ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ЦИТОХАЛАЗИНА В ИЗ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА HEK293

М.О. Гомзикова, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Investigating the properties of membrane vesicles obtained from human cells HEK293 using cytochalasin B

M.O. Gomzikova, A.A. Rizvanov
Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Получение мембранных везикул из клеток человека с помощью цитохалазина В позволяет преодолеть ограничения естественных микровезикул клеток человека, связанные со сложной процедурой выделения и ограниченным выходом. Мембранные везикулы (МВ), полученные из клеток человека, являются перспективным вектором для доставки различных биологически активных веществ. Нами проведено получение МВ из клеток человека HEK293 с помощью цитохалазина В, исследование размера МВ, а также оценка влияния концентрации наносимых МВ и концентрации загруженного в МВ вещества на эффективность доставки в клетки-реципиенты. Было установлено, что размер МВ варьирует от 164,2 нм до 3580 нм, с пиком в области от 164,2 нм до 712,4 нм. МВ способны заключать внутри себя цитоплазматическое содержимое исходной клетки и переносить заключенные молекулы клеткам-реципиентам, при этом количество доставляемого в клетку-реципиента вещества (CFDA SE) пропорционально загрузке вещества в МВ.

Ключевые слова: микровезикулы, мембранные везикулы, цитохалазин В.

The preparation method of membrane vesicles from human cells using cytochalasin B allows to overcome the limitations of human cells natural microvesicles, associated with the complex procedure of isolation and limited output. Membrane vesicles (MV) prepared from human cells are a promising vector for delivering of various bioactive substances. We performed the preparation of MV from human cells HEK293 using cytochalasin B and size determination of the MV. Then we studied the influence of applied MV concentration and intravesicular substance concentration on the substance delivery effectiveness to recipient cells. It was found that MV ranging in size from 164,2 nm to 3580 nm, but the most of MV sized from 164,2 nm to 712,4 nm (84.6%). MV are able to enclose the cytoplasmic contents of the parent cells and deliver it to recipient cells, the amount of delivered substance (CFDA SE) to the recipient cells is proportional to the loaded substances into MV.

Keywords: microvesicles, membrane vesicles, cytochalasin B.

Введение

Развитие методов молекулярной биологии позволило исследовать основу многих патологических процессов. В результате многие современные способы терапии направлены на устранение причины заболевания на молекулярном уровне. Так как введение биологически активных веществ пациенту в чистом виде оказалось не достаточно эффективной стратегией, например, период полураспада ДНК в сыворотке крови составляет до 10 мин. [1], возникла необходимость развития систем для доставки биоактивных молекул или лекарств, то есть векторов.

Вектор должен отвечать нескольким критериям: 1) быть безопасным; 2) обладать низкой иммуногенностью; 3) иметь определенное стандартное время циркуляции, которое зависит от распознавания и удаления иммунной системой организма; 4) обладать выраженной эффективностью доставки.

Известно, что несмотря на то, что наиболее эффективными векторами являются вирусы, существуют ограничения использования данных векторов в медицинской практике, связанные с онкогенностью (характерно для семейства ретровирусов) и иммуногенностью [2–3]. Для того, чтобы избежать активации иммунной системы, были разработаны векторы, окруженные оболочкой, имитирующей клеточную мембрану (например, липосомы), а также векторы на основе клеток человека («тени эритроцитов») [4]. Липосомы — микроскопические частицы, оболочка которых состоит из фосфолипидного бислоя, подобного мембране клеток. Однако применение липосом остается ограниченным, так как воссоздание молекулярной асимметрии слоев мембраны, которая играет важную биологическую роль, невозможно из-за постоянного уравновешивания липидных компонентов в липосомах [4], в результате чего они распознаются и удаляются иммунной системой пациента [5]. Кроме того, липосомы обычно не содержат в своем составе мембранные белки, необходимые для естественного взаимодействия с клетками организма. «Тени эритроцитов» — красные кровяные клетки, освобожденные от цитоплазматического содержимого. Лекарство загружают путем инкубации теней эритроцитов в гипотоническом растворе, содержащем лекарство [6]. Однако для данного вектора характерна невысокая эффективность целевой доставки. А так как зрелые эритроциты не содержат ядра, практически невозможно осуществить генетическую модификацию с целью экспрессии специфичных поверхностных рецепторов [3]. Поскольку каждый из вышеперечисленных векторов обладает недостатками, ограничивающими его применение, наряду с усовершенствованием имеющихся продолжается поиск новых инструментов терапии.

