*НЕЙРОХИМИЯ, 2024, том 41, № 1, с. 76–91*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

*УДК 571.27*

# ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, СЕКРЕТИРУЕМЫЕ АКТИВИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ THP-1, ВЛИЯЮТ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ В ОРГАНАХ *DANIO RERIO*

**© 2024 г. Д. Б. Самбур[1], О. В. Калинина[1], А. Д. Акино[1], П. В. Тирикова[1], М. А. Мигунова[1], Е. Е. Королева[1], А. С. Трулев[2], А. А. Рубинштейн[1, 2], И. В. Кудрявцев[1, 2], А. С. Головкин[1, *]**

*[1]ФГБУ НМИЦ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия*

*[2]ФГБУ "Институт экспериментальной медицины", Санкт-Петербург, Россия*

**E-mail: golovkin_a@mail.ru*

Поступила в редакцию 17.06.2023 г.
После доработки 04.09.2023 г.
Принята к публикации 05.09.2023 г.

Внеклеточные везикулы, секретируемые иммунокомпетентными клетками, могут играть значительную роль в инициации, поддержании и прогрессировании системного воспаления. Цель исследования – изучить регуляторное влияние внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками линии THP-1, на уровень экспрессии генов воспаления в органах рыб *Danio rerio*. После интрацеломической инъекции ВВ, продуцированных клетками THP-1, активированных фактором некроза опухолей α (TNFα) и форбол-миристат-ацетатом (PMA) в разных концентрациях, оценивали относительный уровень экспрессии генов *il-1*β, *il-6*, *tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx*, *il-10* в мозге, печени и сердце методом ПЦР в реальном времени. Введение ВВ, секретируемых клетками THP-1, активированными TNF в концентрации 10 нг/мл и PMA в концентрациях 16 и 50 нг/мл, снижали экспрессию генов *il-1*β, *ifn*-γ, *tnf*-α, *mpx*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2* и *il-10* в мозге, сердце и печени рыб *Danio rerio*. При этом ВВ, секретируемые клетками THP-1 под воздействием TNF в дозах 10 и 20 нг/мл, обладали разнонаправленными эффектами на экспрессию гена *il-1*β в мозге; на гены *il-1*β, *il-10* и *il-6* в сердце и на гены *il-1*β, *il-6*, *il-10* в печени. ВВ, секретируемые клетками THP-1 под воздействием PMA в дозах 16 и 50 нг/мл, обладали аналогичными разнонаправленными эффектами в отношении генов *il-6* и *il-10* в сердце и на ген *ifn*-γ в печени. ВВ, продуцируемые активированными клетками THP-1, при интрацеломическом введении рыбам *Danio rerio* оказывают системный эффект, проявляющийся изменением экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в головном мозге, печени и сердце. В зависимости от вида и дозы использованного для активации стимула может меняться качественный состав продуцируемых везикул, что проявляется в силе и направленности детектируемых *in vivo* эффектов.

*Ключевые слова: внеклеточные везикулы, клетки THP-1, Danio rerio, зебрафиш, экспрессия генов*

**DOI:** 10.31857/S1027813324010096, **EDN:** GYTGWD

## ВВЕДЕНИЕ

Системное воспаление представляет собой сложную реакцию организма в ответ на серьезные повреждающие факторы, такие как обширные травмы, инфекции, хирургические вмешательства, ишемические и реперфузионные повреждения и др. Несмотря на то что развитие системной воспалительной реакции направлено на защиту организма, формирующийся нерегулируемый цитокиновый шторм способен вызвать массивный воспалительный каскад, приводящий к нарушению функций многих органов или даже к смерти [1–3]. Выраженность эффектов цитокинов, а также их направленность (протективная или повреждающая) связана, в первую очередь, со степенью дисбаланса про- и противовоспалительных факторов. При этом важнейшими оказываются дистантные эффекты цитокинов. Так, фактор некроза опухолей α (TNFα), интерлейкин-1 (IL-1), IL-6, воздействуя на центр терморегуляции, вызывают повышение температуры тела с лихорадкой, стимулируют продукцию лейкоцитов в костном мозге, усиливают продукцию белков острой фазы (С-реактивный белок и др.) клетками печени и т.д. [4]. Вместе с тем возможны и негативные эффекты цитокинов: высокий уровень TNF приводит к снижению

сердечного выброса, повышению проницаемости сосудов, усилению тромбообразования, метаболическим нарушениям, связанным с изменением резистентности к инсулину, и т.д. [4–6]. Таким образом, дисбаланс цитокинов является одним из наиболее важных патогенетических звеньев развития системного воспалительного ответа (СВО). Гиперпродукция провоспалительных цитокинов оказывается важнейшей составляющей фазы первичного флогогенного удара СВО [7]. Считается, что в этих процессах ключевую роль играет врожденная иммунная система и активность ее клеток (моноцитов, макрофагов, нейтрофилов и т.д.) [5]. Вместе с тем продуцентами провоспалительных цитокинов могут выступать клетки других органов и тканей (эндотелиоциты, кардиомиоциты, гепатоциты и т.д.). При этом, вне зависимости от того, в каком органе было инициировано воспаление, происходит вовлечение отдаленных органов, что получило название компартментализации воспаления [8].

Таким образом, вопросы, связанные с регуляцией цитокинового шторма и компартментализации воспаления, оказываются очень важными в изучении патогенеза СВО. Поскольку на начальных этапах формирования системного воспаления ведущая роль отводится клеткам врожденной иммунной системы и, в первую очередь, клеткам моноцитарно-макрофагального ряда, то традиционно используемой моделью является культура клеток THP-1 (human leukemia monocytic cell line – моноцитоподобная клеточная линия), полученная от пациента с острым моноцитарным лейкозом [9]. В литературе описаны разные варианты активации THP-1 клеток, например, форбол-миристат-ацетат (phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), фактор некроза опухолей, перекись водорода, инфицирование микроорганизмами и др. [10, 11], при этом для дальнейшей поляризации в направлении M1 (классически активированных) макрофагов используют интерферон γ (IFNγ) и липополисахарид (ЛПС), а для поляризации в M2 (альтернативно активированные) макрофаги – интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-13 (IL-13) [12, 13].

В настоящее время большое внимание уделяется внеклеточным везикулам как инструменту регуляции активности клеток, межклеточных взаимодействий, а также компартментализации воспаления [14–16]. В зависимости от своего происхождения внеклеточные везикулы могут нести различные клеточные компоненты, включая мРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК, ДНК, метаболиты, белки и липиды [17, 18], и влиять на активность как соседних, так и отдаленных клеток, потенциально вызывая системные эффекты [18].

Традиционно, говоря о внеклеточных везикулах, по размеру объектов и механизмам их формирования выделяют три группы: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Последние имеют размеры от 50 до 5000 нм (чаще баланс смещен в сторону более крупных объектов) и образуются в результате программируемой клеточной гибели. Экзосомы от 30 до 150 нм в диаметре образуются путем внутреннего отпочкования от пограничной мембраны ранних эндосом, которые во время этого процесса созревают в мультивезикулярные тельца. Поскольку экзосомы образуются внутри клетки, вне зависимости от их клеточного происхождения, они оказываются насыщенными вспомогательными белками – Alix, TSG101, HSC70, HSP90β [19]. Собственно внеклеточные везикулы (микровезикулы) имеют размеры 100–1000 нм в диаметре и образуются путем отпочкования от плазматической мембраны клетки. В результате они содержат белки, ассоциированные с цитозолем и плазматической мембраной (например, тетраспанины) [20]. Уникальность микровезикул заключается в том, что они обладают способностью упаковывать активный груз (белки, нуклеиновые кислоты и липиды) и доставлять его в другую клетку, соседнюю или отдаленную, а также изменять функции клетки-реципиента при его доставке [19, 20].

В настоящее время все больше исследований, моделирующих патологические состояния, проводят на маленьких тропических пресноводных рыбах *Danio rerio*. Они имеют более 70% общих генов-ортологов с *Homo sapiens*, в частности, гены, участвующие в органоспецифических генетических программах регуляции пролиферации, воспаления и т.д. [21]. Это предопределяет возможность использования рыб для изучения различных патологических процессов и заболеваний человека [22, 23].

Таким образом, исследование механизмов регуляции воспаления является важным для понимания патогенеза системного воспалительного ответа, а рыбы *Danio rerio* представляются удобной моделью для изучения участия внеклеточных везикул в регуляции и компартментализации СВО. Цель работы: изучить регуляторное влияние внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками линии THP-1, на уровень экспрессии генов воспаления в органах рыб *Danio rerio*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования представлен на рис. 1. На первом этапе для получения различных популяций внеклеточных везикул осуществляли активацию моноцитоподобных клеток линии THP-1 посредством воздействия различных стимулов. После чего проводили фенотипическую характеристику внеклеточных везикул, секретируемых клетками THP-1. Полученные внеклеточные везикулы вводили в целомическую полость рыбам *Danio rerio* и по истечении суток проводили биобанкирование жизненно важных органов (печень, сердце и мозг).

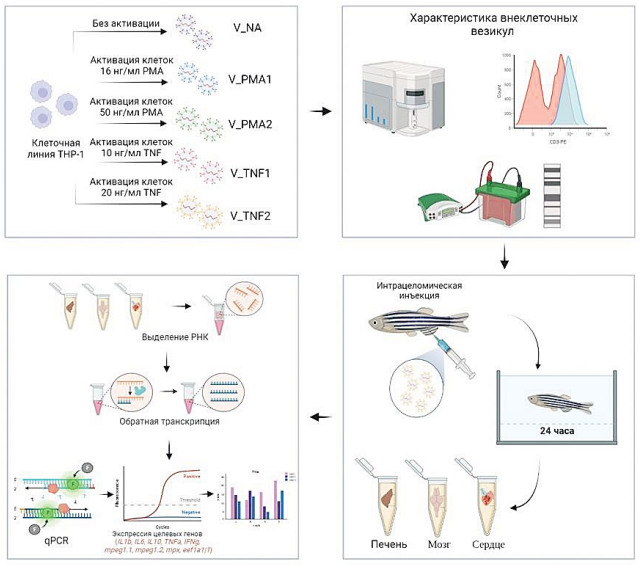



**Рис. 1.** Дизайн исследования.

На следующем этапе оценивали уровень органной экспрессии генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

*Получение и характеристика внеклеточных везикул*

В работе использовали культуру опухолевых моноцитоподобных клеток линии THP-1 (“Российская коллекция клеточных культур института цитологии РАН”, Россия), которую культивировали в питательной среде RPMI-1640 (“Биолот”, Россия) с добавлением L-глутамина (“Биолот”, Россия), 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США) по стандартной методике в $CO_2$-инкубаторе (при 37°C и 5% $CO_2$) со сменой культуральной среды каждые 3 дня согласно протоколу, описанному ранее [24, 25].

