



УДК 571.27

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КЛЕТКАМИ ЛИНИИ ТНР-1 ПРИ СТИМУЛЯЦИИ *IN VITRO*

Краткое название: Продукция внеклеточных везикул клетками линии ТНР-1

А.Д. Акино¹, А.А. Рубинштейн², И.А. Головкин³, П.В. Тирикова¹, А.С. Трулев², И.В. Кудрявцев^{1,2},
А.С. Головкин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; ² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт Экспериментальной Медицины», ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; ³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Кронверкский пр., 49А, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197101

Для корреспонденции: Артур Даниил Акино, akino97@bk.ru; адрес: ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

Основные положения

- Внеклеточные везикулы (ВВ) – это мембранные объекты с молекулярным грузом внутри себя и на поверхности, выполняющие разнообразные биологические функции, связанные с межклеточным взаимодействием, поэтому являются перспективным объектом для диагностических и терапевтических целей.
- Культура клеток острого миелоидного лейкоза человека – ТНР-1 – классическая модельная моноцитарно-макрофагальная система. Спектр секретируемых этой культурой ВВ гетерогенен и недостаточно охарактеризован к настоящему времени.
- В работе проводится сравнение продуцируемых клетками ТНР-1 ВВ при воздействии различных стимуляторов.

Цель. Дать количественную и качественную характеристику внеклеточных везикул, продуцируемых клетками линии ТНР-1, в зависимости от использованного стимулятора и его дозы.

Материалы и методы. В исследовании были использованы клетки культуры ТНР-1. Для стимуляции клеток использовались: РМА (4-форбол-12-миристат-13-ацетат) в дозах 5, 16 и 50 нг/мл, ЛПС (липолисахарид) в дозах 0,1 нг/мл, 0,3 нг/мл, 1,0 нг/мл и ФНО (фактор некроза опухоли) в дозах 5, 10 и 20 нг/мл. Активация клеток оценивалась изменением уровня экспрессии CD54, а наличие апоптоза/некроза – посредством подсчета DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол)-позитивных клеток с помощью высокочувствительной проточной цитометрии (hs-FCM). Размерность продуцируемых везикул и их количественная характеристика была дана с использованием анализа траектории наночастиц (НТА). Качественная характеристика экспрессируемых поверхностных молекулярных маркеров была дана с помощью высокочувствительной многоцветной проточной цитометрии (hs-FCM).

Результаты. Стимуляция ФНО и РМА в средних и высоких дозировках приводит к нарастанию секретируемой фракции малых (30–150 нм) внеклеточных везикул, экспрессирующих тетраспаниновые маркеры (CD9, CD63). Малые дозы ФНО и РМА не приводили к достоверному приросту количества ВВ. При использовании всех дозировок ЛПС отмечалось некоторое количественное снижение ВВ в диапазоне 30-150 нм (малые ВВ). Однако средние и высокие дозы ЛПС вызывали достоверную селективную секрецию CD63-положительных ВВ при полном

отсутствии динамики изменения CD9-позитивных везикул. Активация клеток, оцениваемая по экспрессии CD54, носила дозозависимый характер и была наиболее выражена при стимуляции PMA.

Заключение. Каждый вид использованной стимуляции клеток ТНР-1 провоцирует изменение функциональной активности клеток в отношении продуцируемых ими внеклеточных везикул. При этом может меняться не только количественный, но и качественный состав продуцируемых объектов. Наиболее предпочтительными в стимуляции везикуляции оказались средние и высокие дозы ФНО и PMA. Стимуляция ЛПС в средних и высоких дозах может быть использована для получения изолированной CD63-положительной фракции ВВ.

Ключевые слова: ТНР-1 • Внеклеточные везикулы • Экзосомы • Микровезикулы • Фактор некроза опухоли • Липополисахарид • 4-форбол-12-миристан-13-ацетат

FEATURES OF EXTRACELLULAR VESICLE PRODUCTION BY THP-1 CELLS DURING *IN VITRO* STIMULATION

Running title: Production of extracellular vesicles by THP-1 cells

A.D. Akino¹, A.A. Rubinshtejn², I.A. Golovkin³, P.V. Tirikova¹, A.S. Trulev², I.V. Kudryavcev^{1,2},
A.S. Golovkin¹

¹ Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Akkuratova St., St. Petersburg, Russian Federation, 197341; ² Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, 12, Akademika Pavlova St., St. Petersburg, Russian Federation, 197022; ³ ITMO University, 49A, Kronverksky Ave., St. Petersburg, Russian Federation, 197101

For correspondence: Artur D. Akino, akino97@bk.ru; address: 2, Akkuratova St., St. Petersburg, Russian Federation, 197341

Highlights

- Extracellular vesicles (EVs) are membrane objects with inner and surface molecular cargo performing various biological functions associated with intercellular connection. Therefore, they are a promising object for diagnostic and therapeutic purposes.
- THP-1 is a human leukemia monocytic cell line and a classic model for monocyte/macrophage function and differentiation. Spectrum of THP-1-derived extracellular vesicles are heterogenic and are not to date totally clarified.
- The comparison of EVs produced by stimulated THP-1 cells is performed in the study.

Aim. Quantitatively and qualitatively characterize THP-1-derived extracellular vesicles in concordance on type and dose of used stimulators.

Methods. THP-1 cells were stimulated by PMA (4-phorbol 12-myristate 13-acetate), LPS (lipopolysaccharide) and TNF (tumor necrosis factor). Cell activation and viability were assessed by the expression of CD54 and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining respectively. Size and quantitative characteristics were assessed using nanoparticle tracking analysis (NTA). Qualitative assessment of surface molecular markers was performed by high-sensitivity multicolor flow cytometry (hs-FCM).

Results. TNF and PMA stimulation in medium and high doses led to an increase in quantity of small EVs (30–150 nm) that express tetraspanins CD9 and CD63. Low doses of TNF and PMA did not lead to a significant increase of EVs compared to control. There was a decrease in amount of small EVs (30–150 nm) in LPS-stimulated probes. However, medium and high doses of LPS stimulated selective CD63-positive EVs secretion with absence of CD9-positive events. Cell activation assessed by CD54 expression

have been dose-dependent and was most prominent under PMA stimulation.

Conclusion. Every type of THP-1 cell activators promotes changes in the functional activity of cells towards production of extracellular vesicles. Moreover, we demonstrate quantitative and qualitative difference in THP-1-derived vesicles under different stimulation conditions. Medium and high doses of PMA and TNF were the most relevant in stimulation of vesiculation. LPS-stimulation could be used to selectively obtain CD63-positive fraction of EV.

Keywords: THP-1 • Extracellular vesicles • Exosomes • microvesicles • Tumor necrosis factor • lipopolysaccharide • 4-*phorbol-12-myristate-13-acetate*

Список сокращений

ВВ – Внеклеточные везикулы

ЛПС – липополисахарид

ФНО – фактор некроза опухоли

CD – кластер дифференцировки

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

FBS – фетальная бычья сыворотка

FCS – фетальная телячья сыворотка

HS-FCM – высокочувствительная проточная цитометрия

ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1

PBS – фосфатно-солевой буфер

PMA – 4-*phorbol-12-myristate-13-acetate*

CD – cluster of differentiation

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

EVs – Extracellular vesicles

FCS – fetal calf serum

HS-FCM – high-sensitivity flow cytometry

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1 FBS – fetal bovine serum

LPS – lipopolysaccharide

PBS – phosphate buffered saline

PMA – 4-*phorbol-12-myristate-13-acetate*

TNF – tumor necrosis factor

Введение

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой гетерогенную группу мембранных структур клеточного происхождения, включающую экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [1–3]. Многие исследования показывают их вовлеченность в межклеточную коммуникацию за счет переносимого ими груза как внутри одного организма, так и между видами [4–7]. Клетки иммунной системы человека, и в частности, клетки моноцитарно-макрофагального ростка, также используют везикулы для внеклеточного взаимодействия. Уже показано, что моноцитарные и макрофагальные везикулы участвуют в регуляции ангиогенеза, коагуляционного и костного гомеостаза [8–15].

Так, в 2008 году в эксперименте *in vitro* было показано, что микровезикулы, полученные из культуры клеток THP-1, активированной эндотоксином и ионофором кальция или голоданием, вызывают апоптоз и дисбаланс тромбогенных/анти тромбогенных факторов в сторону прокоагуляции у эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) [11]. Кроме того, в этой же работе показана их возможная вовлеченность в ангиогенез за счет стимуляции образования трубочек, схожих с человеческими сосудами [11]. В дополнение к вышесказанному, внеклеточные везикулы, полученные от THP-1, обработанные пальмитиновой кислотой, стимулируют

эндотелиальную миграцию и увеличение экспрессии молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1) у тех же эндотелиальных клеток [16]. Однако везикулы из макрофагов, дифференцированных из ТНР, угнетают миграцию клеток эндотелия (HUVEC) за счет изменения экспрессии интегринов на их поверхности [17]. Стоит отметить, что везикулы, полученные из клеточной линии макрофагов крыс (Raw 264.7) оказывают противоположный эффект, а именно стимулируют ангиогенез *in vitro* и ускоряют рост сосудов *in vivo* [8].

