaert J., et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. 2017;14(3):228–32. DOI: 10.1038/nmeth.4185
- 6 Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255–89. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
- 7 Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(36):13368–73. DOI: 10.1073/pnas.0403453101
- 8 EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):347–57. DOI: 10.1038/nrd3978
- 9 Sharma S., Dasgupta A., Singh A.K. Clinical relevance of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Med*. 2019;8(10):1670. DOI: 10.3390/jcm8101670
- 10 Tian Y., Li S., Song J., Ji T., Zhu M., Anderson G.J., et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*. 2014;35(7):2383–90. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.083
- 11 Xin H., Li Y., Buller B., Katakowski M., Zhang Y., Wang X., et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*. 2012;30(7):1556–64. DOI: 10.1002/stem.1129
- 12 Watson D.C., Bayik D., Srivatsan A., Bergamaschi C., Valentin A., Niu G., et al. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles. *Biomaterials*. 2016;105(2):195–205. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.003
- 13 Beylerli O., Gareev I., Ilyasova T., Musaev E., Chekhonin V. The Mechanism of Action of Exosomes Derived from Glioblastoma Cells. *Curr Med Chem*. 2025;32(27):5733–59. DOI: 10.2174/0109298673344390241017065119
- 14 Gareev I., Beylerli O., Tamrazov R., Ilyasova T., Shumadalova A., Du W., et al. Methods of miRNA delivery and possibilities of their application in neuro-oncology. *Noncoding RNA Res*. 2023;8(4):661–74. DOI: 10.1016/j.ncrna.2023.10.002
- 15 Gareev I., Beylerli O., Yang G., Sun J., Pavlov V., Izmailov A., et al. The current state of MiRNAs as biomarkers and therapeutic tools. *Clin Exp Med*. 2020;20(3):349–59. DOI: 10.1007/s10238-020-00627-2
- 16 Colombo M., Moita C., van Niel G., Kowal J., Vigneron J., Benaroch P., et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5553–65. DOI: 10.1242/jcs.128868
- 17 Baietti M.F., Zhang Z., Mortier E., Melchior A., Degeest G., Geeraerts A., et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(7):677–85. DOI: 10.1038/ncb2502
- 18 Hsu C., Morohashi Y., Yoshimura S., Manrique-Hoyos N., Jung S., Lauterbach M.A., et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J Cell Biol*. 2010;189(2):223–32. DOI: 10.1083/jcb.200911018
- 19 Cocucci E., Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*. 2015;25(6):364–72. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.01.004
- 20 Muralidharan-Chari V., Clancy J.W., Sedgwick A., et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 10):1603–11. DOI: 10.1242/jcs.064386
- 21 Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S., Fangel I., Raposo G., Savina A., et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19–30; sup pp 1–13. DOI: 10.1038/ncb2000
- 22 Skotland T., Sandvig K., Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res*. 2017;66:30–41. DOI: 10.1016/j.plipres.2017.03.001
- 23 Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30
- 24 Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977
- 25 Xu R., Rai A., Chen M., Suwakulsiri W., Greening D.W., Simpson R.J. Extracellular vesicles in cancer – implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(10):617–38. DOI: 10.1038/s41571-018-0036-9
- 26 Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470–6. DOI: 10.1038/ncb1800

- 27 Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulo-lytes. *J Cell Biol.* 1983;97(2):329–39. DOI: 10.1083/jcb.97.2.329
- 28 Гареев И.Ф., Бейлерли О.А., Zhao Sh., Yang G., Sun J., Бейлерли А.Т., Сафин Ш.М. Экстракция экзосом из плазмы крови пациентов с мультиформной глиобластомой. *Креативная хирургия и онкология.* 2019;9(3):234–8. DOI: 10.24060/2076-3093-2019-9-3-234-238  
Gareev I.F., Beylerli O.A., Zhao Sh., Yang G., Sun J., Beilerli A.T., Safin Sh.M. Extraction of Exosomes from Glioblastoma Multiforme Patients' Blood Plasma. *Creative surgery and oncology.* 2019;9(3):234–8 (In Russ.). DOI: 10.24060/2076-3093-2019-9-3-234-238
