

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В РЕГУЛЯЦИИ АУТОФАГИИ

© 2025 г. А. А. Яковлев^{1, 2, *}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

*E-mail: al_yakovlev@ihna.ru

Поступила в редакцию 01.07.2024 г.

После доработки 05.10.2024 г.

Принята к публикации 12.10.2024 г.

Интерес научного сообщества к внеклеточным везикулам (ВВ) растет с каждым годом. ВВ представляют собой ограниченные липидной мембранные пузырьки, содержащие сотни белков и нуклеиновых кислот. ВВ секретируются практически всеми клетками организма и способны длительное время циркулировать в кровотоке. Также одной из отличительных особенностей ВВ является способность проникать через гистогематические барьеры. Неудивительно, что ВВ привлекают внимание прежде всего потому, что потенциально могут быть использованы для диагностики и терапии заболеваний. Однако у ВВ есть также и роль в нормальном функционировании организма. В дополнение к уже известным примерам межклеточной коммуникации с использованием ВВ в последнее время появились примеры того, что ВВ регулируют аутофагию, по крайней мере в нервных клетках. В зависимости от типа клетки-реципиента ВВ могут как активировать, так и угнетать аутофагию. Возможно, регуляция аутофагии в мозге включает в себя межклеточный сигналинг с участием ВВ.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; нейроны, сигналинг, аутофагия

DOI: 10.31857/S1027813325010114, **EDN:** DKCCHI

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время внеклеточные везикулы (ВВ) привлекают внимание исследователей из всех областей биологии [1]. ВВ не представляют собой ничего иного, кроме как ограниченные липидной мембранные пузырьки с внутренней водной средой и содержимым биологического происхождения, имеющие размер порядка сотен нанометров [1]. Эти везикулы не способны к самовоспроизведению в том смысле, что не содержат ядра и всего аппарата ферментов копирования нуклеиновых кислот [1]. Данное определение не исключает существование подобных структур в любом месте вселенной, возможность искусственного происхождения ВВ и невозможность попадания/нахождения в ВВ фармакологически активных веществ, но именно такое очень общее определение является в настоящее время наиболее распространенным. Хотя слабость такого определения очевидна, оно позволяет, например, отличить ВВ от внеклеточных липидных капель или белковых агрегатов [2]. Все типы ВВ отличаются друг от друга биогенезом. Точка зрения на физиологическую функцию ВВ за последние десятилетия несколько раз менялась, и сейчас ВВ принято считать новым

агентом межклеточной коммуникации. Основные типы ВВ – экзосомы и эктосомы – секретируются практически постоянно всеми клетками организма и содержатся практически в любой жидкости биологического происхождения. Эктосомы и экзосомы отличаются биогенезом, но по многим своим свойствам зачастую неотличимы друг от друга.

Международное сообщество по исследованию внеклеточных везикул активно занимается созданием классификации ВВ [3]. Однако к настоящему времени такая классификация еще не создана и считается, что точная идентификация типа ВВ в подавляющем большинстве случаев представляет собой невыполнимую задачу – практически никогда предметом исследования не становится происхождение изучаемых ВВ, их биогенез. А биогенез практически все, что отличает везикулы разных типов друг от друга. Для большинства практических целей в настоящее время сообщество допускает использование обобщающего термина ВВ, без уточнения конкретного типа везикулы, и в зависимости от размера ВВ может подразделять их на малые и большие, меньше или больше 200 нм размером, соответственно [3]. Стоит заметить, что во многих статьях авторы делают заключение

о принадлежности везикул к экзосомам или эктосомам на основании окрашивания на некоторые антигены. Эта практика способна лишь запутать других исследователей, так как подавляющее большинство везикулярных антигенов экспрессируются на везикулах разных типов [4], так что использованным в статьях названиям везикул не стоит верить безоговорочно. При таком положении дел в большинстве ситуаций исследователям ничего не остается, кроме как употреблять самые общие названия, такие, например, как термин малые ВВ, если, скажем, с помощью электронной микроскопии показано, что размер везикул попадает в диапазон 50–200 нм. Усложняет ситуацию тот факт, что большинство современных методов выделения ВВ отбирают их по размеру, плотности или поверхностным антигенам. Более или менее исследованные в настоящее время классы везикул, в том числе экзосомы и эктосомы, зачастую не отличаются друг от друга по этим характеристикам.

Особенный интерес к исследованию ВВ основан на нескольких их важных свойствах. Первое, ВВ содержат опознавательные знаки для собственных макрофагов, что позволяет ВВ относительно долго циркулировать в крови [5]. Один из основных опознавательных знаков – молекула CD47 на поверхности ВВ [5]. Кроме того, ВВ являются своеобразными наноконтейнерами, защищающими свое внутреннее содержимое от гидролитических ферментов [5]. Второе, видимо, для ВВ проницаемы все гистогематические барьеры, и гематоэнцефалический в том числе [6]. К сожалению, механизм проникновения ВВ через гистогематические барьеры в настоящее время остается невыясненным, хотя и существуют эмпирические подтверждения этого факта [6]. Перечисленные качества ВВ позволяют исследователям в этой области считать, что в будущем они будут активно востребованы в диагностике и терапии заболеваний человека.

Смена представлений о роли ВВ в организме произошла буквально за последнее десятилетие [7]. Раньше самой распространенной была позиция, согласно которой ВВ являются конечными продуктами эндотилозомальной системы, выброшенными клеткой наружу за ненадобностью. Сейчас же повсеместно признается, что ВВ принимают участие в межклеточной коммуникации [7].