Кроме того, внеклеточные везикулы вовлечены и в процесс воспаления. Например, ВВ, полученные непосредственно из культуры клеток ТНР-1, обладают иммуномодулирующей функцией во время инфекционного процесса [18]. Более того, везикулы из М1-поляризованных макрофагов за счет входящей в их состав *miR-1246* способствуют воспалению в височно-нижнечелюстном суставе посредством активации пути Wnt/ β -катенин, а везикулы из М2-макрофагов, несущих длинную некодирующую РНК MEG3, участвуют в воспалительных реакциях при язвенном колите [14,19]. Показана также роль ВВ в воспалительных процессах в эндотелии при артериальной гипертензии [20] и в различных инфекционных и неинфекционных заболеваниях печени [21,22]. С другой стороны, в ряде случаев у макрофагальных везикул отмечают противовоспалительные эффекты. Так макрофагальные везикулы оказывали противовоспалительный эффект путем подавления продукции цитокинов макрофагами в мышинной модели острого гепатита, индуцированного конканавалином А [23]. А С. Shi et al. обнаружили в везикулах из культуры ТНР-1 белок теплового шока 27 (HSP27), оказывающий противовоспалительное действие, ингибирующий атерогенез и снижающий уровень холестерина [24]. Все это свидетельствует о плеiotропном действии внеклеточных везикул в зависимости от стадии дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда или стимулятора, действовавшего на них.

Использованная во многих описанных выше экспериментах культура ТНР-1 – это клетки моноцитарного ряда человека, полученные от больного острым миелоидным лейкозом. Данная культура уже показала свою состоятельность в моделировании поляризации и функциональных особенностей моноцитов и макрофагов [25–27]. В литературе описано множество способов стимуляции и поляризации ТНР-1. В том числе используются протоколы стимуляции с использованием липополисахарида (ЛПС) [21, 25, 28–32], форбол 12-миристат 13-ацетата (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) [27, 33–36] и фактора некроза опухолей (ФНО) [37, 38]. Однако характеристика внеклеточных везикул, выделяемых стимулированными клетками ТНР-1, а также обуславливающих их множественную биологическую функцию, дана недостаточно. Целью нашей работы стала количественная и качественная характеристика внеклеточных везикул, продуцируемых клетками линии ТНР-1, в зависимости от использованного стимулятора и его дозы.

Материалы и методы

Культивирование и стимуляция клеток культуры ТНР-1

Культура опухолевых моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 («Российская коллекция клеточных культур института цитологии РАН», Россия) содержалась и выращивалась в питательной среде RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамин («Биолот», Санкт-Петербург), гентамицина и 10% эмбриональной сыворотки теленка («Hyclone», США) во флаконе для культивирования клеток в условиях инкубатора при температуре 37 °C и с 5%-ым содержанием CO₂ в воздухе, как это было описано ранее [39]. Пассажиrowание клеток проводилось два раза в неделю с интервалом в 2–3 дня. Кратность пересева составляла 1:4.

Затем собрали 22,5 миллионов клеток, отмыли в свежей среде RPMI1640 (Биолот, Москва, Россия) без сыворотки и развели в RPMI1640 с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) в концентрации 500 тысяч клеток в миллилитре. После этого вносили клетки в лунки 6-луночного планшета в объёме 3 мл на лунку (по $1,5 \times 10^6$ клеток). Затем к клеткам добавили стимуляторы TNF

(Biolegend, конечные концентрации 5, 10 и 20 нг/мл), или PMA (Sigma Aldrich, конечные концентрации 5, 16 и 50 нг/мл), или бактериальный липополисахарид (ЛПС, Sigma Aldrich, конечные концентрации 0,1 нг/мл, 0,3 нг/мл, 1,0 нг/мл). В качестве отрицательного контроля к клеткам добавили равный объем питательной среды PRMI-1640. После чего клетки инкубировали сутки при 37 °C и 5% CO₂ в течение суток. По окончании инкубации содержимое лунок собирали и центрифугировали 15 минут со скоростью 1 500 g, надосадки отобрали в свежие пробирки и повторно центрифугировали 15 минут со скоростью 1 500 g, затем надосадок переносили в свежие пробирки и центрифугировали 15 минут со скоростью 3 000 g. Надосадок отбирали в свежие пробирки замораживали и хранили при –70 °C до дальнейшего использования. Все эксперименты делали в тройных повторах.

После разморозки при комнатной температуре образцы фракционировали при помощи центрифугирования (30 минут при 16 000 g). После чего надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 µl DPBS без Ca и Mg (Биолот, Москва, Россия).

Иммунофенотипирование клеток THP-1

Окрашивание клеток культуры THP-1 проводили через 24 часа после стимуляции с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флюорофорами: anti-CD54-PE (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США), anti-CD209-PE (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США) и anti-CD16-PC7 (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США). Окрашивание образцов проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Кратко, 100 мкл суспензии клеток THP-1 окрашивали вышеуказанными антителами при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте. Затем все образцы дважды промывались (330 g в течение 7 мин) стерильным PBS с добавлением 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (Sigma-Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури, США), ресуспендировали в 200 мкл свежего PBS. Для удаления погибших клеток из зоны анализа, а также для определения жизнеспособности клеток линии THP-1 в ответ на стимуляцию применяли ДНК-связывающий краситель DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США) в финальной концентрации 10 нг/мл, как это было показано ранее [40].

Иммунофенотипирование внеклеточных везикул

Окрашивание внеклеточных везикул проводили с использованием следующих моноклональных антител, конъюгированных с флюорофорами: anti-CD54-PE (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США), Annexin V-FITC (BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США), anti-CD14-KromeOrange (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США), anti-CD9-PE/Cy7 (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США), anti-CD63-APC (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США). 100 мкл ранее фракционированного образца окрашивали 1 мкл соответствующих антител в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Окрашенный образец разбавляли DPBS до исчезновения эффекта наложения (co-incidence) по ранее описанной методике [41–43]. Рабочими разведениями для цитометрии были 1:50 и 1:100 в зависимости от использованной панели и концентрации детектируемых частиц.

Анализ внеклеточных везикул проводился с использованием проточного лазерного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США). Настройка калибровки прибора была выполнена с использованием эталонного набора Cytometry Sub-Micron Particle Size Reference Kit, молекулярных зондов от Life Technologies, а также Megamix-Plus FSC и Megamix-Plus SSC (Bioscytex, Марсель, Франция), содержащих FITC-меченые частицы различных известных диаметров. Все контроли, в том числе контроль наличия мембран с использованием детергентов, контроль ложноположительных и ложноотрицательных результатов были выполнены в

соответствии с ранее опубликованными требованиями [6, 44] и ранее описанными нашей группой [41, 42, 45].

Анализ и оценку полученных результатов фенотипирования клеток и внеклеточных везикул проводили в программной среде Cytexpert 2.4 (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США) и Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Западный Сакраменто, Калифорния, США).

Анализ траектории наночастиц (NTA)

Для определения размера и концентрации исследуемых внеклеточных везикул использовали прибор NanoSight (NanoSight Ltd, Amesbury, United Kingdom), оборудованный синим лазером (488 нм). Перед анализом образцы были разбавлены в 1 мл ультрачистой воды, полученной из прибора MiliPore_(Merck Milipore, Burlington, Massachusetts, USA), в соотношении 1:10 для создания оптимальной концентрации частиц для проведения анализа. Видеофиксацию результатов исследования проводили в режиме равномерной потоковой подачи образца в 5 технических повторах в течение 60 сек каждый.

Полученные изображения оценивали визуально, с использованием программного обеспечения NTA 3.4 NanoSight (NanoSight Ltd, Amesbury, United Kingdom). Полученные видео процессировали с использованием программного обеспечения NTA 3.4 для отслеживания траекторий движения всех частиц. Полученные результаты количества частиц анализировали в 4 диапазонах размерности: менее 30 нм, 30–150 нм, 150–400 нм и более 400 нм. Частицы менее 30 нм и более 400 нм были исключены из анализа для нивелирования влияния нецелевых частиц и апоптотических тел, соответственно. Согласно литературным данным в диапазоне размерности 30–150 нм находятся популяции внеклеточных везикул называемая экзосомы (далее малые ВВ), а частицы в диапазоне 150–400 нм являются популяцией микровезикул (далее средние ВВ) [1, 2, 46, 47]. Все измерения проводились при температуре 26,1–27,1 °С, определенной с помощью термометра, прикрепленного к камере с образцом. Фон всех видеоданных был автоматически извлечен перед отслеживанием частиц. Диаграммы распределения по размерам, значения среднего и стандартные отклонения были рассчитаны в программе NTA 3.4 и использованы для последующего анализа.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica 12.0 (StatSoft, Талса, Оклахома, США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Данные с проточного цитометра представлены в виде количества положительных событий в микролитре, а результаты с анализатора траектории наночастиц в виде количества частиц в миллилитре. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха: Me (25;75). Сравнение средних значений в выборках осуществляли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Активация клеток культуры ТНР-1

Для оценки активации клеток изучали изменение уровня экспрессии молекул клеточной адгезии CD54 (ICAM-1), CD209, CD 16 и CD14. При стимуляции клеток ТНР-1 в возрастающих концентрациях ФНО (5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл), ЛПС (0,1 нг/мл, 0,3 нг/мл, 1,0 нг/мл) и РМА (5 нг/мл, 16 нг/мл, 50 нг/мл) во всех образцах наблюдалось увеличение экспрессии CD54 по сравнению с контрольными образцами (рис. 1). Наиболее выраженное усиление экспрессии было при стимуляции РМА и носило дозозависимый характер (рис. 1В).

Все клетки, как в контроле, так и при стимуляции конститутивно экспрессировали CD16, CD14 и CD209. Уровень их экспрессии не менялся при использовании стимуляторов.

