

Міністерство охорони здоров'я України
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для впровадження в науково-дослідних установах, лабораторіях,
виробництвах та інститутах клітинної біології, що вивчають вплив біологічно
активних речовин та структур на властивості біологічних об'єктів, умови
культивуації клітин, клітинних ліній

(НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я)

ОЦІНКА РІВНЯ ПАРАКРИНОВОЇ СЕКРЕЦІЇ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ IN VITRO ПІД ВПЛИВОМ ЕКЗОСОМ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ РІЗНИХ БІОЛОГІЧНИХ СЕРЕДОВИЩ

**Натрус Л.В., Черновол П.А., Клись Ю.Г., Лабудзинський Д.О.
Музиченко П.Ф., Шаблій В.А.**

Київ - 2021

УДК 616.12-008.46:612.017:611-018.53

Методичні рекомендації складено за матеріалами
НДР «Вивчення інтегральних реакцій судин та їх окремих клітинних
компонентів у відповідь на застосування терапевтичних екзосом з
мезенхімальних клітин людини, у порівнянні з реакцією на ефект екзосом, що
отримані з крові хворих при різних патологічних станах» (№ держреєстрації
0119U101218 строки виконання 01.01.2019-31.12.2021).

*Рекомендовано для впровадження в науково-дослідних установах,
лабораторіях, виробництвах та інститутах клітинної біології, що вивчають
вплив біологічно активних речовин та структур на властивості біологічних
об'єктів, умови культивування клітин, клітинних ліній*

*Оцінка рівня паракринової секреції мононуклеарних клітин периферичної крові
людини in vitro під впливом екзосом, виділених із різних біологічних середовищ.* Натрус Л.В.,
Черновол П.А., Клись Ю.Г., Лабудзинський Д.О. Музиченко П.Ф., Шаблій В.А. // Методичні
рекомендації (нововведення в сфері охорони здоров'я) для впровадження в науково-дослідних
установах, лабораторіях, виробництвах та інститутах клітинної біології, що вивчають вплив
біологічно активних речовин та структур на властивості біологічних об'єктів, умови культивування
клітин, клітинних ліній/ Київ, НМУ імені О.О. Богомольця, 2021. 15 с.

Рецензенти:

Чайковський Ю.Б., завідувач кафедри гістології та ембріології НМУ імені
О.О. Богомольця, член-кор. НАМН України

Тихомиров А.О., завідувач відділу хімії та біохімії ферментів Інституту
біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, д.біол.н.

Для використання матеріал рекомендований Вченою Радою НМУ імені
О.О. Богомольця, протокол № _____ від _____ 2021 р.

ЗМІСТ

Вступ	4
Мета впровадження	5
Завдання	5
Матеріали та методи проведення дослідження	6
Результати	11
Висновки	18
Використана література	19

ВСТУП

Хронічна серцева недостатність (ХСН) є глобальною проблемою, в останні кілька десятиліть поширеність і захворюваність на ХСН постійно зростає у всьому світі. ХСН вважається основною причиною смерті у пацієнтів із встановленими серцево-судинними (ССЗ) та метаболічними захворюваннями. Ефективне лікування та профілактика поглиблення ХСН залишається невирішеною проблемою, оскільки сучасне уявлення про розвиток стану виходить за рамки механічної дисфункції системи кровообігу і включає взаємодію багатьох патофізіологічних механізмів: запалення, ендотеліальну дисфункцію, ремоделювання тканин, нейрогормональну та ендокринну передачу сигналів, взаємодію з сечовидільною та нервовою системами [1].

У багатьох випадках на тлі ХСН та атеросклерозу судин розвивається облітеруючий атеросклероз нижніх кінцівок (ОАНК). Це не менш загрозливе захворювання сучасності, з характерним специфічним ураженням артерій еластичного та м'язово-еластичного типів у вигляді вогнищового розростання сполучної тканини з ліпідною інфільтрацією інтими, у результаті чого виникає порушення кровотоку в тканинах. Етіологія атеросклерозу складна та багатогранна, але загально визнано, що одним з головних пускових механізмів розвитку атеросклерозу є дисфункція ендотелію, що проявляється підвищенням проникності й адгезії, а також збільшенням секреції прокоагулянтних і судинозвужуючих факторів. Паралельним процесом атерогенезу є інфільтрація інтими циркулюючими моноцитами, які трансформуються в макрофаги і здійснюють захоплення окислених ліпопротеїнів низької щільності з їхньою наступною деструкцією, запускаючи патофізіологічні механізми утворення атеросклеротичної бляшки [2].

Не зважаючи на досягнення медицини у лікуванні цих захворювань, існує гостра необхідність у розробці нових стратегічних підходів. Позаклітинні везикули - екзосоми, привертають увагу дослідників як потужні засоби міжклітинної комунікації. Екзосоми – пухирці розміром від 40 до 160 нм - походять з ендосомних компартментів, складаються з двошарової ліпідної мембрани, містять різноманітні молекулярні компоненти, включаючи ДНК, РНК, ліпіди і білки та володіють здатністю транспортувати свій вміст, тим самим впливаючи на різні фізіологічні та патологічні функції клітини-реципієнта [3,4].

Останнім часом терапія на основі мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) сприймається як багатообіцяюча стратегія при різних захворюваннях. Аналіз численних наукових досліджень свідчить про сприятливий терапевтичний вплив, обумовлений проліферативними, антиапоптичними та протизапальними ефектами МСК при хронічних запальних процесах. Дедалі більше досліджень демонструють, що терапевтичні переваги МСК переважно опосередковуються паракринними функціями, секрецією факторів росту, хемокінів і цитокінів, а не їх диференційними властивостями. Тому дослідники все більше цікавляться

терапевтичною цінністю біоактивних молекул, отриманих з МСК, особливо позаклітинних везикул, які вважаються ключовими компонентами паракринного ефекту при лікувальному впливі на основі МСК [5]. Доведено, що екзосоми, отримані із МСК, володіють позитивним терапевтичним ефектом при відновленні пошкоджених тканин на моделях захворювань печінки, нирок, серцево-судинних та неврологічних захворювань [6,7]. Терапія на основі екзосом із МСК здається більш перспективною, оскільки вона з меншою вірогідністю сприяє реакції імунного відторгнення, безпечна для реципієнта, не торкається етичних аспектів, тобто володіє важливими прикладними перевагами [8,9].

Мета впровадження :

дослідити *in vitro* особливості паракринної секреції мононуклеарних клітин крові у пацієнтів із ХСН та ОАНК під дією екзосом, виділених із плазми крові здорових донорів та середовища культивування МСК плаценти.

Завдання:

1. Дослідити вміст VEGF-A, MCP-1, ICAM-1 в середовищі культивування клітин крові пацієнтів із ХСН без впливу екзосом та після інкубації клітин з екзосомами, виділеними із плазми здорових донорів.
2. Визначити рівень VEGF-A, MCP-1, ICAM-1 в середовищі культивування клітин крові пацієнтів з ХСН та ОАНК без впливу екзосом та після впливу екзосом із середовища культивування МСК плаценти.
3. Провести оцінку впливу на ступінь паракринної секреції мононуклеарних клітин крові у пацієнтів із ХСН екзосом, виділених із плазми крові здорових донорів та середовища культивування МСК плаценти.

