

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130

Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала

Шендеров Б. А.¹, Синица А. В.², Захарченко М. М.², Ткаченко Е. И.³¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К. Г. Разумовского (Первый казачий университет)» (109004, Земляной вал, д. 73, Москва, Россия)² ООО «Крафт» (Санкт-Петербург, Россия)³ ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия)

Extracellular vesicles (exosomes) in prokaryotic organisms: role in their biology and realization of their pathogen potential

B. A. Shenderov¹, A. V. Sinitsa², M. M. Zakharchenko², E. I. Tkachenko³¹ K. G. Razumovsky Moscow state University (109004, Zemlyanoi Val, 74, Moscow, Russia)² Kraft LLC (St. Petersburg, Russia)³ SM Kirov Military Medical Academy (St. Petersburg, Russia)

Для цитирования: Шендеров Б. А., Синица А. В., Захарченко М. М., Ткаченко Е. И. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020;179(7): 118–130. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130

For citation: Shenderov B. A., Sinitsa A. V., Zakharchenko M. M., Tkachenko E. I. Extracellular vesicles (exosomes) in prokaryotic organisms: role in their biology and realization of their pathogen potential. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;179(7): 118–130. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130

✉ **Corresponding author:**

Шендеров Борис Аркадьевич
Boris A. Shenderov
shenderov@yandex.ru

Шендеров Борис Аркадьевич, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник. ПНИЛ «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания»

Синица Александр Владимирович, к. т. н.

Захарченко Михаил Михайлович, Кандидат медицинских наук, Руководитель отдела развития

Ткаченко Евгений Иванович, д.м.н., профессор, профессор 2-я кафедра (терапии усовершенствования врачей)

Boris A. Shenderov, PhD, MD, professor, main researcher of Laboratory "Construction and introduction of personalized nutrition"; *SPIN-код: 7566–7706, ORCID ID: 0000–0003–3298–6508*

Aleksander B. Sinitsa, PhD

Mikhail M. Zakharchenko, PhD, Head of Development Department

Evgeny I. Tkachenko, Doctor of medical sciences, professor, Department of therapy, 2-nd Chair of internal diseases, postgraduate medical education course

Резюме

Продукция экзосомных микровезикулярных структур (ЭМВС) широко распространена у грамотрицательных и грамположительных бактерий. Эти внеклеточные везикулы присутствуют во многих, если не во всех биологических жидкостях и тканях хозяина. Они могут передавать множество различных низкомолекулярных эффекторных и сигнальных молекул (белки, пептиды, коферменты, липиды, метаболиты, ДНК, РНК, токсины и др.) в бактериальные клетки и клетки-хозяина, у которых они могут выполнять важные функции и биохимические реакции, включая межклеточную коммуникацию и регуляцию иммунных ответов. Вовлечение бактериальных ЭМВС в различные биологические функции прокариотических и эукариотических клеток делает их ключевыми игроками, как в физиологических процессах, так и в патологических состояниях. Способность ЭМВС выступать в качестве носителей различных регуляторных и сигнальных молекул открывает возможность их использования в качестве новых биомаркеров заболеваний и в качестве перспективных лекарственных агентов, в том числе, вакцинных препаратов. В представленном обзоре описываются механизмы, с помощью которых бактериальные ЭМВС, могут поддерживать гомеостаз и здоровье хозяина, а также индуцировать у последнего патологические процессы или иммунную толерантность; обсуждается возможность участия этих ЭМВС в инновационных нанобиотехнологиях.

Ключевые слова: грам-негативные и грам-позитивные бактерии; внеклеточные везикулы; эффекторные и сигнальные молекулы; микробиота-хозяин коммуникация; вирулентность; иммунная система; биомаркеры; вакцины

Summary

An increasing number of gram-negative and gram-positive bacteria have been observed to secrete outer-membrane vesicles (OMVs) during their growth both under physiological and pathological conditions *in vitro* and *in vivo*. These cell-derived particles are present in many — if not all — physiological fluids. They can convey the multiple various low weight effector and signal molecules (proteins, nucleic acids, lipids, and carbohydrates) into the bacterial and host cells that have important functions in their intercellular communication and regulation. Involvement of OMVs in the various biological functions of prokaryotic and eukaryotic cells make them to be key players in both physiological processes and also in pathological conditions. Additionally, the ability of OMVs to deliver molecules to recipient cell opens the possibility of their use as novel disease biomarkers and as promising drug/therapy agents. In this Review, we describe the mechanisms through which bacterial OMVs can support the host homeostasis and health and induce host pathology or immune tolerance, and discuss the possibility of these OMVs participate in innovative nanobiotechnologies.

Keywords: gram-negative bacteria; gram-positive bacteria; extracellular vesicles; effector and signal molecules; inter-kingdom communication; virulence factors; immune function; diagnostic biomarker; drug-delivery vehicles, vaccine

Введение

Животные организмы обеспечивают себя многочисленными нутриентами, ферментами, кофакторами и сигнальными молекулами за счет трех источников: переработки сложных и простых пищевых субстратов экзогенного происхождения ферментными системами пищеварительного тракта, метаболической активности симбиотической микробиоты, а также за счет биомолекул, формирующихся внутри клеток различных тканей многоклеточного организма. Большинство исследователей и клиницистов полагают, что в организме здорового человека и при различных заболеваниях, возникающие в метаболических реакциях водорастворимые низкомолекулярные пищевые и другие соединения, поступают в межклеточное пространство и в различные клетки органов и тканей через кровяную и лимфатическую системы или путем формирования щелевых контактов между клетками. Внутри- и межклеточные информационные взаимодействия осуществляются либо внутри клеток (аутокринная сигнализация), при взаимодействии с соседними клетками (паракринная сигнализация) или клетками, расположенными в различных отдаленных областях организма через различные нейроэндокринные, иммунные, метаболические и эпигенетические механизмы (за счет многочисленных сигнальных цитокинов, хемокинов, гормонов, нейротрансмиттеров, метаболитов и других молекул). Дисбаланс гомеостаза этих секреторных молекул пищевого, микробного и эндогенного происхождения стали рассматривать как ведущий механизм и фактор риска различных заболеваний [1–5]. В последние два десятилетия исследователи, изучающие межклеточные взаимоотношения микробных сообществ и клеток-хозяев, стали интенсивно оценивать способность живых организмов продуцировать, регулировать и функционально использовать экзосомные

микровезикулярные структуры как новые секреторные средства выживания и взаимодействия со своей клеточной и внеклеточной средой. Стала накапливаться информация, что многие биологически активные низко-молекулярные соединения, образуемые комменсальными, симбиотическими и патогенными грам-негативными и грампозитивными бактериями, могут аккумулироваться в цитоплазматическом содержимом микробных и эукариотических клеток и передаваться в соседние и отдаленные клетки живых организмов через постоянно обновляющуюся независимую секреторную систему прокариотических и эукариотических организмов – специализированные внеклеточные микро- и нановезикулярные структуры (ЭМВС или просто, экзосомы). ЭМВС служат для улучшения приспособления и облегчения взаимодействий трех доменов жизни (бактерии, археи, грибы, простейшие) в полимикробных сообществах, а также межклеточных взаимодействий между микроорганизмами и клетками хозяина [6]. ЭМВС обеспечивают защиту прокариотических и эукариотических клеток от физических, химических и биологических воздействий, участвуют в ферментативной деградации различных субстратов и имеют уникальные преимущества по сравнению с другими системами секреции живых организмов, транспортируя низкомолекулярные биомолекулы в высоких концентрациях в локальные целевые пункты и/или на большие расстояния [2, 5–15]. В представленном обзоре дается анализ опубликованных преимущественно в зарубежной литературе данных о роли бактериальных ЭМВС в биологии прокариотических организмов, в поддержании здоровья человека, в этиопатогенезе инфекций и других заболеваний, а также в новых нанобиотехнологиях, как биомаркеры, вакцины и компоненты лекарственных препаратов.

