

# Внеклеточные везикулы (экзосомы) и паразитарные болезни: типовые технологии изоляции и исследования. Часть 1

Шендеров Б.А.<sup>1,2</sup>,  
Кузнецова К.Ю.<sup>3</sup>,  
Сергиев В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)», 109004, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, 119121, г. Москва, Российская Федерация

Экзосомные микровезикулярные структуры (ЭМВС) – это внеклеточные микро- и нанообразования, окруженные мембранами, продуцируемые эукариотическими и прокариотическими клетками *in vivo* и *in vitro*, способные передавать различные низкомолекулярные соединения (белки, пептиды, кофакторы, липиды, метаболиты, ДНК, РНК, некодирующие РНК и др.), которые могут быть обнаружены в биологических жидкостях и различных тканях хозяина. ЭМВС могут участвовать в синтезе энергии, осуществлять межклеточную коммуникацию, регулировать иммунные, нейроэндокринные ответы и многие другие функции и реакции клеток, поддерживать здоровье и участвовать в патогенезе многих заболеваний.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Вклад авторов.** Концепция исследования – Шендеров Б.А., дизайн исследования – Кузнецова К.Ю., Сергиев В.П., сбор материала – Шендеров Б.А., Сергиев В.П., обработка материала – Кузнецова К.Ю., написание текста – Шендеров Б.А., Кузнецова К.Ю., редактирование – все авторы.

**Для цитирования:** Шендеров Б.А., Кузнецова К.Ю., Сергиев В.П. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и паразитарные болезни: типовые технологии изоляции и исследования. Ч. 1 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 4. С. 110–115. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-4-110-115>

Статья поступила в редакцию 22.07.2020. Принята в печать 09.11.2020.

## Ключевые слова:

внеклеточные везикулы, изоляция и функции экзосом, молекулярная структура, паразитарная патология

## Extracellular vesicles (exosomes) and parasitic infections: typical isolation and research technologies. Part 1

Shenderov B.A.<sup>1,2</sup>,  
Kuznetsova K.Yu.<sup>3</sup>,  
Sergiyev V.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> K.G. Razumovsky Moscow State University, 109004, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, 119121, Moscow, Russian Federation

Exosomal microvesicular structures (EMVS) are extracellular micro-and nano-formations surrounded by membranes produced by eukaryotic and prokaryotic cells *in vivo* and *in vitro*, capable of transmitting to other cells various low-molecular compounds (proteins and peptides, cofactors, lipids, metabolites, DNA, RNA, non-

coding RNA, and others), which can be detected in biological fluids and various host tissues. They can participate in the synthesis of energy, carry out intercellular communication, regulate immune, neuro-endocrine responses and many other functions and reactions of cells, maintain health and participate in the pathogenesis of many diseases.

**Funding.** The study was not sponsored.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflicts of interest.

**Contributions.** Research concept – Shenderov B.A.; research design – Kuznetsova K.Yu., Sergiev V.P.; collection of material – Shenderov B.A., Sergiev V.P.; processing of material – Kuznetsova K.Yu.; writing the text – Shenderov B.A., Kuznetsova K.Yu.; editing – all authors.

**For citation:** Shenderov B.A., Kuznetsova K.Yu., Sergiyev V.P. Extracellular vesicles (exosomes) and parasitic infections: typical isolation and research technologies. Part 1. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2020; 9 (4): С. 110–5. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-4-110-115> (in Russian)

**Received** 22.07.2020. **Accepted for publication** 09.11.2020.

**Keywords:**  
extracellular vesicle, exosome isolation and functions, molecular structure, parasitic pathology

Паразитарные болезни до настоящего времени остаются важнейшей мировой проблемой, угрожающей здоровью человека. Повышение осведомленности об этой патологии, поиск более эффективных способов борьбы с паразитарными болезнями остаются настоящей необходимостью. В ходе длительной коэволюции с различными видами хозяев паразиты разработали сложные стратегии коммуникации и управления физиологическим гомеостазом, позволяющим им выживать в организме хозяина. В последние годы с открытием внеклеточных везикул и установлением их несомненной роли во внутриклеточных и межклеточных взаимодействиях исследователи все более активно начинают сосредотачивать свое внимание на роли этих внеклеточных микро- и наноструктур при паразитарных болезнях [1–3].

Внутриклеточные цитоплазматические везикулы впервые были описаны бельгийским ученым Christian de Duve в 1955 г. Лизосомы распознают в цитоплазме клеток наличие или недостаток различных нутриентов и активируют сигнальный ядерно-лизосомальный путь, ответственный за ответ клеток на дефицит этих нутриентов и регуляцию энергетического метаболизма. В содержимом лизосом найдено около 60 различных растворимых гидролаз (сульфатазы, гликозидазы, фосфатазы, липазы, нуклеазы), способных гидролизовать широкий спектр биологических субстратов (гликозаминогликаны, сфинголипиды, гликоген, белки и др.) в кислой среде. Подвергая деградации различный внеклеточный или внутриклеточный материал, лизосомы участвуют в формировании метаболитов и новых биологически активных молекул и передают их собственным и другим клеткам через соответственно эндоцитоз (фагоцитоз, макропиноцитоз и др.) или путем аутофагии (self-eating).

Внутриклеточные везикулы участвуют в специфической аутофагально-лизосомальной деградации и метаболизации поступающих эндогенных соединений и компонентов, а в последующем адресно передают вновь созданные продукты исходным и реципиентным клеткам хозяина [4]. В настоящее время внутри- и внеклеточные везикулярные микро- и нанообразования в научной литературе обозначают по-разному: экзосомы, эктосомы, микровезикулы, микрочастицы, вирусомы, вирусосхожие частицы, апоптозные тельца, онкосомы и др. [5–7]. Внеклеточные везикулы,

присутствуя в большинстве жидкостей организма человека, могут осуществлять межклеточную коммуникацию, регулировать эпигенетические, иммунные, нейроэндокринные и другие процессы, включая клеточное старение, в эукариотических и прокариотических клетках [2, 4, 8].

При длительных и/или чрезмерных стрессовых ситуациях в клетках увеличивается число внеклеточных везикул, в которых начинают накапливаться дефектные или избыточные низкомолекулярные соединения, способные индуцировать развитие патологических процессов (изменение иммунологической реактивности, хроническое воспаление и др.).

В течение длительного времени научный интерес в области паразитарных болезней преимущественно был сосредоточен на обнаружении и идентификации различных секреторных сигнальных молекул, участвующих в резистентности хозяина к патогенным паразитам, возникновению и прогрессированию паразитарных заболеваний. В последнее десятилетие заметно возросло внимание исследователей и клиницистов к оценке роли внеклеточных и внутриклеточных микровезикул в этиопатогенезе паразитарных инфекций [1, 2, 9]. В данном обзоре проведен анализ опубликованных в зарубежной литературе данных о роли внеклеточных везикулярных структур в этиопатогенезе паразитарных инфекций у млекопитающих, включая человека.