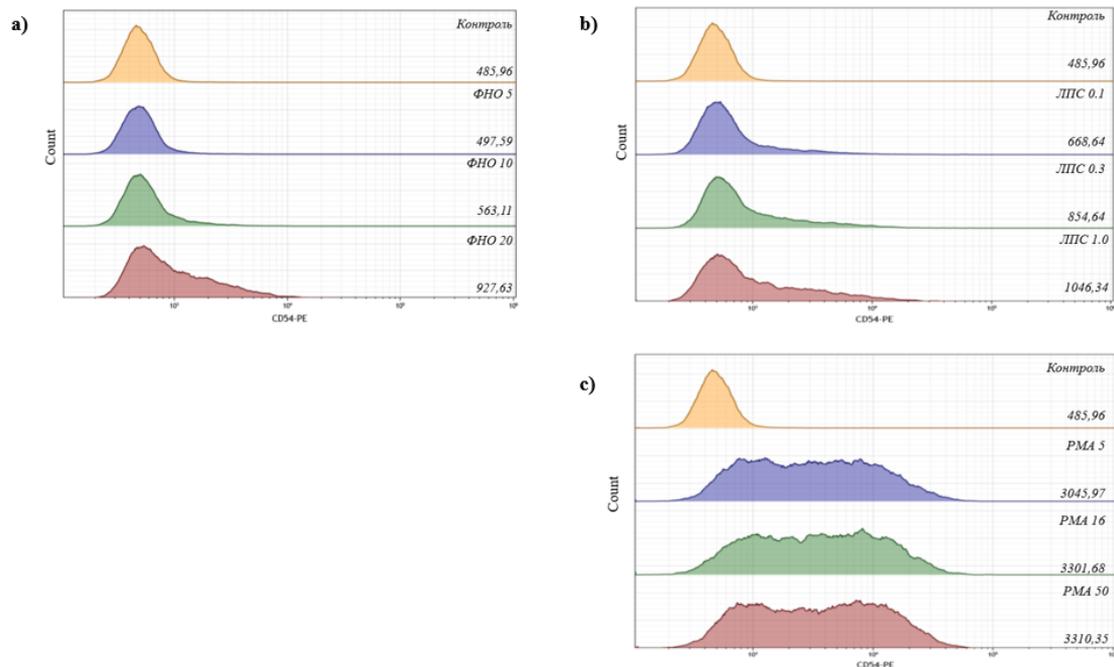


Рисунок 1. Сравнительная характеристика активации клеток THP-1 по интенсивности флюоресценции флуорохромов связавшихся антител: А – интенсивность флюоресценции при стимуляции ФНО в дозах 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл; В – интенсивность флюоресценции при стимуляции ЛПС в дозах 0,1 нг/мл, 0,3 нг/мл, 1,0 нг/мл; С – интенсивность флюоресценции при стимуляции PMA в дозах 5 нг/мл, 16 нг/мл, 50 нг/мл

Примечание: Значения представлены в виде геометрического значения интенсивности флюоресценции CD54 по каналу фикоэритрина (PE). Дозы стимуляторов выражены в нг/мл.

Picture 1. Comparative characteristics of THP-1 cells activation by fluorescence intensity: А – fluorescence intensity during LPS stimulation at doses 5 ng/mL, 10 ng/mL and 20 ng/mL; В – fluorescence intensity during LPS stimulation at doses 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL and 1.0 ng/mL; С – fluorescence intensity during PMA stimulation at doses of 5 ng/mL, 16 ng/mL, 50 ng/mL

Note: Values are presented as a geometric value of CD54 fluorescence intensity over the phycoerythrin (PE) channel. Doses of stimulants are provided as nanograms per milliliter (ng/mL).

Стимуляция ФНО и ЛПС не приводила к значимому апоптозу/некрозу. Соотношение живых и погибших клеток в опытных образцах значимо не отличались от такового в контрольных (рис. 2). При использовании PMA наблюдалось достоверное увеличение количества погибших клеток, повышающееся по мере повышения дозы PMA (рис. 2).

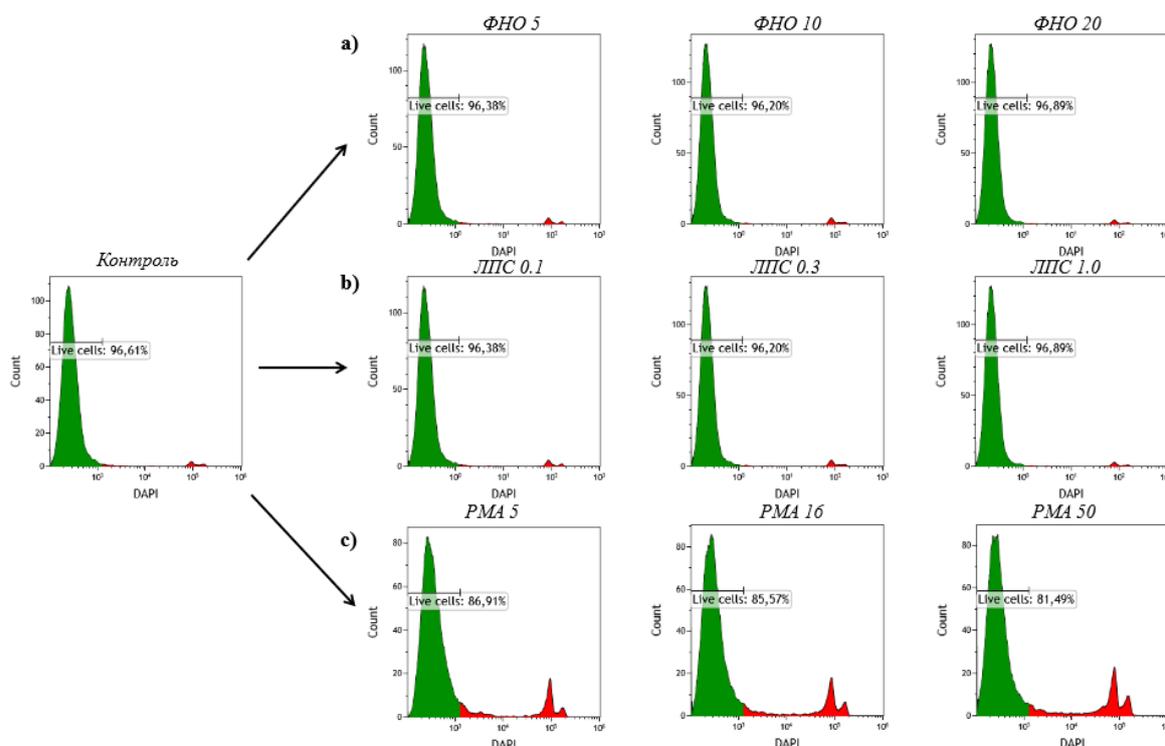


Рисунок 2. Процент живых клеток из культуры ТНР-1 через 24 часа после стимуляции, оцененный с помощью DAPI: А – стимуляция ФНО в дозах 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл; В – стимуляция ЛПС в дозах 0,1 нг/мл, 0,3 нг/мл, 1,0 нг/мл; С – PMA в дозах 5 нг/мл, 16 нг/мл и 50 нг/мл

Figure 2. Percentage of live cells from THP-1 culture 24 hours after stimulation estimated using DAPI: A – TNF stimulation at doses of 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL; B – LPS stimulation at doses of 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL, 1.0 ng/mL; C – PMA at 5 ng/mL, 16 ng/mL and 50 ng/mL

Размерность и концентрация внеклеточных везикул

Средние размеры ВВ, измеренной с помощью NTA, по фракциям и суммарно представлены в табл. 1. Статистически значимых различий размера частиц при использовании разных стимуляторов не наблюдалось как в сравнении с контролем, так и между собой.

Таблица 1. Размеры внеклеточных везикул

Table 1. Sizes of extracellular vesicles

	30–150 нм	150–400 нм
Контроль	89,8±1,0	191,4±2,3
ФНО 5	88,9±1,3	196,2±4,1
ФНО 10	88,7±1,0	196,0±3,2
ФНО 20	87,0±1,0	187,8±1,3
ЛПС 0.1	89,9±1,5	190,5±4,2
ЛПС 0.3	93,9±1,7	193,7±2,0

<i>ЛПС 1,0</i>	90,8±2,8	192,3±3,9
<i>РМА 5</i>	91,1±1,2	186,5±3,0
<i>РМА 16</i>	89,8±0,7	184,5±2,1
<i>РМА 50</i>	88,8±0,4	187,6±3,5

Концентрации ВВ были рассчитаны с помощью анализа траектории наночастиц в каждом диапазоне размерности. Конечные концентрации представлены в табл. 2.

При всех видах стимуляции во всех дозах в диапазоне размерности частиц 150–400 нм не обнаружилось статистически значимых отличий в концентрациях частиц как по сравнению с контролем, так и между группами. Все достоверные различия были обнаружены у частиц размером 30–150 нм. Наблюдалось достоверное увеличение концентрации частиц при стимуляции ФНО в дозах 10 нг/мл и 20 нг/мл по сравнению с контролем ($p = 0,0002$ и $p < 0,0001$, соответственно). При воздействии ЛПС в дозах 0,3 нг/мл и 1,0 нг/мл было достоверное снижение количества частиц по сравнению с контрольными образцами ($p = 0,0193$ и $p = 0,0080$, соответственно). При дозах РМА 16 нг/мл и 50 нг/мл количество продуцируемых частиц увеличивалась в 3,4 и в 2,3 раза в сравнении с контролем, соответственно ($p = 0,0057$ и $p = 0,0007$). Низкие дозы каждого из стимуляторов (ФНО 5 нг/мл, ЛПС 0,1 нг/мл и РМА 5 нг/мл) не приводили к достоверному изменению в концентрации продуцируемых частиц.