Первыми указаниями на существование ВВ можно считать работы 1940-х гг. по механизмам свертывания крови [8, 9]. В этих работах было показано, что добавление осадка после высокоскоростного центрифугирования плазмы крови к очищенной плазме приводит к значительному уменьшению времени свертывания, а сама фракция осадка представляет собой продукты распада тромбоцитов, частицы очень маленького размера. Сегодня понятно, что так были открыты малые ВВ тромбоцитов. Впрочем, до выяснения

везикулярной природы этих частиц прошло еще немало лет. Везикулярная природа осадка после высокоскоростного центрифугирования была доказана в 1960-х гг. с помощью электронной микроскопии и была описана как фракция, происходящая из тромбоцитов, но тромбоцитами не являющаяся [10]. Несколько позже было показано, что подобные везикулы можно получить также и из плазмы, очищенной от тромбоцитов [11]. Тогда же было показано, что эти везикулы содержат липиды, АТФ и белки, что уже может являться намеком на выполняемую этими везикулами функцию [11]. Такие везикулы не могут представлять собой ничего иного, кроме как то, что сейчас называется эктосомами – маленькими везикулами, отшнуровывающимися от плазматической мембранны. Но, как мы сейчас знаем, существует и другой тип ВВ – экзосомы, являющиеся продуктом слияния мультивезикулярного тела (МВТ) и плазматической мембранны. Их существование было предсказано примерно в это же время [12].

В 1980-х гг. произошло существенное обновление знаний о ВВ, и фактически изучение ВВ стало отдельной экспериментальной областью. Было показано, что во время созревания ретикулоцитов рецептор трансферрина переходит из мембранны во внутриклеточные органеллы, а затем секретируется в составе ВВ, и тогда же за этими ВВ закрепился термин “экзосомы” [13, 14]. В этих работах родился и метод выделения ВВ, остающийся золотым стандартом до настоящего времени, – ультракентрифугирование при 100 000 g. Выбранная экспериментальная модель наложила отпечаток на понимание роли экзосом в физиологии. Так как ретикулоциты в процессе созревания утрачивают характерные белки, в том числе рецептор трансферрина и транспортер нуклеозидов, и эти белки оказываются в секретированных экзосомах, то как раз после этих работ появилась продержавшаяся долгое время точка зрения на ВВ как на средство удаления клеткой ненужных отслуживших белков [15]. Периодически такой взгляд на ВВ встречается и сегодня.

Немного забегая вперед и чуть-чуть отклоняясь в сторону, стоит немного сказать о связи ВВ и белков, транспортирующих железо. Дело в том, что к 2010-м гг. выяснилось, что ВВ содержат не только рецептор трансферрина, но и переносчики железа ферритин, лактоферрин и собственно трансферрин [16]. Судя по всему, с помощью ВВ клетки могут избавляться от ионов железа и тем самым увеличивать свою устойчивость к железо-зависимой клеточной гибели, ферроптозу [17]. В то же время ВВ также могут приносить ионы железа в какие-то клетки и увеличивать чувствительность клеток к ферроптозу [18]. Таким образом, к настоящему времени понятно, что ВВ связаны с регуляцией ферроптоза в клетках, но детали этой регуляции

еще далеки от выяснения. Также важно отметить, что, несмотря на отличия ферроптоза от аутофагической клеточной гибели, по некоторым проявлениям эти процессы похожи [19]. Из этого сходства может проистекать и путаница — и повышение устойчивости клеток к ферроптозу может быть принято за повышение устойчивости клеток к аутофагической клеточной гибели.

В 1990-х гг. происходило активное накопление данных о структурных особенностях ВВ. В частности, были определены белки, которые сегодня считаются маркерами ВВ того или иного происхождения. Было показано, что малые ГТФазы семейства Rab содержатся внутри экзосом в уже упоминавшейся модели созревания ретикулоцитов [20]. В-лимфоциты секрецируют экзосомы, содержащие тетраспанины [21], основные белковые маркеры экзосом на сегодняшний день. Были описаны ферменты, связанные с ВВ [22]. С помощью новых методов количественной детекции ВВ, в первую очередь цитофлуориметрии, было впервые проведено количественное определение числа ВВ в крови для некоторых заболеваний.

Изучению везикулярной коммуникации между клетками организма сейчас посвящено довольно много исследований, а первые работы, подчеркивающие сигнальные свойства ВВ, появились именно в 1990-х гг. и касались роли везикул в обмене информацией между клетками иммунной системы [23, 24]. В самой первой работе по этой теме было показано, что дендритные клетки секретируют белки главного комплекса гистосовместимости II типа в составе ВВ [23]. Более того, дендритные клетки за счет секреции ВВ значительно повышают противоопухолевую защиту организма [24]. Таким образом, оказалось, что ВВ могут выполнять биологическую функцию. Эти работы стали переломными для осознания ВВ как перспективной области современной физиологии.

В 2000-е гг. вышло несколько крупных дополнений к пониманию функции ВВ. В те годы были опубликованы работы, посвященные белковому и липидному составу ВВ, но настоящим прорывом стало изучение нуклеиновых кислот в составе ВВ. Оказалось, что ВВ содержат мРНК, причем концентрация некоторых мРНК внутри ВВ была значительно больше, чем в родительских клетках [25]. По крайней мере некоторые из перенесенных мРНК могли транслироваться в клетках-реципиентах, а полученный белковый продукт выполнял свои функции. Вскоре было продемонстрировано, насколько масштабен может быть перенос РНК между клетками. Мало того, что в составе ВВ было обнаружено более тысячи разных мРНК, по крайней мере часть из которых была функциональной, так еще и внутри ВВ было обнаружено более сотни микроРНК, обладающих регуляторными свойствами [26].

Примерно пятая часть всех мРНК была обнаружена только внутри ВВ и не обнаружена в клетках-донорах, то есть эти мРНК клетки делают исключительно на экспорт. В этой же работе было продемонстрировано, что с помощью ВВ можно переносить мРНК мыши в клетки человека, после чего получать функциональные мышиные белки в человеческих клетках [26]. Эта статья совершила настолько большой прорыв в понимании функции ВВ, что на сегодняшний день она является самой цитируемой работой во всей везикулярной биологии.

