УДК 571.27
DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-3-154-166

ONLINE

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

А.Д. Акино[1], А.А. Рубинштейн[2], И.А. Головкин[3], П.В. Тирикова[1], А.С. Трулев[2], И.В. Кудрявцев[1, 2], А.С. Головкин[1]

[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

Основные положения

• Внеклеточные везикулы (ВВ) – 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 (THP-1) – классическая модельная моноцитарно-макрофагальная система. Спектр секретируемых этой культурой ВВ гетерогенен и недостаточно охарактеризован к настоящему времени.

• В работе проведено сравнение продуцируемых клетками THP-1 ВВ при воздействии различных стимуляторов.

Цель	Количественная и качественная характеристика внеклеточных везикул (ВВ), продуцируемых клетками линии THP-1, в зависимости от использованного стимулятора и его дозы.
Материалы и методы	В исследовании использованы клетки культуры THP-1. Для стимуляции клеток применены 4-форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) в дозах 5, 16 и 50 нг/мл, липополисахарид (ЛПС) в дозах 0,1, 0,3 и 1,0 нг/мл и фактор некроза опухоли (ФНО) в дозах 5, 10 и 20 нг/мл. Активация клеток оценена 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 приведены с использованием анализа траектории наночастиц (NTA). Качественная характеристика экспрессируемых поверхностных молекулярных маркеров (CD9, CD63, CD54) представлена с помощью высокочувствительной многоцветной проточной цитометрии (hs-FCM).
Результаты	Стимуляция ФНО и PMA в средних и высоких дозировках приводит к нарастанию секретируемой фракции малых (30–150 нм) ВВ, экспрессирующих тетраспаниновые маркеры (CD9, CD63). Малые дозы ФНО и PMA не приводили к достоверному приросту количества ВВ. При использовании всех дозировок ЛПС отмечено 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 THP-1 провоцирует изменение функциональной активности клеток в отношении продуцируемых ими ВВ. 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.

Для корреспонденции: *Артур Даниил Акино, akino97@bk.ru; адрес: ул. Аккуратова, 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341*
Corresponding author: *Artur D. Aquino, akino97@bk.ru; address: 2, Akkuratova St., St. Petersburg, Russian Federation, 197341*

Стимуляция ЛПС в средних и высоких дозах может быть использована для получения изолированной CD63-положительной фракции ВВ.

Ключевые слова THP-1 • Внеклеточные везикулы • Экзосомы • Микровезикулы • Фактор некроза опухоли • Липополисахарид • 4-форбол-12-миристат-13-ацетат

Поступила в редакцию: *04.04.2024;* ***поступила после доработки:*** *31.05.2024;* ***принята к печати:*** *04.06.2024*

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

A.D. Aquino[1], A.A. Rubinstein[2], I.A. Golovkin[3], P.V. Tirikova[1], A.S. Trulioff[2], I.V. Kudryavtsev[1, 2], A.S. Golovkin[1]

[1] Federal State Budgetary Institution "Almazov National Medical Research Centre" 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

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 understudied.

• The review presents the comparison of EVs produced by stimulated THP-1 cells.

Aim To quantitatively and qualitatively characterize THP-1-derived extracellular vesicles in depending 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 (CD9, CD63, CD54) 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 have demonstrated 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-forbol-12-myristate-13-acetate

Received: *04.04.2024;* ***received in revised form:*** *31.05.2024;* ***accepted:*** *04.06.2024*

Список сокращений

ВВ – внеклеточные везикулы
ЛПС – липополисахарид
ФНО – фактор некроза опухоли
ICAM1 – молекула межклеточной адгезии 1
PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат

Введение

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

Так, в 2008 г. в эксперименте in vitro определено, что микровезикулы, полученные из культуры клеток THP-1, активированной эндотоксином и ионофором кальция или голоданием, вызывают апоптоз и дисбаланс тромбогенных/антитромбогенных 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 (VCAM1, ICAM1) у тех же эндотелиальных клеток [16]. Однако везикулы из макрофагов, дифференцированных из THP, 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 в процесс воспаления. Например, ВВ, полученные непосредственно из культуры клеток THP-1, обладают иммуномодулирующей функцией во время инфекционного процесса [18]. Более того, везикулы из M1-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 M2-макрофагов, несущих длинную некодирующую РНК MEG3, участвуют в воспалительных реакциях при язвенном колите [14, 19]. Также показана 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 мышиной модели острого гепатита, индуцированного конканавалином A [23]. A.C. Shi и коллеги обнаружили в везикулах из культуры THP-1 белок теплового шока 27 (HSP27), оказывающий противовоспалительное действие, ингибирующий атерогенез и снижающий уровень холестерина [24]. Все это свидетельствует о плейотропном действии внеклеточных везикул в зависимости от стадии дифференцировки клеток моноцитарно-макрофагального ряда или стимулятора, подействовавшего на них.

Использованная во многих описанных выше экспериментах культура THP-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 THP-1, в том числе применяют 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 внеклеточные везикулы, выделяемые стимулированными клетками THP-1, а также обусловливающие их множественную биологическую функцию, изучены недостаточно. **Целью настоящей работы** стала количественная и качественная характеристика внеклеточных везикул, продуцируемых клетками линии THP-1, в зависимости от использованного стимулятора и его дозы.

Материалы и методы

Культивирование и стимуляция клеток культуры THP-1

Культура опухолевых моноцитоподобных клеток линии THP-1 («Российская коллекция клеточных культур института цитологии РАН», Россия) содержалась и выращивалась в питательной среде RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург), гентамицина и 10% эмбриональной сыворотки те-

ленка (Hyclone, США) во флаконе для культивирования клеток в условиях инкубатора при температуре 37 °C и с 5%-м содержанием CO_2 в воздухе, как это было описано ранее [39]. Пассажирование клеток проводилось два раза в неделю с интервалом в 2–3 дня. Кратность пересева составляла 1:4.

