

Физиология и патология внеклеточных везикул

М.А. Пантелеев¹⁻⁴, А.А. Абаева², Д.Ю. Нечипуренко¹⁻³, С.И. Обыденный^{1,2}, А.Н. Свешникова¹⁻³, А.М. Шибeko²

¹ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН»; Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 38А, корп. 1;

³физический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2;

⁴факультет биологической и медицинской физики ФГАУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»; Россия, 141700 Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

Контакты: Михаил Александрович Пантелеев taranteleev@yandex.ru

Этот год юбилейный: 50 лет назад была опубликована первая работа, сообщающая об открытии микровезикул плазмы крови. Изначально считавшиеся просто обломками клеток, «тромбоцитарной пылью», внеклеточные везикулы в настоящее время привлекают внимание биохимиков, биофизиков, врачей, фармакологов всего мира. Они гетерогенны по устройству и клеточному происхождению, несут на себе и в себе разнообразные биомолекулы и обладают широким спектром биологических активностей (прокоагулянтную, регенеративную, иммуномодулирующую и др.), которые играют важную роль в патофизиологии широкого круга заболеваний и состояний — от инфаркта, травмы и беременности до реакции «трансплантат против хозяина». Сами везикулы в качестве лекарств и их носителей, равно как и влияющие на них препараты, представляют собой объект исследований и разработок, который быстро набирает популярность. Настоящий обзор посвящен современным представлениям о внеклеточных везикулах и их практическом применении.

Ключевые слова: внеклеточные микровезикулы, экзосомы, эктосомы, прокоагулянтная активность

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-62-70

Physiology and pathology of extracellular vesicles

M.A. Panteleev¹⁻⁴, A.A. Abaeva², D. Yu. Nechipurenko¹⁻³, S.I. Obydenniy^{1,2}, A.N. Sveshnikova¹⁻³, A.M. Shibeko²

¹National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, Russia, 117997;

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS; 38A-1 Leninsky Avenue, Moscow 119991, Russia;

³Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University; 1-2 Leniskie Gory, Moscow 119991, Russia;

⁴Department of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology (State University); 9 Institutskiy Lane, Dolgoprudny, Moscow Region 141700, Russia

This year marks the 50th anniversary of the first publication about blood plasma microparticles. Initially considered as cell fragments or “platelet dust”, extracellular vesicles currently attracted the attention of biochemists, biophysicists, physicians, pharmacists around the world. They are heterogeneous in structure and derived from many cell types, express different antigen and contain variety of biomolecules that determines wide range of biological activity, including procoagulant, regenerative, immunomodulating, and others. They play an important role in the pathophysiology of different diseases and conditions — from infarction, injuries and pregnancies to the “graft versus host” disease. The vesicles as medicaments and their carriers, as well as the drugs that affect them, are a rapidly developing field of research.

Key words: extracellular microvesicles, exosomes, ectosomes, procoagulant activity

Введение

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой бислоиные структуры из мембранных липидов, которые присутствуют во всех жидкостях нашего организма: интерстициальной, спинномозговой, амниотической и других, а также в слюне, сперме, плазме крови, лимфе. Везикулы крови были открыты самими первыми и остаются наиболее изученными до сих пор. Их размер варьирует в широких пределах — от десятков нанометров до микрона и более, форма чаще всего сферическая (особенно для небольших). ВВ образуют-

ся при разнообразных процессах активации, жизнедеятельности и смерти практически из любых клеток. В зависимости от происхождения и устройства, среди ВВ выделяют экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела и другие подтипы (впрочем, эта классификация пока плохо проработана и не устоялась). В отличие от клеток, даже самых примитивных, ВВ «мертвы»: у них нет мембранной и ионной асимметрии, зависящих от аденозинтрифосфата (АТФ) процессов и прочих признаков даже самых примитивных клеток. Однако они несут на себе и внутри себя разнообразные

белки, липиды и нуклеиновые кислоты, способные существенно влиять на биологические процессы. За последние десятилетия ВВ поднялись в статусе от «клеточного мусора» и «обломков клеток» до активно изучаемых и важных объектов. Существуют профессиональное общество и специализированный журнал (www.journalofextracellularvesicles.net), посвященные исключительно ВВ.

Текущий год для ВВ юбилейный: существование липидного везикулярного материала в крови было обнаружено ровно полвека назад в работах английского физиолога Питера Вульфа [1], который пытался разобраться в природе прокоагулянтной активности плазмы крови. В каком-то смысле история открытия ВВ напоминает историю открытия нуклеиновых кислот Фридрихом Мишером: 1) они были обнаружены исследователем-одиночкой в результате долгих попыток разрешить некую сложную фундаментальную загадку; 2) несмотря на успешное решение этой конкретной загадки (подробно описанной чуть ниже), истинная значимость ВВ на протяжении десятилетий оставалась никем не оцененной.

Исследования Вульфа были направлены на поиск в плазме гипотетических объектов, способных взаимодействовать с белками свертывания и улучшать их работу. Из-за маленького размера, в целом лежащего ниже дифракционного предела, ВВ почти не видны в оптических микроскопах (если не использовать флуоресцентные метки), а из-за недостаточно развитого цитоскелета плохо переносят пробоподготовку для любого вида электронной или зондовой микроскопии. Поэтому Вульф выявил их благодаря способности ускорять реакции свертывания крови. Как известно, основные реакции свертывания крови протекают на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах [2]: ферменты, субстраты, кофакторы связываются с фосфатидилсерином через ионные

кальциевые «мостики», и из-за концентрирования белков скорости реакций возрастают на порядки [3]. Главным поставщиком мембранной поверхности для свертывания крови *in vivo* считаются активированные тромбоциты, при стимуляции которых появляется субпопуляция с фосфатидилсерином на поверхности [4–6]. Абсолютная необходимость мембранной поверхности для свертывания крови стала понятна достаточно рано (самый главный способ антикоагуляции при заготовке препаратов крови – добавление цитрата натрия – основан как раз на удалении из плазмы крови ионов кальция), равно как и способность тромбоцитов поддерживать мембранные реакции свертывания. Но загадка заключалась в том, что плазма крови способна свертываться даже без клеток [7]. Но чистые выделенные белки свертывания без мембраны не работают. Получается, в плазме должны были быть еще какие-то объекты, вероятно, мембранной природы? Концентрирование этих объектов при центрифугировании на высоких скоростях и наблюдение с помощью световой микроскопии (рис. 1) позволили их выявить. Объекты получили название «тромбоцитарной пыли».

