

Филиппов А.Г.¹, Синюкова Т.А.², Московцев А.А.¹

Эритросомы – получение и поглощение эндотелиоцитами *in vitro*

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия,
ул. Балтийская, д. 8;

²Бюджетное учреждение высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский
государственный университет», 628412, Сургут, Россия, проспект Ленина, д. 1

Введение. Многие болезни человека патогенетически связаны с дисфункцией эндотелия, что мотивирует разрабатывать лекарственные препараты, воздействующие на эндотелиоциты. Для решения задачи разработки терапии, нацеленной на эндотелий, предлагается использовать методы наномедицины, а именно создание наноразмерных структур, доставляющих лекарственный препарат в эндотелиоциты. Перспективным кандидатом на роль нетоксичного, биосовместимого носителя лекарственных препаратов в эндотелиоциты являются нановезикулы из мембран эритроцитов человека. **Цель работы** – разработка технологии получения наноразмерных везикул мембран эритроцитов человека загруженных модельным соединением, и изучение поглощения полученных везикул эндотелием на модели *in vitro*.

Методика. Методом гипотонического гемолиза получали эритроцитарные тени, загружали мембранонепроницаемым флуоресцирующим красителем, восстанавливали изотоничность среды и ультразвуковой гомогенизацией получали эритроцитарные наноразмерные везикулы, которые затем отмывали методом диализа или ультраконцентрифугирования. Характеризовали полученные эритросомы методами фотонно-корреляционной спектроскопии и просвечивающей электронной микроскопии с обратным контрастом. Изучали поглощение полученных эритросом клетками линии EA.Nу926 с использованием метода проточной цитофлуориметрии и оценивали цитотоксичность эритросом в MTT-тесте.

Результаты. Получены и охарактеризованы препараты эритросом – наноразмерных везикул из замкнутых теней эритроцитов. Показано, что эритросомы загруженные мембранонепроницаемыми флуоресцирующими красителями поглощаются клетками линии эндотелиоцитов EA.Nу926, рассматриваемыми как модель эндотелия *in vitro*. Транспорт эритросом в эндотелиоциты является энергозависимым, т.к. блокируется при 4°C. Эритросомы не оказывают цитотоксического действия.

Заключение. Разработана простая и технологичная методика получения из мембран эритроцитов человека наноразмерных везикул, загруженных модельным соединением и поглощаемых клетками эндотелиоцитов, что позволяет рассматривать полученные эритросомы как перспективные средства доставки лекарственных препаратов в эндотелий.

Ключевые слова: эритросомы; эритроциты; эндотелий; наномедицина

Для цитирования: Филиппов А.Г., Синюкова Т.А., Московцев А.А. Эритросомы – получение и поглощение эндотелиоцитами *in vitro*. Патологическая физиология и экспериментальная терапия.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.03.12-17

Участие авторов: концепция исследования – Филиппов А.Г., Московцев А.А.; постановка экспериментов – Филиппов А.Г., Синюкова Т.А.; обработка результатов, написание рукописи – все авторы.

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2024–108–05.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.06.2025

Принята к печати 25.08.2025

Опубликована 30.09.2025

Список сокращений PBS – фосфатно-солевой буфер; FSC и SSC – прямое и боковое светорассеяние, соответственно; ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат; АТФ – аденоzinтрифосфат.

Filippov A.G.¹, Sinyukova T.A.², Moskovtsev A.A.¹**Erythrosomes: preparation and uptake by the endothelium *in vitro***¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;² Surgut State University, 1 Prospekt Lenina, Surgut, 628412, Russian Federation

Introduction. Many human diseases are pathogenetically associated with endothelial dysfunction, which motivates the development of drugs that affect endothelial cells. To develop therapies targeted at the endothelium, it is proposed to use technologies of nanomedicine, specifically, the creation of nanoscale structures that deliver a drug to endothelial cells. Nanovesicles from human erythrocyte membranes are a promising candidate for the role of a non-toxic, biocompatible drug carrier in endothelial cells. The aim of the study was to develop a technology for obtaining nanoscale vesicles of human erythrocyte membranes loaded with a model compound and to study the absorption of the obtained vesicles by the endothelium in an *in vitro* model.