Затем собрали 22,5 млн клеток, отмыли в свежей среде RPMI1640 («Биолот», Москва, Россия) без сыворотки и развели в RPMI1640 с 10% FBS (Gibco, ThermoFisher, США) в концентрации 500 тыс. клеток в миллилитре. После этого вносили клетки в лунки 6-луночного планшета в объеме 3 мл на лунку (по $1,5 \times 10^6$ клеток). Затем к клеткам добавили стимуляторы TNF (BioLegend, США; конечные концентрация 5, 10 и 20 нг/мл), PMA (Sigma Aldrich, США; конечные концентрации 5, 16 и 50 нг/мл) или бактериальный ЛПС (Sigma Aldrich, США; конечные концентрации 0,1, 0,3, 1,0 нг/мл). В качестве отрицательного контроля к клеткам добавили равный объем питательной среды PRMI-1640. После чего клетки инкубировали в течение суток при 37 °C и 5% CO_2. По окончании инкубации содержимое лунок собирали и центрифугировали 15 мин со скоростью 1 500 g, надосадки отбирали в свежие пробирки и повторно центрифугировали 15 мин со скоростью 1 500 g, затем надосадок переносили в свежие пробирки и центрифугировали 15 мин 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 мин при 16 000 g). После чего надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 µl DPBS без Ca и Mg («Биолот», Россия).

Иммунофенотипирование клеток THP-1

Окрашивание клеток культуры THP-1 проводили через 24 ч после стимуляции с использованием моноклональных антител, конъюгированных с флюорофорами anti-CD54-PE (Beckman Coulter, США), anti-CD209-PE (Beckman Coulter, США) и anti-CD16-PC7 (Beckman Coulter, США). Окрашивали образцы в соответствии с рекомендациями производителя: 100 мкл суспензии клеток THP-1 окрашивали вышеуказанными антителами при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте. Затем все образцы дважды промывали (330 g в течение 7 мин) стерильным PBS с добавлением 2% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (Sigma-Aldrich Co., 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, США) в финальной концентрации 10 нг/мл, как это показано ранее [40].

Иммунофенотипирование внеклеточных везикул

Окрашивание внеклеточных везикул проводили с использованием следующих моноклональных антител, конъюгированных с флюорофорами antiCD54-PE (Beckman Coulter, США), Annexin V-FITC (BioLegend, США), anti-CD14-KromeOrange (Beckman Coulter, США), anti-CD9-PE/Cy7 (BioLegend, США), anti-CD63-APC (BioLegend, 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 (coincedence) 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.

Анализировали внеклеточные везикулы с использованием проточного лазерного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Настройка калибровки прибора выполнена с помощью эталонного набора Cytometry Sub-Micron Particle Size Reference Kit, молекулярных зондов от Life Technologies, а также Megamix-Plus FSC и Megamix-Plus SSC (Biocytex, Франция), содержащих FITC-меченые частицы различных известных диаметров. Все контроли, в том числе контроль наличия мембран с использованием детергентов, контроль ложноположительных и ложноотрицательных результатов, выполнены в соответствии с ранее опубликованными требованиями [6, 44] и ранее описанной нами методикой [41, 42, 45].

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

Анализ траектории наночастиц (NTA)

Для определения размера и концентрации исследуемых внеклеточных везикул использовали прибор NanoSight (NanoSight Ltd, Великобритания), оборудованный синим лазером (488 нм). Перед анализом образцы были разбавлены в 1 мл ультрачистой воды, полученной из прибора MiliPore_(Merck Milipore, США), 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, Великобритания).

Полученные видео процессировали с использованием программного обеспечения NTA 3.4 для отслеживания траекторий движения всех частиц. Результаты количества частиц анализировали в 4 диапазонах размерности: менее 30, 30–150, 150–400 и более 400 нм. Частицы менее 30 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, называемые экзосомы (далее малые ВВ), а частицы в диапазоне 150–400 нм являются популяцией микровезикул (далее средние ВВ) [1, 2, 46, 47]. Все измерения проводили при температуре 26,1–27,1 °C, определенной с помощью термометра, прикрепленного к камере с образцом. Фон всех видеоданных автоматически извлечен перед отслеживанием частиц. Диаграммы распределения по размерам, значения среднего и стандартные отклонения рассчитаны в программе NTA 3.4 и использованы для последующего анализа.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica 12.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., 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 THP-1

Для оценки активации клеток изучали изменение уровня экспрессии молекул клеточной адгезии CD54 (ICAM1), CD209, CD16 и CD14. При стимуляции клеток THP-1 в возрастающих концентрациях ФНО (5, 10, 20 нг/мл), ЛПС (0,1, 0,3, 1,0 нг/мл) и PMA (5, 16, 50 нг/мл) во всех образцах наблюдалось увеличение экспрессии CD54 по сравнению с контрольными образцами (рис. 1). Наиболее выраженное усиление экспрессии было при стимуляции PMA и носило дозозависимый характер (см. рис. 1, *B*).

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

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

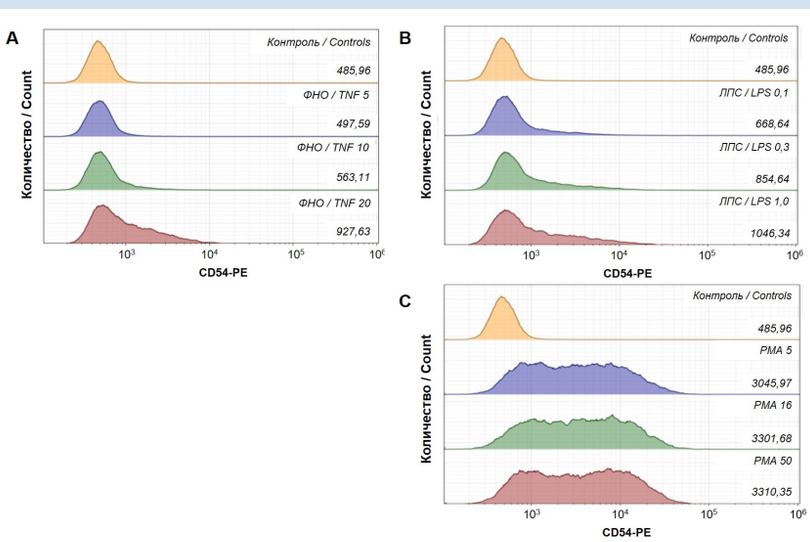

Рисунок 1. Сравнительная характеристика активации клеток THP-1 по интенсивности флюоресценции флуорохромов связавшихся антител: *A* – интенсивность флюоресценции при стимуляции ФНО в дозах 5, 10 и 20 нг/мл; *B* – интенсивность флюоресценции при стимуляции ЛПС в дозах 0,1, 0,3 и 1,0 нг/мл; *C* – интенсивность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

