

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.352.3

Морфология эритроцитов указывает на различие механизмов формирования внеклеточных везикул эритроцитарного происхождения

Е.Ю. Паршина^{1, *} , Л.С. Фролова², Г.В. Максимов¹ 

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24;

²Department of Chemistry, Irving K. Barber Faculty of Science, University of British Columbia Okanagan, 3247 Research Road, Kelowna, BC V1V 1V7, Canada

*e-mail: parshinae@gmail.com

Внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения (ЭВ) являются перспективным средством «адресной доставки лекарств», в связи с чем целью работы стало сравнение ряда методов получения ЭВ из эритроцитов *in vitro*. С помощью сканирующей электронной микроскопии установлено, что при ряде воздействий (кальциевый ионофор A23187, додецилсульфат натрия, лизофосфатидная кислота и инкубация при 50°C) эритроциты отщепляют ЭВ. Различие в морфологии эритроцитов, подвергнутых воздействиям, стимулирующим выделение ЭВ, указывает на различие механизмов формирования ЭВ. Методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что ЭВ, полученные методом термической обработки, могут содержать гемоглобин, в то время как при воздействии додецилсульфата натрия образуются везикулы без гемоглобина. Полученные данные позволят целенаправленно выбирать метод получения ЭВ в соответствии с требованиями к их составу.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения, сканирующая электронная микроскопия, эритроцит

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-4

Внеклеточные везикулы (ВВ) и внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения (эритроцитарные везикулы, ЭВ), в частности, обладают множеством важных характеристик, которые подходят для применения в биомедицине, в частности для доставки лекарств. Во-первых, как побочный продукт функционирования клеток организма ВВ биосовместимы и не вызывают иммунной реакции [1]. Во-вторых, благодаря малым размерам (как правило, менее 200 нм) ВВ могут преодолевать гематоэнцефалический барьер [1–3], а благодаря наличию рецепторов на поверхности проникать через клеточные мембраны, что идеально для доставки лекарств на основе РНК (siRNA и miRNA) [4]. В-третьих, ВВ способны обходить систему комплемента и факторов свертывания крови, благодаря чему обеспечивается их высокая стабильность в крови [4]. В-четвертых, способность ВВ сохранять некоторые компоненты мембраны исходной клетки может быть использована для формирования вектора при доставке лекарств [4]. Для доставки лекарств важно, что гидрофильные вещества могут быть локализованы в водной полости ВВ, в то

время как гидрофобные/липофильные вещества могут быть локализованы в липидном бислое [5].

Эритроциты являются легкодоступным источником ВВ, при использовании эритроцитов для производства ВВ нет необходимости культивировать клетки, что устраняет риск мутаций [6]. В отличие от ядерных клеток, эритроциты не содержат ДНК, и, следовательно, ВВ, полученные из эритроцитов, не представляют риска горизонтального переноса генов при доставке лекарств [6]. Кроме того, эритроциты для производства ЭВ могут быть получены от самого пациента, таким образом обеспечивается полная биосовместимость.

В то же время, ЭВ имеют некоторые особенности, отличающие их от остальных типов ВВ. В физиологических условиях внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения составляют около 7,3% всех ВВ, обнаруженных в крови [7]. Эритроциты могут высвобождать только эктосомы — везикулы, отщепляющиеся наружу от клеточной мембраны, поскольку у них отсутствует механизм для производства экзосом, который существует в ядерных клетках [8]. В процессе развития в костном мозге незрелые эритроциты — ретикулоциты —

могут высвобождать экзосомы, однако после накопления гемоглобина и утраты ядра эритроциты производят только эктосомы [9]. Что касается апоптотических телец, которые тоже относят к ВВ, поскольку запрограммированная смерть эритроцитов, эриптоз, отличается от апоптоза, эритроциты не могут высвобождать апоптотические тельца.