- 29 Zhang Q., Jeppesen D.K., Higginbotham J.N., Franklin J.L., Coffey R.J. Comprehensive isolation of extracellular vesicles and nanoparticles. *Nat Protoc.* 2023;18(5):1462–87. DOI: 10.1038/s41596-023-00811-0
- 30 Stam J., Bartel S., Bischoff R., Wolters J.C. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021;1169:122604. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122604
- 31 Arifin D.R., Witwer K.W., Bulte J.W.M. Non-Invasive imaging of extracellular vesicles: Quo vaditis *in vivo*? *J Extracell Vesicles.* 2022;11(7):e12241. DOI: 10.1002/jev2.12241. Erratum in: *J Extracell Vesicles.* 2022;11(12):e12284. DOI: 10.1002/jev2.12284
- 32 Malenica M., Vukomanović M., Kurtjak M., Masciotti V., Dal Zilio S., Greco S., et al. Perspectives of microscopy methods for morphology characterisation of extracellular vesicles from human biofluids. *Biomedicines.* 2021;9(6):603. DOI: 10.3390/biomedicines9060603
- 33 Giebel B., Helmbrecht C. Methods to analyze EVs. *Methods Mol Biol.* 2017;1545:1–20. DOI: 10.1007/978-1-4939-6728-5\_1
- 34 Jiang A., Nie W., Xie H.Y. In vivo imaging for the visualization of extracellular vesicle-based tumor therapy. *ChemistryOpen.* 2022;11(9):e202200124. DOI: 10.1002/open.202200124
- 35 Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1153. DOI: 10.3390/ijms18061153
- 36 Imbrosci B., Schmitz D., Orlando M. Automated detection and localization of synaptic vesicles in electron microscopy images. *eNeuro.* 2022;9(1):ENEURO.0400-20.2021. DOI: 10.1523/ENEURO.0400-20.2021. Erratum in: *eNeuro.* 2022;9(2):ENEURO.0123-22.2022. DOI: 10.1523/ENEURO.0123-22.2022
- 37 Isogai T., Hirotsawa K.M., Suzuki K.G.N. Recent advancements in imaging techniques for individual extracellular vesicles. *Molecules.* 2024;29(24):5828. DOI: 10.3390/molecules29245828
- 38 Arasu U.T., Härkönen K., Koistinen A., Rilla K. Correlative light and electron microscopy is a powerful tool to study interactions of extracellular vesicles with recipient cells. *Exp Cell Res.* 2019;376(2):149–58. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.02.004
- 39 Chambers M.G., McNamara R.P., Dittmer D.P. Direct stochastic optical reconstruction microscopy of extracellular vesicles in three dimensions. *J Vis Exp.* 2021;(174). DOI: 10.3791/62845
- 40 Noble J.M., Roberts L.M., Vidavsky N., Chiou A.E., Fischbach C., Paszek M.J., et al. Direct comparison of optical and electron microscopy methods for structural characterization of extracellular vesicles. *J Struct Biol.* 2020;210(1):107474. DOI: 10.1016/j.jsb.2020.107474
- 41 Corona M.L., Hurbain I., Raposo G., van Niel G. Characterization of extracellular vesicles by transmission electron microscopy and immunolabeling electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2023;2668:33–43. DOI: 10.1007/978-1-0716-3203-1\_4
- 42 Agarwal V., Yadav S.S., Kumar S., Mehta N., Talwar G., Qadri J., et al. Evaluating the role of extracellular vesicles as a biomarker under transmission electron microscope in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients. *Urologia.* 2022;89(2):210–5. DOI: 10.1177/03915603211018677
- 43 Fertig E.T., Gherghiceanu M., Popescu L.M. Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography. *J Cell Mol Med.* 2014;18(10):1938–43. DOI: 10.1111/jcmm.12436
- 44 Parker K.A., Ribet S., Kimmel B.R., Dos Reis R., Mrksich M., Dravid V.P. Scanning transmission electron microscopy in a scanning electron microscope for the high-throughput imaging of biological assemblies. *Biomacromolecules.* 2022;23(8):3235–42. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00323
- 45 Perrie Y., Ali H., Kirby D.J., Mohammed A.U., McNeil S.E., Vangala A. Environmental scanning electron microscope imaging of vesicle systems. *Methods Mol Biol.* 2017;1522:131–43. DOI: 10.1007/978-1-4939-6591-5\_11
- 46 Demir Ş., Erdal E., Bagriyanik H.A. Imaging of Isolated Exosomes by Correlative Microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2024;72(3):149–56. DOI: 10.1369/00221554241233346