Method. Erythrocyte ghosts were obtained by hypotonic hemolysis and loaded with a membrane-impermeable fluorescent dye. Then the medium isotonicity was restored, nanoscale erythrocyte vesicles were obtained by ultrasonic homogenization and washed by dialysis or ultracentrifugation. The erythrosomes were characterized by photon correlation spectroscopy and inverted-contrast transmission electron microscopy. The erythosome uptake by EA.Hy926 cells was studied using flow cytometry, and the erythosome cytotoxicity was evaluated in a MTT test.

Results. Preparations of erythrosomes, nanoscale vesicles from erythrocyte ghosts, were obtained and characterized. It was shown that erythrosomes loaded with membrane-impermeable fluorescent dye were absorbed by human EA.Hy926 endothelial cells, that are considered an *in vitro* model of the endothelium. The transport of erythrosomes into endothelial cells was energy-dependent as it was blocked at 4°C. The erythrosomes had no cytotoxic effect.

Conclusion. A simple and technologically advanced method was developed for obtaining nanoscale vesicles loaded with a model compound and absorbed by endothelial cells from human erythrocyte membranes. Thus, the obtained erythrosomes are promising means for drug delivery to the endothelium.

Keywords: erythrosomes; red blood cells; endothelium; nanomedicine

For citation: Filippov A.G., Sinyukova T.A., Moskovtsev A.A. Erythrosomes – preparation and uptake by endothelium *in vitro*. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(3): 12–17. (in Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.03.12-17

Author's contribution: research concept – Filippov A.G., Moskovtsev A.A.; experiment design – Filippov A.G., Sinyukova T.A., results processing, writing the text – all authors.

For correspondence: Alexey. A. Moskovtsev, Head of the Cellular Stress laboratory, Russian Federation, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, e-mail: bioinf@mail.ru

Information about the authors:

Moskovtsev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-824X>

Sinyukova T.A., <https://orcid.org/0000-0001-6079-8841>

Financing. The reported study was funded by Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra, project number № 2024-108-05.

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

Received 15.06.2025

Accepted 25.08.2025

Published 30.09.2025

Введение

Эндотелий сосудов можно рассматривать как один из крупнейших органов человека, дисфункция которого ассоциирована с рядом патологий и патологических состояний (диабет, курение, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, гипергомоцистинемия и др.). При ишемии, тромбозе, воспалении возникает задача доставки терапевтических и диагностических агентов к эндотелию, кроме того, нацеливание на эндотелий может обеспечить доставку препаратов в ткани через эндотелий посредством

трансцитоза [1]. Известные стратегии доставки в патологический эндотелий включают: липосомы; белковые коньюгаты, нацеленные на молекулы межклеточной адгезии; поверхностные рецепторы; ферменты [2]. Недавно было показано изменение поглощения активированными эндотелиоцитами HUVEC липосом, несущих углеводный лиганд Sialyl Lewis X к E-селектину, в зависимости от скорости потока в микрофлюидной модели «сосуда-на-чи-псе» [3], что указывает на важность не только нацеливания, но учета гидродинамических условий для обеспечения эффективного захвата липосом клетками.

Интересна возможность использовать в качестве контейнеров для лекарств собственные клетки организма, например, эритроциты [4]. Загрузка молекул препарата в эритроциты или иммобилизация на поверхности клеток обеспечивает длительную циркуляцию лекарства в крови, уменьшение частоты побочных эффектов [5]. Известны работы по загрузке в эритроциты кортикоэстериолов, кардиотоксичных антибиотиков, детоксицирующих ферментов [6]. При этом известно, что микрочастицы, отщепляемые эритроцитами пациентов с серповидно-клеточной анемией, способны поглощаться эндотелиальными клетками [7], что указывает на тропность эритроцитарных микрочастиц к эндотелию.

Целью настоящей работы является получение эритросом – наночастиц из замкнутых теней эритроцитов, загруженных модельным соединением, и оценка возможности использования эритросом в качестве средства доставки лекарств в эндотелий.

