

УДК 577.32

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ МИКРОВЕЗИКУЛ В КЛЕТКЕ МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСПЕТРОСКОПИИ

© 2024 г. Е. Д. Белицкая^{a, b, *}, Е. В. Сливка^a, В. А. Олейников^{a, b}, А. В. Залыгин^{a, b}

^aИнститут биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
улица Миклухо-Маклая, д. 16/10, ГСП-7, Москва, 117997 Российская Федерация

^bНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”,
Каширское шоссе, 31, Москва, 115409 Российская Федерация

*E-mail: belitskayakatya@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 07.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

В работе представлены первые результаты серии экспериментов по изучению механизма связывания микровезикул с адресной клеткой с помощью метода сканирующей флуоресцентной конфокальной микроскопии. Разработан новый подход для визуализации проникновения микровезикул в клетку.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, флуоресцентная микроспектроскопия

DOI: 10.56304/S2079562924050063

ВВЕДЕНИЕ

Микровезикулы (МВ) и экзосомы — это внеклеточные везикулы (ВВ), которые выделяются как прокариотическими, так и эукариотическими клетками. Они играют важную роль в коммуникации между клетками и поддержании клеточного гомеостаза. ВВ доставляют биомолекулы не только к соседним клеткам, но и по всему организму [1]. ВВ состоят из липидного бислоя, мРНК, miРНК, белков, липидов, простагландинов и лейкотриенов [2]. Экзосомы генерируются в мультивезикулярных тельцах внутри клетки и секретируются во внеклеточное пространство, когда мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной клетки. Микровезикулы же отпочковываются участка плазматической мембраны [3, 4]. ВВ не доступны для попадания ферментов клеток [5], что важно для сохранности биомолекул, вводимых для доставки в клетку-адресат. Введение в состав мембраны ВВ молекул-векторов, узнаваемых рецепторами клетки-адресата, в совокупности с сохранностью содержимого делает ВВ перспективными средствами доставки при таргетной терапии. ВВ имеют ряд преимуществ перед макромолекулами, так как они стабильны и не разлагаются при циркуляции внутри органов и тканей, в отличие от деградирующих в этих условиях антител и РНК, а также легко проникают че-

рез гематоэнцефалический барьер и через слизистую оболочку кишечника [6].

В настоящее время существует проблема понимания взаимодействия МВ с клеткой-адресатом. Необходимо идентифицировать точное месторасположение и время доставки МВ до клеток, а также понять, какие механизмы управляют этим взаимодействием. Существуют исследования, в которых применялся метод флуоресцентной микроспектроскопии для изучения различных биологических объектов. В работе [7] исследовалось взаимодействие наночастиц на основе пористого кремния с клетками рака толстой кишки и кардиомиобластовыми клетками методом флуоресцентной микроскопии. Актиновые нити цитоскелета и исследуемые наночастицы имели разные пики флуоресценции, что позволило различать их местоположение. Результаты показали, что поглощение наночастиц может быть легко обнаружено с помощью флуоресцентной микроспектроскопии. До настоящего времени не было проведено исследования, использующее данный метод для изучения взаимодействия микровезикул с адресными клетками.

В данной работе была разработана методика, которая позволяет визуализировать происходящие процессы взаимодействия микровезикул и клеток, основываясь на явлении флуоресценции. При перемещении фокальной плоскости по оси аппли-

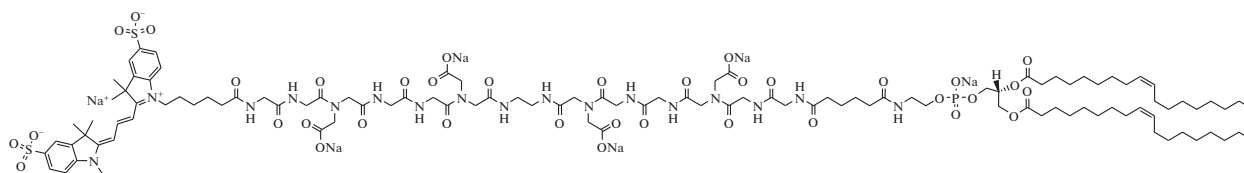


Рис. 1. Структурная формула синтетического конструктора sulfo-Cy3-CMG2-DOPE.

кат можно увидеть распределение окрашенных микровезикул во всем объеме адресной клетки.

Флуоресцентная микроскопия — метод получения изображения, при котором используется люминесценция возбужденных атомов и молекул образца [8]. Флуоресценцией обладают разнообразные молекулы и на спектральные свойства флуорофоров влияет целый ряд факторов и процессов, делающий флуоресцентную микроскопию полезным методом для изучения биологических объектов позволяющим получить информацию о структуре организованных молекулярных систем [9].