Примечание: *данные представлены в виде геометрического значения интенсивности флюоресценции CD54 по каналу фикоэритрина (PE). ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат.*

Figure 1. Comparative characteristics of THP-1 cells activation by fluorescence intensity: *A* – fluorescence intensity during LPS stimulation at doses of 5 ng/mL, 10 ng/mL and 20 ng/mL; *B* – fluorescence intensity during LPS stimulation at doses of 0.1 ng/mL, 0.3 ng/mL and 1.0 ng/mL; *C* – fluorescence intensity during PMA stimulation at doses of 5 ng/mL, 16 ng/mL, 50 ng/mL

Note: *Data 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). LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

Размерность и концентрация внеклеточных везикул

Средние размеры ВВ, измеренные 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.

Концентрации ВВ 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 обнаружены у частиц размером 30–150 нм. Определено достоверное увеличение концентрации частиц при стимуляции ФНО в дозах 10 и 20 нг/мл по сравнению с контролем (p = 0,0002 и p < 0,0001 соответственно). При воздействии ЛПС в дозах 0,3 и 1,0 нг/мл установлено достоверное снижение количества частиц по сравнению с контрольными образцами (p = 0,0193 и p = 0,0080 соответственно). При дозах PMA 16 и 50 нг/мл количество продуцируемых частиц увеличивалось в сравнении с контролем в 3,4 и в 2,3 раза соответственно (p = 0,0057 и p = 0,0007). Низкие дозы каждого из стимуляторов (ФНО 5 нг/мл, ЛПС 0,1 нг/мл и PMA 5 нг/мл) не приводили к достоверному изменению концентрации продуцируемых частиц.

Иммунофенотипирование внеклеточных везикул, продуцируемых клетками линии THP-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 менялось при стимуляции ЛПС во всех дозах, а также при воздействии низких доз ФНО и PMA. Наблюдалось увеличение CD9-положительных событий при стимуляции ФНО и PMA в средних и высоких дозировках. Так, после стимуляции ФНО в дозе 10 и 20 нг/мл отмечено достоверное увеличение по сравнению с контролем (p = 0,0014 и p = 0,0084 соответственно). Аналогично при сравнении с кон-

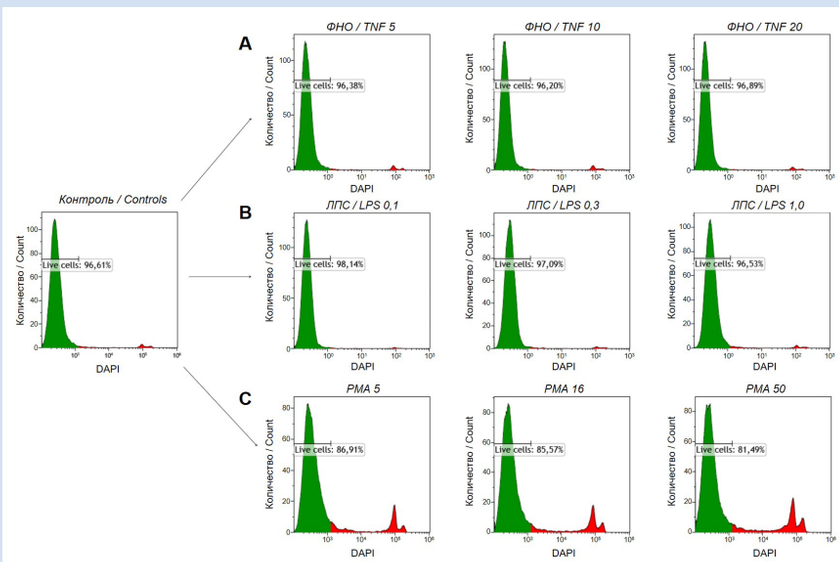

Рисунок 2. Процент живых и клеток в раннем апоптозе из культуры THP-1 через 24 ч после стимуляции, оцененный с помощью DAPI: *A* – стимуляция ФНО в дозах 5, 10 и 20 нг/мл; *B* – стимуляция ЛПС в дозах 0,1, 0,3 и 1,0 нг/мл; *C* – PMA в дозах 5, 16 и 50 нг/мл

Примечание: *ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат.*

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 doses of 5 ng/mL, 16 ng/mL and 50 ng/mL

Note: *LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

Таблица 1. Размеры внеклеточных везикул

Table 1. Sizes of extracellular vesicles

Контроль / Control	30–150 нм / nm	150–400 нм / nm
	89,8 ± 1,0	191,4 ± 2,3
ФНО / TNF 5	88,9 ± 1,3	196,2 ± 4,1
ФНО / TNF 10	88,7 ± 1,0	196,0 ± 3,2
ФНО / TNF 20	87,0 ± 1,0	187,8 ± 1,3
ЛПС / LPS 0,1	89,9 ± 1,5	190,5 ± 4,2
ЛПС / LPS 0,3	93,9 ± 1,7	193,7 ± 2,0
ЛПС / LPS 1,0	90,8 ± 2,8	192,3 ± 3,9
PMA 5	91,1 ± 1,2	186,5 ± 3,0
PMA 16	89,8 ± 0,7	184,5 ± 2,1
PMA 50	88,8 ± 0,4	187,6 ± 3,5

Примечание: *ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат.*

Note: *LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

Таблица 2. Концентрации продуцируемых внеклеточных везикул (частиц/мл) в диапазоне 30–150 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)