Внимание исследователей приковывают естественные образования клеток человека — микровезикулы. Микровезикулы — это окруженные мембраной везикулы размером 100–1000 нм, отделяющиеся от цитоплазматической мембраны клетки и заключающие в себе цитозольные компоненты клетки, которые образуются в результате нормальной жизнедеятельности клеток как in vivo, так и в культуре клеток in vitro [7]. Поскольку микровезикулы опосредуют межклеточную коммуникацию в организме

e-mail: Albert.Rizvanov@kpfu.ru

человека, использование их в качестве вектора для доставки необходимых веществ представляется весьма перспективным. Однако в настоящее время процедура получения микровезикул клеток человека достаточно сложна, а количество получаемых микровезикул ограничено и не достаточно для терапевтического применения [8].

H. Pick и соавт. (2005) описали способ получения мембранных везикул из клеток, обработанных цитохалазином B, с целью создания адекватной уменьшенной модели для изучения функционирования мембранных рецепторов и клеточного сигналинга [9]. Под действием цитохалазина B происходит разрушение связей цитоскелета с ЦПМ [10–12]. Данный способ прост в осуществлении и позволяет получать мембранные везикулы в большом количестве. Это позволяет обойти ограничения, связанные с использованием в качестве вектора естественных микровезикул, сохраняя при этом все преимущества везикулярной векторной системы. То есть содержимое везикул оказывается защищено от деградации внеклеточными ферментами цитоплазматической мембраной (ЦПМ), которая липидным составом и поверхностными рецепторами повторяет ЦПМ клетки-родителя и, следовательно, является неиммуногенной, а также обеспечивает целевую доставку содержимого везикул. Недавно Z. Mao и соавт. (2011) предложили использовать мембранные везикулы, полученные от клеток, обработанных цитохалазином B, в качестве векторов для упаковывания лекарств и наночастиц [13]. Таким образом, мембранные везикулы, полученные из клеток человека, обработанных цитохалазином B, могут стать перспективным инструментом терапии.

В этой связи целью нашей работы явилась характеристика мембранных везикул, полученных из модельных клеток человека HEK293, обработанных цитохалазином B, а также оценка влияния концентрации наносимых МВ, концентрации загруженного в МВ вещества на эффективность доставки в клетки-реципиенты.

Материал и методы

Культура клеток HEK293

Работы с культурами клеток проводили в стерильном ламинарном боксе с соблюдением правил работы в лаборатории II класса биобезопасности. Клетки линии HEK293 (ATTC, CRL-3216) культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium) (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma-Aldrich, США) и 2мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия). Клетки инкубировали при +37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Пересев осуществляли с помощью 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Sigma, США) при достижении клетками плотности монослоя 90%.

Окраска клеток красителем карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил эфиром (CFDASE)

Карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидил эфир (англ. carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) — соединение, которое свободно проникает в клетку, в цитоплазме подвергается отщеплению ацетатных групп и превращению в карбоксифлуоресцеин сукцинимидил эфир (CFSE — carboxyfluorescein succinimidyl ester), обладающий флуоресценцией. CFSE, в свою очередь, ковалентно связывается с аминогруппами внутриклеточных молекул, в результате чего соединение способно оставаться в живой клетке долгое время и не способно пассивно вытекать и окрашивать соседние клетки (eBioscience, США).