Следующая работа подтвердила перенос большого числа функциональных мРНК между клетками посредством ВВ и впервые показала, как это может использоваться раковыми клетками [27]. Оказалось, что ВВ от раковых клеток активируют пролиферацию раковых клеток и стимулируют ангиогенез в своем окружении. В те же 2000-е гг. впервые вышли достаточно подробные методические рекомендации по работе с ВВ [28].

Таким образом, за несколько лет произошел серьезный пересмотр роли и функции ВВ в организме, появились конкретные практические приложения ВВ к диагностике заболеваний и возникли первые попытки пристроить ВВ в терапию различных патологий. Можно сказать, что в те годы был сформирован набор теоретических представлений о ВВ, которым мы пользуемся и сегодня. С тех пор везикулярная биология в основном движется вширь, для все большего числа патологий открываются диагностические применения ВВ, для все большего числа типов клеток находятся подтверждения сигнальной функции ВВ, и с применением все большего числа биотехнологических подходов проводятся попытки применить ВВ в терапии.

КЛЕТКИ ОБМЕНИВАЮТСЯ ИНФОРМАЦИЕЙ С ПОМОЩЬЮ ВВ

Со времени пионерских работ прошло уже около двадцати лет, и во многих органах и тканях были обнаружены примеры обмена информацией между клетками с помощью ВВ. Основной упор современных работ по этой теме направлен на поиск тех молекул в составе ВВ, которые непосредственно отвечают за физиологический эффект. Основной интерес направлен на исследование микроРНК в составе ВВ и на исследование регуляторных функций этих микроРНК. Можно отметить некоторую слабость подхода, в котором центральное место занимают микроРНК, и эта слабость заключается в очень широкой специфичности микроРНК как класса нуклеиновых кислот. Широкая специфичность микроРНК заключается в том, что одна и та же молекула микроРНК может регулировать экспрессию нескольких белков. По этой причине получается, что одни и те же микроРНК

изменяются при разных функциональных состояниях организма, например при разных заболеваниях. Например, при нескольких заболеваниях мозга изменяется везикулярная концентрация одних и тех же миРНК [29]. Таким образом, миРНК привлекают внимание исследователей, занимающихся исследованием межклеточной коммуникации с помощью ВВ, но зачастую исследования миРНК не дают точного ответа, что же именно изменяется за счет этих регуляторных молекул.

За последние годы достигнуты успехи в идентификации белков и нуклеиновых кислот в составе ВВ, а также важность конкретных молекул в составе ВВ для межклеточной коммуникации. Особенно активно исследования состава и функции ВВ проводятся в нервной и иммунной системах, не в последнюю очередь вследствие того, что клетки в этих системах организма очень интенсивно обмениваются информацией. Предварительно можно остановиться на роли ВВ в нервной системе. Уже довольно давно известно, что нейроны секретируют ВВ, влияющие на работу других нейронов [30] и окружающих эндотелиальных клеток [31]. Однако исследования последних лет позволяют с другой стороны взглянуть на процесс межклеточной коммуникации с использованием ВВ. Оказывается, несколько формальных обстоятельств позволяют считать ВВ новой системой межнейронной коммуникации [32]. В нейронах ВВ накапливаются в синапсах и высвобождаются в ответ на повышение концентрации ионов кальция. Это именно та схема, по которой секретируются канонические нейротрансмиттеры. Возможно, у ВВ в мозге также есть и свои рецепторы.

Примеры коммуникации посредством ВВ также касаются и клеток других типов в головном мозге. Олигодендроциты секретируют ВВ, которые стимулируют аксональный транспорт в окружающих нейронах [33]. Астроцитарные ВВ изменяют спонтанную активность нейронов [34], существенно изменяют вызванную активность нейронов [35], а также изменяют морфологию синаптического аппарата нейронов [36]. Работы по везикулярной коммуникации в мозге, в принципе, объединены примерно одной интерпретацией: в норме клетки мозга с помощью ВВ помогают нейронам выполнять свою работу или с помощью ВВ другие клетки мозга оказывают нейронам трофическую поддержку [37, 38]. Однако при возникновении в мозге достаточно продолжительной патологической ситуации ВВ мозга начинают оказывать губительное действие на нейроны [39].

В настоящее время факт обмена информацией между клетками организма посредством ВВ не ставится под сомнение. Тем не менее молекулярные механизмы адресной доставки ВВ, их интернализации и внутриклеточной сортировки остаются

изучены совершенно недостаточно. Лишь единичные работы указывают на роль специфических молекул в распознавании ВВ клетками и роль конкретных молекул в составе ВВ в реализации тех или иных функций. Почему же так мало работ, посвященных роли конкретных макромолекул в составе ВВ? Причина в том, что такие эксперименты сложны в реализации и для их проведения зачастую не хватает возможностей соответствующих технологий изучения везикул. Такое положение дел, однако, не является препятствием для разработки диагностических тестов и даже для создания терапии на основе ВВ [40]. Ниже приведены примеры подобных исследований.

ВВ от макрофагов вызывают двукратное увеличение пролиферации эндотелиальных клеток *in vitro* за 24 ч, а *in vivo* за две недели под действием ВВ макрофагов число новых сосудов увеличивается втрое [41]. Эффект, судя по всему, опосредован ростовыми факторами VEGF и Wnt3a, концентрация которых внутри макрофагальных ВВ несоизмеримо больше, чем их концентрация собственно внутри самих макрофагов. Эти же ВВ вызывают и миграцию эндотелиальных клеток к месту повреждения. Эта работа показывает, что клетки, продуцирующие ВВ, на экспорт производят не только нуклеиновые кислоты, но и функциональные белки [41].