Общая характеристика экзосомных микровезикулярных структур

Согласно современным представлениям в эндосомах всех живых организмов (эукариоты, археи и бактерии) формируется и высвобождается

мембраносвязанный материал, часто описываемый под разными названиями (апоптотические тельца, мембранные везикулы, микровезикулы, экзосомы,

толерасомы, агросомы, вирусоподобные частицы и другими) [5, 9, 16]. Если в составе двухслойной липидной мембраны этих частиц присутствует лизобисфосфатидиловая кислота, то эти везикулы рассматривают как внутриклеточные лизосомы, которые в последующем подвергаются деградации в цитоплазме клеток. Если в микровезикулах мембраны преимущественно содержат церамиды (специфические липидные соединения), они могут выделяться в межклеточное пространство и участвовать в коммуникации эукариотических и прокариотических клеток [9, 15, 17–21]. Терминологически внеклеточные везикулы (с размерами от 30 до 2000 нм) делят: на микровезикулы/микрочастицы/эктосомы, образующиеся в результате выпячивания и отделения плазматической мембраны от внешней стороны клеток; экзосомы, формирующиеся в результате высвобождения мультивезикулярных тел за счет отделения участков плазматической мембраны во внутреннюю часть клетки; апоптотические тела, высвобождаемые из клеток при их апоптотическом повреждении [2, 16]. Различные экстремальные стрессовые воздействия меняют выраженность, локализацию и структуру секретируемых клетками везикул. В 2011 году микровезикулярные структуры в соответствии с предложениями *International Society for Extracellular Vesicles* стали подразделять на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела. Термин «экзосомы» был предложен *Rose Johnstone* в 1987 году [22]. Экзосомы (ЭМВС) – это внеклеточные структуры цитоплазматического происхождения с размером 30–150 нм, способные нести и передавать другим клеткам простые и сложные молекулы [16, 23]. Большинство эукариотических и прокариотических клеток человека постоянно высвобождают ЭМВС (экзосомы) [10, 15–17, 20, 24–26]. Эти ЭМВС, выделяемые в окружающую среду, двигаются в межклеточном пространстве или в биологических жидкостях пока они не фиксируются к рецепторам определенных клеток. Если они не связываются с клетками, ЭМВС подвергаются элиминации из организма путем деградации или за счет других механизмов очищения [27]. В настоящее время в составе ЭМВС могут быть обнаружено порядка 4000 различных белков, более 1500 микроРНК, липиды, ДНК, РНК и другие субстанции и молекулы [2, 28]. Разработаны подходы и конкретные приемы, напрямую или опосредованно измеряющие количество и состав экзосом и их биомолекул. Эти методы включают традиционное градиентное центрифугирование, хроматографию, разделение на основе иммунного аффинитета, протеомный подход и другие. Дифференцированное ультрацентрифугирование удаляет большие фрагменты разрушенных клеток вначале при низкой скорости вращения центрифуги (ниже 20000 × g); дальнейшее очищение ЭМВС производят путем их

преципитации с использованием высоких скоростей вращения ротора (не менее 100000 × g). При ультрафильтрации удаление, очистку и стерилизацию ЭМВС осуществляют с мембранами, содержащими поры от 0,001 до 0,1 мкм [10, 12, 15, 23, 25, 28–31]. Использование специальных биореакторов для увеличения выращенных в питательных средах различных эукариотических и прокариотических организмов позволяет в более, чем 10–100 раз увеличивать выход ЭМВС для аналитических и других целей [32]. В модельных экспериментах с использованием ЭМВС, образуемых эритроцитами крови, установлено, что в наибольшем количестве и наиболее длительно экзосомы сохраняются в клетках печени, костных тканях, кожи, мышц, селезенки, почек и, наконец, в легочной ткани. ЭМВС различного происхождения постоянно обнаруживаются в различных биологических жидкостях человека: кровь (плазма и сыворотка), моча, грудное молоко, пот, слюна, асцитическая, амниотическая, синовиальная и спинномозговая жидкости. Плазма крови человека содержит до трех миллионов ЭМВС в одном микролитре [17, 19]. До недавнего времени экзосомы рассматривались как побочные продукты роста патогенных и комменсальных бактерий. Однако результаты исследований последнего десятилетия убедительно продемонстрировали, что экзосомы активно участвуют в многочисленных физиологических и патогенных функциях и реакциях прокариотических и эукариотических организмов. ЭМВС, продуцируемые живыми организмами, помимо доставки им нутриентов и ко-факторов, участвуют в межклеточных коммуникациях, в иммунных ответах, транспорте антимикробных пептидов, в процессах клеточного старения, репарации тканей, других генетических, эпигенетических, метаболических и сигнальных реакциях [2, 10, 15, 28, 33–35]. В стрессовых ситуациях и при различных заболеваниях ЭМВС способствуют активации воспалительных процессов, усилению инвазии и распространению бактериальной, вирусной и паразитарной инфекции, переносу прионов, поврежденного и модифицированного клеточного и субклеточного материала в другие клетки, распространению токсических форм агрегированных белков [10, 11, 15]. В различных эукариотических и прокариотических клетках идентифицированы ЭМВС, несущие низкомолекулярные биомолекулы, способные модифицировать эпигенетическую экспрессию хромосомных, митохондриальных и плазмидных генов, осуществлять микробную и микробиота-хозяин регуляцию. В 2013 году Д. Ротман, З. Шекман и Т. Зюдоф за работы по изучению везикулярного транспорта были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине «Везикулярный транспорт-основа транспортной системы в наших клетках».

Экзосомные микровезикулярные структуры прокариотических организмов

Организм человека в своей жизни сталкивается с огромным количеством различных микроорганизмов. Из 52 признанных бактериальных филов,

присутствующих на нашей планете, пять-семь филов обнаружены на коже и слизистых млекопитающих. Большинство бактерий в кишечном тракте человека

относятся к *Firmicutes* (24,4%) и *Bacteroidetes* (65,4%). Представители *Proteobacteria* (4,5%), *Actinobacteria* (2,2%), *Verrucomicrobia* (0,7%) и, так называемый кандидат в новый фил, ТМ7 встречаются в меньших количествах. *Proteobacteria* (Протеобактерии) (грам-отрицательные факультативно анаэробные бактерии) таксономически включают в себя шесть классов бактерий. У взрослых людей на слизистой кишечника и в фекалиях наиболее часто обнаруживаются представители *Alpha-, Beta- Gamma- и Delta-*протеобактерий. У здоровых людей представители протеобактерий обнаруживаются в биоиматериале, взятом из полости рта (17–37%), с кожи (7–30%), из пищеварительного (2,5–5%) и из вагинального (2,3%) трактов. *Proteobacteria* – это наиболее распространенная группа грам-негативных бактерий в микробном мире. В составе этого фила входят такие группы бактерий, которые таксономически принадлежат семействам *Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Neisseriales, Bdellovibrionales, Desulfobacterales* и другим (это более 1000 видов или примерно треть от всех известных видов культивируемых бактерий). Среди них присутствуют и такие известные комменсальные, патогенные и условно-патогенные бактерии, которые принадлежат родам *Escherichia, Salmonella, Vibrio, Helicobacter, Yersinia, Legionellales, Neisseria* и многие другие [36]. Грам-позитивные, бактерии, обнаруживаемые у человека, преимущественно принадлежат филу *Firmicutes* и *Actinobacteria*. В его составе в 2016 г было идентифицировано более 274 родов, включая факультативно и анаэробные грам-позитивные кокки и грам-позитивные бациллы. Последние делят на подкласс *Bacillales* (*Bacillus, Listeria, Staphylococcus*) и подкласс *Lactobacillales* (*Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus*) и подкласс *Clostridia* (*Acetobacterium, Clostridioides, Clostridium, Eubacterium, Megasphaera, Mollicutes, Selenomonas* и многие другие). Стафилококки подразделяют на *S. aureus, S. epidermidis, S. saprophyticus*, стрептококки – на *Strep. pyogenes (Group A), Strep. agalactiae (Group D), Enterococci (Group D), Strep. viridans* и *Strep. pneumonia* [37]. Количество бактериальных видов, культивируемых на искусственных питательных средах, в настоящее время превышает 1500; количество генов, обнаруживаемых у бактерий, в 150 раз больше, чем в геноме человека [4]. Грам-позитивные и грам-негативные бактерии содержат в своем составе или продуцируют в окружающую среду множество различных низкомолекулярных соединений [3, 4]. Экзосомы, содержащие многие типы биомолекул у грам-негативных бактерий впервые были описаны в 1965–1966 годах, у грам-позитивных бактерий – в 2009 г. В течение нескольких десятилетий микробиологи мало уделяли внимания их значению в окружающем биологическом мире. В начале этого столетия появились первые публикации, позволившие оценить реальное значение микробных ЭМВС в жизни прокарриотических сообществ [2, 5, 17, 38, 39]. Бактериальные ЭМВС – это внеклеточные наноразмерные сферические частицы, высвобождающиеся из бактерий в физиологических и неблагоприятных условиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Все бактерии способны высвободить ЭМВС; последние могут иметь диаметр 10–300 нм и содержать менее 370 *kbp*

