

Особливості впливу екзосом, виділених із плазми донорів та з кондиційного середовища мезенхімальних стромальних клітин плаценти, на паракринну секрецію мононуклеарних клітин периферичної крові людини

Л. В. Натрус^{1,A,E,D}, Ю. Г. Клись^{1,C,D}, Д. О. Лабудзинський^{2,C,D},
П. А. Черновол^{1,B}, Р. Н. Хайрнасов^{3,B}, П. Ф. Музиченко^{1,F}, І. М. Рижко^{1,B}

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Інститут біохімії імені О. В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ, ³Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Позаклітинні дрібно розмірні везикули – екзосоми – привертають увагу дослідників як перспективний інструмент регулювання міжклітинної комунікації. Терапевтичні ефекти, досягнуті за допомогою використання мезенхімальних стовбурових клітин (MSC), традиційно в медицині визначають як перевірену часом, багатовекторну стратегію лікування різних патологій. Так, окрім застосування безпосередньо MSC, актуальним є дослідження продуктів їх секреції.

Мета роботи – вивчити особливості впливу екзосом, виділених із плазми крові здорових донорів і з кондиційного середовища культивування MSC плаценти, на паракринну секрецію мононуклеарних клітин крові пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю (XCH) *in vitro*.

Матеріали та методи. Дослідження особливостей паракринної секреції мононуклеарних клітин крові пацієнтів із XCH за вмістом протеїнів VEGF-A, MCP-1, ICAM-1 у середовищі їх культивування здійснили у двох напрямках експерименту: під дією екзосом, виділених із плазми крові здорових донорів, та екзосом, що виділені з середовища культивування MSC плаценти.

Результати. Інкубація мононуклеарних клітин периферичної крові (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) із плазматичними екзосомами сприяла підвищенню секреції VEGF-A у групі здорових донорів у 2,73 раза ($p \leq 0,05$), у пацієнтів із XCH – удвічі ($p \leq 0,05$), а також мала різноспрямований ефект на вміст протеїну ICAM-1: в групі донорів він підвищувався в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), а в групі пацієнтів із XCH зменшувався в 1,4 раза ($p \leq 0,05$); секреція MCP-1 у групі донорів незначущо знизилася на 10 % та вірогідно не змінювалася у пацієнтів. Інкубація PBMC з екзосомами, що виділені з кондиційного середовища MSC, не викликала достовірних змін паракринної секреції PBMC: у групі здорових добровольців спостерігали зменшення секреції VEGF-A на 25 %, ICAM-1 – на 17 %, MCP-1 – на 22 %; у групі пацієнтів із XCH секреція цих протеїнів зменшувалася на 19,7 %, 22,0 % та 25,0 % відповідно. Ефекти, що спостерігали при інкубації мононуклеарних клітин крові з екзосомами, виділеними з плазми крові здорових донорів і з кондиційного середовища культивування MSC плаценти, дають цінну інформацію щодо дизайну майбутніх досліджень у цьому напрямі клітинної біології.

Висновки. Дослідження на моделі *in vitro* показали особливості впливу екзосом, що виділені з плазми донорів і кондиційного середовища, на функціональні властивості мононуклеарних клітин периферичної крові людини.

Ключові слова:
екзосоми, хронічна серцева недостатність, мезенхімальні стромальні клітини плаценти, VEGF-A, MCP-1, ICAM-1.

Запорізький медичний журнал.
2022. Т. 24, № 4(133).
С. 431-439

*E-mail:
yulya.klyts@ukr.net

Characteristics of the effect of exosomes isolated from donor plasma and placenta-derived mesenchymal stromal cell-conditioned medium on the paracrine secretion of human peripheral blood mononuclear cells

L. V. Natrus, Yu. H. Klyts, D. O. Labudzynskiy, P. A. Chernovol, R. N. Khairnasov, P. F. Muzychenko, I. M. Ryzhko

Extracellular small vesicles – exosomes, attract the attention of researchers as a promising tool for regulating intercellular communication. At the same time, the therapeutic effects achieved through the use of mesenchymal stem cells (MSCs) are traditionally considered by medicine as a time-tested, multi-vector strategy for the treatment of various pathologies. In particular, in addition to the application of MSCs directly, it is important to study the products of their secretion.

Aim. To study characteristics of the influence of exosomes isolated from blood plasma of healthy donors and conditioned medium of placental mesenchymal stromal cell (MSC) culture on paracrine secretion of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with chronic heart failure (CHF) *in vitro*.

Materials and methods. The characteristics of paracrine secretion of PBMCs in patients with CHF by the content of proteins VEGF-A, MCP-1, ICAM-1 in their culture medium were studied in two directions: under the influence of exosomes isolated from plasma of healthy donors and exosomes isolated from placental MSC culture medium.

Results. Incubation of PBMCs with plasma exosomes increased VEGF-A secretion in the group of healthy donors by 2.73 times ($P \leq 0.05$), in patients with CHF – by 2 times ($P \leq 0.05$); but there were a multidirectional effect on the content of ICAM-1 protein: it was 1.8 times ($P \leq 0.05$) increased in the group of donors and 1.4 times ($P \leq 0.05$) decreased in the group of CHF patients; MCP-1 secretion was insignificantly 10 % reduced in the donor group and did not change significantly in patients. Incubation of PBMC with exosomes isolated from MSC conditioned medium did not cause significant changes in paracrine secretion of PBMCs: there

Key words:
exosomes, chronic heart failure, placental mesenchymal stromal cells, VEGF-A, MCP-1, ICAM-1.

Zaporozhye medical journal
2022; 24 (4), 431-439

was a decrease in secretion of VEGF-A by 25 %, ICAM-1 by 17 %, MCP-1 by 22 % in the group of healthy volunteers; secretion of these proteins was 19.7 %, 22.0 % and 25.0 % decreased, respectively, in the group of CHF patients. The effects observed in the incubation of PBMCs with exosomes isolated from blood plasma of healthy donors and conditioned medium of placental MSC culture have provided valuable information for the design of future studies in this area of cell biology.

Conclusions. Our studies have demonstrated *in vitro* the effects of exosomes isolated from donor plasma and conditioned medium on the functional properties of human PBMCs.

Хронічна серцева недостатність (ХСН) – глобальна медична проблема, оскільки в останні кілька десятиліть у всьому світі постійно зростає поширеність і захворюваність на цю патологію. ХСН вважають основною причиною смерті в пацієнтів зі встановленими серцево-судинними та метаболічними захворюваннями. Ефективне лікування, профілактика поглиблення ХСН залишаються не вирішеною проблемою, оскільки сучасне уявлення про розвиток стану виходить за межі механічної дисфункції системи кровообігу та включає взаємодію багатьох патофізіологічних механізмів (запалення, ендотеліальна дисфункція, ремоделювання тканин, нейрогормональна та ендокринна передача сигналів), а також зв'язок із сечовидільною та нервовою системами [1]. Небезпечність цих станів зумовлює актуальність пошуку нових стратегічних підходів до лікування.

