

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №____ засідання кафедри

від “____” _____ 20__ р.

**ВПЛИВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ВЕЗИКУЛ *P. AERUGINOSA* ATCC 10145 НА
ФОРМУВАННЯ ТИПІВ РЕГУЛЬОВАНОЇ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Рудь Вікторії Максимівни

Науковий керівник від кафедри

канд. біол. наук Коваль Т.В.

Робота виконана у лабораторії мікробної екології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом завідувачки лабораторії, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Козировської Наталії Олексіївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

В-ЗМВ	– вибухові везикули зовнішньої мембрани;
З-ВМВ	– зовнішньо-внутрішньо-мембранні везикули;
ЗМВ	– зовнішньо-мембранні везикули;
ЛПС	– ліпополісахарид;
МВТ	– мультивезикулярні тільця;
ПВ	– позаклітинні везикули;
РКЗ	– регульована клітинна загибель;
AIM2	– absent in melanoma 2 (відсутній за меланоми 2);
ASC	– apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (білок, Speck-подібний асоційований з апоптозом з CARD-доменом);
DAMP	– damage-associated molecular patterns (молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням);
ESCRT	– endosomal sorting complexes required for transport (ендосомні сортувальні комплекси, необхідні для транспорту);
FADD	– Fas-associated protein with death domain (Fas-асоційований білок з доменом смерті);
GSDMD	– gasdermin D (газдермін D);
IL	– interleukin (інтерлейкін);
MLKL	– mixed lineage kinase domain-like (псевдокіназа змішаної лінії кіназного домену);
NLRP	– NOD-like receptor protein (NOD-подібний рецепторний білок);
NF-κB	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерний фактор κB);
OSA	– O-specific antigen (О-специфічний антиген);
PAMP	– pathogen-associated molecular patterns (патоген-асоційовані молекулярні патерни);
PQS	– P. quinolone signal (хінолоновий сигнал P.);

- RHIM – RIP homotypic interaction motif (мотив гомотипічної взаємодії RIP);
- RIPK – receptor-interacting protein kinase (рецептор-взаємодіючі протеїнкінази);
- TLR – Toll-like receptors (Toll-подібні рецептори);
- ZBP1 – Z-DNA binding protein 1 (Z-ДНК-зв'язувальний білок 1).

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика бактеріальних везикул та їхня роль у регуляції програмованої загибелі клітини.....	8
1.1. Загальна характеристика позаклітинних везикул.....	8
1.2. Будова, біогенез та склад зовнішньо-мембранних везикул грамнегативних бактерій	10
1.3. Особливості біогенезу та складу зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i>	14
1.4. Функції та терапевтичний потенціал зовнішньо-мембранних везикул .	16
1.5. ПАНоптоз як інтегративна форма регульованої клітинної загибелі	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	27
2.1. Матеріали та обладнання	27
2.2. Характеристика експериментальних біологічних об'єктів	28
2.3. Культивування бактерії <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	29
2.4. Виділення зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	29
2.5. Трансмисійна електронна мікроскопія отриманих зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	30
2.6. Визначення вмісту білка у зразках зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	30
2.7. Завантаження зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 доксорубіцином	31
2.8. Флуоресцентна спектроскопія зразків зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	31
2.9. Культивування еукаріотичних клітин THP-1 та обробка зовнішньо-мембранними везикулами <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	32
2.10. Візуалізація клітин за допомогою світлового мікроскопа.....	33
2.11. Визначення цитотоксичності методом МТТ	33
2.12. Кількісна ПЛР у реальному часі.....	33

РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	36
3.1. Морфологія та розміри зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> .	36
3.2. Взаємодія між доксорубіцином та зовнішньо-мембранними везикулами <i>P. aeruginosa</i>	38
3.3. Дія зовнішньо-мембранних везикул <i>P. aeruginosa</i> на морфологію та життєздатність клітин ТНР-1	40
3.4. Результати дослідження експресії генів клітинної загибелі.....	42
ВИСНОВКИ	47
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	48

ВСТУП

Онкологічні захворювання залишаються однією з провідних причин смертності у світі [1]. Попри значний прогрес у розумінні молекулярних механізмів канцерогенезу, розробка ефективних терапевтичних підходів залишається пріоритетним напрямом біомедичних досліджень. Одним із головних викликів сучасної онкології є стійкість злоякісних клітин до апоптозу – основного механізму регульованої клітинної загибелі (РКЗ), на якому ґрунтується дія більшості хіміотерапевтичних препаратів. Крім того, класичні цитостатики часто не індукують імуногенну клітинну загибель, що обмежує активацію протипухлинної імунної відповіді [1]. Це зумовлює необхідність пошуку альтернативних агентів, здатних одночасно елімінувати пухлинні клітини та стимулювати імунну систему.

У цьому контексті зростає інтерес до зовнішньо-мембранних везикул (ЗМВ) грамнегативних бактерій як біологічної терапевтичної платформи. Завдяки природній імуногенності, можливості інженерної модифікації та здатності накопичуватися у пухлинних тканинах ЗМВ розглядаються як перспективна альтернатива традиційним хімічним носіям. Дослідження останніх років продемонстрували, що ЗМВ ефективно активують як вроджений, так і адаптивний імунітет, а також можуть бути використані для адресної доставки лікарських засобів до клітин-мішеней [2].

Паралельно з розвитком досліджень ЗМВ відбувся суттєвий прогрес у розумінні механізмів РКЗ. Нещодавно було описано ПАНоптоз – інтегративну форму РКЗ, що об'єднує піроптоз, апоптоз та некроптоз в єдиному сигнальному комплексі [3]. Одночасна активація трьох шляхів загибелі суттєво обмежує здатність пухлинних клітин розвивати резистентність, що робить ПАНоптоз привабливою мішенню для протипухлинних стратегій. Показано, що *P. aeruginosa* взаємодіє з усіма гілками ПАНоптозу через різні системи секреції та фактори вірулентності [4]. Водночас механізми впливу ЗМВ *P. aeruginosa* на РКЗ у пухлинних клітинах залишаються невивченими.

Клітинна лінія лейкозних моноцитів людини THP-1 є визнаною моделлю для вивчення імунних відповідей та механізмів лейкозу завдяки здатності диференціюватися у макрофагоподібні клітини [5]. Дослідження впливу ЗМВ на РКЗ у цій моделі може сприяти розробці нових терапевтичних підходів в онкології, зокрема поєднанню індукції імуногенної клітинної загибелі з цілеспрямованою доставкою протипухлинних препаратів.

Метою роботи було визначити формування різних типів РКЗ за використання ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 у клітинній лінії THP-1 та оцінити як змінюються рівень активності ексекторів РКЗ за появи додаткових лікарських субстанцій на ЗМВ.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Отримати та охарактеризувати ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145.
2. Відпрацювати та дослідити наповнення ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 протипухлинним препаратом доксорубіцином.
3. Ввести нативні та наповнені доксорубіцином ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 у клітинну лінію THP-1 *in vitro* та оцінити морфологію і життєздатність клітин.
4. Визначити експресію генів, відповідальних за регульовану клітинну загибель, та дослідити її зміну за рахунок наповнення ЗМВ доксорубіцином.

Наукова новизна роботи полягає у дослідженні ЗМВ *P. aeruginosa* як біологічного агенту, здатного модулювати РКЗ ракових клітин, на відміну від традиційних лікарських субстанцій, дія яких обмежується переважно апоптотичним шляхом.

Отримані результати є підґрунтям для подальшого вивчення зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* як перспективної платформи для розробки нових комбінованих підходів у терапії онкологічних захворювань.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІАЛЬНИХ ВЕЗИКУЛ ТА ЇХНЯ РОЛЬ У РЕГУЛЯЦІЇ ПРОГРАМОВАНОЇ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

1.1. Загальна характеристика позаклітинних везикул

Позаклітинні везикули (ПВ) становлять гетерогенну групу сферичних наноструктур, оточених ліпідним бішаром, які секретуються клітинами в позаклітинний простір [6]. Перші спостереження датуються 1946 роком, коли Chargaff і West виявили в плазмі крові субклітинні фракції з прокоагулянтними властивостями, що згодом були ідентифіковані як везикули. Протягом наступних десятиліть уявлення про ПВ поступово еволюціонувало від сприйняття їх як побічних продуктів клітинного метаболізму до визнання їхньої ролі в міжклітинній взаємодії [7]. Сьогодні відомо, що ПВ продукуються практично всіма доменами життя і переносять білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти, ферменти, полісахариди та токсини [8]. Вміст везикул захищений від деградації, а самі везикули циркулюють у біологічних рідинах та легко поглинаються клітинами-реципієнтами [9]. Класифікація ПВ ґрунтується на розмірі, походженні, біогенезі, шляху вивільнення, вмісті й функціях [2, 6].

В еукаріотичних клітинах розрізняють три основні підтипи ПВ. Екзосоми (30–150 нм) мають ендосомальне походження і утворюються внаслідок злиття мультивезикулярних тілець (МВТ) з плазматичною мембраною. Їх виявлено в плазмі, сечі, слині, спинномозковій рідині, грудному молоці та інших біологічних рідинах [6, 8]. Біогенез починається з інвагінації мембрани ранніх ендосом і формування інтралюмінальних везикул (ІЛВ) усередині МВТ, які потім або деградують в лізосомах, або вивільняються як екзосоми шляхом екзоцитозу [6, 8, 9, 10]. Формування ІЛВ регулюється двома механізмами: ESCRT-залежним, за участю ендосомального сортувального комплексу, необхідного для транспорту (ESCRT), що складається з субкомплексів

ESCRT-0, -I, -II, -III та допоміжних білків ALIX, TSG101, VPS4, і ESCRT-незалежним, опосередкованим нейтральною сфінгомієліназою 2 [8, 10, 11]. Також тетраспаніни (CD9, CD63, CD81) беруть участь у сортуванні карго в обох шляхах [10, 11]. Хоча молекулярний склад екзосом відображає профіль клітини-продуцента, їхніми універсальними маркерними білками є тетраспаніни, флотилін, TSG101, ALIX та білки теплового шоку HSP70 і HSP90 [6, 10, 11]. Мікровезикули (100–1000 нм) формуються шляхом прямого брунькування плазматичної мембрани і містять переважно цитозольні й мембрано-асоційовані білки, тетраспаніни, цитоскелетні білки та інтегрини [2, 6]. Апоптотичні тільця (50–5000 нм) вивільняються під час РКЗ внаслідок підвищення гідростатичного тиску. Вони містять інтактні органели, хроматин, гістони та мітохондріальні білки, а їхній протеомний профіль наближений до клітинного лізату [6, 8].

ПВ задіяні в підтримці гомеостазу, ремоделюванні тканин, мієлінізації, рості нейритів і метаболічній регуляції, а також у патологічних станах: ракові клітини транспортують ними онкогенний вантаж, а при нейродегенеративних захворюваннях везикули переносять β -амілоїд, α -синуклеїн і мутантну SOD1 [6, 9, 10]. Оскільки склад ПВ відображає стан клітини-джерела, їх розглядають як біомаркери для рідинної біопсії при онкологічних, нейродегенеративних і серцево-судинних захворюваннях, а здатність долати гематоенцефалічний бар'єр, неімуногенність і можливість інженерної модифікації роблять ПВ перспективною платформою для цілеспрямованої доставки ліків [6, 9, 10].

Секреція везикул виявлена і в рослин. Рослинні везикули мають розмір 50–1000 нм і забезпечують міжклітинний транспорт біоактивних карго, ремоделювання клітинної стінки та захист від патогенів [12]. Відомі щонайменше три шляхи біогенезу рослинних везикул: секреція TET8/TET9-асоційованих везикул із MBT (аналог шляху екзосом ссавців), формування PEN1-позитивних везикул та утворення везикул з екзоцист-позитивних органел (EXPO) [12]. Рослинні везикули демонструють

протипухлинний та терапевтичний потенціал і не містять зоонозних патогенів, на відміну від ПВ ссавців [12].

1.2. Будова, біогенез та склад зовнішньо-мембранних везикул грамнегативних бактерій

Бактеріальні ПВ є одним з найактуальніших напрямків сучасної мікробіології. Систематичний аналіз 845 публікацій за 2015–2021 роки засвідчив стрімке зростання кількості досліджень, з яких 65% присвячені функціям цих наноструктур [13]. Перші спостереження бактеріальних везикул датуються 1960-ми роками, коли було виявлено округлі мембранні структури, що походили від зовнішньої мембрани *Vibrio cholerae*. Проте активне вивчення їхнього біогенезу та функцій розпочалося лише в останні десятиліття [8, 14].

Найбільш дослідженим типом бактеріальних везикул є ЗМВ – нанорозмірні сферичні структури діаметром 20–400 нм з ліпідно-білковою будовою, що містять компоненти периплазматичного простору [15, 16]. ЗМВ продукуються всіма грамнегативними бактеріями, як патогенними, так і непатогенними, у різноманітних середовищах: у прісній та солоній воді, біоплівках, всередині еукаріотичних клітин та в організмі ссавців [14, 15].

Оболонка грамнегативних бактерій складається з двох мембран, зовнішньої та цитоплазматичної, які розділені периплазматичним простором із шаром пептидоглікану [15, 16]. Зовнішня мембрана утворена внутрішнім шаром фосфоліпідів та зовнішнім шаром ліпополісахариду (ЛПС), який включає ліпід А, кор-олігосахарид та О-бічний ланцюг (О-антиген). Пептидоглікановий шар надає клітинам форми і забезпечує захист від осмотичних змін та механічного стресу [14, 15, 16].

Грамнегативні бактерії секретують три типи везикул: класичні ЗМВ, що утворюються шляхом нелітичного брунькування зовнішньої мембрани; зовнішньо-внутрішньомембранні везикули (З-ВМВ), які формуються шляхом

спільного вивільнення обох мембран; та вибухові везикули зовнішньої мембрани (В-ЗМВ), що виникають внаслідок літичного вивільнення. Серед них класичні ЗМВ є переважаючим типом [2, 17].

Утворення класичних ЗМВ відбувається шляхом брунькування, під час якого зовнішня мембрана вивільняється від підлеглого пептидоглікану, випинається назовні та відділяється з формуванням везикули [15, 18]. Для пояснення цього процесу запропоновано кілька взаємодоповнювальних моделей.