Макрофаги жировой ткани секретируют ВВ, которые определяют многие свойства окружающих адипоцитов [42]. Например, макрофаги мышей с ожирением секретируют ВВ, которые вызывают множество негативных эффектов при их введении интактным мышам. Среди этих эффектов инсулинорезистентность, увеличение производства глюкозы печенью, повышение концентрации глюкозы в крови. И наоборот, ВВ из макрофагов мышей с нормальным весом оказывают благотворное влияние при их введении мышам с ожирением [42]. Все эффекты ВВ макрофагов нормальных мышей и мышей с ожирением оказались опосредованы миРНК. Ожирение вызывает трехкратное повышение концентрации miR-155 как в макрофагах, так и в секретируемых ими ВВ, а эти ВВ в свою очередь вызывают примерно такое же повышение концентрации miR-155 в клетках-реципиентах: адипоцитах, миоцитах и гепатоцитах. Авторы выяснили, что содержащаяся в ВВ miR-155 опосредует существенную часть эффектов ВВ, а на молекулярном уровне на увеличение внутриклеточной концентрации miR-155 адипоциты, миоциты и гепатоциты реагируют трехкратным-пятикратным снижением концентрации фосфорилированной по 473 серину протеинкиназы АКТ [42].

Уникальные свойства обнаружены у ВВ нейрональных стволовых клеток. Нейрональные стволовые клетки выделяли из спинного мозга эмбриона мыши, культивировали их в присутствии ростовых

факторов, а из культуральной жидкости собирали ВВ. Эти ВВ способны снижать апоптоз нейронов, ингибировать нейровоспаление и стимулировать функциональное восстановление животных после травмы спинного мозга [43]. На модели глутаматной экзайтотоксичности было показано, что гибель первичных нейронов под действием глутамата снижается в два раза, если предварительно в течение суток проинкубировать эти нейроны в среде, содержащей ВВ от нейрональных стволовых клеток. При этом ВВ снижают экспрессию как активной формы каспазы-3, так и экспрессию Bax в два раза и двукратно повышают экспрессию Bcl-2 [43]. На фоне снижения активности апоптотических ферментов и экспрессии проапоптотических белков происходит усиление аутофагии. А именно, в клетках, обработанных ВВ от нейрональных стволовых клеток, содержится в три раза больше аутофагосом в расчете на клетку и увеличена экспрессия маркеров аутофагии. Более того, ингибирование аутофагии не только снимает защитный эффект ВВ нейрональных стволовых клеток на гибель первичных нейронов, но и повышает активность и экспрессию проапоптотических белков в этих клетках [43].

АУТОФАГИЯ И ЕЕ РОЛЬ В МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ВВ

Аутофагией называется процесс расщепления внутриклеточных макромолекул до мономеров, например расщепления белков до аминокислот [44]. Макромолекулы сначала расщепляются в лизосомах, а получившиеся мономеры используются для строительства новых макромолекул. Лизосомы являются конечным пунктом сбора всех макромолекул, предназначенных к деградации, так что лизосомы являются тем внутриклеточным компонентом, без которого аутофагия произойти не может. Среди индукторов аутофагии не только нехватка питательных веществ, но и многие другие стрессы факторы. Аутофагия может быть индуцирована различными формами клеточного стресса, включая нехватку факторов роста, гипоксию, избыток активных форм кислорода, повреждение ДНК, накопление белковых агрегатов, поврежденных органелл или проникновение в клетку патогенов, хотя механизм активации аутофагии далеко не всегда понятен [45]. Запуск аутофагии в ответ на стресс в первую очередь предохраняет клетку от гибели. Аутофагия и есть тот самый быстрый ответ на стресс в виде расщепления ненужных и поврежденных белков, из фрагментов которых клетка нарабатывает новые белки, специфически необходимые в конкретной стрессовой ситуации.

Некоторое время назад считалось, что при нехватке питательных веществ аутофагия в нейронах не индуцируется [46]. Однако сейчас более или менее понятно, что в нейронах даже при

кратковременной нехватке питательных веществ запускается аутофагия [47–50]. И роль аутофагии в нейронах существенно больше, чем восстановление энергетического запаса. Так, у мышей без аутофагии существенно увеличивается гибель нейронов и развивается поведенческий дефицит [51, 52]. Практически во всех регионах мозга мышей с неактивной аутофагией накапливаются нефункциональные формы белков, причем с возрастом накопление только усиливается [51, 53]. В мышной модели болезни Альцгеймера показано снижение эффективности аутофагии, а терапевтическое восстановление интенсивности аутофагии снижает выраженность когнитивного дефицита и снижает концентрацию бета-амилоида в мозге [54, 55]. Похожую роль играет аутофагия в моделях болезни Хантингтона [56, 57] и при боковом амиотрофическом склерозе [58]. В модельных ситуациях развитие болезни Паркинсона угнетает аутофагию, а активация аутофагии снижает проявления болезни и предотвращает клеточную гибель [59–61].

Таким образом, недостаточная интенсивность аутофагии легко может приводить к серьезным заболеваниям, и некоторые авторы заключают, что в целом нейродегенеративные заболевания являются результатом снижения интенсивности аутофагии [62]. По крайней мере в том смысле, что в процессе аутофагии устраняются нежелательные клеточные компоненты, такие как нефункциональные белки или целые органеллы, не вызывает сомнения, что аутофагия полезна для нейронов. На основании результатов исследований роли аутофагии уже сформулированы терапевтические подходы к лечению заболеваний мозга [63, 64].

