

УДК 576.314+576.367+571.27

ТЕХНОЛОГІЯ УТВОРЕННЯ МЕМБРАННИХ ВЕЗИКУЛ ДЛЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ

Р. О. Білий

Інститут біології клітини НАН України, Львів

E-mail: R.Bilyy@nas.gov.ua

Статтю присвячено обговоренню механізмів індукованого утворення мембранних везикул пухлинних клітин, які б зберігали імунологічні (антигенні) властивості і стали перспективним агентом для протипухлинної імунотерапії. Така імунотерапія здатна викликати імунну відповідь організму на пухлинні клітини, запобігати появі мікрометастазів та сприяти усуненню залишків пухлинних клітин після інших видів лікування. Для забезпечення імунної відповіді на пухлинні антигени слід провести відповідну імунізацію організму поверхневими детермінантами пухлини. Існують способи імунізації штучно інактивованими чи такими, що гинуть шляхом запрограмованої смерті (апоптичними), пухлинними клітинами. Останні експонують на своїй поверхні фосфатидилсерин, який справляє протизапальний вплив і унеможлиблює їх використання з метою індукування імунної відповіді. Метою роботи був пошук агентів, здатних індукувати утворення мембранних везикул пухлинних клітин, які б зберігали антигенні властивості пухлини і мали низький вміст фосфатидилсерину. Нами показано, що інгібітор АТФ-чутливих калієвих каналів ендоплазматичного ретикулуму — глібенкламід індукуює утворення мембранних везикул з «неапоптичним» фенотипом — відносно малими (до 2,5 мкм) розмірами і низьким вмістом фосфатидилсерину, які водночас експресують на поверхні компоненти глікокаліксу. Сумісна дія глібенкламїду та ультрафіолетового випромінювання типу Б (315–280нм) значно збільшує кількість утворених мембранних везикул, збіднених за вмістом фосфатидилсерину, зберігаючи компоненти глікокаліксу (тобто основні імунологічні детермінанти клітини пухлини). Тому згадані везикули та технологія їх утворення можуть стати перспективними засобами для здійснення імунізації під час аутологічної імунотерапії пухлин.

Ключові слова: плазматична мембрана, мембранні везикули, протипухлинна імунотерапія, фосфатидилсерин, апоптоз.

Серед існуючих методів лікування пухлин імунотерапія посідає особливе місце. Так, хірургічне видалення клітин, хіміотерапія, променева терапія, гіпертермія сьогодні є стандартними підходами до терапії пухлин людини, які спрямовані в конкретне місце локалізації пухлини і, усуваючи її, можуть подовжити життя пацієнта [1]. Проте ефективність видалення первинної пухлини не гарантує повного знищення всіх її клітин, зокрема дисемінованих, тих, що потрапили у кров'яне русло, чи мікрометастазів у віддалених органах [2]. Окрім того, хіміотерапія та променева терапія часто мають доволі неспецифічний характер, адже діючий агент знищуватиме будь-які проліферативно-активні клітини як пухлини, так і нормальних тканин, насамперед кісткового мозку, кишечника, суглобів тощо. Імунотерапія ж спрямована на створення імунної відповіді організму проти пухлинних антигенів. І хоча на початкових стадіях лікуван-

ня, коли очевидно є наявність великої виснажливої пухлини, що не дає змоги імунній системі функціонувати на повну силу, імунотерапія за ефективністю поступається класичним методам терапії, однак цей підхід має суттєву перевагу. Передусім він забезпечує постійну імунну відповідь проти можливих рецидивів у майбутньому, причому в такому разі знищуються саме мікрометастази чи мікрозалишки пухлин ще до того, як пухлина розвинеться до розмірів, які уможливляють їх виявлення. Дані останніх досліджень свідчать про безпосередню роль імунної системи в контролі прогресування пухлини та підтриманні подальшого безпухлинного статусу [3].