Для получения популяций внеклеточных везикул 200 мкл суспензии клеток в концентрации $1 \times 10^5$ переносили в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt, Германия) и активировали посредством воздействия стимулами: фактором некроза опухоли (TNF) (Biolegend, Калифорния, США) в конечной концентрации 10 и 20 нг/мл или форбол-12-миристат-13-ацетатом (PMA) (Sigma Aldrich, Миссури, США) в конечной концентрации 16 и 50 нг/мл. В качестве контроля в среду вносили раствор DPBS (р-р Дульбекко без Ca и Mg, “Биолот”, Россия). THP-1 клетки культивировали в течение 24 ч в стандартных условиях [24, 25]. Внеклеточные везикулы получали методом последовательного центрифугирования, для чего суспензию клеток осаждали в течение 20 мин при 330g, далее надосадочную жидкость двукратно центрифугировали в течение 20 мин при 1500g и однократно – при 3000, каждый раз удаляя осадок. Надосадок пропускали через фильтр Millex с диаметром пор 800 нм (Merck-Millipore, Массачусетс, США). Далее концентрирование внеклеточных везикул производили посредством центрифугирования надосадка 30 мин при 16 000g. В результате надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS без Ca и Mg (“Биолот”, Россия).

Иммунофенотипирование ВВ проводили с использованием следующих моноклональных антител, конъюгированных с флюорофорами: anti-CD54-PE (Beckman Coulter, Калифорния, США), Annexin V-FITC (Biolegend, Калифорния, США), anti-CD14-KromeOrange (Beckman Coulter, Калифорния, США), anti-CD9-PE/Cy7 (Beckman Coulter, Калифорния, США), anti-CD63-APC (Beckman Coulter, Калифорния, США) согласно протоколу, опубликованному ранее [26–28]. Анализ осуществляли на проточном лазерном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Калифорния, США), оснащенном фиолетовым (405 нм), голубым (488 нм), красным (638 нм) и желто-зеленым (561 нм) лазерами, с помощью программной среды Cytexpert 2.4 (Beckman Coulter, Калифорния, США) и Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Калифорния, США). Калибровку и настройку прибора проводили с использованием стандартных калибровочных частиц известного размера от 100 до 1000 нм (Cytometry Sub-Micron Particle Size Reference Kit, Molecular probes, Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США). Начальный сигнал регистрировали по каналу бокового светорассеяния с фиолетового лазера, по которому применяли дискриминатор. Исследование объектов проводили по соответствующим каналам флуоресценции. Гейты строили на основании контрольных образцов, включающих только моноклональные антитела, внесенные в PBS. Для анализа логически формировали единую популяцию объектов, позитивных хотя бы по одному из использованных маркеров. Данные с проточного цитометра представляли в виде количества положительных событий в микролитре, а также удельного веса позитивных событий по таргетному маркеру, выраженному в процентах. Все контроли, в том числе контроль наличия мембран с использованием детергентов, контроль ложноположительных и ложноотрицательных результатов, были выполнены в соответствии с требованиями MISEV2018 [29–31]. Для исключения эффекта наложения использовали разведения образцов 1:100. Показатель получали в результате проведенных исследований серий последовательных разведений.

Исследование размеров внеклеточных везикул и их дисперсности оценивали с использованием метода динамического рассеяния света на приборе Nanolink SZ902M (Linkoptik, Китай). Исследование

проводили при следующих параметрах: температура – 25°C, рефрактерный индекс растворителя – 1.330, позиция измерения – 4.65 мм, аттенюатор – 0. Исследование проводили в трех повторах по 100 с в каждом. Для анализа полученных результатов использовали программное обеспечение Linkoptik Ver. 2.0.0.7. Образцы внеклеточных везикул оценивали по параметрам размеров объектов (peak size, nm), средняя Z (average Z, nm), индекс полидисперсности (polydispersity index – PdI), стандартное отклонение (St. deviation, nm).

Определение белкового состава исследуемых ВВ осуществляли методом вестерн-блот. Разделение белков проводили методом SDS-PAGE гель-электрофореза. Образцы предварительно прогревали 5 мин при 95°C в буфере Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Калифорния, США), содержащим 2-меркаптоэтанол (Bio-Rad, Калифорния, США). В качестве стандарта молекулярных масс использовали PageRuler™ (Thermofisher Scientific, Массачусетс, США). В качестве положительного белкового контроля использовали лизат клеток THP-1 (THP-1 total). После прохождения электрофореза разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Калифорния, США) в течение 1 ч при постоянном напряжении 100 В. Для контроля переноса белков мембрану окрашивали Ponseau S (Thermofisher Scientific, Массачусетс, США). После переноса мембрану промывали Tris Buffered Saline with Tween® 20 (TBST) буфером и блокировали в 5%-ном растворе молока в 1x TBST буфере в течение 90 мин при комнатной температуре. После чего мембрану инкубировали с первичными антителами HSP70 (D69) Antibody 4876 (1:1000), CD9 (D8O1A) Rabbit mAb 13174 (1:1000) (Cell Signaling Technology, Массачусетс, США) в течение ночи при 4°C, далее после отмывки в TBST буфере с вторичными антителами Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 7074 (1:2000) (Cell Signaling Technology, Массачусетс, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации использовали проявитель SuperSignal™ (Thermofisher Scientific, Массачусетс, США). Снимки мембран осуществляли с помощью системы гель-документации Fusion FX Vilber Lourmat.

Исследование размера и концентрации ВВ проводили с использованием технологии анализа траектории наночастиц (Nanoparticle tracking analysis – NTA) с видеофиксацией в течение 60 с в режиме равномерной потоковой подачи на приборе NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, UK). Для каждого образца выполняли 5 технических повторов. Полученные изображения оценивали визуально с использованием программного обеспечения NTA 3.4 NanoSight (Malvern Panalytical, UK). Анализ проводили в диапазонах размерности объектов 30–150 и 150–400 нм, результаты представляли в виде количества частиц в миллилитре.

*Дизайн эксперимента in vivo*

Протокол эксперимента был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В. А. Алмазова (выписка № 8 из протокола № 22-8/1 от 31 августа 2022 г.).

Исследование эффектов внеклеточных везикул проводили на рыбах *Danio rerio* обоего пола в возрасте 4–5 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях: светотемновой режим 14:10, кормление готовыми рационами Tetra mini granules 2 раза в сутки, температура воды 28.0°C с pH 6.8–7.4.

Всего было сформировано семь групп рыб: 1-я группа – контроль (рыбы интактные, без введения препарата); 2-я группа – DPBS (введение раствора DPBS); 3-я группа – V_NA (введение ВВ, секретированных неактивированными клетками THP-1); 4-я группа – V_PMA1 (введение ВВ, секретированных клетками THP-1 после активации PMA в концентрации 16 нг/мл); 5-я группа – V_PMA2 (введение ВВ, секретированных клетками THP-1 после активации PMA в концентрации 50 нг/мл); 6-я группа – V_TNF1 (введение ВВ, секретированных клетками THP-1 после активации TNF в концентрации 10 нг/мл); 7-я группа – V_TNF2 (введение ВВ, секретированных клетками THP-1 после активации TNF в концентрации 20 нг/мл). В каждую группу было включено не менее 10 рыб.

Во всех случаях интрацеломическую инъекцию образца в объеме 2 мкл осуществляли в состоянии медикаментозного сна, достигаемого путем помещения рыбы в анестезирующий раствор (пропофол 2.5 мг/л + лидокаин 50 мг/л). Использовали микроинъектор InjectMan 4 (Eppendorf, Великобритания) и одноразовые боросиликатные стеклянные капилляры с филаментной нитью (O.D. 1.5 mm, I.D. 0.86 mm) (Sutter instrument, Калифорния, США). После манипуляций каждую рыбу помещали в индивидуальный аквариум с добавлением метиленового синего. Спустя сутки рыб подвергали эвтаназии передозировкой пропофола (25 мг/л). Препаровку проводили стерильным микрохирургическим инструментом с использованием стереоскопического микроскопа (АО “ЛОМО”, Россия) и забирали внутренние органы (печень, мозг, сердце). Полученный материал помещали в отдельные стерильные пробирки, содержащие 800 мкл реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия), замораживали и хранили при –80°C до последующего использования.

*Выделение тотальной РНК*

Выделение тотальной РНК из тканей печени, мозга и сердца проводили с использованием реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) согласно

инструкции производителя. Кратко, к замороженным образцам добавляли дополнительно 200 мкл ExtractRNA, гомогенизировали пипетированием, инкубировали 40 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 13 000 g при комнатной температуре. После центрифугирования 1 мл супернатанта отбирали в чистые пробирки и добавляли 200 мкл хлороформа с последующей инкубацией в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее образцы центрифугировали 15 мин при 13 000 g при 4°C. К верхней фазе добавляли 1 мкл голубого гликогена и 500 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли при –20°C на ночь. Далее центрифугировали 15 мин при 13 000 g при 4°C, осадок промывали дважды 75%-ным этиловым спиртом (центрифугировали 5 мин при 20 000 g при 4°C). Осадок сушили на льду до полного испарения спирта и элюировали в 15 мкл свободной от нуклеаз воде. Качество и количество выделенной тотальной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 UV Visible Spectrophotometer (Thermofisher Scientific, Массачусетс, США).

### *Обратная транскрипция*

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием 500 нг выделенной тотальной РНК, 20 мкМ случайного праймера (“Евроген”, Россия) и фермента MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) при 37°C в течение 60 мин согласно протоколу производителя. Синтезированную кДНК хранили при –80°C.

