

МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ ПЕРЕДАЮТ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СИГНАЛ ДРУГ ДРУГУ ПОСРЕДСТВОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Эрдынеева Д.Б.^{1,2},

Ставская Н.И.³,

Постнов Ю.А.⁴.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», г. Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», г. Долгопрудный, Россия

³ФГБУН «Институт биологии гена» Российской академии наук (ИБГ РАН), г. Москва, Россия

⁴Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ "Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского", г. Москва, Россия

MONOCYTES AND MACROPHAGES TRANSMIT INFLAMMATORY SIGNALS TO EACH OTHER VIA EXTRACELLULAR VESICLES

Erdynееva D.B.^{a,b},

Stavskaya N.I.^c,

Postnov A.Y.^d

^aInstitute Of General Pathology And Pathophysiology, Moscow, Russia

^bMoscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnij, Russia

^cInstitute of gene biology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

^dPetrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

Резюме. Моноциты и макрофаги играют важную роль в развитии воспалительных заболеваний, в том числе сепсиса и тд. Помимо роли «мусорщиков» макрофаги выделяют различные вещества (в основном, цитокины и хемокины), как оказывающие системное действие, так и модулирующие микроокружение воспалительного очага. Нарушение их нормальной функции может вызывать различные иммунные патологии и изменение гомеостаза тканей. Макрофаги способны передавать сигналы другим клеткам в зоне воспаления, в том числе выделяя различные цитокины и другие соединения прямо во внеклеточное пространство. Однако, время жизни и радиус действия данных веществ могут быть ограничены. Альтернативным способом межклеточной коммуникации служит упаковка веществ во внеклеточные везикулы, которые могут помочь в распространении сигнала. Внеклеточные везикулы — это небольшие частицы с двухслойной липидной мембраной, которые переносят различные биологически активные вещества как внутри, так и на внешней стороне. Существуют различные типы внеклеточных везикул, каждая из которых может оказывать своё специфическое влияние на другие клетки. Благодаря наличию специфических рецепторов на поверхности везикул возможна селективная доставка биологических молекул к определённым клеткам. Везикулы могут содержать различные компоненты, такие как нуклеиновые кислоты, белки, липиды и даже отдельные органоиды клетки. Поэтому неудивительно, что везикулы способны модулировать физиологические процессы в организме и быть вовлечены в патогенез различных заболеваний. Установление механизмов участия везикул в развитии воспалительных заболеваний, в том числе хронических, крайне актуально. Целью настоящего исследования было установить способны ли внеклеточные везикулы модулировать иммунный ответ. Для этого мы оценили секрецию цитокинов макрофагами, обработанными везикулами от стимулированных LPS моноцитов и макрофагов. Обнаружено, что клетки, которые получили везикулы от активированных LPS моноцитов и макрофагов, секретируют больше

провоспалительных сигнальных молекул: цитокина IL-6 и хемокина IL-8. Полученные результаты демонстрируют, что межклеточное взаимодействие и передача воспалительного сигнала клеток моноцитарного ряда осуществляется также посредством внеклеточных везикул. В дальнейшем необходимы дополнительные исследования для понимания полной картины, какие вещества в составе внеклеточных везикул моноцитов и макрофагов позволяют им оказывать иммуномодулирующий эффект не только друг на друга, но и на клетки других типов.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, внеклеточные везикулы, воспаление, провоспалительные цитокины, LPS.

Abstract. Monocytes and macrophages play an important role in the development of inflammatory diseases, including sepsis, etc. In addition to their role as “scavengers,” macrophages secrete various substances (mainly cytokines and chemokines), which have a systemic effect and modulate the microenvironment of the inflammatory focus. Disruption of their normal function can cause various immune pathologies and changes in tissue homeostasis. Macrophages are able to transmit signals to other cells in the area of inflammation, including various cytokines and other compounds. Usually, they are secreted directly into the extracellular space. However, the lifetime and range of action of these substances may be limited. An alternative method of intercellular communication is the packaging of substances into extracellular vesicles, which can help in signal propagation. Extracellular vesicles are small particles with a bilayer lipid membrane that transport various biologically active substances. There are different types of extracellular vesicles, each of which can have its own specific effect on other cells. Due to the presence of specific receptors on the surface of the vesicles, they can make selective delivery of biological molecules to certain cells. Vesicles can contain various components, such as nucleic acids, proteins, lipids, and even individual cell organelles. Therefore, it is not surprising that vesicles are able to modulate physiological processes in the body and be involved in the pathogenesis of various