бактериальной ДНК [8, 14, 38]. Микробные внеклеточные везикулы нагружены многими специфическими компонентами, включая белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты, токсины, пептидогликаны, липополисахариды, другие низкомолекулярные соединения, которые играют важную роль в жизни не только прокариотических, но и эукариотических организмов, в том числе млекопитающих и человека. Изменение гомеостаза бактериальных мембран существенно меняет высвобождение ЭМВС прокариотических клеток [5, 39]. Протеомный анализ бактериальных ЭМВС показал, что мембранные белки участвуют в поддержании выживаемости микроорганизмов, распознают нутриенты, участвуют в транспорте экзосом, подавляют рост бактерий конкурентов, проявляют вирулентные свойства в отношении клеток хозяина и модифицируют его иммунные функции [5]. ДНК в бактериальных ЭМВС имеет хромосомное, плазмидное и бактериофаговое происхождение; в этих экзосомах также выявлены различные типы РНК (*mRNA, rRNA, sRNA, и tRNA*). Предполагается, что молекулы ДНК и РНК захватываются экзосомами из цитоплазмы и периплазматического пространства бактерий и из различных эукариотических клеток хозяина. Кроме того, бактериофаги могут напрямую вводить свою ДНК в ЭМВС [15]. ЭМВС бактериального происхождения поглощаются реципиентными клетками в результате активного процесса, называемого эндоцитозом [6, 11, 12, 14]. Бактериальные ЭМВС вступают во взаимодействие с эукариотическими клетками хозяина за счет активации их рецепторов, путем передачи содержимого экзосом в реципиентную клетку и, наконец, в результате полной инкорпорации ЭМВС в цитоплазму этих клеток [5]. ЭМВС бактериального происхождения обладают как схожими, так и различными характеристиками. В настоящее время, к сожалению, у ЭМВС пока не выявлены универсальные биомаркеры, позволяющих устанавливать их точную видовую, и тем более штаммовую бактериальную принадлежность [8]. Прокарриотические ЭМВС по своей структуре (например, белкам и липидам) проявляют выраженное сходство с мембранами бактерий, из которых они получены. В то же время, нередко эти ЭМВС, даже образуемые представителями одного и того же вида бактерий, могут различаться по своему составу в зависимости от того участвуют ли они в межклеточном контакте с другими бактериями и клетками хозяина, или когда они функционируют на дальних расстояниях от места их возникновения. Родовая, видовая и штаммовая принадлежность, стадии развития бактерий, температура и среда культивирования, присутствие в организме эукариотического хозяина и многие другие факторы, могут существенным образом модифицировать состав и функции ЭМВС, даже у одного и того же штамма бактерий [8, 15, 21]. На биогенез бактериальных ЭМВС может влиять катионный состав среды культивирования [21, 41]. Присутствие в питательной среде хелатирующего агента (*EDTA*), изменяющего соотношение Mg^{2+} и Ca^{2+} ионов и влияющего на продукцию пептидогликана и липополисахарида, а также на синтез мембранных белков (*OmpA, TolA/B (Tol-Pal), YbgF* и *LppAB*) меняет биогенез ЭМВС. Дефицит

нутриентов, включая ионов железа, окислительный стресс, перекись водорода, низкие значения pH стимулируют синтез бактериальных ЭМВС [8, 14]. Протективный пептидогликановый слой в периплазме внутренней мембраны являются главным фактором диффузного барьера бактериальных микровезикулярных структур. Имеются доказательства, что формирование ЭМВС может контролироваться мутациями генов *lpp* и *vfgl*, вовлекаемых в синтез и деградацию пептидогликана и мураминовой кислоты в процессе синтеза бактериальной стенки. Изучение динамики формирования ЭМВС позволяло предположить, что нарушения взаимоотношений пептидогликана и бактериальной наружной мембраны является толчком к индукции процесса биогенеза этих внеклеточных наночастиц [42]. Если при формировании ЭМВС отмечается выпячивание наружной мембраны прокариотических клеток, размер экзосом может увеличиваться до 250 нм ЭМВС [17]. В формировании, упаковке и функционировании прокариотических ЭМВС важную роль играют специфические аутолизины, циркулирующие в биологических тканях и жидкостях млекопитающих [42]. Количественное снижение литических трансгликозилаз, бактериальных мембранах фосфолипидов, ЛПС и других специфических молекул существенно модифицирует процесс образования бактериальных ЭМВС. Повышенная температура, антибиотики и бактериофаги также увеличивают продукцию внеклеточных бактериальных микровезикул [8, 14, 19]. Состав ЭМВС также различается, если бактерии находятся в планктонном состоянии или локализованы в биопленках, а также колонизируют различные клетки одного или даже различных хозяинов [9, 19]. В биопленках грам-положительные и грам-отрицательные бактерии нередко живут в виде единого мультিকлеточного сообщества [4]. Бактериальные ЭМВС играют важную роль в формировании и поддержании подобных биопленок (обеспечивают адгезию бактериальных клеток, доставку для них нутриентов, транспорт сигнальных молекул, деструкцию антимикробных соединений, синтез факторов вирулентности, антимикробную резистентность и т.д.). Участие ЭМВС в формировании биопленок позволяет им инактивировать в них антибиотики, фаги, компоненты комплимента и антитела [15]. Высвобождение экзополисахаридов из прокариотических ЭМВС, увеличивает ко-агрегацию бактериальных клеток в биопленках, защищая последние от высыхания, голодания или воздействия на них

антимикробных пептидов [8, 17]. ЭМВС, имея в своем составе белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты, ферменты и другие низкомолекулярные соединения, участвуют в трансформации и модификации сложного биоматериала в нутриенты и кофакторы, в адгезивные молекулы, микробные и химические токсины, снижают или активируют вирулентные факторы патогенных и оппортунистических бактерий, индуцируют синтез различных иммуномодулирующих соединений. ЭМВС бактериального происхождения могут служить вектором горизонтального переноса генов и играют жизненно важную роль в диссеминации генов антибиотикорезистентности среди грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также клеток тканей организма хозяина [8, 12, 15, 42, 43]. Разнообразные ферменты (β -лактамазы, протеазы, эндопептидазы и др.), присутствующие в бактериальных ЭМВС, участвуют в нейтрализации антибиотиков, антимикробных пептидов, токсинов и бактериофагов, способствуют выживаемости бактериальных клеток и одновременно могут предотвращать их проникновение в ткани хозяина [15, 19]. Эти ЭМВС также являются важным регулятором межклеточной сигнальной кворум-сенсинг коммуникации в системе микробиота-хозяин [8, 14, 43]. Экзосомы прокариотического происхождения, связанные с патогенным потенциалом, могут содержать молекулы, как стимулирующие защитные механизмы человека и элиминирующие патогенные микроорганизмы, так, и напротив, способствовать распространению вирулентных факторов, и поддерживать выживаемость возбудителя патологических процессов [2]. Исследование продукции прокариотических ЭМВС в естественных и стрессовых ситуациях позволило понять молекулярные механизмы, вовлекаемые в патогенез многих заболеваний. Патогенный потенциал экзосом, секретиремых бактериями, может включать в себя перенос микробных антигенов, активацию Т-клеток, моноцитов/макрофагов, нарушения микроваскулярной эндотелиальной проницаемости, модификацию защитных сигнальных изменений в организме хозяина в отношении проникающих инфекционных агентов [5, 9]. Бактериальные внеклеточные микровезикулы при взаимодействии с молекулами реципиентных клеток, могут участвовать в формировании новых ЭМВС, которые будут выделяться из клеток и вновь объединяться с другими клетками. Этот процесс обозначают как многократная межклеточная коммуникация [26, 31].