### *Оценка уровня экспрессии генов*

Относительный уровень экспрессии генов *il-1*β, *il-6*, *tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx* и *il-10* в клетках органов рыб *Danio rerio* определяли методом ПЦР в реальном времени, как описано ранее [32]. Последовательности праймеров исследованных генов представлены в дополнительных материалах, таблица S1. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора реагентов qPCRmix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР осуществляли на приборе LightCycler 480 (“Roche”, Швейцария) при следующих условиях: 45 циклов 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 30 с, 70°C в течение 30 с. Для анализа ПЦР использовали программное обеспечение к амплификатору LightCycler®480 Software version 1.5.1.62 SP3 (Roche, Швейцария). Детекция накопления флуоресцентного сигнала проводилась на стадии элонгации в каждом цикле амплификации. Пороговый цикл (Ct) для каждого образца определяли на основании цикла, при котором кривая флюоресценции пересекала пороговую линию. Пороговая линия, представляющая собой фоновый уровень флюоресценции, рассчитывалась программным обеспечением. В качестве референсного гена для нормализации данных использовали ген домашнего хозяйства *eef1a1|1* [32]. Для относительной количественной оценки экспрессии генов использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Выбросы значений $2^{-\Delta\Delta Ct}$ определяли с помощью метода ROUT (Q = 5%) и исключали из дальнейшего анализа.

### *Статистический анализ*

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (25; 75). Различия между группами рассчитывали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Корреляционные связи между изучаемыми показателями определяли с помощью критерия Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Характеристика образцов внеклеточных везикул*

Все образцы ВВ продемонстрировали умеренную полидисперсность при исследовании методом динамического рассеяния света (рис. 2, *а*, *б*). Образцы ВВ, продуцируемые клетками THP-1 при стимуляции TNF, имели наибольшие размеры, тогда как образцы ВВ, полученные в результате стимуляции клеток PMA, имели наибольший диапазон размерности (примерно до 110 нм и пиком, приходящимся на 36 нм).

При исследовании концентраций ВВ методом NTA достоверных отличий между образцами выявлено не было (рис. 3). При анализе везикул в разных диапазонах размерностей были выявлены следующие закономерности. Достоверных различий в размерах внеклеточных везикул, а также в концентрациях частиц в диапазоне 150–400 нм при использовании разных стимулов не наблюдалось как в сравнении с контролем, так и между собой. Достоверные различия были выявлены при сравнении частиц в диапазоне размеров 30–150 нм. Так, было отмечено увеличение концентрации внеклеточных везикул, продуцируемых клетками THP-1 при стимуляции TNF в дозах 10 и 20 нг/мл, а также PMA в дозах 16 и 50 нг/мл по сравнению с таковыми, продуцированными нестимулированными клетками ($p < 0.01$).

Качественный состав продуцированных под воздействием различных активаторов ВВ оценивали посредством фенотипирования методом высокочувствительной проточной лазерной цитометрии (рис. 4). Уровень Annexin V-позитивных ВВ был достоверно повышен во всех образцах,

полученных от активированных клеток по сравнению с таковыми от неактивированных. Количество CD54+ ВВ было достоверно повышено в образцах ВВ, полученных при активации THP-1 клеток обоими стимулами во всех дозировках. При этом в большей степени уровень CD54-позитивных событий был повышен в образцах, полученных посредством активации клеток TNF в дозах 10 и 20 нг/мл. Во всех образцах ВВ после активации клеток обоими стимулами был отмечен повышенный уровень CD9+ и CD63+ объектов по сравнению с образцами от неактивированных клеток.

Вестерн-блот анализ продемонстрировал, что во фракции внеклеточных везикул присутствовал везикулярный мембранный маркер CD9 и маркер внутреннего содержимого – белок теплового шока 70 (HSP70) (рис. 2, *в*).

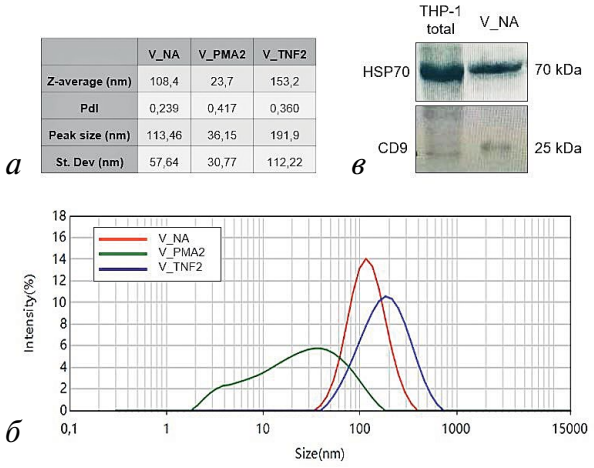



**Рис. 2.** Характеристика внеклеточных везикул, секретируемых клетками THP-1. Размер внеклеточных везикул (*а*) и дисперсность (*б*), оцененные по результатам использования метода динамического рассеяния света. Результаты вестерн-блот анализа (*в*), выполненного с антителами к белку теплового шока 70 (HSP70) и мембранному гликопротеину семейства тетраспанинов CD9. Обозначения: V_NA – ВВ, секретируемые неактивированными клетками THP-1; V_PMA2 – ВВ, секретируемые клетками THP-1 при стимуляции PMA в концентрации 50 нг/мл; V_TNF2 – ВВ, секретируемые клетками THP-1 при стимуляции TNF в концентрации 20 нг/мл; THP-1 total – лизат клеток.

*Органная экспрессия генов*

**Мозг.** В образцах мозга рыб *Danio rerio* оценивали изменения относительного уровня экспрессии восьми генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1*β, *il-6, tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1, mpeg1.2, mpx*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин. Введение раствора DPBS в целомическую полость рыб (группа DPBS) в качестве контроля реакции на проведение манипуляции вызывало достоверное увеличение уровня экспрессии генов *il-1*β ($p = 0.04$), *tnf*-α ($p = 0.04$), *mpeg1.1* ($p = 0.01$) и *mpeg1.2* ($p = 0.04$) по сравнению с интактными рыбами (контрольная группа) (рис. 5, таблица S2).

Введение ВВ приводило к достоверному снижению уровня экспрессии гена *il-1*β (рис. 5, *а*) в группах V_NA ($p = 0.05$), V_PMA1 ($p < 0.01$), V_PMA2 ($p < 0.01$) и V_TNF1 ($p < 0.01$); к снижению экспрессии гена *ifn*-γ в группах V_NA ($p = 0.04$), V_PMA2 ($p = 0.04$) и V_TNF1 ($p = 0.02$) (рис. 5, *д*); к снижению экспрессии гена *mpeg1.1* в группах V_NA ($p = 0.04$), V_PMA2 ($p < 0.01$) и V_TNF1 ($p = 0.01$) (рис. 5, *ж*); гена *tnf*-α в группах V_PMA1 ($p = 0.04$) и V_TNF1 ($p = 0.02$) (рис. 5, *г*) и гена *mpeg1.2* в группах V_NA ($p = 0.01$) и V_PMA1 ($p < 0.01$) (рис. 5, *з*) по сравнению с таковыми в группе DPBS.

ВВ, секретируемые THP-1 клетками под воздействием TNF в дозах 10 нг/мл (группа V_TNF1) и 20 нг/мл (группа V_TNF2), обладали разнонаправленными эффектами на экспрессию гена *IL-1*β (рис. 5, *а*) по отношению к таковому в группе DPBS. Под воздействием ВВ в группе V_TNF1 отмечалось снижение уровня экспрессии гена, в то время как в группе V_TNF2 – повышение.

ВВ, полученные при активации клеток одинаковым стимулом, но в разных дозах, демонстрировали достоверные отличия в уровне экспрессии генов в мозге. Так, у рыб в группе V_TNF2 был повышен уровень экспрессии генов *il-1*β ($p = 0.04$), *il-10* ($p = 0.02$) и *ifn*-γ ($p = 0.02$) по сравнению с таковым в группе V_TNF1, а в группе V_PMA2 – уровень экспрессии гена *mpeg 2.2* ($p = 0.02$) по сравнению с группой V_PMA1 (см. рис. 5).

Корреляционный анализ выявил положительные связи между уровнями экспрессии генов в группе контроля (рис. 6, *а*); в группе V_NA (рис. 6, *в*); в группах V_PMA1 (рис. 6, *г*), V_TNF1 (рис. 6, *д*) и V_TNF2 (рис. 6, *е*). Отрицательная корреляция наблюдалась только в группе V_PMA1 между уровнями экспрессии генов *il-1*β и *mpeg1.2.*

**Сердце.** В ткани сердца рыб *Danio rerio* оценивали изменения относительного уровня экспрессии шести генов, кодирующих пять провоспалительных (*il-1*β, *il-6, tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин (рис. 7, таблица S3).

Под воздействием манипуляции в группе DPBS отмечали увеличение экспрессии генов *il-1*β ($p < 0.01$) (рис. 7, *а*), *il-6* ($p = 0.02$) (рис. 7, *б*), *il-10* ($p < 0.01$) (рис. 7, *в*) и *tnf*-α ($p = 0.02$) по сравнению с контрольной группой интактных рыб (рис. 7, *г*).

Введение ВВ приводило к достоверному снижению уровня экспрессии генов *il-10* (см. рис. 7, *в*) в группе V_PMA2 ($p < 0.01$) и увеличению в группе

*а*

| Образец | Размер ВВ | | Концентрация ВВ (частиц/мл) | |
|---|---|---|---|---|
| | 30-150 нм | 150-400 нм | 30-150 нм | 150-400 нм |
| V_NA | 89,8±1,0 | 191,4±2,3 | $11{,}3\times10^8$ ($8{,}53\times10^8$; $11{,}7\times10^8$) | $1{,}57\times10^8$ ($1{,}46\times10^8$; $1{,}64\times10^8$) |
| V_TNF1 | 88,7±1,0 | 196,0±3,2 | $29{,}3\times10^8$ ($16{,}9\times10^8$; $38{,}3\times10^8$) * | $2{,}43\times10^8$ ($1{,}74\times10^8$; $2{,}80\times10^8$) |
| V_TNF2 | 87,0±1,0 | 187,8±1,3 | $29{,}7\times10^8$ ($19{,}9\times10^8$; $38{,}3\times10^8$) * | $2{,}35\times10^8$ ($1{,}68\times10^8$; $2{,}95\times10^8$) |
| V_PMA1 | 89,8±0,7 | 184,5±2,1 | $37{,}5\times10^8$ ($12{,}1\times10^8$; $44{,}8\times10^8$) * | $1{,}80\times10^8$ ($1{,}75\times10^8$; $1{,}84\times10^8$) |
| V_PMA2 | 88,8±0,4 | 187,6±3,5 | $25{,}8\times10^8$ ($16{,}4\times10^8$; $43{,}2\times10^8$) * | $2{,}37\times10^8$ ($1{,}93\times10^8$; $2{,}55\times10^8$) |