diseases. Establishing the mechanisms of vesicle participation in the development of inflammatory diseases, including chronic ones, is extremely important. The aim of the present study was to determine whether extracellular vesicles are capable of modulating the immune response. To do this, we assessed cytokine secretion by macrophages treated with vesicles from LPS-stimulated monocytes and macrophages. It was found that cells that received vesicles from LPS-activated monocytes and macrophages secrete more pro-inflammatory signaling molecules: the cytokine IL-6 and the chemokine IL-8. The results demonstrate that intercellular interaction and transmission of the inflammatory signal of monocytic cells also occurs through extracellular vesicles. In the future, additional research is needed to understand the full picture of what substances in the extracellular vesicles of monocytes and macrophages allow them to have an immunomodulatory effect not only on each other, but also on other types of cells.

Key words: monocytes, macrophages, extracellular vesicles, inflammation, proinflammatory cytokines, LPS.

Введение.

Моноциты и макрофаги – клетки врождённого иммунитета, выполняющие множество функций, среди которых не только модулирование иммунного ответа организма, но также и регулирование микроокружения тканей [7]. Крайне актуально подробное раскрытие механизмов участия макрофагов в различных патологических процессах, в том числе развития воспалительных заболеваний.

Внеклеточные везикулы важны в физиологических процессах, а также при различных патологиях, таких как онкологические, нейродегенеративные, и острые и хронические воспалительные заболевания [7]. Известно, что в состав везикул входят различные белки, которые могут находиться как внутри, так и быть закреплены на мембране. Также везикулы содержат нуклеиновые кислоты (мРНК, микроРНК, мтДНК и тд) и даже клеточные органеллы, такие как митохондрии [4].

В зависимости от происхождения и своих размеров внеклеточные везикулы классифицируются на экзосомы (30–200 нм), микровезикулы (200–1000 нм) и апоптотические тельца (1–5 мкм). В последнее время также выделяют и другие субпопуляции экзосомы (<50 нм) и большие онкосомы (1–10 мкм). Экзосомы образуются при высвобождении содержимого мультивезикулярных телец во внешнюю среду при слиянии с плазматической мембраной. В отличие от экзосом микровезикулы образуются непосредственно отделением от мембраны клетки [8].

Ранее считалось, что главной функцией везикул было участие в утилизации клеточных отходов, однако в дальнейшем стало очевидно, что они играют намного более важную роль в организме, в первую очередь участвуя в межклеточной коммуникации. Высвобожденные везикулы взаимодействуют с другими клетками и способны регулировать экспрессию генов и модулировать работу сигнальных путей. Притом это взаимодействие может происходить как с близлежащими клетками, так и на удалённом расстоянии. Рецепторы на поверхности везикул позволяют проводить селективную передачу сигнала

только определённым клеткам. Находясь под защитой липидной мембраны, переносимые везикулой вещества могут продлить своё время жизни, избежав встречи с ферментами деградации и т.д. Также транспортировка внутри везикулы позволяет им быть доставленными к клетке-реципиенту в необходимой концентрации без разбавления [1].

Целью настоящего исследования было установить способны ли внеклеточные везикулы модулировать иммунный ответ. Для этого мы оценили секрецию цитокинов макрофагами, обработанными везикулами от стимулированных LPS моноцитов и макрофагов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Мононуклеарные клетки были получены из венозной крови здорового донора методом центрифугирования в градиенте плотности ($\rho = 1,077$ г/см³, раствор Фиколла, ПанЭко, Россия). Для выделения CD14⁺ моноцитов из полученных мононуклеаров использовался метод иммуномагнитной сепарации на колонках (Miltenyibiotec, Германия). Полученные клетки были разделены на три части, две из которых были предназначены для выделения везикул из кондиционированной среды, которые в последующем были добавлены к ТНР-1 и макрофагам из 3-й группы клеток.