Позаклітинні везикули – екзосоми – привертають увагу дослідників як потужні засоби міжклітинної комунікації. Екзосоми – пухирці розміром 40–160 нм, що походять з ендосомних компартментів, складаються з двошарової ліпідної мембрани, містять різноманітні молекулярні компоненти, включаючи ДНК, РНК, ліпіди та білки, а також мають здатність транспортувати свій вміст, впливаючи на різні фізіологічні та патологічні функції клітини-реципієнта [2,3].

Останнім часом терапію на основі мезенхімальних стовбурових клітин (mesenchymal stromal cells, MSC) вважають перспективною стратегією при різних захворюваннях. Аналіз наукових досліджень свідчить про сприятливий терапевтичний вплив, зумовлений проліферативними, антиапоптичними та протизапальними ефектами MSC при хронічних запальних процесах. Дедалі більше досліджень підтверджують, що терапевтичні переваги MSC здебільшого опосередковуються паракринними функціями, секрецією факторів росту, хемокинів і цитокінів, а не їхніми диференційними властивостями. Тому дослідники все більше цікавляться терапевтичною цінністю біоактивних молекул, отриманих із MSC, особливо позаклітинних везикул, які вважають ключовими компонентами паракринного ефекту під час лікувального впливу на основі MSC [4–6]. Опубліковано відомості, що екзосоми, отримані з MSC, характеризуються позитивним терапевтичним ефектом при відновленні пошкоджених тканин на моделях захворювань печінки та нирок, серцево-судинних і неврологічних захворювань [7,8]. Терапія на основі екзосом із MSC здається більш перспективною, оскільки вона з меншою імовірністю спричиняє реакції імунного відторгнення, безпечна для реципієнта, не порушує етичні аспекти, а отже їй властиві важливі прикладні переваги [9,10].

Мета роботи

Вивчити особливості впливу екзосом, виділених із плазми крові здорових донорів і з кондиційного середовища

культивування MSC плаценти, на паракринну секрецію мононуклеарних клітин крові пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю *in vitro*.

Матеріали і методи дослідження

У дослідження *in vitro* залучили чоловіків, хворих на ХСН (ХСН, n = 28), віком 62 роки [56–76] (44–81) (Me [Q1+QIII] (Min-Max)). Пацієнти надходили на лікування у відділення терапевтичного профілю Університетської клініки Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, в останні 5 років перенесли інфаркт міокарда. Ступінь ХСН визначали згідно з критеріями: фракція викиду лівого шлуночка – 40–49 % за даними ехокардіографії, натрійуретичний пептид ргоВ-типу – понад 400 пг/л, рівень феритину – менше ніж 100 мкг/л у сироватці. Критерії виключення з дослідження: наявність захворювань печінки, що прогресують; респіраторні захворювання; діагностовані ниркова недостатність, злоякісні захворювання, септицемія; стероїдна терапія, що триває; наявність інших запальних патологій. Кров для дослідження брали під час надходження в стаціонар до початку лікування.

Контрольна група (КГ, n = 24) – добровольці чоловічої статі (віком 35 років [24,5–43,5] (21–49) (Me; [Q1+QIII] (Min-Max)), які звернулися до Університетської клініки Національного медичного університету імені О. О. Богомольця для профогляду. За результатами огляду, опитування, біохімічного та гематологічного дослідження крові вони визначені як відносно здорові особи.

У дослідження залучали лише чоловіків, оскільки в попередній роботі встановлена розбіжність паракринної секреції цитокінів мононуклеарними клітинами периферичної крові під впливом екзосом залежно від статі [11]. Усі учасники надали письмову інформовану згоду на використання біоматеріалу для дослідження (протокол № 128 від 23.12.2019 р. Комісії з біоетики НМУ імені О. О. Богомольця).

Мононуклеарні клітини периферичної крові (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) виділяли з венозної крові пацієнтів та осіб КГ, досліджували їхні властивості культуральним методом. Екзосоми виділяли з плазми донорів (ЕкзоПл) і з кондиційного середовища MSC плаценти (ЕкзоMSC), що надане ТОВ «Інститут клітинної терапії» згідно з договором про наукове співробітництво № 2 від 02.04.2021 р. Після активації клітин шляхом 24-годинної культивування PBMC із ліпополісахаридами (#L2630, Sigma-Aldrich, США) додавали суспензію екзосом для інкубації протягом доби.

Дослідження паракринної секреції клітин здійснили методом ІФА шляхом визначення біологічних речовин у середовищі культивування PBMC усіх груп на тлі інкубації з екзосомами та без впливу екзосом. Оцінювання паракринної секреції здійснили за рівнями фактора