Как стало понятно позже, даже ВВ плазмы имеют далеко не только тромбоцитарное происхождение (хотя тромбоцитарные считаются самыми многочисленными). Они способны не только ускорять свертывание крови, но также ингибировать его и индуцировать фибринолиз, стимулировать и подавлять иммунную систему, влиять на регенерацию и ангиогенез, экспрессию генов и дифференцировку разнообразных клеток (например, мезенхимальных стволовых [9, 10]).

В данном обзоре мы вкратце рассмотрим современные представления об устройстве, происхождении и свойствах ВВ, чтобы затем сосредоточиться на описании тех функций, которые они могут осуществлять

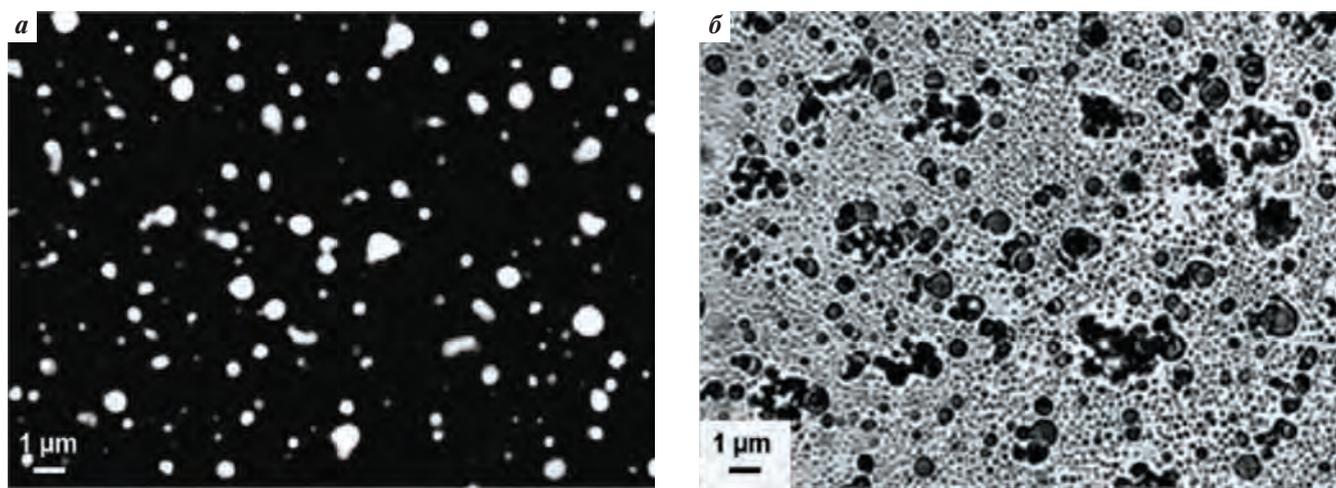


Рис. 1. Вид эритроцитарных микровезикул из плазмы крови пациента с бета-талассемией при наблюдении в световой микроскоп (воспроизведено из [8]): а – флуоресцентная конфокальная микроскопия, б – классическая световая микроскопия. Шкала масштаба – 1 µм
 Fig. 1. Erythrocyte microvesicles from plasma of a patient with beta-talassemia as seen in an optical microscope (reproduced from [8]): a – fluorescence confocal microscopy, б – traditional light microscopy. Scale – µm

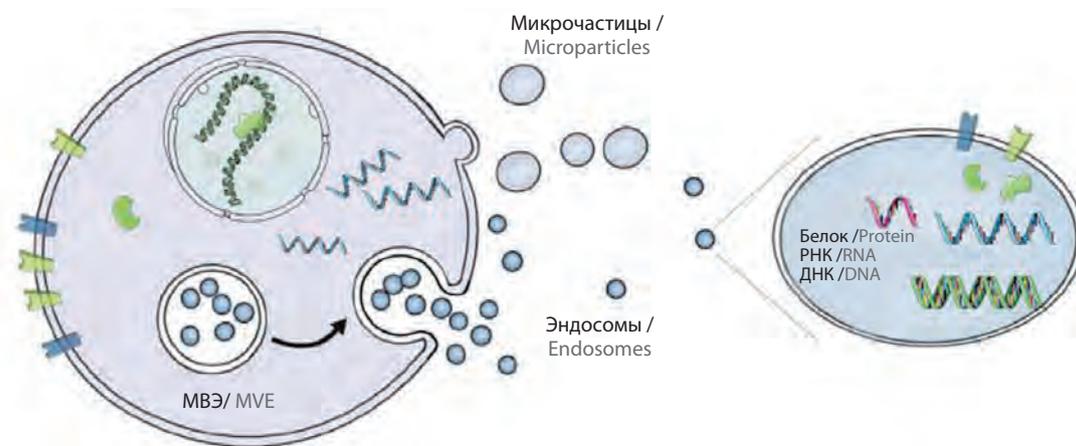


Рис. 2. Основные пути образования внеклеточных везикул в современной трактовке (воспроизведено из [11]): справа – отщепление от клеточной мембраны (в результате получаются микровезикулы); слева – формирование экзосом внутри мультивезикулярной эндосомы (МВЭ).

Сокращения: ДНК и РНК – дезокси- и рибонуклеиновые кислоты

Fig. 2. Main pathways of extracellular vesicles' formation according to current knowledge (reproduced from [11]): right – separation from the cell membrane (this results in formation of microvesicles); left – formation of exosomes inside multivesicular endosome (MVE).

Abbreviations: DNA and RNA – deoxy- and ribonucleic acids

в норме и патологии, а также на представлении их возможного применения на практике в целях диагностики и терапии.

Происхождение и устройство внеклеточных везикул

ВВ представляют собой бислойные липосомы, несущие разнообразные мембранные белки, матричные и микрорибонуклеиновые кислоты (мРНК и миРНК). Точный состав и структура зависят от типа клеток, на которых ВВ формируются в результате выпячивания и отрыва участков разных клеточных мембран (рис. 2). Два главных класса ВВ – это экзосомы и эктосомы, они же микровезикулы.