Экзосомные микровезикулярные структуры грамотрицательных бактерий

Феномен возникновения ЭМВС у грамнегативных бактерий был впервые описан в 1965 году на примере *E. coli*, которых выращивали в питательной среде, лишенной аминокислоты лизина, что тормозило у них синтез пептидогликана. Электронная микроскопия осадка бактериального супернатанта, полученного при ультрацентрифугировании ($20000 \times g$ и $100000 \times g$), позволила выявить небольшие сферической формы структуры, имеющие

однослойную мембрану [18]. В последующем естественно образующиеся ЭМВС были обнаружены и у других штаммов и видов патогенных, комменсальных и симбиотических грамотрицательных бактерий: пробиотический штамм *E. coli* Nissle 1917, энтеротоксигенные штаммы *E. coli* (ETEC), энтерогеморрагические *E. coli* (EHEC), различные представители *Acinetobacter sp.*, *Borrelia sp.*, *Bacteroides sp.*, *Campylobacter sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*,

Helocobacter sp., *Klebsiella sp.*, *Morganella sp.*, *Proteus sp.*, *Serratia*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio sp.*, *Neisseria sp.* и другие. Эти ЭМВС секретируются бактериями в процессе роста и развития в различных условиях и средах (пресная и соленая вода, жидкие и плотные среды, в биопленках и при внутриклеточной инфекции различных эукариотических организмов). При электронной микроскопии ЭМВС, образуемые грам-негативными бактериями, выглядели как сферические образования размером 50–300 нм в диаметре; самые большие размеры этих экзосом обнаружены у *S. marcescens* (150–250 нм). Штамм *H. pylori* TK1402 не мог образовывать биопленки на искусственной питательной среде, обогащенной 0.2% бета-циклодекстрином; при добавлении ЭМВС из бактерий, выращенных на плотной среде, заметно увеличивалась скорость формирования биопленки этих бактерий [8, 9, 14, 19, 44, 45]. Из 1 л бульонной культуры различных грамотрицательных бактерий при дифференцированном ультрацентрифугировании и микрофильтрации можно получать до 0,5–1,0 мг сырой массы ЭМВС. Наибольший выход ЭМВС отмечался на стадии максимального роста [40]. На модели *E. coli* установлено, что снижение образования у бактерий литических трансгликозилаз, количественное содержание в бактериальных мембранах фосфолипидов и других специфических молекул существенно модифицирует процесс образования бактериальных ЭМВС. Помимо липидов и жирных кислот ЭМВС грамотрицательных бактерий могут содержать также липополисахариды (ЛПС) [17]. Мембраны и содержание этих ЭМВС характеризовались также наличием у них пептидогликанов, необычных белков наружной мембраны, ЛПС, фосфолипидов, периплазматических, цитоплазматических растворимых белков, ферментов ДНК, РНК и вторичных метаболитов [9, 17, 46]. В составе экзосом, идентифицированы такие белки как *OmpA*, *OmpC*, и *OmpF*, периплазматические белки (*AcrA* и щелочная фосфатаза), а также белки, ассоциированные с вирулентностью этих бактерий, вовлекаемые в адгезию и инвазию этих бактерий в ткани хозяина (в экзосомах, изолированных из различных грам-негативных бактерий, идентифицировано более 3500 белков, принадлежащих различным функциональным группам). Среди липидов этих экзосом выявлены глицерофосфолипиды, фосфатидилглицерол, фосфатидилэтаноламин, и кардиолипин. Нуклеиновые кислоты ЭМВС представлены внеклеточными и поверхностными фрагментами ДНК (ДНК, РНК, плазмид и ДНК фаговой и хромосомной ДНК) [19]. ЭМВС,

продуцируемые *N. gonorrhoeae*, и грам-отрицательными анаэробными бактериями из полости рта (*Porphyromonas gingivalis*), часто содержат как ДНК, так и РНК [15]. Стрессы, температура, дефицит нутриентов, воздействие антибиотиков и взаимоотношения бактерий с хозяином существенно меняют количество, структуру и функции ЭМВС, продуцируемых грам-негативными бактериями [47]. Используя электронную микроскопию и протеомные подходы, показано, что воздействие флуорохинолона (ципрофлоксацина) приводило к секреции у бактерий *S. maltophilia* гетерогенного пула ЭМВС с поврежденными мембранами, измененными молекулами ДНК и липополисахарида, что сопровождалось модификацией скорости распространения горизонтального переноса экзосом и генов фагов в штаммы других бактерий. Экзосомные микровезикулярные структуры, формируемые псевдомонадами в обычных условиях и в присутствии гентамицина, различались по своему составу. У *P. aeruginosa*, клетки обработанные этим антибиотиком, продуцировали ЭМВС, в содержимом которых присутствовали значительные количества аутолизина и микроколичества гентамицина; во внеклеточных нановезикулах штамма псевдомонад, не обработанного гентамицином, синергидная активность указанных выше антимикробных соединений была ниже в 2.5 раза. Многие антибиотики (гентамицин, полимиксин, D-циклосерин, митомицин С) могли индуцировать продукцию ЭМВС у псевдомонад и шигелл. ЭМВС, секретируемые псевдомонадами, играют важную роль в межклеточных контактах и в *quorum sensing* процессах. Экзосомы этих бактерий ответственны также за горизонтальный перенос генов антибиотикорезистентности и ферментов (например, β -лактамаз) [15, 17]. Наличие у псевдомонадных ЭМВС двухслойной мембраны позволяло им сливаться с мембранами других грамотрицательных бактерий а также участвовать в адгезии к клеточным стенкам грам-положительных бактерий. Аминопептидаза и экзосомы, в избытке присутствующие в биопленках, образуемых штаммами *P. aeruginosa*, участвуют в формировании этого матрикса, обладающего высокой устойчивостью к антимикробным препаратам [15, 60]. Схожие наблюдения получены по синтезу ЭМВС у штаммов *E. coli* O104: H4 и O157: H7 в присутствии таких антибиотиков, как ципрофлоксацин, меропенем, фосфомицин и полимиксин В [15]. Выявленный повышенный синтез бактериальных экзосом некоторые исследователи предлагают рассматривать как новый побочный эффект антибиотикотерапии [15, 19, 44, 47].

Участие ЭМВС, секретируемых грамотрицательными бактериями, в реализации их патогенного потенциала

Низкомолекулярные биоактивные молекулы, присутствующие в содержимом ЭМВС (адгезины, токсины, липопротеины, липополисахарид и другие патогенассоциируемые компоненты), секретируемых грамотрицательными бактериями, активно участвуют в реализации их патогенных свойств, в развитии воспалительных процессов у хозяина при их воздействии и в защитных ответах этих бактерий на различные стрессы. Поскольку иммунные клетки

имеют рецепторы к микробным антигенам, присутствующим в бактериальных ЭМВС, последние также могут проявлять выраженный эффект на иммунные функции организма хозяина [5, 47]. У грамотрицательных патогенных бактерий (*N. meningitidis*, *F. tularensis* subsp. *novicida*, *B. pseudomallei*, *M. haemolytica* (*Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*)) секреция ЭМВС помогала этим патогенам адаптироваться в различных нишах, в конкурентном

соревновании с другими микроорганизмами, защищала бактерии в противостоянии с иммунными механизмами хозяина. Способность этих бактерий включать в свои ЭМВС поверхностные белковые антигены и ЛПС позволяло этим бактериальным экзосомам превращать эти экзосомы в эффективные генераторы адаптивного иммунного ответа [9]. Бактериальные ЭМВС за счет наличия в них пептидогликановой фракции могли взаимодействовать с *NOD1* рецепторами эпителиальных клеток, индуцируя у последних продукцию воспалительных цитокинов (*IL-8*). Наконец, ЭМВС могут также напрямую модулировать активность клеток хозяина за счет переноса в них микро РНК. Экзосомные микро РНК32 и sRNA52320, секретируемые штаммами *M. catarrhalis*, индуцировали Т-независимую активацию В-клеток, как в местах локализации этих бактерий, так и в клетках отдаленных тканей человека. При этом увеличивалась иммунная резистентность сыворотки крови и специфического антимикробного ответа не только к моракселлам, но и другим видам микроорганизмов (пневмококки, нейссерии), присутствующим в дыхательном тракте. Активация рецепторов *TLR2* и *TLR9* рецепторов у В-клеток, вызываемая ЭМВС, секретируемых моракселлами, увеличивала продукцию как *IgM*-антител так и интерлейкина *IL-6* [5, 48]. Возбудители гонорее (*N. gonorrhoeae*) секретируют ЭМВС, которые легко обнаруживались в макрофагах (нейтрофилах и моноцитах) больных. На внешней мембране *N. gonorrhoeae* расположен протеиновый *ProB* – комплекс, участвующий в обмене ионов и обеспечении этих бактерий низкомолекулярными нутриентами, необходимыми для их жизнедеятельности. *ProB* белки также взаимодействовали с мембранами митохондрий клеток слизистых репродуктивных органов. В составе ЭМВС, синтезируемых гонококками, выявлено более 110 различных белков, 35% которых приходились на белки *ProB*. Эти экзосомальные белки могли включаться в плазматические мембраны клеток хозяина. Схожие *ProB* белки обнаружены также у ЭМВС, образуемые *P. aeruginosa*, *V. cholera*, *N. meningitidis*, *E. coli*, *Acinetobacter sp.* *ProB* белки, секретируемые гонококками, при передаче через ЭМВС индуцировали митохондриальные нарушения и апоптоз у макрофагов, защищали этих возбудителей от нейтрофилов и удаляли макрофаги из очага поражения. Это позволило рассматривать гонококковый экзосомный белковый комплекс, как важнейший фактор патогенности этих микроорганизмов [49]. Экзосомы, высвобождаемые эпителиальными клетками при гонорее, содержали повышенные уровни ингибитора апоптоза (*cIAP2*), который подавлял апоптоз эпителиальных клеток и ограничивал продукцию *IL-1* бета цитокина [2]. ЭМВС, секретируемые штаммами *P. aeruginosa*, выделенные от пациентов с муковисцидозом, содержали высокоактивную аминопептидазу и характеризовались в 3–4 раза более высокой ассоциации с клетками легких, чем экзосомы лабораторно адаптированного штамма *PAO1* [11]. Электронная микроскопия очищенных ЭМВС кишечных палочек выявила в них наличие больших фрагментов хромосомных ДНК и небольшие открытые участки ДНК бактериальных фагов и плазмид; экзосомы