Матеріали і методи проведення дослідження

Дизайн дослідження та основні методологічні кроки зображено на блок-схемі (рис. 1): біоматеріал для дослідження отримували у пацієнтів кардіологічного стаціонару, пацієнтів відділення судинної хірургії та здорових донорів.

Екзосоми відбирали із плазми здорових донорів та середовища культивування МСК плаценти. РВМС донорів і пацієнтів виділяли у градієнті та після 24-годинної культивуації із LPS (для активації лейкоцитів) у середовище із РВМС додавали суспензію екзосом для подальшої інкубації протягом доби.

Дослідження секреції клітин методом ІФА проводили у наступному біоматеріалі досліджуваних осіб:

- 1) середовище культивування контрольних РВМС;
- 2) лізати РВМС без екзосом;
- 3) середовище культивування на тлі інкубації РВМС із екзосомами;
- 4) лізати РВМС після інкубації із екзосомами.

Морфологічну верифікацію екзосом проводили шляхом електронної мікроскопії.

Групи дослідження. До дослідження були залучені хворі на ХСН чоловіки (середній вік $62 \pm 10,2$ років, $M \pm m$), що поступали на лікування у відділення терапевтичного профіля Університетської клініки НМУ імені Богомольця, які перенесли інфаркт міокарда за останні 5 років. Загальна кількість пацієнтів з ХСН складала 28 осіб. З них було виділено 2 групи для дослідження ХСН_1, ХСН_2, оскільки експеримент проводився у двох серіях. Ступінь ХСН визначали відповідно до встановлених рекомендацій загальних критеріїв: фракція викиду лівого шлунка 40-49% за даними ехокардіографії, натрійуретичний пептид ргоВ-типу більше 400 пг/л та рівень феритину нижче 100 мкг/л у сироватці. Критерії виключення: пацієнти з прогресуючими захворюваннями печінки, респіраторними захворюваннями, нирковою недостатністю, злоякісними захворюваннями, септицемією, поточною стероїдною терапією та іншими запальними захворюваннями. Кров для дослідження забирали при надходженні до стаціонару до початку лікування.

Другу групу (ОАНК, $n=12$) склали пацієнти (чоловіки, середній вік $59 \pm 9,6$ років, $M \pm m$), із основним діагнозом ОАНК, що перебували на лікуванні в стаціонарі судинної хірургії. У більшості хворих на тлі ангіопатії (в основному діабетичної етіології, діабет 2 типу) судин нижніх кінцівок спостерігалася оклюзія стегново /підколінно/гомількового сегментів нижніх кінцівок та/або хронічна критична ішемія. У всіх пацієнтів цієї групи супутнім захворюванням була ішемічна хвороба серця, серцева недостатність, гіпертонічна хвороба II ст. За показаннями їм проводилася реваскуляризація кінцівки (шляхом аутовенозного шунтування, балонної ангіопластика артерій), або ампутація частини кінцівки. Кров для дослідження забиралася при надходженні до стаціонару, перед оперативним втручанням.

Контрольну групу (КГ, n=24) склали добровольці чоловічої статі (середній вік $35 \pm 4,7$ років, $M \pm m$), які звернулися до Університетської клініки НМУ імені Богомольця з метою профогляду, і за результатами огляду, опитування, результатів біохімічного та гематологічного дослідження крові були відібрані як відносно здорові особи. Пацієнти групи контролю також були поділені на КГ_1 та КГ_2 для двох серій експерименту.

Усі надали дозвіл (у вигляді письмової Інформованої згоди) на використання біоматеріалу для дослідження (протокол № 128 від 23.12.2019 р. Комісії з біоетики НМУ імені О.О. Богомольця).

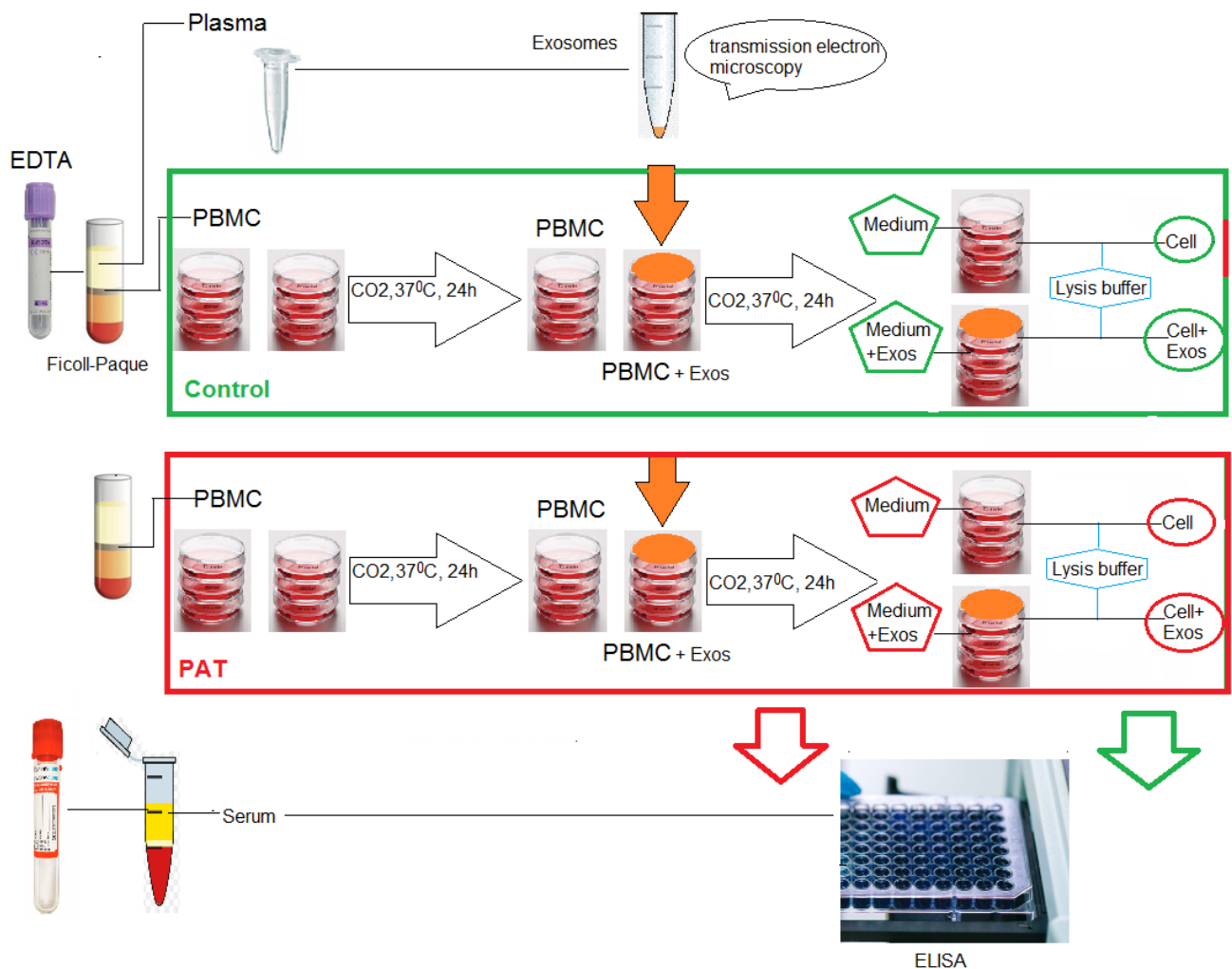


Рисунок 1 - Схема дизайну дослідження, яку проводили на матеріалі пацієнтів (PAT) та здорових добровольців (Control). PBMC – мононуклеарні клітини периферичної крові, Exos – екзосоми; Medium – середовище культивування PBMC; Cell – клітинний матеріал після інкубації.