*б*

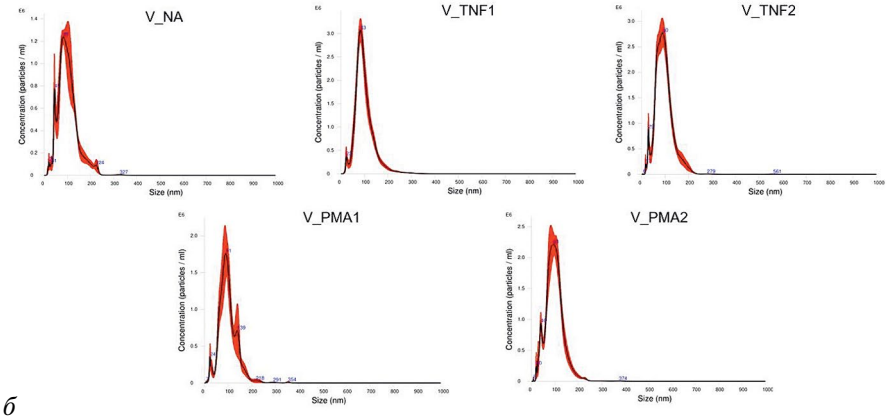



**Рис. 3.** Средние размеры и концентрация ВВ, секретируемых клетками THP-1, рассчитанные по результатам анализа траектории наночастиц в диапазонах 30–150 и 150–400 нм: *а* – таблица размер/концентрация продуцируемых внеклеточных везикул в диапазоне 30–150 и 150–400 нм; *б* – графики размер/концентрация ВВ, секретируемых THP-1 клетками при активации TNF и PMA в разных концентрациях. Обозначения: V_NA – ВВ, секретируемые неактивированными клетками THP-1; V_PMA1 – ВВ, секретируемые клетками THP-1 при стимуляции PMA в концентрации 16 нг/мл; V_PMA2 – ВВ, секретируемые клетками THP-1 при стимуляции PMA в концентрации 50 нг/мл; V_TNF1 – ВВ, секретируемые клетками THP-1 при стимуляции TNF в концентрации 10 нг/мл; V_TNF2 – ВВ, секретируемые клетками THP-1 при стимуляции TNF в концентрации 20 нг/мл.
* $p < 0.05$ – достоверность отличий с группой V_NA.

V_TNF2 ($p = 0.02$); к снижению экспрессии гена *tnf*-α (см. рис. 7, *г*) в группах V_PMA1 ($p = 0.03$) и V_TNF1 (p = 0.01) и к снижению экспрессии гена *mpeg1.1* (рис. 7, *е*) в группе V_TNF1 ($p = 0.04$) по сравнению с группой DPBS.

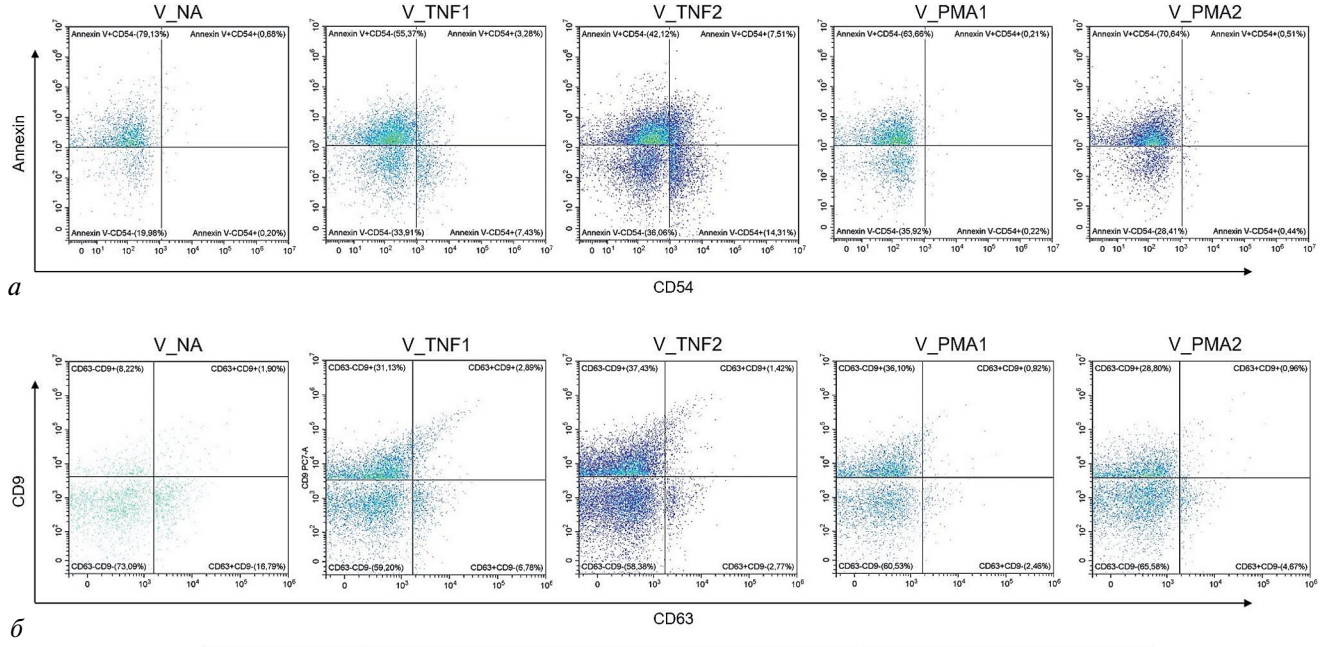
Инъекции ВВ в группах V_TNF1 и V_TNF2 оказывали разнонаправленные эффекты относительно группы DPBS на экспрессию генов *il-1*β, *il-6*, *il-10*. Везикулы группы V_TNF1 приводили к снижению уровня экспрессии, в то время как везикулы V_TNF2 – к повышению. Аналогичную закономерность можно отметить у ВВ из групп V_PMA1 и V_PMA2 в отношении экспрессии генов *il-6* и *il-10* (см. рис. 7).

Вводимые ВВ, полученные от одинаковых стимулов, но в разных дозах демонстрировали достоверные отличия в эффектах на уровень экспрессии генов в сердце. В группе V_TNF2 был повышен уровень экспрессии генов *il-1*β ($p < 0.01$), *il-6* ($p < 0.01$), *il-10* ($p < 0.01$), *tnf*-α ($p = 0.04$), *mpeg1.1* ($p = 0.03$) по сравнению с таковыми в группе V_TNF1; в группе V_PMA2 уровень экспрессии гена *il-10* был достоверно ниже, чем в группе V_PMA1 ($p < 0.01$).

Корреляционный анализ выявил положительную связь только в группе V_NA между уровнем экспрессии генов *il-1*β и *tnf*-α; отрицательная связь – в группе V_NA между *ifn*-γ и *il-6* и в группе DPBS между *ifn*-γ и *il-10* (рис. 8). В остальных группах V_PMA1, V_PMA2, V_TNF1 и V_TNF2 взаимосвязи между экспрессией генов цитокинов обнаружено не было.

**Печень.** В образцах печени рыб *Danio rerio* оценивали изменения относительного уровня экспрессии восьми генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1*β, *il-6*, *tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин (рис. 9, таблица S4).

При введении раствора DPBS в образцах печени в отличие от образцов мозга и сердца не наблюдали изменения уровня экспрессии ни одного из исследованных генов по сравнению с интактными рыбами. Инъекция ВВ, полученных от неактивированных клеток, в группе V_NA приводила к достоверному увеличению экспрессии генов *il-6* ($p = 0.03$) (рис. 9, *б*), *mpx* ($p = 0.02$) (рис. 9, *е*) и *mpeg1.1* ($p = 0.03$) (рис. 9, *ж*) в сравнении с группой DPBS. В группе V_TNF2 отмечено достоверное




| Группы | Внеклеточные везикулы (событий/мкл) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Annexin V+ | CD9+ | CD63+ | CD54+ | CD14+ |
| V_NA | 442 (122;966) | 57,5 (31,7;96,0) | 26,0 (20,5;44,0) | 18,2 (5,5;20,0) | 9,0 (8,0;9,0) |
| V_TNF1 | 2491 (309;3200)* | 897,0 (445,7;2123,5)* | 280,5 (172,5;445,5)* | 329,2 (43,9;1177,0)* | 12,5 (10,0;13,0) |
| V_TNF2 | 3378 (215;4242)* | 872,0 (286,5;2746,0)* | 240,0 (190,0;509,0)* | 538,2 (27,5;1215,5)* | 11,0 (8,0;15,7) |
| V_PMA1 | 1596 (132;2246)* | 684,0 (358,0;1590,0)* | 158,0 (58,0;560,50)* | 44,5 (32,0;77,5)* | 8,5 (5,0;16,5) |
| V_PMA2 | 2085 (315;2630)* | 946,7 (647,5;2255,5)* | 196,5 (92,0;640,0)* | 37,0 (27,5;77,0)* | 15,2 (13,5;17,0) |

*в*

**Рис. 4.** Иммунофенотипирование внеклеточных везикул, секретируемых клетками THP-1, исследованные методом высокочувствительной проточной лазерной цитометрии. Репрезентативные двухпараметровые псевдоцветные графики результатов иммунофенотипирования – с anti-CD54-PE и Annexin V-FITC антителами (*а*); с anti-CD63-APC и anti-CD9-PE/Cy7 антителами (*б*); *в* – концентрации позитивных по маркерам внеклеточных везикул. Результаты представлены в количестве событий в мкл, Me (25; 75). Обозначения групп аналогичны рис. 3.
* $p < 0.05$ – достоверность отличий с группой V_NA.

повышение экспрессии генов *il-1*β ($p = 0.02$), *il-6* ($p = 0.03$), *il-10* ($p = 0.02$) и *mpx* ($p = 0.03$); в группах V_PMA1 и V_PMA2 – снижение экспрессии гена *il-10* ($p = 0.01$ и $p = 0.03$ соответственно) по сравнению с таковыми в группе DPBS.

Разнонаправленными эффектами на экспрессию генов в печени обладали везикулы групп V_TNF1 и V_TNF2 в отношении *il-1*, *il-6*, *il-10*, а также везикулы групп V_PMA1 и V_PMA2 в отношении гена *ifn*-γ.

В группах V_TNF1 и V_TNF2 в ответ на введение ВВ в образцах печени наблюдали достоверно различающиеся эффекты на уровень экспрессии генов *il-1*β ($p < 0.01$), *il-10* ($p = 0.01$), *ifn*-γ, *mpx* ($p = 0.02$) и *mpeg1.2* ($p = 0.02$). Достоверно различающиеся эффекты были отмечены в группах V_PMA1 и V_PMA2 в отношении гена *ifn*-γ ($p = 0.04$).