В молекулярной биофизике конфокальный режим флуоресцентного спектрометра используется для изучения трехмерной структуры биологических объектов, таких как клетки, ткани и органы. Сканирующая флуоресцентная конфокальная микроспектроскопия при правильном выборе длины волны возбуждения и соответствующих флуоресцентных красителей для МВ и гликокаликса клеток позволит селективно получать информацию о размерах и форме этих клеток, а также о механизмах прохождения МВ через слой гликокаликса адресных клеток [10]. Наличие в конструкции используемого спектрометра широкого диапазона длин волн возбуждения позволяет работать с различными флуоресцентными метками, что даст возможность визуализировать пространственное распределение нескольких окрашенных объектов [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовался конфокальный флуоресцентный спектрометр Renishaw Raman InVia Qontor microscope, который позволяет получать спектры флуоресценции с высокой пространственной разрешающей способностью, так как лазерное излучение фокусируется только на очень маленькую область поверхности образца. Это дает возможность исследовать микроскопические детали структуры образца.

Микровезикулы (МВ) выделены из супернатанта нативных клеток EA.hy 926 ультрацентрифугированием при 14000 g в течение 40 мин при 4°C. Далее МВ отмывали дважды PBS встраивали sulfo-Cy3-CMG2-DOPE (рис. 1) [12] (конечная концентрация 5 мМ). МВ инкубировали с клетка-

ми EA.hy 926 в течение 40 мин при 37°C в PBS, после чего клетки отмывали дважды PBS центрифугированием при 300 g в течение 3 мин. Подготовленные образцы МВ и клеток после инкубации с МВ были проанализированы на спектрометре Renishaw Raman InVia Qontor microscope. Режим сканирования позволяет визуализировать данные по полученным спектрам флуоресценции и сопоставлять распределение интенсивности флуоресценции с оптическим изображением исследуемых клеток чтобы реконструировать процесс взаимодействия МВ с клетками-адресатами

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение спектров флуоресценции было произведено при длине волны возбуждения 532 нм, мощность возбуждающего излучения на образце составила 2.3 мВт. Измерение проводилось с перемещением фокальной плоскости по высоте, расстояние между двумя соседними точками, в которых проводилось измерение, составило 3.125 мкм. Всего было взято 100 точек (время накопления для каждого измерения составляло 1 с).

Согласно полученным данным, был построен профиль интенсивности максимума пика флуоресценции (на длине волны 569 нм).

На полученном графике было обнаружено два максимума на расстоянии 12.5 мкм друг от друга. Так как размер исследуемых клеток составляет 15–20 мкм, то с учетом деформации в вертикальном направлении можно утверждать, что МВ со встроенным липидом, локализуются, в основном, на поверхности клеточной мембраны.

Измерение флуоресценции образца также проводилось в режиме картирования в конфокальном режиме. На рис. 5а показана схема расположения исследуемой клетки и фокальная плоскость, на которой производились измерения. Фокальная плоскость находилась на полувывоте клетки. Длина волны возбуждения — 532 нм, шаг — 1.5 мкм, размер карты — 16 × 16 точек. Карта строилась по интенсивности пика флуоресценции красителя Cy3 на 569 нм. Всего было построено 6 карт. Расстояние между двумя соседними картами — 5 мкм.

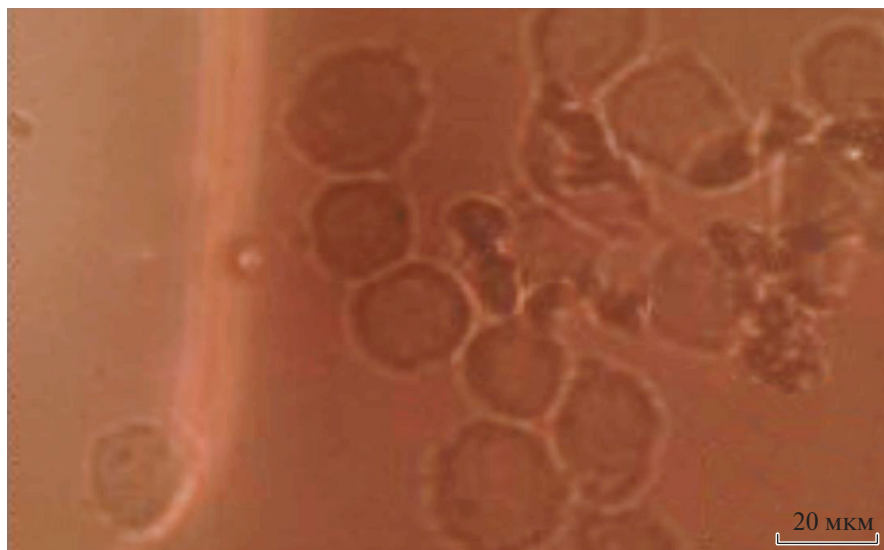


Рис. 2. Оптическое изображение исследуемых клеток.