Виготовлення PBMC та культивування. Кров пацієнтів розводили (1:1) стандартним фосфатним буфером (PBS), центрифугували у градієнті фіколу з набору Ficoll-Paque PLUS (Ficoll-Paque TM, GE Healthcare, Швеція) у

співвідношенні 3:4 при $400\times g$, 25 хв при 18°C . Осад клітин відбирали і промивали холодним $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ вільним PBS і потім готували до культивування. Клітини культивували в середовищі Roswell Park Memorial Institute medium – RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), доповненому 5% FCS (Gibco® Invitrogen), 1% пеніциліном/стрептоміцином та 1% L-глутаміном (Sigma-Aldrich) при 37°C і 5% CO_2 [10]. Після 24 годин активації 50 нг/мл LPS (Fermentas) клітини інкубували 24 години з екстрактом екзосом.

Важливою умовою стандартизації експерименту було поміщення до кожної чашки Петрі 2 млн клітин, що було підраховано за допомогою гематологічного аналізатора у венозній крові, в ізольованій популяції РВМС та додатково оцінено в камері Горяєва методом візуального підрахунку.

Виділення і верифікація екзосом.

Із крові пацієнтів обох груп та КГ виділяли моноклеарні клітини периферичної крові (англ., peripheral blood mononuclear cell, РВМС). Екзосоми відбирали із плазми донорів (Екзо_Пл) та із середовища культивування МСК плаценти (Екзо_МСК), яке було надано ТОВ «Інститут клітинної терапії» згідно договору про наукове співробітництво №2 від 02.04.2021 р.

Екзосоми виділяли із плазми осіб контрольної групи за допомогою набору для ізоляції Total Exosome (Invitrogen, США) за протоколом виробника. Принцип виділення екзосом полягає в тому, що зв'язуючи молекули води, тотальний ізоляційний реагент екзосоми витісняє з розчину менш розчинні компоненти, зокрема везикули, що дозволяє їх збирати за допомогою центрифугування. Після 30 хв. інкубації із реагентом при $2-8^{\circ}\text{C}$, суспензію із екзосомами осаджували центрифугуванням при $10\ 000\times g$ протягом 5 хв. при кімнатній температурі. Отриманий осад екзосом ретельно ресуспендували у стерильному PBS буфері.

Екзосоми іншого виду виділяли із середовища культивування МСК плаценти. МСК були вирощені з плацент людини кінцевого терміну гестації, отриманих при кесеровому розтині з інформованої згоди породіль відповідно до методики описаної раніше [11]. МСК плаценти вирощувалися в повному поживному середовищі, що містить alpha-MEM (HyClone, USA) з додаванням 15% FBS (HyClone, USA), $1\times$ RPMI amino acid solution (Sigma, USA), та $1\times$ streptomycin/penicillin (Sigma, USA) в умовах 5% CO_2 при температурі 37°C . Кондиційоване середовище збирали, центрифугували при $400\times g$ протягом 10 хв.

Екзо_МСК виділяли за допомогою набору для Total Exosome Isolation Reagent from cell culture media (Invitrogen, США) згідно інструкції виробника. Набір призначений для концентрації екзосом із зразків середовищ клітинних культур, принцип дії його аналогічний до попереднього, дозволяє зібрати екзосоми як менш розчинні компоненти після низькошвидкісного центрифугування. Середовище культивування МСК центрифугували при $2000\times g$ протягом 30 хвилин для позбавлення від самих клітин, до отриманого супернатанту додавали реагент для ізолювання екзосом у співвідношенні 2:1 та обережно перемішували. Зразки інкубували протягом ночі при $2-8^{\circ}\text{C}$ та центрифугували при $10\ 000\times g$ протягом години при охолодженні. Після аспірації

супернатанту осад екзосом ресуспендували у стерильному PBS буфері та зберігали при -20°C . До культивованих PBS додавали 50 мкл суспензії екзосом.

Очищені екзосоми досліджували за допомогою електронного мікроскопа («Selmi» ПЕМ-125К) на збільшенні 4800-9600. Розчин з екзосомами наносили на колодієву плівку-підкладку та фіксували розчином глутарового альдегіду (Sigma-Aldrich), у співвідношенні 1:1. Використовували різні теплові та часові режими фіксації. Після виділення екзосом із плазми проводили їх морфологічну верифікацію за допомогою електронного мікроскопа. Результати морфометрії показали, що вже при режимі експозиції 3 хв $t=60^{\circ}\text{C}$ відбувається денатурація РНК/ДНК в екзосомах. Доказом цього є відсутність хроматинового вмісту у внутрішній частині та тонка оболонка. При підвищенні часу інкубації весь нуклеотидний склад екзосом денатурується, вони порушуються і залишки нуклеїнових кислот хаотично розподіляються в препараті. Додавання фіксатора закріплює глибки білка і вони приймають вигляд «звареного білку». Наводимо вигляд морфологічних змін середовища із екзосомами, яке фіксували за різними температурними та часовими режимами (рис. 2).

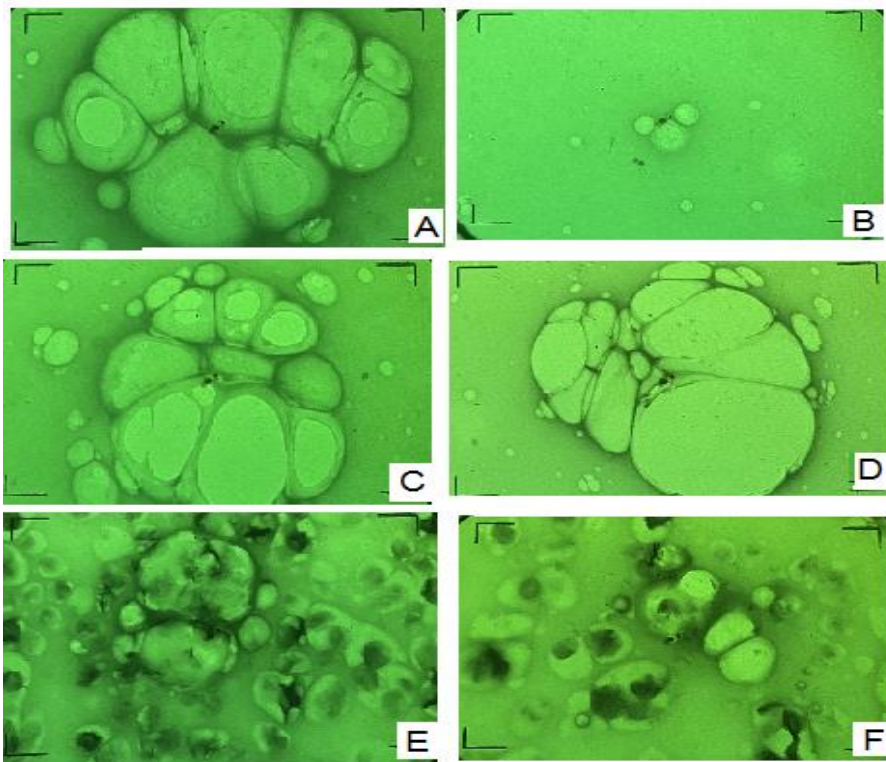


Рисунок 2 - Морфологічні зміни суміші екзосом при підготовці для електронної мікроскопії. Фото з фронтальної камери: А, В, - без фіксації при кімнатній температурі, С - фіксація глутаральдегідом при кімнатній температурі; D - інкубація при $t=60^{\circ}\text{C}$ 3 хв без фіксатора; E - 5 хв, $t=60^{\circ}\text{C}$ без фіксатора; F - 5 хв, $t=60^{\circ}\text{C}$ з фіксацією глутаральдегідом.