Теперь самое время вернуться к обсуждению связи ВВ с аутофагией (рис. 1). Если культуру первичных микроглиальных клеток однократно обработать ВВ от нейрональных стволовых клеток, то в этих клетках в три раза снижается вызванное воспалением производство NO, и этот эффект заметен на протяжении четырех дней. Также ВВ от нейрональных стволовых клеток снижают производство провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли альфа (ФНО альфа), интерлейкина-1бета и интерлейкина-6. Ингибирование аутофагии снижает этот эффект. Наиболее примечателен эффект, который ВВ нейрональных стволовых клеток оказывают *in vivo*. Животных подвергали травме спинного мозга, и части из них сразу же после травмы внутривенно вводили ВВ нейрональных стволовых клеток. Уже через 6 ч у этих животных в нейронах спинного мозга в месте травмы повышалась экспрессия маркеров аутофагии, а начиная с седьмого дня моторная функция животных, получивших ВВ нейрональных стволовых клеток, была достоверно лучше, чем у контрольных, и восстанавливалась быстрее, чем у контроля, в течение четырех недель [43]. По данным МРТ животные, получившие

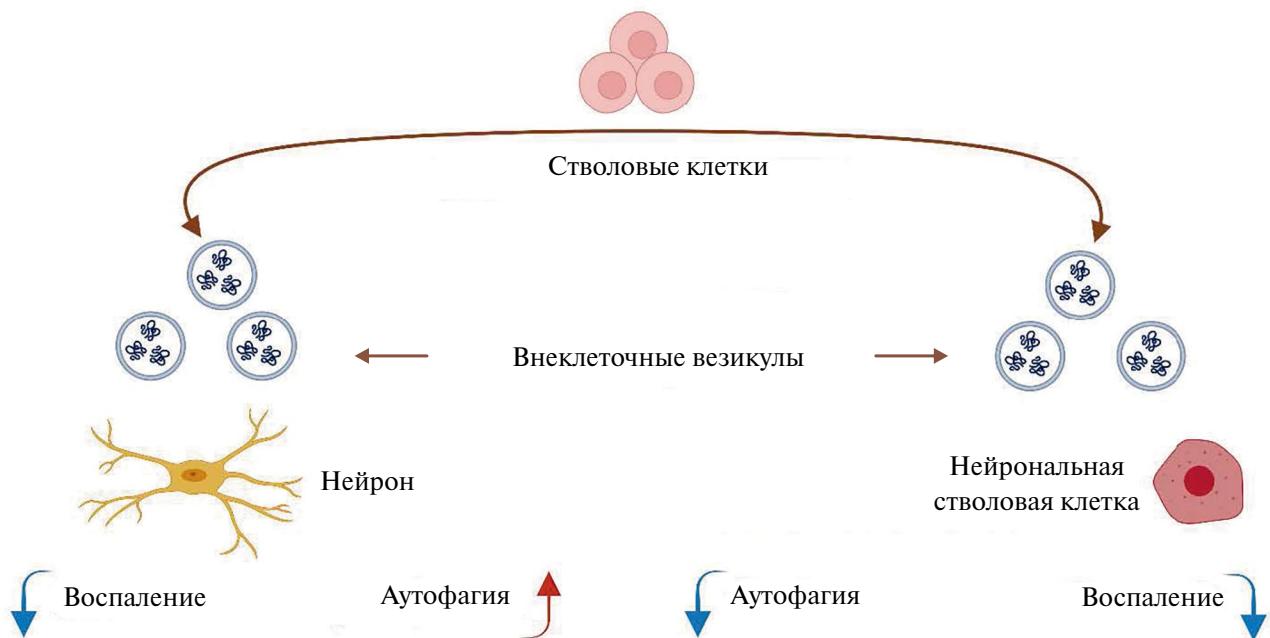


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая способность ВВ от стволовых клеток как угнетать, так и усиливать аутофагию в клетках разных типов.

ВВ нейрональных стволовых клеток, после этих четырех недель продемонстрировали примерно в два раза меньшее по объему повреждение, чем контрольные животные. При окрашивании срезов спинного мозга по Нисслю зона повреждения также была меньше. На третий день после травмы в зоне вокруг повреждения было в три раза меньше активированных клеток микроглии у животных, получивших ВВ нейрональных стволовых клеток. Также в зоне повреждения была существенно менее выраженной экспрессия провоспалительных цитокинов ФНО альфа, интерлейкин-1бета и интерлейкин-6. Можно заключить, что механизм, по которому оказывают свое действие ВВ нейрональных стволовых клеток, становится более или менее понятен [43]. А именно, так же как и на модели первичных нейронов *in vitro*, эти везикулы стимулируют аутофагию и у животных после травмы спинного мозга *in vivo*. Защитный эффект развивается очень быстро, уже в течении нескольких часов после введения ВВ нейрональных стволовых клеток и в модели на животных, и в культуре, и продолжается несколько дней или даже, возможно, неделю.

Среди содержимого ВВ от нейрональных стволовых клеток можно предположить наличие каких-то определенных белков, вызывающих устойчивость клеток к гибели. Вероятно, одним из таких белков является белок 14-3-3t [65]. Все обнаруженные эффекты ВВ от нейрональных стволовых клеток на аутофагию, гибель и воспаление снижались после нокаута гена 14-3-3t и увеличивались после

оверэкспрессии гена этого белка в нейрональных стволовых клетках, служивших донорами ВВ. При этом белок 14-3-3t в норме содержится в ВВ, и если в клетках провести нокаут или оверэкспрессию этого белка, то его секреция в составе ВВ снижается или увеличивается соответственно. В клетках-реципиентах белок 14-3-3t физически взаимодействует с белком Beclin-1, что в свою очередь приводит к активации аутофагии и последующим благоприятным эффектам [65]. В принципе, давно известно, что адапторные белки семейства 14-3-3 у эукариот принимают участие в большом числе внутриклеточных регуляторных процессов. Теперь к числу этих процессов можно также отнести межклеточную регуляцию посредством ВВ.