Контроль / Control	30–150 нм / nm	150–400 нм / nm
	$11,3 \times 10^8$ ($8,53 \times 10^8$; $11,7 \times 10^8$)	$1,57 \times 10^8$ ($1,46 \times 10^8$; $1,64 \times 10^8$)
ФНО / TNF 5	$13,0 \times 10^8$ ($12,0 \times 10^8$; $13,5 \times 10^8$)	$1,87 \times 10^8$ ($1,57 \times 10^8$; $2,31 \times 10^8$)
ФНО / TNF 10	$29,3 \times 10^8$ ($16,9 \times 10^8$; $38,3 \times 10^8$)^	$2,43 \times 10^8$ ($1,74 \times 10^8$; $2,80 \times 10^8$)
ФНО / TNF 20	$29,7 \times 10^8$ ($19,9 \times 10^8$; $38,3 \times 10^8$)^	$2,35 \times 10^8$ ($1,68 \times 10^8$; $2,95 \times 10^8$)
ЛПС / LPS 0,1	$8,34 \times 10^8$ ($5,27 \times 10^8$; $9,33 \times 10^8$)	$1,11 \times 10^8$ ($0,95 \times 10^8$; $1,33 \times 10^8$)
ЛПС / LPS 0,3	$5,57 \times 10^8$ ($4,65 \times 10^8$; $7,31 \times 10^8$)^	$1,21 \times 10^8$ ($0,97 \times 10^8$; $1,24 \times 10^8$)
ЛПС / LPS 1,0	$6,84 \times 10^8$ ($6,08 \times 10^8$; $7,68 \times 10^8$)^	$1,48 \times 10^8$ ($1,44 \times 10^8$; $1,61 \times 10^8$)
PMA 5	$9,57 \times 10^8$ ($9,30 \times 10^8$; $12,1 \times 10^8$)	$1,37 \times 10^8$ ($1,33 \times 10^8$; $1,73 \times 10^8$)
PMA 16	$37,5 \times 10^8$ ($12,1 \times 10^8$; $44,8 \times 10^8$)^	$1,80 \times 10^8$ ($1,75 \times 10^8$; $1,84 \times 10^8$)
PMA 50	$25,8 \times 10^8$ ($16,4 \times 10^8$; $43,2 \times 10^8$)^	$2,37 \times 10^8$ ($1,93 \times 10^8$; $2,55 \times 10^8$)

Примечание: *^ p < 0,01 достоверность отличий с контролем. ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат.*

Note: *^ p < 0.01 statistically significant difference compared to controls. LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

тролем определено достоверное увеличение уровня ВВ после воздействия PMA в дозе 16 и 50 нг/мл (p = 0,0003 и p = 0,0002 соответственно).

При воздействии всех видов стимуляторов в низких дозах не найдено отличий по сравнению с контрольным образцом в уровне продуцируемых CD63-позитивных ВВ. При стимуляции ФНО в дозе 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 возрастало по сравнению с контролем после обработки PMA в дозе 16 и 50 нг/мл (p = 0,0303 и p = 0,0062 соответственно). После стимуляции ЛПС в дозе 0,3 и 1,0 нг/мл количество CD63-позитивных ВВ также достоверно повышалось (p = 0,0357 и p = 0,0357 соответственно).

Количество продуцируемых $CD54^+$ ВВ при стимуляции ФНО 10 и 20 нг/мл увеличивалось в 18 и в 29 раз соответственно. При использовании других стимул изменения были менее выраженными. При применении PMA количество ВВ достоверно возрастало 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.

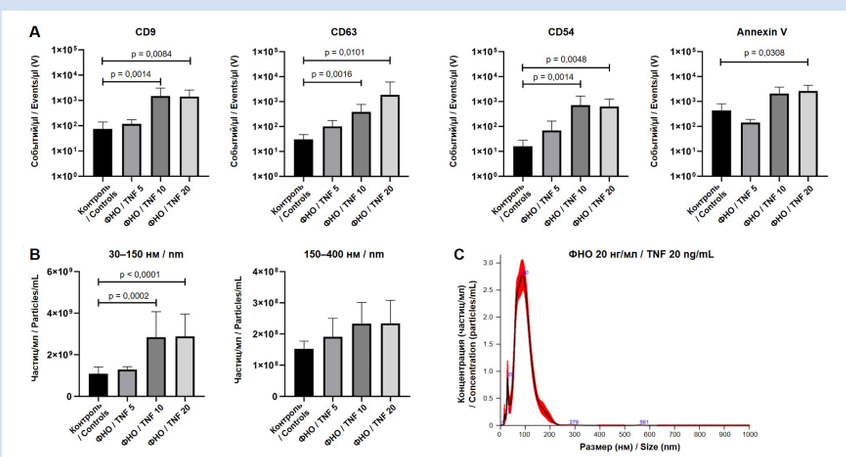

Рисунок 3. Характеристика ВВ, продуцируемых клетками THP-1 при их стимуляции ФНО: *A* – сравнительная характеристика эффектов различных доз ФНО на продукцию ВВ; *B* – количественная характеристика ВВ в различных диапазонах размерности; *C* – график концентрация/размер ВВ после стимуляции ФНО в дозе 20 нг/мл
Примечание: *ВВ – внеклеточные везикулы; ФНО – фактор некроза опухоли.*
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
Note: *TNF – tumor necrosis factor.*

Обсуждение

Стимуляция клеток ФНО во всех использованных дозах не приводила к значимой гибели клеток по сравнению с контролем (см. рис. 2). Вместе с тем продукция внеклеточных везикул имела определенный профиль. При использовании средней и высокой дозы стимула отмечено 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

Таблица 3. Результаты иммунофенотипирования внеклеточных везикул, продуцируемые клетками THP-1 (событий/мкл), Me (25; 75)
Table 3. Results of immunophenotyping of THP-derived EVs (events/µl), Me (25;75)

Контроль / Control	Annexin V	CD9	CD63	CD54	CD14
	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)
ФНО / TNF 5	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)
ФНО / TNF 10	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)
ФНО / TNF 20	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)
ЛПС / LPS 0,1	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)
ЛПС / LPS 0,3	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)
ЛПС / LPS 1,0	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)
PMA 5	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)
PMA 16	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)
PMA 50	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. ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат.*
Note: ** p < 0.05 statistically significant difference compared to controls. LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

важным может оказаться, что экспрессия CD54 на цитоплазматической мембране клеток THP-1 была увеличена в результате стимуляции фактором некроза опухоли.