Таким чином, для візуалізації екзосом та їх аналізу за допомогою електронного мікроскопу вважаємо доцільним використовувати режим фіксації матеріалу при кімнатній температурі, що дозволяє отримати чітку картину візуалізації екзосом у вигляді мембранних структур - везикул орієнтовно 30-150 нм.

Виготовлення лізатів для визначення цитокінів методом ELISA. Середовище культивування (англ., Medium) відбирали після добової інкубації і зберігали (-20°C), тоді як клітини РВМС (Cell) лізували в RIPA буфері при +4°C. Для стандартизації дослідження, в кожній пробі визначали концентрацію загального протеїну на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS-3000M (Китай) із використанням біохімічного набору «DiagnosticumZrt» (Угорщина). Рівень VEGF-A, ICAM-1, MCP-1 в пробі визначали методом ІФА, використовуючи набори Elabscience (США) за допомогою аналізатора RT-2100C (Китай) та перераховували відповідно до концентрації протеїну у зразках.

Оцінку паракринної секреції ми визначали за рівнем хемоаттрактантного протеїну моноцитів (англ., Monocyte Chemoattractant Protein, MCP-1), фактору росту ендотелію судин (англ., Vascular endothelial growth factor, VEGF-A) та молекул клітинної адгезії (англ., Inter-Cellular Adhesion Molecule, ICAM-1), які визначали у середовищі культивування мононуклеарів.

Статистичний аналіз даних проводився за допомогою пакету IBM SPSS Statistics, версія 23.0 (SPSS Inc., США). Результати всіх експериментів наведені як середнє \pm SEM. Для перевірки нормального розподілу використовувався тест Шапіро-Вілка. Для нормально розподілених даних статистичні відмінності між групами аналізували за допомогою одностороннього ANOVA-тесту з наступним тестом Тьюкі post-hoc. Для непараметричних даних використовували критерій χ^2 та Крускала-Уолліса. Відмінності вважалися значущими при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

В першій серії досліджень ми вивчали секрецію клітин пацієнтів ХСН_1 (n=15) та осіб КГ_1 (n=12) під впливом Екзо_Пл. А в другій серії, яка виконувалася пізніше, ми наводимо дані пацієнтів групи ХСН_2 (n=13), ОАНК (n=12) та осіб КГ_2 (n=12) під впливом Екзо_МСК. Такий дизайн експерименту створив можливість порівняти потенційний вплив екзосом, виділених із різних середовищ, на регуляторні властивості клітин.

Результати, наведені на рис. 3, свідчать про вірогідне зменшення (у 2,1 рази) рівня VEGF-A в клітинах осіб КГ_1 під впливом інкубації із Екзо_Пл. Вони також сприяли зменшенню рівня цього показника у 1,5 рази в клітинах пацієнтів з ХСН_1 після 24-годинної інкубації з Екзо_Пл.

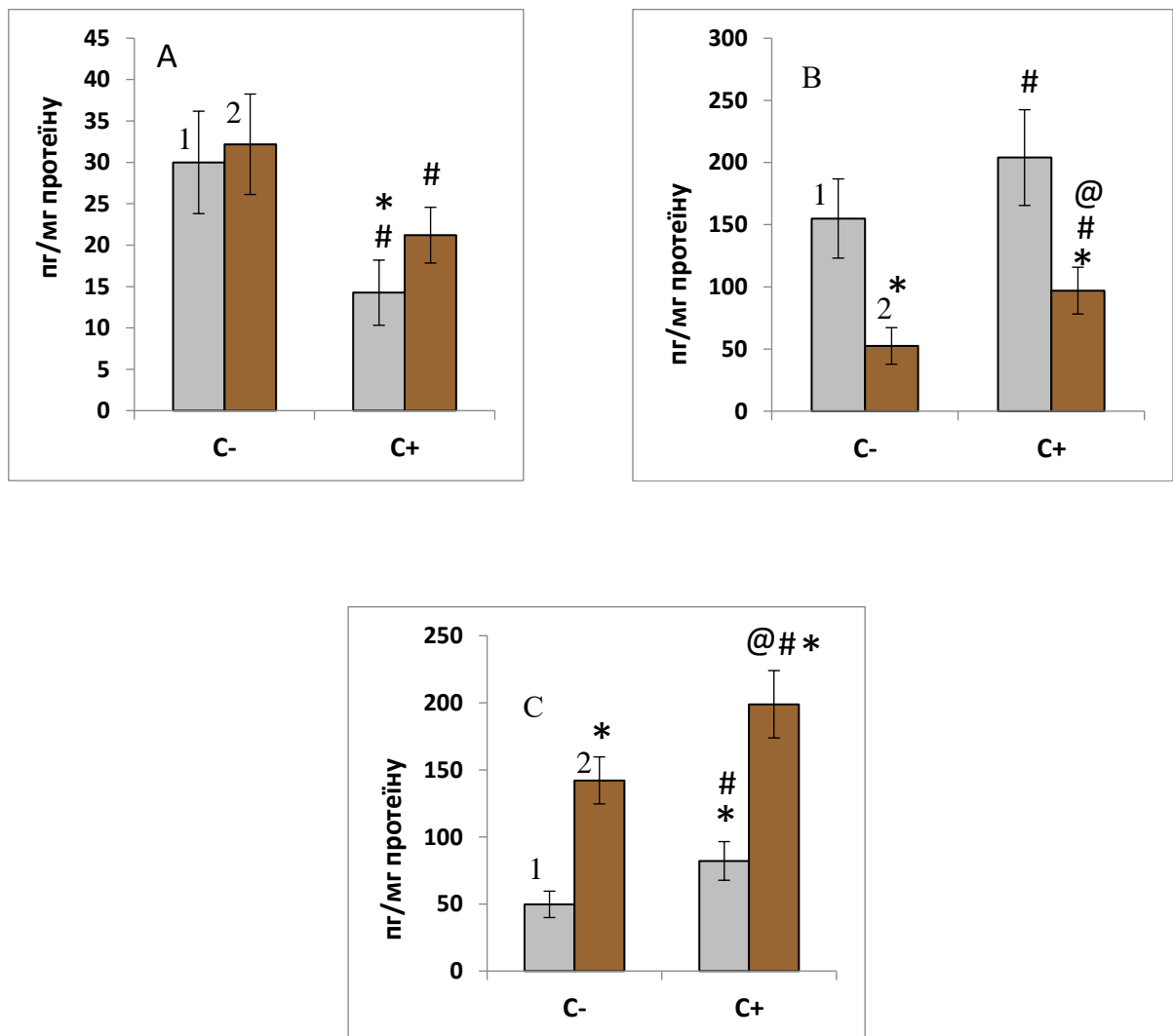


Рисунок 3 - Рівні VEGF-A (A), MCP-1 (B) та ICAM-1 (C) у LPS-стимульованих клітинах крові на базовому рівні (C-) та після інкубації (C+) із екзосомами Екзо_Пл. Дані груп здорових донорів КГ_1 (1) та пацієнтів із ХСН_1 (2), * - $p < 0,05$ проти контролю «Екзо-»; # $p < 0,05$ проти ХСН «Екзо-»; @ $p < 0,05$ проти контролю «Ехо+».