Методика

Получение эритросом. Эритросомы получали из свежей человеческой крови здоровых доноров. Кровь отбирали в цитратный буфер, центрифугированием осаждали эритроцитарную массу (200g, 10 мин, 4°C), которую ресуспензировали в холодном (4°C) однократном растворе фосфатно-солевого буфера (1X PBS) с 5 mM глюкозы и повторно осаждали, затем повторяли промывку два раза. 0,5 мл суспензии эритроцитов вносили в 4 мл лизирующего буфера (1/5X PBS, 1 mM MgCl₂, с/без 1 mM CaCl₂, 4°C). Мембранны осаждали центрифугированием (800g, 10 мин, 4°C) и промывали лизирующим буфером три раза. Вносили кальций до конечной концентрации или ФИТЦ меченный диглицил-глицин до конечных концентраций 80 мкг/мл и 300 мкМ, соответственно, и запечатывали тени, восстанавливая изотоничность добавлением 8X PBS, с последующей инкубацией при 37°C в течение 0,5 ч. Затем суспензию теней обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе Sonopuls (Bandelin electronics) при 50% мощности и длительности циклов 5×10% в течение 3×10 с и внешнем охлаждении (0°C) и подвергали диализу (порог отсечения 12 кДа) против двукратно сменяемого физиологического раствора при 4°C в течение 12 ч либо центрифugировали при 100 000g в течение 35 мин, а осадок ресуспензировали в 1 мл PBS и хранили при 4°C.

Распределение эритросом по размерам характеризовали методом фотонно-корреляционной спектроскопии (ZetaPALS, Brookhaven Instruments) и просвечивающей электронной микроскопии с обратным контрастом молибдатом аммония (LEO 912 AB OMEGA, Carl Zeiss, Germany).

Эксперименты на культуре клеток. Эксперименты проводились на клетках линии эндотелиоцитов EA.Nu926. Клетки линии EA.Nu926 культивировали в среде DMEM с 2 mM L-глутамином, 5 mM пируватом натрия, добавками НАТ, заменимых аминокислот (NEAA) и 10% эмбриональной сывороткой теленка в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Для изучения поглощения эритросом эндотелиоцитами, в культуру клеток EA.Nu926 вносили препарат эритросом с разбавлением в 10 раз и инкубировали в течение 3 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе, затем среду удаляли, промывали PBS, клетки снимали с подложки версен-трипсином, ресуспензировали в PBS и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson Ltd, США).

Оценку выживаемости в МТТ-тесте проводили в 96-лучочном планшете после инкубации клеток в течение 12 или 24 ч с препаратом эритросом, внесенным с разбавлением в 10 и более раз. МТТ-краситель вносили до концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали 4 ч, удаляли среду, растворяли осадок формазана в DMSO и измеряли оптическую плотность при λ=544 нм против 620 нм (Hidex Chameleon, Hidex Oy).

Результаты и обсуждение

Известны различные методы загрузки эритроцитов: электропорация, фармацевтически вызванный эндоцитоз, осмотический гемолиз и гипотонический гемолиз в различных модификациях [5]. Мы использовали гипотонический гемолиз, позволивший просто и технологично получать «тени» эритроцитов и загружать в них модельные соединения – мембранонепроницаемые флуоресцирующие красители. Эритросомы, полученные озвучиванием замкнутых теней эритроцитов, согласно данным фотонно-корреляционной спектроскопии имели средний размер 120 нм (**рис. 1**).

Для изучения поглощения эритросом эндотелиоцитами в качестве модели эндотелия *in vitro* была выбрана клеточная линия EA.Nu926 (гибридома клеток культуры эндотелиоцитов вен пупочного канатика HUVEC и клеток линии adenокарциномы легких A549) стабильно сохраняющая фенотип эндотелия в процессе культивирования [8]. Учитывая, что λ (max) экстинкции и эмиссии для кальция равны 470 и 509 (нм), соответственно, а для флуоресцина 495 и 520 (нм), поглощение клетками эритросом, загруженных этими красителями, можно наблюдать на проточном цитофлуориметре с возбуждением синим лазером (488 нм) и детекцией на канале FL-1H (530±30 нм). Выделив гейт клеток в координатах FSC/SSC (**рис. 2, а/а**), получали гистограмму распределения числа клеток по интенсивности флуоресценции. Видно (**рис. 2, б/б**), что после прединкубации клеток с эритросомами загруженными