### Общая характеристика, физиологические свойства и метаболические характеристики экзосом – микровезикулярных структур

Начало исследования внеклеточных микровезикул можно датировать 1946 г., когда E. Chargaff и R. West впервые описали в плазме нормальной крови небольшие по размеру частицы субклеточного прокоагулянтного фактора, образуемого тромбоцитами. Позднее он был более детально описан в 1967 г. как «пыль тромбоцитов» и как богатые липидами везикулы с диаметром 20–50 нм [10]. В последующем внеклеточные микровезикулярные структуры эндогенного происхождения были обнаружены у водорослей (1957),

животных и бактериальных клеток (1959), у высших растений (1965), грибов (1973), у паразитов (1979) и, наконец, у археев (2000). Они естественно высвобождаются из клеток и не способны к репликации [2, 3, 11–14].

В 2011 г. было создано международное общество (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV), работа которого полностью посвящена изучению биологии и прикладному использованию этих нановнеклеточных образований [14]. Термин «экзосомы» был предложен Rose Johnstone в 1987 г. [4]. В 2011 г. микровезикулярные структуры в соответствии с предложениями ISEV стали подразделять на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела. Относительно недавно появились данные о наличии определенной связи между лизосомами и экзосомами. При этом оказалось, что аутофагия, возникающая при дефиците необходимых биоактивных молекул, уменьшала высвобождение экзосом. Напротив, ингибирование аутофагии способствовало секреции экзосом. При нарушении деградации поврежденных лизосом в их содержимом происходит прогрессированная аккумуляция цитоплазматических молекул, что способствует их высвобождению в виде частично или полностью не перевариваемого материала в экзосомы [15].

Экзосомы могут быть идентифицированы в клетках практически всех тканей организма хозяина, а также во многих биологических жидкостях млекопитающих, включая человека (слюна, моча, смывы носоглотки и бронхов, амниотическая жидкость, плазма, сыворотка крови, спинномозговая жидкость, грудное молоко и т.д.) [1, 12, 14]. Биологическая важность лизосом и экзосом во многих физиологических процессах до настоящего времени полностью не установлена.

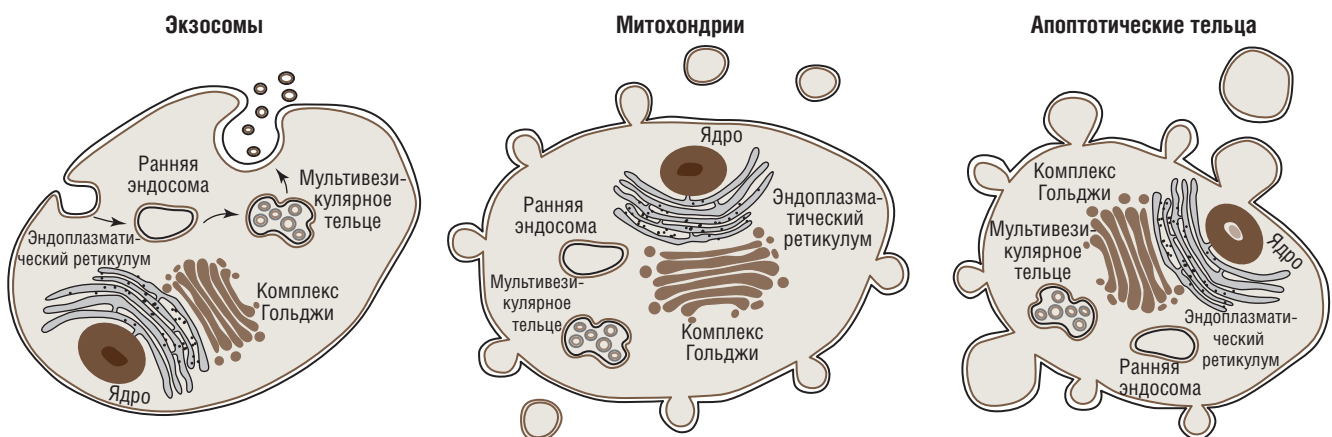
Аутофагия и секреция экзосом, несомненно, являются координированными процессами, которые совместно участвуют в гомеостазе хозяина, а возникающие в них дефекты ассоциируют со многими заболеваниями человека [4, 8, 16]. Внеклеточные везикулярные структуры в зависимости от размера, способа выделения и источника образования делят на экзосомы (30–150 нм), формирующиеся в результате высвобождения мультивезикулярных тел за счет отделения участков плазматической мембраны во внутреннюю

часть клетки; микровезикулы (100–1000 нм), образующиеся в результате выпячивания и отделения плазматической мембраны от внешней стороны клеток; и апоптотические тела (1000–5000 нм в диаметре), образующиеся при программированной гибели клеток в процессе апоптоза и их фрагментации [5, 17] (см. рисунок).

Клеточные и внеклеточные микровезикулы (лизосомы и экзосомы) различают также по составу мембранных липидов, белков и их внутреннего содержимого, участию в физиологических и патологических реакциях и функциях организма хозяина. Если в составе двуслойной липидной мембраны преимущественно присутствует лизобисфосфотидиловая кислота, эти микровезикулы относят к лизосомам, которые могут подвергаться деградации. Если в составе мембран преобладают церамиды, микровезикулы превращаются в экзосомы, способные выделяться в межклеточное пространство [7, 12, 14, 17]. Поскольку консенсуса по номенклатуре последних микровезикул не достигнуто до настоящего времени, в этом обзоре для обозначения всех видов выделяемых внеклеточных нановезикул терминологически они будут обозначаться как экзосомные микровезикулярные структуры (или просто экзосомы) (ЭМВС).

Экзосомы движутся в межклеточном пространстве или в биологических жидкостях, пока они не фиксируются к рецепторам определенных клеток. Если они не связываются, экзосомы подвергаются элиминации из организма путем деградации или за счет других механизмов очищения [18]. Фармакокинетические исследования на мышинных моделях показали, что 4–10% первоначально парентерально вводимых экзосом могут сохранять свою структуру и функции в биологических жидкостях (например, крови) в течение достаточно ограниченного времени (от 10 мин до 5,5 ч). Клетки способны захватывать экзосомы за счет рецепторно/липидного сливания с плазматическими мембранами реципиентных клеток. Захват внеклеточных микровезикул является энергозависимым процессом [15].