Корреляционный анализ выявил положительную связь в группе DPBS между уровнем экспрессии генов *tnf*-α и *mpx*; в группе V_PMA2 – между *il-1*β и *mpeg1.2* (рис. 10); отрицательная корреляция была установлена в группе V_PMA1 между *tnf*-α и *mpeg1.2*, и в группе V_TNF2 – между *mpx* и *mpeg1.2*. В контрольной группе, а также в группах V_NA и V_TNF1 взаимосвязи между экспрессией генов про- и противовоспалительных цитокинов обнаружено не было.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проводимые с рыбой *Danio rerio* манипуляции (наркоз, временное извлечение из водной среды, пункция брюшной стенки, интрацеломическое введение DPBS) могут являться триггером

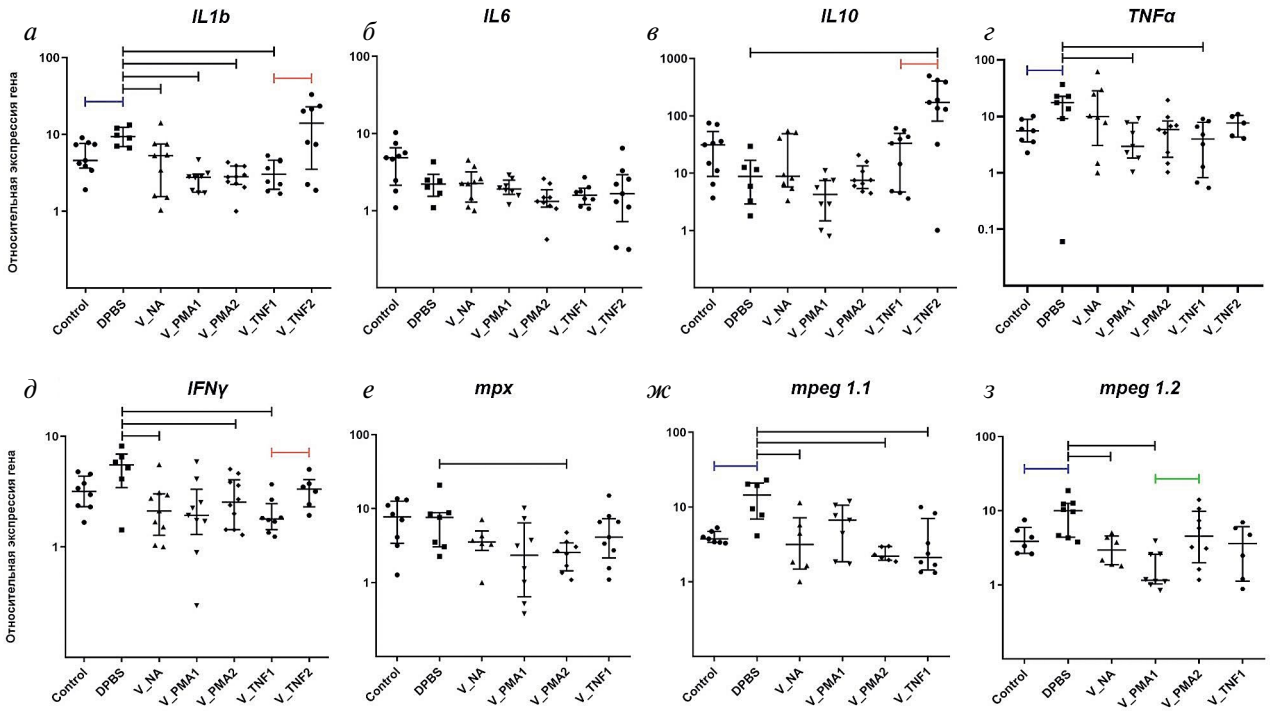



**Рис. 5.** Относительная экспрессия генов *il-1*β (*а*), *il-6* (*б*), *il-10* (*в*), *tnf*-α (*г*), *ifn*-γ (*д*), *mpx* (*е*), *mpeg1.1* (*ж*), *mpeg1.2* (*з*) в образцах мозга рыб *Danio rerio* исследуемых групп: Control – интактные рыбы; DPBS – инъекция раствора DPBS; V_NA – инъекция ВВ, секретируемых неактивированными клетками THP-1; V_PMA1 – инъекция ВВ, секретируемых клетками THP-1 при стимуляции PMA в концентрации 16 нг/мл; V_PMA2 – инъекция ВВ, секретируемых клетками THP-1 при стимуляции PMA в концентрации 50 нг/мл; V_TNF1 – инъекция ВВ, секретируемых клетками THP-1 при стимуляции TNF в концентрации 10 нг/мл; V_TNF2 – инъекция ВВ, секретируемых клетками THP-1 при стимуляции TNF в концентрации 20 нг/мл.
Синий цвет – достоверные отличия между группами Control и DPBS при $p < 0.05$.
Черный – достоверные отличия между группой DPBS и группами V_NA, V_PMA1, V_PMA2, V_TNF1, V_TNF2 при $p < 0.05$.
Зеленый цвет – достоверные отличия между группами V_PMA1 и V_PMA2 при $p < 0.05$.
Красный цвет – достоверные отличия между группами V_TNF1 и V_TNF2 при $p < 0.05$.

активации продукции провоспалительных цитокинов в отдаленных органах. Так, было показано увеличение экспрессии генов *il-1*β и *tnf*-α в мозге и сердце, *il-6* и *il-10* в сердце, а также *mpeg1.1* и *mpeg1.2* в мозге после интрацеломической инъекции DPBS по сравнению с интактными рыбами. Это демонстрирует ответ иммунной системы на проводимые манипуляции и соотносится с имеющимися представлениями о возможном развитии системного воспаления в ответ на значительные повреждения и вмешательства, а также с дальнейшим вовлечением отдаленных органов в поддержание воспаления [33–35].

Мы продемонстрировали возможность оказывать влияние на выраженность реакций на проводимые манипуляции на модели рыб *Danio rerio* посредством внеклеточных везикул, секретируемых активированными клетками THP-1. Было показано, что инъекция ВВ в целомическую полость рыб приводила к изменению профиля экспрессии генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1*β, *il-6*, *tnf*-α, *ifn*-γ, *mpx*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин, в отдаленных органах, таких как печень, сердце и мозг. Наблюдаемые изменения уровня экспрессии генов цитокинов после введения ВВ могут говорить об их системном воздействии на организм рыб *Danio rerio*.

Экзогенные внеклеточные везикулы могут присутствовать в кровотоке от нескольких минут до нескольких часов [36]. Их выведение из циркуляции, скорее всего, связано с задержкой и поглощением в органах-мишенях, причем скорость выведения и распределение по органам может в значительной степени зависеть от клеточного происхождения и состава везикул. Например, исследование биораспределения эритроцитарных ВВ показало поглощение печенью (44,9%), костями (22,5%), кожей (9,7%), мышцами (5,8%), селезенкой (3,4%), почками (2,7%) и легкими (1,8%) [37].

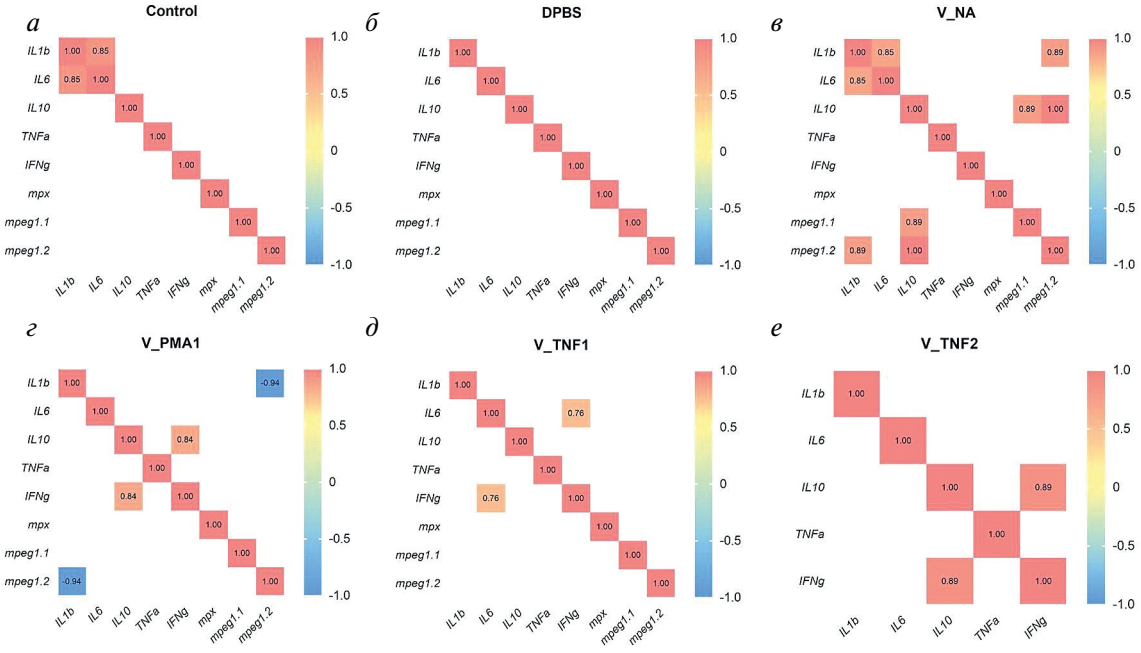



**Рис. 6.** Тепловая карта корреляции между относительной экспрессией генов в образцах мозга рыб *Danio rerio* внутри каждой исследуемой группы. Представлены группы рыб только с достоверными корреляциями ($p < 0.05$): *а – е* – группы рыб, обозначения которых аналогичны рис. 5. Полоса цветовой шкалы показывает диапазон коэффициента корреляции (*r*). Красный цвет обозначает высокую положительную корреляцию, уменьшающуюся до синей полосы, которая представляет отрицательную корреляцию.