В настоящее время известны следующие механизмы образования ЭВ. Повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} запускает процессы, приводящие к отпочкованию ЭВ от поверхности мембраны [7, 9–11]. Этот механизм высвобождения тесно связан с эриптозом [7, 10]. Увеличение концентрации кальция в цитозоле приводит к активации Ca^{2+} -чувствительного K^+ -канала и потере катионов калия эритроцитом, что в свою очередь стимулирует выход Cl^- [11, 12], а следом выход воды под действием сил осмоса, что приводит к сжатию эритроцита [11, 13]. Кроме того, повышение внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах активирует скрамблазу и флоппазу, и ингибирует флиппазу, ферменты, поддерживающие асимметрию распределения фосфолипидов во внутреннем и внешнем монослоях мембраны [7, 14]. В покоящихся клетках флоппаза и скрамблаза неактивны, но после активации флоппаза экстернализует фосфатидилсерин (phosphatidylserine, PS), а скрамблаза не специфически перераспределяет отрицательно заряженные фосфолипиды к внутреннему и внешнему листкам мембраны [7]. В результате PS, который обычно находится во внутреннем монослое мембраны, экспонируется на поверхности клеток, а асимметрия распределения фосфолипидов в мембране нарушается [15], что приводит к увеличению площади внешнего монослоя мембраны и способствует формированию выпячивания наружу плазматической мембраны эритроцита [16, 17]. При значительной разнице в соотношении площадей монослоев мембраны такое выпячивание может отпочковываться наружу в виде везикулы [16]. Увеличение цитозольного Ca^{2+} активирует фермент кальпаин, разрушающий белки подмембранного цитоскелета эритроцитов, что приводит к освобождению мембраны и также способствует образованию везикул [11, 12, 18].

Несмотря на значительный потенциал для биомедицинских применений, методы производства ЭВ для доставки лекарств остаются недостаточно разработанными. В большинстве исследований используют гемолиз эритроцитов для получения эритроцитарных теней с последующей экструзией теней через пористые мембраны для производства ЭВ [19–22], либо за счет увеличения внутриклеточного Ca^{2+} для индукции везикуляции в эритроцитах [6, 23, 24]. В то же время, метод получения ЭВ может напрямую влиять на их состав и функциональные свойства. Учитывая важность изучения ЭВ с точки зрения их потенциала для доставки лекарств, целью настоящей работы

стала разработка нескольких методов индукции высвобождения ЭВ из эритроцитов *in vitro* и характеристика полученных ЭВ с точки зрения их размера, биогенеза и содержания гемоглобина.

Материалы и методы

Получение ЭВ. Везикулы были получены из эритроцитов, выделенных из крови здоровых доноров в пластиковые пробирки с гепарином (30 Ед./мл; кровь предоставлена НМИЦ кардиологии имени академика А.Е. Чазова). Эритроцитарную массу получали трехкратным центрифугированием в изотоническом буфере Аллена (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgSO_4 , 4 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 1 мМ $\text{NaN}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 мМ глюкоза; pH 7,2–7,4) при 1300 g, 4°C в течение 7 мин. В работе использовали эритроцитарную массу с гематокритом 3–5%.

Для получения внеклеточных везикул из эритроцитов использовали следующие методы.

Инкубирование с кальциевым ионофором A23187 в кальций-содержащем буфере. Эритроцитарную массу инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 5 мкМ ионофора A23187. Контрольный образец инкубировали при 37°C в течение 30 мин с эквивалентным количеством растворителя (диметилсульфоксид, ДМСО) [8].

Инкубирование эритроцитов с анионным амфифилом додецилсульфатом натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS). Эритроцитарную массу инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 50 мкМ SDS [25].

Инкубирование эритроцитов с анионным амфифилом лизофосфатидной кислотой (lysophosphatidic acid, LPA). Эритроцитарную массу инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 20 мкМ LPA. Контрольный образец для второго и третьего методов представлял собой эритроцитарную массу, инкубированную при 37°C в течение 30 мин с добавлением эквивалентного количества дистиллированной воды [26].

Термическая обработка. Для индукции везикуляции эритроцитов эритроцитарную массу инкубировали при 50°C в течение 10 мин. Контрольный образец инкубировали при комнатной температуре [27].

После инкубации отбирали 10 мкл суспензии эритроцитов для морфологического анализа. Затем все образцы центрифугировали при 3500 g, 4°C в течение 20 мин для осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость собирали и повторно центрифугировали при 3500 g, 4°C в течение 5 мин для удаления оставшихся крупных частиц, белковых агрегатов и эритроцитов (везикулы оставались в супернатанте). Полученный супернатант снова центрифугировали при 16000 g, 4°C в течение 60 мин. Осадок внеклеточных везикул ресуспендировали в 150 мкл буфера Аллена и хранили при –80°C в течение суток.

Сканирующая электронная микроскопия. Суспензию эритроцитов, подвергавшуюся воздействию, вызывающим везикуляцию и в контроле, фиксировали 0,5%-ным раствором глutarового альдегида в буфере Аллена в течение 1 ч и отмывали дистиллированной водой путем четырехкратного центрифугирования (2 мин при 4500 g). Осажденные эритроциты наносили в виде мазка на стекло и высушивали на воздухе. Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на образцы напыляли слой золота или платины толщиной 20 нм. Образцы изучали на сканирующих электронных микроскопах KYKY-EM6200 (KYKY TECHNOLOGY, Китай) и TESCAN VEGA 3 SBH (TESCAN GROUP, Чехия).