Стоковый раствор красителя растворяли в среде DMEM (ПанЭко, Россия) без сыворотки для получения раствора с рабочей концентрацией красителя — 2,5 мкМ или 10 мкМ CFDA SE. Инкубировали клетки в течение 20 мин. при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. После инкубации добавляли к клеткам 4 объема полной среды DMEM (ПанЭко, Россия), инкубировали клетки на льду в течение 5 мин., затем отмывали клетки с помощью полной среды DMEM трижды.

Получение мембранных везикул

Получение мембранных везикул (МВ) из культуры клеток HEK293 осуществляли согласно протоколу Z. Mao и соавт. с модификациями [13]. При достижении культурой клеток плотности монослоя 90%, отбирали питательную среду, дважды промывали культуру с помощью фосфатно-солевого буфера (ФСБ) от остатков среды. Клетки отделяли от субстрата с помощью 0,25% раствора трипсина-ЭДТА, затем отмывали клетки с помощью ФСБ. Инкубировали клетки в DMEM без сыворотки, содержащей 10 мкг/мл цитохалазина B (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин. при +37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO^2. Далее осуществляли серию последовательных центрифугирований: 500 об./мин. 10 мин., супернатант отбирали и центрифугировали 500 об./мин. 20 мин., супернатант отбирали и центрифугировали 3000 об./мин. 25 мин. Осадок, содержащий МВ отмывали большим количеством ФСБ, центрифугировали при 3000об./мин. 25 мин. Полученный осадок МВ использовали далее в работе.

Определение концентрации белка методом бицинхониновой кислоты

Определение концентрации тотального белка МВ осуществляли с помощью коммерческого набора Pierce BCA ProteinAssayKit (ThermoFisherScientific, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Нанесение МВ в культуру клеток-реципиентов

Полученную фракцию МВ наносили на клетки-реципиенты HEK293 в четырех различных концентрациях белка (15,62 мкг/мл; 62,5 мкг/мл; 125 мкг/мл и 250 мкг/мл). Осуществляли посев клеток-реципиентов на 96-луночный планшет в количестве 2×10^4 клеток на лунку, через 24 ч. наносили МВ в определенной концентрации. Инкубирование клеток-реципиентов с МВ осуществляли в течение 24 ч. Так как CFDA SE не способен пассивно вытекать, передача клеткам-реципиентам красителя и сообщение им флуоресценции возможна только посредством МВ. Через 24 ч. проводили анализ методом проточной цитофлуориметрии. В качестве отрицательного контроля с целью определения фонового значения флуоресценции были использованы клетки-реципиенты HEK293, которые инкубировали также в течение 24 ч. с МВ, предварительно разрушенными ультразвуком.

Проточная цитофлуориметрия

Для оценки эффективности передачи содержимого МВ клеткам-реципиентам, определяли долю клеток, обладающих зеленой флуоресценцией. Для этого клетки-реципиенты через 24 ч. инкубирования с МВ снимали с культурального флакона с помощью 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США) и промывали ФСБ дважды. Известно, что трипсин разрушающе воздействует на поверхностные молекулы адгезии и рецепторы [14], поэтому открепление клеток трипсином позволяет одновременно отмыть клетки от адгезировавшихся, но не слившихся на их поверхности МВ. Анализ осуществляли на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8HT (Millipore, США). Для того, чтобы при анализе клеточной популяции не учитывать вклад везикул и/или агрегатов МВ в значение флуоресценции, на графике бокового светорассеивания (Side Scatter) против прямого светорассеивания (Forward Scatter) выделяли регионом (gate) только популяцию клеток, которая по размерам значительно крупнее МВ.

Результаты и обсуждение

Цитохалазин В представляет собой легкопроницаемый в клетку животного микотоксин [15]. Цитохалазин В воздействует на актиновые микрофиламенты, которые являются основным компонентом цитоскелета клетки, ингибируя их полимеризацию, взаимодействие с образованием сети, а также вызывает дестабилизацию цитоскелет-мембранных взаимодействий [10–12]. В результате воздействия цитохалазина В в концентрации 10 мкг/мл на культуру клеток HEK293, наблюдалась потеря клетками формы и округление.