Микровезикулы, или эктосомы, отщепляются от плазматической (т.е. внешней) мембраны практически всех клеток (для которых совершались соответствующие исследования) при активации, смерти и просто в ходе их жизни и старения. Они имеют 100–1000 нм в диаметре и являются единственным видом ВВ, доступным для прямого наблюдения в оптическом диапазоне с помощью микроскопа или проточного цитометра. Их состав по липидам и мембран-

ным белкам качественно близок к составу плазматической мембраны порождающей клетки, но количественно может сильно различаться. В результате работ последних лет у них даже обнаружили цитоскелет (рис. 3). Как и плазматическая мембрана, микровезикулярная содержит фосфатидилсерин. Однако в отличие от клеток микровезикулы не имеют АТФ-зависимых механизмов для поддержания мембраны в асимметричном состоянии, поэтому фосфатидилсерин присутствует на внешнем слое мембраны микровезикулы постоянно [11]. Именно микровезикулы являются главным неклеточным источником прокоагулянтной поверхности в плазме крови, соперничая в этом даже с тромбоцитами [13, 14], и именно они, по-видимому, были обнаружены Вульфом в его работе.

Второй главный класс ВВ – экзосомы, отщепляемые от мембран внутриклеточных компартментов частицы 50–100 нм в диаметре [15]. Теоретически их можно детектировать по флуоресценции, но понять структуру при этом все равно нельзя из-за дифракционного ограничения разрешающей способности, если

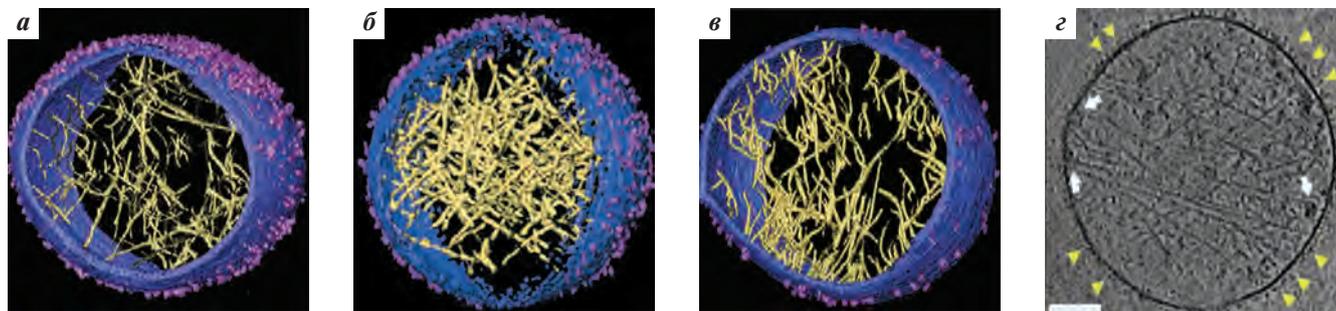


Рис. 3. Криоэлектронная томография и ультраструктура тромбоцитарных микровезикул. Показаны 3 разные микровезикулы (а–в) и 1 исходный срез (z). Видна мембрана, нити актина и мембранные гликопротеины. Шкала масштаба – 100 нм. Воспроизведено из [12]

Fig. 3. Cryo-electron tomography and ultrastructure of platelet microvesicles. Different microvesicles (a – v) and the initial section (z) are shown. Membrane, actin filaments, and membrane glycoproteins are apparent. Scale – 100 nm. Reproduced from [12]

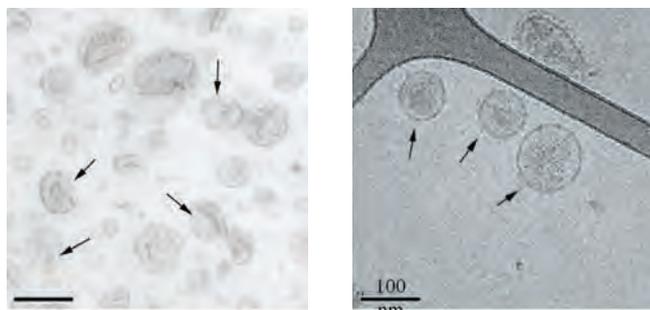


Рис. 4. Электронная микроскопия экзосом (воспроизведено из [16]): слева – стандартная, справа – криоэлектронная
Fig. 4. Electron microscopy of exosomes (reproduced from [16]): left – standard, right – cryo-electron

только не использовать новейшие технологии сверхвысокого разрешения STORM или PALM, поэтому главным источником информации о структуре экзосом является электронная микроскопия (рис. 4). При этом из-за нестабильности экзосом качественные изображения дает только криоэлектронная микроскопия, при которой сокращены процедуры подготовки образца. В отличие от микровезикул экзосомы предположительно не несут фосфатидилсерин и не имеют прокоагулянтной активности.

Разделение на экзосомы и эктосомы достаточно условно. Распределение этих образований по размерам не является дискретным, антигенный состав тоже в значительной степени может быть смешанным, и отделить их друг от друга сложно. Например, недавнее детальное исследование Бриссона и соавт. показало, что ВВ плазмы крови плохо укладываются в вышеописанные 2 класса [17]. В плазме крови оказалось 3 типа везикул, отличающихся по форме: сферические, трубчатые и фрагментарные. Сферические ВВ были равномерно распределены по диаметру от 30 до 1000 нм и составляли около 95 % всех ВВ, при этом никакой жесткой границы распределения не было. Окраска антителами с наночастицами золота показала, что сферические везикулы на 40 % тромбоцитарные, но только треть из них содержит фосфатидилсерин; 20 % были эритроцитарными, причем почти все без фосфатидилсерина (что озадачивает, так как у эритроцита нет внутренних мембран без фосфатидилсерина). Трубчатые ВВ были 1–5 мкм длиной и составляли около 5 % всех ВВ, мембранные фрагменты размером 1–8 мкм – около 0,5 % и не более. При этом трубки тромбоцитарного происхождения не несли фосфатидилсерина, и значительную долю составляли загадочные мультинегативные трубки неясного происхождения. Тут стоит отметить, что из-за того, что ВВ находятся на грани чувствительности современных методов, неопределенность их количественных показателей в разных жидкостях организма составляет порядки. Интересно отметить, что в исследовании Бриссона в плазме крови наблюдалось 30 тыс. ВВ в микролитре, а стандартная проточная цитометрия