Слід зазначити, що під їх впливом вміст VEGF-A зростав як у середовищі культивування РВМС КГ_1 (у 2,7 рази), так і клітин хворих на ХСН_1 (у 2 рази) відносно значень VEGF-A у середовищах культивування клітин цих груп без внесених екзосом (рис.4).

VEGF-A – ключовий фактор ангіогенезу, що бере участь у основних його етапах: блокує апоптоз ендотеліальних клітин кровоносних судин, індукує протеїнази, які ремодулюють міжклітинну речовину, підсилює проникність судин та вазодилатацію, стимулює міграцію ендотеліальних клітин та формування нових капілярів.

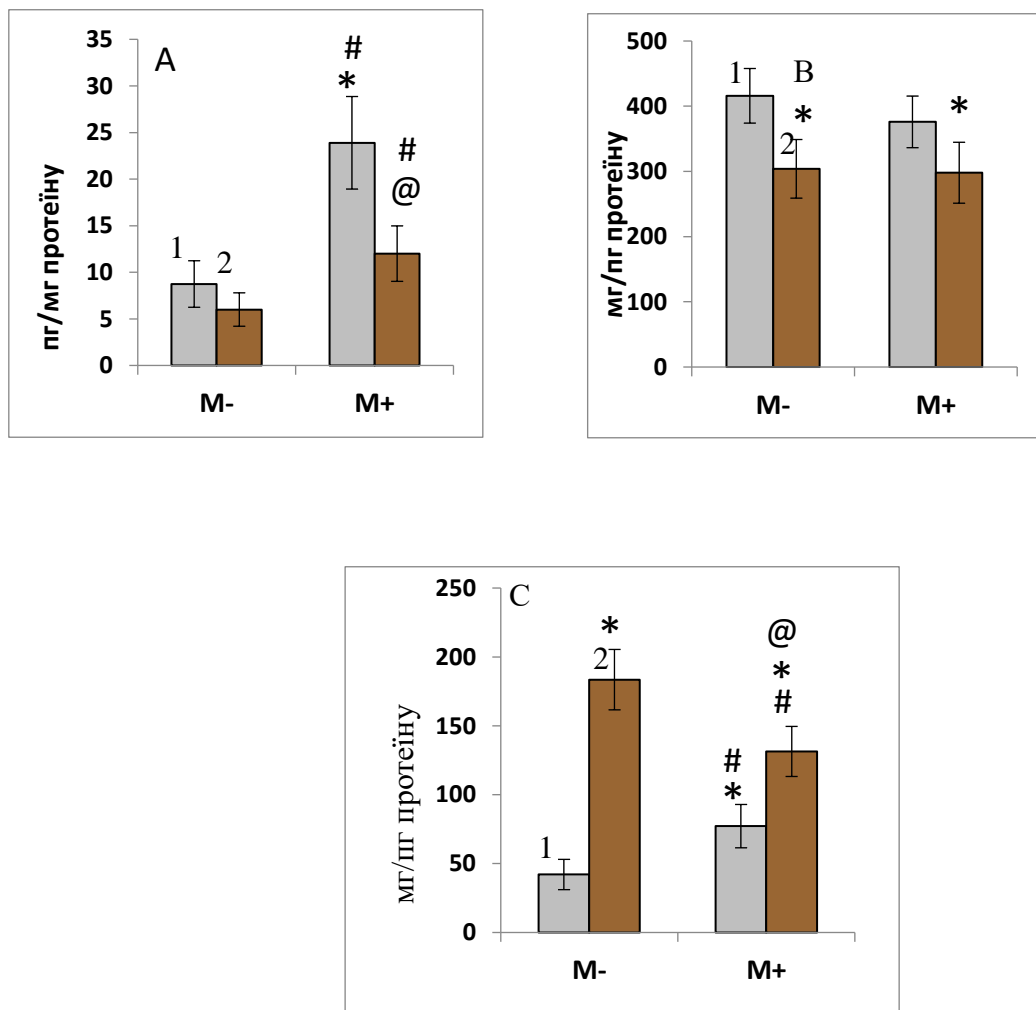


Рисунок 4 - Рівні VEGF-A (A), MCP-1 (B) та ICAM-1 (C) у середовищі культивування LPS-стимульованих РВМС на базовому рівні (M-) та після інкубації у присутності екзосом (M+) із екзосомами Екзо_Пл. Дані груп здорових донорів КГ_1 (1) та пацієнтів із ХСН_1 (2), * - $p < 0,05$ проти контролю «Екзо-»; # $p < 0,05$ проти ХСН «Екзо-»; @ $p < 0,05$ проти контролю «Екзо+».

Ангіогенез відбувається у відповідь на фізіологічні та на патологічні стимули, у той же час ангіогенез має патологічний характер при серцево-судинних

захворюваннях (зокрема, при ХСН), онкологічних захворюваннях, віковій макулярній дегенерації сітківки та інших захворюваннях [1].

Аналіз літературних даних свідчить, що маркери ангиогенезу, а саме всі типи VEGF, активно досліджуються у пацієнтів із ХСН з метою пошуку перспективних показників для удосконалення діагностики та прогнозування ХСН. Робилися неодноразові спроби використання VEGF у генній терапії у хворих на серцево-судинні захворювання, але результати доклінічних та клінічних досліджень суперечливі. Доклінічними дослідженнями продемонстровано, що терапія, спрямована на VEGF-A, при ішемічній та гіпертрофічній кардіоміопатії знижує апоптоз кардіоміоцитів, вплив на VEGF-B за даними авторів має позитивний вплив на діастолічну дисфункцію та товщину міокарда шлуночків [1]. У більшості клінічних досліджень йшлося про VEGF-A. У низці досліджень продемонстровано покращення перфузії міокарда та його функції у хворих на ІХС [12], тоді як в інших повідомляється про відсутність статистично значущого поліпшення перфузії міокарда в порівнянні з плацебо [13].

Відомо, що активовані моноцити/макрофаги можуть продукувати фактори ангиогенезу (VEGF, bFGF та інші фактори), які впливають на ендотелій та клітини гладких м'язів, індукуючи синтез VEGF іншими клітинами в кровоносних судинах [2]. Незважаючи на встановлене нами зниження внутрішньоклітинного рівня VEGF-A, що може бути результатом впливу різних прозапальних факторів, рівень паракринної секреції VEGF-A під впливом екзосом, отриманих із плазми здорових донорів, зростає. Це може свідчити про збільшення ангиогенного потенціалу моноклеарних клітин та можливий їх протекторний вплив для відновлення клітин міокарду. Існує також думка, згідно якої зростання проангиогенних маркерів може бути пов'язане із процесами, спрямованими на відновлення дисфункціонального епітелію, а не сприяти ангиогенезу як такому [14, 15].