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Для исследования спектров комбинационного рассеяния использовали фиксированные и высушенные на стеклах образцы эритроцитов, полученные для оптической микроскопии. Спектры регистрировали на комбинированном микроспектрометре Ntegra-Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия) с использованием 100× объектива, длины волны возбуждения 532 нм и мощности 5 мВт. Время регистрации одного спектра составляло 60 с. Обработку спектров и коррекцию базовой линии проводили с помощью оригинальной программы Raman.

Результаты и обсуждение

С использованием кальциевого ионофора, анионных амфифилов и термической обработки были получены ЭВ из эритроцитов человека. Оценочные эксперименты по измерению содержания белка по методу Лоури показали, что наибольшее количество везикул (в пересчете на белок) выделяется при действии ионофора A23187 в кальций-содержащем растворе, а определенный методом динамического светорассеяния диаметр ЭВ во всех

случаях составляет от 300 до 500 нм (данные не представлены).

Исследование морфологии методом СЭМ показало, что эритроциты, подвергшиеся обработке, индуцирующей высвобождение ЭВ, существенно меняют свою морфологию во всех исследованных случаях (рис. 1). При этом кальциевый ионофор A23187 в Ca^{2+} -содержащем буфере, додецилсульфат натрия и лизофосфатидная кислота вызывают образование выростов (спикул) на поверхности эритроцитов, которые превращаются в эхиноциты, в то время как инкубация при температуре 50°C приводит к тому, что эритроциты принимают сферическую форму и от них отщепляются сферические или каплеобразные фрагменты.

Важной особенностью является то, что форма эхиноцитов при различных воздействиях существенно различается между собой, что указывает на различие изменения, происходящих в клетках, и в механизме формирования отщепляющихся везикул. Повышение содержания Ca^{2+} в эритроците меняет активность ферментов, которые регулируют асимметрию фосфолипидов [7, 14]. Активация Ca^{2+} -чувствительного K^+ -канала [11, 12] и последующий выход ионов хлора Cl^- приводит к потере клеткой воды и сжатию эритроцита [11, 13]. На рис. 1Б видно, что клетки принимают компактную сферическую форму и несут тонкие, иногда нитевидные выросты. Такие выросты могут отпочковываться, формируя ЭВ, если изменения активности ферментов значительны [16], или с помощью кальпаина, который разрушает белки, прикрепляющие мембрану к цитоскелету [11, 12, 18]. Известно также, что ЭВ, продуцируемые стимуляцией A23187- Ca^{2+} , обогащены диацилглицерином, возможно, что диацилглицерин выполняет важную роль в образовании спикул [28]. Предполагается, что при увеличении цитозольного Ca^{2+} в эритроцитах диацилглицерин образуется во внутреннем