кишечных палочек также содержали и интактные плазмиды. Генетический материал грамотрицательных бактерий, включая гены вирулентности (протеазы, фосфолипазы, аутолизин, гемолизин, токсины) и антибиотикорезистентности, через ЭМВС мог быть передан в реципиентные клетки и затем в последних экспрессироваться [15, 19]. Многие токсины энтерогеморрагических штаммов *E. coli* (*EHEC*) (шига токсины, гемолизин, цитолетальный токсин V) передаются с помощью ЭМВС. Низкие значения рН и антимикробных пептидов в содержимом кишечника стимулируют высвобождение из внеклеточных везикул этого и других кишечных патогенов. ЭМВС, секретируемые грамотрицательными кишечными бактериями, нередко несут в своем составе комплекс биологически активных молекул, включая ЛПС, поверхностные мембранные белки, фосфолипиды, которые более активно и более продолжительно стимулируют защитные иммунные эффекты, чем белковые или даже рекомбинантные протективные вакцины, изготовленные из белков бактериальных патогенов [14, 47]. Уропатогенные штаммы кишечной палочки, синтезирующие ЭМВС, способны вызывать сердечные дисфункции работы сердца. Показано, что внутрибрюшинное введение мышам очищенных бактериальных ЭМВС, не содержащих микробные клетки, могли существенно увеличивать концентрацию провоспалительных цитокинов в крови и лизатах клеток мышц сердца экспериментальных животных. Эти бактериальные ЭМВС могли индуцировать повреждение сердечных клеток как *in vitro*, так и *in vivo*, в отсутствие воздействия уропатогенных кишечных палочек. Предлагается рассматривать бактериальные ЭМВС в дополнение к живым бактериям, как возможные терапевтические мишенями при разработке профилактики и терапии сепсиса у больных, страдающих уропатогенными инфекциями [50]. При добавлении к культуре кишечных палочек бактериальных ЭМВС резистентность этих бактерий к субингибиторным концентрациям антимикробных пептидов и антибиотиков (полимиксин, колистин), заметно увеличивалась. Напротив, кишечные палочки, обработанные ЭМВС, в составе которых присутствовала ДНК Т-4 фага, инфекционная эффективность последнего снижалась. Обработка грамотрицательных бактерий ЭМВС повышала их резистентность к β -лактамовым антибиотикам из-за присутствия в экзосомах β -лактамаз [15]. ЭМВ, производимые представителями различных видов и штаммов *Bacteroides*, способны выступать как транспортные средства, которые могут распространять среди кишечных бактерий гидролазы и полисахаридные лиазы, позволяющие бактериям, не производящим эти ферменты, метаболизировать полисахариды для их использования прокариотическими и эукариотическими клетками пищеварительного тракта [9]. ЭМВС, секретируемые отдельными штаммами *B. fragilis*, содержат полисахаридный капсульный антиген, способный запускать продукцию иммунорегулирующего цитокина *IL-10*, ответственного за созревание Т-регуляторных иммунных клеток. Образованные этими грамотрицательными анаэробными бактериями ЭМВС способствовали их защите от воздействия различных стрессов (белки теплового шока,

воздействие алкоголя, антимикробные пептиды, хелаты металлов и другие) [17]. Благодаря присутствию у грамотрицательных бактерий экзосомных микровезикулярных структур, содержащих многочисленные гидролитические энзимы (например, гидролазы пептидогликанов), эти бактерии могли лизировать соседние микробные клетки; это увеличивало уровень пищевых субстратов для нужд

клеток донорского штамма. Многообразие биологических молекул, присутствующих в ЭМВС грамотрицательных бактерий, и разнообразная их функциональная активность, позволяет патогенным и оппортунистическим грамотрицательным бактериям при попадании в кровоток и лимфоток увеличивать их общую выживаемость и устойчивость к защитным механизмам организма человека [19].

Экзосомные микровезикулярные структуры грампозитивных бактерий

Существование экзосомных микровезикулярных структур у грампозитивных бактерий впервые было упомянуто в научной литературе в 1990 году [38]. В 2009 году у экзосом, образуемых *S. aureus*, с использованием масс-спектрометрии был детально исследован белковый состав этих внеклеточных везикул [19]. В последующем ЭМВС (диаметр 10–400 нм) были обнаружены и у других грампозитивных бактерий (*Bacillus sp.*, *Listeria sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptococcus sp.* и других) [12, 38, 39]. Клеточная стенка у этих бактерий имеет достаточно плотную оболочку; поэтому, в синтезе этих ЭМВС участвуют как бактериальные ферменты, деградирующие пептидогликановый слой этой оболочки, так и однослойная цитоплазматическая мембрана и внутреннее содержимое микроорганизмов [38, 39]. Продукция ЭМВС штаммами *S. aureus*, *B. subtilis* и *S. mutans* наблюдается в процессе коагуляции бактерий и формирования биопленок. ЭМВС являются важным фактором при формировании биопленок стафилококков. В культуральной жидкости *L. monocytogenes* постоянно обнаруживаются белки ЭМВС; однако при исследовании биопленок в них отсутствовали экзосомы, присущие этим бактериям [38]. Внеклеточные везикулы, образуемые *B. subtilis*, морфологически схожи с везикулами других грамположительных бактерий, но они имеют значительно меньшие размеры [38]. Фазы роста и размножения этих бактерий влияют на размеры и количество бактериальных ЭМВС [15]. При образовании ЭМВС грампозитивными бактериями в их

состав переходят пептидогликаны и их гидролазы, белки, липиды, *quorum sensing* сигнальные молекулы, фрагменты ЛПС, фосфолипиды, РНК, ДНК, ионы, разнообразные метаболиты, сигнальные и регуляторные молекулы и часть других периплазматических компонентов, играющих важную регуляторную роль в микробной физиологии и патогенезе заболеваний. Сливаясь с мембранами бактериальных и эукариотических клеток, эти ЭМВС передают в них разнообразные низкомолекулярные соединения, включая нуклеиновые кислоты, липопротеины, токсины, энзимы и другие молекулярные соединения [38, 39]. Присутствующие в ЭМВС низкомолекулярные соединения могут участвовать в физиологии бактерий, в стрессовых ответах на различные агенты окружающей среды, в формировании микробных биопленок, в межклеточных взаимодействиях с прокариотическими и эукариотическими клетками хозяина и в возникновении риска и проявлениях различных заболеваний [17, 38, 39]. ЭМВС, синтезируемые золотистыми стафилококками, содержат активную β -лактамазу, которая может защитить чувствительные к пеницилину грамположительные и грамотрицательные бактерии от β -лактаманых антибиотиков [9, 15, 39]. ЭМВС грампозитивных бактерий могут напрямую взаимодействовать с поверхностью клеток хозяина и инициировать в них различные внутриклеточные сигналы. Энзимы, связанные с ЭМВС, могут иметь функциональную схожесть с ферментами бактерий, которые секретируют эти экзосомы [39].