Использование ЛПС в качестве стимулятора также не приводило к увеличению уровня апоптоза клеток. Вместе с тем повышенная экспрессии ICAM1 на цитоплазматической мембране ЛПС-активированных клеток THP-1 не привела к увеличению уровня CD54-позитивных везикул. 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). Кроме того, в отличие от двух других стимуляторов воздействие ЛПС приводило не к увеличению, а к снижению продукции ВВ даже в высоких дозировках.

Применение PMA в любых дозировках приводило к увеличению доли DAPI-позитивных событий, то есть к росту доли клеток в апоптозе/некрозе. Вместе с тем отмечен достоверный прирост количества ВВ в диапазоне размеров 30–150 нм при стимуляции PMA в дозе 16 и 50 нг/мл, однако в диапазоне 150–400 нм прироста не установлено (рис. 5). По-видимому, прирост происходил за счет $CD9^+$, $CD63^+$, $CD54^+$ ВВ. При этом количество $CD54^+$ ВВ повышалось при всех дозах стимулятора и положительно коррелировало с выраженной экспрессией ICAM1 на поверхности THP-1.

Таким образом, использование трех разных клеточных активаторов приводило к изменению функциональной активности THP-1, проявляющейся в изменении профиля продуцируемых внеклеточных везикул. Для оценки активации клеток изучали уровень экспрессии молекулы межклеточной адгезии (ICAM1), или CD54. Известно, что при действии провоспалительных цитокинов, в том числе ФНО-α, в лейкоцитах наблюдается увеличение экспрессии ICAM1. Более того, CD54 может быть использован как косвенный маркер активации антигенпрезентующих клеток, а его экспрессию связывают с активацией и сборкой NLRP3-инфламосомы в клетках THP-1 [48, 49].

Для изучения профиля продуцируемых ВВ проводили их фенотипирование. Наличие мембраны в изучаемых образцах подтверждали позитивным окрашиванием на аннексин V, связывающийся с фосфатидилсерином фосфолипидов. Кроме того, оценивали уровень везикул, позитивных по на-

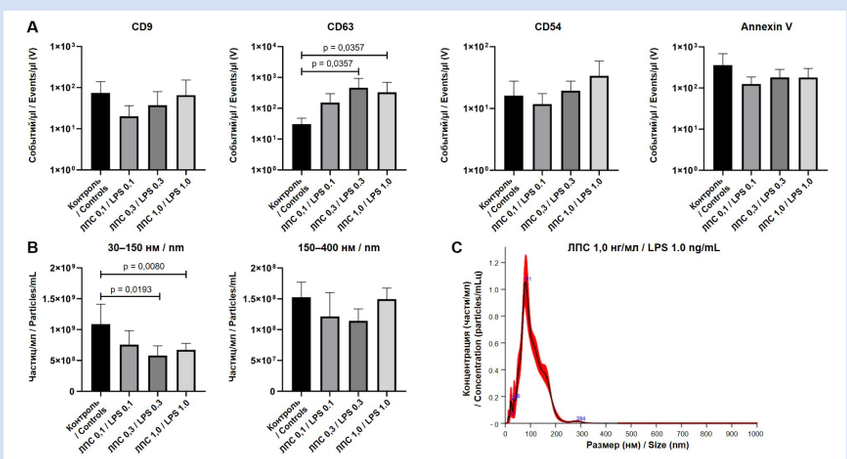

Рисунок 4. Характеристика ВВ, продуцируемых клетками THP-1 при их стимуляции ЛПС: *A* – сравнительная характеристика эффектов различных доз ЛПС на продукцию ВВ; *B* – количественная характеристика ВВ в различных диапазонах размерности; *C* – график концентрация/размер ВВ после стимуляции ЛПС в дозе 1,0 нг/мл
Примечание: *ВВ – внеклеточные везикулы; ЛПС – липополисахарид.*
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
Note: *LPS – lipopolysaccharide.*

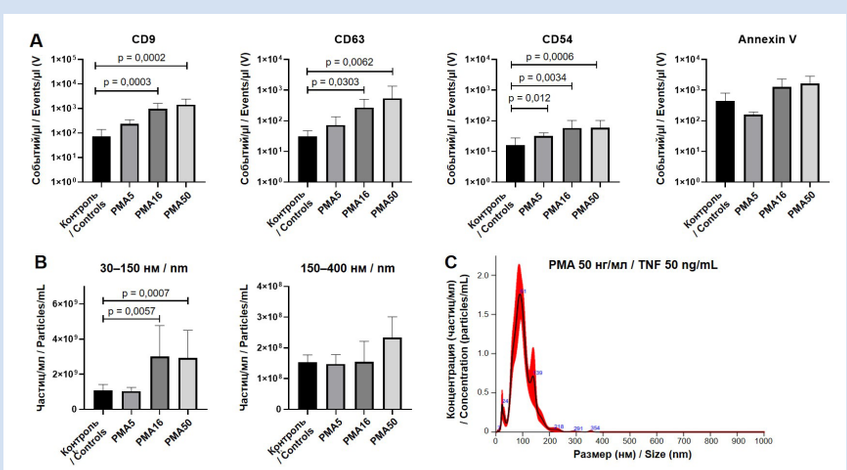

Рисунок 5. Характеристика ВВ, секретируемых клетками линии THP-1 при стимуляции PMA: *A* – сравнительная характеристика влияния различных доз PMA на продукцию ВВ; *B* – количественная характеристика ВВ в различных диапазонах размерности; *C* – график концентрация/размер ВВ после стимуляции PMA в дозе 16 нг/мл
Примечание: *ВВ – внеклеточные везикулы; PMA – 4-форбол-12-миристат-13-ацетат.*
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
Note: *PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate.*