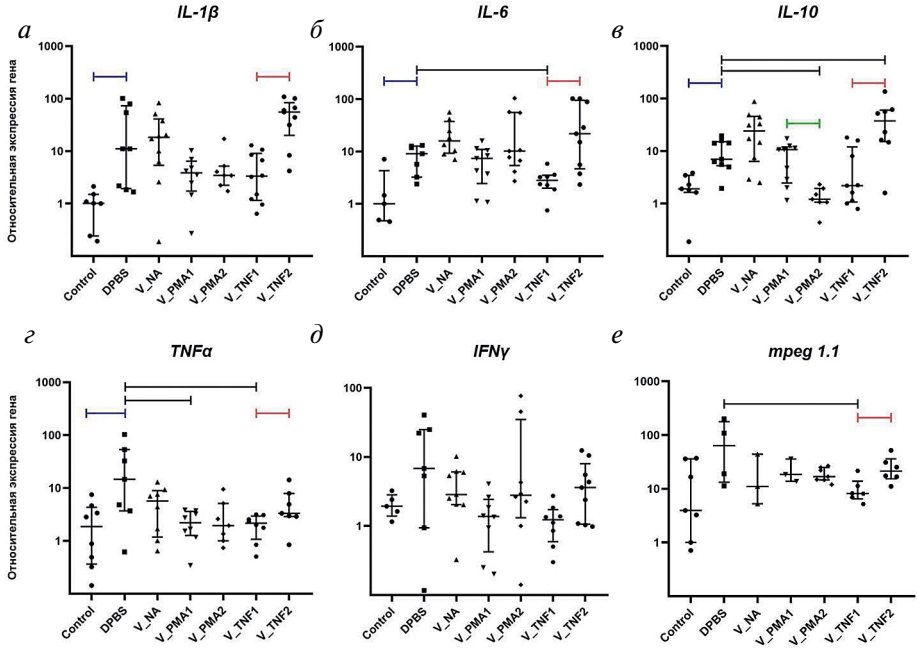



**Рис. 7.** Относительная экспрессия генов *il-1*β (*а*), *il-6* (*б*), *il-10* (*в*), *tnf*-α (*г*), *ifn*-γ (*д*), *mpeg1.1* (*е*) в образцах сердца рыб *Danio rerio* исследуемых групп. Достоверные отличия между группами при $p < 0.05$. Обозначения групп рыб аналогичны рис. 5.

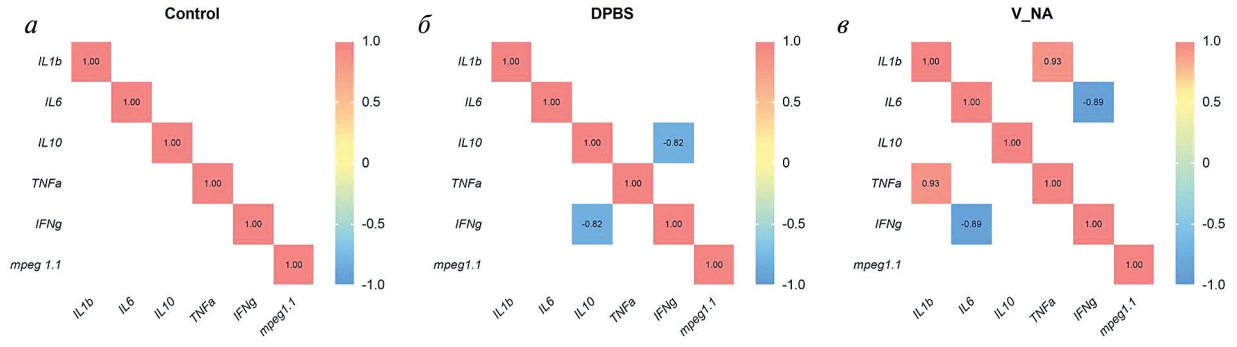



**Рис. 8.** Тепловая карта корреляции между экспрессией генов в образцах сердца рыб *Danio rerio.* Представлены группы рыб только с достоверными корреляциями ($p < 0.05$): *а – в* – группы рыб, обозначения которых аналогичны рис. 5. Полоса цветовой шкалы показывает диапазон коэффициента корреляции (*r*). Красный цвет обозначает высокую положительную корреляцию, уменьшающуюся до синей полосы, которая представляет отрицательную корреляцию.

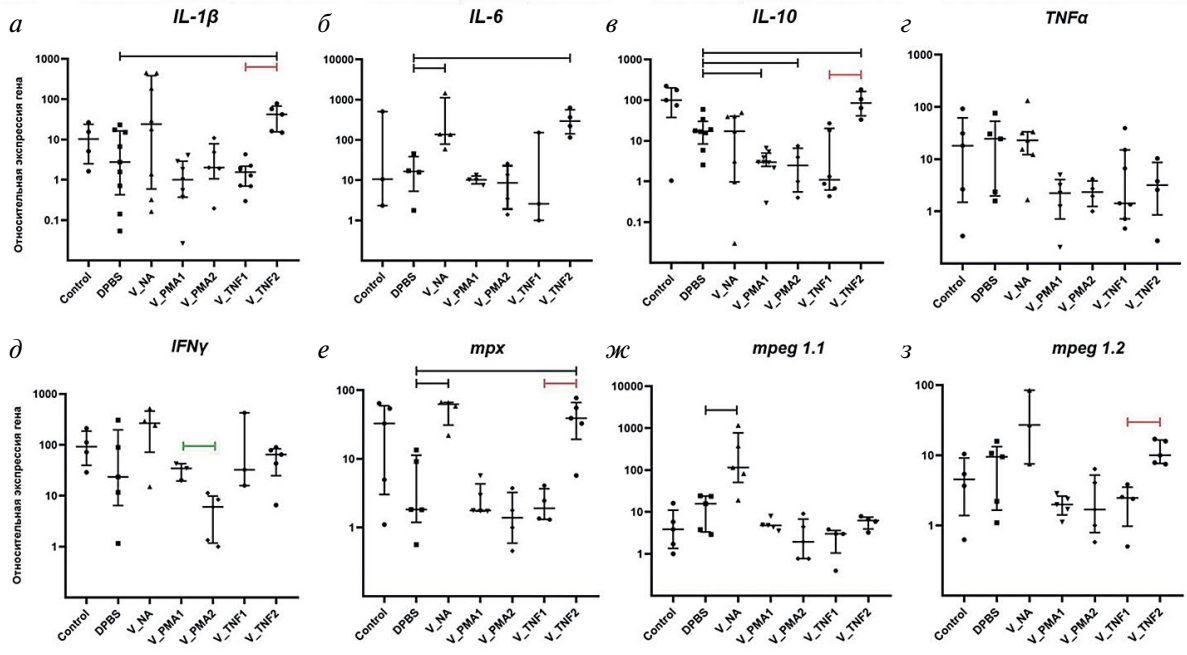



**Рис. 9.** Относительная экспрессия генов *il-1*β (*а*), *il-6* (*б*), *il-10* (*в*), *tnf*-α (*г*), *ifn*-γ (*д*), *mpx* (*е*), *mpeg1.1* (*ж*), *mpeg1.2* (*з*) в образцах печени рыб *Danio rerio* исследуемых групп. Достоверные отличия между группами при $p < 0.05$. Обозначения групп рыб аналогичны рис. 5.

ВВ, полученные из клеток злокачественных опухолей простаты, почек, мочевого пузыря, при экспериментальном введении в кровоток распределялись по органам по-разному, в зависимости от вида опухоли (рак простаты: легкие > печень > мозг; рак почки: мозг > легкие > печень; рак мочевого пузыря: легкие > печень > мозг). При этом поглощение экзосом другими органами, кроме легких, печени, головного мозга и селезенки, не было отмечено [38]. В нашем исследовании оценка эффектов введенных везикул оценивалась через сутки после инфузии, что можно считать достаточным для их распределения по органам и реализации возможного эффекта.

Ранее *Golnaz Morad et al.* продемонстрировали распределение экзосом в организме рыб *Danio rerio* после их внутрисердечной инъекции [39]. С помощью покадровой визуализации авторы наблюдали процессы трансцитоза объектов в нервную ткань, при этом целостность гематоэнцефалического

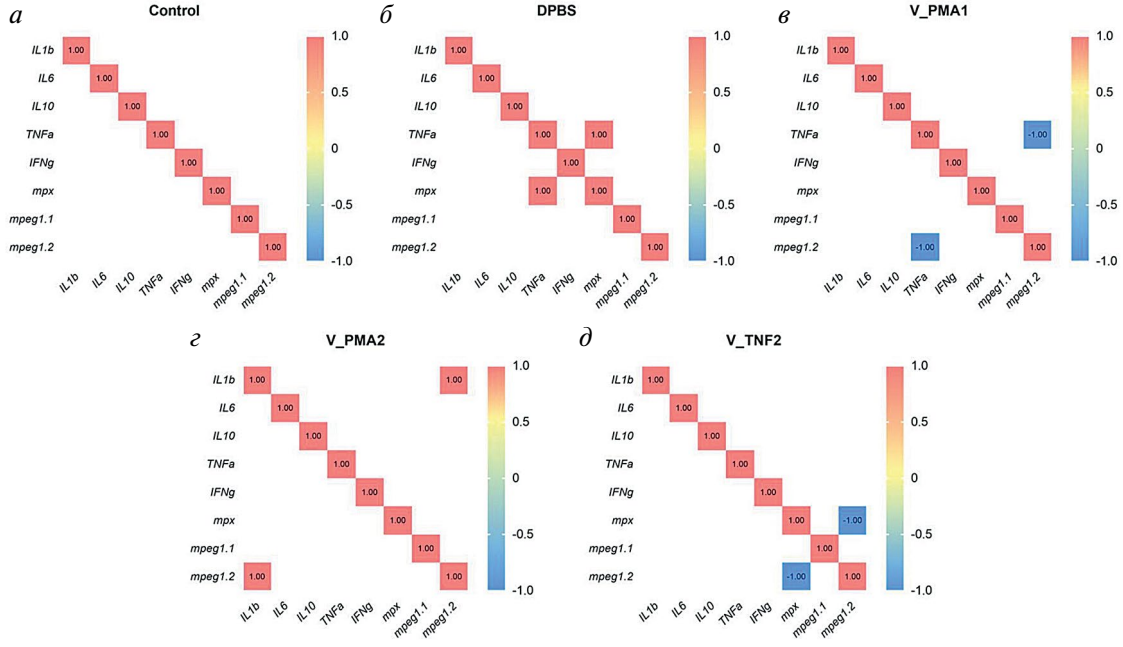



**Рис. 10.** Тепловая карта корреляции между экспрессией генов в образцах печени рыб *Danio rerio*. Представлены группы рыб только с достоверными корреляциями ($p < 0.05$); *а* – *д* – группы рыб, обозначения которых аналогичны рис. 5. Полоса цветовой шкалы показывает диапазон коэффициента корреляции (*r*). Красный цвет обозначает высокую положительную корреляцию, уменьшающуюся до синей полосы, которая представляет отрицательную корреляцию.