После обработки клеток цитохалазином В и применения к ним механического воздействия, образуется гетерогенная система, которую разделяют пропорционально массе последовательным центрифугированием [13]. Предварительно клетки HEK293 были окрашены красителем CFDASE (eBioscience, США). МВ, полученные от окрашенных клеток HEK293, также обладали флуоресценцией, что свидетельствует о заключении цитоплазматического содержимого клетки-родителя внутри МВ и о целостности окружающей их ЦПМ (рис. 1). При этом окрашивание мембранопроницаемым красителем, связывающимся с двухцепочечной ДНК – Hoechst 33342, не выявило наличия клеточных ядер во фракции МВ (рис. 1). Таким образом, последний этап центрифугирования позволяет получить фракцию мембранных везикул, которая, согласно данным флуоресцентной микроскопии, свободна от клеток, ядер и крупных фрагментов клеток.

Однако микрофотографии фракции мембранных везикул не позволили точно определить диаметр большей части везикул, что связано с ограниченной разрешающей способностью флуоресцентного микроскопа. Так как длина волны видимого света составляет 390–700 нм, везикулы менее 390 нм в диаметре нельзя различить четко [16]. Поэтому с целью определения размера полученных МВ, мы использовали ZetasizerNano ZS (Malvern, UK) – прибор, обладающий разрешающей способностью 0,3 нм – 10 мкМ. Определение размера частиц и молекул основано на измерении динамического рассеяния света частицами в анализируемом образце. Измерение фракции МВ производилось в ФСБ в трех повторностях, кривые распределения МВ по размерам представлены на рис. 2А. Согласно полученным нами данным, размер МВ варьирует от 164,2 нм (0,65% везикул) до 3580 нм (0,1% везикул) (рис. 2Б). С двумя пиками в областях: от 825 нм до 3580 нм (в сумме 15,4% везикул) и основной пик – от 164,2 нм до 712,4 нм (в сумме 84,6% везикул). То есть полученная фракция МВ содержит нано- и микровезикулы, размер которых сопоставим с размером естественных микровезикул клеток человека. Это свидетельствует в пользу перспективности применения МВ, получаемых из клеток, обработанных цитохалазином В, в качестве векторной системы.