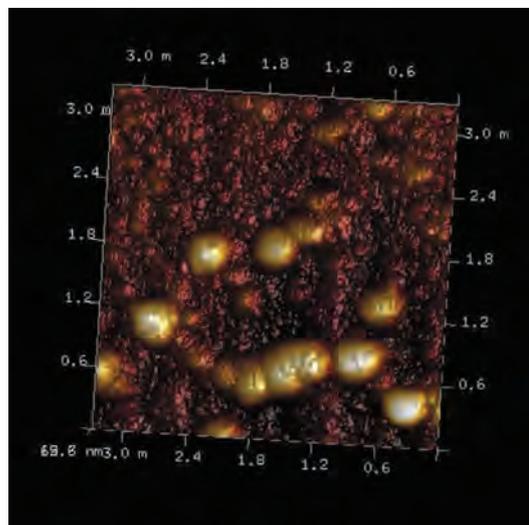


Рис. 5. Тромбоцитарные микровезикулы под атомно-силовым микроскопом (воспроизведено из [18])
Fig. 5. Platelet microvesicles in an atomic force microscope (reproduced from [18])

давала в микролитре 500 ВВ; т. е. с помощью цитометра можно определить только 1–2 % от общего количества ВВ.

Атомно-силовая микроскопия способна детектировать ВВ (рис. 5), но при этом сложно сохранить их структуру в процессе пробоподготовки и сложно использовать этот метод для количественных оценок.

Наконец, в последние годы выделяют 3-й тип везикул – апоптотические тела [19, 20]. Они похожи на микровезикулы по размеру и также несут фосфатидилсерин. Однако эти ВВ специально образуются в ходе запрограммированной клеточной смерти для «упаковки» содержимого клетки и часто включают элементы ядерного материала и органеллы [20]. По этим параметрам и ряду других они заметно отличаются от состава микровезикул, которые отделяются от плазматической мембраны при активации или механическом повреждении клетки.

Формирование ВВ, по-видимому, является универсальным феноменом, сопровождающим функционирование любых биологических мембран: они производятся любыми клетками и содержатся в любых жидкостях организма. В какой-то степени охарактеризованы ВВ синовиальной жидкости и слюны [21], мочи [22], межклеточной жидкости печени [23], мозга [20], плаценты [24], внеклеточного матрикса [25] и особенно органического матрикса скелетных тканей [26]. Разумеется, наиболее детально изученными являются ВВ плазмы крови.

Считается, что в норме кровь содержит только ВВ, произведенные клетками крови или сосудистого русла. Появление ВВ иного происхождения обычно характерно только для травм или онкологических заболеваний. Больше всего – тромбоцитарных микровезикул, возможно, часть из них производится мегакариоцитами. Эритроцитарные ВВ также достаточно многочис-

сленны, даже в норме [27], а при серповидноклеточной анемии, бета-талассемии и других нарушениях их число заметно выше. Лейкоцитарных везикул очень мало, но они могут иметь интересные виды биологической активности (в частности, в отличие от тромбоцитов и эритроцитов, они несут сигнальные нуклеиновые кислоты). Чаще всего предметом изучения являются моноцитарные ВВ [28]. Эндотелиальные везикулы немногочисленны, повышение их уровня обычно связано с системными заболеваниями [29]. Для каждой клетки существует свой набор стимуляторов выброса ВВ, обычно включающий свыше десятка активаторов.

Как предполагается, микрочастицы формируются прямым выпячиванием плазматической мембраны. Впрочем, в этом задействованы сложные молекулярные «машины», требуется регуляция актинового и микротрубочкового цитоскелетов, работа ассоциированных с ними миозиновых и кинезиновых моторов, специальные белки (такие как SNARE). Напротив, экзосомы формируются как интралюминальные везикулы больших вакуолей – многовезикулярных эндосом (МВЭ) – и выбрасываются наружу при их слиянии с мембраной. Из подробностей этого процесса известно, что МВЭ бывают двух морфологически идентичных типов [16]: а) богатые холестерином и несущие экзосомы для секреции и б) бедные холестерином и несущие органеллы и белки к лизосомам для уничтожения. Пока лучше всего изучен процесс формирования МВЭ второго типа: выявлена роль эндосомальных сортирующих комплексов (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) и в целом охарактеризована сортировка содержимого на мембране в процессе формирования. Не исключено, что ряд этих механизмов задействован и в секреции экзосом.

Взаимодействие ВВ с клетками и слияние с ними изучены недостаточно. По-видимому, клетки используют самые разнообразные механизмы в зависимости от своего типа и вида активации, включая клатрин-зависимый эндоцитоз, кавеолин-опосредованный вход, макропиноцитоз, фагоцитоз, интернализацию посредством липидных рафтов [30].

Основные свойства ВВ связаны с их ключевыми компонентами – липидами мембран, мембранными белками и нуклеиновыми кислотами внутри [30, 31]. В первую очередь это прокоагулянтная активность. Благодаря фосфатидилсерину ВВ связывают белки свертывания и ускоряют мембранные реакции. Далее, благодаря мембранным белкам, ВВ обладают адгезионной и сигнальной активностью: одни белки-рецепторы отвечают за физическое взаимодействие ВВ с клетками-мишенями, а другие – за индукцию определенных сигналов. Наконец, важнейшее свойство ВВ – это регуляция экспрессии генов в клетках-мишенях при слиянии с мембраной и выделении своего содержимого в цитоплазму. Наиболее важными нуклеиновыми кислотами ВВ являются миРНК – малые некодирующие РНК, способные к транс- и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции [32].

Физиологические и патологические роли внеклеточных везикул

ВВ несравненно лучше изучены относительно патологии, нежели физиологического потенциала. Их участие в многочисленных патологических процессах хорошо документировано, в то время как доказанных физиологических функций немного.