Перша модель пов'язує біогенез ЗМВ з локальним послабленням перехресних зв'язків між зовнішньою мембраною та пептидогліканом, які у нормі забезпечуються ліпопротеїном Брауна (Lpp), білком зовнішньої мембрани A (OmpA) та комплексом Tol–Pal. У ділянках зі зниженою кількістю цих зв'язків мембрана випинається й відбруньковується [14, 15, 16]. Друга модель описує утворення ЗМВ унаслідок накопичення фрагментів пептидоглікану та неправильно згорнутих білків у периплазмі, які чинять тургорний тиск на зовнішню мембрану, що спричиняє її деформацію та вивільнення ЗМВ [14, 16, 19]. Третя модель пов'язана із системою VacJ/YRB типу ABC, яка транспортує фосфоліпіди до зовнішньої мембрани. Порушення її роботи призводить до накопичення фосфоліпідів на зовнішньому листку та підвищеної секреції ЗМВ [2, 16]. Додатково, деацитування аніонного ЛПС збільшує продукцію ліпідів конусоподібної форми, що підвищує кривизну мембрани та посилює везикуляцію [16].

Окрім брунькування, ЗМВ можуть утворюватися шляхом вибухового клітинного лізису. Цей механізм спочатку відкрили у *P. aeruginosa*, а згодом підтвердили у *Escherichia coli* та *Shewanella vesiculosa* [18]. Вибуховий лізис запускається фаг-похідним ендолізином, який руйнує пептидоглікан. Після цього клітина округлюється і лізується, а мембранні фрагменти самоорганізуються у В-ЗМВ [18, 20]. Дослідження В-ЗМВ у природних середовищах, зокрема у відкритому океані, показали, що ці везикули містять повні вірусні послідовності ДНК, а профаги значно стимулюють їх

утворення [20]. Третій тип, 3-ВМВ, вперше охарактеризований у *S. vesiculosa* М7 і відрізняється наявністю двох мембранних бішарів з пептидогліканом між ними, завдяки чому такі везикули містять як периплазматичний, так і цитоплазматичний вміст, включно з ДНК [8, 20]. Частка 3-ВМВ серед загальної кількості везикул є варіабельною: від 0,1% у *S. vesiculosa* до 49% у *Pseudoalteromonas marina* [20].

Склад 3МВ не є випадковим. Оскільки везикули формуються із зовнішньої мембрани, їх основними структурними компонентами є фосфоліпіди, ЛПС, білки зовнішньої мембрани та периплазматичні білки, що захоплюються під час брунькування; при цьому відносна кількість насичених жирнокислотних ланцюгів у 3МВ вища, ніж у зовнішній мембрані, що надає везикулам більшої жорсткості [14, 16, 17]. Окрім мембранних компонентів, у 3МВ виявлено ДНК хромосомного, плазмідного та фагового походження, різні типи РНК (мРНК, тРНК, рРНК, некодуючі РНК), ферменти та вторинні метаболіти [2, 8]. Порівняльний аналіз фракцій зовнішньої мембрани та 3МВ продемонстрував їх відмінне збагачення білками й ліпідами, що вказує на наявність специфічних механізмів сортування [19]. Протеомний профіль 3МВ також залежить від механізму біогенезу: везикули, утворені шляхом брунькування, збагачені білками зовнішньої мембрани, тоді як В-3МВ містять більше внутрішньоклітинних білків та ДНК внаслідок вивільнення цитоплазматичного вмісту під час лізису [18].

Умови середовища суттєво впливають на інтенсивність продукції 3МВ. Везикуляція функціонує як відповідь на стрес оболонки і сприяє виживанню бактерій за несприятливих умов [15]. Підвищення температури у *E. coli* та *P. aeruginosa* збільшує текучість мембрани й рівень продукції 3МВ [2, 15]. Оксидативний стрес також запускає продукцію 3МВ, збагачених стрес-індукованими молекулами. Зокрема, обробка *P. aeruginosa* пероксидом водню та *Staphylococcus aureus* ципрофлоксацином значно підвищувала везикуляцію [2, 15]. Осмотичний стрес має видоспецифічну дію, що впливає на натяг мембрани. У деяких бактерій високий осмотичний тиск призводить

до потовщення клітинної стінки та зниження секреції ЗМВ, в інших, навпаки, підвищує везикуляцію [2]. Накопичення неправильно згорнутих білків у периплазмі активує стресову відповідь оболонки та стимулює продукцію ЗМВ як механізм їх видалення [15]. Добре вивченим тригером є антибіотики, які стимулюють продукцію ЗМВ щонайменше трьома механізмами: через стрес клітинної оболонки, індукцію SOS-відповіді та інгібування біосинтезу клітинної стінки [20]. У патогенної *E. coli* O157:H7 антибіотики спричиняють не лише синтез токсину Шига, а й його поширення через ЗМВ, що ускладнює лікування пацієнтів [20]. Крім того, ЗМВ антибіотикорезистентних штамів можуть переносити білки стійкості до антибіотиків, які чутливі бактерії використовують як захист. Це було продемонстровано у *E. coli*, стійкої до β -лактамних антибіотиків, і є одним з механізмів горизонтального поширення антибіотикорезистентності [8]. Доступність поживних речовин, кворум-сенсинг і тип росту також впливають на склад та кількість ЗМВ [18].

Важливою складовою вмісту ЗМВ патогенних бактерій є фактори вірулентності (токсини, адгезини та ферменти), які селективно упаковуються у везикули для цілеспрямованої доставки в клітини хазяїна [2, 18]. ЗМВ доставляють свій вміст безпосередньо в цитоплазму клітини-мішені у повністю згорнутій, ферментативно активній формі, готовій до негайної дії [21]. Інкапсуляція у везикули підвищує не тільки стабільність, а й ефективність токсинів: наприклад, олігомерні комплекси цитотоксину ClyA у складі ЗМВ демонструють вищу цитотоксичність порівняно з вільною формою [16].

Проникнення ЗМВ у клітини хазяїна відбувається двома основними шляхами: через ендоцитоз і шляхом прямого злиття з мембранами [16, 19]. Ендоцитоз охоплює макропіноцитоз, клатрин-опосередкований, кавеолін-опосередкований та клатрин- і кавеолін-незалежний шляхи [11, 16]. Шлях інтерналізації залежить від розміру везикул: дрібніші ЗМВ (20–100 нм) потрапляють у клітини переважно через кавеолін-опосередкований ендоцитоз, тоді як більші (90–450 нм) – через макропіноцитоз [16].

Хоча тривалий час вважалося, що продукція позаклітинних везикул характерна переважно для грамнегативних бактерій, згодом було показано, що грампозитивні бактерії також активно вивільняють везикули як нормальне фізіологічне явище [8, 22]. Оскільки грампозитивні бактерії не мають зовнішньої мембрани, їхні везикули походять із цитоплазматичної мембрани і називаються везикулами цитоплазматичної мембрани (ВЦМ). Їх формування відбувається шляхом ліпідного ремоделювання мембрани та послаблення пептидоглікану за участю аутолізинів і пеніцилін-зв'язуючих білків. ВЦМ позбавлені ЛПС, натомість містять ліпотейхоєві кислоти та характерний набір імуномодуляторних білків і метаболітів [8, 17].

1.3. Особливості біогенезу та складу зовнішньо-мембранних везикул

P. aeruginosa

P. aeruginosa є одним з найбільш вивчених модельних організмів у дослідженні ЗМВ. Окрім загальних механізмів біогенезу, цей вид має унікальний видоспецифічний шлях везикуляції, опосередкований сигнальною молекулою кворум-сенсингу хіноліновий сигнал Р. (PQS, 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон) [20, 23]. PQS є високогідрофобною молекулою, яка вбудовується у зовнішній листок зовнішньої мембрани та зв'язується з ЛПС, порушуючи взаємодію двовалентних катіонів Mg^{2+} і Ca^{2+} з ліпідом А. Це спричиняє асиметричне розширення зовнішнього листка, зміну кривизни мембрани та відбруньковування ЗМВ [14, 23]. Мутант *pqsA* з дефектним синтезом PQS демонстрував 10-кратне зниження продукції ЗМВ, яке відновлювалося після обробки синтетичним хінолоном. Крім цього, екзогенно додана PQS стимулює везикуляцію і в інших грамнегативних бактеріях [14, 15, 19]. Водночас мутант *pqsA* продовжував продукувати везикули, що свідчить про одночасну роботу кількох механізмів біогенезу ЗМВ [23].

На везикуляцію *P. aeruginosa* також впливає структура ЛПС. Цей вид експресує два варіанти О-антигену – нейтральний спільний полісахаридний антиген (CPA) та негативно заряджений О-специфічний антиген (OSA), і збільшення частки OSA у зовнішній мембрані сприяє вивільненню ЗМВ через електростатичне відштовхування між молекулами ЛПС, що підтверджується підвищеною продукцією везикул у мутанта, здатного синтезувати лише OSA ЛПС [14, 16]. Ліпідний склад ЗМВ *P. aeruginosa* відрізняється від складу зовнішньої мембрани вищим вмістом фосфатидилгліцеролу та довших насичених жирних кислот, що надає везикулам більшої ригідності і свідчить про формування ЗМВ на жорсткіших ділянках мембрани [14, 15]. Окрім брунькування та PQS-опосередкованої везикуляції, *P. aeruginosa* продукує ЗМВ шляхом вибухового клітинного лізису, який запускається SOS-відповіддю на пошкодження ДНК та опосередковується ендолізином. Попри загибель частини популяції, утворені В-ЗМВ здатні нейтралізувати антимікробні агенти, бактеріофаги та фактори захисту хазяїна [20].

ЗМВ *P. aeruginosa* несуть широкий набір факторів вірулентності: ферменти деградації (протеази, еластази, фосфоліпази, β -лактамази), пороутворювальний гемолізін, специфічні токсини (зокрема CFTR-інгібуючий фактор (Cif)) та молекули кворум-сенсингу [8, 19, 21]. Доставка цих факторів через ЗМВ є значно ефективнішою за вплив вільних білків. Наприклад, Cif у складі ЗМВ виявився у 17 000 разів активнішим, і його дія залежала від цілісності везикул [21]. Окрім білкового вантажу, ЗМВ містять селективно упаковані малі некодуючі РНК, зокрема, sRNA-52320 після доставки в епітеліальні клітини дихальних шляхів функціонує подібно до мікроРНК, пригнічуючи секрецію прозапальних цитокінів та послаблюючи вроджену імунну відповідь хазяїна [16, 24].

1.4. Функції та терапевтичний потенціал зовнішньо-мембранних везикул

ЗМВ є ключовими медіаторами взаємодії бактерій з навколишнім середовищем та організмом хазяїна, залученими до патогенезу, міжклітинної комунікації, горизонтального перенесення генів, набуття поживних речовин, формування біоплівки та модуляції імунної відповіді хазяїна [2, 14, 20]. Функції ЗМВ значною мірою визначаються механізмом їх біогенезу: перенесення ДНК та антимікробна активність переважно асоціюються з В-ЗМВ та З-ВМВ, які містять цитоплазматичні компоненти [18, 20].

Оскільки мембранний склад везикул ідентичний зовнішній мембрані клітини-продуцента, ЗМВ слугують «приманками» для антимікробних агентів, зв'язуючи і нейтралізуючи антимікробні пептиди, антитіла та бактеріофаги [2, 16, 20]. Деякі бактерії додатково секретують у складі ЗМВ ферменти, що здатні деградувати антибіотики, зокрема β -лактамази [19]. Везикули також є інструментами мікробної конкуренції: ЗМВ *P. aeruginosa* здатні знищувати як грамнегативних, так і грампозитивних конкурентів [18, 19]. ЗМВ забезпечують горизонтальне перенесення генів (везидукцію), транспортуючи плазмідні та гени стійкості до антибіотиків між бактеріями; а ДНК у їх складі є стійкою до зовнішніх нуклеаз [2, 16]. Окрім цього, ЗМВ виконують структурну функцію у формуванні біоплівки, забезпечуючи їх цілісність та обмін біосполуками в межах бактеріальних спільнот [2, 20].

ЗМВ патогенних бактерій забезпечують доставку факторів вірулентності, захищаючи їх від протеаз хазяїна [16]. Токсини та ферменти у складі ЗМВ руйнують тканинні бар'єри, сприяючи інвазії [2], та пригнічують автофагію, підтримуючи хронічні інфекції [16]. ЗМВ також переносять некодуючі РНК, послідовності яких відповідають міжгенним ділянкам ДНК людини і здатні спричиняти епігенетичні зміни в транскрипції хазяїна [19]. Важливою є здатність ЗМВ перетинати бар'єри організму, зазвичай непроникні для клітин: Їх виявлено у сироватці крові пацієнтів із запальними захворюваннями

кишківника, а ЗМВ *H. pylori* здатні досягати мозку, де їх інтерналізація астроцитами призводить до нейрональної дисфункції та когнітивного зниження, характерних для хвороби Альцгеймера [17].

Проникнення ЗМВ через біологічні бар'єри та їхній молекулярний склад зумовлює і взаємодію з імунною системою хазяїна. Завдяки біосумісності, високій імуногенності, стабільності та здатності бути інженерно модифікованими, ЗМВ розглядаються як інструмент протиракової терапії, контролю інфекцій та розробки вакцин [2, 19, 20]. Через наявність патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMP) (ЛПС, флагеліну) ЗМВ розпізнаються позаклітинними Toll-подібними рецепторами (TLR) дендритних клітин, макрофагів та нейтрофілів, а також рецептором NOD1, що зумовлює прозапальну дію. Крім того, ЗМВ переносять молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням (DAMP), додатково стимулюючи вроджений і адаптивний імунітет [2, 16, 25]. Зокрема, ЗМВ *P. aeruginosa* активують TLR-4, підвищуючи експресію цитокінів IL-1 β , IL-6, TNF- α та MIP-2 [16, 19]. Після ендоцитозу пептидогліканові компоненти розпізнаються NOD1, запускаючи ядерний фактор κ B (NF- κ B)-залежне запалення та автофагію [25], а доставка ЛПС у цитозоль макрофагів активує каспазо-11-опосередковані відповіді, піропtotичну загибель клітин через розщеплення газдерміну D (GSDMD) та продукцію запальних цитокінів [2, 26]. На рівні адаптивного імунітету дендритні клітини поглинають ЗМВ і презентують їхній вантаж CD4⁺ Т-клітинам, стимулюючи антиген-специфічні В-клітинні відповіді та формування імунної пам'яті [2, 17, 25].