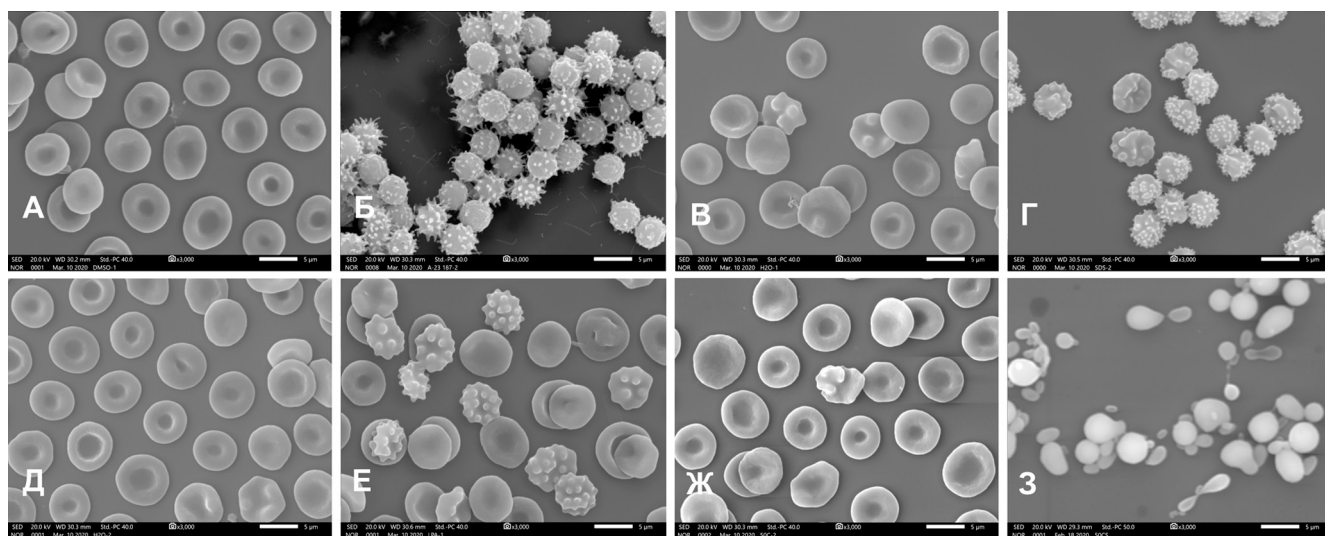


Рис. 1. Изображения эритроцитов, полученные методом СЭМ в контроле (А, В, Д, Ж) и при действии кальциевого ионофора A23187 в Ca^{2+} -содержащем буфере (Б), додецилсульфата натрия (SDS) (Г), лизофосфатидной кислоты (LPA) (Е) и термической обработки при 50°C (З). Размер масштабного отрезка 5 мкм, увеличение $\times 3000$.

листка мембраны стимулированной Ca^{2+} фосфолипазой C, и это нарушает асимметрию мембраны, вызывая искривление и сокращение, необходимые для почкования. Кроме того, диацилглицерол обладает фузогенными свойствами и может вызывать слияние мембран на цитоплазматической поверхности спикул, что необходимо для их почкования и высвобождения в качестве ЭВ [28]. Независимо от объяснения их образования, спикулы, показанные на рис. 1Б, являются предшественниками ЭВ и были названы «протоветукулами» [29]. В работах других авторов [30, 31] с помощью электронной микроскопии наблюдали остатки таких спикул в виде характерных «хвостов» на самих ЭВ, полученные при обработке A23187- Ca^{2+} . Отщепление ветукул приводит к потере мембраны клетки, что снижает соотношение площади мембраны к объему клетки и приводит к формированию сфероцитов [26, 29, 30].

Инкубация с SDS, анионным амфифильным соединением, также приводит к образованию выростов на клетках и формированию эхиноцитов. Однако эритроциты после обработки SDS имеют менее сферическую форму, а выступы на их поверхности не имеют нитевидной формы, как при действии A23187- Ca^{2+} . При этом формируются выступы двух типов — гладкие крупные выросты, как в случае обычных эхиноцитов, которые наблюдаются в малом количестве в нормальной крови (см. контрольный образец на рис. 1В) и более мелкие выросты, покрывающие иногда часть клетки. SDS имеет отрицательный заряд и распределяется во внешнем монослое мембраны, поскольку в норме внутренний монослой богат PS и сам заряжен отрицательно, способствуя проникновению во внутренний монослой положительных, но не отрицательных амфифильных молекул. Встраиваясь во внешний монослой, SDS увеличивает его площадь и за счет разности в площадях внешнего и внутреннего монослоев создает повышенную кривизну мембраны, образование выступов и переход от формы дискоцита к форме эхиноцита [17, 32]. Встраивание молекулы в мембрану может вызывать также образование пор, индуцирующее механизм ветукуляции, подобный эриптозу, который защищает клетку от гемолиза [33–35].

Инкубация с LPA приводит к трансформации части клеток в форму эхиноцитов 2–3-го типов. В отличие от A23187- Ca^{2+} и SDS, в этом случае наблюдаются крупные выросты, как у обычных эхиноцитов, присутствующих в нормальной крови. Образование таких выростов при действии LPA показано ранее [36]. Важно отметить, что хотя амфифильная молекула LPA также отрицательно заряжена, как и SDS, однако изменения морфологии существенно отличаются. Это можно объяснить тем, что жирнокислотный хвост SDS включает 12 атомов углерода, тогда как LPA — как правило, 18, также жирная кислота в составе LPA

может быть ненасыщенной. Короткая молекула SDS имеет форму перевернутого треугольника с относительно большой полярной головкой, в то время как в случае LPA скорее форму трапеции с суженным нижним основанием, поскольку наличие цис-двойной связи делает молекулу нелинейной и увеличивает латеральное пространство, занимаемое жирнокислотным остатком. Таким образом, различие формы амфифильных молекул влияет на изменения, производимые ими в мембране. LPA, по-видимому, также встраивается во внешний монослой, однако за счет длины гидрофобного хвоста, совпадающей с длиной других фосфолипидов, изменения кривизны поверхности наблюдаются в меньшей степени.