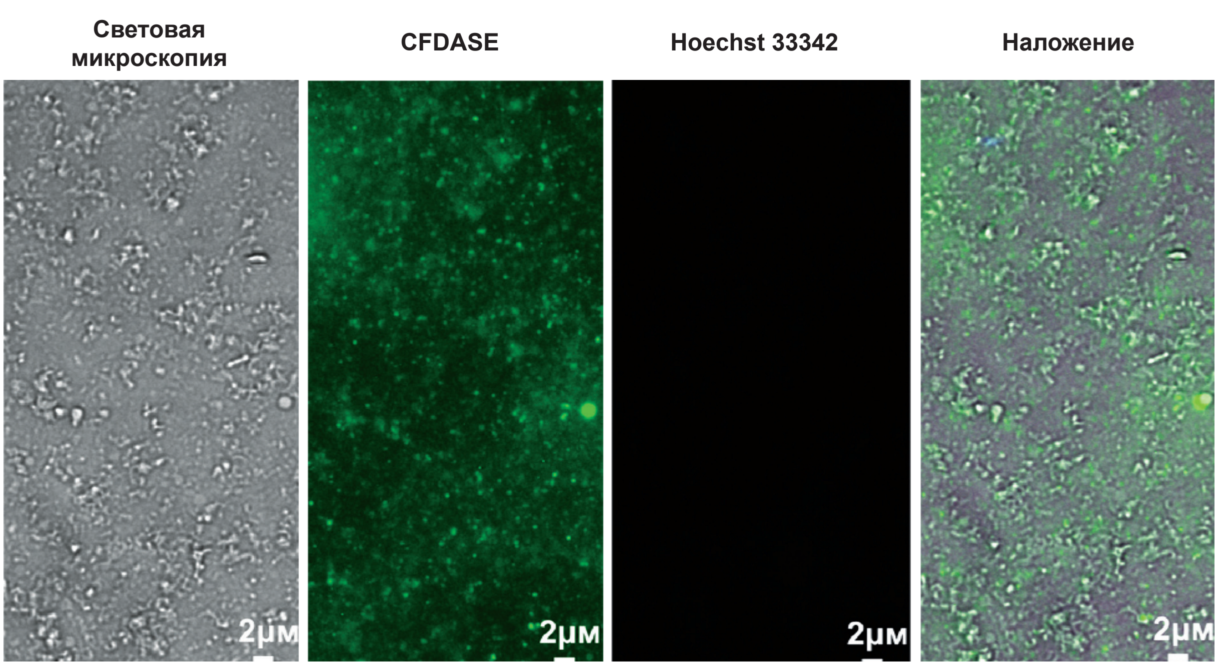

Рис. 1. Суспензия МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных красителями CFDASE и Hoechst 33342. Ув. ×63

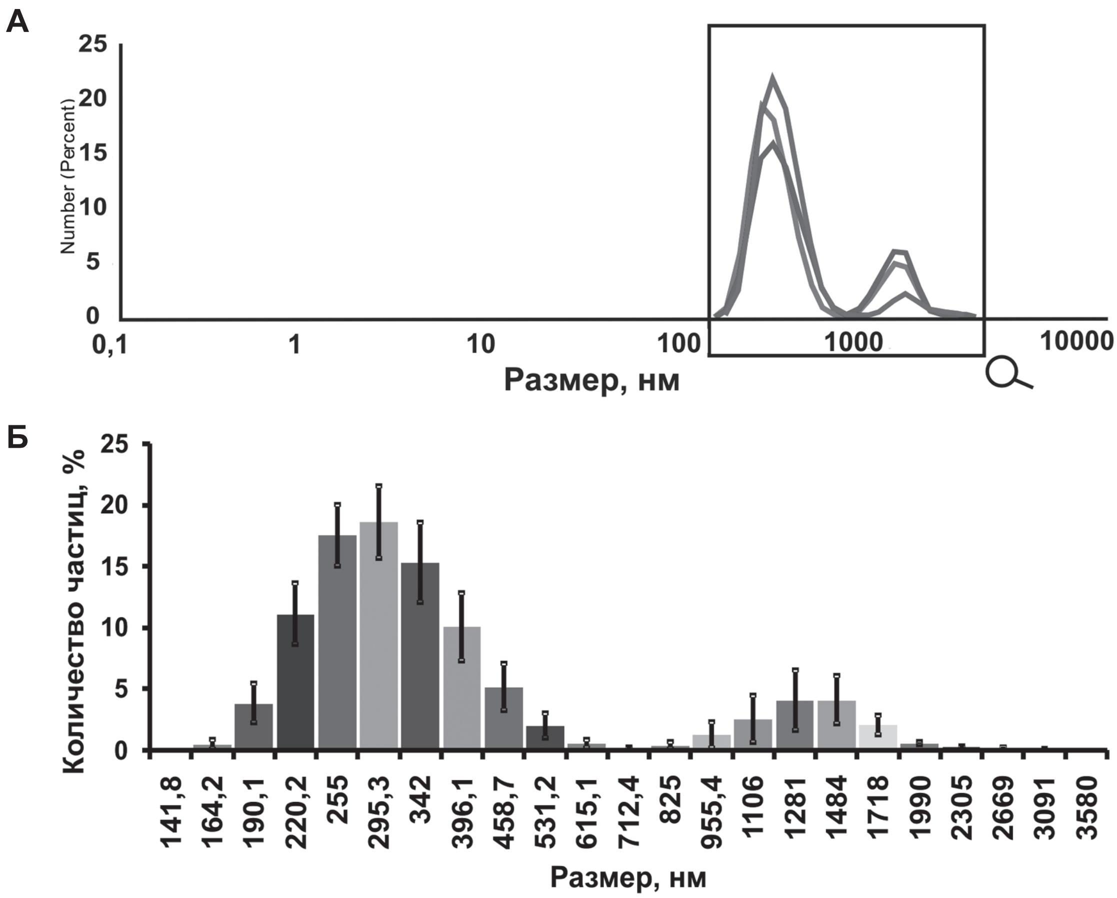

Рис. 2. Распределение МВ по размерам, полученное с помощью ZetasizerNano ZS (Malvern, UK) (А); гистограмма, отражающая размер и процентное соотношение МВ (Б)