ЗМВ виконують подвійну роль в імунній регуляції: везикули коменсала *B. fragilis* через TLR2-залежне розпізнавання капсульного полісахариду стимулюють регуляторні Т-клітини та продукцію IL-10, забезпечуючи захист від коліту, тоді як ЗМВ *B. thetaiotaomicron* можуть ініціювати кишкове запалення [15, 25]. Водночас ЗМВ патогенів *H. pylori* та *N. meningitidis* несуть фактори, що пригнічують імунну відповідь або запускають апоптоз імунних клітин [2].

Здатність ЗМВ взаємодіяти з клітинами-мішенями та захищати люмінальний вміст від деградації робить їх перспективними носіями антибіотиків та терапевтичних молекул. Завантажені ципрофлоксацином ЗМВ продемонстрували ефективність у моделях інфекції *Shigella* [2, 27]. Суттєвою складовою терапевтичного потенціалу є цитотоксична активність ЗМВ. Доставляючи ліпіди, білки та полісахариди, вони активують поверхневі та цитозольні рецептори й індукують піроптоз або апоптоз через формування інфламасоми й апоптосоми, а порушення мітохондріальної цілісності або вивільнення токсинів запускає внутрішній апоптотичний шлях [26].

Особливу увагу привертає застосування ЗМВ для подолання резистентності до протиракової терапії [28]. Наноплатформа на основі ЗМВ *E. coli* (Δ msbB) для доставки доксорубіцину та CD47-siRNA при гліобластомі забезпечує подолання гематоенцефалічного бар'єру та перепрограмування імунних клітин ЦНС [28]. Системне введення siRNA-упакованих ЗМВ спричиняє таргетне пригнічення генів і регресію пухлин, а везикули накопичуються у пухлинних тканинах та стимулюють продукцію CXCL10 та IFN- γ [15, 16]. Розроблено також трансдермальну наноплатформу для терапії меланоми на основі ЗМВ *E. coli*, модифікованих лігандом до інтегрину $\alpha\upsilon\beta3$ та індоціаніновим зеленим, де фототермічний ефект спричиняє вивільнення ліганду смерті TRAIL з активацією апоптозу пухлинних клітин [2]. Платформа OMV-NICE на основі ЗМВ *E. coli* Nissle 1917 з подвійною кон'югацією нанотіл проти CD47/SIRP α та PD-1/PD-L1 (конструкція SpyCatcher/SnoopCatcher) забезпечила синергістичне посилення фагоцитозу макрофагів і цитотоксичності Т-клітин у моделі меланоми B16-F10 [29], а бактеріальні везикули з IFN- γ перепрограмують пухлино-асоційовані макрофаги M2 в M1 через NF- κ B/JAK-STAT із синергізмом у комбінації з анти-PD-1 [30]. ЗМВ також слугують біомаркерами для моніторингу пухлинної прогресії та раннього виявлення нейродегенеративних захворювань [8, 11], хоча маніпулювання їх біогенезом потребує обережності через побічні ефекти на здорові тканини, а масштабування виробництва та клінічне впровадження

залишається викликом [2, 11, 27].

Нереплікативна природа, здатність імітувати імуногенні властивості бактерії-продуцента та нанорозмір, який забезпечує проникнення у лімфатичні судини та поглинання антигенпрезентуючими клітинами, роблять ЗМВ привабливою вакцинною платформою з природними ад'ювантними властивостями [16, 19]. Інженерне конструювання через генетичну модифікацію, хімічне зв'язування та глікоінженерію дозволяє експресувати ненативні антигени на поверхні ЗМВ [17, 31]. Для подолання гіперекспресії PD-L1 у пухлинному мікрооточенні розроблено платформу APSE – ЗМВ, модифіковані α PD-L1, які поєднують доставку пухлинних антигенів з відновленням функції CD80 [32]. Оскільки нативні ЗМВ продукуються у недостатніх кількостях, застосовують детергентну екстракцію або генетичні маніпуляції з отриманням GMMA (Generalized Modules for Membrane Antigens) [33]. Наразі ліцензованими ЗМВ-вакцинами є препарати проти менінгококового менінгіту типу В та *H. influenzae* типу b, а ряд кандидатів проходить клінічні випробування, включно з вакциною проти COVID-19 [16, 33]. Серед основних обмежень – варіабельність між партіями та токсичність ЛПС-компонентів, що може регулюватися генетично або детергентною екстракцією [2, 31].

Отже, поєднання природних механізмів доставки молекулярного вантажу, імуномодуляторної активності та можливості інженерної модифікації робить ЗМВ перспективним напрямом сучасної біомедицини. Подальші дослідження їх біогенезу, складу та взаємодії з клітинами-мішенями відкривають можливості для розробки нового покоління таргетних терапевтичних і вакцинних засобів.

1.5. ПАНоптоз як інтегративна форма регульованої клітинної загибелі

Імунна система організму сформувала численні механізми для боротьби з

інфекціями та регуляції запальних реакцій, серед яких РКЗ є однією з ключових ліній захисту вродженого імунітету. РКЗ – це генетично регульований процес, спрямований на підтримку клітинного гомеостазу, елімінацію патогенів і відповідь на стресові чинники. Піроптоз, апоптоз та некроптоз є найбільш дослідженими шляхами РКЗ зі специфічними молекулярними механізмами та морфологічними ознаками [3, 4, 34].

За фізіологічних умов апоптоз є основною незапальною формою клітинної смерті, що відіграє центральну роль в ембріональному розвитку, тканинному гомеостазі та функціонуванні імунної системи [34, 35, 36]. На відміну від некроптозу та піроптозу, він є «нелітичною» формою загибелі, що характеризується зменшенням об'єму клітини, конденсацією хроматину, фрагментацією ДНК та утворенням апоптотичних тілець зі збереженням цілісності мембрани [3, 35, 37]. Апоптоз реалізується через зовнішній (рецепторний) та внутрішній (мітохондріальний) шляхи, які збігаються на активації ефекторних каспаз-3/-7, що розщеплюють понад 1000 субстратів і призводять до фрагментації ДНК та руйнування ядра й цитоскелету [35, 36]. Зовнішній шлях ініціюється зв'язуванням лігандів смерті (FasL, TNF- α , TRAIL) з відповідними рецепторами, формуванням сигнального комплексу, що індукує смерть (DISC) та активацією каспази-8, яка залежно від типу клітини або безпосередньо активує ефекторні каспази-3/-7, або залучає мітохондріальний шлях через розщеплення Bid до tBid [35, 36, 37]. Внутрішній шлях активується стресовими сигналами, а його ключовою подією є пермеабілізація зовнішньої мітохондріальної мембрани, регульована білками Bcl-2 та Bax, що супроводжується вивільненням цитохрому c, формуванням апоптосом та активацією каспази-9 [35, 36, 37]. Окрім цього, існує перфторин/гранзимовий механізм, який використовують цитотоксичні Т-лімфоцити та NK-клітини [35]. За певних умов апоптоз здатний індукувати запальні відповіді – через перемикання на некроптоз при інгібуванні каспази-8 або вивільнення DAMP за вторинного некрозу [3].

Піроптоз є запальною та літичною формою РКЗ, що забезпечує

елімінацію внутрішньоклітинних патогенів та індукує імуногенну загибель клітин зі стимуляцією протипухлинного імунітету. Він характеризується набуханням клітини, розривом мембрани та вивільненням прозапальних цитокінів IL-1 β та IL-18 [38, 39]. В його основі лежить протеолітична активація газдермінів (GSDMD, GSDMA-E, PJVK), що формують мембранні пори діаметром 20–22 нм. Канонічний шлях реалізується через збирання інфламасоми (NOD-подібний рецепторний білок 1 та 3 (NLRP1, NLRP3), NLRC4, AIM2 (Absent in Melanoma 2), Pyrin) та активацію каспази-1, яка розщеплює GSDMD і процесує про-IL-1 β /IL-18; неканонічний шлях залучає каспази-4/5, що безпосередньо зв'язують цитозольний ЛПС і розщеплюють GSDMD [38, 39]. Фінальний розрив мембрани є не пасивним осмотичним процесом, а опосередковується білком NINJ1 [38, 39].

Некроптоз – генетично регульована запальна РКЗ, що морфологічно нагадує некроз і слугує «резервним» механізмом протиінфекційного захисту при блокуванні апоптозу патогенами [40, 41]. Його центральними медіаторами є рецептор-взаємодіючі серин/треонінові протеїнкінази 1 та 3 (RIPK1, RIPK3) та псевдокіназа змішаної лінії кіназного домену (MLKL), що формують некросому. Класичний шлях ініціюється через TNFR1, а ключовою умовою є інгібування каспази-8, що дозволяє RIPK1 рекрутувати RIPK3 через мотив гомотипічної взаємодії RIP (RHIM)-взаємодії [4, 40, 41]. RIPK3 фосфорилує MLKL, яка транслокується до мембрани та формує катіон-проникні пори. Як і при піроптозі, фінальний розрив мембрани потребує NINJ1 [40, 41]. Некроптоз може індукуватися й незалежно від RIPK1 – через TRIF або Z-ДНК-зв'язувальний білок 1 (ZBP1), які безпосередньо активують RIPK3 [41].

Апоптоз, піроптоз та некроптоз демонструють значний перетин молекулярних механізмів: апоптоз і піроптоз залежать від каспаз різних підтипів, тоді як піроптоз і некроптоз потребують порутворювальних білків GSDMD та MLKL відповідно і супроводжуються запальною відповіддю [3, 42]. Як свідчать нещодавні дослідження, кожен з них здатний до перехресної взаємодії з іншими шляхами клітинної загибелі, формуючи

новий вид РКЗ – ПАНоптоз (від англ. «P» – Pyroptosis, «A» – Apoptosis, «N» – Necroptosis; «optosis» – форма регульованої клітинної загибелі) [34].

ПАНоптоз – це високоскоординований процес, який інтегрує ключові елементи піроптозу, апоптозу та некроптозу в єдиному сигнальному комплексі: сукупність біологічних ефектів не може бути пояснена жодним із цих шляхів окремо, а інгібування одного каскаду компенсується активацією альтернативних шляхів, що забезпечує надійну реалізацію клітинної загибелі у відповідь на патогенні або стресові стимули. [3, 4, 34]. Концепція ПАНоптозу бере початок у 2016 році, коли команда професора Каннеганті продемонструвала, що ZBP1 розпізнає нуклеопротеїн вірусу грипу А та синергічно індукує апоптоз, некроптоз і піроптоз у макрофагах, а у 2019 році було ідентифіковано ПАНоптосому – мультипротеїновий комплекс, що інтегрує ефектори всіх трьох модальностей клітинної загибелі [3, 4, 34].

Ініціація збирання ПАНоптосоми відбувається через активацію рецепторів розпізнавання патернів (PRR), які розпізнають PAMP, DAMP, прозапальні цитокіни та інтерферони [3, 42, 43]. ПАНоптосома має модульну будову з трьох функціональних блоків, що послідовно забезпечують трансдукцію сигналу від розпізнавання загрози до літичної клітинної загибелі: сенсори (ZBP1, AIM2, NLRP3), адапторні білки (ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD), Fas-асоційований білок з доменом смерті (FADD)) та каталітичні ефектори (RIPK1, RIPK3, CASP1, CASP8) [3, 34]. Збирання комплексу опосередковується домен-специфічними взаємодіями (CARD, DEATH, DED, PYD, RHIM), специфічними щодо тригера, часу та типу клітин [3, 34, 43]. Сенсорні білки розпізнають специфічні молекулярні патерни та визначають, який підтип ПАНоптосоми буде сформовано: цитозольний ZBP1 розпізнає Z-нуклеїнові кислоти вірусного походження через Zα-домени та через RHIM-взаємодію рекрутує RIPK3, формуючи центральне ядро комплексу [3, 4, 34, 42]; AIM2 розпізнає цитозольну дсДНК і через піриновий домен рекрутує ASC, активуючи каспазу-1 [3, 4]; сенсори інфламасом (NLRP3, NLRC4, Pyrin) сприяють процесингу прозапальних цитокінів та ініціації

піроптозу [3]; RIPK1 визначає баланс між виживанням та загибеллю клітини [4]. Адапторні білки слугують структурними містками між сенсорами та ефекторами, забезпечуючи поширення активаційного сигналу [3]: ASC містить PYD-домен для взаємодії з сенсорами та CARD-домен для рекрутування каспази-1, формуючи характерні ASC-агрегати, тоді як FADD з'єднує RIPK1 через DED-домен з каспазою-8 [3, 4, 42]. Ефекторні молекули безпосередньо виконують програму клітинної загибелі: каспаза-1 спеціалізується на розщепленні GSDMD та вивільненні цитокінів [3, 4, 42], а каспаза-8 функціонує як ключовий молекулярний перемикач – в активному стані ініціює апоптоз і пригнічує некроптоз через інактивацію RIPK1/RIPK3, тоді як її відсутність посилює некроптозну вісь, причому каспаза-8 здатна й безпосередньо розщеплювати GSDMD [3, 4, 34, 42, 43]. Каспаза-6 підсилює взаємодію між ZBP1 та RIPK3 [3, 4], RIPK1 і RIPK3 динамічно визначають долю клітини та через NF-κB-сигналізацію посилюють експресію NLRP3 [3, 4, 42], а MLKL є кінцевим виконавцем некроптозу та спричиняє розрив плазматичної мембрани [3].