Не исключено, что включение как молекул SDS, так и LPA в мембрану приводит к образованию локальных дефектов мембраны и проникновению ионов кальция в цитоплазму [26]. Однако возможны и кальций-независимые механизмы, например, LPA активирует кальций-независимую РКС ζ , активность которой приводит к экспонированию PS во внешний монослой [26]. LPA также ингибирует флиппазу, которая отвечает за транспорт PS с внешней поверхности на цитозольную поверхность мембраны против градиента концентрации [26]. Нарушение асимметрии мембраны приводит к образованию внешних выступов, которые позже отпочковываются, образуя ветукулы [16]. Также, сходство морфологических трансформаций эритроцитов при действии SDS и LPA (отсутствие нитевидных выростов, которые образуются при действии A23187- Ca^{2+}) можно объяснить образованием пор в мембране при встраивании молекул LPA и SDS [15, 34, 35]. Наконец, возможно, что LPA в концентрации, использованной в настоящем исследовании (20 мкМ), оказывает более мягкое воздействие на эритроциты по сравнению с A23187- Ca^{2+} или SDS (концентрация 50 мкМ). В связи с этим на рис. 1Е меньше эхиноцитов и они не имеют игольчатых или нитевидных выступов.

Очевидные изменения в морфологии эритроцитов можно наблюдать после инкубации при 50°C в течение 10 мин (рис. 13). В то время как большинство необработанных эритроцитов сохранили свою форму дискоцитов (рис. 1Ж), эритроциты, подвергнутые воздействию температуры, трансформировались в сфероциты, окруженные более мелкими ветукулами различной формы (рис. 13). Подобные изменения описаны ранее [37–39]. При этом термическая обработка не вызывает образования эхиноцитов в отличие от других исследованных нами воздействий, что указывает на различие механизмов процессов ветукуляции. Известно, что при температуре 49–50°C денатурирует спектрин, основной белок цитоскелета в эритроцитах, образует матрицу на внутреннем мембранном листке, который связан с белком

полосы 3 в мембране через анкирин [40]. Ряд авторов предполагают, что повышение температуры индуцирует эриптоз [13, 27], который приводит к блеббину мембраны и высвобождению ЭВ через Ca^{2+} -зависимый механизм [7, 10]. Однако, в отличие от других случаев кальций-зависимого образования везикул, повышение температуры не вызывает образования эхиноцитов. В нашей работе [41] методом атомно-силовой микроскопии показано увеличение перепадов рельефа поверхности эритроцитов с характерными латеральными размерами около 200 нм при инкубации при 50°C, при этом эритроциты так же принимали сферическую форму и образовывали везикулы. Возможно, увеличение перепадов рельефа является предпосылкой формирования ЭВ.

Часть ЭВ, производимых эритроцитами, может содержать гемоглобин [42, 43], в других случаях сообщается об отсутствии гемоглобина в ЭВ [44]. Для определения наличия гемоглобина в ЭВ был использован метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия), который позволяет оценить химический состав образца [45, 46].

На рис. 2А представлены спектры цельной интактной крови (1) и фиксированных эритроцитов и везикул. Видно, что спектр крови соответствует спектру гемопорфирина гемоглобина (стрелками отмечены характерные для гемопорфирина полосы [46]). В случае фиксированных эритроцитов без обработки и инкубированных при повышенной температуре спектр отличается, что, по-видимому, связано с денатурацией гемоглобина в процессе фиксации глутаровым альдегидом, однако характерные полосы сохраняют свое положение и могут служить индикатором

присутствия гемоглобина. При инкубации при температуре 50°C спектр соответствует контрольному. В ЭВ, полученных в результате термической обработки эритроцитов, также регистрируется характерный спектр гемоглобина, однако с разной интенсивностью, что указывает на различное содержание гемоглобина, связанное, возможно, с различным размером везикул. При действии SDS в контрольном и обработанном SDS эритроцитах также регистрируется спектр гемоглобина, однако в везикулах спектр гемоглобина отсутствует. Возможно, это связано с меньшим размером везикул, полученным методом инкубации с SDS. Однако не исключено, что при таком механизме выделения ЭВ получаются ЭВ без гемоглобина. Таким образом, мы показали, что состав ЭВ зависит от метода выделения и, по-видимому, связан с механизмом образования везикул.