барьера сохранялась, а его проницаемость для других компонентов крови не увеличивалась. В исследовании *in vivo* на мышиной модели *William A. Banks et al.* показали, что вводимые экзосомы способны проникать через гематоэнцефалический барьер [40]. В нашем исследовании была использована фракция микровезикул, обладающая определенной полидисперсностью с включением в свой состав объектов менее 100 нм в диаметре. При этом был отмечен эффект на уровень экспрессии генов цитокинов в клетках головного мозга, что в совокупности с литературными данными может указывать на проходимость исследуемых объектов через гематоэнцефалический барьер.

Модуляция нейровоспаления основана на способности микроглии и моноцитов/макрофагов взаимодействовать и проявлять два противоположных типа реагирования – по фенотипу М1 или фенотипу М2. Как результат, обеспечивается баланс цитотоксических и протективных эффектов в клетках центральной нервной системы [41]. Внеклеточные везикулы, являясь важным инструментом межклеточных взаимодействий и обладая возможностью преодолевать гематоэнцефалический барьер, могут обеспечивать рекрутирование макрофагов в мозг, усугубляя патологический статус [42]. Ранее было показано, что продуцируемые макрофагами ВВ, перенося провоспалительные цитокины, например IL-1β, к астроцитам и нейрональным клеткам, способны вызывать нейровоспаление [43]. Кроме того, продуцируемые макрофагами ВВ способны оказывать влияние на скорость проведения нейроимпульса. Причем эффект отличался у везикул, полученных от М0, М1 и М2 макрофагов [44].

Клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета способны продуцировать внеклеточные везикулы. При этом их функция будет в значительной мере связана с типом клеток [16]. В настоящем исследовании была использована линия моноцитоподобных клеток THP-1, традиционно считающейся релевантной моделью моноцитов/макрофагов. Известно, что внеклеточные везикулы последних обладают различными функциями. Так, они вызывают обусловленную воспалением программированную клеточную гибель гладкомышечных клеток посредством переноса функциональной пироптотической каспазы-1 [45]. Макрофагальные ВВ могут индуцировать дифференцировку наивных моноцитов в макрофаги [46]. Кроме того, эти везикулы содержат микроРНК miR-223, являющуюся важным регулятором пролиферации и дифференцировки миелоидных клеток, а также несут в своем составе молекулы главного комплекса гистосовместимости (MHC II) и костимуляторные молекулы, что позволяет им участвовать в презентации антигена [47].

В данном исследовании продемонстрировано, что внеклеточные везикулы, полученные от клеток THP-1, активированных PMA и TNF в разных дозах, обладали различными иммуномодулирующими свойствами в организме рыб *Danio rerio*. Инъекция ВВ, секретируемых клетками THP-1 при воздействии TNF в концентрации 10 нг/мл и PMA в концентрациях 16 и 50 нг/мл, приводила к снижению экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*il-1*β, *ifn*-γ, *tnf*-α, *mpx*, *mpeg1.1* и *mpeg1.2*) в печени, сердце и мозге рыб *Danio rerio*. Подобные изменения свидетельствуют о потенциальных противовоспалительных эффектах, использованных ВВ.

Также было установлено, что активация клеток THP-1 воздействием TNF в концентрациях 10 и 20 нг/мл оказывала дозозависимый эффект на свойства секретируемых этими клетками везикул. Так, внеклеточные везикулы, полученные от клеток THP-1, активированных обработкой 20 нг/мл TNF, приводили к большему увеличению экспрессии генов *il-10* и *il-1*β в печени, сердце и мозге по сравнению с таковым от везикул, полученных от дозы TNF 10 нг/мл. Кроме того, достоверно отличался уровень экспрессии генов *il-6* в сердце и *mpx* в печени. В отношении эффектов от везикул, полученных при стимуляции клеток разными дозами PMA, были выявлены достоверные отличия между уровнями экспрессии генов *mpeg1.2* в мозге, *il-10* в сердце и *ifn*-γ в печени.

Интересно, что в ряде случаев были отмечены разнонаправленные эффекты ВВ, полученных при использовании разной дозы стимула TNF. В частности, ВВ в группе V_TNF1 вызывали снижение экспрессии *il-1*β в мозге и сердце, в то время как V_TNF2 – повышение. Аналогичный эффект был в отношении *il-10* в сердце и печени, а *il-6* – в сердце. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под воздействием различных видов стимулов, а также различных доз активаторов, моноцитоподобные клетки продуцируют везикулы, качественно отличающиеся между собой, что приводит к разным эффектам при их инъекции в организм рыб *Danio rerio*. Эффекты ВВ связаны с составом переносимого ими груза, который может значительно различаться и включать нуклеиновые кислоты, липопротеиды, цитокины, ферменты и т.д. [16, 19, 36, 48]. При этом качественный состав ВВ разного клеточного происхождения зависит от клетки-продуцента [27, 36]. Мало того, *Schindler V.* с соавторами было показано, что эпителиальные клетки бронхов в одинаковых условиях продуцировали различные по размеру, уровню экспрессии тетраспанинов на поверхности, а также по переносимому набору микроРНК внеклеточные везикулы апикальной и базальной частями клеток [49]. Таким образом, характеристика продуцируемых везикул зависит не только от клеточного происхождения, влияния активаторов или блокаторов, но и от пространственной организации и области самой клетки, где происходит синтез экзосом или микровезикул.

Везикулы, продуцированные клетками THP-1 после стимуляции всеми использованными активаторами, имели преимущественно меньшие размеры, чем таковые от нестимулированных клеток. Кроме того, полидисперсность объектов увеличивалась в направлении неактивированные клетки – стимуляция TNF – стимуляция PMA. Размерность везикул является важным фактором, напрямую связанным с биогенезом объектов и, соответственно, с принадлежностью их к экзосомам или микровезикулам. При этом биологической активностью в отношении регуляции воспаления могут обладать обе категории внеклеточных везикул [16, 50]. Кроме того, несколько больший размер объектов, а также большее содержание аннексин V-позитивных объектов может быть признаком присутствия в образцах V_TNF2 апоптотических телец, которые также обладают высокой биологической активностью [51].

В образцах ВВ, полученных от стимулированных клеток (TNF и PMA), был более высокий уровень CD9+ и CD63+ объектов, т.е. несущих тетраспаниновые рецепторы, по сравнению с таковым от нестимулированных клеток. Кроме того, в образцах, полученных при стимуляции TNF, отмечалось повышенное содержание CD54-позитивных событий. Таким образом, морфология и качественный состав использованных в исследовании внеклеточных везикул различались в образцах в зависимости от использованных активаторов.

CD54 является индуцибельным белком клеточной адгезии, который играет ключевую роль во взаимодействии эндотелия и лейкоцитов и регулирует сосудистую проницаемость. Кроме этого, CD54 используют в качестве маркера активации антигенпрезентирующих клеток [52], а экспрессирующие его внеклеточные везикулы являются активными участниками регуляции воспаления [50]. Ранее было показано, что уровень CD54+ объектов коррелирует со степенью повреждения головного мозга при инсульте [53], а также повышается при субарахноидальном кровотечении [54, 55].

Таким образом, внеклеточные везикулы, секретируемые клетками THP-1, обладают разным качественным составом в зависимости от способов активации клеток, способны оказывать влияние на экспрессию генов провоспалительных (*il-1*β, *il-6*, *tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx*) и противовоспалительных (*il-10*) цитокинов в тканях и органах.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, продуцируемые моноцитоподобными клетками THP-1 под воздействием

различных стимулов, при интрацеломическом введении рыбам *Danio rerio* оказывают системный эффект, проявляющийся изменением экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в головном мозге, печени и сердце. В зависимости от вида и дозы использованного для активации стимула может меняться качественный состав продуцируемых везикул, что проявляется в силе и направленности детектируемых *in vivo* эффектов.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-20076. https://rscf.ru/project/19-75-20076/

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов*. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Протокол эксперимента был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В.А. Алмазова (выписка № 8 из протокола № 22-8/1 от 31 августа 2022 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lenz A., Franklin G.A., Cheadle W.G.* // Systemic inflammation after trauma / Injury. 2007. V. 38. № 12. P. 1336–1345.
2. *Lee O., Xinyi Z., Partha D.* // Pharmacological research. 2021. V. 170. P. 105692.
3. *Головкин А.С.* Механизмы синдрома системного воспалительного ответа после операций с применением искусственного кровообращения / Дис... доктора мед. наук. 2014. Т. 14. № 03.
4. *Abbas A., Lichtman A., Pillai S.* // Cellular and Molecular Immunology 9th edition. 2018. P. 62–65.
5. *Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андронова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.А., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г.* // Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. 2021. 550 с.
6. *Каспаров Э.В., Савченко А.А., Кудлай Д.А., Кудрявцев И.В., Тихонова Е.П., Головкин А.С., Борисов А.Г.* // Клиническая иммунология. Реабилитация иммунной системы. 2022. 196 с.
7. *Черешнев В.А., Гусев Е.Ю.* // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14. № 1–2. С. 9–20.
8. *Cavaillon J.M., Annane D.* // Journal of endotoxin research. 2006. V. 12. № 3. P. 151–170.
9. *Chanput W., Mes J., Vreeburg R.A., Savelkoul H.F., Wichers H.J.* // Food & function. 2010. V. 1. № 3. P. 254–261.
10. *Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y.* // Molecular cell. 2010. V. 39. № 1. P. 133–144.
11. *McDonald M.K., Tian Y., Qureshi R.A., Gormley M., Ertel A., Gao R., Aradillas Lopez E., Alexander M., Sacan A., Fortina P., Ajit S.K.* // Pain. 2014. V. 155. № 8. P. 1527–1539.
12. *Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C.* // BMC Cancer. 2015. V. 15. № 1. P. 1–14.
13. *Chanput W., Mes J., Savelkoul H.F., Wichers H.J.* // Food & function. 2013. V. 4. № 2. P. 266–276.
14. *Walsh S.A., Davis T.A.* // Journal of Inflammation. 2022. V. 19. № 1. P. 6.
15. *Rossaint J., Kühne K., Skupski J., Van Aken H., Looney M.R., Hidalgo A., Zarbock A.* // Nature communications. 2016. V. 7. № 1. P. 13464.
16. *Ohayon L., Zhang X., Dutta P.* // Pharmacological research. 2021. V. 170. P. 105692.
17. *Aires I.D., Ribeiro-Rodrigues T., Boia R., Ferreira-Rodrigues M., Girao H., Ambrosio A.F., Santiago A.R.* // Biomolecules. 2021. V. 11. № 6. P. 770.
18. *Hu Q., Su H., Li J., Lyon C., Tang W., Wan M., Hu T.Y.* // Precision Clinical Medicine. 2020. V. 3. № 1. P. 54–66.
19. *Doyle L.M., Wang M.Z.* // Cells. 2019. V. 8. № 7. P. 727.
20. *Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P.* // Bioscience. 2015. V. 65. № 8. P. 783–797.
21. *Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L. et al.* // Nature. 2013. V. 496. № 7446. P. 498–503.
22. *Zizioli D., Mione M., Varinelli M., Malagola M., Bernardi S., Alghisi E., Borsani G., Finazzi D., Monti E., Presta M., Russo D.* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2019. V. 1865 № 3. P. 620–633.
23. *Baranasic D., Hörtenhuber M., Balwierz P.J., Zehnder T., Mukarram A.K., Nepal C., Várnai C., Hadzhiev Y., Jimenez-Gonzalez A., Li N. et al.* // Nature genetics. 2022. V. 54. № 7. P. 1037–1050.
24. *Акино А.Д., Рубинштейн А.А., Головкин И.А., Тирикова П.В., Трулев А.С., Кудряыцев И.В., Головкин А.С.* // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.– 2024. Опубликовано онлайн 07.12.2023
25. *Dubashynskaya N.V., Bokatyi A.N., Golovkin A.S., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Trulioff A.S., Dubrovskii Y.A., Skorik Y.A.* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22. № 20. P. 10960.