Исторически самая первая функция ВВ – это прокоагулянтная активность, и она лучше всего изучена

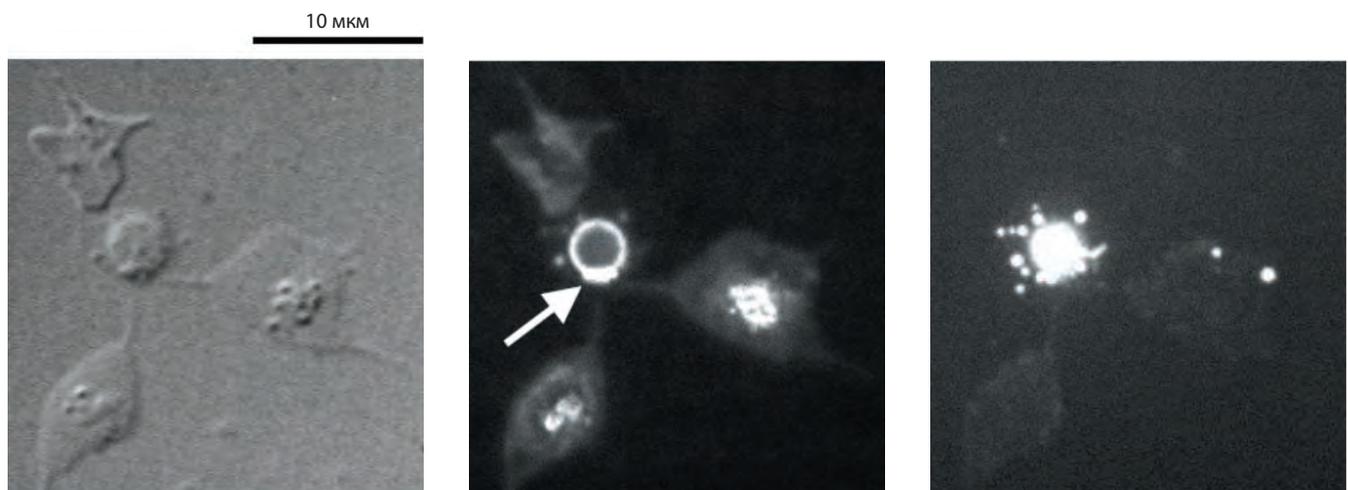


Рис. 6. Формирование микровезикул при активации тромбоцитов (воспроизведено из [40]). На микрофотографии показаны 4 тромбоцита после активации: слева – в дифференциальном интерференционном контрасте (ДИК), в центре – конфокальная микроскопия с окраской антителом против интегринов (общий маркер тромбоцитов), справа – с окраской аннексином V. Можно увидеть, что один тромбоцит стал прокоагулянтным и окружен россыпью микровезикул

Fig. 6. Formation of microvesicles during activation of platelets (reproduced from [40]). Microphotograph shows 4 platelets after activation: left – in differential interference contrast, center – confocal microscopy with staining by antibodies against integrins (general platelet marker), right – with staining by annexin V. One of the platelets became procoagulating and is surrounded by a scattering of microvesicles

для микровезикул плазмы крови. Присутствующий в их мембранах фосфатидилсерин не просто ускоряет мембранные реакции свертывания по аналогии с клетками. В силу плохо понятных пока причин микровезикулы связывают белки свертывания в 50–100 раз лучше, чем наиболее сильно активированные тромбоциты [14]. В результате одна маленькая микровезикула по способности ускорять основные реакции свертывания крови сопоставима с полноценным тромбоцитом. При этом во время активации тромбоцитов сильными стимуляторами [33–36] или во время иных процессов [37, 38] (в частности, при хранении тромбоконцентратов [39]) идет интенсивная везикуляция: свыше десятка везикул образуется на один прокагулянтный тромбоцит (рис. 6) [40]. В результате легко может случиться, что вклад тромбоцитарных микровезикул в ускорение реакций свертывания будет выше вклада самих тромбоцитов.

Прокагулянтная активность ВВ плазмы крови не ограничивается пассивным ускорением реакций свертывания. Циркулирующие микровезикулы могут нести на себе активные долгоживущие факторы свертывания, такие как IXa, XIa или XIIIa [11]. Тромбоцитарные и эритроцитарные микровезикулы напрямую активируют свертывание крови по контактному пути [41], в то время как моноцитарные микровезикулы несут тканевый фактор и активируют по пути внешнему [31].

Какую роль это все играет в норме и в патологии? Для здорового организма ответ пока неопределенный. Ускорение реакций свертывания циркулирующими микровезикулами здоровых доноров достаточно заметно, равно как и вклад микровезикул, генерируемых при активации тромбоцитов *in vitro*. Однако прямых доказательств их вклада *in vivo* пока нет. Еще меньше информации о возможном значении активации свертывания микровезикулами в норме.

У пациентов наблюдается повышение концентрации ВВ, в том числе несущих активные факторы и активирующих свертывание, при самых различных заболеваниях, состояниях и процедурах: инсульте, травмах, онкологических заболеваниях, химиотерапии, беременности [31]. Однако при этом нет ответа на принципиальный вопрос — тромботические осложнения вызывают эти ВВ, или они являются их следствием?

Два других варианта биологического действия ВВ (запуск путей сигнализации при контакте с клеточными рецепторами и регуляция экспрессии генов через мРНК) стоит рассматривать в связке, так как они часто соседствуют и с трудом отделимы друг от друга. Как и в случае со свертыванием, физиологические функции ВВ пока недостаточно понятны. Исторически первой является демонстрация способности простасом регулировать мобильность сперматозоидов [42]. В ряде недавних работ было обнаружено, что экзосомы могут нести на себе молекулы-морфогены,