Заключение

Обобщая результаты работы, можно сказать, что полученные данные указывают на важную роль метода получения ЭВ, определяющего их состав, размер и свойства. В процессе выделения ЭВ эритроциты подвергаются морфологическим трансформациям, которые напрямую связаны с механизмами выделения везикул. Наиболее распространенный метод получения ЭВ с целью их дальнейшего использования в качестве транспортеров лекарственных препаратов — добавление кальциевого ионофора A23187 в Ca^{2+} -содержащем буфере. Везикулы в этом случае образуются в результате отщепления от спикул или нитевидных выростов, формирующихся на поверхности эритроцита. Другие способы получения ЭВ не демонстри-

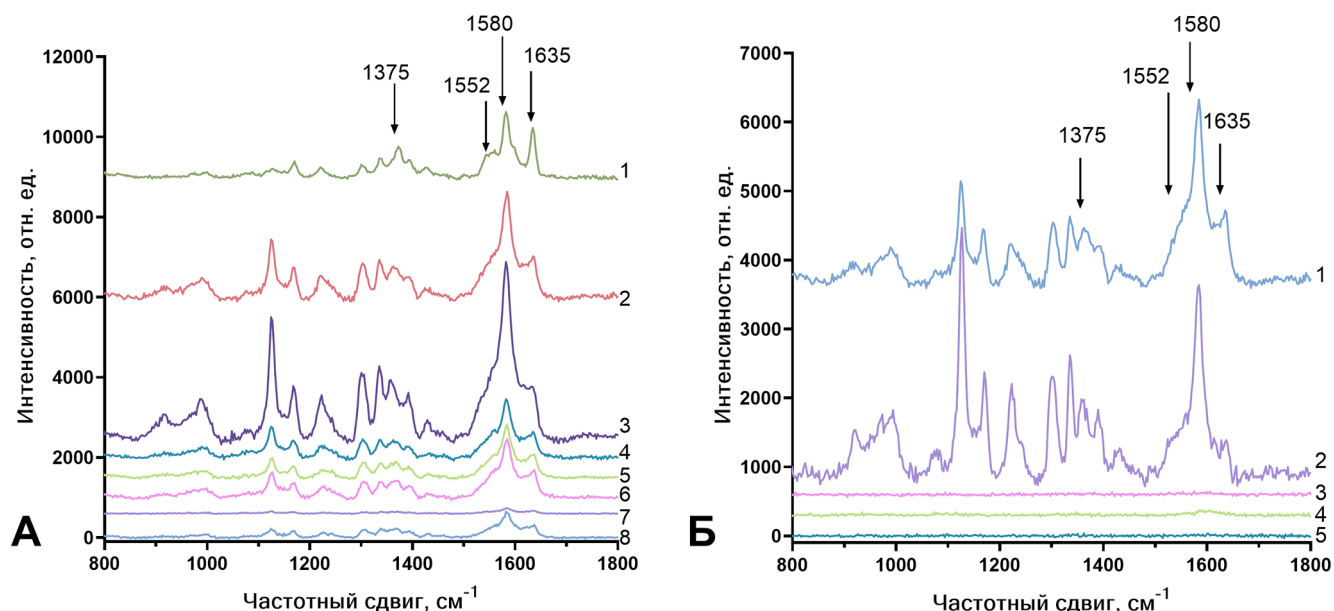


Рис. 2. Спектры КР эритроцитов и ЭВ при инкубации при температуре 50°C (А) и при добавлении SDS (50 мкМ) (Б). А — спектр цельной интактной крови (1), фиксированного эритроцита, инкубированного при комнатной температуре (2), фиксированного эритроцита, инкубированного при 50°C (3), отдельных ЭВ (4–8). Б — спектр фиксированного эритроцита без добавления SDS (1), спектр фиксированного эритроцита при добавлении SDS (50 мкМ) (2), спектры отдельных ЭВ (3–5).

руют образования такого рода структур, что указывает на возможность образования везикул другого состава. Везикулы, полученные методом термической обработки эритроцитов, могут иметь большие размеры и содержать гемоглобин, в отличие от везикул, полученных инкубацией с анионным детергентом SDS. Данные результаты указывают на важность выбора метода получения ЭВ в зависимости от целей их дальнейшего использования.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-