Для того чтобы ВВ обладали нейропротекторным действием, не обязательно в качестве источника ВВ использовать стволовые клетки нейронального происхождения. Оказывается, для этой цели также прекрасно подходят мезенхимные стволовые клетки, МСК [66]. Под действием трансформирующего фактора роста бета1 (ТФР-бета1) МСК секретируют практически в два раза больше ВВ в культуральную среду, и такие ВВ как раз и оказывают наиболее драматический эффект *in vitro* и *in vivo*. Если животным с травмой спинного мозга вводить ВВ, то введенные ВВ накапливаются именно в месте травмы. Авторы обосновывают предположение, что основной мишенью ВВ являются нестин-положительные нейрональные стволовые клетки (НСК) в спинном мозге травмированных животных, хотя и проверяют это на

культуре НСК [66]. Основным эффектом ВВ является пролиферация НСК и их дифференцировка в нейроны. Кроме того, под воздействием ВВ НСК четырехкратно увеличивают секрецию эпидермального фактора роста (EGF), мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и фактора роста фибробластов 2 (FGF-2). Под действием ФНО альфа НСК начинают погибать по апоптотическому сценарию, а такая ситуация возникает в спинном мозге после травмы. Так, ВВ в этой модели *in vitro* снижают число апоптотических клеток, предотвращают активацию каспазы-3 и усиливают экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2. Примерно такое же по выраженности снижение гибели клеток, увеличение экспрессии Bcl-2 и подавление экспрессии каспазы-3 наблюдается в зоне повреждения на седьмой день после травмы спинного мозга *in vivo*, если сразу же после травмы внутривенно ввести животным ВВ МСК. На этом же сроке ВВ МСК снижают провоспалительную активацию микроглии в зоне повреждения и в два-четыре раза снижают концентрацию провоспалительных (ФНО альфа, интерлейкинов -6 и -1бета) и повышают концентрацию противовоспалительных цитокинов (интерлейкинов -4 и -10). За эти же семь дней после травмы в эпицентре повреждения под действием ВВ МСК увеличивается число НСК, а также экспрессия в этой зоне протеинкиназы mTOR, ее фосфорилированной по серину 2448 активной формы и адапторного белка Rictor. На микроскопическом уровне на этом сроке видно увеличение числа нейритов и уменьшение глиального рубца под действием ВВ МСК. Моторная функция животных после травмы спинного мозга начиная уже с четвертой недели после травмы достоверно улучшается по сравнению с контролем после однократной инъекции ВВ (сразу после травмы). Таким образом, в этой модели авторы показали усиление активности комплекса mTORC2/Rictor, и, видимо, снижение аутофагии под действием ВВ МСК, но только в одном типе клеток, НСК [66]. Другие типы клеток не были столь пристально изучены, и делать выводы о снижении аутофагии в этих клетках нельзя. Возможно, ВВ стволовых клеток выступают положительным регулятором аутофагии в нейронах [43] и отрицательным регулятором аутофагии в нейрональных стволовых клетках [66]. По крайней мере на сегодняшний день такое объяснение эффектов ВВ выглядит наиболее доказанным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работы последних лет однозначно указывают на то, что ВВ регулируют аутофагию в нейронах [43], причем могут не только активировать, но и угнетать аутофагию [66]. Эта роль ВВ на сегодняшний день явно недооценена. Хотя работы, посвященные этой теме, выходят уже несколько лет, важность

именно этого аспекта межклеточного обмена ВВ пока под вопросом. Если дальнейшие исследования покажут, что ВВ в разных экспериментальных ситуациях регулируют аутофагию в нейронах, это сделает межклеточную коммуникацию с использованием ВВ одним из центральных механизмов ответа организма на стресс.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках госзадания ИВНД и НФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van Niel G., Carter D.R.F., Clayton A., Lambert D.W., Raposo G., Vader P. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2022. V. 23. № 5. P. 369–382.
2. Amarasinghe I., Phillips W., Hill A.F., Cheng L., Helbig K.J., Willms E., Monson E.A. // J. Extracell. Biol. 2023. V. 2. № 3. P. e77.
3. Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., Buzas E.I., Blenkiron C., Bussolati B., Cai H., Di Vizio D., Driedonks T.A.P., Erdbrügger U., Falcon-Perez J.M., Fu Q.L., Hill A.F., Lenassi M., Lim S.K., Mahoney M.G., Mohanty S., Möller A., Nieuwland R., Ochiya T., Sahoo S., Torrecilhas A.C., Zheng L., Zijlstra A., Abuelreich S., Bagabas R., Bergese P., Bridges E.M., Brucale M., Burger D., Carney R.P., Cocucci E., Crescitelli R., Hanser E., Harris A.L., Haughey N.J., Hendrix A., Ivanov A.R., Jovanovic-Talismann T., Kruh-Garcia N.A., Ku'ulei-Lyn Faus-tino V., Kyburz D., Lässer C., Lennon K.M., Lötvall J., Maddox A.L., Martens-Uzunova E.S., Mizenko R.R., Newman L.A., Ridolfi A., Rohde E., Rojalin T., Rowland A., Saftics A., Sandau U.S., Saugstad J.A., Shekari F., Swift S., Ter-Ovanesyan D., Tosar J.P., Useckaite Z., Valle F., Varga Z., van der Pol E., van Herwijnen M.J.C., Wauben M.H.M., Wehman A.M., Williams S., Zendrini A., Zimmerman A.J.; MISEV Consortium; Théry C., Witwer K.W. // J. Extracell. Vesicles. 2024. V. 13. № 2. P. e12404.
4. Jeppesen D.K., Zhang Q., Franklin J.L., Coffey R.J. // Trends Cell Biol. 2023. V. 33. № 8. P. 667–681.
5. Kamerkar S., Lebleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. // Nature. 2017. V. 546. № 7659. P. 498–503.
6. Khaspekov L.G., Yakovlev A.A. // Neurochem. J. 2023. V. 17. № 1. P. 1–9.
7. Couch Y., Buzas E.I., Di Vizio D., Gho Y.S., Harrison P., Hill A.F., Lötvall J., Raposo G., Stahl P.D., Théry C., Witwer K.W., Carter D.R.F. // J. Extracell. Vesicles. 2021. V. 10. № 14. P. e12144.
8. Chargaff E. // J. Biol. Chem. 1945. V. 160. № 1. P. 351–359.
9. Chargaff E., West R. // J. Biol. Chem. 1946. V. 166. № 1. P. 189–197.