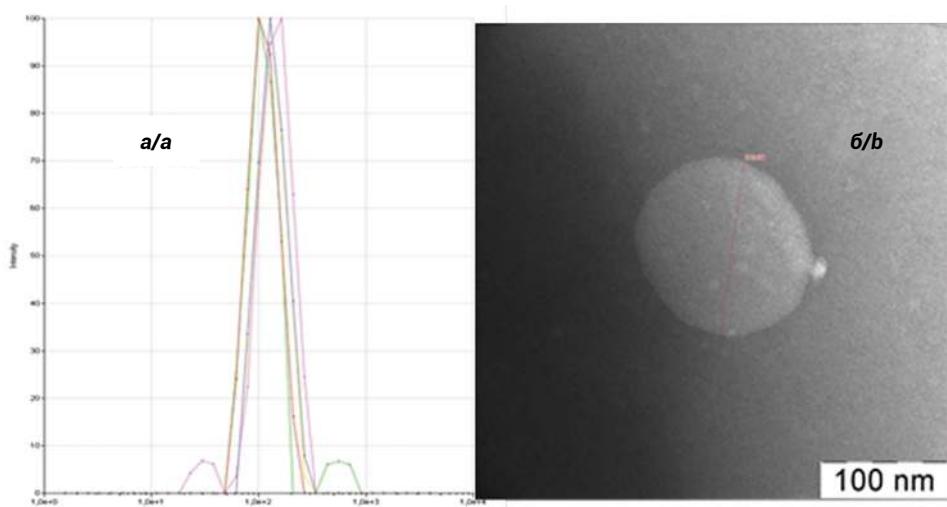


Рис. 1. Характеристика эритросом. а – Гистограмма распределения по размерам эритроцитарных наносом полученная методом фотонно-корреляционной спектроскопии. б – Электронно-микроскопическое изображение эритросомы с обратным контрастом молибдатом аммония.

Fig. 1. Characteristics of erythrosomes. a – Histogram of the size distribution of erythrocyte nanosomes obtained by photon correlation spectroscopy. b – Electron microscopic image of an erythrosome with reverse contrast with ammonium molybdate.

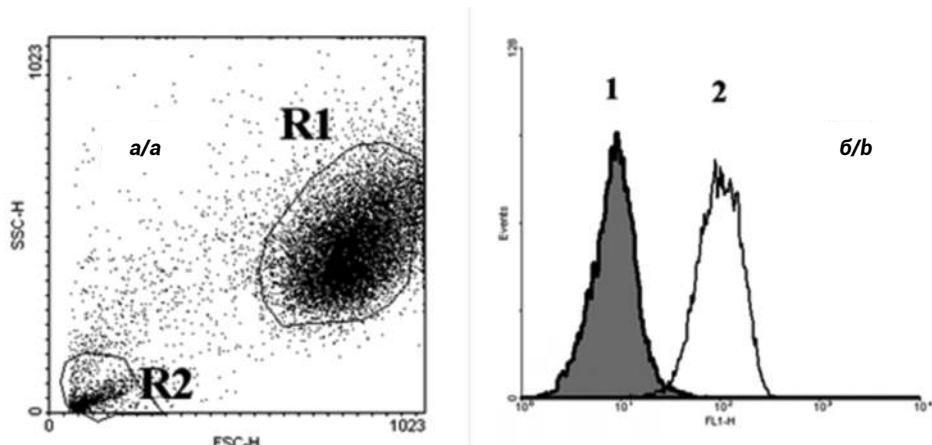


Рис. 2. Оценка интернализации эритросом клетками EA.Hy926. а – Типичная картина распределения суспензии клеток EA.Hy926 в координатах FSC/SSC: гейт R1 – клетки, гейт R2 – дебриз. б – Гистограммы гейта клеток инкубированных с эритросомами пустыми (1) и загруженными кальцеином (2) по каналу FL1-H.

Fig. 2. Evaluation of erythrosome internalization by EA.Hy926 cells. a – Typical distribution pattern of EA.Hy926 cell suspension in FSC/SSC coordinates: gate R1 – cells, gate R2 – debris. b – Gate histograms of cells incubated with empty (1) and calcein-loaded (2) erythrosomes in the FL1-H channel.