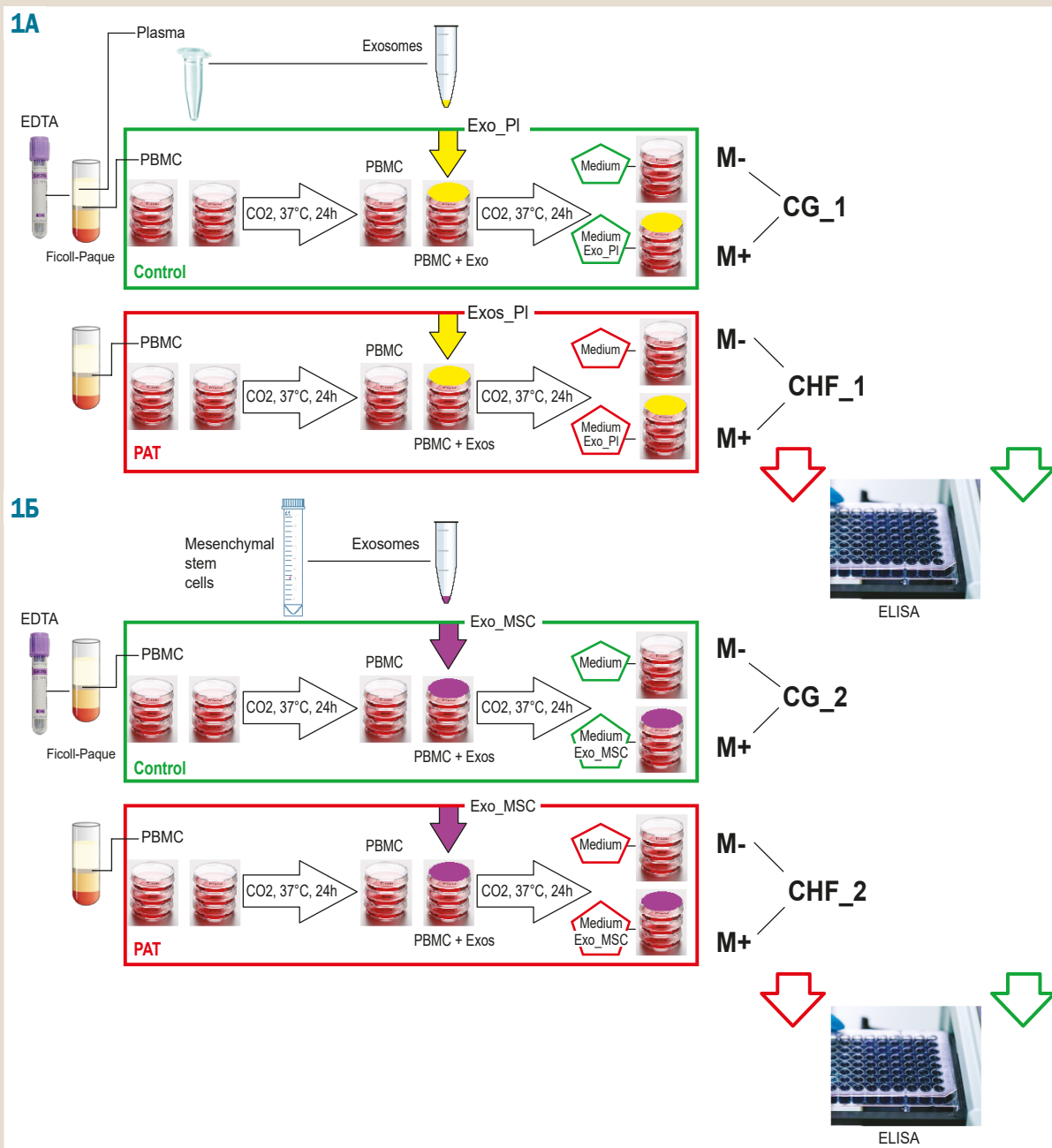


Рис. 1. Дизайн дослідження, що здійснили у 1 серії (А) та 2 серії (Б) із PBMC пацієнтів (PAT) із ХСН у двох групах CHF_1, CHF_2, а також здорових добровольців (Control) у двох групах CG_1, CG_2.

PBMC: мононуклеарні клітини периферичної крові; **Exo_PI:** екзосоми, що виділені з плазми осіб КГ; **Exo_MSC:** екзосоми, що виділені з кондиційного середовища MSC плаценти; **Medium (M):** середовище культивування PBMC.

росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor, VEGF-A), молекул клітинної адгезії (inter-cellular adhesion molecule-1, ICAM-1), хемоатрактантного протеїну моноцитів (monocyte chemoattractant protein, MCP-1), що визначені в середовищі культивування мононуклеарів.

У першій серії досліджень вивчали секрецію клітин пацієнтів ХСН1 (n = 12) та осіб КГ1 (n = 12) під впливом ЕкзоПл. У другій серії, яку здійснили пізніше, вивчали секрецію клітин пацієнтів ХСН2 (n = 13) та осіб КГ2 (n = 12) під впливом ЕкзоMSC.

Дизайн експерименту наведено на схемі (рис. 1).

Для дослідження використовували венозну кров, що брали натще у вакуумні пробірки з антикоагулянтном EDTA. Кров розводили (1:1) стандартним фосфатним буфером (PBS), центрифугували у градієнті фіколу (Ficoll-Paque TM, GE Healthcare, Швеція) у співвідношенні 3:4, 400×g протягом 25 хв за температури 18 °С. Осад клітин після відбирання промивали холодним PBS (вільним від Ca²⁺/Mg²⁺). Клітини кожного пацієнта культивували в 3 мл середовища Roswell Park Memorial Institute medium – RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), що до-

повнене 5 % FCS (Gibco® Invitrogen), 1 % пеніциліном/стрептоміцином і 1 % L-глутаміном (Sigma-Aldrich) за температури 37 °C, 5 % CO₂ [12] у двох чашках Петрі (60 mm, Thermo scientific, США, #130181) протягом 24 годин із 50 нг/мл LPS. Після цього в одну з чашок Петрі додавали суспензію екзосом і продовжували інкубацію ще протягом доби. Важлива умова стандартизації експерименту – поміщення до кожної чашки Петрі 2 млн клітин. Для цього кількість лейкоцитів визначили за допомогою гематологічного аналізатора у венозній крові пацієнтів, в ізолюваній популяції РВМС, додатково оцінили в камері Горяєва методом візуального обрахунку. Далі шляхом розрахунку визначали об'єм рідини, якій містив 2 млн клітин, і вносили в кожну чашку Петрі.

Екзосоми (ЕкзоГл) виділяли з плазми осіб КГ, яку збирали шляхом центрифугування цільної крові, за допомогою набору для ізоляції Total Exosome (Invitrogen, США, #4484450) за протоколом виробника. Отримали загальний пул екзосом від кількох донорів. Із 12 здорових донорів рандомно обрали 6 для виділення загального (змішаного) екстракту екзосом із плазми крові. З венозної крові кожного донора отримували 3–4 мл плазми, але брали для експерименту по 1 мл для отримання осаду екзосом і наступного ресуспендування у 500 мкл PBS буфера. За даними виробника, з 1 мл плазми отримують 1,5–3,0 × 10¹² екзосом. Отже, 6 осадів екзосом, що містилися у 3 мл розчину, містили ~12 × 10¹² екзосом. Для стандартизації кількості екзосом суспензію, що одержали, розводили PBS удвічі, в кожну чашку Петрі вносили 50 мкл цієї суспензії з вмістом 1 × 10¹¹ екзосом.

Принцип виділення екзосом полягає в тому, що, зв'язуючи молекули води, ізоляційний реагент витісняє з розчину менш розчинні компоненти, зокрема везикули. Це дає змогу їх збирати за допомогою центрифугування. Після 30 хв інкубації з реагентом за температури 2–8 °C суспензію з екзосомами осаджували центрифугуванням при 10 000×g протягом 5 хв за кімнатної температури. Отриманий осад екзосом від різних здорових донорів ретельно ресуспендували у стерильному PBS буфері, вносили 50 мкл суспензії екзосом до кожного зразка культивованих РВМС і 50 мкл PBS буфера як негативного контролю.

MSC вирощено з плацент людини кінцевого терміну гестації, що одержані під час кесаревого розтину з інформованої згоди породіль відповідно до методики [13]. MSC плаценти вирощували в поживному середовищі, що містить alpha-MEM (HyClone, USA) з додаванням 15 % FBS (HyClone, USA), 1×RPMI amino acid solution (Sigma, USA) та 1×streptomycin/penicillin (Sigma, USA) в умовах 5 % CO₂ за температури 37 °C. Кондиційоване середовище збирали шляхом центрифугування MSC при 400×g протягом 10 хв і відбиранням надосадової рідини.