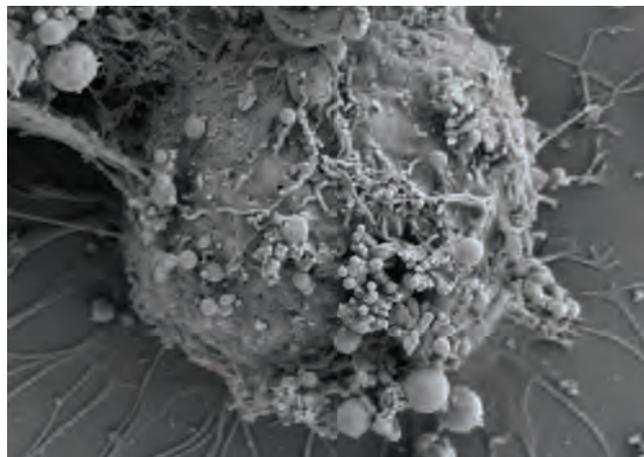


Рис. 7. Поверхность циркулирующей опухолевой клетки с большим количеством отщепляющихся микровезикул (воспроизведено из [46]). Сканирующая электронная микроскопия

Fig. 7. Surface of a circulating tumor cell with a large number of separating microvesicles (reproduced from [46]). Scanning electron microscopy

такие как секретируемые белки Wnt, управляющие дифференциацией клеток в процессе развития и формированием биологических структур [43]. Для клеток нервной системы показано значение ВВ в регуляции формирования миелиновой оболочки [44]. ВВ внеклеточного матрикса служат узловыми точками в процессах биоминерализации [45]. Обсуждается возможное участие ВВ в регуляции иммунитета путем обмена сигналами между клетками, вплоть до антиген-презентирования [30], так как не все сигнальные молекулы могут далеко двигаться в плазме крови и не все клетки легко мобильны.

Напротив, роль ВВ в патологических процессах проявляется ярко и считается надежно установленной. Это особенно касается нарушений иммунитета и онкологических заболеваний, при которых формирование ВВ происходит особо бурно (рис. 7).

ВВ способны переносить разнообразные рецепторы (например, тромбоцитарные интегрин) на поверхность раковых клеток путем слияния с ними, индуцировать активацию киназных каскадов (например, путей митоген-активируемой протеинкиназной сигнализации и протеинкиназы В), стимулировать экспрессию металлопротеиназ матрикса и сосудистого эндотелиального фактора роста, подавлять апоптоз, вызывать хемотаксис и способствовать появлению метастазов, а также развитию множественной лекарственной устойчивости (путем переноса одних мембранных молекул или индукции экспрессии других) [47]. Сейчас эта область исследований бурно развивается.

Применение внеклеточных везикул в фармакологии, диагностике и терапии

В настоящее время ВВ в медицине рассматриваются во всех возможных качествах — как биомаркеры, потенциальные лекарственные средства, носители лекарств, мишени терапии. Использование ВВ в каче-

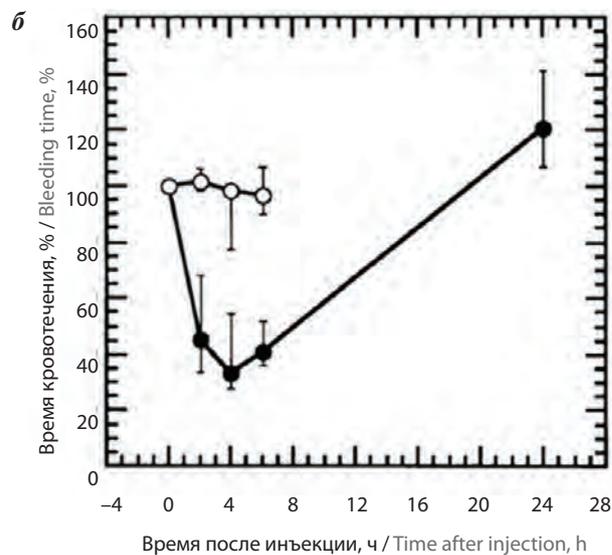
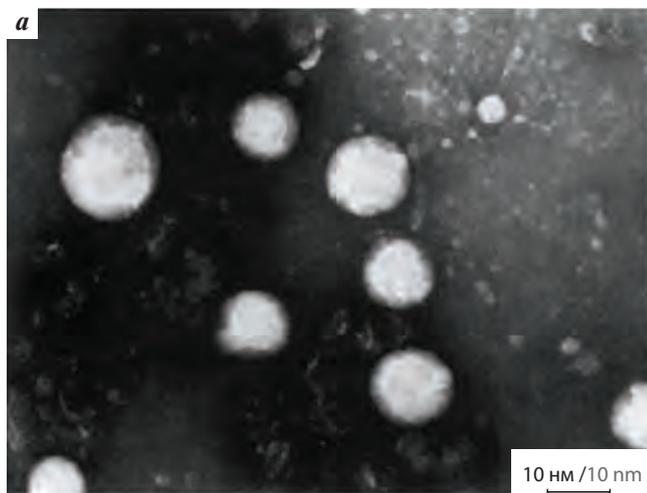


Рис. 8. «Искусственные тромбоциты» на основе микровезикул (воспроизведено из [50]): слева — негативно окрашенная трансмиссионная электронная микрофотография (масштаб 100 нм), справа — сокращение времени кровотечения при добавлении лиофилизированных восстановленных тромбоцитарных микровезикул (черный) по сравнению с контролем (белый)

Fig. 8. “Artificial platelets” based on microvesicles (reproduced from [50]): left — negative staining transmission electron microphotography (scale 100 nm), right — decrease in bleeding time after addition of lyophilized recovered platelet microvesicles (black) compared to control (white)

стве биомаркеров тромботических рисков, онкологических нарушений и иммунных реакций на данный момент является единственным из этих вариантов, который вышел из стадии разработки. Несмотря на все сложности, связанные с воспроизводимой детекцией ВВ, они успешно используются для прогнозирования тромбозов при широком круге нарушений [31]. ВВ определенных типов можно применять для избирательной детекции в конкретных случаях: так, эндотелиальные микровезикулы успешно показали себя как прогностический маркер развития острой реакции «трансплантат против хозяина» при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [48]. Другой пример — анализ профиля миРНК в циркулирующих ВВ пациентов с острым лимфобластным лейкозом, позволяющий различить подтипы заболевания [49]: предварительные исследования показали, что ВВ из клеток Т-клеточного и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза обладают принципиально разным профилем миРНК. Аналогичные исследования сейчас проводятся для широкого круга онкологических и онкогематологических заболеваний, так как микровезикулы плазмы или сыворотки представляют собой очень привлекательный вариант «жидкой биопсии». Так, в феврале 2017 г. появилась работа, посвященная исследованию миРНК-155 (не-кодирующего транскрипта гена кластера интеграции В-клеток) в ряде гематологических заболеваний: она резко повышена при хроническом лимфоцитарном лейкозе, ангиомиолипоме и макроглобулинемии Вальденстрема.