00006). Исследование было выполнено на базе отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени ак. Е.И. Чазова Минздрава России. Исследование было одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической кардиологии имени А.Л. Мясникова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени ак. Е.И. Чазова Минздрава России (протокол № 83 заседания Комитета от 31 октября 2022 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shahjin F., Chand S., Yelamanchili S.V. Extracellular Vesicles as Drug Delivery Vehicles to the Central Nervous System. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020;15(3):443–458.
2. Matsumoto J., Stewart T., Sheng L., Li N., Bullock K., Song N., Shi M., Banks W.A., Zhang J. Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathol. Commun.* 2017;5(1):71.
3. You Y., Ikezu T. Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 2019;130:104512.
4. Kim O.Y., Lee J., Gho Y.S. Extracellular vesicle mimetics: Novel alternatives to extracellular vesicle-based therapeutics, drug delivery, and vaccines. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017;67:74–82.
5. Lai R.C., Yeo R.W.Y., Tan K.H., Lim S.K. Exosomes for drug delivery – a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol. Adv.* 2013;31(5):543–551.
6. Usman W.M., Pham T.C., Kwok Y.Y., Vu L.T., Ma V., Peng B., Chan Y.S., Wei L., Chin S.M., Azad A., He A.B.-L., Leung A.Y.H., Yang M., Shyh-Chang N., Cho W.C., Shi J., Le M.T.N. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2359.
7. Tissot J.-D., Canellini G., Rubin O., Angelillo-Scherer A., Delobel J., Prudent M., Lion N. Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Transl. Proteomics.* 2013;1(1):38–52.
8. Jank H., Salzer U. Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils. *Sci. World J.* 2011;11(1):173–185.
9. Kuo W.P., Jia S., editors. *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*. N.Y.: Springer New York; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1
10. Harisa G.I., Badran M.M., Alanazi F.K. Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach. *Saudi Pharm. J.* 2017;25(1):8–17.
11. Lang E., Qadri S.M., Lang F. Killing me softly – Suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2012;44(8):1236–1243.
12. Lang F., Gulbins E., Lang P.A., Zappulla D., Föller M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010;26(1):21–28.
13. Föller M., Kasinathan R.S., Koka S., Lang C., Shumilina E., Birnbaumer L., Lang F., Huber S.M. TRPC6 contributes to the Ca^{2+} leak of human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 2008;21(1–3):183–192.
14. Daleke D.L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr. Opin. Hematol.* 2008;15(3):191–195.
15. Nguyen D.B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., Bernhardt I. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2011;28(5):847–856.
16. Kalra H., Adda C.G., Liem M., Ang C., Mechler A., Simpson R.J., Hulett M.D., Mathivanan S. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics.* 2013;13(22):3354–3364.
17. Sheetz M.P., Painter R.G., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J. Cell Biol.* 1976;70(1):193–203.
18. Pant H.C., Virmani M., Gallant P.E. Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983;117(2):372–377.
19. Ak G., Hamarat Şanlıer Ş. Erythrocyte membrane vesicles coated biomimetic and targeted doxorubicin nanocarrier: Development, characterization and *in vitro* studies. *J. Mol. Struct.* 2020;1205:127664.
20. AlQahtani S.A., Harisa G.I., Badran M.M., Al-Ghamdi K.M., Kumar A., Salem-Bekhit M.M., Ahmad S.F., Alanazi F.K. Nano-erythrocyte membrane-chaperoned 5-fluorouracil liposomes as biomimetic delivery platforms to target hepatocellular carcinoma cell lines. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2019;47(1):989–996.
21. Hu C.-M.J., Zhang L., Aryal S., Cheung C., Fang R.H., Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(27):10980–10985.
22. Malhotra S., Dumoga S., Sirohi P., Singh N. Red blood cells-derived vesicles for delivery of lipophilic drug camptothecin. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019;11(25):22141–22151.
23. Chang M., Hsiao J.-K., Yao M., Chien L.-Y., Hsu S.-C., Ko B.-S., Chen S.-T., Liu H.-M., Chen Y.-C., Yan C.-S., Huang D.-M. Homologous RBC-derived vesicles as ultrasmall carriers of iron oxide for magnetic resonance imaging of stem cells. *Nanotechnology.* 2010;21(23):235103.
24. Wang L.-Y., Shi X.-Y., Yang C.-S., Huang D.-M. Versatile RBC-derived vesicles as nanoparticle vector of photosensitizers for photodynamic therapy. *Nanoscale.* 2013;5(1):416–421.