Состав экзосом достаточно гетерогенен и изменяется в динамике. В содержимом ЭМВС различного происхождения уже выявлено 3500–11 261 белков, 1300–2375 мРНК (около 10% мРНК родительских клеток), 120–764 микроРНК,



Основные типы внеклеточных нанообразований [5] (по Skotland T. et al., 2017)

2000 липидов, гликанов, фрагментов двухпочечных ДНК, других низкомолекулярных субстанций и образований (фрагменты митохондрий, плазмиды, прионы, вирусы и др.). Присутствие этих внеклеточных образований в биологических жидкостях организма в местах их нахождения и в реципиентных клетках, расположенных в отдалении, свидетельствует об их важности как в поддержании гомеостаза, так и при патологических процессах [3, 6, 15, 16, 18–21]. Когда содержимое внеклеточных микровезикул взаимодействует с молекулами реципиентных клеток, они участвуют в формировании других ЭМВС, которые аналогичным образом выделяются из клеток и вновь объединяются с другими клетками. Этот процесс обозначают как многократную межклеточную коммуникацию [15, 16].

*Типовые технологии изоляции и исследования экзосомных микровезикулярных структур, в том числе паразитарного происхождения.* В настоящее время разработаны многочисленные приемы изоляции, очистки и молекулярного исследования ЭМВС из различного биоматериала. С учетом задач эти методы имеют определенные особенности. На протяжении многих лет наиболее распространенными приемами выделения и анализа ЭМВС различного происхождения являются ультрацентрифугирование, оценка плотности получаемого осадка, градиентное центрифугирование, преципитация, ультрафильтрация, эксклюзивная хроматография, иммунные и другие методы [8, 10, 16, 22, 23]. Ультрацентрифугирование является наиболее эффективным приемом выделения ЭМВС из исследованного биоматериала и включает несколько этапов с использованием разных скоростей вращения ротора центрифуги. Загрязняющие ЭМВС более крупные частицы (липопротеиновые комплексы, фрагменты клеток, жгутики, белковые агрегаты и другие по составу и массе компоненты) остаются в осадке после ультрацентрифугирования. Дифференцированное ультрацентрифугирование удаляет большие фрагменты разрушенных клеток вначале при низкой скорости вращения центрифуги (ниже 20 000g); дальнейшее удаление белков ЭМВС производят путем их преципитации с использованием высоких скоростей вращения ротора (не менее 100 000g). При центрифугировании с измененным градиентом плотности в биоматериал могут добавлять раствор сахарозы или йодксанола, что способствует лучшему отделению ЭМВС от контаминирующих белков и других частиц. Фильтрация – это еще один простой метод изоляции ЭМВС из образцов биоматериала. Используя мембраны с известными размерами пор, можно отделять различные фрагменты клеток и получать очищенные внутри- и внеклеточные микро- и наночастицы.

Обычно фильтрацию комбинируют с методами центрифугирования [10, 23]. Иногда для увеличения преципитации к биоматериалу, содержащему ЭМВС, добавляют различные растворимые полимеры. Для этих целей используют коммерческие наборы (киты), антитела (или пептиды), имеющие сродство к поверхностным белкам, аптамеры, связывающиеся с нуклеиновыми кислотами, специфические наборы (киты), имеющие сродство к липидным и другим компонентам мембран. Для отделения и манипулирования с ЭМВС используются также различные приемы электрокинетиче-

ской изоляции (например, иммуноэлектрофорез), а также другие, позволяющие селективно захватывать и концентрировать ЭМВС [10, 22–24].

В последние годы используют новые стратегии изоляции и идентификации ЭМВС (создание биомолекулярных зондов, применение поверхностных плазмонов, наноматериалов, магнитные технологии и др.) [10].

Бельгийская фирма Cell Guidance Systems выпускает хроматографические колонки, позволяющие выделять высокоочищенные ЭМВС из крови за 1–2 ч. 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 [25]. Различные субтипы ЭМВС содержат низкомолекулярные субстанции, различающиеся по своему происхождению, молекулярному составу, ультраструктуре, размерам, форме и другим морфологическим, физико-химическим и функциональным характеристикам.

Современные приемы молекулярного исследования ЭМВС используют широкий спектр методов не только суммарной их характеристики, но даже на уровне отдельных экзосом [15]. Для выявления морфологических, физико-химических, биомолекулярных и функциональных свойств ЭМВС используют электронную, сканирующую электронную, трансмиссивную электронную и криомикроскопию, проточную цитометрию, вестерн-блоттинг, хроматографические, масс-спектрометрические, иммунологические и другие методы анализа [7, 26].

Дальнейший анализ ЭМВС осуществляют с использованием разнообразных приемов ОМИК-анализа, газовой и жидкостной хроматографии, различных вариантов масс-спектропии или их комплекса [15, 25, 27]. Для выявления и оценки молекулярного состава ЭМВС в биоматериале «невооруженным глазом» без их выделения и очистки начинают использовать флуоресцентный метод.

Флуоресцентные молекулы позволяют облегчить детекцию экзосомных отдельных низкомолекулярных соединений за счет антиген/антитела взаимодействия или гибридизации нуклеиновых кислот [28]. Помимо флуоресцентных молекул, используют различные липофильные красители, которые окрашивают липидные мембраны или красители, связывающиеся с РНК [10]. Эти приемы высокочувствительны и не требуют больших количеств исследуемого материала.

Нуклеиновые кислоты, присутствующие в этих экзосомах, можно определять с использованием ПЦР и технологий секвенирования. Эффективным колориметрическим приемом визуального исследования ЭМВС является добавление к биоматериалу наночастиц золота (AuNps) и аптамеров ДНК. Вносимые соединения приводят к изменению цвета агрегатов от красного до голубого [10, 28].

Наиболее распространенные приемы и методы изоляции, изучения молекулярного состава и функционирования ЭМВС применительно к различным патогенным простейшим и нематодам недавно опубликованы в нескольких обзорах [3, 9, 10, 29]. Перечень подобных быстрых и удобных в использовании новинок в области изучения паразитарных ЭМВС и входящих в них биомолекул в ближайшие годы, несомненно, увеличится [10].



## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Шендеров Борис Аркадьевич (Boris A. Shenderov)\*** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания» ФГБОУ ВО «МГУТУ им. К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)», Москва, Российская Федерация

E-mail: shenderof@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0003-3298-6508>

**Кузнецова Камалыя Юнис-кызы (Kamalya Yu. Kuznetsova)** – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории санитарной бактериологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

E-mail: kama.123@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0003-2176-7852>

**Сергиев Владимир Петрович (Vladimir P. Sergiyev)** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

E-mail: v.sergiev@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-1163-8419>

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Riaz F., Cheng G. Exosome-like vesicles of helminths: implication of pathogenesis and vaccine development. *Ann Transl Med.* 2017; 5 (7): 175. DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.0e.45>
- Wu Z., Wang L., Li J., Wang L., Wu Z., Sun X. Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. *Front Immunol.* 2019; 9: 3066. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03066>
- Khosravi M., Mirsamadi E.S., Mirjalali H., Zali M.R. Isolation and functions of extracellular vesicles derived from parasites: the promise of a new era in immunotherapy, vaccination, and diagnosis. *Int J Nanomed.* 2020; 15: 2957–2969. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S250993>
- Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75: 193–208. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
- Skotland T., Sandvig K., Llorente A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res.* 2017; 66: 30–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
- Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic.* 2018; 19 (5): 319–27. DOI: <https://doi.org/10.1111/tra.12558>
- 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: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010007>
- Malloci M., Perdomo L., Veerasamy M., Andriantsitohaina R., Sirmard G., Martinez M.C. Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2019; 30: 813–56. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7265>
- Nawaz M., Malik M.I., Hameed M., Zhou L. Research progress on the composition and function of parasite-derived exosomes. *Acta Trop.* 2019; 196: 30–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.004>
- Wang Y., Yuan W., Kimber M., Lu M., Dong L. Rapid differentiation of host and parasitic exosome vesicles using microfluidic photonic crystal biosensor. *ACS Sens.* 2018; 3 (9): 1616–21. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00360>
- Silveira J.F., Abrahamsohn P.A., Colli W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 550 (2): 222–32.
- Yanez-Mo M., Siljander P. R.-M., Andreu Z., Zavec A.B., Borrás F.E., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell. Vesicles.* 2015; 4: 27066. DOI: <https://doi.org/10.1034/2015.4.27066>
- Mekonnen G.G., Pearson M., Loukas A., Sotillo J. Extracellular vesicles from parasitic helminths and their potential utility as vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2018; 17: 197–205. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1431125>
- Woith E., Fuhrmann G., Melzig M.F. Extracellular vesicles-connecting kingdoms. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 5695. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20225695>
- Vidal M. Exosomes: revisiting their role as «garbage bags». *Traffic.* 2019; 20: 815–28. DOI: <https://doi.org/10.1111/tra.12687>
- 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): 620–32. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.39629>
- Devhare P.B., Ray R.B. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol Aspects Med.* 2018; 60: 115–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.001>
- Record M., Silvente-Poirot M., Wakelam M.J.O. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res.* 2018; 59 (8): 1316–23. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.E086173>
- Kuipers M.E., Hokke C.H., Smits H.H., Hoene E.N.M.N. Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: an overview. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2182. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02182>
- Buck A.H., Coakley G., Simbari F., McSorley H.J., Quintana J.F., Le Bihan T., et al. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun.* 2014; 5: 5488. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Atayde V.D., Lira A., Chaparro V., et al. Exploitation of the Leishmania exosomal pathway by Leishmania RNA virus 1. *Nat Microbiol.* 2019; 4 (4). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0352-y>
- 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): 3558–77. DOI: <https://doi.org/10.1039/c7lc00592j>
- Chen B.-Y., Sung C.W.-H., Chen C., Cheng C.-M., Lin D.P.-C., Huang C.-T. et al. Advances in exosomes technology. *Clin Chim Acta.* 2019; 493: 14–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.021>
- Zhu G., Chen X. Aptamer-based targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018; 134: 65–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>
- Palviainen M., Saari H., Karkkainen O., Pekkinen J., Auriola S., Yli-perttula M., et al. Metabolic signature of extracellular vesicles depends on

\* Автор для корреспонденции.

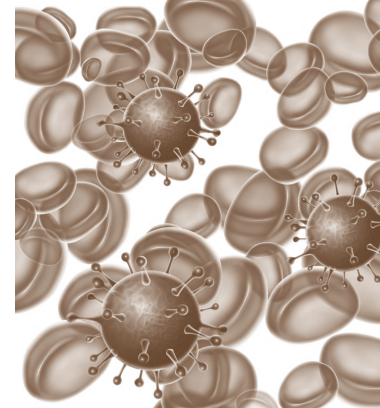
the cell culture conditions. *J Extracell Vesicles*. 2019; 8: 1596669. DOI: <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1596669>

26. Koritzinsky E.H., Street J.M., Star R.A., Yuen P.S.T. Quantification of exosomes. *J Cell Physiol*. 2017; 232 (7): 1587–90. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.25387>

27. Shenderov B.A., Sinitza A.V., Zaharchenko M.M., Lang C. *Metabiotcs. Present State, Challenges and Perspectives*. Springer Nature Switzerland AG, 2020: 123 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>

28. 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): 6641–51. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00453>

29. Pech-Canul A.C., Monteon V., Solis-Oviedo R.L. A brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res*. 2017; 2017: 3751403. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>



# Внеклеточные везикулы (экзосомы) и паразитарные болезни. Часть 2. Роль экзосомных микровезикулярных структур при паразитарных заболеваниях\*

Шендеров Б.А.<sup>1,2</sup>,  
Кузнецова К.Ю.<sup>3</sup>,  
Сергиев В.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)», 109004, г. Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, 119121, г. Москва, Российская Федерация

При взаимодействии хозяина и паразита экзосомальные внеклеточные структуры (ЭМВС) опосредуют взаимную коммуникацию, переносят факторы вирулентности и другие эффекторные и регуляторные молекулы, воздействующие на экспрессию различных генов возбудителя и хозяина. Лучшее понимание формирования и функционирования ЭМВС может индуцировать новые идеи для развития молекулярных диагностических приемов, вакцин и терапевтических методов для паразитарных и, возможно, других заболеваний.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Вклад авторов.** Концепция исследования – Шендеров Б.А.; дизайн исследования – Кузнецова К.Ю., Сергиев В.П.; сбор материала – Шендеров Б.А., Сергиев В.П.; обработка материала – Кузнецова К.Ю.; написание текста – Шендеров Б.А., Кузнецова К.Ю.; редактирование – все авторы.

**Для цитирования:** Шендеров Б.А., Кузнецова К.Ю., Сергиев В.П. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и паразитарные болезни. Часть 2. Роль экзосомных микровезикулярных структур при паразитарных заболеваниях // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2021. Т. 10, № 1. С. 66–74. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-1-66-74>

Статья поступила в редакцию 22.07.2020. Принята в печать 28.12.2020.

## Ключевые слова:

паразиты, экзосомальные внеклеточные структуры, паразитарная патология, диагностика, иммунотерапия, вакцинация

## Extracellular vesicles (exosomes) and parasitic infections. Part 2. The role of exosomal microvesicular structures in parasitic diseases

Shenderov B.A.<sup>1,2</sup>,  
Kuznetsova K.Yu.<sup>3</sup>,  
Sergiyev V.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management (the First Cossack University), 109004, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, 119121, Moscow, Russian Federation

\* Часть 1 опубликована в журнале «Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение» № 4, 2020.

When the host and parasite interact, exosomal microvesicular structures (EMVS) mediates mutual communication, transfers virulence factors and other effector molecules, and regulates the expression of various pathogen and host genes. A better understanding of the mechanisms of formation and functioning of EMVS can induce new ideas for further development of molecular diagnostic biomarkers, vaccines, and therapeutic methods for parasitic, and perhaps other disease.