Кроме того, было показано, что МВ, полученные с помощью цитохалазина B, способны к слиянию и доставке содержимого в клетку-реципиента [13]. Однако факторы, влияющие на эффективность доставки, до сих пор исследованы не были. В этой связи мы оценили влияние концентрации наносимых МВ и концентрации загруженного в МВ вещества на эффективность доставки в клетки-реципиенты. Согласно представленным данным с увеличением концентрации МВ происходит увеличение количества клеток, обладающих зеленой флуоресценцией (далее CFDA$^+$-клетки) (рис. 3). Вероятно, это обусловлено несколькими причинами: во-первых, чем больше концентрация МВ, тем выше вероятность встречи МВ с клетками; во-вторых, чем больше концентрация МВ, тем больше красителя они вносят в клетки-реципиента и тем больший процент клеток переходит порог детектируемости и регистрируется прибором, как CFDA$^+$-клетки.

При инкубации клеток HEK293 с одинаковой концентрацией МВ, но полученных от клеток HEK293, окрашенных разной концентрацией красителя CFDA SE (2,5 мкМ и 10 мкМ), мы наблюдали небольшие различия в количестве CFDA$^+$-клеток. Хотя при инкубации клеток-реципиентов с 250 и 125 мкг/мл МВ эти отличия статистически не значимы, с концентрации МВ в 62,5 мкг/мл происходит разрыв в соотношении CFDA$^+$-клеток между МВ, полученными от клеток HEK293, окрашенными CFDA SE в концентрации 2,5 мкМ и 10 мкМ (рис. 3).

Мы предположили, что чем выше концентрация красителя в МВ, тем больше клеток-реципиентов перейдет порог детектируемости при одной и той же концентрации нанесенных МВ, выраженной в тотальном белке. С целью проверки этого предположения мы сравнили средние интенсивности флуоресценции (Median Fluorescence Intencity — MFI) клеток-реципиентов. Действительно, при нанесении на клетки-

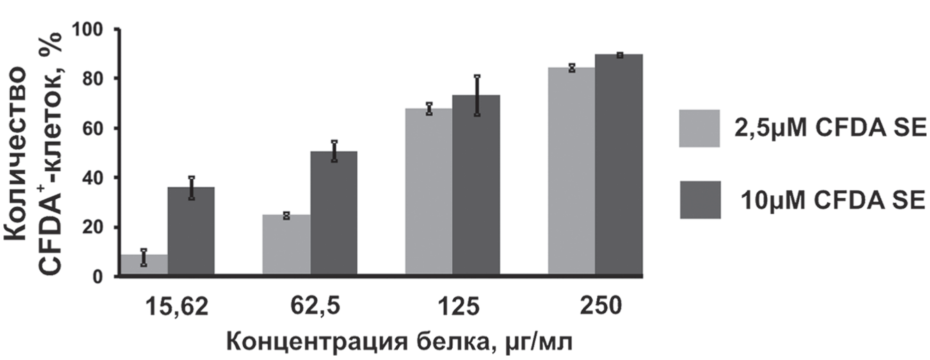

Рис. 3. Соотношение CFDA$^+$-клеток-реципиентов после нанесения разных концентраций МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных 2,5 мкМ и 10 мкМ красителя CFDASE