красителем, интенсивность флуоресценции клеток резко возрастила по сравнению с автофлуоресценцией в контроле (наблюдалось смещение пика на гистограмме вправо, свидетельствующее об усилении флуоресценции клеток вследствие поглощения флуоресцирующего красителя). Чтобы гарантировать отсутствие в препарате эритросом незагруженного красителя, эритросомы очищали двумя различными способами: ультрацентрифугированием или диализом. Способ очистки не влиял на наблюдаемый эф-

фект поглощения. Также не было замечено значимых отличий в поглощении эритросом, приготовленных с/без добавок ионов кальция (1 мМ).

Можно предположить различные механизмы поглощения эритросом. Для их дискриминации был поставлен эксперимент по инкубации эритросом с эндотелиоцитами при 4°C, а также с эндотелиоцитами после прединкубации клеток с гепарином (10 мкг/мл) или хлорохином (200 мМ). Из **рис. 3, а/а** видно, что при 4°C эритросомы

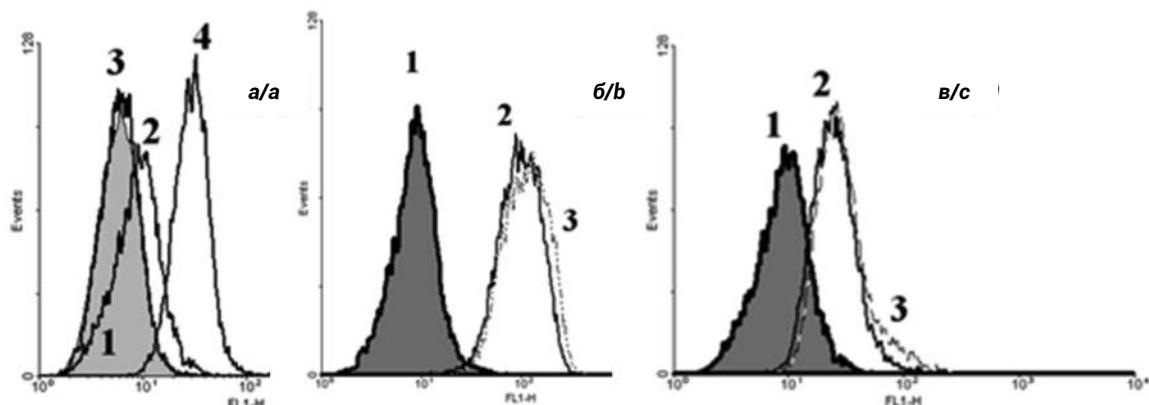


Рис. 3. Эффекты ингибиторов эндоцитоза на поглощение эритросом. *а* – Гистограммы гейта клеток EA.Hy926 инкубированных с пустыми эритросомами при 4°C (1), при 37°C (2) и загруженными флуоресцеином диглицилглицином при 4°C (3), при 37°C (4) по каналу FL1-H. *б* – Гистограммы гейта клеток интактных (1), без прединкубации с гепарином (2) и после прединкубации с гепарином (3) по каналу FL1-H инкубированных с эритросомами загруженными кальцеином. *в* – Гистограммы гейта клеток интактных (1), без прединкубации с хлорохином (2) и после прединкубации с хлорохином (3) канала FL1-H инкубированных с эритросомами загруженными флуоресцеиндиглицилглицином.

Fig. 3. Effects of endocytosis inhibitors on erythrosome uptake. *a* – Gate histograms of EA.Hy926 cells incubated with empty erythrosomes at 4°C (1), at 37°C (2) and loaded with fluorescein diglycylglycine at 4°C (3), at 37°C (4) via the FL1-H channel. *b* – Gate histograms of intact cells (1), without preincubation with heparin (2) and after preincubation with heparin (3) via the FL1-H channel incubated with erythrosomes loaded with calcein. *c* – Histograms of the gate of intact (1), without preincubation with chloroquine (2) and after preincubation with chloroquine (3) cells in the FL1-H channel incubated with erythrosomes loaded with fluorescein diglycylglycine.