Таблица 2. Концентрации продуцируемых внеклеточных везикул (частиц/мл) в диапазоне 30–150 нм и 150–400 нм Me (25;75)

Table 2. Concentrations of THP-derived EVs (particles/ml) in the range of 30–150 nm and 150–400 nm Me (25;75)

	<i>30–150 нм</i>	<i>150–400 нм</i>
<i>Контроль</i>	11,3*10 ⁸ (8,53*10 ⁸ ; 11,7*10 ⁸)	1,57*10 ⁸ (1,46*10 ⁸ ; 1,64*10 ⁸)
<i>ФНО 5</i>	13,0*10 ⁸ (12,0*10 ⁸ ; 13,5*10 ⁸)	1,87*10 ⁸ (1,57*10 ⁸ ; 2,31*10 ⁸)
<i>ФНО 10</i>	29,3*10 ⁸ (16,9*10 ⁸ ; 38,3*10 ⁸) ^	2,43*10 ⁸ (1,74*10 ⁸ ; 2,80*10 ⁸)
<i>ФНО 20</i>	29,7*10 ⁸ (19,9*10 ⁸ ; 38,3*10 ⁸) ^	2,35*10 ⁸ (1,68*10 ⁸ ; 2,95*10 ⁸)
<i>ЛПС 0,1</i>	8,34*10 ⁸ (5,27*10 ⁸ ; 9,33*10 ⁸)	1,11*10 ⁸ (0,95*10 ⁸ ; 1,33*10 ⁸)
<i>ЛПС 0,3</i>	5,57*10 ⁸ (4,65*10 ⁸ ; 7,31*10 ⁸) ^	1,21*10 ⁸ (0,97*10 ⁸ ; 1,24*10 ⁸)
<i>ЛПС 1,0</i>	6,84*10 ⁸ (6,08*10 ⁸ ; 7,68*10 ⁸) ^	1,48*10 ⁸ (1,44*10 ⁸ ; 1,61*10 ⁸)
<i>РМА 5</i>	9,57*10 ⁸ (9,30*10 ⁸ ; 12,1*10 ⁸)	1,37*10 ⁸ (1,33*10 ⁸ ; 1,73*10 ⁸)
<i>РМА 16</i>	37,5*10 ⁸ (12,1*10 ⁸ ; 44,8*10 ⁸) ^	1,80*10 ⁸ (1,75*10 ⁸ ; 1,84*10 ⁸)

РМА 50	25,8*10 ⁸ (16,4*10 ⁸ ; 43,2*10 ⁸) ^	2,37*10 ⁸ (1,93*10 ⁸ ; 2,55*10 ⁸)
--------	---	---

Примечание: ^ $p < 0,01$ достоверность отличий с контролем.

Note: ^ $p < 0.01$ statistically significant difference from control.

Имунофенотипирование внеклеточных везикул, продуцируемых клетками линии ТНР-1

Количество Аннексин V положительных событий достоверно увеличивалось по сравнению с контролем только в случае стимуляции ФНО в высокой дозировке. Стимуляция другими индукторами во всех дозировках не приводила к достоверному изменению концентрации Аннексин V-позитивных ВВ.

Количество CD9-позитивных событий не изменялась при стимуляции липополисахаридом во всех дозах, а также при воздействии низких доз ФНО и РМА. Наблюдалось увеличение CD9-положительных событий при стимуляции ФНО и РМА в средних и больших дозировках. Так после стимуляции ФНО в дозе 10 нг/мл и 20 нг/мл было отмечено достоверное увеличение по сравнению с контролем ($p = 0,0014$ и $p = 0,0084$, соответственно). Аналогично при сравнении с контролем наблюдалось достоверное увеличение уровня ВВ после воздействия РМА в дозе 16 нг/мл и 50 нг/мл ($p = 0,0003$ и $p = 0,0002$ соответственно).

При воздействии всех видов стимуляторов в низких дозах не было найдено отличий по сравнению с контрольным образцом в уровне продуцируемых CD63-позитивных ВВ. При стимуляции ФНО в дозе 10 нг/мл и 20 нг/мл количество CD63+ везикул увеличивалось по сравнению с контролем ($p = 0,0016$ и $p = 0,0101$, соответственно). Количество CD63-положительных событий достоверно увеличивалось по сравнению с контролем после обработки РМА в дозе 16 нг/мл и 50 нг/мл ($p = 0,0303$ и $p = 0,0062$, соответственно). После стимуляции ЛПС в дозе 0,3 нг/мл и 1,0 нг/мл количество CD63-позитивных ВВ также достоверно ($p = 0,0357$ и $p = 0,0357$) увеличивалось.

Количество продуцируемых CD54+ ВВ при стимуляции ФНО 10 нг/мл и 20 нг/мл увеличивалось в 18 и в 29 раз, соответственно. При использовании других стимулов изменения были менее выраженными. При использовании РМА количество ВВ достоверно увеличивалось с случае использования всех дозировок. В то время как ЛПС, наоборот, в любой из дозировок не вызывал достоверного увеличения продуцируемых CD54+ ВВ.

Количество продуцируемых CD14+ ВВ во всех случаях было незначительным и не менялось при использовании стимуляторов.

Результаты фенотипирования внеклеточных везикул представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты иммунофенотипирования внеклеточных везикул, продуцируемые клетками ТНР-1 (событий/мкл), Me (25;75)

Table 3. Results of immunophenotyping of TNP-derived EVs (events/ μ l), Me (25;75)

	<i>Annexin V</i>	<i>CD9</i>	<i>CD63</i>	<i>CD54</i>	<i>CD14</i>
<i>Контроль</i>	442,00 (122,00; 966,00)	57,50 (31,75; 96,00)	26,00 (20,50; 44,00)	18,25 (5,50; 20,00)	9,00 (8,00; 9,00)
<i>ФНО 5</i>	140,00 (99,00; 190,00)	121,00 (63,50; 170,00)	97,50 (28,00; 177,50)	31,5 (9,50; 128,75) *	11,50 (9,25; 13,75)
<i>ФНО 10</i>	2491,00 (309,75; 3200,00)	897,50 (445,75; 2123,50) *	280,50 (172,50; 445,50) *	329 (43; 1177) *	12,50 (10,00; 13,00)

<i>ФНО 20</i>	3378,00 (215,00; 4242,00) *	872,00 (286,50; 2746,00) *	240,00 (190,00; 509,00) *	538,25 (27,50; 1215,50) *	11,00 (8,00; 15,75)
<i>ЛПС 0.1</i>	92,50 (86,50; 195,00)	11,00 (10,50; 39,00)	98,00 (43,00; 315,00)	9,5 (8,00; 15,50)	7,00 (6,00; 11,50)
<i>ЛПС 0.3</i>	141,50 (104,00; 298,00)	17,50 (8,00; 86,00)	194,00 (191,50; 1005,00) *	18,75 (12,25; 26,50)	10,25 (9,50; 16,75)
<i>ЛПС 1.0</i>	129,50 (95,50; 317,00)	19,50 (10,50;167,00)	178,00 (63,00; 746,00) *	24,25 (18,00; 49,50)	10,25 (7,75; 15,25)
<i>РМА 5</i>	155,00 (133,50; 197,00)	282,00 (115,50; 320,00)	56,00 (21,00; 142,00)	28,75 (28,00; 37,00)	8,00 (5,00; 11,50)
<i>РМА 16</i>	1596,00 (132,00; 2246,00)	684,00 (358,00; 1590,00) *	158,00 (58,00; 560,50) *	44,50 (32,00; 77,50) *	8,50 (5,00; 16,50)
<i>РМА 50</i>	2085,00 (315,50; 2630,50)	946,75 (647,50; 2255,50) *	196,50 (92,00; 640,00) *	37,00 (27,50; 77,00) *	15,25 (13,50; 17,00)

Примечание: * $p < 0,05$ достоверность отличий с контролем

Note: * $p < 0.05$ statistically significant difference from control

Обсуждение

Стимуляция клеток ФНО во всех использованных дозах не приводила к значимой гибели клеток по сравнению с контролем (рис. 2). Вместе с тем продукция внеклеточных везикул имела определенный профиль. При использовании средней и высокой дозы стимула отмечалось достоверное увеличение продукции ВВ до 150 нм в диаметре, но не более крупных объектов (рис. 3). Достоверно увеличивалось количество CD9+, CD63+, CD54+ ВВ. При этом уровень аннексин-позитивных событий менялся только в случае использования максимальной дозировки ФНО, но изменение было незначительное ($p = 0,030$). Также важным может оказаться, что экспрессия CD54 на цитоплазматической мембране клеток ТНР-1 была увеличена в результате стимуляции фактором некроза опухоли.