Наразі ідентифіковано чотири підтипи ПАНоптосом з унікальними механізмами активації. ZBP1-залежна ПАНоптосома, вперше описана при інфекції вірусом грипу А, об'єднує ZBP1, RIPK3, RIPK1, каспази-6, -8 та -1, ASC і NLRP3; після розпізнавання вірусної Z-РНК ZBP1 рекрутує RIPK3 і каспазу-8, активує інфламасому NLRP3/каспази-1 та запускає ПАНоптоз [3, 4, 42, 43]. AIM2-опосередкована ПАНоптосома, описана при інфекціях *Francisella novicida* та HSV1, включає AIM2, Pyrin, ZBP1, ASC, каспази-1 та -8, RIPK3, RIPK1 і FADD; за умови кількох сигналів небезпеки AIM2 кооперується з Pyrin та ZBP1 у мультисенсорний комплекс [4, 34, 43]. RIPK1-регульована ПАНоптосома активується при інфекціях *Yersinia*, ефектори якої інгібують кіназу TAK1, вивільняючи RIPK1 для формування комплексу з RIPK3, NLRP3, ASC, каспазою-8 та FADD; її збирання залежить від фосфатазного комплексу протеїнфосфатази 6 [3, 4]. NLRP12-асоційована ПАНоптосома активується гемолітичними та запальними сигналами (вільний

гем, TNF, PAMP) і реалізується через NLRP12, NLRP3, ASC, RIPK3 та каспазу-8 [4, 43].

Прогресія ПАНоптозу регулюється кількома сигнальними шляхами вищого порядку: мітохондріальні пошкодження з вивільненням мтДНК активують ZBP1-залежний ПАНоптоз [3], інтерферон-регуляторний фактор 1 (IRF1) функціонує як транскрипційний регулятор ZBP1 [3, 34], а інгібування TAK1, який за нормальних умов підтримує клітинний гомеостаз, блокуючи синтез TNF та пригнічуючи RIPK1, призводить до автофосфорилування RIPK1 і збирання ПАНоптосом (RIPK1/каспаза-8/ASC/FADD) [3, 42, 43].

Численні чинники, зокрема інфекції, пошкодження тканин та власні дефекти клітин, можуть запускати ПАНоптоз. Серед інфекційних тригерів ПАНоптозу особливе місце посідають бактеріальні патогени. ЛПС активує інфламасоми через TLR-4 [4]. У дослідженні Christgen [44] стимуляція макрофагів ЛПС призводила до одночасної активації піроптозу, апоптозу та некроптозу з формуванням комплексу RIPK1/NLRP3/ASC/CASP8/FADD. Інфекція *Yersinia* індукує ZBP1-незалежну ПАНоптосому через TNFR/TLR-4 та інгібування TAK1 [34]. *Salmonella* і *Listeria* також реалізують повноцінний ПАНоптоз, і лише одночасна втрата каспаз-1, -11, -8 та RIPK3 значно захищає клітини від загибелі [43]. Деякі патогени виробили механізми протидії: ентеропатогенна *E. coli* через T3SS-ефектори NleB, NleF та EspL блокує всі три шляхи загибелі [42]. *P. aeruginosa* демонструє особливо широку взаємодію з усіма гілками ПАНоптозу через системи секреції T2SS, T3SS та T6SS, індукуючи апоптоз через ефектори T3SS та екзотоксин А, піроптоз – через флагелін, а некроптоз – через кворум-сенсингову систему [4].

Важливу роль у запуску клітинної смерті відіграють і бактеріальні позаклітинні везикули. Везикули *S. aureus* індукують мітохондріальне пошкодження та апоптоз [4], ЗМВ *M. catarrhalis* доставляють ліпоолігосахарид у цитоплазму макрофагів, запускаючи GSDMD-залежний піроптоз та секрецію IL-1 β /IL-18 [45], а ЗМВ *N. gonorrhoeae* доставляють білок PorB до мітохондрій для індукції апоптозу [4]. Особливий інтерес становлять везикули *F. nucleatum*,

які доставляють Z-нуклеїнові кислоти в макрофаги та активують ZBP1-ПАНоптосому, одночасно запускаючи GSDME-опосередкований піроптоз, каспаза-3-залежний апоптоз та MLKL-опосередкований некроптоз. Нокдаун ZBP1 значно знижував усі три шляхи загибелі, що підтверджує центральну роль ZBP1 у цьому процесі [46]. Серед вірусних тригерів найбільш вивченим є вірус грипу А, а грибкові патогени (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*) активують лектинові рецептори С-типу із залученням SYK, що ймовірно сприяє ПАНоптозу [34, 42].

Окрім інфекційних тригерів, порушення регуляції ПАНоптозу пов'язане з широким спектром захворювань. Зокрема, ZBP1-опосередкований ПАНоптоз задіяний у перебігу COVID-19, а сам процес причетний до патогенезу запальних захворювань кишечника, остеопорозу та нейродегенеративних хвороб [34].

В онкогенезі ПАНоптоз відіграє подвійну роль: він сприяє елімінації злоякісних клітин, але його гіперактивація може формувати імуносупресивне мікрооточення [3]. Комплексний аналіз Cai [1] восьми компонентів ПАНоптосом у 33 типах пухлин показав, що високі значення індексу PANo-RPI позитивно корелюють з інфільтрацією цитотоксичних Т-клітин, НК-клітин та дендритних клітин і кращою відповіддю на інгібітори імунних контрольних точок. Терапевтичний потенціал ПАНоптозу в онкології визначається можливістю одночасної активації трьох шляхів загибелі, що суттєво обмежує здатність пухлинних клітин розвивати резистентність. Ключовими мішенями для терапевтичного модулювання є каспази, NLRP3, RIPK1 та RIPK3, цілеспрямований вплив на які дозволяє підсилювати імуногенну клітинну загибель та активувати протипухлинний імунітет [47]. Активація ПАНоптозу в пухлинних клітинах спричиняє вивільнення DAMP, що сприяє дозріванню дендритних клітин, поляризації макрофагів у M1-фенотип та посиленню інфільтрації клітинами вродженого і адаптивного імунітету, перетворюючи «холодні» пухлини на «гарячі», чутливі до імунотерапії [3]. Комбінація індукторів ПАНоптозу з інгібіторами імунних

контрольних точок додатково підвищує ефективність лікування завдяки збільшенню експресії PD-L1 та пригніченню імуносупресивних факторів. Особливу перспективу становлять наночастинкові платформи, які забезпечують адресну індукцію ПАНоптозу безпосередньо в мікрооточенні пухлини [3, 47]. Серед конкретних підходів описано кілька стратегій: дефіцит цистеїн-десульфурази NFS1 підвищує чутливість клітин колоректального раку до оксалиплатину; інгібітор CDK1 кукурбітацин Е запускає ZBP1-залежний ПАНоптоз у клітинах адренкортикальної карциноми; делеція ADAR1 у мієлоїдних клітинах забезпечує резистентність мишей до колоректального раку та меланоми [3, 34].

Перспективним прикладом є комбінація ЗМВ *F. nucleatum* (Fn-ЗМВ) з онколітичним вірусом простого герпесу першого типу (oHSV). Fn-ЗМВ підвищують рівень білків-виконавців ПАНоптозу (GSDMD, GSDME, MLKL), захищаючи їх від протеасомної деградації, тоді як oHSV активує ZBP1, що в комбінації призводить до вивільнення імуногенних молекул (HMGB1, TNF- α , АТФ) з пухлинних клітин та посилення запальної відповіді [48].

Таким чином, ПАНоптоз є універсальною відповіддю вродженої імунної системи на широкий спектр патогенів та запальних процесів. Попри значний прогрес у розумінні молекулярної архітектури ПАНоптосоми, механізми регуляції, специфічність терапевтичного модулювання та взаємодія з існуючими методами лікування залишаються недостатньо з'ясованими. Подальше дослідження цих аспектів відкриває перспективи для розробки цілеспрямованих терапевтичних стратегій у лікуванні онкологічних, інфекційних, запальних та нейродегенеративних захворювань [3, 34].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

В експерименті було використано такі матеріали та реактиви: шприцевий фільтр 0,45 мкм (Starlab, Україна), шприцевий фільтр 0,22 мкм (IDEALAB, Україна), концентрат доксорубіцину 2 мг/мл для розчину (Ebewe Pharma, Австрія), ExoBacteria™ Isolation Kit (System Biosciences, США), Pierce™ Bradford Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США), Pierce™ Protein Concentrators PES 100K MWCO 100–500 мкл (Thermo Fisher Scientific, США), TRI Reagent (Zymo Research, США), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Литва) та EvaGreen® qPCR Mix Plus (NO ROX) (Solis BioDyne, Естонія).

У дослідженні було використано такі буфери та розчини: деіонізована вода, фосфатно-сольовий буфер (PBS) (8 г натрію хлориду, 0,2 г калію хлориду, 1,44 г динатрію гідрогенфосфату, 0,24 г калію дигідрогенфосфату на 1 л розчину, pH 7,4), 100% розчин диметилсульфоксиду (ДМСО), розчин 5 мг/мл тіазолілу синього тетразолію броміду (МТТ), 0,4% трипановий синій.

У роботі було застосовано таке лабораторне обладнання: ламінарний бокс breva 1200 II типу (Kupertek, Україна), шейкер-інкубатор ES-20 (BioSan, Латвія), CO₂-інкубатор (New Brunswick, Канада), лабораторні ваги TBE-0,15-0,001 (Техноваги, Україна), мікроцентрифуга з охолодженням PCVsR (Centurion Scientific, Велика Британія), спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США), центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), інвертований світловий мікроскоп Primovert (ZEISS, Німеччина), UVC/T-AR ПЛР-бокс (BioSan, Латвія) та ампліфікатор CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США).

Для культивування бактеріальних та еукаріотичних клітин було

використано відповідні поживні середовища: бульйон LB (Fisher BioReagents, США), який стерилізували під високим тиском при температурі 121 °C протягом 20 хв, та середовище RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США), доповнене 10% сироваткою великої рогатої худоби (FBS) (Biowest, Франція), 1 mM L-глутаміном, 1 mM пірувату натрію та розчином пеніциліну/стрептоміцину (100 Од/мл та 100 мкг/мл відповідно) (Biowest, Франція).

2.2. Характеристика експериментальних біологічних об'єктів

Згідно з оглядом Pang [49], *P. aeruginosa* проявляє виражену протипухлинну активність завдяки здатності індукувати апоптоз і некроптоз пухлинних клітин, пригнічувати ріст пухлин та активувати протипухлинну імунну відповідь організму-господаря через її численні фактори вірулентності, зокрема екзотоксин А. Це вплинуло на вибір *P. aeruginosa* як продуцента ЗМВ, які потенційно здатні чинити цитотоксичну дію на ракові клітини. Штам *P. aeruginosa* ATCC 10145 було отримано з Американської колекції типових культур (Манассас, штат Вірджинія, США).

Як модельний об'єкт у роботі було використано клітинну лінію THP-1 – іморталізовану моноцитоподібну клітинну лінію, отриману з периферичної крові однорічного пацієнта чоловічої статі з діагнозом гострої моноцитарної лейкемії. Однорідний генетичний фон клітин THP-1 мінімізує варіабельність клітинного фенотипу та дозволяє культивувати їх *in vitro* до 25-го пасажу (приблизно 3 місяці) без втрати чутливості та активності, що сприяє відтворюваності результатів. Ця клітинна лінія є важливою моделлю в онкологічних та імунологічних дослідженнях завдяки здатності диференціюватися у зрілі макрофаги та дендритні клітини, що дає змогу вивчати властивості цих імунних клітин [5]. Лінію клітин моноцитарної лейкемії людини THP-1 було придбано у компанії Cytion (Польща).

2.3. Культивування бактерії *P. aeruginosa* ATCC 10145

Культивували *P. aeruginosa* ATCC 10145 у пробірках з рідким поживним середовищем LB у термостаті в аеробних умовах при температурі +28 °C протягом ночі для того, щоб отримати достатню щільність клітин.

2.4. Виділення зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* ATCC 10145

Зовнішньо-мембранні везикули *P. aeruginosa* ATCC 10145 виділяли двома методами.

У першому варіанті ЗМВ отримували за допомогою набору EhoBacteria™ Isolation Kit відповідно до інструкцій виробника. Бактеріальну культуру двічі центрифугували при 3500 g протягом 20 хв за +4 °C для видалення клітин та їх залишків, після чого супернатант послідовно фільтрували через мембранні фільтри 0,45 та 0,22 мкм. Очищений супернатант наносили на колонку, заповнену запатентованим полімерним реагентом із набору, для зв'язування ЗМВ. Колонку інкубували при +4 °C, після чого зв'язані везикули елюювали в мікропробірку. Отриманий концентрат ЗМВ додатково фільтрували через мембранний фільтр 0,22 мкм та зберігали при 4 °C до наступного використання.

Другий спосіб ізоляції ЗМВ базувався на методі диференційного ультрацентрифугування [50]. Попередньо нарощували бактеріальну культуру до необхідного об'єму. Культуральне середовище центрифугували при 15 000 g протягом 30 хв при +4 °C для видалення клітин та їх залишків після чого супернатант послідовно фільтрували через мембранні фільтри 0,45 та 0,22 мкм. Очищений супернатант центрифугували на високошвидкісній ультрацентрифузі Sorvall WX 80 Ultra (Thermo Electron, Німеччина) при 100 000 g протягом 2 год при +4°C. Осад відбирали піпеткою, ресуспендували у PBS та проводили повторне центрифугування при 100 000 g протягом 2 год

при +4 °C. Супернатант видаляли, а очищені ЗМВ ресуспендували у 400 мкл PBS та додатково фільтрували через мембранний фільтр 0,22 мкм та зберігали при +4 °C до наступного використання.

2.5. Трансмісійна електронна мікроскопія отриманих зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* ATCC 10145

Для підтвердження морфології ЗМВ використовували трансмісійну електронну мікроскопію (Leo 906, модель Zeiss 100 KV, Німеччина). Метод базується на пропусканні пучка електронів через ультратонкий зразок, де електрони взаємодіють з його структурами та формують зображення з нанометровою роздільною здатністю. Розподіл ЗМВ за розмірами визначали методом динамічного розсіювання світла при +25 °C за допомогою приладу Nano-ZS (Malvern, Великобританія) та програмного забезпечення Zetasizer (версія 7.03, Malvern, Великобританія).