25. Hägerstrand H., Isomaa B. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* 1992;1109(2):117–126.
26. Chung S.-M., Bae O.-N., Lim K.-M., Noh J.-Y., Lee M.-Y., Jung Y.-S., Chung J.-H. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(2):414–421.
27. Vodyanoy V. Thermodynamic evaluation of vesicles shed by erythrocytes at elevated temperatures. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015;133:231–238.
28. Allan D., Billah M.M., Finean J.B., Michell R.H. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca^{2+}]$. *Nature.* 1976;261(5555):58–60.
29. Pompeo G., Girasole M., Cricenti A., Boumis G., Bellelli A., Amiconi S. Erythrocyte death *in vitro* induced by starvation in the absence of Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* 2010;1798(6):1047–1055.
30. Allan D., Thomas P., Limbrick AR. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. *Biochem. J.* 1980;188(3):881–887.
31. Shukla S.D., Berriman J., Coleman R., Finean J.B., Michell R.H. Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes. *FEBS Lett.* 1978;90(2):289–292.
32. Bütikofer P., Brodbeck U., Ott P. Modulation of erythrocyte vesiculation by amphiphilic drugs. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* 1987;901(2):291–295.
33. Chernitsky E.A., Senkovich O.A., Rozin V.V. Dependence of erythrocyte vesiculation and hemolysis parameters on the concentration of sodium dodecyl sulfate. Vesicular-competitive hemolysis. *Membr. Cell Biol.* 2001;14(5):629–636.
34. Senkovich O.A., Chernitsky E.A. On the size of pores arising in erythrocytes under the action of detergents. *Membr. Cell Biol.* 1998;11(5):679–689.
35. Shalel S., Streichman S., Marmur A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. *J. Colloid Interface Sci.* 2002;252(1):66–76.
36. Moolenaar W.H., Van Meeteren L.A., Giepmans B.N.G. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays.* 2004;26(8):870–881.
37. Baar S. Mechanisms of delayed red cell destruction after thermal injury. An experimental *in vitro* SEM study. *Br. J. Exp. Pathol.* 1974;55(2):187–193.
38. Baar S., Arrowsmith D.J. Thermal damage to red cells. *J. Clin. Pathol.* 1970;23(7):572–576.
39. Christel S., Little C. Morphological changes during heating of erythrocytes from stored human blood. *J. Therm. Biol.* 1984;9(3):221–228.
40. Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Manchenko E., Moroz V., Kozlov A. Conformational distortions of the red blood cell spectrin matrix nanostructure in response to temperature changes *in vitro*. *Scanning.* 2019;2019:8218912.
41. Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Platonova A.A., Grygorczyk R., Maksimov G.V., Orlov S.N. Thermal inactivation of volume-sensitive K^{+} , Cl^{-} cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes. *Pflug. Arch.—Eur. J. Physiol.* 2013;465(7):977–983.
42. Bosman G.J.C.G.M., Lasonder E., Groenen-Döpp Y.A.M., Willekens F.L.A., Werre J.M. The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J. Proteomics.* 2012;76:203–210.
43. Thangaraju K., Neerukonda S.N., Katneni U., Buehler P.W. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;22(1):153.
44. Huisjes R., Bogdanova A., Van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., Van Wijk R. Squeezing for life — properties of red blood cell deformability. *Front. Physiol.* 2018;9:656.
45. Kitahama Y., Ozaki Y. Surface-enhanced resonance Raman scattering of hemoproteins and those in complicated biological systems. *The Analyst.* 2016;141(17):5020–5036.
46. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancheri S., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;387(5):1691–1703.

Поступила в редакцию 29.06.2025

После доработки 16.07.2025

Принята в печать 19.07.2025

ORIGINAL RESEARCH

The morphology of erythrocytes reveals differences in the mechanisms of erythrocyte derived extracellular vesicle formation

E.Yu. Parshina^{1,*} , L.S. Frolova², G.V. Maximov¹ 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–24 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Chemistry, Irving K. Barber Faculty of Science, University of British Columbia Okanagan,
3247 Research Road, Kelowna, BC V1V 1V7, Canada

*e-mail: parshinae@gmail.com

Erythrocyte-derived extracellular vesicles (EDEVs) are a promising tool for “targeted drug delivery,” and this study aimed to compare several methods of obtaining EDEVs from erythrocytes *in vitro*. Scanning electron microscopy revealed that under certain treatments (calcium ionophore A23187, SDS, LPA, and incubation at 50°C), erythrocytes shed EDEVs.

The differences in the morphology of erythrocytes subjected to EDEVs-stimulating treatments suggest distinct mechanisms of EDEVs formation. Raman spectroscopy showed that EDEVs obtained by heat treatment may contain hemoglobin, while SDS-induced treatment produces hemoglobin-free vesicles. The data obtained will allow for a targeted selection of EDEVs production methods based on their required composition.

Keywords: erythrocyte-derived extracellular vesicles, scanning electron microscopy, erythrocyte

Funding: This research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-74-00006.

Сведения об авторах

Паршина Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: parshinae@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7072-0693>

Фролова Любовь Сергеевна — аспирант химического факультета Университета Британской Колумбии, Оканеган, Канада. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: fr.liubov@gmail.com

Максимов Георгий Владимирович — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: gmaksimov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7377-0773>