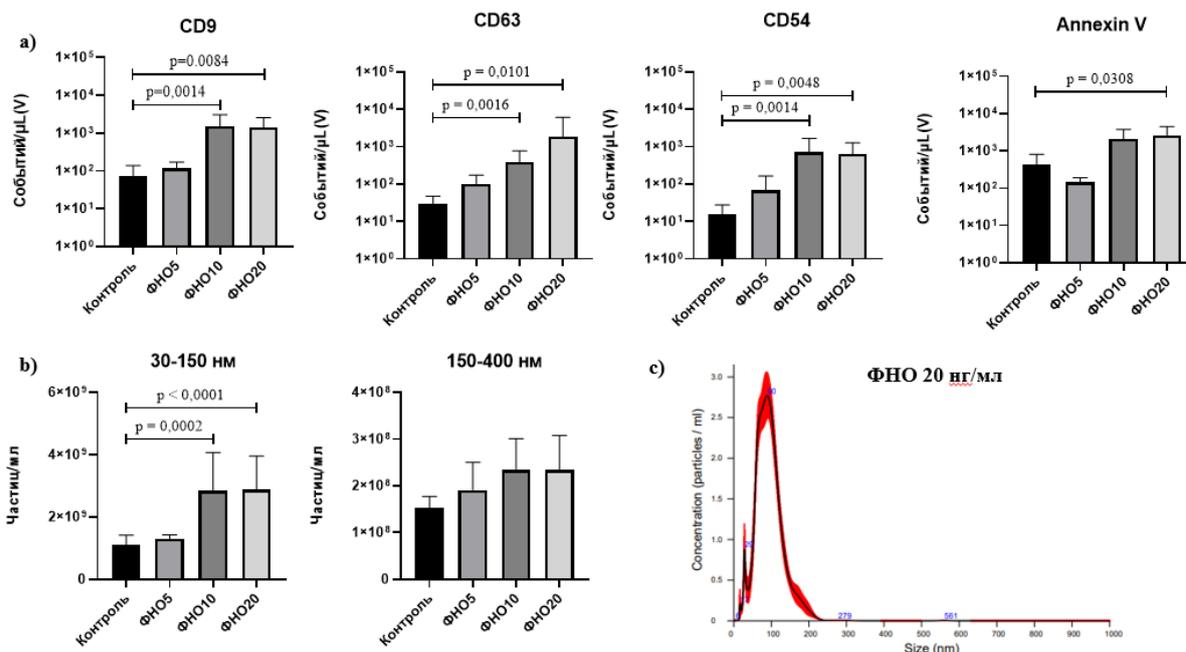


Рисунок 3. Характеристика внеклеточных везикул, продуцируемых клетками ТНР-1 при их стимуляции ФНО: А – сравнительная характеристика эффектов различных доз ФНО на продукцию ВВ; В – количественная характеристика ВВ в различных диапазонах размерности; С – график концентрация/размер ВВ после стимуляции ФНО в дозе 20 нг/мл
Figure 3. Characteristics of THP-derived EVs upon TNF stimulation: A – comparative characterization of the effects of different doses of TNF on the EVs production; B – quantitative characterization of different size ranges of EVs; C – concentration/size graph of EVs after TNF stimulation at a dose of 16 ng/mL

Использование ЛПС в качестве стимулятора также не приводило к увеличению уровня апоптоза клеток. Вместе с тем, повышенная экспрессии ICAM-1 на цитоплазматической мембране ЛПС-активированных клеток ТНР-1, не привела к увеличению уровня CD54-позитивных везикул. Было отмечено увеличение количества только продуцируемых CD63+ ВВ при средних и высоких дозировках индуктора. Уровень продукции везикул, позитивных по другим изучаемым маркерам достоверно не менялся (рис. 4). Мало того, в отличие от двух других стимуляторов, воздействие ЛПС приводило не к увеличению, а к снижению продукции ВВ даже в высоких дозировках.

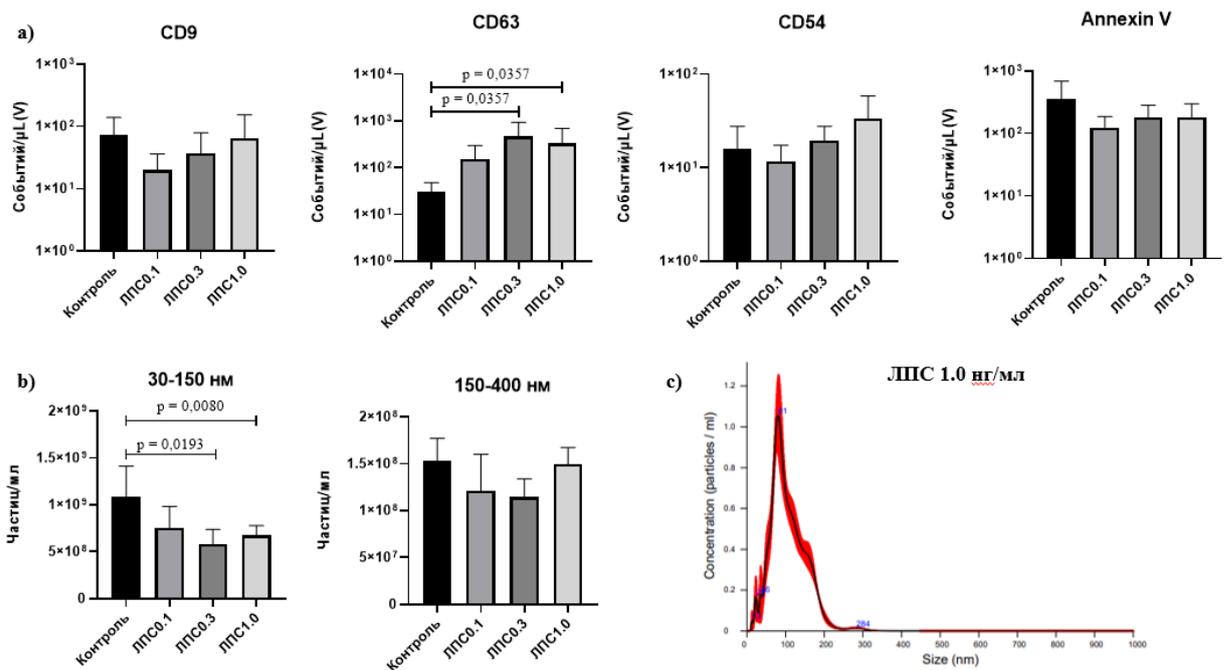


Рисунок 4. Характеристика внеклеточных везикул, продуцируемых клетками ТНР-1 при их стимуляции ЛПС: А – сравнительная характеристика эффектов различных доз ЛПС на продукцию ВВ; В – количественная характеристика ВВ в различных диапазонах размерности; С – график концентрация/размер ВВ после стимуляции ЛПС в дозе 1.0 нг/мл
Figure 4. Characteristics of THP-derived EVs upon LPS stimulation: A – comparative characterization of the effects of different doses of LPS on the EVs production; B – quantitative characterization of different size ranges of EVs; C – concentration/size graph of EVs after LPS stimulation at a dose of 16 ng/mL

Применение РМА в любых дозировках приводило к увеличению доли DAPI-позитивных событий, то есть к увеличению доли клеток в апоптозе/некрозе. Вместе с тем, отмечался достоверный прирост количества ВВ в диапазоне размеров 30–150 нм при стимуляции РМА в дозе 16 и 50 нг/мл, но в диапазоне 150–400 нм – прироста не было (рис. 5). По-видимому, прирост происходило за счет CD9+, CD63+, CD54+ ВВ. При этом количество CD54+ ВВ повышалось при всех дозах стимулятора и положительно коррелировало с выраженной экспрессии ICAM-1 на поверхности ТНР-1.

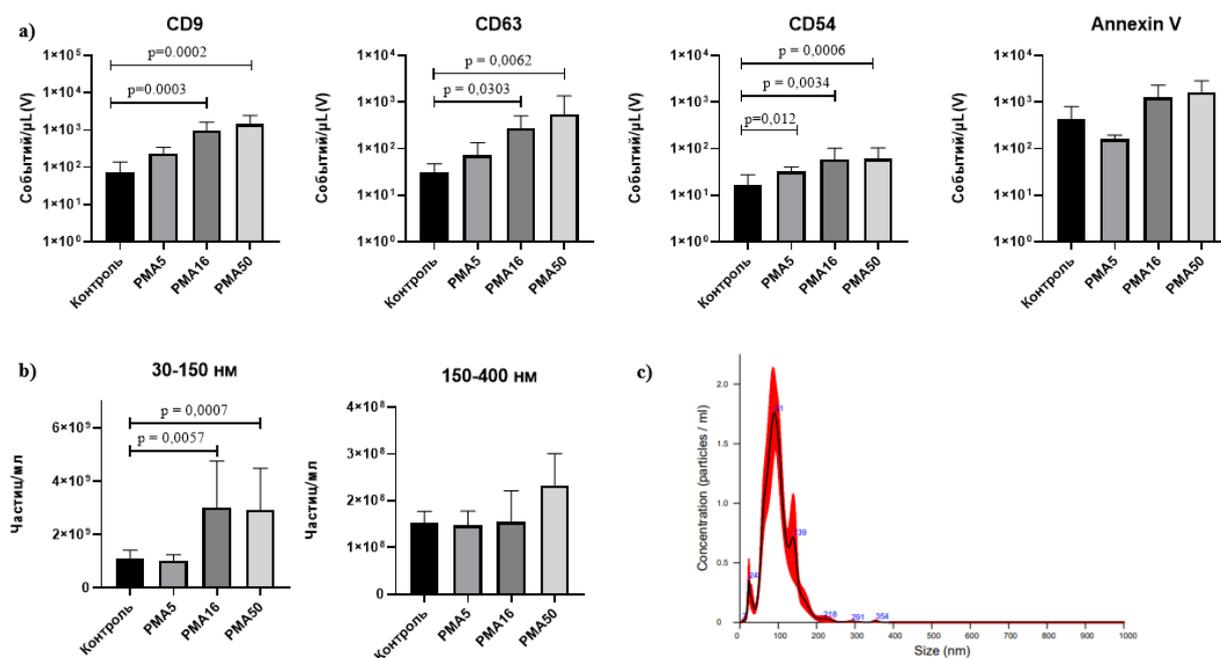


Рисунок 5. Характеристика внеклеточных везикул, секретируемых клетками линии ТНР-1 при стимуляции PMA: А – сравнительная характеристика эффектов различных доз PMA на продукцию ВВ; В – количественная характеристика ВВ в различных диапазонах размерности; С – график концентрация/размер ВВ после стимуляции PMA в дозе 16 нг/мл
Figure 5. Characteristics of THP-derived EVs upon PMA stimulation: A – comparative characterization of the effects of different doses of PMA on the production of EVs; B – quantitative characterization in different size ranges of EVs; C – concentration/size graph of EVs after PMA stimulation at a dose of 16 ng/mL

Таким образом, использование трех разных клеточных активаторов приводило к изменению функциональной активности ТНР-1, проявляющейся в изменении профиля продуцируемых внеклеточных везикул. Для оценки активации клеток изучали уровень экспрессии молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1) или CD54. Известно, что при действии провоспалительных цитокинов, в том числе ФНО α , в лейкоцитах наблюдается увеличение экспрессии ICAM-1. Более того, CD54 может быть использован как косвенный маркер активации антигенпрезентирующих клеток, а его экспрессию связывают с активацией и сборкой NLRP3 инфламсомы в клетках ТНР-1 [48, 49].