10. Wolf P. // Br. J. Haematol. 1967. V. 13. № 3. P. 269–288.
11. Crawford N. // Br. J. Haematol. 1971. V. 21. № 1. P. 53–69.
12. Nunez E.A., Wallis J., Gershon M.D. // Am. J. Anat. 1974. V. 141. № 2. P. 179–201.
13. Harding C., Heuser J., Stahl P. // J. Cell Biol. 1983. V. 97. № 2. P. 329–339.
14. Pan B.T., Johnstone R.M. // Cell. 1983. V. 33. № 3. P. 967–978.
15. Johnstone R.M., Mathew A., Mason A.B., Teng K. // J. Cell. Physiol. 1991. V. 147. № 1. P. 27–36.
16. Truman-Rosentvit M., Berenbaum D., Spektor L., Cohen L.A., Belizowsky-Moshe S., Lifshitz L., Ma J., Li W., Kesselman E., Abutbul-Ionita I., Danino D., Gutierrez L., Li H., Li K., Lou H., Regoni M., Poli M., Glaser F., Rouault T.A., Meyron-Holtz E.G. // Blood. 2018. V. 131. № 3. P. 342–352.
17. Brown C.W., Mercurio A.M. // Mol. Cell. Oncol. 2020. V. 7. № 3. P. 1730144.
18. Wu J., Li Z., Wu Y., Cui N. // Cell Death Discov. 2024. V. 10. № 1. P. 1–9.
19. Yan H., Zou T., Tuo Q., Xu S., Li H., Belaïdi A.A., Lei P. // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. V. 6. № 1. P. 1–16.
20. Vidal M.J., Stahl P.D. // Eur. J. Cell Biol. 1993. V. 60. № 2. P. 261–267.
21. Escola J.M., Kleijmeer M.J., Stoorvogel W., Griffith J.M., Yoshie O., Geuze H.J. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 32. P. 20121–20127.
22. Johnstone R.M., Bianchini A., Teng K. // Blood. 1989. V. 74. № 5. P. 1844–1851.
23. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C.V., Melfi C.J., Geuze H.J. // J. Exp. Med. 1996. V. 183. № 3. P. 1161–1172.
24. Zitvogel L., Regnault A., Lozier A., Wolfers J., Flament C., Tenza D., Ricciardi-Castagnoli P., Raposo G., Amigorena S. // Nat. Med. 1998. V. 4. № 5. P. 594–600.
25. Ratajczak J., Miekus K., Kucia M., Zhang J., Reca R., Dvorak P., Ratajczak M.Z. // Leukemia. 2006. V. 20. № 5. P. 847–856.
26. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. // Nat. Cell Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 654–659.
27. Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Sena-Esteves M., Curry W.T., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. // Nat. Cell Biol. 2008. V. 10. № 12. P. 1470–1476.
28. Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. // Curr. Protoc. Cell Biol. 2006. V. 30. № 1. P. 3.22.1–3.22.29.
29. Gruzdev S.K., Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // Cell. Mol. Neurobiol. 2019. V. 39. № 6. P. 729–750.
30. Lachenal G., Pernet-Gallay K., Chivet M., Hemming F.J., Belly A., Bodon G., Blot B., Haase G., Goldberg Y., Sadoul R. // Mol. Cell. Neurosci. 2011. V. 46. № 2. P. 409–418.
31. Schiera G., Proia P., Alberti C., Mineo M., Savettieri G., Di Liegro I. // J. Cell. Mol. Med. 2007. V. 11. № 6. P. 1384–1394.
32. Yakovlev A.A. // Biochem. Mosc. 2023. V. 88. № 4. P. 457–465.
33. Frühbeis C., Kuo-Elsner W.P., Müller C., Barth K., Peris L., Tenzer S., Möbius W., Werner H.B., Nave K.-A., Fröhlich D., Krämer-Albers E.M. // PLOS Biol. 2020. V. 18. № 12. P. e3000621.
34. Chaudhuri A.D., Dasgheyb R.M., DeVine L.R., Bi H., Cole R.N., Haughey N.J. // Glia. 2019. V. 68. № 1. P. 128–144.
35. Chun C., Smith A.S.T., Kim H., Kamenz D.S., Lee J.H., Lee J.B., Mack D.L., Bothwell M., Clelland C.D., Kim D.-H. // Biomaterials. 2021. V. 271. P. 120700.
36. Patel M.R., Weaver A.M. // Cell Rep. 2021. V. 34. № 10. P. 108829.
37. Hayakawa K., Esposito E., Wang X., Terasaki Y., Liu Y., Xing C., Ji X., Lo E.H. // Nature. 2016. V. 535. № 7613. P. 551–555.
38. Krämer-Albers E., Bretz N., Tenzer S., Winterstein C., Möbius W., Berger H., Nave K., Schild H., Trotter J. // Proteomics Clin. Appl. 2007. V. 1. № 11. P. 1446–1461.
39. Yakovlev A.A. // Neurochem. J. 2022. V. 16. № 2. P. 121–129.
40. Druzhkova T.A., Yakovlev A.A. // Neurochem. J. 2018. V. 12. № 3. P. 195–204.
41. Gangadaran P., Rajendran R.L., Oh J.M., Hong C.M., Jeong S.Y., Lee S.-W., Lee J., Ahn B.-C. // Exp. Cell Res. 2020. V. 394. № 2. P. 112146.
42. Ying W., Riopel M., Bandyopadhyay G., Dong Y., Birmingham A., Seo J.B., Ofrecio J.M., Wollam J., Hernandez-Carretero A., Fu W., Li P., Olefsky J.M. // Cell. 2017. V. 171. № 2. P. 372–384.e12.
43. Rong Y., Liu W., Wang J., Fan J., Luo Y., Li L., Kong F., Chen J., Tang P., Cai W. // Cell Death Dis. 2019. V. 10. № 5. P. 1–18.
44. Mizushima N., Komatsu M. // Cell. 2011. V. 147. № 4. P. 728–741.
45. Kroemer G., Mariño G., Levine B. // Mol. Cell. 2010. V. 40. № 2. P. 280–293.
46. Mizushima N., Yamamoto A., Matsui M., Yoshimori T., Ohsumi Y. // Mol. Biol. Cell. 2004. V. 15. № 3. P. 1101–1111.
47. Alirezaei M., Kemball C.C., Flynn C.T., Wood M.R., Whittton J.L., Kiosses W.B. // Autophagy. 2010. V. 6. № 6. P. 702–710.
48. Chen X., Kondo K., Motoki K., Homma H., Okazawa H. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 12115.