реципиенты 250 мкг/мл МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных разной концентрацией CFDA SE (2,5 мкМ или 10 мкМ) наблюдается сдвиг пиков относительно друг друга. Пик флуоресценции клеток-реципиентов, на которые были нанесены МВ от клеток HEK293, окрашенных 2,5 мкМ CFDA SE, был ближе к отрицательному контролю, по сравнению с клетками-реципиентами, на которые нанесли МВ от клеток HEK293, окрашенных 10 мкМ CFDA SE (рис. 4А). Это свидетельствует о том, что при одной и той же концентрации МВ, в клетки-реципиенты было внесено в среднем в 4,1 раза меньше красителя в случае МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных 2,5 мкМ CFDA SE, чем в случае МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных 10 мкМ CFDA SE (рис. 4Б). При нанесении 62,5 и 15,62 мкг/мл МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных 2,5 мкМ CFDA SE, средняя интенсивность флуоресценции становится низкой и пик оказывается сильно сдвинут в сторону отрицательного контроля, что обуславливает наблюдаемый разрыв в соотношении $CFDA^{+}$-клеток между МВ, полученными от клеток HEK293, окрашенными CFDA SE в разных концентрациях — 2,5 мкМ и 10 мкМ (рис. 3).

Таким образом, МВ, полученные из клеток человека с помощью цитохалазина В, способны заключать внутри себя цитоплазматическое содержимое исходной клетки и переносить заключенные молекулы клеткам-реципиентам. При этом согласно полученным данным количество доставленных в клетку-реципиента веществ пропорционально концентрации загруженных в МВ.