Для изучения профиля продуцируемых внеклеточных везикул проводили их фенотипирование. Наличие мембраны в изучаемых объектах подтверждали позитивным окрашиванием на Аннексин V, способный связываться с фосфотидилсерином фосфолипидных мембран. Кроме того, оценивали уровень везикул, позитивных по наличию в их структуре тетраспаниновых рецепторов – CD9 и CD63. Все тесты и методы являются рекомендованными к применению в случае проведения исследовательских работ по изучению ВВ [6]. Наличие на поверхности мембраны тетраспаниновых рецепторов связано с процессом упаковки груза во время их образования в мультивезикулярных тельцах, поэтому именно тетраспанин-положительные везикулы представляют интерес с точки зрения переноса сигнальных молекул [50–53]. При анализе везикул также использовался CD54, с помощью которого оценивалась активации клеток ТНР-1. И последним выбранным маркером был CD14, как маркер дифференцировки моноцитарно-макрофагального звена, а также молекула, способная связывать LPS/LBP – комплексы [54].

Стимуляция клеток с помощью ФНО и РМА показала схожие результаты в количественном и качественном отношении (рис. 6, 7). Однако стоит отметить, что только при применении средних и высоких доз ФНО и РМА наблюдалось достоверное повышение уровня внеклеточных везикул, хотя по количеству продуцируемых клетками везикул при использовании двух стимуляторов они не отличались. Вместе с тем, несмотря на фенотипическую схожесть продуцируемых ВВ при действии ФНО и РМА, внутренний состав их может оказаться различным. Важным моментом при обеих стимуляциях оказалось отсутствие дубль позитивных популяций CD9+ и CD63+ ВВ, что может говорить об их независимом образовании. Таким образом, в общей массе внеклеточных везикул отчетливо формируются везикулы, несущие либо один, либо другой тетраспаниновый маркер.

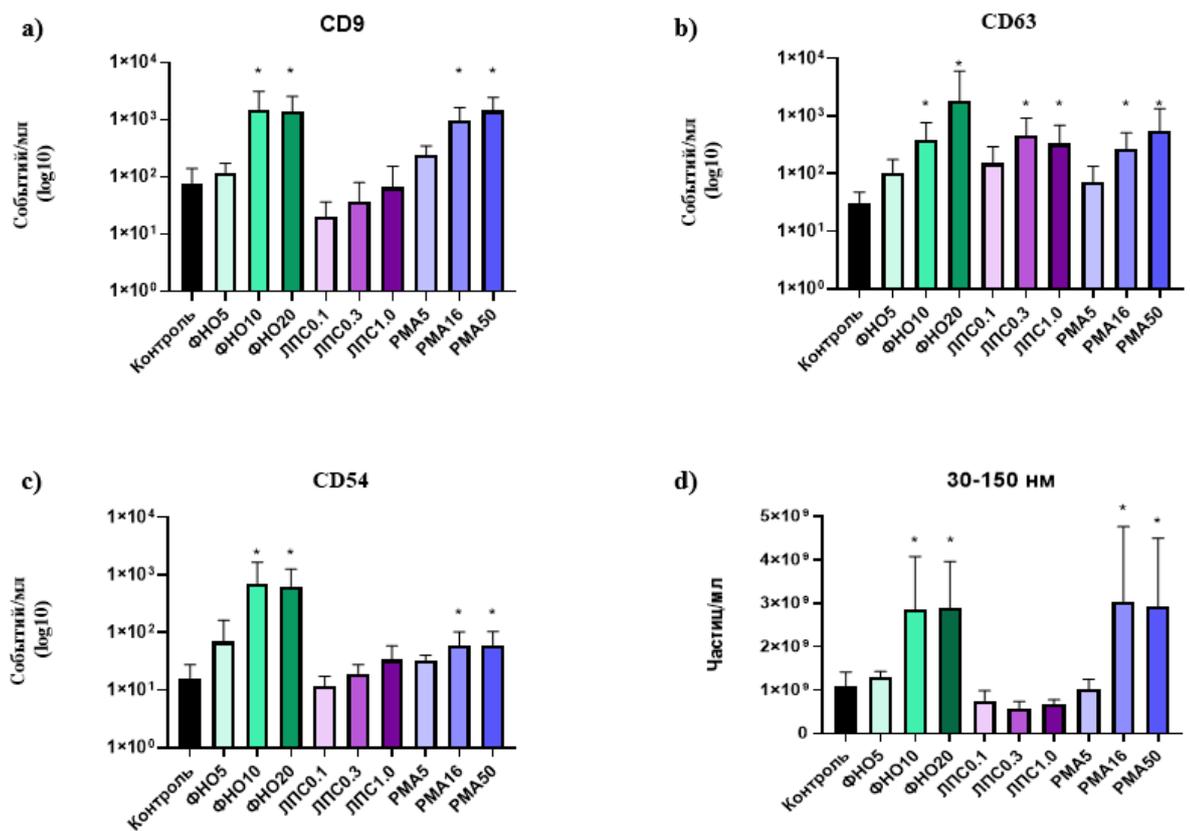


Рисунок 6. Сравнительная характеристика продуцируемых внеклеточных везикул клетками THP-1 при использовании различных стимуляторов: А – количество CD9+ ВВ; В – количество CD63+ ВВ; С – количество CD54+ ВВ; D – общее количество ВВ в диапазоне размерности 30–150 нм по данным NTA

Figure 6. Comparative characterization of THP-derived EVs using various stimulants. A – number of CD9+ EVs. B – number of CD63+ EVs. C – number of CD54+ EVs. D – the total number of EVs in the 30–150 nm range according to NTA data

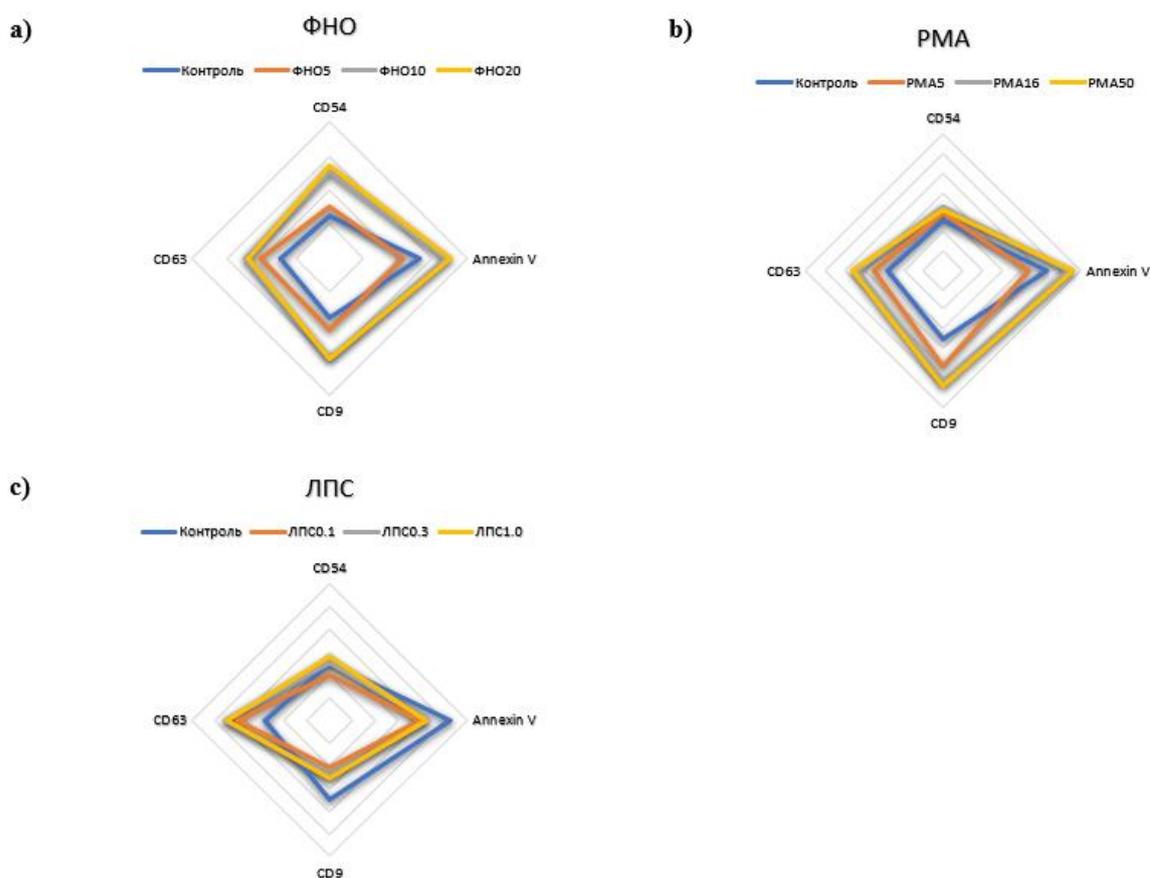


Рисунок 7. Фенотипический профиль продуцируемых клетками ТНР-1 ВВ при воздействии различных стимуляторов

Примечание: Значения количества положительных событий в микролитре представлены в виде десятичного логарифма.