Яким же чином спонукати імунну систему атакувати пухлинні клітини? Оскільки пухлинам притаманна молекулярна ідентичність, виражена в пухлинно-асоційованих антигенах (ТАА), індукція імунної відповіді проти них може забезпечити

усунення пухлин. При цьому імунна система повинна «побачити» чужорідні ознаки пухлини, тобто вони мають експресуватись на поверхні клітини. Дійсно, вже сам факт появи таких антигенів має спричиняти імунну відповідь, і в багатьох випадках окремі ракові клітини чи мікропухлини усуваються імунною системою на ранніх стадіях свого розвитку. Проте в деяких випадках (які зазвичай клінічно діагностуються) імунна відповідь є недостатньою. Логічним підходом є імунізація пацієнта з метою посилення імунної відповіді, та цей на перший погляд простий спосіб має низку особливостей. Автори роботи [4] пропонують такі концептуальні вимоги до створення вакцин, що базуються на повних мертвих аутологічних пухлинних клітинах: 1) повна інактивація пухлинних клітин; 2) збереження їхньої імуногенності; 3) потреба в додержанні положень законів. Забезпечити інактивацію пухлинних клітин можна, індукувавши їх загибель шляхом апоптозу чи некрозу. Однак чинники, здатні спричинити загибель клітин, також мають певні особливості. Так, більшість хіміопрепаратів не підходять для цієї мети, адже перед ін'єкцією пацієнтові після загибелі клітин вони мають бути видалені. Певні обмеження стосуються і різних типів іонізуючого випромінювання, зокрема законами ФРН та деяких інших європейських країн заборонено рентгенівське опромінення об'єктів, призначених для ін'єкції людині [5]. Одним з ефективних способів інактивації пухлинних клітин є використання високого гідростатичного тиску, який залежно від дози та часу дії призводить до утворення апоптичних і некротичних клітин [5]; також є багато цитотоксичних сполук, які легко інактивуються, наприклад пероксид водню, і здатні спричинити апоптоз та/чи некроз [6].

Апоптичні клітини, втрачаючи асиметрію плазматичної мембрани, експонують на своїй поверхні фосфатидилсерин (ФС), відомий маркер апоптозу [7], при цьому самі апоптичні клітини мають протизапальні властивості [8], спрямовані на пригнічення імунної відповіді, які частково реалізуються через зв'язування ФС із молекулами анекси-ну А5 на поверхні апоптичних клітин [9]. Роль фосфоліпідів у забезпеченні імунної відповіді детально описано в огляді [10]. Для посилення імуногенних властивостей апоптичних клітин авторами роботи [4] запропоновано використовувати для імунізації ці клітини разом з анексином А5, який, маскуючи ФС на їхній поверхні, нівелює протиза-

пальні сигнали і виконує роль ад'юванту, проте такий підхід робить протипухлинну терапію малодоступною. Слід зазначити, що апоптичні клітини через певний час спонтанно перетворюються на вторинно-некротичні. У свою чергу, первинні та вторинні некротичні клітини є прозапальними, тобто індукують імунну відповідь, проте вони несуть іншу небезпеку, експонуючи всі внутрішні компоненти клітини, дещо модифіковані вільнорадикальними сполуками, утвореними в разі загибелі клітини [11]. Надмірна експозиція некротичних клітин імунній системі може викликати імунну реакцію проти власних антигенів (утворення антитіл до власних клітин/тканин організму), що спричинить розвиток аутоімунних захворювань [12–13]. Так, характерною клінічною ознакою аутоімунної хвороби системного червоного вовчачка є наявність антинуклеарних чи анти-ДНК антитіл [14].

Одним з підходів до транспорту в імунну систему поверхневих маркерів клітин (у т. ч. пухлинних) із забезпеченням інактивації пухлинних клітин та адекватної імунної відповіді є використання для імунізації мембранних везикул [15]. Утворення випинань плазматичної мембрани (блебінг) є характерним для різних біологічних процесів, зокрема росту бактерій, проліферації, апоптозу еукаріотичних клітин, передусім клітин крові, тощо [16]. Випинання плазматичної мембрани, відділяючись від клітини, утворюють мембранні везикули. Останні зберігають усі імунологічні та біохімічні властивості мембран і тому можуть бути використані для дослідження плазматичної мембрани (ПМ), зокрема проникнення фармакологічних чи інших препаратів через неї. Мембранні везикули також зберігають усі імунологічні властивості ПМ клітини, а отже, їх можна застосовувати для індукції імунної відповіді, як це описано для везикул бактерійних мембран у патентній заявці [15]. Так, унаслідок генно-інженерних модифікацій в грамнегативних бактерій видів *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* індукується утворення мембранних везикул, які після відповідного очищення використовують як бактерійний антиген чи ад'ювант (у поєднанні з іншим бактерійним антигеном) для імунізації з метою утворення імунної відповіді проти антигенів поверхні мембранних везикул (наприклад, ліпополісахариду).