2.6. Визначення вмісту білка у зразках зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* ATCC 10145

Концентрацію білка в отриманих зразках ЗМВ визначали за допомогою набору Pierce™ Bradford Protein Assay Kit відповідно до протоколу виробника. Цей метод передбачає зв'язування барвника Кумасі з основними та ароматичними амінокислотами білків, що супроводжується зміною зсуву спектра поглинання барвника з 465 до 595 нм.

Від кожного зразка відбирали аліквоту та додавали реактив Бредфорда у співвідношенні 1:1. Суміш інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі, після чого вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 595 нм на спектрофотометрі. Концентрацію білка розраховували за

калібрувальною кривою, побудованою на основі стандартних розчинів бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у діапазоні 10-80 мкг/мл.

2.7. Завантаження зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* ATCC 10145 доксорубіцином

Для отримання ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145, наповнених доксорубіцином, застосовували метод пасивного завантаження [51]. Доксорубіцин та ЗМВ змішували у масовому співвідношенні 2:1 і інкубували протягом ночі при +4 °С. Незв'язаний доксорубіцин відділяли від везикул методом ультрафільтрації з використанням концентраційних колонок (Pierce Protein Concentrators, PES-мембрана, MWCO 100 кДа, об'єм 100–500 мкл) шляхом багаторазового центрифугування при 12 000 g протягом 7 хв з послідовним промиванням PBS до повного видалення залишків вільного препарату.

2.8. Флуоресцентна спектроскопія зразків зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* ATCC 10145

Для оцінки можливості взаємодії між ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 та доксорубіцином було застосовано метод тривимірної збуджувально-емісійної флуоресцентної матриці. Метод полягає в послідовній реєстрації спектрів випромінювання зразка при поступовій зміні довжини хвилі збудження, що дозволяє отримати двовимірну карту інтенсивності флуоресценції та ідентифікувати всі флуорофори зразка за характерними парами максимумів збудження/випромінювання та виявляти зміни у їхньому мікрооточенні, спричинені взаємодією між компонентами [52]. Вимірювання фотолюмінесценції проводили за допомогою спектрофлуориметра

FP-8200 (Jasco, Японія), оснащеного ксеноновою лампою потужністю 150 Вт.

Зразки об'ємом 400 мкл поміщали у кварцову кювету (5×5 мм, об'єм 800 мкл). Спектри записували за кімнатної температури. Щілини монохроматорів збудження та випромінювання було встановлено на 5 нм, швидкість сканування становила 500 нм/хв, крок збору даних – 1 нм. Калібрування системи за довжиною хвилі проводили з використанням піку комбінаційного розсіювання (Рамана) води для забезпечення точності вимірювань.

Двовимірні карти збудження/випромінювання флуоресценції отримували шляхом реєстрації 40 спектрів випромінювання при послідовній зміні довжини хвилі збудження в діапазоні від 290 до 500 нм з кроком 5 нм. Діапазон довжин хвиль випромінювання становив 205-750 нм. Загальний час сканування одного зразка становив приблизно 50 хв. Усі вимірювання було проведено протягом одного дня з метою мінімізації впливу інструментальної варіабельності, зокрема коливань інтенсивності лампи.

2.9. Культивування еукаріотичних клітин ТНР-1 та обробка зовнішньомембранними везикулами *P. aeruginosa* ATCC 10145

Клітинну лінію ТНР-1 культивували у середовищі RPMI-1640, доповненому 10% фетальною бичачою сироваткою (FBS), 1 мМ L-глутаміну, 1 мМ пірувату натрію 100 Од/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини вирощували у CO₂-інкубаторі при +37 °С у зволоженій атмосфері (70-80% вологості) з 5% CO₂. Після нарощування 10⁶ клітин до них додавали ЗМВ у концентрації 6 мкг/мл, доксорубіцин у концентрації 1 мкг/мл та суміш ЗМВ з доксорубіцином та інкубували протягом 24 год.

2.10. Візуалізація клітин за допомогою світлового мікроскопа

Морфологію клітин та їхній загальний стан оцінювали за допомогою інвертованого світлового мікроскопа при 10-кратному збільшенні. Клітини фарбували трипановим синім у співвідношенні 1:1 та поміщали у камеру Горяєва для візуалізації. Зображення фіксували за допомогою вбудованої камери мікроскопа. Морфологічні зміни клітин після обробки ЗМВ оцінювали якісно шляхом порівняння з необробленим контролем.

2.11. Визначення цитотоксичності методом МТТ

Цитотоксичність ЗМВ оцінювали за кількістю життєздатних клітин шляхом МТТ-тесту [53], який базується на здатності мітохондріальних дегідрогеназ життєздатних клітин відновлювати тiazоліл блакитний тетразолію бромід (МТТ) до нерозчинного у воді формазану.

Аліквоти клітинної суспензії об'ємом 200 мкл (10^6 клітин/мл) вносили у мікропробірки у трьох паралелях. До кожної мікропробірки додавали 20 мкл розчину МТТ (5 мг/мл у PBS, pH 7,4) та інкубували при +37 °C протягом 3 год. Після інкубації розчин МТТ видаляли центрифугуванням, а утворені кристали формазану розчиняли у 100 мкл ДМСО. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометрі. Результати виражали у відсотках відносно необробленого контролю.

2.12. Кількісна ПЛР у реальному часі

Тотальну РНК екстрагували з необроблених та оброблених ЗМВ клітин ТНР-1 за допомогою реагенту TRI Reagent відповідно до протоколу виробника. Отриману РНК використовували як матрицю для синтезу кДНК за допомогою

набору RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit згідно з інструкціями виробника.

Для оцінки рівня експресії досліджуваних генів було використано ген-специфічні праймери, послідовності яких наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Послідовності праймерів для кількісної ПЛР у реальному часі

Ген	Прямий праймер (5'→3')	Зворотний праймер (5'→3')
<i>GAPDH</i>	AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	AGGGGCCATCCACAGTCTTC
<i>TNF-α</i>	ATGAGCACTGAAAGCATGAT CC	GAGGGCTGATTAGAGAGAG GTC
<i>IL-1β</i>	CCTGTCCTGCGTGTTGAAAG A	GGGAACTGGGCAGACTCAA A
<i>Casp3</i>	TGGTTCATCCAGTCGCTTTG	CATTCTGTTGCCACCTTTTCG
<i>TLR-4</i>	TTGAGCAGGTCTAGGGTGAT TGAAC	ATGCGGACACACACACTTTC AAATA
<i>Bcl-2</i>	ATCGCCCTGTGGATGACTGA G	CAGCCAGGAGAAATCAAAC AGAGG
<i>Bax</i>	GGACGAACTGGACAGTAAC ATGG	GCAAAGTAGAAAAGGGCGA CAAC
<i>Casp1</i>	TCCAATAATGGACAAGTCAA GCC	GCTGTACCCCAGATTTTGTA GCA
<i>Casp8</i>	CCAGAGACTCCAGGAAAAG AGA	GATAGAGCATGACCCTGTAG GC
<i>RIPK1</i>	GACTATGAGCGAGATGGACT GAA	AAGGTCGATCCTGGAACACT G
<i>GSDME</i>	CAGCCTACTTCTTGGTCAGT GC	TCTGTATCTTTCAGGGGAGT CA
<i>MLKL</i>	TGCCCTGGAGGAGGCTAATG	CAACCTGAAGTAACAGCGA GA
<i>NLRP3</i>	AGCACCAGCCAGAGTCTAAC	CCCCAACCACAATCTCCGAA T

Реакційна суміш загальним об'ємом 20 мкл мала такий склад: 4 мкл

EvaGreen® qPCR Mix Plus (NO ROX), по 1 мкл прямого та зворотного праймерів (кінцева концентрація 0,5 пікоМ), 1 мкл кДНК та 13 мкл безнуклеазної води. Ампліфікацію проводили на приладі CFX96™ Real-Time System за таких умов термоцикування: початкова денатурація при +95 °C протягом 10 хв, після чого 40 циклів – денатурація при 95 °C протягом 15 с, відпал праймерів при +59 °C протягом 20 с та елонгація при +72 °C протягом 20 с.

Кожну реакцію виконували у трьох технічних повторях. Як негативний контроль використовували зразок без матриці, що містив безнуклеазну воду замість кДНК. Специфічність реакції підтверджували аналізом кривої плавлення. Ефективність ампліфікації розраховували за допомогою програмного забезпечення LinRegPCR (версія 11.0). Відносну експресію генів, нормалізовану до референтного гена *GAPDH*, аналізували за допомогою програмного забезпечення Gene Expression Macro™ версії 1.1 (Bio-Rad Laboratories, Німеччина). Результати наведено як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення (SD) для кожної групи. Статистичний аналіз результатів проводили за двобічним t-критерієм Стьюдента у модифікації Велча. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Морфологія та розміри зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa*

Морфологію виділених ЗМВ *P. aeruginosa* досліджували методом трансмісійної електронної мікроскопії з негативним контрастуванням. На рис. 3.1. везикули зображені як наносфери округлої форми з чітко окресленою мембранною структурою.

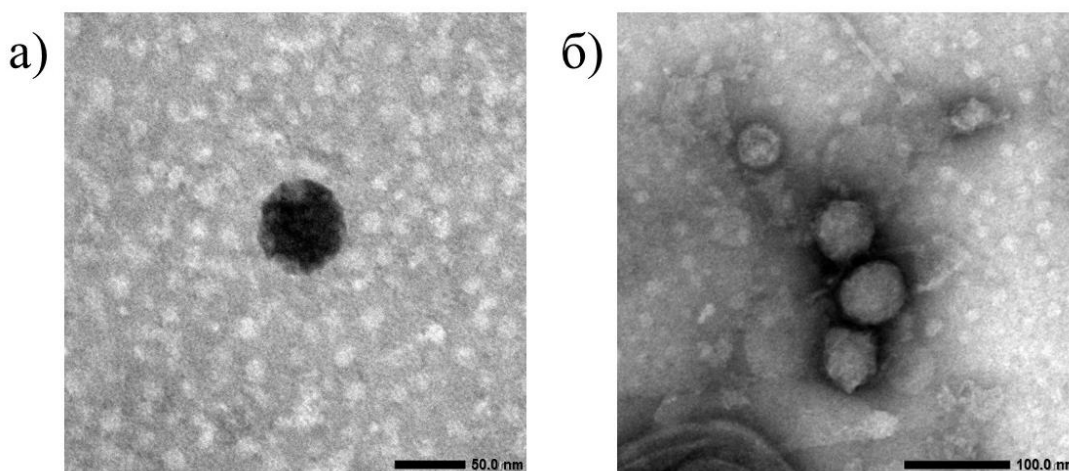


Рис. 3.1. Мікрофотографії зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa*, отримані методом трансмісійної електронної мікроскопії (негативне контрастування); розмір лінійки становить 50 нм (а) та 100 нм (б)

Діаметр виявлених ЗМВ коливався від 10 до 180 нм. Окремі везикули мали характерну «чашоподібну» або дещо витягнуту форму, що є типовим артефактом пробопідготовки для трансмісійної електронної мікроскопії. Частина везикул спостерігалася у вигляді скупчень (агрегатів). Навколо та всередині деяких дрібних везикул виявлено електронно-прозорий матеріал, що може свідчити про наявність розчинного вмісту периплазматичного походження.

Аналіз розподілу ЗМВ за розмірами (рис. 3.2.) показав гетерогенний характер популяції з переважанням дрібних везикул.

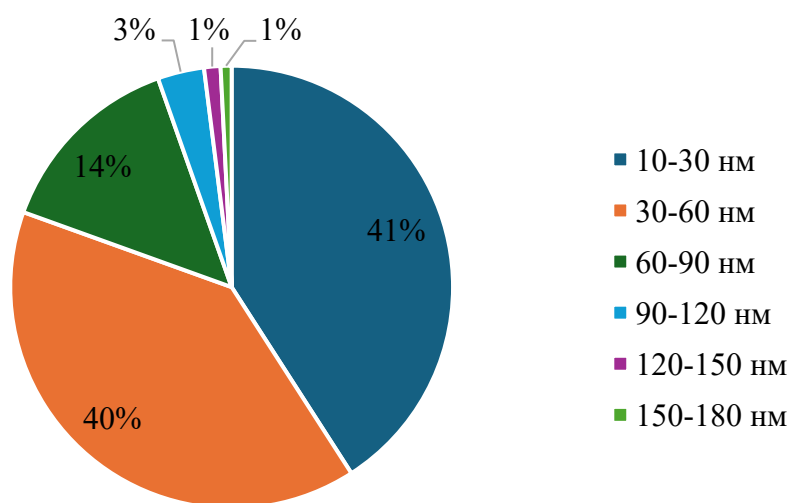


Рис. 3.2. Розподіл зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* за розмірами, визначений методом динамічного розсіювання світла

Домінуючими фракціями були везикули діаметром від 30 до 90 нм, які разом становили 94,6 % усієї популяції. Везикули більшого діаметра (90–180 нм) були нечисленними. Такий розподіл узгоджується з літературними даними щодо розмірів ЗМВ грамнегативних бактерій, для яких характерний діапазон 20–300 нм із переважанням дрібної фракції [18].

Для виділення ЗМВ використовували два методи: ультрацентрифугування та комерційний набір ExoBacteria™ Isolation Kit. Вміст білка у виділених фракціях визначали за допомогою набору для аналізу BCA. Концентрація білка ЗМВ, отриманих методом ультрацентрифугування, становила 440 ± 80 мкг/мл, тоді як при використанні комерційного набору – $40 \pm 24,8$ мкг/мл, що свідчить про суттєво вищий вихід везикул при ультрацентрифугуванні. Водночас слід зазначити, що метод ультрацентрифугування потребує значних об'ємів вихідної культуральної рідини та є більш тривалим у виконанні. Комерційний набір, натомість, дозволяє працювати з меншими об'ємами зразка, є менш трудомістким і не потребує спеціалізованого обладнання, що робить його

зручнішим для рутинного використання за умови достатньої кількості вихідного матеріалу.

3.2. Взаємодія між доксорубіцином та зовнішньо-мембранними везикулами *P. aeruginosa*

Перевіряли утворення комплексів між ЗМВ та доксорубіцином методом збуджувально-емісійного картування за рахунок аналізу змін їхніх флуоресцентних характеристик (рис. 3.3).