**Funding.** The study was not sponsored.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Contribution.** Research concept – Shenderov B.A., research design – Kuznetsova K.Yu., Sergiev V.P.; material collection – Shenderov B.A., Sergiev V.P.; material processing – Kuznetsova K.Yu.; text writing – Shenderov B.A., Kuznetsova K.Yu.; editing – all authors.

**For citation:** Shenderov B.A., Kuznetsova K.Yu., Sergiyev V.P. Extracellular vesicles (exosomes) and parasitic infections. Part 2. The role of exosomal microvesicular structures in parasitic diseases. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2021; 10 (1): 66–74. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-1-66-74> (in Russian)

**Received** 22.07.2020. **Accepted for publication** 28.12.2020.

**Keywords:**  
parasites, exosomal  
microvesicular  
structures,  
parasitic pathology,  
diagnosis,  
immunotherapy,  
vaccination

Организм человека в течение своей жизни сталкивается более чем с 400 различными видами паразитов, при этом около 90 из них потенциально могут вызывать у него ту или иную патологию даже со смертельным исходом. Наиболее распространенными являются паразитарные заболевания, вызываемые простейшими (*phylum Apicomplexa*), проникающими через кожу, а затем в кровяное русло и в различные органы и ткани организма человека, или трематодами (*phylum Platyhelminthes*) с пищевым путем заражения. ЭМВС, обнаруживаемые у различных паразитов, их переносчиков и у млекопитающих с острой, хронической формой паразитарной патологии или бессимптомных носителей, образуются путем слияния лизосомальных и внеклеточных везикул. В патогенезе паразитарных заболеваний участвуют как паразитарные экзосомы, так и экзосомы, высвобождающиеся из клеток хозяина после инвазии паразитов [1–4]. Это предполагает, что биологические активные соединения экзосом, секретируемых паразитом, при попадании в клетки хозяина могут модулировать у него иммунные и другие реакции. При определенных условиях это может привести к развитию паразитарной болезни. В то же время хозяин способен высвобождать экзосомы, участвующие в активации его врожденного и приобретенного иммунитета, формируя противоинфекционную защиту в отношении внедрившегося паразитарного агента [2, 3, 5]. Известно более 70 видов патогенных простейших (*Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. и др.), ежегодно поражающих сотни миллионов людей. Исследования биоматериала, взятого у больных или умерших от паразитарных инфекций, показали, что в биологических жидкостях (моча или в кровь) этих людей присутствуют не только живые простейшие, но и ЭМВС, секретируемые этими патогенами или инфицированными ими клетками. Обнаруживаемые в ЭМВС антигены, токсины, генетический материал, метаболиты и другие низкомолекулярные соединения, ассоциируемые с этими простейшими, специфическим образом участвуют в патогенезе данных паразитарных инфекций и модулируют различные функции организма хозяина [2, 3, 6–10]. Многие низкомолекулярные молекулы, обнаруженные в экзосомах патогенных простейших, выступают в качестве мессенджеров паразитарной инвазии, повышая чувствительность кле-

ток и тканей будущих хозяев к внедрению этих простейших [4, 10–13]. Молекулярный состав экзосом варьирует в зависимости от типа протиста и включает много общих белковых компонентов (аннексины, белки теплового шока, молекулы адгезии, тетраспанины, галектиновые белки и т.д.), липидов (холестерин, гликофинголипиды, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и т.д.), нуклеиновых кислот (мРНК, тРНК, рРНК, фрагменты рРНК, микроРНК; одноцепочечная ДНК, ретротранспозонные РНК-транскрипты, митохондриальная ДНК и т.д.) [3, 5].

Трематодозы – гельминтозы, вызываемые паразитическими червями из класса сосальщиков, количество которых в природе достигает 6000 видов. У человека и у животных заболевания, вызываемые гельминтами, преимущественно характеризуются интоксикацией организма и различными аллергическими проявлениями; ими инфицировано более 400 млн человек, а более 10% населения земного шара находится в группе риска. При трематодозах известны 2 типа экзосомных микровезикулярных структур: ЭМВС, продуцируемые внеклеточными паразитами, и ЭМВС, образуемые клетками хозяина, инфицированными этими патогенами. Оба эти варианта выступают в качестве сигнальных молекул в межклеточной коммуникации паразитов и организма хозяина и участвуют в патогенезе заболевания и защите от него [1]. Гельминты и секретируемые ими ЭМВС используют разнообразные стратегии для манипулирования позвоночными хозяевами, однако данные о содержании в ЭМВС специфических белков, липидов, микроРНК и других биоактивных молекул ограничены [1, 3, 5, 14–16].

*Экзосомные микровезикулярные структуры плазмодий.* Малярия – распространенная антропонозная паразитарная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. Клинические признаки малярии включают периодическую лихорадку, рвоту, усталость и головную боль. Возбудитель малярии человека относится к отряду *Haemosporidia*, роду *Plasmodium*. Известны 4 вида: *Plasmodium vivax* и *P. ovale* – возбудители трехдневной малярии, *P. falciparum* – возбудитель тропической малярии и *P. malariae* – возбудитель четырехдневной малярии. Присутствие экзосомных микровезикул в периферической крови больных, страдающих



малярией, вызванной *P.falciparum* или *P.vivax*, было впервые описано еще в 2011 г. В протеоме ЭМВС этих простейших присутствовали такие антигены, как поверхностные белки, лактатдегидрогеназа, эндолаза, альдолаза, цистеин протеазы и др. Некоторые из них были вовлечены в развитие системного воспаления у больных малярией [6, 10, 17].

Исследования на модели малярии у крыс показали, что внеклеточные везикулы, выделенные из ретикулоцитов, содержали белковые антигены и специфические липиды, которые не только подавляли протективный иммунный ответ, но и были ответственны за смерть животных [17, 18]. На той же модели малярии было установлено, что дефекты функционирования гена *ABCA1* в хромосоме животных резко уменьшали секрецию экзосом, ассоциированных с *P. falciparum*, что защищало экспериментальных мышей от фенотипических проявлений церебральной малярии. Экзосомы, секретиромые штаммом *P. falciparum* и другими плазмодиями, способствовали развитию малярийной инфекции, поддерживали высокий уровень паразитемии и выживание паразитов в организме животного, индуцировали ретикулоцитоз, повышали тяжесть течения малярии, подавляли иммунный ответ в отношении возбудителя. ЭМВС вирулентного штамма плазмодия передавали генетический материал в клетки животных, участвовали в презентации паразитарных белковых антигенов, а экзосомные микроРНК ингибировали экспрессию генов в эндотелиальных клетках [5]. У людей, инфицированных *P. falciparum*, гаплотипы промотора гена *ABCA1* также влияли на тяжесть течения и частоту осложнений при малярии. Изучение уровня экзосом, образуемых тромбоцитами, позволило предположить, что количественное содержание ЭМВС в крови больных малярией и высокая температура тела могут играть важную роль в развитии воспалительных проявлений, индуцированных *P. vivax* [5, 6, 18].