Figure 7. Phenotypic profile of THP-derived EVs upon exposure to various stimulants

Note: Values for the number of positive events per microliter are presented as a base 10 logarithm.

Наличие молекулы ICAM-1 на поверхности ВВ может говорить о том, что часть полученных везикул образовалась путем «почкования» от цитоплазматической мембраны и является микровезикулами, а не экзосомами [55, 56]. В пользу этого говорит и наличие дубль-положительных событий по CD54 и Аннексину V, так как последний связывает фосфотидилсерин, который конститутивно присутствует в структуре клеточных мембран [57].

Отличительной особенностью стимуляции РМА оказалась наибольшая в процентном соотношении активация клеток, оцененная по экспрессии CD54, по сравнению с контролем и другими видами стимуляции. Кроме того, нельзя не отметить, что при воздействии РМА во всех дозах наблюдалась клеточная гибель, которая усугублялась с увеличением дозы. И хоть при оценке самих везикул по сравнению с полученными при стимулировании ФНО достоверной разницы не было, необходимо учитывать возможное присутствие апоптотических тел.

Низкие дозы ФНО и РМА не являются предпочтительными в выборе доз стимуляции для получения везикул в виду отсутствия достоверного изменения количественного и качественного профиля продуцируемых ВВ.

Стимуляция липополисахаридом во всех дозировках достаточна для активации клеток ТНР-1, но негативно сказывается на общем фоне образования внеклеточных везикул. При использовании всех

дозировок ЛПС отсутствовало количественное нарастание продукции ВВ, и даже отмечалось некоторое их снижение в диапазоне размерности 30-150 нм (малые ВВ). Однако липополисахарид в дозе 0,3 и 1,0 нг/мл вызывал селективную секрецию CD63-положительных ВВ при полном отсутствии динамики изменения CD9-позитивных везикул. Подобную особенность можно в дальнейшем использовать для получения изолированной CD63-положительной популяции внеклеточных везикул. Более того, подобный эффект может быть связан с функциональными особенностями CD63-положительной фракции при взаимодействии с липополисахаридом грамотрицательных бактерий.

Таким образом, каждый вид использованной стимуляции клеток THP-1 провоцирует изменение функциональной активности клеток в отношении продуцируемых ими внеклеточных везикул. При этом может меняться не только количественный, но и качественный состав продуцируемых объектов.

Конфликт интересов

А.Д. Акино заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Рубинштейн заявляет об отсутствии конфликта интересов. И.А. Головкин заявляет об отсутствии конфликта интересов. П.В. Тирикова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.С. Трулев заявляет об отсутствии конфликта интересов. И.В. Кудрявцев заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.С. Головкин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20076).

Информация об авторах

Акино Артур Даниил, младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», ассистент кафедры клеточной биологии и гистологии и кафедры патологической физиологии института медицинского образования федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-6516-7184

Akino Arthur Daniil, junior researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center “Center for Personalized Medicine”, assistant at the Department of Cell Biology and Histology and the Department of Pathophysiology, Institute of Medical Education of the Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-6516-7184

Рубинштейн Артем Аркадьевич, лаборант-исследователь лаборатории клеточной иммунологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8493-5211

Rubinshtein Artem A., research laboratory assistant at the Laboratory of Cellular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8493-5211

Головкин Иван Алексеевич, студент федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Российская Федерация;
Golovkin Ivan A., student at the ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation;

Тирикова Полина Валерьевна, студент лечебного факультета института медицинского образования федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4433-1640
Tirikova Polina V., student at the medical faculty, Institute of Medical Education of the Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4433-1640

Трулев Андрей Сергеевич, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории общей иммунологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-7495-446X
Trulyov Andrey S., PhD, researcher at the Laboratory of General Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-7495-446X

Кудрявцев Игорь Владимирович, кандидат биологических наук заведующий научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», доцент кафедры клеточной биологии и гистологии института медицинского образования федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; заведующий лабораторией клеточной иммунологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-7204-7850
Kudryavtsev Igor V., PhD, Head of the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center “Center for Personalized Medicine”, Associate Professor at the Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education of the Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution “Institute of Experimental Medicine”, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-7204-7850

Головкин Алексей Сергеевич, доктор медицинских наук руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний научного центра мирового уровня «Центр персонализированной медицины», профессор кафедры клеточной биологии и гистологии института медицинского образования федерального

государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-7577-628X
Golovkin Aleksey S., Doctor of Medicine, Head of the Group of Genetic Cell Engineering, Institute of Molecular Biology and Genetics; Leading Researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center “Center for Personalized Medicine”; Professor at the Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education of the Federal State Budgetary Institution “V. A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-7577-628X

Вклад авторов

ААД – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

РАА – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГИА – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ТПВ – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ТАС – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КИВ – вклад в концепцию и дизайн исследования, интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГАС – вклад в концепцию и дизайн исследования, интерпретация данных исследования, написание и корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

AAD – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

RAA – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

GIA – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

TPV – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

TAS – data collection and analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KIV – contribution to the concept and design of the study, data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

GAS – contribution to the concept and design of the study, data interpretation, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

Список литературы

1. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015 Aug 1;65(8):783–97. doi:10.1093/biosci/biv084
2. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Bedina Zavec A, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015 Jan 1;4(1):27066. doi:10.3402/jev.v4.27066

3. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian J Med Biol Res.* 2013 Oct;46(10):824–30. doi:10.1590/1414-431X20132964
4. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010 Sep;73(10):1907–20. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006
5. Ludwig A-K, Giebel B. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jan;44(1):11–5. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.005
6. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018 Dec 1;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
7. Reales-Calderón JA, Vaz C, Monteoliva L, Molero G, Gil C. Candida albicans Modifies the Protein Composition and Size Distribution of THP-1 Macrophage-Derived Extracellular Vesicles. *J Proteome Res.* 2017 Jan 6;16(1):87–105. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00605
8. Gangadaran P, Rajendran RL, Oh JM, Hong CM, Jeong SY, Lee S-W, et al. Extracellular vesicles derived from macrophage promote angiogenesis *In vitro* and accelerate new vasculature formation *In vivo*. *Exp Cell Res.* 2020 Sep;394(2):112146. doi:10.1016/j.yexcr.2020.112146
9. Liu S, Chen J, Shi J, Zhou W, Wang L, Fang W, et al. M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment. *Basic Res Cardiol.* 2020 Mar 28;115(2):22. doi:10.1007/s00395-020-0781-7
10. Chen B, Luo L, Wei X, Gong D, Li Z, Li S, et al. M1 Bone Marrow-Derived Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Angiogenesis and Myocardial Regeneration Following Myocardial Infarction via the MALAT1/MicroRNA-25-3p/CDC42 Axis. Zhou Y, editor. *Oxid Med Cell Longev.* 2021 Oct 29;2021:1–26. doi:10.1155/2021/9959746
11. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2008 Nov 22;100(05):878–85. doi:10.1160/TH07-11-0691
12. Pieters BCH, Cappariello A, van den Bosch MHJ, van Lent PLEM, Teti A, van de Loo FAJ. Macrophage-Derived Extracellular Vesicles as Carriers of Alarmins and Their Potential Involvement in Bone Homeostasis. *Front Immunol.* 2019 Aug 8;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01901
13. Kang M, Huang C-C, Lu Y, Shirazi S, Gajendrareddy P, Ravindran S, et al. Bone regeneration is mediated by macrophage extracellular vesicles. *Bone.* 2020 Dec;141:115627. doi:10.1016/j.bone.2020.115627
14. Ding J, Zhang Y, Cai X, Zhang Y, Yan S, Wang J, et al. Extracellular vesicles derived from M1 macrophages deliver miR-146a-5p and miR-146b-5p to suppress trophoblast migration and invasion by targeting TRAF6 in recurrent spontaneous abortion. *Theranostics.* 2021;11(12):5813–30. doi:10.7150/thno.58731
15. Singhto N, Kanlaya R, Nilnumkhum A, Thongboonkerd V. Roles of Macrophage Exosomes in Immune Response to Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *Front Immunol.* 2018 Feb 27;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00316
16. Gao W, Guo X, Wang Y, Jian D, Li M. Monocyte-derived extracellular vesicles upon treated by palmitate promote endothelial migration and monocytes attachment to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Mar;523(3):685–91. doi:10.1016/j.bbrc.2019.12.095
17. Lee HD, Kim YH, Kim D-S. Exosomes derived from human macrophages suppress endothelial cell migration by controlling integrin trafficking. *Eur J Immunol.* 2014 Apr;44(4):1156–69. doi:10.1002/eji.201343660
18. Volgers C, Benedikter BJ, Grauls GE, Savelkoul PHM, Stassen FRM. Immunomodulatory role for membrane vesicles released by THP-1 macrophages and respiratory pathogens during macrophage