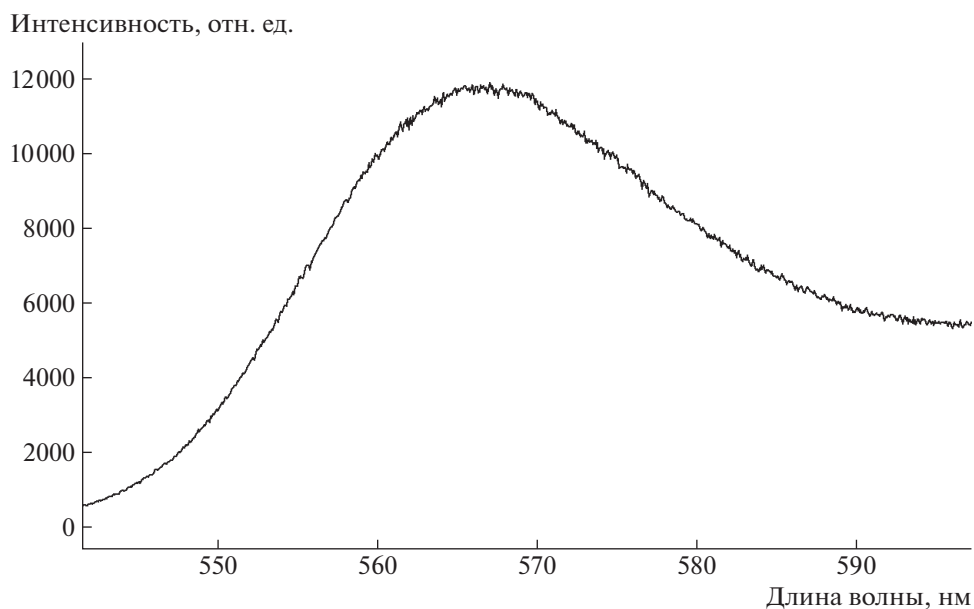


Рис. 3. Спектр флуоресценции при фокусировке на клетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были получены спектры флуоресценции клеток-адресатов, инкубированных с везикулами, содержащими встроенное липидное производное sulfo-Su3-CMG2-DOPE. Данные спектры свидетельствуют о том, что спектр флуоресценции отдельного красителя Су3 соответствует спектру флуоресценции везикул в клетках.

Применение метода сканирующей флуоресцентной конфокальной микроспектроскопии позволяет визуализировать взаимодействие микрове-

зикул с адресными клетками. Согласно полученному графику профиля флуоресценции клетки можно утверждать, что эти микровезикулы со встроенным липидом локализуются на поверхности клеточной мембраны. Были получены также карты сканирующей флуоресцентной конфокальной микроспектроскопии, которые подтвердили, что микровезикулы не проникают внутрь клеток и, предположительно, связываются с некоторыми рецепторами на поверхности клеток. Тип этих рецепторов необходимо будет определить в дальнейших исследованиях. Полученные данные могут быть исполь-

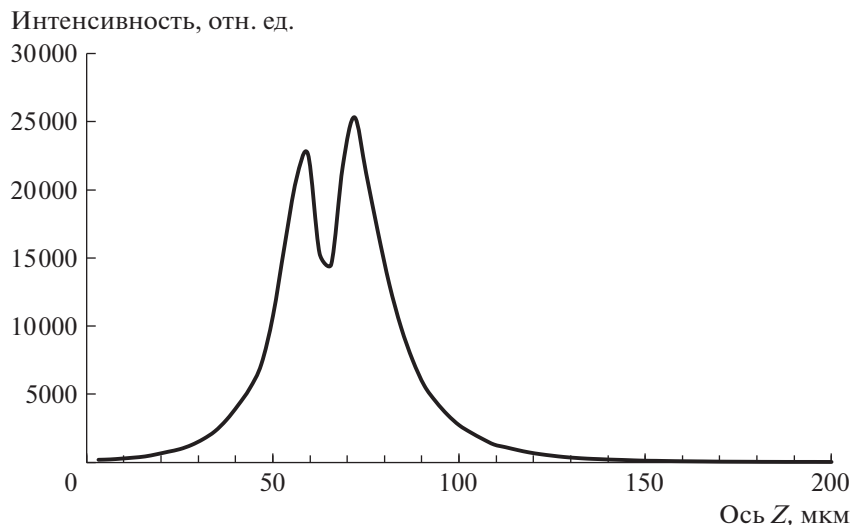


Рис. 4. Профиль интенсивности максимума пика флуоресценции.