49. Kaushik S., Rodriguez-Navarro J.A., Arias E., Kiffin R., Sahu S., Schwartz G.J., Cuervo A.M., Singh R. // Cell Metab. 2011. V. 14. № 2. P. 173–183.
50. Zhang K., Shi P., An T., Wang Q., Wang J., Li Z., Duan W., Li C., Guo Y. // Brain Res. 2013. V. 1519. P. 112–119.
51. Komatsu M., Waguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J., Tanida I., Ueno T., Koike M., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. // Nature. 2006. V. 441. № 7095. P. 880–884.
52. Liang C.-C., Wang C., Peng X., Gan B., Guan J.-L. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 5. P. 3499–3509.
53. Komatsu M., Waguri S., Koike M., Sou Y.-S., Ueno T., Hara T., Mizushima N., Iwata J.-I., Ezaki J., Murata S., Hamazaki J., Nishito Y., Iemura S., Natsume T., Yanagawa T., Uwayama J., Warabi E., Yoshida H., Ishii T., Kobayashi A., Yamamoto M., Yue Z., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. // Cell. 2007. V. 131. № 6. P. 1149–1163.
54. Boland B., Kumar A., Lee S., Platt F.M., Wegiel J., Yu W.H., Nixon R.A. // J. Neurosci. 2008. V. 28. № 27. P. 6926–6937.
55. Spilman P., Podlutskaya N., Hart M.J., Debnath J., Gorostiza O., Bredesen D., Richardson A., Strong R., Galvan V. // PloS One. 2010. V. 5. № 4. P. e9979.
56. Martinez-Vicente M., Talloczy Z., Wong E., Tang G., Koga H., Kaushik S., de Vries R., Arias E., Harris S., Sulzer D., Cuervo A.M. // Nat. Neurosci. 2010. V. 13. № 5. P. 567–576.
57. Sarkar S., Ravikumar B., Floto R.A., Rubinsztein D.C. // Cell Death Differ. 2009. V. 16. № 1. P. 46–56.
58. Hetz C., Thielen P., Matus S., Nassif M., Court F., Kiffin R., Martinez G., Cuervo A.M., Brown R.H., Glimcher L.H. // Genes Dev. 2009. V. 23. № 19. P. 2294–2306.
59. Malagelada C., Jin Z.H., Jackson-Lewis V., Przedborski S., Greene L.A. // J. Neurosci. 2010. V. 30. № 3. P. 1166–1175.
60. Spencer B., Potkar R., Trejo M., Rockenstein E., Patrick C., Gindi R., Adame A., Wyss-Coray T., Masliah E. // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 2009. V. 29. № 43. P. 13578–13588.
61. Winslow A.R., Chen C.-W., Corrochano S., Acevedo-Arozena A., Gordon D.E., Peden A.A., Lichtenberg M., Menzies F.M., Ravikumar B., Imarisio S., Brown S., O’Kane C.J., Rubinsztein D.C. // J. Cell Biol. 2010. V. 190. № 6. P. 1023–1037.
62. Nixon R.A. // Nat. Med. 2013. V. 19. № 8. P. 983–997.
63. Bové J., Martínez-Vicente M., Vila M. // Nat. Rev. Neurosci. 2011. V. 12. № 8. P. 437–452.
64. Harris H., Rubinsztein D.C. // Nat. Rev. Neurol. 2012. V. 8. № 2. P. 108–117.
65. Rong Y., Liu W., Lv C., Wang J., Luo Y., Jiang D., Li L., Zhou Z., Zhou W., Li Q., Yin G., Yu L., Fan J., Cai W. // Aging. 2019. V. 11. № 18. P. 7723–7745.
66. Chen G., Tong K., Li S., Huang Z., Liu S., Zhu H., Zhong Y., Zhou Z., Jiao G., Wei F., Chen N. // Bioact. Mater. 2024. V. 35. P. 135–149.

The Role of Extracellular Vesicles in the Regulation of Autophagy

A. A. Yakovlev^{1, 2}

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, RAS, Moscow, Russia

²Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

The interest of the scientific community in extracellular vesicles (EVs) is growing every year. EVs are lipid membrane-limited vesicles containing hundreds of proteins and nucleic acids. BBs are secreted by almost all cells in the body and are able to circulate in the bloodstream for long periods of time. Also, one of the distinctive features of BBs is their ability to penetrate blood-tissue barriers. Not surprisingly, BBs have attracted attention primarily because they can potentially be used for the diagnosis and therapy of diseases. However, BBs also have a role in the normal functioning of the body. In addition to the already known examples of BB-mediated intercellular communication, there are recent examples of BBs regulating autophagy, at least in nerve cells. Depending on the type of recipient cell, BBs can both activate and inhibit autophagy. Perhaps the regulation of autophagy in the brain involves intercellular signaling involving BBs.

Keywords: extracellular vesicles; neurons, signaling, autophagy