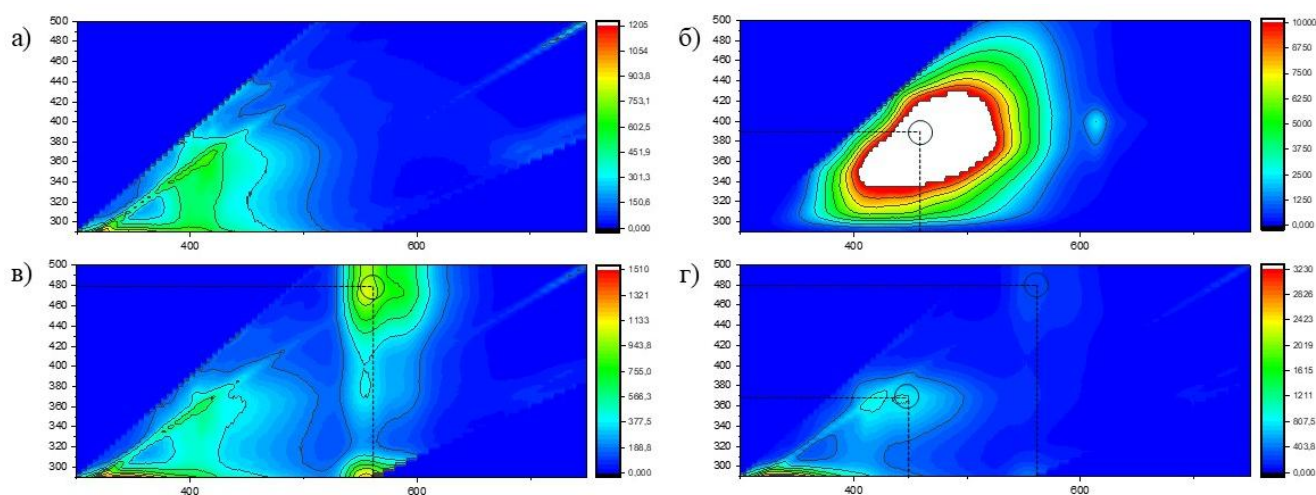


Рис. 3.3. Двовимірні збуджувально-емісійні флуоресцентні матриці досліджуваних зразків: а – PBS (негативний контроль); б – зовнішньо-мембранні везикули *P. aeruginosa* у PBS; в – розчин доксорубіцину у PBS; г – зовнішньо-мембранні везикули *P. aeruginosa* з доксорубіцином у PBS. По вертикальній осі – довжина хвилі збудження (λ_{ex} , нм); по горизонтальній – довжина хвилі випромінювання (λ_{em} , нм); інтенсивність флуоресценції (ум.од.) закодована кольором згідно зі шкалою праворуч від кожної панелі

Як негативний контроль вимірювали PBS (рис. 3.3. а), спектр якого не містив вираженого сигналу автофлуоресценції. Реєструвались лише діагональні смуги розсіювання та раманівський пік води, що підтверджує

відсутність фонового сигналу буфера та чистоту оптичної системи.

У спектрі ЗМВ *P. aeruginosa* без барвника (рис. 3.3. б) спостерігалась інтенсивна широкосмугова автофлуоресценція з максимумом в області $\lambda_{ex} \approx 340\text{--}400$ нм, $\lambda_{em} \approx 450\text{--}480$ нм, причому у центральній зоні піку інтенсивність досягала верхньої межі діапазону детектора ($\sim 10\,000$ у.о.). Таке спектральне положення узгоджується з флуоресценцією PQS, яка, ймовірно, є основним джерелом автофлуоресценції везикул.

Спектр вільного доксорубіцину у PBS (рис. 3.3. в) демонстрував характерний для антрациклінового хромофора профіль з основним максимумом флуоресценції в області $\lambda_{ex} \approx 470\text{--}490$ нм, $\lambda_{em} \approx 560\text{--}595$ нм [51], причому максимальна інтенсивність сягала 1510 ум.од. Окрім основного піку, на карті фіксувалися лише слабкі смуги розсіювання, які не несуть додаткової інформації.

У зразку, що містив одночасно ЗМВ та доксорубіцин (рис. 3.3. г), спостерігалися суттєві зміни збуджувально-емісійного профілю. Максимальна інтенсивність сигналу (~ 3230 ум.од.) виявилася значно нижчою за очікувану адитивну суму інтенсивностей вихідних компонентів ($\sim 11\,500$ ум.од.). Автофлуоресценція ЗМВ у зоні максимуму була практично погашена, а спектральний максимум доксорубіцину змінив форму та ослабив інтенсивність порівняно з вільним препаратом у PBS.

Це свідчить про зміну мікрооточення молекул доксорубіцину – перехід з водного середовища у гідрофобне при контакті з везикулами. Найімовірніше, це пов'язано з частковою адсорбцією молекул доксорубіцину на поверхні везикул або їхньою інкорпорацією в ліпідний бішар, що узгоджується з відомими фізико-хімічними властивостями цього препарату і підтверджує взаємодію між доксорубіцином і ЗМВ *P. aeruginosa*.

3.3. Морфологія та життєздатність клітин ТНР-1 за використання зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa*

Для оцінки цитотоксичного впливу ЗМВ *P. aeruginosa* на клітини гострого моноцитарного лейкозу людини лінії ТНР-1 було проведено візуальну оцінку морфології клітин методом світлової мікроскопії та кількісне визначення життєздатності клітин за допомогою МТТ-тесту.

На рис. 3.4. представлено мікрофотографії необроблених та оброблених ЗМВ *P. aeruginosa* клітин ТНР-1.

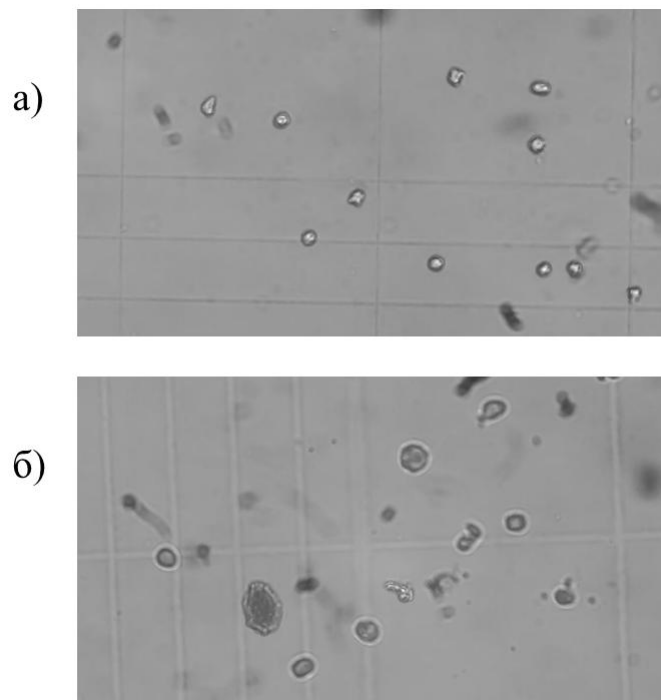


Рис. 3.4. Мікрофотографія клітин лінії ТНР-1 за результатами світлової мікроскопії: а) інтактні клітини контрольної групи; б) клітини після інкубації із зовнішньо-мембранними везикулами *P. aeruginosa*. (забарвлення трипановим синім; Об.×4, Ок.×10)

У контрольній групі (рис. 3.4, а) клітини мали типову для цієї лінії морфологію – округлу форму, чіткі контури плазматичної мембрани та збережену цілісність клітин. Натомість у зразках, оброблених ЗМВ

P. aeruginosa (рис. 3.4, б), спостерігалися виражені морфологічні зміни, такі як втрата правильної округлої форми, набрякання клітини та розрив плазматичної мембрани з появою клітинних фрагментів. Такі морфологічні ознаки вказують на літичний тип клітинної загибелі, що відповідає піроптозу або некроптозу.

Результати МТТ-тесту представлено на рис. 3.5.

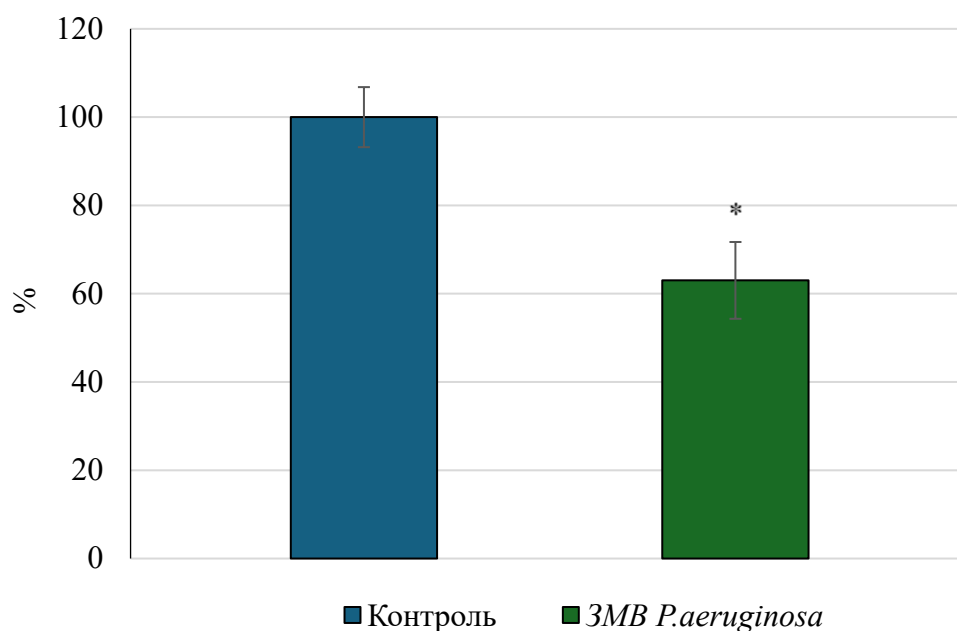


Рис. 3.5. Відносний рівень життєздатності клітин ТНР-1 після інкубації із зовнішньо-мембранними везикулами *P. aeruginosa* за даними МТТ-тесту ($M \pm SD$, $n = 3$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Життєздатність клітин у контрольній групі прийнято за 100 %. Після 24-годинної інкубації клітин ТНР-1 із ЗМВ *P. aeruginosa* життєздатність достовірно знижувалася майже на 40 % порівняно з контролем. Отримані дані свідчать, що ЗМВ *P. aeruginosa* мають виражений цитотоксичний ефект щодо клітин ТНР-1 та здатність індукувати загибель пухлинних клітин.

3.4. Результати дослідження експресії генів клітинної загибелі

Методом ПЛР у реальному часі було проаналізовано експресію генів, залучених у реалізацію трьох шляхів РКЗ (апоптозу, піроптозу та некроптозу) у клітинній лінії ТНР-1. Дослідження проводили у чотирьох експериментальних групах ($n = 3$ для кожної): необроблені контрольні клітини, клітини після інкубації із ЗМВ *P. aeruginosa* (6 мкг/мл), клітини після обробки доксорубіцином (1 мкг/мл) та клітини, які отримували комбіноване введення ЗМВ *P. aeruginosa* з доксорубіцином.

На рис. 3.6. представлено експресія генів апоптозного шляху загибелі.

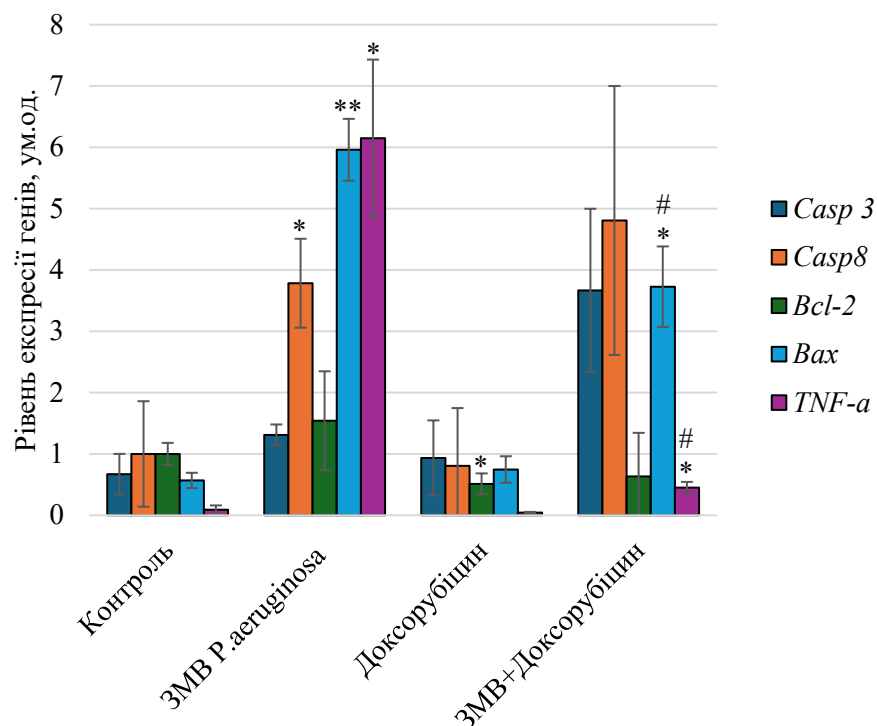


Рис. 3.6. Рівень експресії генів *Casp3*, *Casp8*, *Bcl-2*, *Bax* і *TNF-α*, нормалізований відносно референтного гена *GAPDH*, у досліджуваних групах ($M \pm SD$, $n=3$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

** – $p < 0,01$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою ЗМВ *P. aeruginosa*

Інкубація клітин THP-1 із ЗМВ *P. aeruginosa* зумовлювала достовірне підвищення експресії проапоптозних генів *Casp8* у 3,8 рази та *Bax* у 10,5 рази порівняно з контролем, що свідчить про активацію зовнішнього (рецепторного) і внутрішнього (мітохондріального) шляхів апоптозу. Рівень експресії *Casp3* при цьому зростав у 2 рази, що наближається до межі статистичної достовірності ($p = 0,059$). Рівень експресії *Bcl-2* у клітинах, оброблених доксорубіцином, продемонстрував достовірне зниження у 2 рази, що є класичним ефектом антрациклінових препаратів та послаблює захист мітохондрій від апоптозної загибелі. Натомість, найбільш виражена активація *Casp3* у 5,5 рази ($p = 0,063$, тенденція до достовірності) порівняно з контролем спостерігалася при комбінованому введенні ЗМВ з доксорубіцином, а експресія *Bax* і *TNF- α* залишалася достовірно підвищеною відносно контролю. Проте, доксорубіцин у макрофагальних клітинах (якими є THP-1) може блокувати транскрипційні фактори (наприклад, NF- κ B), які відповідають за утворення прозапальних цитокінів у відповідь на стимуляцію ЗМВ, тому на рис. 3.6. показано суттєве зниження рівня *TNF- α* . Додавання доксорубіцину може перемикає сигнальні шляхи клітини. Це може вказувати на те, що хіміопрепарат «пом'якшує» надмірну запальну відповідь, викликану ЗМВ, що іноді розглядається як позитивний ефект для зменшення системного запалення. Зниження *TNF- α* на фоні росту каспази 3 (виконавчої каспази апоптозу) може свідчити про те, що доксорубіцин успішно сенсibiliзує ракові клітини до антигенів ЗМВ, перетворюючи імунний стимул на смертельний сигнал.