Екзосоми із середовища культивування MSC плаценти (ЕкзоMSC) виділяли за допомогою набору для Total Exosome Isolation Reagent from cell culture media (Invitrogen, США, #4478359) згідно з інструкцією виробника. Набір призначений для концентрації екзосом зі зразків середовищ клітинних культур, принцип його дії аналогічний до попереднього, дає змогу зібрати екзосоми як менш розчинні компоненти після низькошвидкісного центрифугування. Відповідно до інструкції, для позбавлення середовища культивування від дебрису

та зруйнованих клітин додатково центрифугували при 2000×g протягом 30 хв. Потім до отриманого супернатанту додавали реагент для ізолювання екзосом у співвідношенні 2:1 та обережно перемішували. Зразки інкубували протягом ночі за температури 2–8 °C і, охолоджуючи, центрифугували при 10 000×g протягом 1 години. Після аспірації супернатанту осад екзосом ресуспендували у стерильному PBS буфері та додавали до культивованих РВМС. За інформацією виробника, з 1 мл культурального середовища лінії клітин HeLa 4 × 10⁷ на матрац T175 у 30 мл середовища отримують 1–3 × 10¹⁰ екзосом. Із 100 мл кондиційного середовища MSC одержали осад (із вмістом ~2 × 10¹²), який розчинили в 1 мл PBS. Для інкубації з клітинами використали 50 мкл суспензії (~1 × 10¹¹ екзосом) у кожну чашку Петрі та 50 мкл PBS буфера як негативний контроль. Стандартизацію дози екзосом здійснили за даними виробника наборів для ізоляції, що розраховані на окремі середовища, зважаючи на елективний розмір везикул 30–150 нм, а також за результатами оглядових публікацій, де порівнювали набори для виділення екзосом різних виробників [14].

Використовуючи названі набори для виділення екзосом, розуміємо, що не можна виключати імовірний вплив реагентів на хімічні та механічні властивості ліпідних мембран. Однак навіть якщо мембрани везикул частково руйнувалися під час ліполітичного впливу реактивів, на РВМС чинили дію екзосомальні біоактивні молекули, що містилися всередині цих везикулярних структур. Тому методичний підхід, що обрали, виправданий для дослідження впливу вмісту екзосом/екзосомальних молекул, які виділені з різних середовищ.

Середовище культивування РВМС відбирали після дводобової інкубації та зберігали до здійснення аналізу за температури -20 °C. Для стандартизації дослідження в кожній пробі визначали концентрацію загального протеїну на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі BS-3000M (Китай), використовуючи біохімічний набір від Diagnosticum Zrt. (Угорщина). Рівень VEGF-A, ICAM-1, MCP-1 в пробі визначали методом ІФА, застосовуючи набори Elabscience (США) за допомогою аналізатора RT-2100C (КНР). Для наведення даних у діаграмах перераховували значення VEGF-A, ICAM-1, MCP-1 для кожного пацієнта відповідно до концентрації загального протеїну в його зразку.

Статистичний аналіз даних здійснили, застосовавши IBM SPSS Statistics, версія 23.0 (SPSS Inc., США). Результати всіх експериментів наведені як середнє ± SEM. Для перевірки нормального розподілу використали тест Шапіро–Вілка. Для даних із нормальним розподілом статистичні відмінності за групами аналізували за допомогою одностороннього ANOVA-тесту з наступним тестом Тьюкі post-hoc. Для непараметричних даних використовували критерій χ² та Крускала–Воліса. Відмінності вважали значущими при p ≤ 0,05.

Результати

Базова секреція VEGF-A у середовищі культивування РВМС пацієнтів нижча, ніж у КГ (рис. 2), але різниця невірогідна. В першій серії визначили різницю за вмістом фактора між групою пацієнтів і КГ у 31 %, у другій – 15 %. Вважаємо, відсутність статистичної достовірності при

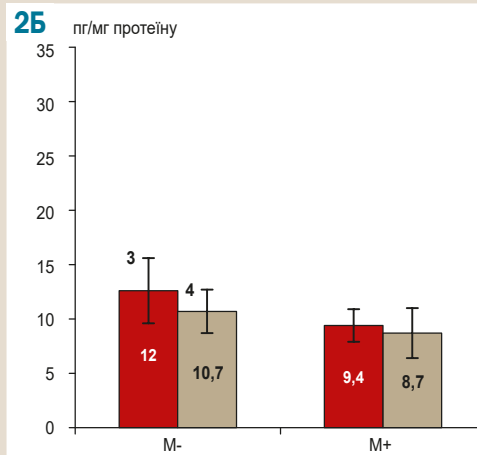
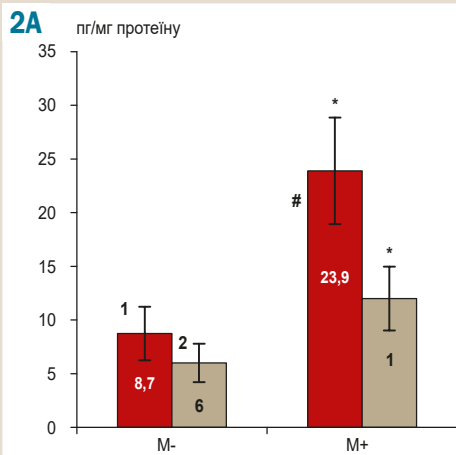


Рис. 2. Вміст VEGF-A у середовищі культивування активованих мононуклеарних клітин крові на базовому рівні (M-) та після інкубації (M+) з екзосомами ЕкзоПл (А) та ЕкзоMSC (Б).

1: показники групи здорових донорів КГ1;
2: пацієнтів ХСН1;
3: здорових донорів КГ2;
4: пацієнтів ХСН2;
*: відмінність показників у кожній групі базового рівня та після впливу екзосом, $p < 0,05$;
#: відмінність показників у групі пацієнтів і контрольній, $p < 0,05$.

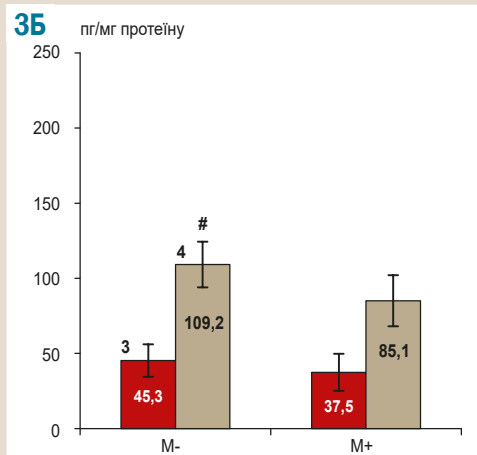
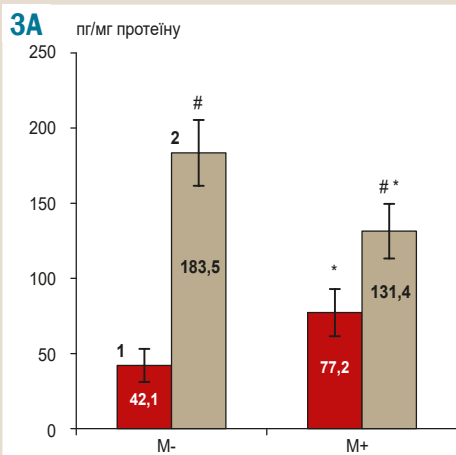


Рис. 3. Вміст ICAM-1 у середовищі культивування активованих мононуклеарних клітин крові на базовому рівні (M-) та після інкубації (M+) з екзосомами ЕкзоПлазма (А) та ЕкзоMSC (Б).