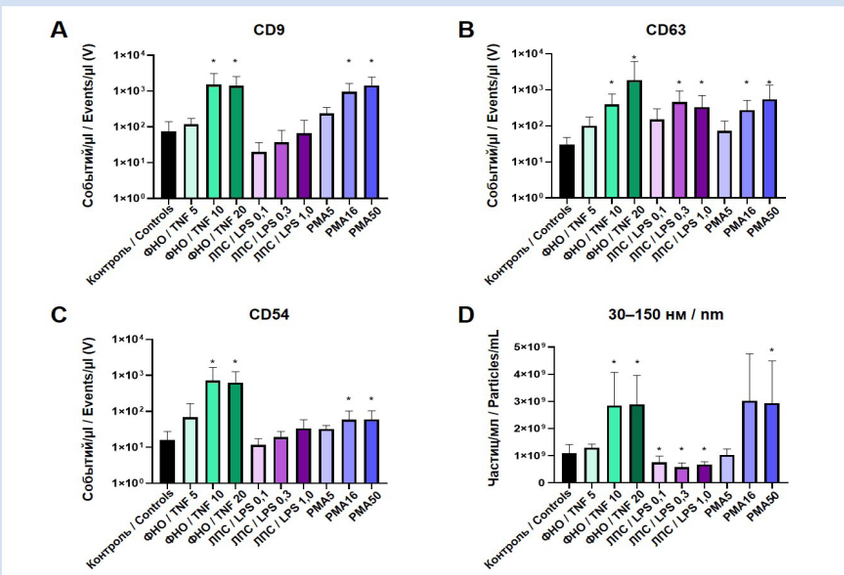

Рисунок 6. Сравнительная характеристика продуцируемых ВВ клетками THP-1 при использовании различных стимуляторов: *A* – количество $CD9^+$ ВВ; *B* – количество $CD63^+$ ВВ; *C* – количество $CD54^+$ ВВ; *D* – общее количество ВВ в диапазоне размерности 30–150 нм по данным NTA

Примечание: *ВВ – внеклеточные везикулы; ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-мириста-13-ацетат.*

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

Note: *LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

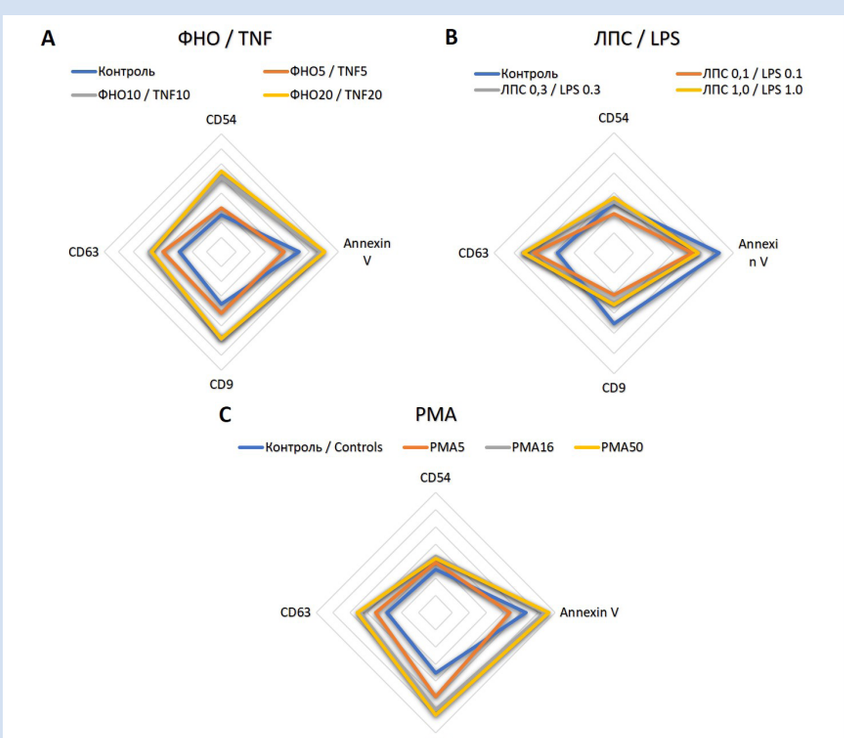

Рисунок 7. Фенотипический профиль продуцируемых клетками THP-1 внеклеточных везикул при воздействии различных стимуляторов

Примечание: *значения количества положительных событий в микролитре представлены в виде десятичного логарифма. ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухоли; PMA – 4-форбол-12-мириста-13-ацетат.*

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. LPS – lipopolysaccharide; PMA – 4-phorbol-12-myristate-13-acetate; TNF – tumor necrosis factor.*

личию в их структуре тетраспаниновых рецепторов – CD9 и CD63. Все тесты и методы рекомендованы 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 THP-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 PMA показала схожие результаты в количественном и качественном отношении (рис. 6, 7). Однако стоит отметить, что только при применении средних и высоких доз ФНО и PMA 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 PMA, их внутренний состав может оказаться различным. Важным моментом при обеих стимуляциях стало отсутствие дубль-позитивных популяций $CD9^+$ и $CD63^+$ ВВ, что может свидетельствовать об их независимом образовании. Таким образом, в общей массе внеклеточных везикул отчетливо формируются везикулы, несущие либо один, либо другой тетраспаниновый маркер.

Наличие молекулы ICAM1 на поверхности ВВ может указывать на то, что часть полученных везикул образовалась путем «почкования» от цитоплазматической мембраны и является микровезикулами, а не экзосомами [55, 56]. В пользу этого свидетельствует и наличие дубль-позитивных событий по CD54 и аннексину V, так как последний связывает фосфотидилсерин, который конститутивно присутствует в структуре клеточных мембран [57].

Отличительной особенностью стимуляции PMA 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 PMA во всех дозах наблюдалась клеточная гибель, которая усугублялась с увеличением дозы. И хотя при оценке самих везикул по сравнению с полученными при стимулировании ФНО достоверной разницы не определено, необходимо учитывать возможное присутствие апоптотических тел. Низкие дозы ФНО и PMA не являются предпочтительными в выборе доз стимуляции для получения везикул ввиду отсутствия достоверного изменения количественного и качественного профиля продуцируемых ВВ.