Сами по себе ВВ могут в ряде ситуаций быть потенциально полезны. Одна из интересных попыток их применения — создание на их основе «искусственных тромбоцитов» для того, чтобы заменить тромбоконцентраты в заместительной терапии. Поскольку

тромбоцитарные микровезикулы несут те же самые белки и обладают той же прокоагулянтной активностью, потенциально они способны быть гемостатически эффективны. Метод получения и лиофилизации таких везикул для переливания был впервые успешно разработан одной из биотехнологических компаний в США в конце 1990-х гг. [50]. Они действительно сохраняли частичную функциональность; первые испытания на животных и первые фазы клинических испытаний показали их способность сокращать время кровотечения (рис. 8). По статусу на 2003 г. тромбоцитарные микрочастицы Surplex находились в III фазе клинических испытаний. После этого разработку приостановили, и только несколько лет назад один из авторов поведал о ее судьбе [51]. По его словам, исследование затормозилось из-за редкости кровотечений тромбоцитарной природы, затрудняющей надежное доказательство эффективности.

Везикулы мезенхимальных стволовых клеток могут использоваться для подавления роста опухоли и ускорения регенерации [52]. Еще один пример — использование микровезикул в иммунотерапии рака, например, для генерации естественных киллеров при лечении острого миелобластного лейкоза [53]. В обоих этих случаях ВВ дают интересные возможности, как и терапия мезенхимальными стволовыми клетками, и иммунотерапия рака — новые и сложные подходы, сопряженные с многочисленными проблемами.

Взаимодействие ВВ с их клетками-мишенями не только является источником проблем, но и может быть выигрышно — например, его логично использовать для направленной доставки лекарств. Эти подходы пока на стадии испытаний на животных [54].

Наконец, механизмы формирования разных типов ВВ в разных клетках организма в зависимости от типа

стимуляции или в ходе жизнедеятельности постепенно проясняются. Для некоторых из этих механизмов уже существуют ингибиторы, и формирование

некоторых микровезикул сейчас рассматривается как мишень для терапии при онкологических и аутоиммунных заболеваниях [55].

Работа авторов поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», грантами Президента РФ МД-229.2017.4, МК-2706.2017.4, МК-9245.2016.4 и МК-5879.2016.4, а также грантами РФФИ 17-04-01309, 16-04-01163, 16-04-00125, 16-34-00651 и 16-34-01342.

This work was supported by the «Basic Research for Development of Biomedical Technologies» Program for Basic Research of the RAS Presidium, grants of the President of the Russian Federation MD-229.2017.4, МК-2706.2017.4, МК-9245.2016.4, and МК-5879.2016.4, as well as grants of the Russian Foundation for Basic Research 17-04-01309, 16-04-01163, 16-04-00125, 16-34-00651, and 16-34-01342.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269–88. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x. PMID: 6025241.
2. Pantelev M.A., Dashkevich N.M., Ataulakhanov F.I. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015;136:699–711. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.07.025. PMID: 26278966.
3. Pantelev M.A., Saenko E.L., Ananyeva N.M., Ataulakhanov F.I. Kinetics of Factor X activation by the membrane-bound complex of Factor IXa and Factor VIIIa. *Biochem J* 2004;381:779–94. DOI: 10.1042/BJ20031748. PMID: 15104540.
4. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N. et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood* 2016;128:1745–55. DOI: 10.1182/blood-2016-02-696898. PMID: 27432876.
5. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J. et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost* 2005;3:2545–53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x. PMID: 16241952.
6. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N. et al. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered “cap” on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem* 2013;288:29621–32. DOI: 10.1074/jbc.M113.474163. PMID: 23995838.
7. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 2013;3:329–40. DOI: 10.4103/2045-8932.114760. PMID: 24015332.
8. Ferru E., Pantaleo A., Carta F. et al. Thalassemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase. *Haematologica* 2014;99:570–8. DOI: 10.3324/haematol.2013.084533. PMID: 24038029.
9. Melki I., Tessandier N., Zufferey A., Boilard E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* 2017;19:1–8. DOI: 10.1080/09537104.2016.1265924. PMID: 28102737.
10. Herring J.M., McMichael M.A., Smith S.A. Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med* 2013;27:1020–33. DOI: 10.1111/jvim.12128. PMID: 24038029.
11. Dostert G., Mesure B., Menu P., Velot E. How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? *Front Cell Dev Biol* 2017;5:6. DOI: 10.3389/fcell.2017.00006. PMID: 28224125.
12. Tamir A., Sorrentino S., Motahedeh S. et al. The macromolecular architecture of platelet-derived microparticles. *J Struct Biol* 2016;193:181–7. DOI: 10.1016/j.jsb.2015.12.013. PMID: 26767592.
13. Lipets E., Vlasova O., Urnova E. et al. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients. *PLoS One* 2014;9:e87692. DOI: 10.1371/journal.pone.0087692. PMID: 24498168.
14. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y. et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007;97:425–34. DOI: 10.1160/TH06-06-0313. PMID: 17334510.
15. Cocucci E., Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* 2015;25:364–72. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.01.004. PMID: 26516592.
16. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200(4):373–83. DOI: 10.1083/jcb.201211138. PMID: 23420871.
17. Arraud N., Linares R., Tan S. et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 2014;12:614–27. DOI: 10.1111/jth.12554. PMID: 24618123.
18. Sarkar S., Dasgupta A.K. Microparticle of drug and nanoparticle: a biosynthetic route. *Pharmacol Res Perspect* 2015;3:e00188. DOI: 10.1002/prp2.188. PMID: 26516592.
19. Loyer X., Vion A.C., Tedgui A., Boulanger C.M. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res* 2014;114:345–53. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300858. PMID: 24436430.
20. Schindler S.M., Little J.P., Klegeris A. Microparticles: a new perspective in central nervous system disorders. *Biomed Res Int* 2014;2014:756327. DOI: 10.1155/2014/756327. PMID: 24860829.
21. Agouni A., Andriantsitohaina R., Martinez M.C. Microparticles as biomarkers of vascular dysfunction in metabolic syndrome and its individual components. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;12:483–92. PMID: 24846237.
22. Gonzalez E., Falcon-Perez J.M. Cell-derived extracellular vesicles as a platform