1: показники групи здорових донорів КГ1;
2: пацієнтів ХСН1;
3: здорових донорів КГ2;
4: пацієнтів ХСН2;
*: відмінність показників у кожній групі базового рівня та після впливу екзосом, $p < 0,05$;
#: відмінність показників у групі пацієнтів і контрольній, $p < 0,05$.

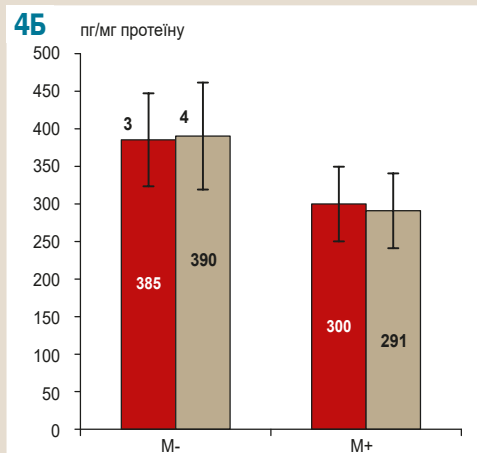
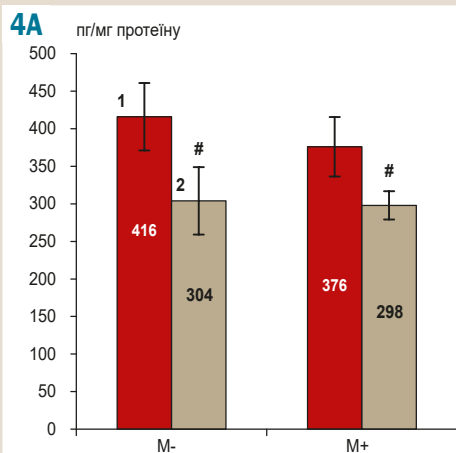


Рис. 4. Вміст MCP-1 у середовищі культивування активованих мононуклеарних клітин крові на базовому рівні (M-) та після інкубації (M+) з екзосомами ЕкзоПлазма (А) та ЕкзоMSC (Б).

1: показники групи здорових донорів КГ1;
2: пацієнтів ХСН1;
3: здорових донорів КГ2;
4: пацієнтів ХСН2; $p < 0,05$;
#: відмінність показників у групі пацієнтів і контрольній, $p < 0,05$.

порівнянні в межах однієї серії експерименту можна пояснити невеликою кількістю зразків для дослідження та істотною індивідуальною варіацією показників.

Інкубація РВМС з екзосомами ЕкзоПл (рис. 2А) призводила до суттєвого зростання рівня VEGF-A: у КГ – в 2,73 раза ($p \leq 0,05$), у пацієнтів із ХСН – удвічі ($p \leq 0,05$). Інкубація клітин з екзосомами ЕкзоMSC (рис. 2Б) не спричиняла істотні зміни VEGF-A, але сприяла недовірному зниженню вмісту VEGF-A в усіх групах: в КГ – на 25,4 %, у хворих на ХСН – на 18,7 %. У цій роботі

наводимо виявлену тенденцію впливу й акцентуємо, що для остаточних висновків необхідно суттєво збільшити об'єм проб і забезпечити відтворюваність даних.

Інкубація РВМС з екзосомами ЕкзоПл по-різному впливала на вміст ICAM-1 (рис. 3А). У КГ рівень протеїну підвищувався в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), а в пацієнтів із ХСН зменшувався в 1,4 раза ($p \leq 0,05$). Зазначимо, що базова секреція ICAM-1 на тлі ХСН перевищувала показник КГ в 4,3 раза ($p \leq 0,05$). В другій серії встановили вірогідну різницю базової секреції ICAM-1 на тлі ХСН, що пере-

вищувала показник КГ у 2,4 раза ($p \leq 0,05$). Інкубація клітин з екзосомами ЕкзоMSC (рис. 3Б) не призводила до суттєвих змін секреції ICAM-1 у КГ, невірогідно знижувала вміст ICAM-1: у КГ – на 17 %, у пацієнтів із ХСН – на 22 %.

У першій серії виявили вірогідну різницю базової секреції MCP-1 у донорів і пацієнтів, що становила 27 % ($p < 0,05$). Інкубація РВМС з екзосомами ЕкзоПл (рис. 4А) спричиняла недостовірне зменшення вмісту MCP-1 у КГ на 10 % і майже не змінювала паракринну секрецію в пацієнтів із ХСН, тому після інкубації з екзосомами ЕкзоПл різниця рівня MCP-1 у КГ і групі ХСН зменшувалася до 20 % ($p < 0,05$).

У другій серії не виявили різницю базового рівня MCP-1 секреції клітин КГ і хворих на ХСН, але після інкубації з екзосомами ЕкзоMSC (рис. 4Б) встановили невірогідне зменшення секреції MCP-1 у КГ на 22 %, а в клітинах пацієнтів із ХСН – на 25 %.

Обговорення

Зауважимо, що у цій роботі не наводимо пряме порівняння між даними двох груп пацієнтів із ХСН або двох груп донорів у першій і другій серіях. По-перше, вимірювання рівня секреції речовин для кожної серії здійснювали за допомогою наборів, що призначені лише для наукових досліджень і належать до різних лотів, й результати порівнювати некоректно. Тому, визначені різні базові рівні VEGF-A у групах добровольців і пацієнтів цілком зрозумілі. По-друге, дизайн експерименту не передбачав можливість вивчити та порівняти вплив на одні й ті самі клітини екзосом ЕкзоПл та ЕкзоMSC, оскільки дві серії експерименту здійснені в різний час, у кожній серії використовували біологічний матеріал різних осіб, що не можна зберігати. Тому можемо констатувати лише різні принципів ефекти, що впливають на властивості клітин периферичної крові – екзосоми, виділені з різних біологічних об'єктів, а також визначати майбутній вектор досліджень.