Утворення мембранних везикул (МВ) в еукаріотичних клітинах спостерігається

при їх апоптичній загибелі, цитокінезі, міграції клітин та деяких інших процесах. Одним з керованих способів активації утворення МВ є індукція апоптозу, яка супроводжується фрагментацією клітини на апоптичні тільця та конденсацією «тіла» клітини. За апоптозу МВ — апоптичні тільця, як і апоптичні клітини, експонують на своїй поверхні ФС. Зважаючи на вже згаданий протизапальний ефект цієї сполуки, використання МВ як імуногенних агентів є ускладненим, окрім того, рівень блебінгу за нормальних умов життєдіяльності клітини, як і в разі її апоптичної загибелі, часто є недостатнім для отримання потрібної кількості МВ, тому виникає потреба в ефективних способах індукції утворення МВ, які на сьогодні для еукаріотичних клітин невідомі.

Утворення мембранних везикул спричиняє збільшення площі поверхні клітинних структур (як і зміну співвідношення поверхні до об'єму), відповідно виникає потреба в компенсації ліпідного шару для зростаючої площі поверхні клітини (площі ПМ). У роботі [17] показано злиття мембран ендоплазматичного ретикулу (ЕР) з ПМ під час утворення апоптичних тілець. Досліджуючи шляхи зміни поверхневих гліканів за апоптозу, ми помітили, що він супроводжується утворенням двох типів мембранних везикул, один з яких утворюється з ЕР і несе на своїй поверхні глікани, притаманні ЕР, але не ПМ. Оскільки вміст ФС серед усіх клітинних компартментів є найвищим саме в ПМ [18], а ФС синтезується у мембранах, асоційованих з мітохондріями (mitochondria-associated membranes, МАМ) [19], нами було висунуто припущення [20], що, індукуючи утворення везикул ПМ, можна домогтися збереження імунологічних властивостей ПМ зі збідненням за вмістом ФС.

У цій роботі ми показали, що глібенкламід — сполука, яка зв'язується з АТФ-каналами ЕР за одночасної дії з ультрафіолетовим випромінюванням типу В, спричинює утворення мембранних везикул, що містять типовий для поверхні клітини спектр глікопротеїнів, проте збіднені за ФС. Зазначені везикули та технологія їх утворення можуть стати перспективними засобами для здійснення імунізації під час аутологічної імунотерапії пухлин.

Матеріали і методи

Клітини, в яких потрібно індукувати утворення МВ, попередньо вирощували на покривних скельцях (для проведення наступної мікроскопії) чи в іншому пластиково-

му культуральному посуді (для отримання фракції МВ). Клітини промивали забуференим фізіологічним розчином — ЗФР (0,8% NaCl, 0,25% KCl, 0,144% Na₂HPO₄ та 0,024% KH₂PO₄, pH 7,4) і вміщували у розчин Хенкса (8,0% NaCl; 0,4% KCl; 0,1% MgSO₄ · 7H₂O; 0,1% MgCl₂ · 6H₂O; 0,06% Na₂HPO₄; 0,6% KH₂PO₄; 1% глюкози; 0,14% CaCl₂; 0,02% фенолового червоного) або Рінгера (0,9% NaCl; 0,02% KCl; 0,02% CaCl₂; 0,02% NaHCO₃).