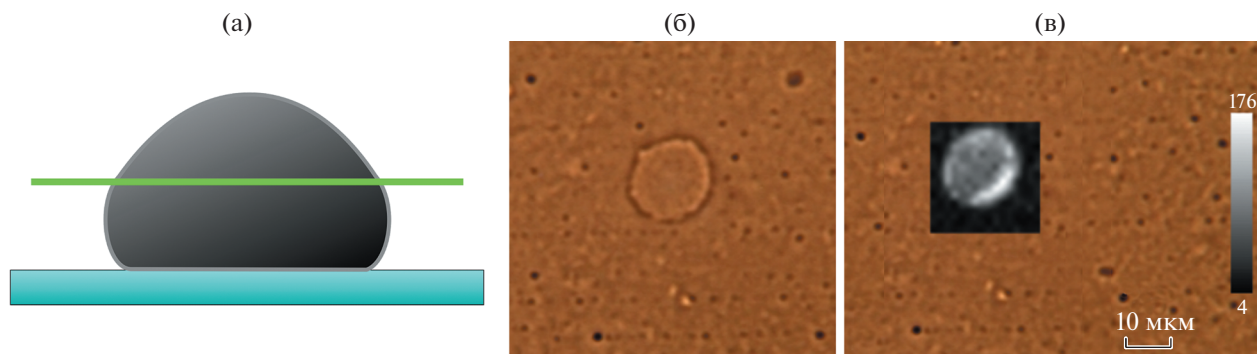


Рис. 5. (а) Схема расположения клетки на предметном стекле и фокальной плоскости; (б) изображение клетки в оптический микроскоп; (в) изображение клетки в оптический микроскоп с наложенной картой распределения интенсивности пика флуоресценции.

зованы для более глубокого изучения механизмов взаимодействия микровезикул с клетками.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-10046).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

- Gill S., Catchpole R., Forterre P. // FEMS Microbiol. Rev. 2019. V. 43 (3). P. 273–303.
- Gretskaya N., Akimov M., Andreev D., Zalygin A., Belitskaya E., Zinchenko G., Fomina-Ageeva E., Mikhalyov I., Vodovozova E., Bezuglov V. // Pharmaceutics. 2023. V. 15 (4). P. 1289.
- Skotland T. et al. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2020. V. 159. P. 308–321.
- Urabe F. et al. // Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 2020. V. 318 (1). P. C29–C39.
- Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R.F. // J. Extracell. Vesicl. 2014. V. 3 (1). P. 24641.
- Chen H., Sun T., Jiang C. // J. Control. Release. 2022. V. 348. P. 572–5896; Jungwirth K., Cejnarova A., Juha L., et al. // Phys. Plasmas. 2001. V. 8. P. 2495
- Tolstik E. et al. // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. P. 962763.
- Lichtman J.W., Conchello J.A. // Nat. Methods. 2005. V. 2 (12). P. 910–919.
- Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2008. Boston: Springer.
- Mochalov K. E., Chistyakov, A.A., Zalygin A.V., Solovyeva, D.O., et al. // Ultramicroscopy. 2017. V. 182. P. 118–123.
- Zalygin A., Solovyeva D., Vaskan I., Henry S., Schaefer M., Volynsky P., Tuzikov A., Korchagina E., Ryzhov I., Nizovtsev A., Mochalov K., Efremov R., Shtykova E., Oleinikov V., Bovin N. // Chem. Open. 2020. V. 9 (6). P. 641–648.
- Vaskan I.S., Prikhodko A.T., Petoukhov M.V., Shtykova E.V., Bovin N.V., Tuzikov A.B., Oleinikov V.A., Zalygin A.V. // Colloids Surf. B. 2023. V. 224. P. 113183.

Research of Localization of Microvesicles in a Cell by Scanning Fluorescent Confocal Microspectroscopy

E. D. Belitskaya^{1, 2, *}, E. V. Slivka¹, V. A. Oleinikov^{1, 2}, and A. V. Zalygin^{1, 2}

¹*Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

²*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia*

**e-mail: belitskayakatya@yandex.ru*

Received June 2, 2023; revised June 7, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—The paper presents the first results of a series of experiments to study the mechanism of binding of microvesicles to an addressable cell using the method of scanning fluorescent confocal microscopy. A new approach has been developed to visualize the penetration of microvesicles into the cell.

Keywords: extracellular vesicles, fluorescence microspectroscopy