На рис. 3.7 наведено результати аналізу експресії генів піроптозного шляху клітинної загибелі.

ЗМВ *P. aeruginosa* виявили виражену прозапальну активність. Як видно з графіку, достовірно підвищилася експресія *TLR-4* у 5,1 рази, *Casp1* у 5,6 рази, *GSDME* у 23 рази, *TNF- α* у 67,6 рази та *IL-1 β* у 1537 разів. Такі зміни характеризують активацію TLR-4/NLRP3-інфламасомного сигнального

каскаду з розвитком повноцінної піроптозної відповіді. При комбінованому введенні ЗМВ з доксорубіцином експресія *TLR-4*, *Casp1* та *GSDME* зберігалася на достовірно високому рівні відносно контролю. Водночас експресія генів ключових прозапальних цитокінів *IL-1 β* і *TNF- α* достовірно знижувалася порівняно з групою ЗМВ *P. aeruginosa*: *IL-1 β* – у 2,6 рази, *TNF- α* – у 13,6 рази. Це вказує на пригальмовування доксорубіцином цитокінового виходу піроптозної реакції, але збереження активності її молекулярного механізму (*GSDME*, каспаза 1).

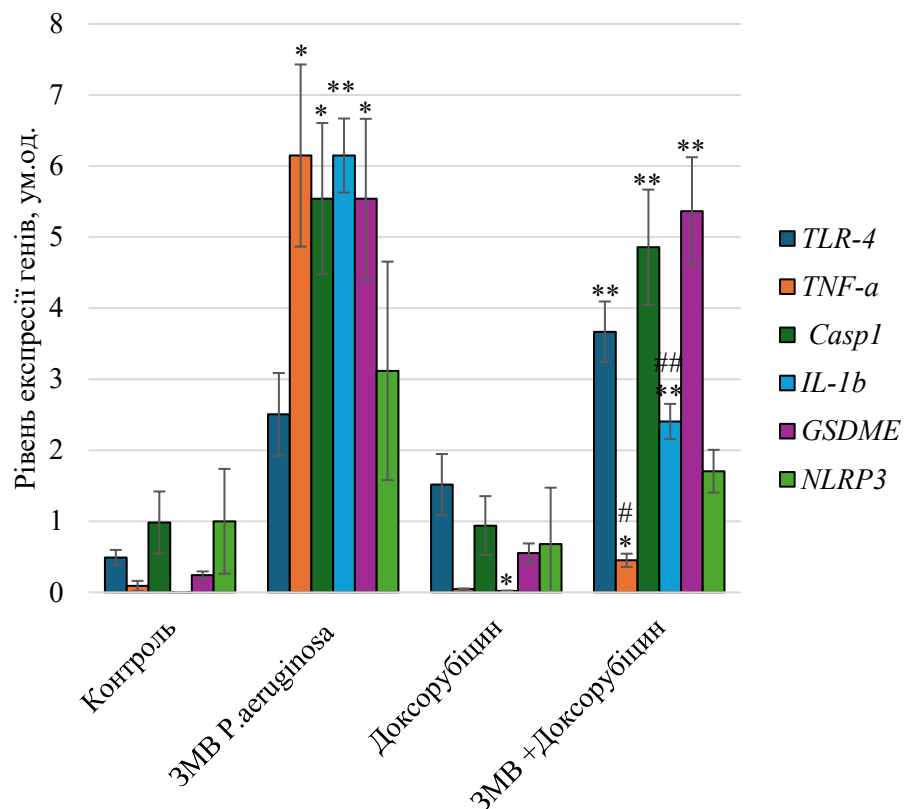


Рис. 3.7. Рівень експресії генів *TLR-4*, *TNF- α* , *Casp1*, *IL-1 β* , *GSDME* та *NLRP3*, нормалізований відносно референтного гена *GAPDH* у досліджуваних групах ($M \pm SD$, $n=3$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

** – $p < 0,01$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою ЗМВ *P. aeruginosa*;

– $p < 0,01$ порівняно з групою ЗМВ *P. aeruginosa*

На рис. 3.8 відображено експресію генів некроптозного шляху загибелі.

У зразках, оброблених ЗМВ *P. aeruginosa*, зафіксовано тенденцію до підвищення експресії *MLKL* (у 3,4 рази, $p = 0,089$), тоді як зміни *RIPK1* не досягали статистичної достовірності через високу варіабельність показника. Найвираженіша активація некроптозного шляху спостерігалася при комбінованому введенні ЗМВ *P. aeruginosa* з доксорубіцином: експресія *RIPK1* достовірно зростала у 11,8 рази, а *TLR-4* – у 7,5 рази порівняно з контролем.

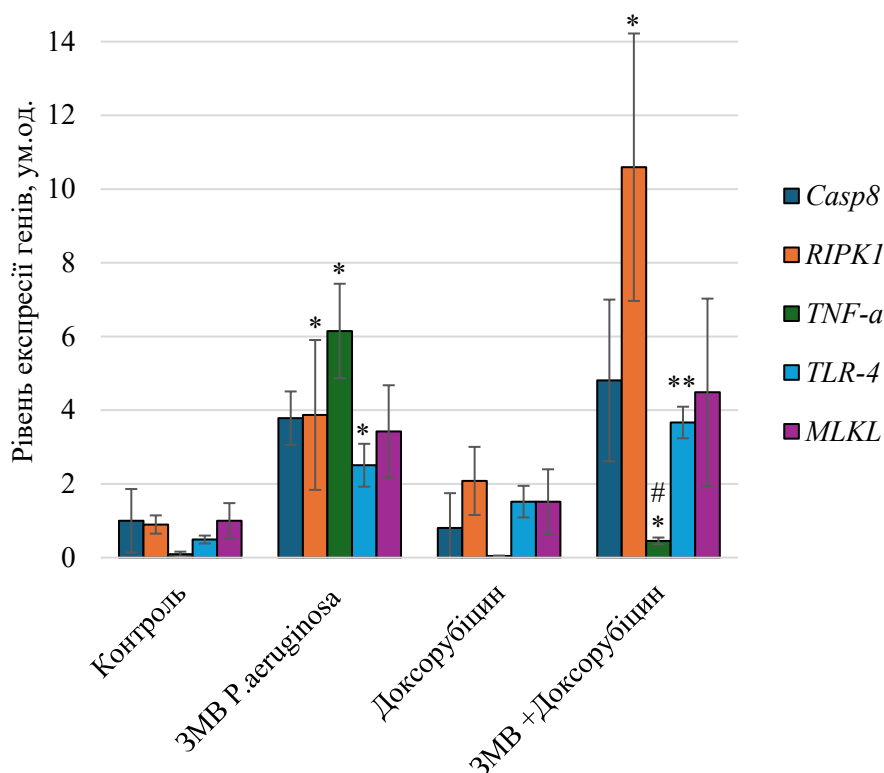


Рис. 3.8. Рівень експресії генів *Casp8*, *RIPK1*, *TNF-α*, *TLR-4* та *MLKL*, нормалізований відносно референтного гена *GAPDH*, у досліджуваних групах ($M \pm SD, n=3$)

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;

** – $p < 0,01$ порівняно з контролем;

– $p < 0,05$ порівняно з групою ЗМВ *P. aeruginosa*

Водночас, рівні *RIPK1* та *TLR-4* мали тенденцію до перевищення показників групи ЗМВ *P. aeruginosa* ($p = 0,068$ та $p = 0,069$ відповідно), що

свідчить про можливу синергічну дію доксорубіцину на ЗМВ-індукований некроптоз.

Аналіз експресії генів, відповідальних за синтез GSDME та MLKL, білків, які утворюють пори за літичної загибелі клітин, може свідчити, що зниження транскрипції прозапальних цитокінів відбувається не за рахунок їхньої недостатньої експресії та пороутворювальної активності або процесінгу цих білків. Встановлена взаємодія доксорубіцину із ЗМВ шляхом їх адсорбції на поверхні везикул або інкорпорації у ліпідний бішар дозволяє припустити, що доксорубіцин перешкоджає пороутворенню шляхом взаємодії з відповідальними білками. Не можна виключати, що доксорубіцин пригнічує активований везикулами прозапальний шлях на рівні транскрипції цитокінів.

Отже, як було продемонстровано, введення ЗМВ *P. aeruginosa* з доксорубіцином *in vitro* до клітин THP-1 підсилює апоптозний та некроптозний шляхи РКЗ пухлинних клітин, а також послаблює запальну складову піроптозної відповіді шляхом зниження транскрипції мРНК прозапальних цитокінів *IL-1 β* та *TNF- α* . Така синергічна дія може мати терапевтичний потенціал за рахунок підсилення цитотоксичного ефекту ЗМВ *P. aeruginosa* відносно пухлинних клітин при одночасному зменшенні системної запальної реакції.

Цікавим також є те, що паралельна активація генів усіх трьох РКЗ у клітинах, оброблених ЗМВ *P. aeruginosa*, а саме каспази 8 та каспази 1, RIPK1 і MLKL, GSDME, *IL-1 β* , дозволяє припустити, що ЗМВ *P. aeruginosa* здатні індукувати у клітинах THP-1 ПАНоптоз. Однак аналіз експресії генів не є достатнім доказом реалізації ПАНоптозу, оскільки регуляція цих шляхів значною мірою відбувається на посттрансляційному рівні. Тому ця гіпотеза потребує підтвердження шляхом дослідження виконавчих білків відповідних каскадів та оцінки формування ПАНоптосомного комплексу у подальших експериментах.

ВИСНОВКИ

Таким чином, виявлено потенціал до здатності зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* ATCC 10145 одночасно модулювати апоптоз, піроптоз і некроптоз у клітинній лінії THP-1, як інтегрований тип РКЗ – ПАНоптоз. Продemonстровано зміну активності наведених шляхів за умов наповнення везикул протипухлинним препаратом доксорубіцином. Отримані результати є підґрунтям для подальшого вивчення зовнішньо-мембранних везикул *P. aeruginosa* як перспективної платформи для розробки нових комбінованих підходів у терапії онкологічних захворювань.

1. Виявлено, що домінуючими фракціями ЗМВ *P. aeruginosa* були дрібні везикули діаметром від 30 до 90 нм, що підтверджує їх приналежність до позаклітинних мембранних везикул грамнегативних бактерій.

2. Встановлено взаємодію доксорубіцину із ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 шляхом адсорбції на поверхні везикул або інкорпорації у ліпідний бішар.

3. Виявлено цитотоксичну дію нативних ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 на клітини лінії THP-1 *in vitro*. Зафіксовано морфологічні ознаки літичної клітинної загибелі, а за даними МТТ-тесту – достовірне зниження життєздатності клітин майже на 40 % порівняно з контролем.

4. Встановлено, що ЗМВ *P. aeruginosa* ATCC 10145 індукують у клітинах THP-1 одночасну активацію генів усіх трьох шляхів РКЗ – апоптозу (*Casp8*, *Bax*), піроптозу (*Casp1*, *GSDME*, *IL-1 β* , *TNF- α*) та некроптозу (*MLKL*). Комбіноване введення ЗМВ з доксорубіцином зумовлює підсилення апоптозного та некроптозного шляхів РКЗ за одночасного послаблення запальної складової піроптозної відповіді, що можна розглядати як позитивний ефект для зменшення системного запалення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cai, Y., Xiao, H., Zhou, Q., Lin, J., Liang, X., Xu, W., Cao, Y., Zhang, X. and Wang, H. (2024). Comprehensive Analyses of PANoptosome with Potential Implications in Cancer Prognosis and Immunotherapy. *Biochemical Genetics*, 63(1), pp. 331-353.
2. Rima, M., Dakramanji, M., El Hayek, E., El Khoury, T., Fajloun, Z. and Rima, M. (2025). Unveiling the wonders of bacteria-derived extracellular vesicles: From fundamental functions to beneficial applications. *Heliyon*, [online] Volume 11(4), p. e42509. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42509> [Accessed 6 Feb. 2025].
3. Wu, S., Tian, B., Pang, X. and Sui, B. (2025). A potential strategy to rebuild the tumor immune microenvironment: PANoptosis. *Frontiers in Immunology*, [online] Volume 16, p. 1626411. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1626411> [Accessed 4 Aug. 2025].
4. Wang, T., Lu, Y., Zhang, X. and Yu, F. (2025). Targeting PANoptosis in Bacterial-Induced Inflammatory Diseases: Mechanisms and Therapeutic Interventions. *Journal of Inflammation Research*, 18, pp. 16713–16728.
5. Chanput, W., Mes, J. and Wichers, H. (2014). THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), pp. 37–45.
6. Doyle, L. and Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, [online] Volume 8(7), p. 727. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8070727> [Accessed 15 Jul. 2019].
7. Couch, Y., Buzàs, E., Di Vizio, D., Gho, Y., Harrison, P., Hill, A., Lötvall, J., Raposo, G., Stahl, P., Théry, C., Witwer, K. and Carter, D. (2021). A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, [online] Volume 10(14), p. e12144. Available at: <https://doi.org/10.1002/jev2.12144> [Accessed 10 Dec. 2021].