Моноцитарний хемоатрактантний протеїн-1 (MCP-1) регулює хемотаксис моноцитів та диференціювання Т-лімфоцитів шляхом зв'язування з хемокіновим рецептором 2 (CCR2), стимулює адгезію моноцитів до ендотеліальних клітин судин та їх міграцію до субендотеліальних ділянок судин, відіграючи вирішальну роль у патогенезі запальних захворювань [16]. Ми досліджували рівень MCP-1 в лізатах та середовищі культивування після стимуляції LPS. Рівень MCP-1 в лізатах клітин КГ_1 перевищував у 3 рази цей показник у зразках РВМС пацієнтів із ХСН_1. Після інкубації з Екзо_Пл було встановлено зростання вмісту MCP-1 в клітинах контрольної групи та пацієнтів (на 31,6 % та 40 % відповідно) відносно їх вихідних значень. У середовищі культивування характер різниці між досліджуваними групами був аналогічним до лізатів клітин: на 36,8 % вищим у середовищі зростання донорських клітин порівняно до групи пацієнтів. Додавання суспензії екзосомів донорів призвело до незначного зниження вмісту MCP-1 у середовищі культивування клітин КГ_1, тоді як у середовищі інкубування РВМС пацієнтів із ХСН_1 він не змінився.

Слід зазначити, що наукові дослідження свідчать про неоднозначну роль MCP-1 у перебігу серцево-судинних захворювань: незважаючи на його ключову роль у хемоатракції моноцитів та макрофагів у вогнище запалення, встановлено, що MCP-1 бере участь у ремоделюванні, неоваскуляризації міокарду після перенесеного інфаркту [17]. Експериментальними дослідженнями показано, що інгібування MCP-1 чи перешкоджання передачі його ефектів послаблює процеси ремоделювання лівого шлуночку, навпаки, MCP-1 має прямий ангіогенний вплив, а ендотеліальні клітини експресують його рецептор. Окрім того, встановлена кардіопротекторна дія MCP-1 при гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro* [18].

Наші дослідження показали збільшення рівня синтезу MCP-1 клітинами як КГ_1, так і пацієнтів із ХСН_1 під впливом екзосом донорів. Однак, незважаючи на його вирішальну роль в регулюванні хемотаксису моноцитів та зростаючий інтерес до можливостей його фармакологічного інгібування, терапевтичні підходи, спрямовані на MCP-1 / CCR2 [19], все ще знаходяться на етапі досліджень, оскільки необхідно з'ясування його участі у розвитку серцево-судинних захворювань.

Результати наших досліджень свідчать, що рівень ICAM-1 у групі пацієнтів із ХСН_1 перевищував показник КГ_1 як за внутрішньоклітинним вмістом (у 2,9 рази), так і за рівнем паракринної секреції – у середовищі культивування мононуклеарів пацієнтів він був вищим за значення контролю у 4,4 рази. Визначення вмісту ICAM-1 після інкубації з екзосомами донорів показало зростання його рівня у лізатах РВМС КГ_1 та пацієнтів із ХСН_1 у 1,7 та 1,4 рази відповідно. Додавання суспензії екзосом донорів призвело до збільшення вмісту ICAM-1 у середовищі інкубування мононуклеарних клітин КГ_1 у 1,8 рази. Водночас ефект екзосом на позаклітинну секрецію цього протейну клітинами пацієнтів із ХСН_1 мав протилежну тенденцію: рівень ICAM-1 у середовищі їх зростання зменшився у 1,4 рази.

ICAM-1 разом з іншими молекулами клітинної адгезії відіграє ключову роль у процесах адгезії нейтрофілів та моноцитів до ендотеліальних клітин, сприяючи розвитку дисфункції ендотелію та прогресуванню ССЗ [20]. Тривають пошуки терапевтичних підходів для впливу на ICAM-1 в якості мішені при захворюваннях серцево-судинної системи [21]. Виявлене нами зниження рівня паракринної секреції ICAM-1 клітинами пацієнтів із ХСН може бути протекторним механізмом «стримання» розвитку запалення на тлі інкубації з екзосомами донорів.

Для порівняння впливу екзосом, виділених із різних середовищ, ми наводимо результати досліджень паракринної секреції VEGF-A, MCP-1 та ICAM-1 у середовищі культивування РВМС пацієнтів з ХСН_2 (n=13), ОАНК (n=12) та осіб КГ_2 (n=12) під впливом Екзо_МСК.

Базова секреція VEGF-A у середовищі культивування РВМС пацієнтів була нижче, ніж у КГ_2, при чому наявність ОАНК характеризується зменшенням VEGF-A на 35% відносно КГ_2 і на 19% від групи ХСН_2 (рис.5).

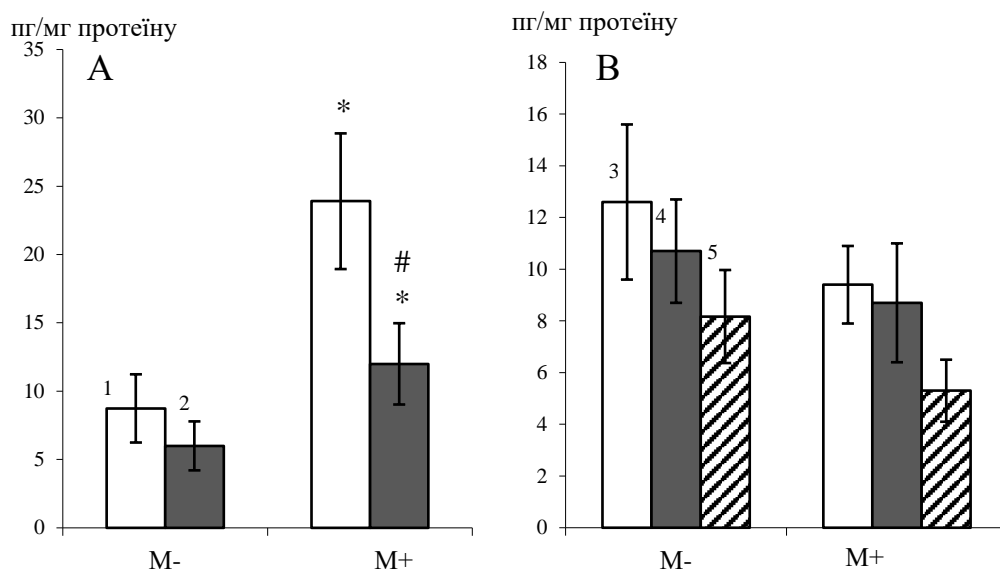


Рисунок 5 - Вміст VEGF-A у середовищі культивування активованих мононуклеарних клітин крові на базовому рівні (M-) та після інкубації (M+) із екзосомами Екзо_Пл (А) та Екзо_МСК (Б). Дані груп здорових донорів КГ_1 (1), пацієнтів із ХСН_1 (2), здорових донорів КГ_2 (3), пацієнтів із ХСН_2 (4), пацієнтів із ОАНК (5), * - відмінність між відповідним показником у кожній групі базового рівня та після впливу екзосом, $p < 0,05$, # - відмінність між показником у групі пацієнтів та контрольній групі, $p < 0,05$

Ми виявили, що інкубація РВМС з екзосомами Екзо_Пл викликала суттєве зростання у середовищі культивування РВМС рівня VEGF-A: в КГ_1 у 2,73 рази ($p \leq 0,05$) та у 2 рази ($p \leq 0,05$) у пацієнтів з ХСН_1. Інкубація клітин з екзосомами Екзо_МСК не призводила до суттєвих змін VEGF-A, але сприяла зниженню вмісту VEGF-A в усіх групах: в КГ_2 на 25,4 %, при ХСН_2 – на 19,7 %, при ОАНК – на 35,2 %. Ці дані демонструють стимуляційний вплив екзосом Екзо_Пл на паракринну секрецію клітинами крові ростового судинного фактору, яка є більш вираженою при аутоstimуляції, але може розглядатися як потенційний шлях терапевтичної дії на стан ендотелію пацієнтів із ХСН.