Первую группу моноцитов высевали в 2 культуральных матраса 25 см² (по 1×10^6 клеток/мл в объёме 5,5 мл) в среде IMDM с глутамином с добавлением пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия), клетки одного из которых сразу в день выделения стимулировали LPS (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в течение 1 часа. Затем клетки в обоих матрасах промывали PBS-буфером (ПанЭко, Россия), культивировали сутки в среде IMDM и собирали кондиционированную среду для последующего выделения везикул. Для дифференцировки в макрофаги вторую группу моноцитов также разделили на 2 матраса (1×10^6 клеток/мл в объёме 5,5 мл) и культивировали 5 суток в среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и GM-CSF (50 нг/мл, SCI-STORE, Россия). Затем так же, как

и с первой группой, макрофаги одного из матрасов стимулировали LPS в течение 1 часа в среде IMDM без сыворотки. Оба матраса промывали PBS-буфером, культивировали сутки в среде IMDM и собирали кондиционированную среду для выделения везикул. 3-ю группу моноцитов крови высевали в 96-луночный планшет ($1 \cdot 10^5$ клеток в объеме 100 мкл) и культивировали 6 суток для дифференцировки в макрофаги в упомянутой выше среде RPMI-1640 с глутамином, антибиотиками, сывороткой и GM-CSF (50 нг/мл) со сменой среды на 4-е сутки после выделения. Затем промывали лунки 200 мкл PBS-буфера и сменяли среду на безсывороточную RPMI-1640 с глутамином и антибиотиками для последующей обработки выделенными везикулами.

Внеклеточные везикулы были выделены с помощью набора ExoQuick-TC (SBI, США) согласно инструкции производителя. Осадок везикул ресуспендировали в 150 мкл PBS. Смесь везикул или PBS (по 50 мкл) добавлялась к моноцитам линии THP-1, а также к макрофагам 3-й группы от того же донора. После обработки везикулами клетки культивировались в течение суток, а затем кондиционированная среда была использована для оценки концентрации цитокинов.

Содержание цитокинов (TNF-а, CCL-2, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10) в среде оценивалось с помощью наборов для ИФА-анализа DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, США) и микропланшетного ридера Tecan Infinite F500.

Статистический анализ проводился с помощью программ JASP 0.18.3 и GraphPad Prism 10.2.2. Сравнение групп проводилось с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что везикулы от стимулированных моноцитов и макрофагов повышали секрецию провоспалительных цитокина IL-6 и хемокина IL-8 у макрофагов-реципиентов по сравнению с везикулами от

нестимулированных моноцитов и макрофагов и PBS ($p < 0,001$) (рисунок 1).
Различий в секреции TNF- α , CCL-2, IL-1 β , IL-10 выявлено не было.

Рисунок 1. Секреция цитокинов макрофагами в ответ на везикулы от активированных моноцитов и макрофагов.

Полученные результаты показывают, что коммуникация между моноцитами и макрофагами не ограничена только прямой секрецией растворимых молекул в межклеточное пространство. В этом процессе также участвуют вещества, передаваемые посредством внеклеточных везикул. Цитокины могут находиться как внутри, так и в составе мембраны везикулы. Благодаря упаковке в везикулы, выделяемые лейкоцитами цитокины могут транспортироваться к удалённым клеткам без разбавления. Липидная мембрана помогает защитить переносимый внутри груз от действия ингибиторов, ферментов деградации, фагоцитоза и т.д. А молекулы, встроенные в мембрану везикулы, в т.ч. цитокины, способны доставить транспортируемые вещества конкретно к клетке со специфическим рецептором на своей поверхности [3].

Полученные в данном исследовании результаты соотносятся с результатами других исследований. Так, в исследовании Tang et al. (2016) показано, что экзосомы стимулированных LPS моноцитов индуцируют экспрессию генов *CCL2*, *IL6*, и *ICAM1* через активацию транскрипционного фактора NF- κ B в клетках HUVEC [6]. De Silva et al. (2018) показали, что экзосомы, полученные от активированных LPS макрофагов и добавленные к культуре адипоцитов, изменяли экспрессию нескольких генов, среди которых был ген хемокина *CXCL5*, участвующий в иммунном ответе. Также экзосомы отличались своим профилем микроРНК [5]. В другом исследовании оценивалось влияние экзосом стимулированных LPS моноцитов на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в контексте костной регенерации. Был показан остеогенный эффект таких экзосом, что проявлялось в усилении экспрессии МСК генов остеогенных маркеров, ассоциированных с белками

RUNX2 и BMP-2 [2]. Однако, исследований, где оценивалось влияние стимулированных моноцитов/макрофагов на нестимулированные макрофаги, не найдено.

Таким образом, внеклеточные везикулы, действительно, участвуют в развитии и распространении иммунного ответа моноцитов и макрофагов. Дополнительные исследования позволят подробнее раскрыть механизмы межклеточной коммуникации моноцитов и макрофагов, вовлечённых в патогенез многих заболеваний, и получить подсказки для развития новых терапевтических подходов.