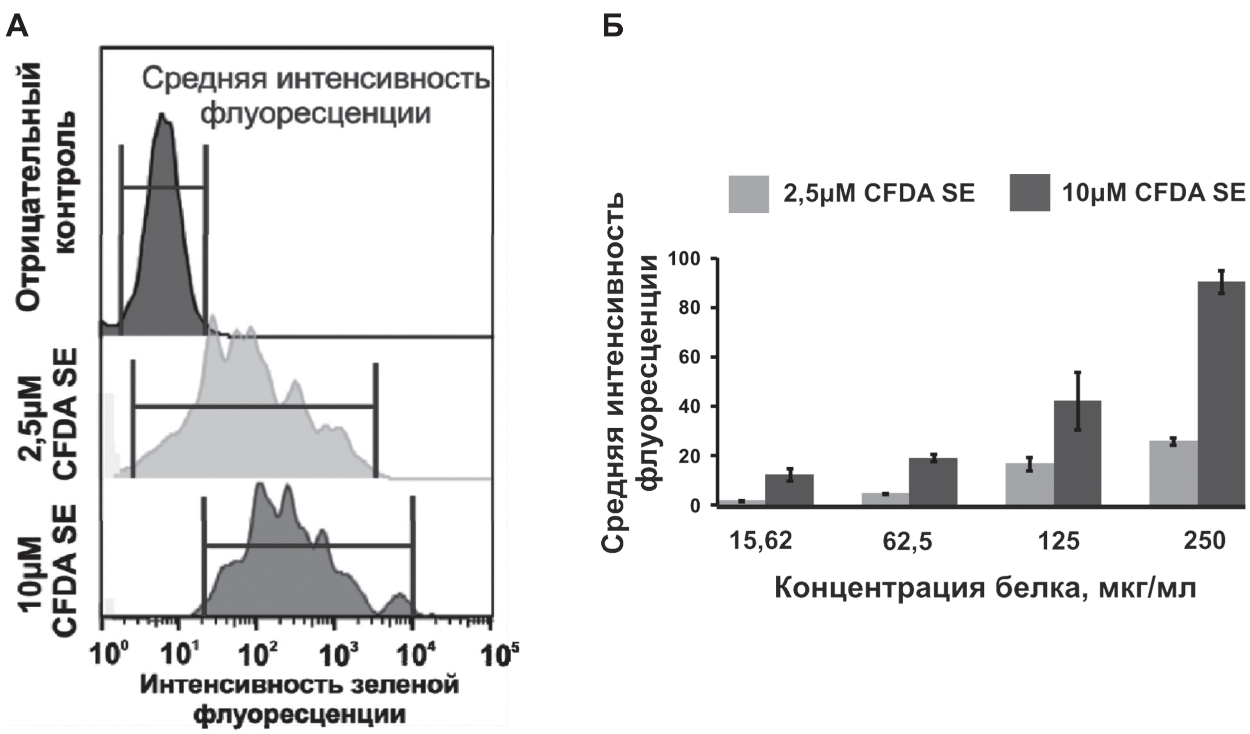

Рис. 4. Средняя интенсивность флуоресценции $CFDA^{+}$-клеток-реципиентов после нанесения разных концентраций МВ, полученных от клеток HEK293, окрашенных 2,5 мкМ и 10 мкМ красителя CFDA SE:
А — качественное сравнение, Б — количественное сравнение

Заключение

Мембранные везикулы клеток человека являются перспективным вектором для доставки различных биологически активных веществ, так как обладают безопасностью (не способны к делению, не токсичны), низкой иммуногенностью (особенно, если МВ получены из аутогенных клеток человека) и, благодаря тому, что несут на своей поверхности рецепторы родительской клетки, способны к эффективному взаимодействию с клетками-реципиентами. Метод получения мембранных везикул клеток человека с помощью цитохалазина В благодаря своей простоте реализации и большому выходу МВ применим в биомедицинской практике.

Можно предположить, что помимо доставки лекарственных средств, МВ, полученные от нативных и генетически модифицированных клеток, могут быть использованы в регенеративной медицине.

Благодарности

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Анализы выполнены в лаборатории лазерной конфокальной микроскопии Междисциплинарного центра аналитической микроскопии на приборе LSM 780 компании CARL ZEISS. Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kawabata K., Takakura Y., Hashida M. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. Pharm. Res. 1995; 12(VI): 825-30.
2. Nayerossadat N., Maedeh T., Ali P.A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Adv. Biomed. Res. 2012; 1: 27.
3. Seow Y., Wood M.J. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. Mol. Ther. 2009; 17(V): 767-77.
4. Wu H., Oliver A.E., Ngassam V.N. et al. Preparation, characterization, and surface immobilization of native vesicles obtained by mechanical extrusion of mammalian cells. Integr. Biol. (Camb). 2012; 4(VI): 685-92.
5. Semple S.C., Troy O.H., Kathy A.C. et al. Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005; 312(III): 1020-6.
6. Byun H.M., Suh D., Yoon H., et al. Erythrocyte ghost-mediated gene delivery for prolonged and blood-targeted expression. Gene. Ther. 2004; 11(V): 492-6.
7. Гомзикова М.О., Гайфуллина Р.Ф., Мустафин И.Г. и др. Мембранные микровезикулы: биологические свойства и участие в патогенезе заболеваний. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013; 8(I): 6-11.
8. Biancone L., Bruno S., Deregibus M.C. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. Nephrol Dial Transplant. 2012; 27(VIII): 3037-42.
9. Pick H., Schmid E.L., Tairi A.P. et al. Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles. J. Am. Chem. Soc. 2005; 127(IX): 2908-12.
10. Phillips M.J., Oda M., Yousef I.M. et al. Effects of cytochalasin B on membrane-associated microfilaments in a cell-free system. J. Cell. Biol. 1981; 91(2): 524-30.
11. MacLean-Fletcher S., Pollard T.D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. Cell. 1980; 20(II): 329-41.
12. Wendel H., Dancker P., Kinetics of actin depolymerization: influence of ions, temperature, age of F-actin, cytochalasin B and phalloidin. Biochim. Biophys. Acta. 1986; 873(III): 387-96.
13. Mao Z., Cartier R., Hohl A. et al. Cells as factories for humanized encapsulation. Nano Lett. 2011; 11(V): 2152-6.
14. Zhang B., Shan H., Li D. et al. Different methods of detaching adherent cells significantly affect the detection of TRAIL receptors. Tumori. 2012; 98(VI): 800-3.
15. Carter S.B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. Nature. 1967; 213(5073): 261-4.
16. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. J. Extracell. Vesicles. 2014; 3.

Поступила: 23.09.2015