Індукція утворення мембранних везикул. До клітин додавали глібенкламід (Sigma, США), розчин в диметилсульфоксиді, в кінцевій концентрації 5–10 мкг/мл середовища (залежно від типу клітин); клітини в культуральному посуді опромінювали ультрафіолетом-В (ультрафіолетове випромінювання з довжиною хвилі 315–280 нм, зазвичай — типове випромінювання бактерицидних ламп чи ламп транслюмінаторів, що широко використовуються в лабораторній практиці) за інтенсивності 180 мДж/см², розмістивши посуд безпосередньо перед ультрафіолетовою лампою лабораторного транслюмінатора. Звичайний лабораторний пластиковий посуд пропускає УФ-В. Клітини інкубували 1–4 год (залежно від конкретного типу клітин) при 37 °С, після чого спостерігали утворення МВ або виділяли фракцію МВ.

Мікроскопія. Мембранні везикули досліджували, використовуючи мікроскоп Carl Zeiss AxioImager A1, обладнаний системою диференційного інтерференційного контрасту (DIC). Для виявлення екстерналізації ФС клітини поміщали в розчин Рінгера, що містив кон'югат анексин V-техаський червоний у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл, і спостерігали червону флуоресценцію при збудженні 550 нм та емісії 580–630 нм, фіксували її за допомогою камери Carl Zeiss AxioCam MRm. Для виявлення гліканів поверхні плазматичної мембрани клітини вносили в розчин Рінгера, що містив кон'югат лектину зародків пшениці (WGA)-техаський червоний у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл, і спостерігали червону флуоресценцію при збудженні 550 нм та емісії 580–630 нм.

Виділення фракції мембранних везикул. Фракцію МВ виділяли центрифугуванням клітинної суспензії (у разі суспензійних клітин) чи супернатанта (надосадової рідини, у випадку субстратзалежних клітин) за 400g протягом 5хв. МВ залишаються в суспензії, тимчасом як клітини осідають. За потреби МВ осаджували центрифугуванням при 12 500g (чи більше) упродовж 60 хв.

Визначення концентрації протеїну в мембранних везикулах. Через 4 год культуральну рідину збирали та переносили в нові пробірки. Центрифугували при 400g 5 хв, для осадження клітин (якщо такі присутні) супернатант переносили в нові пробірки, які центрифугували при 15 000g 60 хв для осадження МВ. Супернатант відбирали, отриманий осад містив МВ. Вміст протеїну у везикулах визначали за методом Петерсона [21].

Статистичний аналіз. Розмір мембранних везикул оцінювали за допомогою програмного забезпечення AxioVision 4.6. Аналізували принаймні 100 об'єктів, наведено середні значення \pm стандартна похибка.

Результати та обговорення

Для пошуку речовин, які б індукували утворення мембранних везикул із мембран ER нами було протестовано сполуки, здатні специфічно зв'язуватись із компонентами ER. Результати попереднього скринінгу показали, що індукцію везикул спричиняє глібенкламід (5-хлоро-N-(4-[N-(циклогексилкарбамойл)сульфамойл]фенетил)-2-метоксибензамід; CAS 10238-21-8, PubChem CID 3488, відомий також як глібурид) — похідне сульфонілсечовини, широкоживаний і доступний фармацевтичний препарат, який використовують у лікуванні цукрового діабету типу II [22]. Глібенкламід зв'язується з АТФ-чутливими калієвими каналами ER та інгібує їх (накопичуючись переважно у бета-клітинах підшлункової залози) [23–24]. Похідні глібенкламїду застосовують як специфічні маркери ER, зокрема ER-Tracker Green™ (BODIPY FL glibenclamide) та ER-Tracker Red™ (BODIPY TR glibenclamide) [25].

Оброблення клітин ультрафіолетом спричинює утворення мембранних везикул, які мають типові ознаки апоптичних тілець, а саме — відносно великий розмір та характерна індукція кількох везикул діаметром, більшим за половину діаметра клітини, чи однієї великої мембранної везикули, діаметр якої рівний або більший за діаметр клітини, з одночасною конденсацією тіла клітини. Водночас дія глібенкламїду супроводжується утворенням великої кількості відносно малих мембранних везикул, при цьому конденсація клітин не спостерігається (рис. 1, А). Середній розмір досліджуваних клітин HeLa становив $37 \pm 9 \times 20 \pm 4$ мкм. За дії глібенкламїду клітини округлювались (середній діаметр клітини $19,7 \pm 3,2$ мкм) і утворювали МВ із середнім розміром $2,01 \pm 0,45$ мкм, при цьому розмір МВ, утво-

рених лише за дії УФ-Б, становив понад 5 мкм ($5 \div 24$ мкм). Одночасна дія глібенкламїду та УФ-Б призводила до утворення відносно малих МВ ($2,45 \pm 0,78$ мкм) (рис. 1, Б).