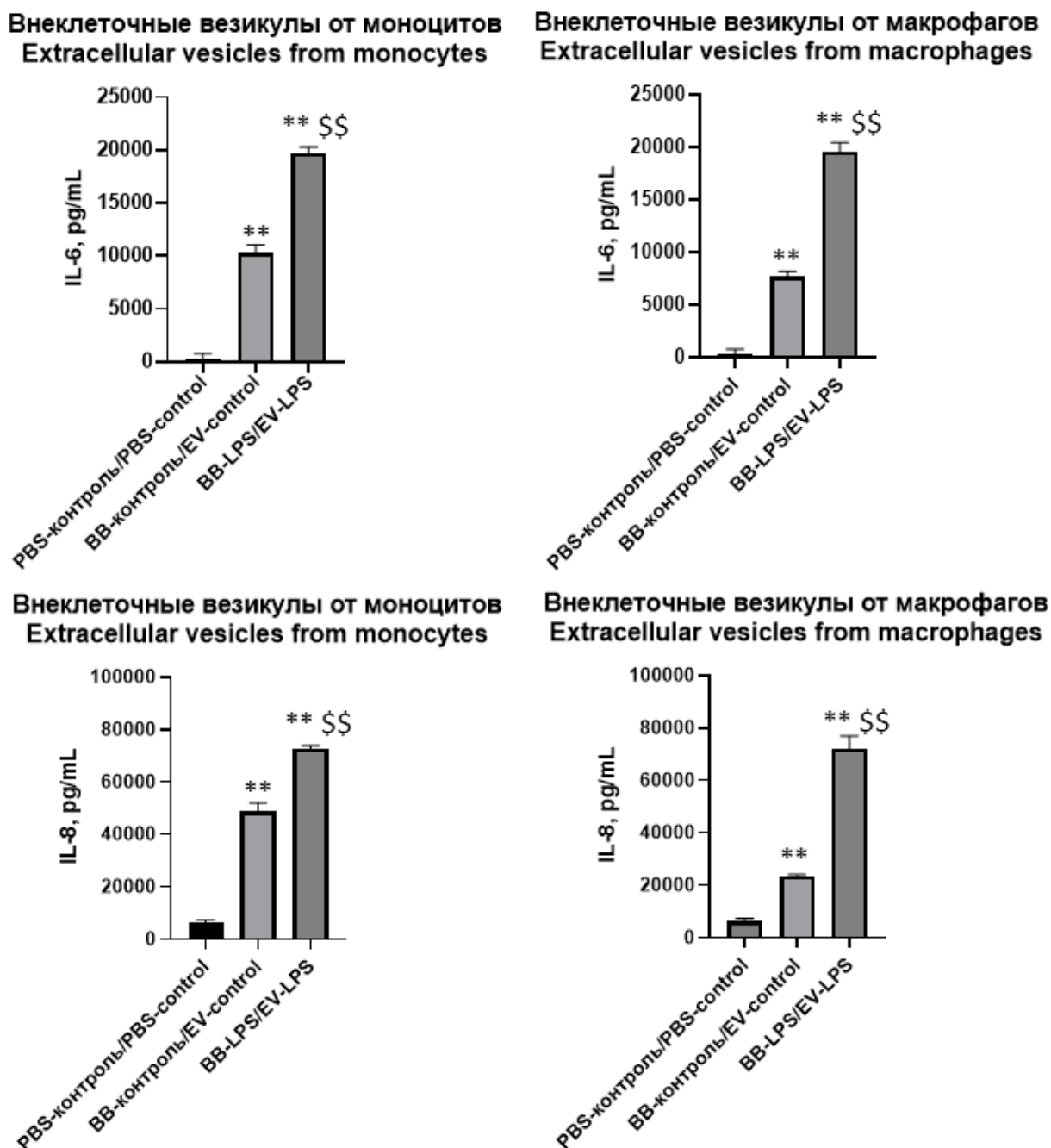
БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, за возможность использования научного оборудования. Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-15-00337.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Секретия цитокинов макрофагами в ответ на везикулы от активированных моноцитов и макрофагов.

Figure 1. Secretion of cytokines by macrophages in response to vesicles from activated monocytes and macrophages.



Примечание. n=3. Результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения. ** - различия $p < 0,01$ по сравнению с контролем PBS, \$\$ - различия $p < 0,01$ по сравнению с везикулами от нестимулированных LPS моноцитами/макрофагами. PBS-контроль – клетки, к которым добавили PBS в качестве контроля, BB-контроль – клетки, обработанные везикулами от

нестимулированных моноцитов/макрофагов, ВВ-LPS – клетки, обработанные стимулированными LPS моноцитами/макрофагами.