Стимуляция ЛПС во всех дозировках достаточна для активации клеток THP-1, но негативно сказывается на общем фоне образования внеклеточных везикул. При использовании всех дозировок ЛПС отсутствовало количественное нарастание продукции ВВ и даже отмечено некоторое их снижение в диапазоне размерности 30–150 нм (малые ВВ). Однако ЛПС 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, такой эффект может быть связан с функциональными особенностями CD63-положительной фракции при взаимодействии с ЛПС грамотрицательных бактерий.

Заключение

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 при поддержке 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

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

Головкин Иван Алексеевич, студент федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0003-8873-0314

Тирикова Полина Валерьевна, студентка лечебного факультета института медицинского образования федерального

Author Information Form

Aquino Arthur D., Junior Researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases, 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, 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

Rubinstein Artem A., Research 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

Golovkin Ivan A., Student at the ITMO University, St. Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0009-0003-8873-0314

Tirikova Polina V., Student at the Medical Faculty, Institute of Medical Education of the Federal State Budgetary Institution

государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4433-1640

Трулёв 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

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

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

"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

Trulioff 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

Kudryavtsev Igor V., PhD, Head of the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases, World-Class Research Center "Center for Personalized Medicine", Associate Professor at the Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education, 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

Golovkin Aleksey S., PhD, 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, World-Class Research Center "Center for Personalized Medicine"; Professor at the Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education, 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 в статью

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 / REFERENCES

1. Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. Bioscience. 2015;65(8):783–97. doi:10.1093/biosci/biv084

2. Yáñez-Mó M., Siljander P.R.M., Andreu Z., Bedina Zavec A., Borràs F.E., Buzas E.I., Casal E., Cappello F. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracell Vesicles. 2015;4(1):27066. doi:10.3402/jev.v4.27066

3. Borges F.T., Reis L.A., Schor N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. Brazilian J Med Biol Res. 2013;46(10):824–30. doi:10.1590/1414-431X20132964

4. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. J Proteomics. 2010;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;44(1):11–5. doi:10.1016/j.biocel.2011.10.005

6. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T. 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;7(1):1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750

7. Reales-Calderón J.A., 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;16(1):87–105. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00605

8. Gangadaran P., Rajendran R.L., Oh J.M., Hong C.M., Jeong S.Y., Lee S.W., Lee J., Ahn B.C. Extracellular vesicles derived from macrophage promote angiogenesis In vitro and accelerate new vasculature formation In vivo. Exp Cell Res. 2020;394(2):112146. doi:10.1016/j.yexcr.2020.112146

9. Liu S., Chen J., Shi J., Zhou W., Wang L., Fang W., Zhong Y., Chen X., Chen Y., Sabri A., Liu S. M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment. Basic Res Cardiol. 2020;115(2):22. doi:10.1007/s00395-020-0781-7

10. Chen B., Luo L., Wei X., Gong D., Li Z., Li S., Tang W., Jin L. M1 Bone Marrow-Derived Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Angiogenesis and Myocardial Regeneration Following Myocardial Infarction via the MALAT1/MicroRNA-25-3p/CDC42 Axis. Oxid Med Cell Longev. 2021;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;100(05):878–85. doi:10.1160/TH07-11-0691

12. Pieters B.C.H., Cappariello A., van den Bosch M.H.J., van Lent P.L.E.M., Teti A., van de Loo F.A.J. Macrophage-Derived Extracellular Vesicles as Carriers of Alarmins and Their Potential Involvement in Bone Homeostasis. Front Immunol. 2019;10:1901. doi:10.3389/fimmu.2019.01901

13. Kang M., Huang C.C., Lu Y., Shirazi S., Gajendrareddy P., Ravindran S., Cooper L.F. Bone regeneration is mediated by macrophage extracellular vesicles. Bone. 2020;141:115627. doi:10.1016/j.bone.2020.115627

14. Ding J., Zhang Y., Cai X., Zhang Y., Yan S., Wang J., Zhang S., Yin T., Yang C., Yang J. 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;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;523(3):685–91. doi:10.1016/j.bbrc.2019.12.095

17. Lee H.D., Kim Y.H., Kim D.S. Exosomes derived from human macrophages suppress endothelial cell migration by controlling integrin trafficking. Eur J Immunol. 2014;44(4):1156–69. doi:10.1002/eji.201343660

18. Volgers C., Benedikter B.J., Grauls G.E., Savelkoul P.H.M., Stassen F.R.M. Immunomodulatory role for membrane vesicles released by THP-1 macrophages and respiratory pathogens during macrophage infection. BMC Microbiol. 2017;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., Miao X.P. Mechanism of M2 macrophage-derived extracellular vesicles carrying lncRNA MEG3 in inflammatory responses in ulcerative colitis. Bioengineered. 2021;12(2):12722–39. doi:10.1080/21655979.2021.2010368

20. Osada-Oka M., Shiota M., Izumi Y., Nishiyama M., Tanaka M., Yamaguchi T., Sakurai E., Miura K., Iwao H. Macrophage-derived exosomes induce inflammatory factors in endothelial cells under hypertensive conditions. Ortega A, editor. Hypertens Res. 2017;40(4):353–60. doi:10.1038/hr.2016.163

21. Wang G., Jin S., Ling X., Li Y., Hu Y., Zhang Y., Huang Y., Chen T., Lin J., Ning Z., Meng Y., Li X. Proteomic Profiling of LPS-Induced Macrophage-Derived Exosomes Indicates Their Involvement in Acute Liver Injury. Proteomics. 2019;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;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;443:152544. doi:10.1016/j.tox.2020.152544

24. Shi C., Ulke-Lemée A., Deng J., Batulan Z., O'Brien E.R. Characterization of heat shock protein 27 in extracellular vesicles: a potential anti-inflammatory therapy. FASEB J. 2019;33(2):1617–30. doi:10.1096/fj.201800987R

25. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. Int Immunopharmacol. 2014;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;4(21):438–438. doi:10.21037/atm.2016.08.53

27. Tedesco S., De Majo F., Kim J., Trenti A., Trevisi L., Fadini G.P., Bolego C., Zandstra P.W., Cignarella A., Vitiello L. 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;9. doi:10.3389/fphar.2018.00071

28. Wang J.G., Williams J.C., Davis B.K., Jacobson K., Doerschuk C.M., Ting J.P., Mackman N. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1β–dependent manner. Blood. 2011;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;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;34(4):5178–92. doi:10.1096/fj.201902307RRR

31. Liu H., Zhang L., Li M., Zhao F., Lu F., Zhang F., Chen S.,

Guo J., Zhang R., Yin H. Bone mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles inhibit DAPK1-mediated inflammation by delivering miR-191 to macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2022;598:32–9. doi:10.1016/j.bbrc.2022.02.009

32. McDonald M.K., Tian Y., Qureshi R.A., Gormley M., Ertel A., Gao R., Aradillas Lopez E., Alexander G.M., Sacan A., Fortina P., Ajit S.K. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. Pain. 2014;155(8):1527–39. doi:10.1016/j.pain.2014.04.029

33. Maeß M.B., Wittig B., Cignarella A., Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. J Immunol Methods. 2014;402(1–2):76–81. doi:10.1016/j.jim.2013.11.006

34. Park E.K., Jung H.S., Yang H.I., Yoo M.C., Kim C., Kim K.S. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflamm Res. 2007;56(1):45–50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5

35. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K.B., Dockrell D.H. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. PLoS One. 2010;5(1):e8668. doi:10.1371/journal.pone.0008668

36. Kim Y.K., Hwang J.H., Lee H.T. 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;28(3–4):122–9. doi:10.1177/17534259221100170

37. Sindhu S., Akhter N., Wilson A., Thomas R., Arefanian H., Al Madhoun A., Al-Mulla F., Ahmad R. MIP-1α 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;9(8):1799. doi:10.3390/cells9081799

38. Akhter N., Wilson A., Thomas R., Al-Rashed F., Kochumon S., Al-Roub A., Arefanian H., Al-Madhoun A., Al-Mulla F., Ahmad R., Sindhu S. ROS/TNF-α Crosstalk Triggers the Expression of IL-8 and MCP-1 in Human Monocytic THP-1 Cells via the NF-κB and ERK1/2 Mediated Signaling. Int J Mol Sci. 2021;22(19):10519. doi:10.3390/ijms221910519

39. Dubashynskaya N.V., Golovkin A.S., Kudryavtsev I.V., Prikhodko S.S., Trulioff A.S., Bokatyi A.N., Poshina D.N., Raik S.V., Skorik Y.A. Mucoadhesive cholesterol-chitosan self-assembled particles for topical ocular delivery of dexamethasone. Int J Biol Macromol. 2020;158:811–8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.251

40. Nurkhametova D., Kudryavtsev I., Guselnikova V., Serebryakova M., Giniatullina R.R., Wojciechowski S., Tore F., Rizvanov A., Koistinaho J., Malm T., Giniatullin R. 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;13. doi:10.3389/fncel.2019.00045

41. Kondratov K., Nikitin Y., Fedorov A., Kostareva A., Mikhailovskii V., Isakov D., Ivanov A., Golovkin A. Heterogeneity of the nucleic acid repertoire of plasma extracellular vesicles demonstrated using high-sensitivity fluorescence-activated sorting. J Extracell Vesicles. 2020;9(1):1743139. doi:10.1080/20013078.2020.1743139

42. Fedorov A., Kondratov K., Kishenko V., Mikhailovskii V., Kudryavtsev I., Belyakova M., Sidorkevich S., Vavilova T., Kostareva A., Sirotkina O., Golovkin A. 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;31(2):226–35. doi:10.1080/09537104.2019.1599337

43. Nolan J.P. Flow Cytometry of Extracellular Vesicles: Potential, Pitfalls, and Prospects. Curr Protoc Cytom. 2015;73(1). doi:10.1002/0471142956.cy1314s73

44. Welsh J.A., Van Der Pol E., Arkesteijn G.J.A., Bremer M., Brisson A., Coumans F., Dignat-George F., Duggan E. et al. MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. J Extracell Vesicles. 2020;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;13(5):767. doi:10.3390/v13050767

46. Kowal J., Tkach M., Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. Curr Opin Cell Biol. 2014;29:116–25. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004

47. Crenshaw B.J., Gu L., Sims B., Matthews Q.L. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. Open Virol J. 2018;12(1):134–48. doi:10.2174/1874357901812010134

48. Sheikh N.A., Jones L.A. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. Cancer Immunol Immunother. 2008;57(9):1381–90. doi:10.1007/s00262-008-0474-9

49. Mitachi T., Kouzui M., Maruyama R., Yamashita K., Ogata S., Kojima H., Itagaki H. 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;5:442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442.

51. MacDonald C., Payne J.A., Aboian M., Smith W., Katzmann D.J., Piper R.C. A Family of Tetraspans Organizes Cargo for Sorting into Multivesicular Bodies. Dev Cell. 2015;33(3):328–42. doi:10.1016/j.devcel.2015.03.007

52. MacDonald C., Stamnes M.A., Katzmann D.J., Piper R.C. Tetraspan cargo adaptors usher GPI-anchored proteins into multivesicular bodies. Cell Cycle. 2015;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;219(3). doi:10.1083/jcb.201904113

54. Ziegler-Heitbrock H.W.L., Ulevitch R.J. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker. Immunol Today. 1993;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;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;19(4):213–28. doi:10.1038/nrm.2017.125

57. Reutelingsperger C.P.M., van Heerde W.L. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. Cell Mol Life Sci. 1997;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;13(3): 154-166. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-154-166*

To cite: *Aquino A.D., Rubinstein A.A., Golovkin I.A., Tirikova P.V., Trulioff A.S., Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S. Features of extracellular vesicle production by THP-1 cells during in vitro stimulation. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2024;13(3): 154-166. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-154-166*