Участие ЭМВС, секретируемых грампозитивными бактериями, в реализации их патогенного потенциала

Протеомный анализ внеклеточных наночастиц *S. aureus* выявил у них около 90 протеинов, участвующих в биогенезе ЭМВС и переносе этих белков другим бактериям, включая белки, ассоциированные с факторами патогенности и антибиотикорезистентности. ЭМВС, образуемые *in vivo* из штаммов *S. aureus* и других бактерий, могут даже в отсутствии живых бактерий индуцировать инфекционный процесс и гибель клеток хозяина [38]. ЭМВС, синтезируемые грамположительными бактериями, содержат в своем составе различные факторы вирулентности и другие компоненты, которые при высвобождении повышают выживаемость бактерий в организме хозяина. Токсины и ферменты бактериальных экзосом (коллагеназа, гиалуронатлаза, сериновые протеазы, расслаивающие ткани токсины) усиливают инвазию патогенов, нарушают физические барьеры и распространение бактерий

в тканях. ЭМВС, образуемые *B. anthracis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и *S. agalactiae*, содержат в своем составе гемолизины и токсины, образующие поры в клеточных стенках. Растворимый α -гемолизин индуцирует апоптоз клеток и некроз тканей. Грампозитивные бактерии *B. anthracis* могут образовывать ЭМВС, в составе которых может присутствовать сибиреязвенный экзотоксин. При этом, множественные компоненты этого токсина в экзосомах этих бактерий, при поступлении в клетки-хозяина, заметно подавляли у него различные защитные иммунные ответы. Экзосомы, продуцируемые *B. anthracis*, содержали токсины (летальный фактор), которые в опытах на культуре ткани повреждали эпителиальные клетки человека [2, 17]. Присутствие различных литических ферментов в ЭМВС грампозитивных бактерий позволяло им подавлять рост и лизировать клетки

других прокариотических организмов (*S. aureus*, *B. subtilis*, *Lactobacillus lactis*) [51]. ЭМВС стафилококкового происхождения способны переносить альфа-гемолизин, вызывающий цитотоксический эффект и индуцировал апоптоз клеток хозяина. Эти же ЭМВС также содержали суперантигены, липазу, иммуноглобулин G-связывающие белки (протеин А), которые способствовали инвазии и помогали стафилококкам ускользать от иммунных защитных факторов. Очищенные ЭМВС, образуемые *L. monocytogenes*, содержали вирулентные факторы *InlB* и *LLO8*, участвующие в инвазии и не включались в клеточные лизосомы [38]. Штаммы *B. subtilis*, изолированные из окружающей среды, продуцировали ЭМВС, которые при воздействии антибиотика сурфактина разрушались. Напротив, экзосомы, присутствующие в супернатантах бактериальных лабораторных штаммов, несущих мутации гена *sfp*, сохраняли свою морфологию и свои функции. Сурфактин мог лизировать ЭМВС, секретируемые как штаммами *B. subtilis*, так и *B. anthracis* [38]. ЭМВС, секретируемые *S. aureus*, могли индуцировать процессы воспаления в тканях путем увеличения экспрессии молекул адгезии (E-селектин, *VCAM-1* и *ICAM-1*), а также интерлейкина *IL-6* у эпителиальных клеток кожи. Экзосомы, продуцируемые *S. pneumoniae*, вызывали активацию дендритных клеток, что увеличивало у них высвобождение провоспалительных цитокинов (*IL-8*, *IL-6*, *TNF*) и *IL-10* [5]. ЭМВС, образуемые штаммами *S. pneumoniae*, содержат большое количество разнообразных цитозольных, мембранных и связанных с поверхностью бактерий протеинов. Среди них присутствует значительное количество цитозольного токсина (пневмолизина), который при взаимодействии с дендритными клетками моноцитов, индуцировали провоспалительные

цитокиновые ответы; следует отметить, что схожий эффект может отмечаться, хотя и в меньшей степени, и при отсутствии пневмолизина в этих ЭМВС. ЭМВС, секретируемые *S. pneumoniae*, могут фагоцитироваться дендритными клетками человека, стимулируя у них продукцию *IL-6*, *IL-8*, *IL-10* и *TNF*, не влияя на образование цитокинов *IL-1* и *IL-12p70*. Пневмококковые ЭМВС также могут содержать бактериофаги или антимикробные пептиды и протеазы, участвующие в деградации белков комплемента, а также другие иммуномодулины. Пневмококковые ЭМВС, взаимодействуя с эпителиальными клетками низких отделов дыхательных путей, способствуют индукции риска пневмококковой инвазивной пневмонии. При пневмококковом сепсисе продукция ЭМВС позволяет этому возбудителю противостоять воздействию на него фагоцитов и комплементарного пути защиты против этой бактериальной инфекции [38, 51]. Ферменты, присутствующие в ЭМВС, могут нарушать в организме хозяина функционирование каскада комплемента и удалять антимикробные антитела в очаге локализации патогенных бактерий [39]. Сыворотки мышей, иммунизированных ЭМВС образуемых *B. anthracis* и *S. pneumoniae*, реагировали на токсические компоненты этих бактерий и стимулировали продукцию антител в отношении бактериальных соответствующих экзосом [38]. ЭМВС *C. perfringens* были не токсичны для макрофагов, но индуцировали у них продукцию воспалительных цитокинов (*TNF*, *IL-6*) и гранулоцитарного колонии-стимулирующего фактора (*GCSF*) в *in vitro* экспериментах. Напротив, два главных токсина (кишечный некротоксин В и гемолитический α -токсин) *C. perfringens*, не включались в состав ЭМВС, секретируемых этими клостридами [38].

Использование экзосомных микровезикулярных структур грамотрицательных и грампозитивных бактерий в диагностических и терапевтических целях

Бактериальные ЭМВС в настоящее время преимущественно используют в научных целях для оценки их роли во внутри- и межклеточных взаимоотношениях прокариотических и эукариотических организмов, включая исследования в области патогенеза заболеваний и регуляции иммунитета хозяина [2]. Однако в последнее десятилетие экзосомные микровезикулярные структуры все чаще начинают использовать в биотехнологических целях как платформу при диагностике заболеваний, а также как транспортное средство для лекарственных препаратов и в качестве вакцинных препаратов при бактериальных инфекциях и других заболеваний. Имеются указания, что количественный и качественный состав бактериальных ЭМВС, присутствующий в биологическом материале (сыворотка или плазма), взятом у больных и здоровых людей, может различаться. Изменения количественного содержания ЭМВС при различных воспалительных заболеваниях может служить биомаркером при диагностике этих патологий (например, при паразитарных и раковых заболеваниях) [2, 5, 39, 52].

ЭМВС, секретируемые прокариотическими клетками, обладают рядом качеств, которые позволяют их применять в биофармацевтике. Их производство достаточно экономически выгодно, они устойчивы к температуре и безопасны при использовании в качестве медицинских и ветеринарных средств [2, 53]. Вакцины считаются достаточно эффективной стратегией борьбы с бактериальными заболеваниями в постантибиотическую эпоху. Детализация состава и функций ЭМВС, образуемых грамотрицательными и грамположительными бактериями, позволила рассматривать эти внеклеточные наноструктуры как многообещающие векторы создания и доставки различных вакцин, в том числе рекомбинантных поливалентных вакцин. ЭМВС, высвобождаемые патогенными бактериями, содержат ряд лигандов (ЛПС, пептидогликаны, другие полисахариды, поверхностные белки, бактериальные нуклеиновые кислоты и другие), которые способны индуцировать длительные гуморальные иммунные реакции и которые могут стать специфическими молекулами при разработке вакцин,

стимулирующих работу адаптивного иммунитета у млекопитающих, включая человека [5, 12, 39, 53]. Например, назальная иммунизация мышей ЭМВС, секретируемых бактериями *H. influenzae*, индуцировала у животных гуморальный и клеточный иммунитет и защищала их при инфекции живыми бактериями этого вида. Показано, что белковые антигены, токсины, иммуностимуляторы и адьюванты, выявляемые в составе ЭМВС различных патогенных бактерий (*N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, энтерогенные *E. coli*), могут быть использованы для разработки безопасных поливалентных вакцин, индуцирующих высокоэффективный иммунный ответ [12, 14, 15]. Вакцина, созданная на основе ЭМВС, образуемых штаммом *N. meningitidis*, в настоящее время используется во многих странах и может обеспечить эффективную иммунную защиту взрослых и детей [54, 55]. Вакцинация мышей ЭМВС, образуемых пневмококками, стимулировала выработку антител, защищающих от пневмококковой инфекции; на этой же модели получены результаты, что экзосомы золотистого стафилококка, используемые в качестве вакцины, обеспечивали повышенный клеточный и гуморальный иммунитет у экспериментальных животных в отношении стафилококковой легочной инфекции [56]. Вакцинация мышей ЭМВС, продуцируемых *S. perfringens*, при внутрибрюшинном введении хотя и стимулировала у животных образование высокого титра IgG, но эти антитела не могли защитить животных от введения им летальной дозы клостридий [12]. Экзосомы, содержащие в качестве антигена капсульный полисахарид *S. pneumoniae*, вызывал заметное повышение уровня защитных IgM и IgG антител при пневмококковой инфекции [2]. ЭМВС, изолируемые из грам-положительных патогенных бактерий (*B. anthracis*, *S. pneumoniae*,

Micobacterium tuberculosis), могли стимулировать иммунные ответы и в отдельных случаях защищать хозяина от соответствующей инфекции; это позволило рассматривать эти экзосомы, как потенциальную основу для приготовления вакцин с целью предотвращения возникновения инфекций, ассоциированных с этими бактериями [38]. ЭМВС, полученные при воздействии на грамнегативные бактерии химических детергентов, могут быть использованы в качестве основы для изготовления вакцин для медицинских и ветеринарных целей. Эти вакцинные препараты обладали не только иммуностимулирующими и модулирующими свойствами, но и защищали экспериментальных мышей от инфекции токсигенными штаммами *E. coli* (O157:H7 серовара) и были иммуногены для коров [59]. Использование в качестве вакцин ЭМВС, секретируемых кишечными палочками или сальмонеллами, обогащенных низкомолекулярным белком (*Skp*) энтеротоксигенных *Escherichia coli* (ETEC), защищало мышей от легочной инфекции, вызываемой ETEC- бактериями [57]. Бактериальные ЭМВС могут быть также безопасно использованы и в качестве носителей химиотерапевтических агентов или ингибиторов специфических ферментов [2, 39, 53]. Наличие у этих ЭМВС липидно-белковых мембран позволяет включать в экзосомы некоторые терапевтические средства (например, специфические протеазы, микроРНК, нуклеазы, противоопухолевые препараты), повышающие сохранность соответствующих агентов в тканях больного человека [2, 39]. Например, введение специфических микроРНК, в структуру ЭМВС, образуемых кишечными палочками, позволило сконструировать новый лекарственный препарат, введение которого в раковые клетки подавляло экспрессию в них онкологических генов [12, 58].