Note. n=3. Results are presented as mean and standard deviation. ** - differences $p < 0.01$ compared to PBS control, \$\$ - differences $p < 0.01$ compared to vesicles from non-stimulated monocytes/macrophages. PBS-control – cells to which PBS was added as a control, EV-control – cells treated with vesicles from non-stimulated monocytes/macrophages, EV-LPS – cells treated with lipopolysaccharide-stimulated monocytes /macrophages.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Эрдынеева Даяна Батоевна^{1,2}, сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (НИИОПП); аспирант МФТИ

125315, Россия, Москва, ул Балтийская, д.8

Тел.: +7 (983) 430-70-24

E-mail: daya-na@mail.ru

Address for correspondence:

Daiana B. Erdynееva^{a,b}, researcher of Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; PhD student of Moscow Institute of Physics and Technology

125315, Russia, Moscow, Baltijskaya street 8

Phone: +7 (983) 430-70-24

E-mail: daya-na@mail.ru

Блок 2. Информация об авторах

Ставская Нина Ивановна³, сотрудник лаборатории молекулярной онкобиологии ИБГ РАН;

Nina I. Stavskaya^c, researcher of Laboratory of Molecular Oncobiology, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences;

Постнов Антон Ювенальевич⁴, д.м.н., заведующий лабораторией клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ "РНИЦХ им. акад. Б.В. Петровского".

Anton Y. Postnov^d, MD, PhD, the Head of Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of Cardiovascular System, Petrovsky National Research Centre of Surgery

Блок 3. Метаданные статьи

**МОНОЦИТЫ И МАКРОФАГИ ПЕРЕДАЮТ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ
СИГНАЛ ДРУГ ДРУГУ ПОСРЕДСТВОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ
MONOCYTES AND MACROPHAGES TRANSMIT INFLAMMATORY
SIGNALS TO EACH OTHER VIA EXTRACELLULAR VESICLES**

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Везикулы активированных макрофагов
Vesicles of activated macrophages

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, внеклеточные везикулы, воспаление, провоспалительные цитокины, LPS.

Key words: monocytes, macrophages, extracellular vesicles, inflammation, proinflammatory cytokines, LPS.

Раздел Объединенный иммунологический форум 2024

Количество страниц текста – 5

Количество таблиц – 0

Количество рисунков – 1

Дата поступления: 31.03.2023

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	DOI.
1	Di Bella, M.A., 2022. Biology (Basel) 11, 804.	-	10.3390/BIOLOGY11060804
2	Ekström, K., Omar, O., Granéli, C., Wang, X., Vazirisani, F., Thomsen, P., 2013. PLoS One 8.	-	10.1371/JOURNAL.PONE.0075227
3	Poveda, E., Fitzgerald, W., Reglero, C., Pérez-González, A., Mariño, A., Álvarez, H., Valcarce, N., Llibre, J.M., Guillén, S.M., Muñoz Fernández, M.A., Ruiz-Mateos, E., Margolis, L., Lederman, M.M., Freeman, M.L., 2023. J Infect Dis 227, 1381.	-	10.1093/INFDIS/JIAD042

4	Puhm, F., Afonyushkin, T., Resch, U., Obermayer, G., Rohde, M., Penz, T., Schuster, M., Wagner, G., Rendeiro, A.F., Melki, I., Kaun, C., Wojta, J., Bock, C., Jilma, B., Mackman, N., Boilard, E., Binder, C.J., 2019. Circ Res 125, 43–52.	-	10.1161/CIRCRESAHA.118.314601
5	De Silva, N., Samblas, M., Martínez, J.A., Milagro, F.I., 2018. J Physiol Biochem 74, 559–568.	-	10.1007/S13105-018-0622-4/TABLES/3
6	Tang, N., Sun, B., Gupta, A., Rempel, H., Pulliam, L., 2016. The FASEB Journal 30, 3097.	-	10.1096/FJ.201600368RR
7	Wang, Y., Zhao, M., Liu, S., Guo, J., Lu, Y., Cheng, J., Liu, J., 2020. Cell Death & Disease 2020 11:10 11, 1–18.	-	10.1038/s41419-020-03127-z
8	Willms, E., Cabañas, C., Mäger, I., Wood, M.J.A., Vader, P., 2018. Front Immunol 9, 355368.	-	10.3389/FIMMU.2018.00738/BIBTEX