Результати підтверджують істотний стимуляційний вплив екзосом ЕкзоПл на паракринну секрецію клітин VEGF-A. Це можна вважати перспективним шляхом терапевтичної дії на стан ендотелію в пацієнтів із ХСН. Зазначимо, що паракринна секреція виявилася більш вираженою в КГ за умов стимуляції екзосомами, що виділені з плазми цих самих осіб, тобто при аутовпливі. Екзосомальна стимуляція секреції VEGF-A активованими мононуклеарами може свідчити про збільшення ангіогенного потенціалу РВМС і можливий протекторний вплив екзосом на відновлення клітин міокарда. Є гіпотеза про зростання рівнів проангіогенних маркерів, що пов'язане з процесами, спрямованими на відновлення дисфункціонального ендотелію, а не сприяє власне ангіогенезу [15,16]. Ангіогенез відіграє важливу роль для загоєння ран, відновлення міокарда та скелетних м'язів після ішемії, але має патологічний характер при серцево-судинних (як-от при ХСН), онкологічних захворюваннях, віковій макулярній дегенерації сітківки та інших патологіях [17].

Аналіз відомостей фахової літератури свідчить, що маркери ангіогенезу, зокрема всі типи VEGF-A, активно досліджують у пацієнтів із ХСН, визначаючи

перспективні показники для удосконалення діагностики та прогнозування ХСН. Здійснили неодноразові спроби використання VEGF-A в генній терапії хворих на серцево-судинні захворювання, але результати доклінічних і клінічних досліджень суперечливі [18,19]. В експериментальних дослідженнях показано: введення VEGF-A спричиняло агресивний розвиток бляшок через прискорення неоваскуляризації судинної стінки [20]. Це визначає актуальність пошуків механізмів блокування названих процесів.

Виявлене підвищення паракринної секреції протеїну ICAM-1 мононуклеарами здорових осіб на тлі інкубації клітин з екзосомами, що виділені з плазми цих самих донорів, тобто за умов фізіологічної аутоstimуляції, може свідчити про потенційне підвищення адгезивних властивостей лейкоцитів крові та їхньої здатності до проникнення в тканину. Зменшення паракринної секреції протеїну в клітин пацієнтів із ХСН під впливом ЕкзоПл, зважаючи на базовий високий рівень ICAM-1 секреції, можна вважати протекторною дією на клітинно-ендотеліальні зв'язки, але це лише припущення, яке потребує додаткових досліджень. На тлі інкубації РВМС обох груп з ЕкзоMSC спостерігали пригнічення ICAM-1 секреції клітин, незважаючи на відсутність вірогідної різниці, виявлена чітка тенденція до впливу екзосом кондиційного середовища на адгезивні властивості клітин.

ICAM-1 разом з іншими молекулами клітинної адгезії відіграє ключову роль у процесах адгезії нейтрофілів і моноцитів до ендотеліальних клітин, призводячи до розвитку дисфункції ендотелію та прогресування серцево-судинних захворювань [21]. Тому обґрунтованими є пошуки терапевтичних підходів для впливу на ICAM-1 як мішень при захворюваннях серцево-судинної системи [22,23]. Виявлене базове підвищення його секреції в хворих на ХСН показує суттєву активацію процесів адгезії моноцитів та ендотеліальних клітин при патології, що має вирішальне значення для поглиблення запалення інтими судин та прогресування атеросклерозу як важливого фактора, що супроводжує і ангіогенний, і атерогенний механізми. Макрофагам, утвореним із моноцитів, належить ключова роль у відкладенні ліпідів і прогресуванні атеросклерозу, оскільки збільшення бляшок призводить до посилення гіпоксії, що підвищує інфільтрацію запальними клітинами. В цьому аспекті встановлене зниження рівня паракринної секреції ICAM-1 клітинами пацієнтів під впливом екзосом може бути протекторним механізмом «стримування» запалення.

Сучасні дослідження свідчать про неоднозначну роль MCP-1 у перебігу серцево-судинних захворювань. Незважаючи на його ключову роль у хемотаксії моноцитів і макрофагів у вогнище запалення, встановлено: MCP-1 бере участь у ремоделюванні та неоваскуляризації міокарда після інфаркту [24]. В експериментальних дослідженнях показано, що інгібування MCP-1 послаблює процеси ремоделювання лівого шлуночка, а підвищення MCP-1 має прямий ангіогенний вплив, й ендотеліальні клітини експресують його рецептор. Ба більше, встановлена кардіопротекторна дія MCP-1 при гіпоксії кардіоміоцитів *in vitro* [25]. Незважаючи на вирішальну роль MCP-1 у регулюванні хемотаксису моноцитів і остаточно не з'ясовану участь у розвитку серцево-судинних захворювань, науковий інтерес ви-

кликають шляхи фармакологічного інгібування MCP-1 [26]. Результати цього дослідження показують певну пригніченість секреції цитокіну під впливом екзосом та можуть бути цікавими.

Наводячи експериментальні дані, з обережністю ставимося до їх інтерпретації. Виявлений вплив екзосом, що виділені з плазми здорових донорів, на властивості РВМС, зокрема значущий ефект на секрецію фактора росту судин і модулювання секреції цитокінів запалення, можна вважати протекторним, хоча однозначно стверджувати це передчасно через обмежену кількість спостережень, відсутність відтворюваності вмісту цитокінів в однакових групах хворих у двох серіях і невеликий спектр показників, що досліджували.

Дослідження на першому етапі передбачали вивчення впливу екзосом, що виділені з плазми донорів, на властивості РВМС людини. Наступний етап – оцінювання впливу екзосом, що виділені з кондиційного середовища MSC на стимульовані РВМС пацієнтів. Отже, в цій роботі вивчили ефекти, що спостерігають при інкубації клітин крові з різними видами екзосом. Результати додають цінну інформацію щодо дизайну майбутніх досліджень у цьому напрямі клітинної біології, показують природний потенціал екзосом як структур-транспортів регуляторних молекул, підкреслюючи перспективність пошуку і розроблення шляхів ефективних фізіологічних і терапевтичних впливів.

Висновки

1. На моделі (*in vitro*) виявили особливості впливу на функціональні властивості клітин периферичної крові людини екзосом, що виділені з плазми донорів і кондиційного середовища.

2. Інкубація РВМС з екзосомами, які виділені з плазми донорів, призводила до підвищення секреції VEGF-A у групі донорів в 2,73 раза ($p \leq 0,05$), у групі пацієнтів із ХСН – удвічі ($p \leq 0,05$); викликала різноспрямований ефект на рівень ICAM-1: в групі донорів він підвищувався в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), у пацієнтів із ХСН зменшувався в 1,4 раза ($p \leq 0,05$); секреція MCP-1 у групі донорів невірогідно знижувалася на 10 %, майже не змінювалась у хворих на ХСН.