*Экзосомные микровезикулярные структуры лейшманий.* Лейшманиозы – группа трансмиссивных протозойных болезней, вызываемых древнейшими эукариотическими протистами лейшманиями (*Leishmania donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. major*, *L. braziliensis* и др.), со сложным жизненным циклом, происходящим либо в песчаной мухе, либо в макрофагах хозяина млекопитающих. Выделяют клинические формы лейшманиозов: кожный, слизисто-кожный и висцеральный лейшманиоз [19]. Присутствие экзосом у больных с лейшманиозом впервые было показано в 2010 г. [20]. Авторы установили, что разнообразные белковые компоненты ЭМВС ответственны за вирулентные свойства этих патогенных простейших, участвуют в межклеточной передаче информации от паразитов в клетки иммунной системы больных.

Экзосомная металлопротеаза GP63 лейшманий активно участвует в модуляции иммунного ответа макрофагов, регулируя синтез белковых тирозинфосфатаз и транскрипционных факторов. По способности модулировать иммунный ответ белковые компоненты экзосом, ассоциированных с культурами различных видов лейшманий, были схожи с экзосомами млекопитающих. Они ингибировали иммунные реакции макрофагов, моноцитов, дендритных клеток моноцитарного происхождения и стимулировали образование

интерлейкинов (IL) -8, -10 и окиси азота (NO), ингибируя интерферон  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), цитокины. Экзосомы лейшманий потенциально могли поддерживать или подавлять выживаемость этих паразитов, активировать и модулировать работу генов в различных клетках иммунной системы, что приводило к снижению продукции некоторых воспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  и IL-12p70 [10, 20]. Провоспалительный эффект экзосом, секретиромых патогенными простейшими (например, *L. major*), мог проявляться также в виде привлечения в очаг воспаления нейтрофилов и эозинофилов [8].

Помимо белков, ЭМВС, секретиромые *L. braziliensis* и *L. donovani*, могут содержать генетический материал, ДНК, РНК, митохондрии и вирусы. Однако функции некодирующих РНК (включая rRNA, tRNA и др.) в экзосомах лейшманий остаются неясными [3, 5]. Биохимический и электронно-микроскопический анализ экзосом, полученных из клеток, инфицированных лейшманиями, несущими РНК-вирус 1 (LRV1), показал, что эти вирусные частицы в составе ЭМВС могли переноситься в другие клетки паразитов, что повышало их инфекционность в организме хозяина. У мышей, коинфицированных паразитами и содержащими LRV1 экзосомы, клинически заболевание имело более тяжелое течение [19].

*Экзосомные микровезикулярные структуры трипаносом.* Трипаносомоз – это зооантропонозная протозойная болезнь, возбудитель – 2 вида патогенных простейших из рода *Trypanosoma* (*Trypanosoma brucei* и *T. cruzi*): первый вызывает африканский трипаносомоз, или сонную болезнь, а второй – американский трипаносомоз (болезнь Шагаса). Трипаносомы проходят сложный цикл развития со сменой хозяев, в процессе которого они находятся в морфологически различных формах. Инвазионной стадией *T. cruzi* для переносчика, как и для позвоночного животного и человека, являются трипомастиготы. Люди заражаются *T. cruzi* преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, который осуществляется контаминационным путем – при расчесывании укусов триатомовых клопов и втирании их испражнений в поврежденные кожные покровы. Возможно заражение возбудителем трансплацентарно и через амниотическую жидкость (врожденный трипаносомоз), при грудном вскармливании, гемотрансфузиях, трансплантации органов, а также пищевым путем при употреблении жидкостей и пищевых продуктов, контаминированных этим паразитом.

Трипаносомы секретиромут различные типы внеклеточных везикул, проникновение которых в клетки организма человека модулирует иммунный ответ хозяина, а с другой стороны, способствует выживанию инфицированных паразитов. Внутри клеток различных тканей трипомастиготы проникают в кислые клеточные фаголизосомы, где они в течение 2–4 ч дифференцируются в репликативную форму (амастиготу). В патогенезе этого заболевания участвует большое количество различных молекул и частиц, в том числе и внеклеточные везикулы.

Наличие ЭМВС у эпимастиготных форм *T. cruzi* впервые было описано в 1979 г. [3]. Проведенные *in vitro* исследования превращения трипомастигот в амастиготы в фаголизосомах при pH 7,4 и 5 и их экзопротеомов позволило идентифи-

цировать соответственно 271 и 483 различных белков, 180 из них были одинаковы по своим химическим характеристикам. У людей с болезнью Шагаса проведенный анализ протеомов внутри- и внеклеточных везикул амастигот показало присутствие повышенного количества муцинов и поверхностных муцино связанных белков со схожими иммуномодулирующими функциями [3, 13, 21, 22].

ЭМВС, образуемые *T. cruzi*, содержали транс-сиалидазы, цинкозависимые металлопротеазы (GP63) и амастин (транс-мембранный гликопротеин), играющие решающую роль в адгезии, пролиферации, дифференцировке и выживании внутриклеточных форм *T. cruzi*. Крузипаины (папаиноподобные цистеиновые протеазы) экзосом необходимы для выживания паразита, они генерируют сильный иммунный ответ у инфицированных людей. ЭМВС амастигот *T. cruzi* содержат белки, РНК и микроРНК, участвующие во взаимодействии хозяина и паразита, в их сигнальном и транспортном взаимодействии, в слиянии их мембран, окислительно-восстановительных и других процессах. Поверхностные мембранные белки имеют решающее значение для адаптации, дифференцировки и выживания паразита в течение его жизненного цикла [3, 22]. Благодаря указанным низкомолекулярным молекулам в ЭМВС, осуществляется инвазия паразитов и реализуется патогенез нарушений в клетках хозяина (например, их внедрение в клетки сердечной мышцы, подавление врожденного иммунитета и комплемент-опосредованного лизиса). Высвобождаемое из ЭМВС большинство секретиремых белков регулирует подвижность патогенных трипаносом, задерживает их продвижение в уже поврежденные клетки и повышает их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды. Эти белки регулируют активность snoRNA и mRNA в клетках хозяина, а также участвуют в контроле жизнеспособности этих простейших и превращении их в различные морфологические формы [8].