- 47 Cizmar P., Yuana Y. Detection and characterization of extracellular vesicles by transmission and cryo-transmission electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2017;1660:221–32. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1\_18
- 48 Martínez-Andrade J.M., Salgado-Bautista D., Ramírez-Acosta K., Cadena-Nava R.D., Riquelme M. A practical protocol for correlative confocal fluorescence and transmission electron microscopy characterization of extracellular vesicles. *Microbiol Spectr.* 2025;13(7):e0302624. DOI: 10.1128/spectrum.03026-24
- 49 Pascucci L., Scattini G. Im aging extracellular vesicles by transmission electron microscopy: Coping with technical hurdles and morphological interpretation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2021;1865(4):129648. DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129648
- 50 Catanese S., Burlaud-Gaillard J., Blasco H., Blanchard E., Pisella P.J., Khanna R.K., et al. Rapid identification of extracellular vesicles in basal tears using transmission electron microscopy. *J Fr Ophtalmol.* 2025;48(4):104446. DOI: 10.1016/j.jfo.2025.104446
- 51 Deng X., Xiong F., Li X., Xiang B., Li Z., Wu X., et al. Application of atomic force microscopy in cancer research. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):102. DOI: 10.1186/s12951-018-0428-0
- 52 Liu S., Han Y., Kong L., Wang G., Ye Z. Atomic force microscopy in disease-related studies: Exploring tissue and cell mechanics. *Microsc Res Tech.* 2024;87(4):660–84. DOI: 10.1002/jemt.24471
- 53 Xia F., Youcef-Toumi K. Review: advanced atomic force microscopy modes for biomedical research. *Biosensors (Basel).* 2022;12(12):1116. DOI: 10.3390/bios12121116
- 54 Cascione M., de Matteis V., Rinaldi R., Leporatti S. Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation. *Microsc Res Tech.* 2017;80(1):109–23. DOI: 10.1002/jemt.22696
- 55 Skliar M., Chernyshev V.S. Imaging of extracellular vesicles by atomic force microscopy. *J Vis Exp.* 2019;(151). DOI: 10.3791/59254
- 56 Parisse P., Rago I., Ulloa Severino L., Perissinotto F., Ambrosetti E., Paoletti P., et al. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *Eur Biophys J.* 2017;46(8):813–20. DOI: 10.1007/s00249-017-1252-4
- 57 Kowkabany G., Bao Y. Nanoparticle tracking analysis: an effective tool to characterize extracellular vesicles. *Molecules.* 2024;29(19):4672. DOI: 10.3390/molecules29194672

- 58 Longjohn M.N., Christian S.L. Characterizing extracellular vesicles using nanoparticle-tracking analysis. *Methods Mol Biol.* 2022;2508:353–73. DOI: 10.1007/978-1-0716-2376-3\_23
- 59 Comfort N., Cai K., Bloomquist T.R., Strait M.D., Ferrante A.W. Jr, Baccarelli A.A. Nanoparticle tracking analysis for the quantification and size determination of extracellular Vesicles. *J Vis Exp.* 2021;(169):10.3791/62447. DOI: 10.3791/62447
- 60 Mladenović D., Brealey J., Peacock B., Koort K., Zarovni N. Quantitative fluorescent nanoparticle tracking analysis and nano-flow cytometry enable advanced characterization of single extracellular vesicles. *J Extracell Biol.* 2025;4(1):e70031. DOI: 10.1002/jex2.70031. Erratum in: *J Extracell Biol.* 2025;4(12):e70103. DOI: 10.1002/jex2.70103
- 61 Vestad B., Llorente A., Neurauder A., Phuyal S., Kierulf B., Kierulf P., et al. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *J Extracell Vesicles.* 2017;6(1):1344087. DOI: 10.1080/20013078.2017.1344087
- 62 Midekessa G., Godakumara K., Dissanayake K., Hasan M.M., Reshi Q.U.A., Rincken T., et al. Characterization of extracellular vesicles labelled with a lipophilic dye using fluorescence nanoparticle tracking analysis. *Membranes (Basel).* 2021;11(10):779. DOI: 10.3390/membranes11100779

**Информация о конфликте интересов.** Конфликт интересов отсутствует.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Информация о спонсорстве.** Данная работа не финансировалась.

**Sponsorship data.** This work is not funded.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Author contributions.** The authors contributed equally to this article.