3. Інкубація РВМС з екзосомами, виділеними з кондиційного середовища MSC, не викликала достовірних змін паракринної секреції РВМС: у групі здорових добровольців встановили зменшення секреції VEGF-A на 25 %, ICAM-1 – на 17 %, MCP-1 – на 22 %; у групі пацієнтів із ХСН секреція цих речовин зменшувалася на 18,7 %, 22,0 % і 25,0 % відповідно.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках 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.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 10.01.2022

Після доопрацювання / Revised: 19.03.2022

Прийнято до друку / Accepted: 18.05.2022

Відомості про авторів:

Натрус Л. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. сучасних технологій медичної діагностики та лікування, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.
ORCID ID: [0000-0003-1763-0618](https://orcid.org/0000-0003-1763-0618)

Клиш Ю. Г., канд. біол. наук, зав. лабораторії експериментальних досліджень Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.
ORCID ID: [0000-0002-4401-803X](https://orcid.org/0000-0002-4401-803X)

Лабудзинський Д. О., канд. біол. наук, науковий співробітник, Інститут біохімії імені О. В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ.
ORCID ID: [0000-0003-4389-6049](https://orcid.org/0000-0003-4389-6049)

Черновол П. А., асистент каф. сучасних технологій медичної діагностики та лікування, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.
ORCID ID: [0000-0001-7478-6921](https://orcid.org/0000-0001-7478-6921)

Хайрмасов Р. Н., канд. мед. наук, асистент каф. терапії, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, м. Київ.
ORCID ID: [0000-0002-7092-6752](https://orcid.org/0000-0002-7092-6752)

Музиченко П. Ф., д-р мед. наук, професор каф. оперативної хірургії та топографічної анатомії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.
ORCID ID: [0000-0001-7876-106X](https://orcid.org/0000-0001-7876-106X)

Рижко І. М., асистент каф. сучасних технологій медичної діагностики та лікування, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.
ORCID ID: [0000-0003-0588-7969](https://orcid.org/0000-0003-0588-7969)

Information about authors:

Natrus L. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Modern Technologies of Medical Diagnostics and Treatment, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Klysh Yu. H., PhD, Head of the Laboratory of Experimental Research of the Institute of Experimental and Clinical Medicine, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Labudzynskiy D. O., PhD, Researcher of the Department of Biochemistry of Vitamins and Coenzymes, Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv.

Chernovol P. A., Assistant of the Department of Modern Technologies of Medical Diagnostics and Treatment, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Khairmasov R. N., PhD, Assistant Professor of Department of Therapy, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv.

Muzychenko P. F., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Ryzhko I. M., Assistant of the Department of Modern Technologies of Medical Diagnostics and Treatment, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Список літератури

- [1] Inamdar A. A., Inamdar A. C. Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. *Journal of clinical medicine*, 2016. Vol. 5. Issue 7. P. 62. <https://doi.org/10.3390/jcm5070062>
- [2] Bernardi S., Balbi C. Extracellular Vesicles: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Biology*. 2020. Vol. 9. Issue 9. P. 258. <https://doi.org/10.3390/biology9090258>
- [3] van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2018. Vol. 19. Issue 4. P. 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- [4] Wang A. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Strategy for Various Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2021. Vol. 22. Issue 4. P. 1769. <https://doi.org/10.3390/ijms22041769>
- [5] Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy / X. L. Fan, Y. Zhang, X. Li, Q. L. Fu. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2020. Vol. 77. Issue 14. P. 2771-2794. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03454-6>

- [6] Planat-Benard V., Varin A., Casteilla L. MSCs and Inflammatory Cells Crosstalk in Regenerative Medicine: Concerted Actions for Optimized Resolution Driven by Energy Metabolism. *Frontiers in immunology*. 2021. Vol. 12. P. 626755. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626755>
- [7] Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications / S. Rani, A. E. Ryan, M. D. Griffin, T. Ritter. *Molecular therapy*. 2015. Vol. 23. Issue 5. P. 812-823. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.44>
- [8] Yin K., Wang S., Zhao R. C. Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomarker research*. 2019. Vol. 7. P. 8. <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0159-x>
- [9] Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy / M. Jafarinaia et al. *Immunological investigations*. 2020. Vol. 49. Issue 7. P. 758-780. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1712416>
- [10] Varderdidou-Minasian S., Lorenowicz M. J. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities. *Theranostics*. 2020. Vol. 10. Issue 13. P. 5979-5997. <https://doi.org/10.7150/thno.40122>
- [11] Plasma exosomes impact on paracrine secretion of peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic heart failure / L. V. Natrus et al. *Фізіологічний журнал*. 2020. Vol. 66, N 6. P. 21-32. <https://doi.org/10.15407/fz66.06.021>
- [12] Riedhammer C., Halbritter D., Weissert R. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods in molecular biology*. 2016. Vol. 1304. P. 53-61. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9902-5_9
- [13] High Proliferative Placenta-Derived Multipotent Cells Express Cytokeratin 7 at Low Level / V. Shablii et al. *BioMed research international*. 2019. Vol. 2019. P. 2098749. <https://doi.org/10.1155/2019/2098749>
- [14] Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications / G. K. Patel et al. *Scientific reports*, 2019. Vol. 9. Issue 1. P. 5335. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41800-2>
- [15] Serum From Advanced Heart Failure Patients Promotes Angiogenic Sprouting and Affects the Notch Pathway in Human Endothelial Cells / M. Pannella et al. *Journal of cellular physiology*. 2016. Vol. 231. Issue 12. P. 2700-2710. <https://doi.org/10.1002/jcp.25373>
- [16] Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal / R. Khurana, M. Simons, J. F. Martin, I. C. Zachary. *Circulation*. 2005. Vol. 112. Issue 12. P. 1813-1824. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535294>
- [17] VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation / X. H. Xu et al. *Journal of cardiothoracic surgery*. 2011. Vol. 6. P. 54. <https://doi.org/10.1186/1749-8090-6-54>
- [18] 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 / L. Favalaro et al. *Catheterization and cardiovascular interventions*. 2013. Vol. 82. Issue 6. P. 899-906. <https://doi.org/10.1002/ccd.24555>
- [19] Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD) / K. Kukula et al. *American heart journal*. 2011. Vol. 161. Issue 3. P. 581-589. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.11.023>
- [20] The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis / A. S. Jaipresad, G. Y. Lip, S. Silverman, E. Shantsila. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014. Vol. 63. Issue 1. P. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.019>
- [21] Circulating Biomarkers of Cell Adhesion Predict Clinical Outcome in Patients with Chronic Heart Failure / E. Bouwens et al. *Journal of clinical medicine*. 2020. Vol. 9. Issue 1. P. 195. <https://doi.org/10.3390/jcm9010195>
- [22] Pharmacological blockage of ICAM-1 improves angiotensin II-induced cardiac remodeling by inhibiting adhesion of LFA-1⁺ monocytes / Q. Y. Lin et al. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2019. Vol. 317. Issue 6. P. H1301-H1311. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00566.2019>
- [23] Bui T. M., Wiesolek H. L., Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of leukocyte biology*. 2020. Vol. 108. Issue 3. P. 787-799. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>
- [24] Morimoto H., Takahashi M. Role of monocyte chemoattractant protein-1 in myocardial infarction. *International journal of biomedical science : IJBS*. 2007. Vol. 3. Issue 3. P. 159-167.
- [25] Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction / H. Morimoto et al. *Circulation research*. 2006. Vol. 99. Issue 8. P. 891-899. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000246113.82111.2d>
- [26] The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1 / V. Bianconi, A. Sahebkar, S. L. Atkin, M. Pirro. *Current opinion in hematology*. 2018. Vol. 25. Issue 1. P. 44-51. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000389>