У человека с болезнью Шагаса ЭМВС вовлечены в усиление паразитизма и воспаления сердечной мышцы [13, 21, 23]. ЭМВС, секретиремые *T. cruzi*, индуцировали различные эпигенетические изменения в геноме, метаболоме и фенотипе человека, чувствительного к протозойной инфекции. В ЭМВС, ассоциируемых с этими паразитами, присутствуют иммуносупрессивные белки (фосфолипид мутаза, эндолаза, пируваткиназа и др.), активно участвующие в продукции провоспалительных (IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ ) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов [10]. В результате патогенного действия трипаносом и продуктов их распада, специфической сенсбилизации и аутоаллергии возникают различные воспалительные, инфильтративные и дегенеративные изменения в тканях внутренних органов, центральной и периферической нервной системы [6, 8].

Экзосомы *T. cruzi*, принимающие участие в трансформации различных морфологических форм этих простейших, повышали восприимчивость клеток хозяина к ним за счет индуцирования изменений в экспрессии некоторых генов клеток макроорганизма. Присутствующие в ЭМВС *T. cruzi* микроРНК участвуют в межклеточной коммуникации патогена и хозяина, изменяют экспрессию генов в иммунных клетках, в том числе за счет стимуляции мРНК, ассоциированных с провоспалительными генами *il-6* и *cxcl2* [5, 8, 23].

При инкубации *in vitro* клеточных линий Vero и HL-1 с экзосомами, секретиремых штаммом *T. cruzi Pan4*, наблюдали изменения клеточной проницаемости и увеличение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>; это приводило к остановке клеточного цикла синтеза ДНК, необходимого для завершения митоза. Имеются предположения, что проникновение ЭМВС *T. cruzi* в клетки хозяина увеличивает количество клеток, подвергающихся инфицированию трипаносомами, и является причиной характерных клинических проявлений болезни Шагаса. Согласно последним данным научных публикаций, выявление в биологических жидкостях ЭМВС, секретиремых трипаносомами, позволяет оценить тяжесть шагазной кардиомиопатии, эффективность вакцин и лекарственных средств, используемых при этой паразитарной патологии, и даже предотвращать риск ее возникновения [22, 23].

*Экзосомные микровезикулярные структуры трихомонад.* Трихомонады – это анаэробные жгутиковые простейшие из класса семейства *Trichomonadidae*. В организме человека паразитируют 3 вида этих протист: *Trichomonas vaginalis* (вагинальная трихомонада), *T. tenax* (ротовая трихомонада) и *T. hominis* (кишечная трихомонада). Цикл развития этих паразитов включает жгутиковую, амёбовидную и цистоподобную стадии.

Трихомониаз – это антропонозная протозойная болезнь, вызываемая *T. vaginalis* и характеризующаяся поражением мочеполовой системы. Протеомный анализ ЭМВС, продуцируемых *T. vaginalis*, показал, что в их составе присутствуют многие белки (тетраспанины, сигнальные белки, метаболические ферменты, поверхностные белки, протеазы и др.), схожие по химическому составу и структуре с протеинами биоматериала, взятого у больного человека или модельных животных [3]. Экзосомные белки, высвобождаемые высокоадгезивными штаммами *T. vaginalis*, способствуют прилипанию патогенных простейших к эпителиальным клеткам. Помимо активации адгезии, они регулируют межклеточные взаимоотношения трихомонад, а также взаимодействие клеток хозяина и паразита, различным образом модулируют иммунный ответ [10, 12, 17]. Регуляторные молекулы, присутствующие в ЭМВС, вмешиваются в воспалительные процессы в организме хозяина, что проявляется снижением секреции IL-8, ключевого цитокина для привлечения нейтрофилов и в усилении продукции IL-10, ингибировании экспрессии генов, ответственных за синтез цитокинов IL-6, -13 и -17. Экзосомы, секретиремые клетками патогенных штаммов *T. vaginalis*, участвуют также в подавлении продукции эпителиальными клетками шейки матки цитокина IL-8 и замедляют миграцию нейтрофилов в очаг инфекции [5, 17, 24].

*Экзосомные микровезикулярные структуры токсоплазм.* Токсоплазмоз – болезнь животных и людей, вызываемая простейшими *Toxoplasma gondii* и характеризующаяся поражением нервной и лимфатической систем, глаз, скелетных мышц и миокарда. Большинство пациентов не имеют клинических симптомов, в то время как у людей с ослабленной иммунной системой могут развиваться тяжелые симптомы. Впервые экзосомы токсоплазм и исследование их протеома было выполнено в 2017 г. [25]. В последующих исследованиях было установлено, что ЭМВС, образуемые *T. gondii*, имеют средний размер 50 нм и содержат не-

сколько различных белков (например, HSP70, CD63 и P30) [3, 5, 26]. HSP70 и CD63 ранее были уже описаны как белковые маркеры многих паразитарных экзосом; поверхностный белок P30 был специфичен и обнаруживался только в ЭМВС *T. gondii* [5]. Эти белки и микроРНК, связанные с ЭМВС, у макрофагов повышают продукцию цитокинов IFN $\gamma$ , IL-12 и TNF- $\alpha$ . ЭМВС, участвующие в двустороннем межклеточном взаимодействии клеток простейших и хозяина, усиливают гуморальный и клеточный иммунный ответы, направленные на усиление защиты хозяина в отношении инфекции *T. gondii* [5, 26]. Экзосомы токсоплазм повышают пролиферацию спленоцитов, что стимулирует усиление уровня производимых ими Th1-цитокинов (IL-2 и IFN $\gamma$ ), подавляет экспрессию генов, ответственных за синтез Th2-цитокинов (IL-5 и IL-10) и усиливает продукцию сывороточных и IgA-антител в кишечнике. Активация макрофагов повышает образование IFN $\gamma$ , IL-12 и TNF- $\alpha$  и стимулирует гуморальные и клеточные специфические и неспецифические иммунные реакции. Анализ ЭМВС, секретированных клетками, инфицированными патогенными паразитами, выявил в них 11 микроРНК, некоторые из них, вероятно, могут регулировать экспрессию генов иммунных и других клеток-хозяев [3, 5].

*Экзосомные микровезикулярные структуры шистосом.* Шистосомоз – заболевание, вызываемое трематодами из рода *Schistosoma*, ежегодно поражающее более 200 млн человек в 74 странах мира [27]. В зависимости от вида паразит поражает желудочно-кишечный тракт (*S. mansoni* и *S. japonicum*) или мочеполовую систему (*S. haematobium*). Существование экзосомных микровезикулярных структур у гельминтов впервые было обнаружено у *S. mansoni* [6, 27, 28]. Геномный и протеомный анализы ЭМВС шистосом и людей, потребляющих пищу, зараженную этими паразитами, позволили идентифицировать в экзосомах паразитов, клетках печени, других органах и тканях, а также в биологических жидкостях больных до 50–80 ключевых белковых антигенов, присущих этим гельминтам. ЭМВС, секретруемые *S. mansoni*, содержат белки, микроРНК и другие биологически активные молекулы, которые могут быть транспортированы в клетки-хозяина при развитии шистосомной инфекции. Многие белки, обнаруженные в ЭМВС *S. mansoni*, связаны с процессами гликолиза, агрегацией и активацией тромбоцитов; другие (металлопротеазы, цистеиновые и сериновые протеазы, тетраспанины, катепсины, 14-3-3-белки, циклофилины, карбоксилазы) участвуют в инвазии, миграции, усвоении питательных веществ, иммуномодуляции и контроле гомеостаза [3, 16, 28]. Многие из перечисленных белков в растворенном состоянии или в виде нерастворимых ЭМВС участвуют в развитии токсических реакций в организме инфицированных людей и животных или негативно модулируют их иммунный статус [3, 14, 29].