не поглощались клетками, т.к. интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с эритросомами, не отличалась от автофлуоресценции контрольных (автофлуоресценция в контроле при 4°C несколько ниже контрольной при 37°C). Ингибирующее действие холода на поглощение эритросом указывает на то, что этот процесс является энергозависимым, и подавление продукции АТФ блокирует транспорт эритросом. Прединкубация клеток с гепарином (рис. 3, б/б) или хлорохином (рис. 3, в/в) не ингибировала поглощение эритросом. Хлорохин ингибирует клатрин-зависимый транспорт [9], а гепарин – ингибирует связывание с рецепторами, ассоциированными с гепарин сульфат протеогликаном; известно ингибирование эндоцитоза экзосом опухолевых клеток гепарином [10]. Можно говорить об отсутствии вовлеченности этих процессов в поглощение эритросом.

В работе [7] было показано, что микрочастицы, отщепляемые эритроцитами пациентов с серповидно-клеточной анемией, способны вызывать окислительный стресс и апоптоз в эндотелиальных клетках, вероятно играя роль в патогенезе атеросклероза. Эффект связывают с наличием в микрочастицах эритроцитов гемоглобина и высвобождаемых из него гемина и ионов железа, способных катализировать реакции образования активных форм кислорода и окисленных липидов. Нами не было обнаружено статистически значимого токсического действия эритросом на клетки культуры EA.Hy926 в MTT-тесте при продол-

жительности инкубации 12 ч и 24 ч. Отсутствие токсичности эритросом можно объяснить отсутствием гемоглобина, удаленного из эритроцитарных теней при отмыке, и использованием для получения эритросом свежих донорских эритроцитов, не подвергшихся старению в процессе хранения.

Заключение

С помощью сравнительно простого и технологичного метода были получены и загружены модельным соединением наноразмерные эритросомы, способные поглощаться эндотелиальными клетками *in vitro*. Это позволяет рассматривать эритросомы как перспективные нетоксичные биосовместимые средства доставки лекарственных препаратов в эндотелий.

Литература/ References

1. Oh P., Borgström P., Witkiewicz H., Li Y., Borgström B.J., Chrastina A., et al. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(3): 327–37. <https://doi.org/10.1038/NBT1292>
2. Muzykantov V.R. Targeted Drug Delivery to Endothelial Adhesion Molecules. *Int Sch Res Notices.* 2013; 2013: 916254. <https://doi.org/10.1155/2013/916254>
3. Onishchenko N.R., Moskovtsev A.M., Kobanenko M.K., Tretiakova D.S., Alekseeva A.S., Kolesov D.V. Protein Corona Attenuates the Targeting of Antitumor Sialyl Lewis X-Decorated Liposomes to Vascular Endothelial Cells under Flow Conditions.

- Pharmaceutics.* 2023; 15: 1754. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061754>
4. Tan S., Wu T., Zhang D., Zhang Z. Cell or cell membrane-based drug delivery systems. *Theranostics.* 2015; 5(8): 863–81. <https://doi.org/10.7150/THNO.11852>
 5. Sarbash V.I., Tikhonova A.G., Vuymo T.A., Derbov A.L., Aleksandrovich Yu. G., Butylin A.A., et al. Red blood cells are drug carriers. *Ros Khim Zh.* 2007; 51(1): 143–9.
 6. Muzykantov V.R. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010; 7(4): 403–27. <https://doi.org/10.1517/17425241003610633>
 7. Camus S.M., De Moraes J.A., Bonnin P., Abbyad P., Le Jeune S., Lionnet F., et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood.* 2015; 125(24): 3805–14. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-07-589283>
 8. Bouïs D., Hospers GAP., Meijer C., Molema G., Mulder N.H. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis.* 2001; 4: 91–102. <https://doi.org/10.1023/A:1012259529167>
 9. Wolfram J., Nizzero S., Liu H., Li F., Zhang G., Li Z., et al. A chloroquine-induced macrophage-preconditioning strategy for improved nanodelivery. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 13738. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-14221-2>
 10. Christianson H.C., Svensson K.J., Van Kuppevelt T.H., Li J.P., Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110(43): 17380–5. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1304266110>

Сведения об авторах:

Филиппов Александр Геннадиевич, науч. сотр. лаб. клеточного стресса ФГБНУ «НИИОПП», algf@yandex.ru;

Синюкова Татьяна Александровна, вед. науч. сотр. научно-образовательного центра, доцент каф. патофизиологии и общей патологии Медицинского института Бюджетного учреждения высшего образования Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный университет»;

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. клеточного стресса ФГБНУ «НИИОПП»
e-mail: bioinf@mail.ru