Екзосомальна стимуляція секреції VEGF-A активованими мононуклеарами може свідчити про збільшення ангіогенного потенціалу РВМС та можливий їх протекторний вплив екзосом на відновлення клітин міокарду. Водночас, в експериментальних дослідженнях показано, що введення VEGF сприяло агресивному розвитку бляшок через прискорення неоваскуляризації судинної стінки [2], що визначає актуальність пошуків механізмів блокування цих процесів.

Інкубація РВМС із Екзо_Пл по-різному впливала на вміст ICAM-1 (рис. 6). В КГ_1 рівень цитокіну підвищувався в 1,8 разів ($p \leq 0,05$), а у пацієнтів із ХСН_2 зменшувався у 1,4 рази ($p \leq 0,05$). Враховуючи, що базова секреція ICAM-1 на тлі ХСН перевищувала показник КГ в 2,4 рази, зменшення паракринної секреції цитокіну під впливом Екзо_Пл можна розглядати як протекторну дію на клітинно-ендотелійні взаємовідносини. Інкубація клітин з екзосомами Екзо_МСК

не призводила до суттєвих змін ICAM-1 секреції в КГ_1, але знижувала вміст ICAM-1 у пацієнтів обох груп на 20%. Таким чином, за умов фізіологічної аутоstimуляції спостерігається підвищення паракринної секреції ICAM-1, підвищення адгезивних властивостей лейкоцитів крові та їх здібності до проникливості у тканину. Вплив екзосом на властивості клітин хворих із судинною патологією виглядає як протекторний протизапальний.

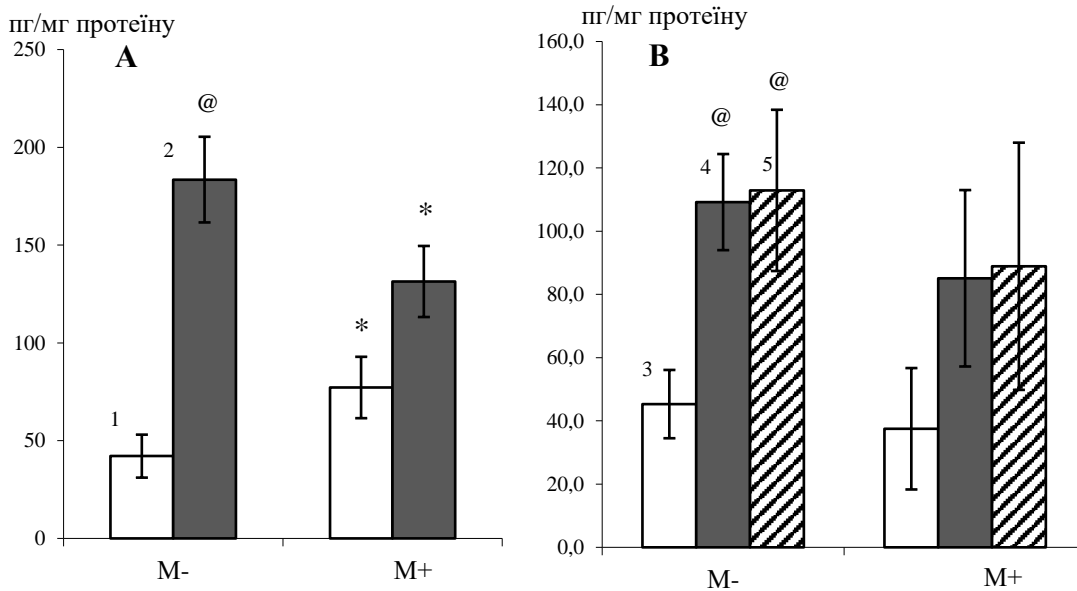


Рисунок 6 - Вміст ICAM-1 у середовищі культивування активованих мононуклеарних клітин крові на базовому рівні (M-) та після інкубації (M+) із екзосомами Екзо_Плазма (А) та Екзо_МСК (Б). Дані груп здорових донорів КГ_1 (1), пацієнтів із ХСН_1 (2), здорових донорів КГ_2 (3), пацієнтів із ХСН_2 (4), пацієнтів із ОАНК (5); * - відмінність між відповідним показником у кожній групі базового рівня та після впливу екзосом, $p < 0,05$; # - відмінність між показником у групах пацієнтів та контрольній групі, $p < 0,05$

ICAM-1 разом з іншими молекулами клітинної адгезії відіграє ключову роль у процесах розвитку дисфункції ендотелію та прогресуванні ССЗ [20], тому є обґрунтованими пошуки терапевтичних підходів для впливу на ICAM-1 в якості мішені при захворюваннях серцево-судинної системи [21]. Виявлене нами базове підвищення секреції цитокіну у хворих на ХСН та ОАНК демонструє значну активацію процесів адгезії моноцитів та ендотеліальних клітин при патології, що має вирішальне значення для поглиблення запалення інтими судин та прогресування атеросклерозу, як важливого фактору, що супроводжує як ангіогенний, так і атерогенний механізми. Макрофаги, утворені з моноцитів, відіграють ключову роль у відкладенні ліпідів і прогресуванні атеросклерозу, оскільки збільшення бляшок призводить до наростання гіпоксії, що підвищує інфільтрацію запальними клітинами. З цього ракурсу також виявлене нами зниження рівня паракринної секреції ICAM-1 клітинами пацієнтів із ХСН та ОАНК може виглядати протекторним механізмом «стримання» розвитку запалення на тлі інкубації з екзосомами.

Інкубація РВМС з Екзо_Пл (рис.7) викликала незначне зменшення вмісту МСР-1 в КГ_1 і практично не змінювала цитокинову секрецію у пацієнтів. Інкубація з Екзо_МСК призводила до зменшення секреції МСР-1 в середовищі культивування усіх груп, що досліджувалися, в середньому на 20%. Вірогідно, зменшення паракринної секреції молекул МСР-1 у позаклітинний простір під впливом екзосом може бути додатковим механізмом пригнічення розвитку запалення.