Заключение

Экзосомные микровезикулярные структуры грамотрицательных и грампозитивных бактерий в последние годы стали рассматриваться как важнейший механизм межклеточной коммуникации и регуляции прокариотических и эукариотических организмов. В составе этих внеклеточных везикул могут присутствовать различные низкомолекулярные белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, антигены и агонисты и другие эффекторные, регуляторные и сигнальные молекулы, принимающие участие в физиологических реакциях человека и в развитии у него различных патологических процессов и заболеваний. Широкий профиль внеклеточных наночастиц, присутствующих и постоянно вновь образуемых в различных тканях хозяина и бактериях, зависит от природы клеток, условий среды, в которых происходит синтез этих ЭМВС. Функции внеклеточных нановезикул у грамотрицательных и грамположительных бактерий и эукариотических организмов многочисленны и разнообразны; они определяются набором присутствующих в них низкомолекулярных биомолекул, которые они несут и передают в межклеточных контактах различным живым организмам.

ЭМВС, образуемые этими бактериями, могут служить источником углерода и азота, эндогенных и пищевых нутриентов, кофакторов и ферментов, позволяющих обеспечить живые организмы необходимыми питательными веществами. Они также участвуют в метаболизме и доставке различных ионов бактериям и клеткам хозяина [6, 8, 9, 39]. Прокариотические ЭМВС защищают грамотрицательные и грампозитивные бактерии от различных неблагоприятных факторов и других агентов, обеспечивают их резистентность к антибиотикам, фагам, химическим токсикантам различного происхождения, регулируют защитный иммунный ответ хозяина в отношении многих оппортунистических и патогенных микроорганизмов, индуцируют процессы воспаления, поддерживают или, напротив, повреждают межклеточные и тканевые связи. Необходимо помнить, что ЭМВС, обнаруживаемые у человека, могут индуцироваться как бактериями, так и клетками организма хозяина [2, 6, 39]. Важно продолжать исследовать эту независимую секреторную систему прокариотических и эукариотических организмов, чтобы лучше выяснить механизм регуляции образования

и функционирования ЭМВС у здоровых людей и лиц с различными патологиями в различных условиях окружающей среды и их образа жизни [2, 10, 39]. Дальнейшие исследования бактериальных ЭМВС позволит лучше понять механизмы переноса сигнальной информации у бактерий, их участие в бактериальных *quorum sensing* системах, а также разрабатывать терапевтические подходы к созданию новых типов вакцин, антибиотиков и диагностических тестовых систем в отношении инфекций, вызванных грамположительными

и грамотрицательными бактериями [2, 8, 19, 39, 43, 59]. Чем более детально мы начнем понимать, как осуществляется биогенез ЭМВС у различных бактерий, тем лучше мы сумеем оценить значимость этих внеклеточных нановезикул, как для конкретных целей, так и для биологии живых организмов в целом. Знание функциональных особенностей ЭМВС поможет лучше понять, как эти бактериальные продукты влияют на окружающую среду, здоровье и заболевания всех живых эукариотических организмов, включая человека [2, 9, 39].

Литература | References

1. Ugolev A. M. Teoriya adekvatnogo potaniya i Trofologiya L. Nauka, 1991. 372 P.
2. Schorey J.S., Harding C. V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to and old story. *J Clin Invest* 2016; 126(4): 1181–1189. doi: 10.1172/JCI81132
3. Shenderov B.A., Sinitsa A. V., Zakharchenko M.M., Lang C. METABIOTICS. Present state, challenges and perspectives. 2020. Springer Nature Switzerland AG 123 P. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>
4. Oleskin A.V., Shenderov B. A. Microbial communication and microbiota-host interactivity. Neurophysiological, biotechnological, and biopolitical implications. New York: Nova Science Publications. 2020. 371 p
5. Macia L., Nanan R., Hosseini-Beheshti E., Grau G. E. Host- and Microbiota-Derived Extracellular Vesicles, Immune Function, and Disease Development. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 107; doi:10.3390/ijms21010107
6. Stentz R., Carvalho A. L., Jones E. J., Carding S. R. Fantastic voyage: the journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. *Biochemical Society Transactions* 2018; 46: 1021–1027. <https://doi.org/10.1042/BST20180114>
7. Kaparakis-Liaskos M.; Ferrero, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 375–387. <https://doi.org/10.1038/nri3837>
8. Orench-Rivera N., Kuehn M. J. Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cell. Microbiol* 2016; 18: 1525–1536. doi: 10.1111/cmi.12676
9. Schwachheimer C., Kuehn M. J. Outer-membrane vesicles from gramnegative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13: 605–619. doi: 10.1038/nrmicro3525
10. Guerrero-Mandujano A., Hernández-Cortez C., Antonio Ibarra J., Castro-Escarpulli G. The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic.* 2017; 18: 425–432. doi: 10.1111/tra.12488
11. O'Donoghue E. J., Krachler A. M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol* 2016; 18: 1508–1517. doi: 10.1111/cmi.12655
12. Bitto N., Kaparakis-Liaskos M. The therapeutic benefit of bacterial membrane vesicles. *Int J Mol Sci* 2017; 18:1287. doi: 10.3390/ijms18061287.
13. Cañas M-A., Fábrega M-J., Giménez R., Badia J., Baldomà L. Outer Membrane Vesicles From Probiotic and Commensal *Escherichia coli* Activate NOD1-Mediated Immune Responses in Intestinal Epithelial Cells. *Front Microbiol* 2018; 9: 498. doi: 10.3389/fmicb.2018.00498
14. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and Delivery of Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors via Outer Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; 10: 91. doi: 10.3389/fcimb.2020.00091
15. Uddin M.J., Dawan J., Jeon G., Yu T., He X., Ahn J. The Role of Bacterial Membrane Vesicles in the Dissemination of Antibiotic Resistance and as Promising Carriers for Therapeutic Agent Delivery. *Microorganisms* 2020;8(5): 670. doi: 10.3390/microorganisms8050670.
16. Skotland T., Sandvig K., Llorente A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research* 2017; 66: 30–41. doi:10.1016/j.plipres.2017.03.001
17. Yanez-Mo M., Siljander P R-M., Andreu Z., Zavec A. B., Borrás F. E., Buzas E. I. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; 4: 27066. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
18. Samuel M., Bleackley M., Anderson M., Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes in cross kingdom regulation: a viewpoint from plant-fungal interactions. *Front Plant Sci* 2015; 6:766. doi:10.3389/fpls.2015.00766
19. Jan A. T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front Microbiol* 2017; 8: 1053. doi: 10.3389/fmicb.2017.01053
20. Sutaria D.S., Jiang J., Elgamal O. A., Pomeroy S.M., Badawi M., Zhu X., Pavlovicz R., et al. Low active loading of cargo into engineered extracellular vesicles results in inefficient miRNA mimic delivery. *J Extracell Vesicles* 2017; 6:1333882. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1333882>
21. Woith E., Fuhrmann G., Melzig M. F. Extracellular Vesicles – Connecting Kingdoms. *Int J Mol Sci* 2019; 20:5695. doi: 10.3390/ijms20225695
22. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75: 193–208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9
23. Contreras-Naranjo J.C., Wu H-J., Ugaz V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: Enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* 2017; 17(21): 3558–3577. doi:10.1039/c7lc00592j.
24. Teng Y., Ren Y., Sayed M., Hu X., Lei C., Kumar A., Hutchins E. et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell Hosity & Microbe* 2018; 24: 1–16. doi:10.1016/j.chom.2018.10.001
25. Hartjes T.A., Mytnyk S., Jenster G.W., van Steijn V., van Royen M. E. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Approaches. *Bioengineering* 2019; 6, 7. doi: 10.3390/bioengineering6010007
26. Tian J., Casella G., Zhang Y., Rostami A., Li X. Potential roles of extracellular vesicles in the pathophysiology,