8. Fang, Y., Wang, Z., Liu, X. and Tyler, B. (2022). Biogenesis and Biological Functions of Extracellular Vesicles in Cellular and Organismal Communication With Microbes. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 13, p. 817844. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.817844> [Accessed 18 Feb. 2022].
9. De Sousa, K., Rossi, I., Abdullahi, M., Ramirez, M., Stratton, D. and Inal, J. (2023). Isolation and characterization of extracellular vesicles and future directions in diagnosis and therapy. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, [online] Volume 15(1), p. e1835. Available at: <https://doi.org/10.1002/wnan.1835> [Accessed 27 Jul. 2022].
10. Kalluri, R. and LeBleu, V. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, [online] Volume 367(6478), p. eaau6977. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aau6977> [Accessed 7 Feb. 2020].
11. Van Niel, G., D'Angelo, G. and Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), pp. 213–228.
12. Lian, M., Chng, W., Liang, J., Yeo, H., Lee, C., Belaid, M., Tollemeto, M., Wacker, M., Czarny, B. and Pastorin, G. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: Recent advancements and current challenges on their use for biomedical applications. *Journal of Extracellular Vesicles*, [online] Volume 11(12), p. e12283. Available at: <https://doi.org/10.1002/jev2.12283> [Accessed 15 Dec. 2022].
13. De Langhe, N., Van Dorpe, S., Guilbert, N., Vander Cruyssen, A., Roux, Q., Deville, S., Dedeyne, S., Tummers, P., Denys, H., Vandekerckhove, L., De Wever, O. and Hendrix, A. (2024). Mapping bacterial extracellular vesicle research: insights, best practices and knowledge gaps. *Nature Communications*, [online] Volume 15(1), p. 9410. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53279-1> [Accessed 31 Oct. 2024].
14. Avila-Calderón, E., Ruiz-Palma, M., Aguilera-Arreola, M., Velázquez-

Guadarrama, N., Ruiz, E., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S. and Contreras-Rodríguez, A. (2021). Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria: An Outlook on Biogenesis. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 12, p. 557902. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902> [Accessed 4 Mar. 2021].

15. Schwechheimer, C. and Kuehn, M. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), pp. 605–619.

16. Zhao, X., Wei, Y., Bu, Y., Ren, X. and Dong, Z. (2025). Review on bacterial outer membrane vesicles: structure, vesicle formation, separation and biotechnological applications. *Microbial Cell Factories*, [online] Volume 24(1), p. 27. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02653-9> [Accessed 21 Jan. 2025].

17. Arnold, P., Boros, F., Mattner, J., Seidel, G., Liu, C., Hensel, I., Van Deun, J., Schwendner, R., Muller-Deile, J., Sopel, N., Ramming, A., Angeli, M., Rauber, S., Vilhena, C., Baur, A., Wirtz, S., Uberla, K., Reutter, H., Mulzer, L., Hilger, A., Zunke, F., Xiang, W., Fuhrmann, G. and Gunther, C. (2025). Two Sides of the Same Coin – Mechanistic Insight, Diagnostic Application and Therapeutic Translation of Bacterial and Host-Derived Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Biology*, [online] Volume 4(11), p. e70093. Available at: <https://doi.org/10.1002/jex2.70093> [Accessed 29 Oct. 2025].

18. Zavan, L., Fang, H., Johnston, E., Whitchurch, C., Greening, D., Hill, A. and Kaparakis-Liaskos, M. (2023). The Mechanism of *P. aeruginosa* Outer Membrane Vesicle Biogenesis Determines Their Protein Composition. *Proteomics*, [online] Volume 23(10), p. e2200464. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.202200464> [Accessed 17 Mar. 2023].

19. Sartorio, M., Pardue, E., Feldman, M. and Haurat, M. (2021). Bacterial Outer Membrane Vesicles: From Discovery to Applications. *Annual Review of Microbiology*, 75, pp. 609–630.

20. Toyofuku, M., Nomura, N. and Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), pp. 13–24.

21. Bomberger, J., MacEachran, D., Coutermarsh, B., Ye, S., O'Toole, G. and Stanton, B. (2009). Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *P. aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathogens*, [online] Volume 5(4), p. e1000382. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000382> [Accessed 10 Apr. 2009].
22. Briaud, P. and Carroll, R. (2020). Extracellular Vesicle Biogenesis and Functions in Gram-Positive Bacteria. *Infection and Immunity*, [online] Volume 88(12), p. e00433-20. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00433-20> [Accessed 16 Nov. 2020].
23. Cooke, A., Nello, A., Ernst, R. and Schertzer, J. (2019). Analysis of *P. aeruginosa* biofilm membrane vesicles supports multiple mechanisms of biogenesis. *PLoS ONE*, [online] Volume 14(2), p. e0212275. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212275> [Accessed 14 Feb. 2019].
24. Koeppen, K., Hampton, T., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S., Mielcarz, D., Demers, E., Dolben, E., Hammond, J., Hogan, D. and Stanton, B. (2016). A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLoS Pathogens*, [online] Volume 12(6), p. e1005672. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672> [Accessed 13 Jun. 2016].
25. Kaparakis-Liaskos, M. and Ferrero, R. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 15(6), pp. 375–387.
26. Dhital, S., Deo, P., Stuart, I. and Naderer, T. (2021). Bacterial outer membrane vesicles and host cell death signaling. *Trends in Microbiology*, 29(12), pp. 1106–1116.
27. Karaman, I., Pathak, A., Bayik, D. and Watson, D. (2024). Harnessing Bacterial Extracellular Vesicle Immune Effects for Cancer Therapy. *Pathogens and Immunity*, 9(1), pp. 56–90.
28. Chai, Q., Li, D., Zhang, M., Gu, Y., Li, A., Wu, X., Liu, X.. and Liu, J. (2025). Engineering Nanoplatfroms of Bacterial Outer Membrane Vesicles to Overcome Cancer Therapy Resistance. *Drug Resistance Updates*, [online] Volume

83, p. 101277. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drup.2025.101277> [Accessed 18 Jul. 2025].

29. Sun, J., Tan, L., Ye, B. and Bi, X. (2024). Engineered Outer Membrane Vesicles as Nanosized Immune Cell Engagers for Enhanced Solid Tumor Immunotherapy. *ACS Nano*, 18(44), pp. 30332–30344.

30. Zheng, P., He, J., Fu, Y., Yang, Y., Li, S., Duan, B., Yang, Y., Hu, Y., Yang, Z., Wang, M., Liu, Q., Zheng, X., Hua, H., Li, W., Li, D., Ding, Y., Yang, X., Bai, H., Long, Q., Huang, W. and Ma, Y. (2024). Engineered Bacterial Biomimetic Vesicles Reprogram Tumor-Associated Macrophages and Remodel Tumor Microenvironment to Promote Innate and Adaptive Antitumor Immune Responses. *ACS Nano*, 18(9), pp. 6863–6886.

31. Lieberman, L. (2022). Outer membrane vesicles: A bacterial-derived vaccination system. *Frontiers in Microbiology*, [online] Volume 13, p. 1029146. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1029146> [Accessed 21 Dec. 2022].

32. Lu, Y., Ma, N., Cheng, K., Liu, G., Liang, J., Xu, C., Li, D., Cao, C., Gao, X., Chen, L., Wang, X., Wang, Y., Zhao, X. and Jiang, K. (2025). An OMV-Based Nanovaccine as Antigen Presentation Signal Enhancer for Cancer Immunotherapy. *Advanced Materials*, [online] Volume 37(8), p. e2413392. Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.202413392> [Accessed 15 Jan. 2025].

33. Micoli, F., Adamo, R. and Nakakana, U. (2024). Outer Membrane Vesicle Vaccine Platforms. *BioDrugs*, 38(1), pp. 47–59.

34. Zhu, P., Ke, Z., Chen, J., Li, S., Ma, T. and Fan, X. (2023). Advances in mechanism and regulation of PANoptosis: Prospects in disease treatment. *Frontiers in Immunology*, [online] Volume 14, p. 1120034. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1120034> [Accessed 9 Feb. 2023].

35. Mustafa, M., Ahmad, R., Tantry, I., Ahmad, W., Siddiqui, S., Alam, M., Abbas, K., Moinuddin, Hassan, M., Habib, S. and Islam, S. (2024). Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*, [online] Volume 13(22), p. 1838. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells13221838> [Accessed 6

Nov. 2024].

36. Qian, S., Long, Y., Tan, G., Li, X., Xiang, B., Tao, Y., Xie, Z. and Zhang, X. (2024). Programmed cell death: molecular mechanisms, biological functions, diseases, and therapeutic targets. *MedComm*, [online] Volume 5(12), p. e70024. Available at: <https://doi.org/10.1002/mco2.70024> [Accessed 28 Nov. 2024].
37. Mosadegh, M., Noori Goodarzi, N. and Erfani, Y. (2025). A Comprehensive Insight into Apoptosis: Molecular Mechanisms, Signaling Pathways, and Modulating Therapeutics. *Cancer Investigation*, 43(1), pp. 33–58.
38. Broz, P. (2025). Pyroptosis: molecular mechanisms and roles in disease. *Cell Research*, 35(5), pp. 334–344.
39. Liu, Y., Pan, R., Ouyang, Y., Gu, W., Xiao, T., Yang, H., Tang, L., Wang, H., Xiang, B. and Chen, P. (2024). Pyroptosis in health and disease: mechanisms, regulation and clinical perspective. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, [online] Volume 9, p. 245. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01958-2> [Accessed 20 Sep. 2024].
40. Choi, M., Price, D., Ryter, S. and Choi, A. (2019). Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*, [online] Volume 4(15), p. e128834. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128834> [Accessed 8 Aug. 2019].
41. Tang, J., Zhuang, Y., Zhang, Y., Hu, H., Wang, H., Xu, H., Li, Y. and Tu, C. (2025). Necroptosis in cancer: insight from epigenetic, post-transcriptional and post-translational modifications. *Journal of Hematology & Oncology*, [online] Volume 18(1), p. 77. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13045-025-01726-x> [Accessed 30 Jul. 2025].
42. Place, D., Lee, S. and Kanneganti, T. (2021). PANoptosis in microbial infection. *Current Opinion in Microbiology*, 59, pp. 42–49.
43. Pandeya, A. and Kanneganti, T. (2024). Therapeutic potential of PANoptosis: innate sensors, inflammasomes, and RIPKs in PANoptosomes. *Trends in Molecular Medicine*, 30(1), pp. 74–88.

44. Christgen, S., Zheng, M., Kesavardhana, S., Karki, R., Malireddi, R., Banoth, B., Place, D., Briard, B., Sharma, B., Tuladhar, S., Samir, P., Burton, A. and Kanneganti, T. (2020). Identification of the PANoptosome: A Molecular Platform Triggering Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANoptosis). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [online] Volume 10, p. 237. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00237> [Accessed 29 May 2020].
45. Enosi Tuipulotu, D., Feng, S., Pandey, A., Zhao, A., Ngo, C., Mathur, A., Lee, J., Shen, C., Fox, D., Xue, Y., Kay, C., Kirkby, M., Lo Pilato, J., Kaakoush, N.O., Webb, D., Rug, M., Robertson, A.A.B., Tessema, M.B., Pang, S., Degrandi, D., Pfeffer, K., Augustyniak, D., Blumenthal, A., Miosge, L.A., Brüstle, A., Yamamoto, M., Reading, P.C., Burgio, G. and Man, S.M. (2023). Immunity against *Moraxella catarrhalis* requires guanylate-binding proteins and caspase-11-NLRP3 inflammasomes. *The EMBO Journal*, [online] Volume 42, p. e112558. Available at: <https://doi.org/10.15252/emboj.2022112558> [Accessed 10 Feb. 2023].
46. Liu, H., Liu, Y., Fan, W. and Fan, B. (2022). *Fusobacterium nucleatum* triggers proinflammatory cell death via Z-DNA binding protein 1 in apical periodontitis. *Cell Communication and Signaling*, [online] Volume 20, p. 196. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00959-4> [Accessed 20 Dec. 2022].
47. Gao, J., Xiong, A., Liu, J., Li, X., Wang, J., Zhang, L., Liu, Y., Xiong, Y., Li, G. and He, X. (2024). PANoptosis: bridging apoptosis, pyroptosis, and necroptosis in cancer progression and treatment. *Cancer Gene Therapy*, 31, pp. 970–983.
48. Wang, S., Song, A., Xie, J., Wang, Y.-Y., Wang, W.-D., Zhang, M.-J., Wu, Z.-Z., Yang, Q.-C., Li, H., Zhang, J. and Sun, Z.-J. (2024). Fn-OMV potentiates ZBP1-mediated PANoptosis triggered by oncolytic HSV-1 to fuel antitumor immunity. *Nature Communications*, [online] Volume 15(1), p. 3669. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48032-7> [Accessed 30 Apr. 2024].
49. Pang, Z., Gu, M.-D. and Tang, T. (2022). *P. aeruginosa* in Cancer Therapy: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives. *Frontiers in*

Oncology, [online] Volume 12, p. 891187. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891187> [Accessed 28 Apr. 2022].

50. Li, N., Wu, M., Wang, L., Tang, M., Xin, H. and Deng, K. (2024). Efficient Isolation of Outer Membrane Vesicles (OMVs) Secreted by Gram-Negative Bacteria via a Novel Gradient Filtration Method. *Membranes*, [online] Volume 14(6), p. 135. Available at: <https://doi.org/10.3390/membranes14060135> [Accessed 6 Jun. 2024].

51. Kuerban, K., Gao, X., Zhang, H., Liu, J., Dong, M., Wu, L., Ye, R., Feng, M. and Ye, L. (2020). Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(8), pp. 1534–1548.

52. Lakowicz, J. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer.

53. Zubova, G., Melnyk, H., Zaets, I., Sergeyeva, T., Havryliuk, O., Rogalsky, S., Khirunenko, L., Zaika, L., Ruban, T., Antonenko, S. and Kozyrovska, N. (2024). Halochromic Bacterial Cellulose/Anthocyanins Hybrid Polymer Film with Wound-Healing Potential. *Polymers*, [online] Volume 16(16), p. 2327. Available at: <https://doi.org/10.3390/polym16162327> [Accessed 16 Aug. 2024].