Для кількісного аналізу утворення везикул було виділено фракцію МВ шляхом 2-етапного центрифугування — з відділенням фракції клітин на першому етапі та осадженням фракції мембранних везикул, як описано в розділі **Матеріали і методи**. В отриманому осаді мембранних везикул (мембранній фракції) визначали вміст протеїну. Для встановлення кількості МВ брали кількість протеїну в мембранній фракції, адже цей метод дозволяє вирішити такі проблеми оцінювання: 1) утворені везикули мають широкий діапазон розмірів і важко порівняти одну велику чи кілька малих везикул; 2) малі везикули можуть залишитись непоміченими під час мікроскопічного аналізу; 3) великі везикули внаслідок додаткових маніпуляцій можуть руйнуватись. Як видно з рис. 2, сумісна дія УФ-Б та глібенкламїду зумовлює достовірне зростання вмісту протеїну МВ в очищених препаратах везикул порівняно з дією УФ-Б чи глібенкламїду окремо.

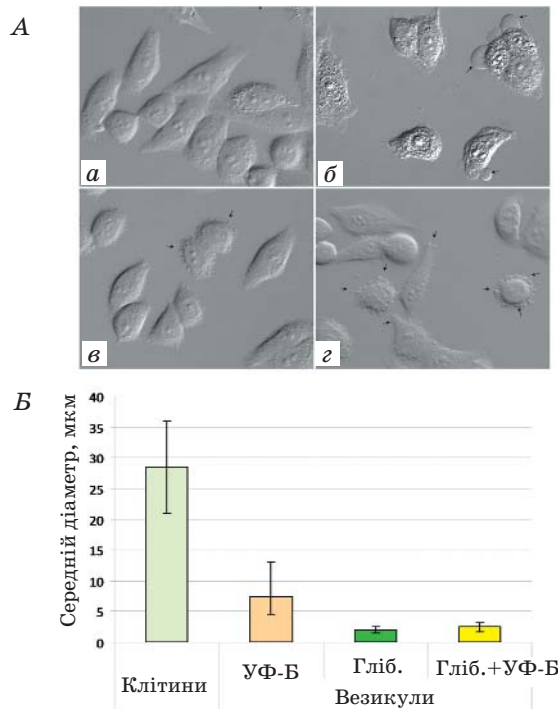


Рис. 1. А — інтактні клітини раку шийки матки людини лінії HeLa (а) та утворення мембранних везикул у культурі клітин під впливом УФ-Б (б), глібенкламїду (в), глібенкламїду та УФ-Б (г); Б — середній розмір досліджуваних клітин HeLa та їхніх мембранних везикул за дії УФ-Б («апоптичні тільця»), глібенкламїду (Гліб.) і глібенкламїду та УФ-Б

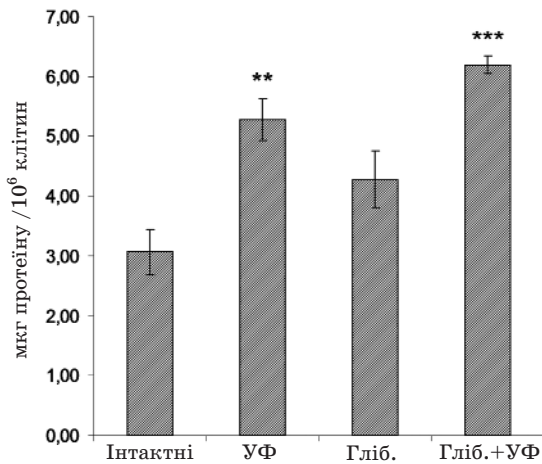


Рис. 2. Кількість мембранних везикул, утворених інтактними клітинами у культурі клітин раку шийки матки людини лінії HeLa під впливом ультрафіолету (УФ), глібенкламід (Гліб.), глібенкламід та ультрафіолету. Утворення мембранних везикул оцінювали за вмістом протеїну, мкг/млн. клітин