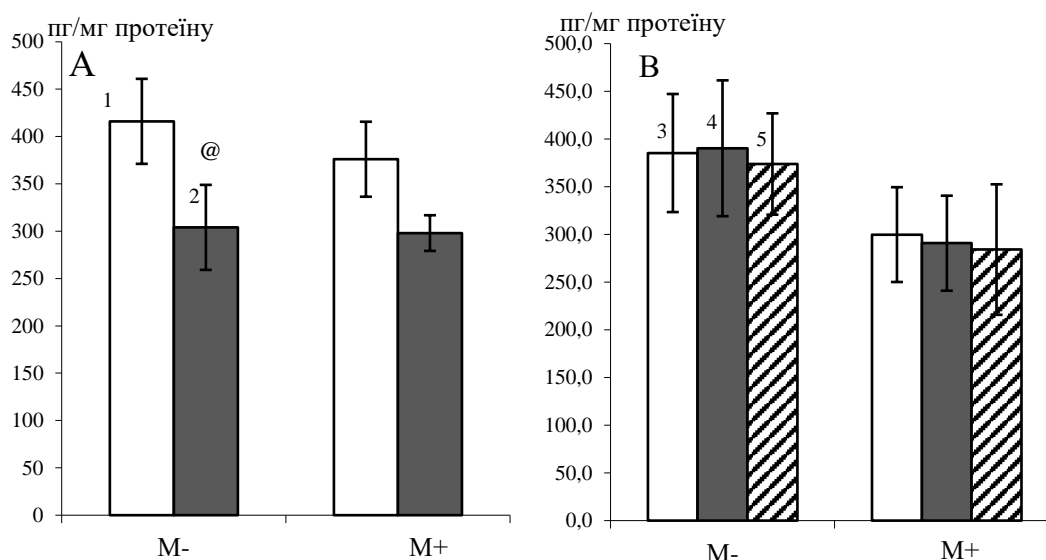


Рисунок 7 - Вміст МСР-1 у середовищі культивування активованих мононуклеарних клітин крові на базовому рівні (М-) та після інкубації (М+) із екзосомами Екзо_Плазма (А) та Екзо_МСК (Б). Дані груп здорових донорів КГ_1 (1), пацієнтів із ХСН_1 (2), здорових донорів КГ_2 (3), пацієнтів із ХСН_2 (4), пацієнтів із ОАНК (5); # - відмінність між показником у групах пацієнтів та контрольній групі, $p < 0,05$

Сучасні дослідження свідчать про невизначену роль МСР-1 у перебігу серцево-судинних захворювань, існує стійкий інтерес до можливостей впливу на нього. В цьому напрямку наші дані, що демонструють певну пригніченість секреції цитокіну під впливом екзосом, можуть бути цікавими.

Наводячи наші експериментальні дані, ми із обережністю ставимося до їх інтерпретації. Виявлений вплив екзосом, що виділені із плазми здорових донорів, на властивості РВМС у вигляді суттєвого модулювання секреції цитокінів запалення та фактору росту судин, можна розцінювати як протекторний, хоча однозначно стверджувати це ще рано через обмежену кількість спостережень, відсутність відтворюваності даних вмісту цитокінів в однакових групах хворих у двох серіях, та невеликий спектр цитокінів, що досліджували, тощо.

Однак, у відмінності від ефекту екзосом із плазми, ми не виявили виражених впливів на РВМС екзосом, що були виділені із середовища МСК. Вважаємо, це можна пояснити консерваційними умовами середовища, у якому перебувають

МСК плаценти. Оскільки це середовище із стійким гомеостазом та мінімальними аферентними сигналами до МСК.

ВИСНОВКИ

1. Наші дослідження продемонстрували на моделі (*in vitro*) суттєву різницю впливу на функціональні властивості клітин периферичної крові людини екзосом, що виділені із різних середовищ.
2. Екзосоми, виділені із плазми здорових донорів справляли більш виражений ефект на цитокінову секрецію клітин крові, і вплив був значно вираженим на клітини КГ, тобто за умов аутоstimуляції.
3. Екзосоми, виділені із середовища культивування МСК, суттєво не впливали на секрецію VEGF-A, ICAM-1, MCP-1 клітин крові, проте за усіма показниками сприяли незначному пригніченню паракринних властивостей клітин крові щодо стимуляції ангиогенезу та запального процесу як у хворих, так і в контролі.
4. Отримані дані додають цінну інформацію щодо дизайну майбутніх досліджень даного напрямку клітинної біології, демонструють природний потенціал екзосом, як структур-транспортів регуляторних молекул, що підкреслює перспективність пошуку і розробки шляхів ефективних фізіологічних та терапевтичних впливів.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Шепель РН, Драпкина ОМ. Ангиогенез у пациентов с хронической сердечной недостаточностью: фокус на эндотелиальный фактор роста сосудов, пентраксин-3 и трансформирующий фактор роста бета. Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. 2020;16(3):439-448.
2. Jaipersad AS, Lip GY, Silverman S. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(1):1–11.
3. Bernardi S, Balbi C. Extracellular Vesicles: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Biology (Basel)*. 2020; 9(9):258.
4. Guillaume van Niel, Gisela D'Angelo, GraçaRaposo. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(4):213-228.
5. Wang AYL. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Strategy for Various Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1769. doi: 10.3390/ijms22041769.
6. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*. 2015;23(5):812-823.
7. Yin K, Wang S, Zhao RC. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomark Res*. 2019;7:8. doi: 10.1186/s40364-019-0159-x.
8. Jafarinia M, Alsahebfosoul F, Salehi H, Eskandari N, Ganjalikhani-Hakemi M. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy. *Immunol Invest*. 2020;49(7):758-780.
9. Varderidou-Minasian S, Lorenowicz MJ. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities. *Theranostics*. 2020;10(13):5979-5997.
10. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. Peripheral blood mononuclear cells: isolation, freezing, thawing, and culture. *Methods Mol Biol*. 2016; 1304:53-61.
11. Shablii V, Kuchma M, Svitina H, et al. High Proliferative Placenta-Derived Multipotent Cells Express Cytokeratin 7 at Low Level. *BioMed Research International*. 2019; doi.org/10.1155/2019/2098749
12. Favalaro L, Diez M, Mendiz O, et al. High-dose plasmid-mediated VEGF gene transfer is safe in patients with severe ischemic heart disease (Genesis-I). A phase I, open-label, two-year follow-up trial. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2013;82(6):899-906.
13. Taimeh Z, Loughran J, Birks E.J, et al. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(9):519-530.
14. Pannella M, Caliceti C, Fortini F, et al. Serum From Advanced Heart Failure Patients Promotes Angiogenic Sprouting and Affects the Notch Pathway in Human Endothelial Cells. *J Cell Physiol*. 2016;231(12):2700-10.
15. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation*. 2005;112(12):1813-24.

16. Elke Bouwens , Victor J van den Berg, K Martijn Akkerhuis, et al. Circulating Biomarkers of Cell Adhesion Predict Clinical Outcome in Patients with Chronic Heart Failure. *J Clin Med*. 2020;9(1):195.
17. Morimoto H, Takahashi M. Role of monocyte chemoattractant protein-1 in myocardial infarction. *Int J Biomed Sci*. 2007;3(3):159-67.
18. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A. Cardiac Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Transgenic Mice Prevents Cardiac Dysfunction and Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 2006;99:891–899.
19. Bianconi V, Sahebkar A, Atkin S, et al. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Current Opinion in Hematology*. 2018; 25(1):44-51.
20. Triet M Bui, Hannah L Wiesolek, Ronen Sumagin. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*. 2020;108(3):787-799.
21. Qiu-Yue Lin, Ping-Ping Lang, Yun-Long Zhang, et al. Pharmacological blockage of ICAM-1 improves angiotensin II-induced cardiac remodeling by inhibiting adhesion of LFA-1 + monocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019; 317(6):1301-1311.