- infection. *BMC Microbiol.* 2017 Dec 13;17(1):216. doi:10.1186/s12866-017-1122-3
19. Wang Y-X, Lin C, Cui L-J, Deng T-Z, Li Q-M, Chen F-Y, et al. Mechanism of M2 macrophage-derived extracellular vesicles carrying lncRNA MEG3 in inflammatory responses in ulcerative colitis. *Bioengineered.* 2021 Dec 20;12(2):12722–39. doi:10.1080/21655979.2021.2010368
 20. Osada-Oka M, Shiota M, Izumi Y, Nishiyama M, Tanaka M, Yamaguchi T, et al. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions. Ortega A, editor. *Hypertens Res.* 2017 Apr 24;40(4):353–60. doi:10.1038/hr.2016.163
 21. Wang G, Jin S, Ling X, Li Y, Hu Y, Zhang Y, et al. Proteomic Profiling of LPS-Induced Macrophage-Derived Exosomes Indicates Their Involvement in Acute Liver Injury. *Proteomics.* 2019 Feb 27;19(3):1800274. doi:10.1002/pmic.201800274
 22. Shao J, Li S, Liu Y, Zheng M. Extracellular vesicles participate in macrophage-involved immune responses under liver diseases. *Life Sci.* 2020 Jan;240:117094. doi:10.1016/j.lfs.2019.117094
 23. Kawata R, Oda S, Koya Y, Kajiyama H, Yokoi T. Macrophage-derived extracellular vesicles regulate concanavalin A-induced hepatitis by suppressing macrophage cytokine production. *Toxicology.* 2020 Oct;443:152544. doi:10.1016/j.tox.2020.152544
 24. Shi C, Ulke-Lemée A, Deng J, Batulan Z, O'Brien ER. Characterization of heat shock protein 27 in extracellular vesicles: a potential anti-inflammatory therapy. *FASEB J.* 2019 Feb 6;33(2):1617–30. doi:10.1096/fj.201800987R
 25. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014 Nov;23(1):37–45. doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
 26. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med.* 2016 Nov;4(21):438–438. doi:10.21037/atm.2016.08.53
 27. Tedesco S, De Majo F, Kim J, Trenti A, Trevisi L, Fadini GP, et al. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying *in vitro* Polarization? *Front Pharmacol.* 2018 Feb 22;9. doi:10.3389/fphar.2018.00071
 28. Wang J-G, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JP-Y, et al. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood.* 2011 Aug 25;118(8):2366–74. doi:10.1182/blood-2011-01-330878
 29. Li X, Lei Y, Wu M, Li N. Regulation of Macrophage Activation and Polarization by HCC-Derived Exosomal lncRNA TUC339. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 28;19(10):2958. doi:10.3390/ijms19102958
 30. Chen L, Yao X, Yao H, Ji Q, Ding G, Liu X. Exosomal miR-103-3p from LPS-activated THP-1 macrophage contributes to the activation of hepatic stellate cells. *FASEB J.* 2020 Apr 17;34(4):5178–92. doi:10.1096/fj.201902307RRR
 31. Liu H, Zhang L, Li M, Zhao F, Lu F, Zhang F, et al. Bone mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles inhibit DAPK1-mediated inflammation by delivering miR-191 to macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Apr;598:32–9. doi:10.1016/j.bbrc.2022.02.009
 32. McDonald MK, Tian Y, Qureshi RA, Gormley M, Ertel A, Gao R, et al. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. *Pain.* 2014 Aug;155(8):1527–39. doi:10.1016/j.pain.2014.04.029
 33. Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods.* 2014 Jan;402(1–2):76–81. doi:10.1016/j.jim.2013.11.006
 34. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 2007 Jan;56(1):45–50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5
 35. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages.
-

- Doherty TM, editor. PLoS One. 2010 Jan 13;5(1):e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668
36. Kim YK, Hwang JH, Lee HT. Differential susceptibility to lipopolysaccharide affects the activation of toll-like-receptor 4 signaling in THP-1 cells and PMA-differentiated THP-1 cells. *Innate Immun.* 2022 Apr 25;28(3–4):122–9. doi:10.1177/17534259221100170
 37. Sindhu S, Akhter N, Wilson A, Thomas R, Arefanian H, Al Madhoun A, et al. MIP-1 α Expression Induced by Co-Stimulation of Human Monocytic Cells with Palmitate and TNF- α Involves the TLR4-IRF3 Pathway and Is Amplified by Oxidative Stress. *Cells.* 2020 Jul 29;9(8):1799. doi:10.3390/cells9081799
 38. Akhter N, Wilson A, Thomas R, Al-Rashed F, Kochumon S, Al-Roub A, et al. ROS/TNF- α Crosstalk Triggers the Expression of IL-8 and MCP-1 in Human Monocytic THP-1 Cells via the NF- κ B and ERK1/2 Mediated Signaling. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 29;22(19):10519. doi:10.3390/ijms221910519
 39. Dubashynskaya N V., Golovkin AS, Kudryavtsev I V., Prikhodko SS, Trulioff AS, Bokaty AN, et al. Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone. *Int J Biol Macromol.* 2020 Sep;158:811–8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.251
 40. Nurkhametova D, Kudryavtsev I, Gusel'nikova V, Serebryakova M, Giniatullina RR, Wojciechowski S, et al. Activation of P2X7 Receptors in Peritoneal and Meningeal Mast Cells Detected by Uptake of Organic Dyes: Possible Purinergic Triggers of Neuroinflammation in Meninges. *Front Cell Neurosci.* 2019 Feb 13;13. doi:10.3389/fncel.2019.00045
 41. Kondratov K, Nikitin Y, Fedorov A, Kostareva A, Mikhailovskii V, Isakov D, et al. Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. *J Extracell Vesicles.* 2020 Sep 30;9(1):1743139. doi:10.1080/20013078.2020.1743139
 42. Fedorov A, Kondratov K, Kishenko V, Mikhailovskii V, Kudryavtsev I, Belyakova M, et al. Application of high-sensitivity flow cytometry in combination with low-voltage scanning electron microscopy for characterization of nanosized objects during platelet concentrate storage. *Platelets.* 2020 Feb 17;31(2):226–35. doi:10.1080/09537104.2019.1599337
 43. Nolan JP. Flow Cytometry of Extracellular Vesicles: Potential, Pitfalls, and Prospects. *Curr Protoc Cytom.* 2015 Jul;73(1). doi:10.1002/0471142956.cy1314s73
 44. Welsh JA, Van Der Pol E, Arkesteijn GJA, Bremer M, Brisson A, Coumans F, et al. MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. *J Extracell Vesicles.* 2020 Sep 3;9(1):1713526. doi:10.1080/20013078.2020.1713526
 45. Kudryavtsev I, Kalinina O, Bezrukikh V, Melnik O, Golovkin A. The Significance of Phenotyping and Quantification of Plasma Extracellular Vesicles Levels Using High-Sensitivity Flow Cytometry during COVID-19 Treatment. *Viruses.* 2021 Apr 27;13(5):767. doi:10.3390/v13050767
 46. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2014 Aug;29:116–25. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
 47. Crenshaw BJ, Gu L, Sims B, Matthews QL. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. *Open Virol J.* 2018 Sep 28;12(1):134–48. doi:10.2174/1874357901812010134
 48. Sheikh NA, Jones LA. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Sep 23;57(9):1381–90. doi:10.1007/s00262-008-0474-9
 49. Mitachi T, Kouzui M, Maruyama R, Yamashita K, Ogata S, Kojima H, et al. Some non-sensitizers upregulate CD54 expression by activation of the NLRP3 inflammasome in THP-1 cells. *J Toxicol Sci.* 2019;44(3):213–24. doi:10.2131/jts.44.213
 50. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol.* 2014;5(SEP).
 51. MacDonald C, Payne JA, Aboian M, Smith W, Katzmann DJ, Piper RC. A Family of Tetraspans Organizes Cargo for Sorting into Multivesicular Bodies. *Dev Cell.* 2015 May;33(3):328–42.

doi:10.1016/j.devcel.2015.03.007

52. MacDonald C, Stamnes MA, Katzmann DJ, Piper RC. Tetraspan cargo adaptors usher GPI-anchored proteins into multivesicular bodies. *Cell Cycle*. 2015 Dec 2;14(23):3673–8. doi:10.1080/15384101.2015.1100773
53. Larios J, Mercier V, Roux A, Gruenberg J. ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *J Cell Biol*. 2020 Mar 2;219(3). doi:10.1083/jcb.201904113
54. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993 Jan;14(3):121–5. doi:10.1016/0167-5699(93)90212-4
55. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013 Feb 18;200(4):373–83. doi:10.1083/jcb.201211138
56. van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr 17;19(4):213–28. doi:10.1038/nrm.2017.125
57. Reutelingsperger CPM, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 1997 Jun 1;53(6):527–32. doi:10.1007/s000180050067

Для цитирования: Акино А.Д., Рубинштейн А.А., Головкин И.А., Тирикова П.В., Трулев А.С., Кудрявцев И.В., Головкин А.С. Особенности продукции внеклеточных везикул клетками линии THP-1 при стимуляции *in vitro*. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2024. Опубликовано онлайн 07.12.2023

To cite: Akino A.D., Rubinshtejn A.A., Golovkin I.A., Tirikova P.V., Trulev A.S., Kudryavcev I.V., Golovkin A.S. Features of extracellular vesicle production by THP-1 cells during *in vitro* stimulation. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024. Published Online 7 December 2023