- to identify low-invasive disease biomarkers. *Expert Rev Mol Diag* 2015;15:907–23. DOI: 10.1586/14737159.2015.1043272. PMID: 25948243.
23. Royo F., Falcon-Perez J.M. Liver extracellular vesicles in health and disease. *J Extracell Vesicles* 2012;11:1. DOI: 10.3402/jev.v1i0.18825. PMID: 24009882.
 24. Aharon A., Brenner B. Placenta-derived microparticles. *Thromb Res* 2013;131(1):22–4. DOI: 10.1016/S0049-3848(13)70014-8. PMID: 23452734.
 25. Shapiro I.M., Landis W.J., Risbud M.V. Matrix vesicles: Are they anchored exosomes? *Bone* 2015;79:29–36. DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.013. PMID: 25980744.
 26. Cui L., Houston D.A., Farquharson C., MacRae V.E. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone* 2016;87:147–58. DOI: 10.1016/j.bone.2016.04.007. PMID: 27072517.
 27. Westerman M., Porter J.B. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol Dis* 2016;59:134–9. DOI: 10.1016/j.bcmd.2016.04.003. PMID: 27282583.
 28. Halim A.T., Ariffin N.A., Azlan M. Review: the Multiple Roles of Monocytic Microparticles. *Inflammation* 2016;39:1277–84. DOI: 10.1007/s10753-016-0381-8.
 29. Curtis A.M., Edelberg J., Jonas R. et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med* 2013;18:204–14. DOI: 10.1177/1358863X13499773. PMID: 23892447.
 30. Hwang I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol Cells* 2013;36:105–11. DOI: 10.1007/s10059-013-0154-2. PMID: 23807045.
 31. Nomura S., Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care* 2015;3(1):2. DOI: 10.1186/s40560-014-0066-z. PMID: 25705427.
 32. Redzic J.S., Balaj L., van der Vós K.E., Breakefield X.O. Extracellular RNA mediates and marks cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2014;28:14–23. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.04.010. PMID: 24783980.
 33. Obydenyy S.I., Sveshnikova A.N., Ataulkhanov F.I., Pantelev M.A. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost* 2016;14:1867–81. DOI: 10.1111/jth.13395. PMID: 27343487.
 34. Sveshnikova A.N., Ataulkhanov F.I., Pantelev M.A. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol Biosyst* 2015;11:1052–60. DOI: 10.1039/c4mb00667d. PMID: 25627921.
 35. Shakhidzhanov S.S., Shaturny V.I., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation. *Biochim Biophys Acta* 2015;1850:2518–29. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.013. PMID: 26391841.
 36. Kotova Y.N., Ataulkhanov F.I., Pantelev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. *J Thromb Haemost* 2008;6:1603–5. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03052.x. PMID: 18541002.
 37. Topalov N.N., Yakimenko A.O., Canault M. et al. Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin alpha(IIb)beta(3). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2475–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.253765. PMID: 22837472.
 38. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Pantelev M.A. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br J Haematol* 2012;157:105–15. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.09021.x. PMID: 23379894.
 39. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E. et al. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016;110:244–52. DOI: 10.1111/vox.12364. PMID: 26646605.
 40. Artemenko E.O., Yakimenko A.O., Pichugin A.V. et al. Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets. *Biochem J* 2016;473:435–48. DOI: 10.1042/BJ20150779. PMID: 26607836.
 41. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A. et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One* 2015;10: e0116665. DOI: 10.1371/journal.pone.0116665. PMID: 25688860.
 42. Stegmayr B., Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 1982;10:253–7. PMID: 6219486.
 43. Gross J.C., Chaudhary V., Bartscherer K., Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14:1036–45. DOI: 10.1038/ncb2574. PMID: 22983114.
 44. Bakhti M., Winter C., Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 2011;286:787–96. DOI: 10.1074/jbc.M110.190009. PMID: 20978131.
 45. Anderson H.C., Garimella R., Tague S.E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 2005;10:822–37. PMID: 15569622.
 46. Stott Sh., Breakefield X., Nahed B. Exosomes and circulating vesicles as biomarkers. The Center for Surgery, Innovation & Bioengineering. Available at: <http://cfsib.com/bioengineering/exosomes/>
 47. Zmigrodzka M., Guzera M., Miskiewicz A. et al. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumour Biol* 2016;37:14391–401. DOI: 10.1007/s13277-016-5358-6. PMID: 27629289.
 48. Pihusch V., Rank A., Steber R. et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation* 2006;81:1405–9. DOI: 10.1097/01.tp.0000209218.24916.ba. PMID: 16732177.
 49. Li W.Y., Chen X.M., Xiong W. et al. Detection of microvesicle miRNA expression in ALL subtypes and analysis of their functional roles. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014;34:640–5. DOI: 10.1007/s11596-014-1330-0. PMID: 25318871.
 50. Chao F.C., Kim B.K., Houranieh A.M. et al. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelets. *Transfusion* 1996;36:536–42. PMID: 8669086.
 51. Nasiri S. Infusible platelet membrane as a platelet substitute for transfusion: an overview. *Blood Transfus* 2013;11:337–42. DOI: 10.2450/2013.0209-12. PMID: 23736926.
 52. Akyurekli C., Le Y., Richardson R.B. et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev* 2015;11:150–60. DOI: 10.1007/s12015-014-9545-9. PMID: 25091427.
 53. Oyer J.L., Igarashi R.Y., Kulikowski A.R. et al. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(4):632–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.037. PMID: 25576425.
 54. Tang K., Zhang Y., Zhang H. et al. Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles. *Nat Commun* 2012;3:1282. DOI: 10.1038/ncomms2282. PMID: 23250412.
 55. Nielsen C.T., Rasmussen N.S., Heegaard N.H., Jacobsen S. “Kill” the messenger: Targeting of cell-derived microparticles in lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 2016;15:719–25. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.03.009. PMID: 26970484.