Для виявлення вмісту ФС на поверхні утворених везикул застосовували тест на екстерналізацію ФС за його зв'язуванням з флуоресцентним похідним анексину-V. Дослідження проводили прижиттєвою флуоресцентною мікроскопією. Клітини вміщували в розчин Рінгера, що містив кон'югат анексин V — техаський червоний у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл, та спостерігали червону флуоресценцію при збудженні 550 нм та емісії 580–630 нм, фіксуючи її за допомогою камери Carl Zeiss AxioCam MRm. Дія глібенкламід та одночасна дія глібенкламід і УФ-Б призводила до утворення мембранних везикул із низьким вмістом фосфатидилсерину (анексин-V-негативні везикули), на противагу дії УФ-Б, що спричиняло утворення анексин-V-позитивних везикул, притаманних апоптичним клітинам (рис. 3, А).

Аби з'ясувати, чи зберігають везикули, утворені за сумісної дії глібенкламід та УФ-Б, характерні поверхневі детермінанти (а отже, імуногенні властивості), нами було проведено детекцію компонентів глікокаліксу на утворених везикулах за допомогою лектину WGA, що характеризується широким спектром зв'язування поверхневих гліканів. Для виявлення гліканів поверхні плазматичної мембрани клітини вміщували в розчин Рінгера, що містив кон'югат лектину зародків пшениці (WGA)-техаський червоний у кінцевій концентрації 2,5 мкг/мл, і спостерігали червону флуоресценцію при

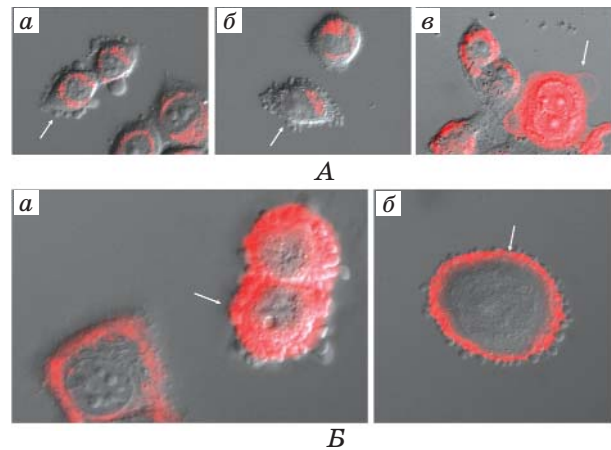


Рис. 3. А — Експонування фосфатидилсерину на поверхні клітини та мембранних везикул, утворених дією глібенкламід та УФ-Б (а, б) чи УФ-Б (в) як позитивний контроль зв'язування ФС із поверхнею апоптичних тілець: DIC-мікроскопія та флуоресцентна мікроскопія, фарбування анексином V-техаський червоний; Б — експонування N-гліканів плазматичної мембрани, притаманних апоптичним клітинам, фарбування лектином WGA-техаський червоний, утворених дією глібенкламід та УФ-Б (а, б):

DIC-мікроскопія та флуоресцентна мікроскопія

збудженні 550 нм та емісії 580–630 нм. Мембранні везикули, утворені за дії УФ-Б та глібенкламід, містили на своїй поверхні достатню кількість гліканів плазматичної мембрани, що виявлялися за фарбуванням лектином WGA (рис. 3, Б).

Таким чином, оброблення клітин глібенкламідом у поєднанні з УФ-Б сприяє утворенню значної кількості мембранних везикул, що зберігають на своїй поверхні детермінанти глікокаліксу ПМ і при цьому мають «неапоптичний» фенотип — збіднені на фосфатидилсерин і характеризуються відносно малими розмірами. Наскільки нам відомо, це перший успішний спосіб утворення мембранних везикул в еукаріотичних клітинах, збіднених на ФС, що нівелює протизапальні властивості апоптичних клітин і при цьому задовольняє вимогам для розроблення технології вакцинації, яка базується на аутологічних пухлинних клітинах. Спосіб індукції мембранних везикул захищений патентом України [20].