- diagnosis, and treatment of autoimmune diseases. *Int J Biol Sci* 2020; 16(4): 620–632. doi: 10.7150/ijbs.39629.
27. *Record M., Silvente-Poirot M., Wakelam M. J. O.* Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lip Res* 2018; 59:13161323. doi: 10.1194/jlr.E086173
 28. *Chen C., Kawamoto J., Kawai S., Tame A., Kato C., Imai T., Kurihara T.* Isolation of a Novel Bacterial Strain Capable of Producing Abundant Extracellular Membrane Vesicles Carrying a Single Major Cargo Protein and Analysis of Its Transport Mechanism. *Front Microbiol* 2020; 10: 3001. doi: 10.3389/fmicb.2019.03001
 29. *Koritzinsky E.H., Street J. M., Star R. A., Yuen P. S. T.* Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol* 2017; 232(7): 1587–1590. doi: 10.1002/jcp.25387
 30. *Ibsen S.D., Wright J., Lewis J. M., Kim S., Ko S-Y., et al.* Rapid Isolation and Detection of Exosomes and Associated Biomarkers from Plasma. *ACS Nano* 2017; 11(7): 6641–6651. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00549>
 31. *Vidal M.* Exosomes: Revisiting their role as “garbage bags”. *Traffic*, 2019; 20: 815–828. doi: 10.1111/tra.12687
 32. *Palviainen M.; Saari H.; Karkkainen O.; Pekkinen J.; Auriola S.; Yliperttula M.; Puhka M.; Hanhineva K., Siljander, P. R.* Metabolic signature of extracellular vesicles depends on the cell culture conditions. *J Extracell Vesicles* 2019; 8: 1596669. doi:10.1080/20013078.2019.1596669
 33. *Settembre C., Fraldi A.i, Medina D. L., Ballabio A.* Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14(5): 283–296. doi:10.1038/nrm3565.
 34. *Urbanelli L., Buratta S., Sagini K., Ferrara G., Lanni M., Emiliani C.* Exosome based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2015; 10: 10–27. doi: 10.2174/1574889810666150702124059
 35. *Kuipers, M.E., Hokke C. H., Smits H. H., Nolte-t Hoen E. N. M.* Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: An overview. *Front Microbiol* 2018; 9: 2182. doi:10.3389/fmicb.2018.02182
 36. *Shin M-R., Whon T. W., Bae J-W.* Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology* 2015; 33(9): 496–503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
 37. *Sizar O., Unakai C. G.* Gram Positive Bacteria. 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>. PMID:29361915
 38. *Brown L., Wolf J. M., Prados-Rosales, R., Casadevall, A.* Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13: 620–630. doi: 10.1038/nrmicro3480
 39. *Liu Y., Defourny K. A.Y., Smid E.J, Abee T.* Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Front Microbiol* 2018; 9:1502. doi: 10.3389/fmicb.2018.01502
 40. *Dauros Singorenko P., Chang V., Whitcombe A., Simonov D., Hong J., Phillips A., Swift S., Blenkiron C.* Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: A technical and biological comparison reveals heterogeneity. *J. Extracell. Vesicles* 2017; 6: 1324731. <http://doi.org/10.1080/20013078.2017.1324731>
 41. *Mallici M., Perdomo L., Veerasamy M., Andriantsitohaina R., Simard G., Martinez M. C.* Extracellular vesicles: Mechanisms in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30: 813–856. doi:10.1089/ars.2017.7265
 42. *Clarke A. J.* The “hole” story of predatory outer-membrane vesicles. *Can J Microbiol* 2018; 64(9): 589–599. doi: 10.1139/cjm-2017-0466
 43. *Toyofuku M., Nomura N., Eberi L.* Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Rev Microbiol* 2019; 17: 13–24. doi: org/10.1038/S41579-018-0112-2
 44. *Devos S., Van Putte W., Vitse J., Van Driessche G., Stremsersch S., Van Den Broek W., et al.* Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. *Environ. Microbiol.* 2017; 19: 3930–3937. doi: 10.1111/1462-2920.13793
 45. *Wang X., Zhang M., Flores S. R.L., Woloshun R. R., Yang C., Yin L., Xiang P., Xu X., Garrick M. D., Vidyasagar S., et al.* Oral gavage of ginger nanoparticle-derived lipid vectors carrying Dmt1 siRNA blunts iron loading in murine hereditary hemochromatosis. *Mol Ther* 2019; 27: 493–506. doi:10.1016/j.yjth.2019.01.003
 46. *Schulz, E., Goes A., Garcia R., Panter, F., Koch M., Muller R., Fuhrmann K., Fuhrmann G.* Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. *J Control Release* 2018; 290: 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.conrel.2018.09.030>
 47. *Cecil J.D., Sirisaengtaksin N., O'Brien-Simpson N.M., Krachler A. M.* Outer Membrane Vesicle – Host Cell Interactions. *Microbiol Spectr* 2019; 7(1). doi:10.1128/microbiolspec.PSIB-0001-2018.
 48. *Lee H. J.* Microbe-host communication by small RNAs in extracellular vesicles: Vehicles for transkingdom RNA transportation. *Int J Mol Sci* 2019; 20(6):1487. doi: 10.3390/ijms20061487
 49. *Deo P., Chow S. H., Hay I. D., Kleifeld O., Costin A., Elgass K. D., Jiang J. H., Ramm, G., Gabriel K., Dougan, G., et al.* Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis. *PLoS Pathog* 2018; 14: e1006945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006945>
 50. *Svennerholm K., Park K. S., Wikstrom J., Lasser C., Crescitelli R., Shelke G. V., et al.* *Escherichia coli* outer membrane vesicles can contribute to sepsis induced cardiac dysfunction. *Sci Rep* 2017; 7:17434. doi: 10.1038/s41598-017-16363-9
 51. *Codemo M., Muschiol S., Iovino F., Nannapaneni P., Plant L., Wai S. N., Henriques-Normark B.* Immunomodulatory effects of pneumococcal extracellular vesicles on cellular and humoral host defenses. *MBio* 2018; 9: e00559–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00559>
 52. *Morshed A., Karawadeniya B. I., Nuwan Y. M., Bandara D. Y., Kim M. J., Dutta P.* Mechanical characterization of vesicles and cells: A review. *Electrophoresis*, 2020; 41(7–8): 449–470. doi: 10.1002/elps.201900362
 53. *Watanabe K.* Bacterial membrane vesicles (MVs): novel tools as nature- and nanocarriers for immunogenic antigen, enzyme support, and drug delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100: 9837–9843. doi:10.1007/s00253-016-7916-7
 54. *Leca M., Bornet C., Montana M., Curti C., Vanelle P.* Meningococcal vaccines: current state and future outlook. *Pathol Biol* 2015; 63: 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2015.04.003>
 55. *Petousis-Harris H., Paynter J., Morgan J., Saxton P., McArdle B., Goodyear-Smith F., et al.* Effectiveness of a group B outer membrane vesicle meningococcal vaccine against gonorrhoea in New Zealand: a retrospective case-control study. *Lancet* 2017; 390: 1603–1610. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31449-6

56. Choi S. J., Kim M.-H., Jeon J., Kim O. Y., Choi Y., Seo J., et al. Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity. *PLoS One* 2015; 10: e0136021. doi: 10.1371/journal.pone.0136021
57. Hays M. P., Houben D., Yang Y., Luirink J., Hardwidge P. R. Immunization with Skp delivered on outer membrane vesicles protects mice against enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8:132. doi: 10.3389/fcimb.2018.00132
58. Gujrati V., Kim S., Kim S. H., Min J. J., Choy H. E., Kim S. C., Jon S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles as cell-specific drug-delivery vehicles for cancer therapy. *ACS Nano* 2014; 8: 1525–1537. doi: 10.1021/nn405724x.
59. Fuhrmann G., Neuer A. L., Herrmann I. K. Extracellular vesicles – a promising avenue for the detection and treatment of infectious diseases? *Eur J Pharm Biopharm* 2017; 118: 56–61. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.04.005.
60. Esoda C., Kuehn M. J. *Pseudomonas aeruginosa* Leucine Aminopeptidase Influences Early Biofilm Composition and Structure via Vesicle-Associated Antibiofilm Activity. *mBio* 2019;10(6): e02548–19. doi: 10.1128/mBio.02548–19.