References

- [1] Inamdar, A. A., & Inamdar, A. C. (2016). Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. *Journal of clinical medicine*, 5(7), 62. <https://doi.org/10.3390/jcm5070062>
- [2] Bernardi, S., & Balbi, C. (2020). Extracellular Vesicles: From Biomarkers to Therapeutic Tools. *Biology*, 9(9), 258. <https://doi.org/10.3390/biology9090258>
- [3] van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- [4] Wang, A. (2021). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Strategy for Various Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 1769. <https://doi.org/10.3390/ijms22041769>
- [5] Fan, X. L., Zhang, Y., Li, X., & Fu, Q. L. (2020). Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(14), 2771-2794. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03454-6>
- [6] Planat-Benard, V., Varin, A., & Casteilla, L. (2021). MSCs and Inflammatory Cells Crosstalk in Regenerative Medicine: Concerted Actions for Optimized Resolution Driven by Energy Metabolism. *Frontiers in immunology*, 12, 626755. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626755>
- [7] Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D., & Ritter, T. (2015). Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Molecular therapy*, 23(5), 812-823. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.44>
- [8] Yin, K., Wang, S., & Zhao, R. C. (2019). Exosomes from mesenchymal stem/stromal cells: a new therapeutic paradigm. *Biomarker research*, 7, 8. <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0159-x>
- [9] Jafarinaia, M., Alsahebhosoul, F., Salehi, H., Eskandari, N., & Ganjalikhani-Hakemi, M. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Cell-Free Therapy. *Immunological investigations*, 49(7), 758-780. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1712416>
- [10] Varderdidou-Minasian, S., & Lorenowicz, M. J. (2020). Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair: challenges and opportunities. *Theranostics*, 10(13), 5979-5997. <https://doi.org/10.7150/thno.40122>
- [11] Natrus, L. V., Muzychenko, P. F., Labudzynski, D. O., Chernovol, P. A., & Klys, Y. G. (2020). Plasma exosomes impact on paracrine secretion of peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic heart failure. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 66(6), 21-32. <https://doi.org/10.15407/fz66.06.021>
- [12] Riedhammer, C., Halbritter, D., & Weissert, R. (2016). Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N. J.)*, 1304, 53-61. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9902-5_9
- [13] Shablii, V., Kuchma, M., Svitina, H., Skrypkina, I., Areshkov, P., Kyryk, V., Bukreieva, T., Nikulina, V., Shablii, I., & Lobytseva, G. (2019). High Proliferative Placenta-Derived Multipotent Cells Express Cytokeratin 7 at Low Level. *BioMed research international*, 2019, 2098749. <https://doi.org/10.1155/2019/2098749>
- [14] Patel, G. K., Khan, M. A., Zubair, H., Srivastava, S. K., Khushman, M., Singh, S., & Singh, A. P. (2019). Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific reports*, 9(1), 5335. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41800-2>
- [15] Pannella, M., Caliceti, C., Fortini, F., Aquila, G., Vieceli Dalla Sega, F., Pannuti, A., Fortini, C., Morelli, M. B., Fucili, A., Francolini, G., Voltan, R., Secchiero, P., Dinelli, G., Leoncini, E., Ferracin, M., Hrelia, S., Miele, L., & Rizzo, P. (2016). Serum From Advanced Heart Failure Patients Promotes Angiogenic Sprouting and Affects the Notch Pathway in Human Endothelial Cells. *Journal of cellular physiology*, 231(12), 2700-2710. <https://doi.org/10.1002/jcp.25373>
- [16] Khurana, R., Simons, M., Martin, J. F., & Zachary, I. C. (2005). Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation*, 112(12), 1813-1824. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535294>
- [17] Xu, X. H., Xu, J., Xue, L., Cao, H. L., Liu, X., & Chen, Y. J. (2011). VEGF attenuates development from cardiac hypertrophy to heart failure after aortic stenosis through mitochondrial mediated apoptosis and cardiomyocyte proliferation. *Journal of cardiothoracic surgery*, 6, 54. <https://doi.org/10.1186/1749-8090-6-54>
- [18] Favalaro, L., Diez, M., Mendiz, O., Janavel, G. V., Valdivieso, L., Ratto, R., Garelli, G., Salmo, F., Criscuolo, M., Bercovich, A., & Crotogni, A. (2013). 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. *Catheterization and cardiovascular interventions*, 82(6), 899-906. <https://doi.org/10.1002/ccd.24555>

- [19] Kukuła, K., Chojnowska, L., Dąbrowski, M., Witkowski, A., Chmielak, Z., Skwarek, M., Kądziela, J., Teresińska, A., Malecki, M., Janik, P., Lewandowski, Z., Kłopotowski, M., Wnuk, J., & Rużyło, W. (2011). Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *American heart journal*, 161(3), 581-589. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.11.023>
- [20] Jaipersad, A. S., Lip, G. Y., Silverman, S., & Shantsila, E. (2014). The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.019>
- [21] Bouwens, E., van den Berg, V. J., Akkerhuis, K. M., Baart, S. J., Caliskan, K., Brugts, J. J., Mouthaan, H., Ramshorst, J. V., Germans, T., Umans, V., Boersma, E., & Kardys, I. (2020). Circulating Biomarkers of Cell Adhesion Predict Clinical Outcome in Patients with Chronic Heart Failure. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 195. <https://doi.org/10.3390/jcm9010195>
- [22] Lin, Q. Y., Lang, P. P., Zhang, Y. L., Yang, X. L., Xia, Y. L., Bai, J., & Li, H. H. (2019). Pharmacological blockage of ICAM-1 improves angiotensin II-induced cardiac remodeling by inhibiting adhesion of LFA-1⁺ monocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 317(6), H1301-H1311. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00566.2019>
- [23] Bui, T. M., Wiesolek, H. L., & Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of leukocyte biology*, 108(3), 787-799. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0220-549R>
- [24] Morimoto, H., & Takahashi, M. (2007). Role of monocyte chemoattractant protein-1 in myocardial infarction. *International journal of biomedical science : IJBS*, 3(3), 159-167.
- [25] Morimoto, H., Takahashi, M., Izawa, A., Ise, H., Hongo, M., Kolatukudy, P. E., & Ikeda, U. (2006). Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circulation research*, 99(8), 891-899. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000246113.82111.2d>
- [26] Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S. L., & Pirro, M. (2018). The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Current opinion in hematology*, 25(1), 44-51. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000389>