Висловлюємо подяку Т. Шкандіній за допомогу в проведенні цитологічних експериментів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Baxevanis C. N., Perez S. A., Papamichail M.* Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy // *Cancer Immun. Immunother.* — 2009. — V. 58, N 3. — P. 317–324.
2. *Schuster M., Nechansky A., Kircheis R.* Cancer immunotherapy // *Biotechnol. J.* — 2006. — V. 1, N 2. — P. 138–147.
3. *Apetoh L., Tesniere A., Ghiringhelli F. et al.* Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies // *Cancer Res.* — 2008. — V. 68, N 11. — P. 4026–4030.
4. *Weiss E.-M., Frey B., Rodel F. et al.* Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* — 2010. — V. 1209, N 1. — P. 109–117.
5. *Weiss E. M., Meister S., Janko C. et al.* High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features // *J. Immunotoxicol.* — 2010. — V. 7, N 3. — P. 194–204.
6. *Saito Y., Nishio K., Ogawa Y. et al.* Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide // *Free Rad. Res.* — 2006. — V. 40, N 6. — P. 619–630.
7. *Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A. et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // *J. Immunol.* — 1992. — V. 148, N 7. — P. 2207–2216.
8. *Voll R. E., Herrmann M., Roth E. A. et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells // *Nature.* — 1997. — V. 390, N 6658. — P. 350–351.
9. *Munoz L. E., Frey B., Pausch F. et al.* The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells // *Cur. Med. Chem.* — 2007. — V. 14, N 3. — P. 271–277.
10. *Chaurio R. A., Janko C., Munoz L. E. et al.* Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation // *Molecules.* — 2009. — V. 14, N 12. — P. 4892–4914.
11. *Casciola-Rosen L. A., Anhalt G., Rosen A.* Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes // *J. Exp. Med.* — 1994. — V. 179, N 4. — P. 1317–1330.
12. *Munoz L. E., Lauber K., Schiller M. et al.* The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity // *Nat. Rev. Rheumatol.* — 2010. — V. 6, N 5. — P. 280–289.
13. *Maniati E., Potter P., Rogers N. J. et al.* Control of apoptosis in autoimmunity // *J. Pathol.* — 2008. — V. 214, N 2. — P. 190–198.
14. *Gomez-Puerta J. A., Burlingame R. W., Cervera R.* Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value // *Autoimmun. Rev.* — 2008. — V. 7, N 8. — P. 606–611.
15. *WO/2002/009746*, від 31.07.2001. МПК А61К 39/102, А61К 39/39, Vaccines comprising outer membrane vesicles from gram negative bacteria / Berthet F. et al. — Опубл. 07.02.2002.
16. *Charras G. T.* A short history of blebbing // *J. Microsc.* — 2008. — V. 231, N 3. — P. 466–478.
17. *Franz S., Herrmann K., Fuhrnrohr B. et al.* After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes // *Cell Death. Differ.* — 2007. — V. 14, N 4. — P. 733–742.
18. *Vance J. E., Steenbergen R.* Metabolism and functions of phosphatidylserine // *Progr. Lipid Res.* — 2005. — V. 44, N 4. — P. 207–234.
19. *Vance J. E.* Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria // *J. Biol. Chem.* — 1990. — V. 265, N 13. — P. 7248–7256.
20. *Пат. України № 60626 від 25.06.2011.* Спосіб індукції утворення мембранних везикул / Білий Р. О. — Заявка на патент України *u201014107 UA*, пріоритет від 26.11.2010.
21. *Peterson G. L.* A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Anal. Biochem.* — 1977. — V. 83, N 2. — P. 346–356.
22. *Kamata Y., Fujita T., Kato T. et al.* An ATP-sensitive potassium channel blocker suppresses sodium-induced hypertension through increased secretion of urinary kallikrein // *Hypertens Res.* — 2009. — V. 32, N 3. — P. 220–226.
23. *Serrano-Martin X., Payares G., Mendoza-Leon A.* Glibenclamide, a blocker of K⁺(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2006. — V. 50, N 12. — P. 4214–4216.
24. *Malaisse W. J., Louchami K., Sener A.* Noninvasive imaging of pancreatic beta cells // *Nat. Rev. Endocrinol.* — 2009. — V. 5, N 7. — P. 394–400.
25. *Haugland R. P.* *In vitro*igen: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Inc, 2005. — 1126 p.