26. *Kudryavtsev I., Kalinina O., Bezrukikh V., Melnik O., Golovkin A.* // Viruses. 2021. V. 13. № 5. P. 767.
27. *Kondratov K., Nikitin Y., Fedorov A., Kostareva A., Mikhailovskii V., Isakov D., Ivanov A., Golovkin A.* // Journal of extracellular vesicles. 2020. V. 9. № 1. P. 1743139.
28. *Fedorov A., Kondratov K., Kishenko V., Mikhailovskii V., Kudryavtsev I., Belyakova M., Sidorkevich S., Vavilova T., Kostareva A., Sirotkina O., Golovkin A.* // Platelets. 2020. V. 31. № 2. P. 226–235.
29. *Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. et al.* // Journal of extracellular vesicles. 2018. V. 7. № 1. P. 1535750.
30. *Welsh J.A., Van Der Pol E., Arkesteijn G.J.A., Bremer M., Brisson A., Coumans F., Dignat-George F., Duggan E., Ghiran I., Giebel B., Görgens A., Hendrix A., Lacroix R., Lannigan J., Libregts SFWM, Lozano-Andrés E., Morales-Kastresana A., Robert S., De Rond L., Tertel T., Tigges J., De Wever O., Yan X., Nieuwland R., Wauben MHM, Nolan J.P., Jones J.C.* // Journal of extracellular vesicles. 2020. V. 9. № 1. P. 1713526.
31. *Welsh J.A., Arkesteijn G.J.A., Bremer M., Cimorelli M., Dignat-George F., Giebel B., Görgens A., Hendrix A., Kuiper M., Lacroix R., Lannigan J., van Leeuwen T.G., Lozano-Andrés E., Rao S., Robert S., de Rond L., Tang V.A., Tertel T., Yan X., Wauben M.H.M., Nolan J.P., Jones J.C., Nieuwland R., van der Pol E.* // Journal of Extracellular Vesicles. 2023. V. 12. № 2. P. e12299.
32. *Ма И., Федоров А.В., Кондратов К.А., Князева А.А., Васютина М.Л., Головкин А.С.* // Медицинская иммунология. 2021. Т. 23. № 5. С. 1069–1078.
33. *Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C.* // Jama. 2016. V. 315. № 8. P. 801–810.
34. *Mira J.C., Gentile L.F., Mathias B.J., Efron P.A., Brakenridge S.C., Mohr A.M., Moore F.A., Moldawer L L.* // Critical care medicine. 2017. V. 45. № 2. P. 253–262.
35. *Toliver-Kinsky T., Kobayashi M., Suzuki F., Sherwood E.R.* // Total burn care. 2018. P. 205–220. e4.
36. *Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J. et al.* // Journal of extracellular vesicles. 2015. V. 4. № 1. P. 27066.
37. *Willekens F.L., Werre J.M., Kruijt J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Döpp Y.A., van den Bos A.G., Bosman G.J., van Berkel T.J.* // Blood. 2005. V. 105. № 5. P. 2141–2145.
38. *Linxweiler J., Kolbinger A., Himbert D., Zeuschner P., Saar M., Stöckle M., Junker K.* // Cancers. 2021. V. 13. № 19. P. 4937.
39. *Morad G., Carman C.V., Hagedorn E.J., Perlin J.R., Zon L.I., Mustafaoglu N., Park T.E., Ingber D.E., Daisy C.C., Moses M.A.* // ACS nano. 2019. V. 13. № 12. P. 13853–13865.
40. *Banks W.A., Sharma P., Bullock K.M., Hansen K.M., Ludwig N., Whiteside T.L.* // International journal of molecular sciences. 2020. V. 21. № 12. P. 4407.
41. *Carata E., Muci M., Simona Di Giulio, Mariano S., Panzarini E.* // International Journal of Molecular Sciences. 2023. V. 24. № . 14. P. 11251.
42. *Saint-Pol J., Gosselet F., Duban-Deweer S., Pottiez G., Karamanos Y.* // Cells. 2020. V. 9. № 4. P. 851.
43. *Kodidela S., Sinha N., Kumar A., Zhou L., Godse S., Kumar S.* // Scientific Reports. 2023. V. 13. № 1. P. 3005.
44. *Vakili S., Ahooyi T.M., Yarandi S.S., Donadoni M., Rappaport J., Sariyer I.K.* // Brain sciences. 2020. V. 10. № 7. P. 424.
45. *Sarkar A., Mitra S., Mehta S., Raices R., Wewers M.D.* // PloS one. 2009. V. 4. № 9. P. e7140.
46. *Ismail N., Wang Y., Dakhlallah D., Moldovan L., Agarwal K., Batte K., Shah P., Wisler J., Eubank T.D., Tridandapani S., Paulaitis M.E., Piper M.G., Marsh C.B.* // Blood. 2013. V. 121. № 6. P. 984–995.
47. *Qu Y., Ramachandra L., Mohr S., Franchi L., Harding C.V., Nunez G., Dubyak G.R.* // The Journal of Immunology. 2009. V. 182. № 8. P. 5052–5062.
48. *Femminò S., Penna C., Margarita S., Comità S., Brizzi M.F., Pagliaro P.* // Vascular Pharmacology. 2020. V. 135. P. 106790.
49. *Schindler V.E.M., Alhamdan F., Preußer C., Hintz L., Alashkar Alhamwe B., Nist A., Stiewe T., Pogge von Strandmann E., Potaczek D.P., Thölken C., Garn H.* // Biomedicines. 2022. V. 10. № 3. P. 622.
50. *Słomka A., Urban S.K., Lukacs-Kornek V.,* Żekanowska *E., Kornek M.* // Frontiers in immunology. 2018. V. 9. P. 2723.
51. *Caruso S., Poon I.K.H.* // Frontiers in immunology. 2018. V. 9. P. 1486.
52. *Sheikh N.A., Jones L.A.* // Cancer Immunology, Immunotherapy. 2008. V. 57. № 9. P. 1381–1390.
53. *Simak J., Gelderman M.P., Yu H., Wright V., Baird A.E.* // Journal of thrombosis and haemostasis. 2006. V. 4. № 6. P. 1296–1302.
54. *Lackner P., Dietmann A., Beer R., Fischer M., Broessner G., Helbok R., Schmutzhard E.* // Stroke. 2010. V. 41. № 10. P. 2353–2357.
55. *El-Gamal H., Parray A.S., Mir F.A., Shuaib A., Agouni A.* // Journal of Cellular Physiology. 2019. V. 234. № 10. P. 16739–16754.

# Extracellular Vesicles Secreted by the THP-1 Cells Influence on the Inflammation Gene Expression in Zebrafish

**D. B. Sambur[1], O. V. Kalinina[1], A. D. Aquino[1], P. V. Tirikova[1], M. A. Migunova[1], E. E. Koroleva[1], A. S. Trulyov[2], A. A. Rubinshtein[1, 2], I. V. Kudryavtsev[1, 2], and A. S. Golovkin[1]**

*[1]Federal State Budgetary Institution "Almazov National Medical Research Center", St. Petersburg, Russia*

*[2]Federal State Budgetary Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia*

Extracellular vesicles secreted by immune cells may play a significant role in the initiation, maintenance, and progression of systemic inflammation. The aim of the study was to investigate the regulatory effect of extracellular vesicles (EVs) produced by activated monocyte-like THP-1 cells on expression levels of inflammatory genes in a zebrafish. Real-time PCR analysis was performed to investigate the relative expression levels of *il-1*β, *il-6*, *tnf*-α, *ifn*-γ, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx*, and *il-10* genes in the brain, liver, and heart of zebrafish followed by intracelomic injection of EVs produced by THP-1 cells activated with tumor necrosis factor (TNF) and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) at different concentrations. EVs, secreted by activated THP-1 cells with TNF at a concentration of 10 ng/mL and PMA at concentrations of 16 and 50 ng/mL, reduced the expression levels of *il-1*β, *ifn*-γ, *tnf*-α, *mpx*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, and *IL-10* genes in the brain, heart and liver of *Danio rerio*. Wherein, EVs secreted by THP-1 cells treated with TNF at doses of 10 and 20 ng/ml had opposite effects on the gene expression levels of *il-1*β in the brain, *il-1*β, *il-10*, and *il-6* in the heart; on *il-1*β, *il-10*, *mpx*, and *mpeg1.2* in the liver. EVs secreted by THP-1 cells treated with PMA at doses of 16 and 50 ng/ml had opposite effects on the expression levels of *il-6* and *il-10* genes in the heart and *ifn*-γ gene in the liver. EVs, produced by activated THP-1 cells have a systemic effect on *Danio rerio* manifested in a changing of the expression level of pro- and anti-inflammatory cytokine genes in the brain, liver, and heart. The qualitative composition of the EVs produced by activate THP-1 cells varies depending on the type and dose of the used stimulus, that reflects on strength and direction of the effects detected *in vivo*.

*Keywords: Extracellular vesicles, THP-1 cells, Danio rerio, zebrafish, gene expression*