ТЕХНОЛОГИЯ ФОРМИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

Р. А. Билый

Институт биологии клетки НАН Украины,
Львов

E-mail: R.Bilyy@nas.gov.ua

Статья посвящена обсуждению механизмов индуцируемого образования мембранных везикул опухолевых клеток, которые сохраняли бы свои иммунологические (антигенные) свойства и стали перспективным агентом для противоопухолевой иммунотерапии. Такая иммунотерапия способна обеспечить иммунный ответ организма на опухолевые клетки, предотвратить появление микрометастазов и устранить остатки этих клеток, оставшихся после других видов лечения. Для обеспечения иммунного ответа на опухолевые антигены следует провести соответствующую иммунизацию организма поверхностными детерминантами опухоли. Известны способы иммунизации искусственно инактивированными или погибающими в результате запрограммированной смерти (апоптотическими) опухолевыми клетками. Последние экспонируют на своей поверхности фосфатидилсерин, который, в связи с его противовоспалительными свойствами, делает невозможным их использование для индукции иммунного ответа. Целью работы был поиск агентов, способных индуцировать образование мембранных везикул опухолевых клеток, которые сохраняли бы антигенные свойства опухоли и содержали мало фосфатидилсерина. Нами показано, что ингибитор АТФ-чувствительных калиевых каналов эндоплазматического ретикулума — глибенкламид вызывает образование мембранных везикул с «неапоптотическим» фенотипом, которые характеризуются относительно малыми (до 2,5 мкм) размерами, низким содержанием фосфатидилсерина, но в то же время экспрессируют на поверхности компоненты гликокаликса. Совместное действие глибенкламида и ультрафиолетового излучения типа В (315–280 нм) значительно увеличивает количество образованных мембранных везикул с низким содержанием фосфатидилсерина, сохраняя компоненты гликокаликса (основные иммунологические детерминанты опухолевой клетки). Эти везикулы и технология их образования могут стать перспективными средствами для осуществления иммунизации при аутологической иммунотерапии опухолей.

Ключевые слова: плазматическая мембрана, мембранные везикулы, противоопухолевая иммунотерапия, фосфатидилсерин, апоптоз.

MEMBRANE VESICLES FORMATION TECHNOLOGY FOR ANTICANCER IMMUNOTHERAPY

R. O. Bilyy

Institute of Cell Biology of National Academy
of Sciences of Ukraine, Lviv

E-mail: R.Bilyy@nas.gov.ua

The article is devoted to discussion of the mechanisms of inducible formation of cancer cells membrane vesicles, which would maintain their immunological (antigenic) properties and would become a perspective agent for anticancer immunotherapy. Anticancer immunotherapy is able to provide immune response of the organism towards cancer cells, and prevent the development of micro-metastases and to facilitate the elimination of the remnants of these cells, that remain after other treatments. To provide an immune response towards tumor antigens one should carry out an organism immunization with the appropriate tumor surface antigens. Some methods of immunization with inactivated or apoptotic cancer cells are known. The last provoke exposure phosphatidyl serine on their surface, which, due to its anti-inflammatory properties, making it impossible to use them for immune response induction. The work objective was screening of the agents, able to induce formation of membrane vesicles that would maintain antigenic properties of tumor and contain little of phosphatidyl serine. We have shown that inhibitor of ATP-sensitive potassium channels of endoplasmic reticulum, glibenclamide, induces formation of membrane vesicles with «non-apoptotic» phenotype, characterized by relatively small (< 2,5 μm) in size, low phosphatidyl serine content, but at the same time expressing glycocalyx composition on its surface. The combined effect of glibenclamide and ultraviolet radiation type B (315–280 nm) significantly increased the amount of formed membrane vesicles with low-phosphatidyl serine content but maintaining glycocalyx components (as main immunological determinants). These vesicles and their creation technology could be a promising mean to carry out immunization during autologous immunotherapy of tumors.

Key words: plasmatic membrane, membrane blebs, anticancer immunotherapy, phosphatidyl serine, apoptosis.