ЭМВС, продуцируемые паразитом *S. japonicum*, участвуют в двустороннем межклеточном взаимодействии паразита и клеток хозяина, активируют его иммунный ответ, уменьшают продукцию провоспалительных и стимулируют продукцию противовоспалительных цитокинов, обеспечивают транспорт miRNA к клеткам млекопитающих, участвующим

во взаимодействии паразит–хозяин, ослабляют тяжесть и подавляют прогрессирование клинических проявлений воспалительных процессов в кишечнике.

Установлено, что интраперитонеальная инъекция экзосом, секретруемых дендритными клетками, ассоциированными с шистосомами, уменьшала тяжесть и подавляла прогрессирование воспалительных процессов в кишечнике мышей с экспериментальным колитом. Оценка иммунного статуса этих животных выявила снижение у них провоспалительных цитокинов (IL-17, IFN $\gamma$ , IL-22, IL-12 и TNF- $\alpha$ ) и количественный рост противовоспалительного цитокина TGF- $\beta$  в зависимости от видо- и штаммовой принадлежности паразита [27]. Основываясь на этих данных, рекомендовано ЭМВС, секретруемые шистосомами, использовать в качестве потенциальных иммуносупрессивных средств при различных воспалительных заболеваниях человека [30]. Результаты протеомного и микроРНК-анализов ЭМВС, образуемых шистосомулами и взрослыми червями, позволяют использовать их в качестве специфических маркеров при диагностике различных стадий жизни этих простейших и в оценке динамики протекания паразитозов, вызванных ими [27, 29].

Некоторые специфические экзосомные белки шистосом предлагают рассматривать в качестве потенциальных кандидатов при конструировании вакцин для стимуляции иммунитета у населения, проживающего в регионах с повышенным риском трематодозов [6, 14, 28–30].

*Экзосомные микровезикулярные структуры печеночной двуустки.* Фасциолезы – зоонозные биогельминтозы из группы трематодозов с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя. Фасциолез, вызываемый *Fasciola hepatica*, поражает жвачных животных (овцы и крупный рогатый скот), а иногда и людей, у которых паразит развивается в печени и в желчных путях. ЭМВС, образуемые *F. hepatica*, участвуют в двусторонней межклеточной коммуникации; их содержимое транспортируется в клетки кишечного тракта [5]. В составе ЭМВС этого гельминта выявлены разнообразные цитоскелетные белки (актин, тубулин, миозин, парамиозин, тропомиозин), гликолитические ферменты (енолаза, альдолаза, GAPDH, PEPCK), кальций-связывающие протеины (кальмодулин, кальпонин), гистоны, факторы удлинения, метаболические ферменты, иммуноглобулины, пероксиредоксины, антистрессовый белок HSPs, CD19-белок и микроРНК с потенциальной иммунорегуляторной активностью [3, 31]. Компоненты ЭМВС при попадании в клетки данного паразита регулируют у них адаптацию к факторам среды, повышают выживаемость этих трематод в организме млекопитающих и вызывают у них выраженную иммуносупрессию [32].

*Экзосомные микровезикулярные структуры эхинококков.* Кистозный эхинококкоз (КЭ) – зоонозный природно-антропоургический биогельминтоз из группы цестодозов, вызываемый эхинококками из рода *Echinococcus* (*E. multilocularis* и *E. granulosus*). Инфицирование человека происходит при реализации фекально-орального механизма передачи возбудителя и поступлением личинок паразита преимущественно с пищей. Личинки эхинококка проникают через стенки кишечника в сосудистое русло и в конечном счете в основном в печень и легкие. Люди заражаются не только



через пищу, контаминированную яйцами *E. granulosus*, но и при попадании яиц возбудителя с загрязненными руками в рот. Во время инфекции эхинококк способен уклоняться от реакций иммунной системы и успешно пребывает в организме человека [33]. Человек и *E. granulosus* оба могут высвобождать экзосомы, несущие разнообразные биомолекулы, которые облегчают межклеточную коммуникацию и бывают обнаружены в сыворотке больных, страдающих КЭ.

Протеомный анализ содержимого ЭМВС выявил 49 белков, в том числе 45 белков человека (карбоангидраза, основной белок тромбоцитов, тубулин, каталаза, богатый гистидином гликопротеин, глутатионпероксидаза, фруктозе-бисфосфатальдолаза, пероксиредоксин,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемоглобины, пируваткиназа, сывороточный альбумин, триозофосфатизомераза и др.) и 4 белка паразитарного происхождения (антиген-5, белок, ответственный за транспорт специфического липида,  $\alpha$ -маннозидаза, малат-дегидрогеназа). Большинство белков человеческого происхождения, присутствующих в ЭМВС больных КЭ, связаны со структурой цитоскелета; некоторые из них обладали антимикробной активностью. Их образование индуцируется в клетках хозяина под воздействием сигналов со стороны паразитов.

Специфические паразитарные белки, присутствующие в ЭМВС, участвуют в таких процессах, как агрегация тромбоцитов, регулируемый экзоцитоз и др., что подтверждает их важную роль в патогенезе КЭ и в двусторонней коммуникации между *E. granulosus* и клетками хозяина. Многие белки, обнаруженные в ЭМВС, обладают различными патогенными свойствами (включая высокоиммуногенные и толерогенные антигены и пептидазы), подавляют синтез оксида азота клетками хозяина и связаны с выживаемостью кисты в организме. Сывороточные экзосомы больных с КЭ экспрессировали в клетках хозяина те гены, которые были связаны с его реакцией на паразитарную инфекцию (включая подвижность, пролиферацию, выживание клеток, активацию тромбоцитов, трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, подавление воспаления) [3, 33–35]. ЭМВС обоих видов *Echinococcus* spp. оказывали модулирующее влияние на активность макрофагов, участвовали в межклеточной коммуникации клеток этого паразита и его взаимодействие с клетками иммунной системы хозяина [36, 37]. В содержимом ЭМВС обнаружена *miR-71*, регулирующая экспрессию различных генов макрофагов [5]. Имеющиеся в ЭМВС поверхностные тетраспаны и микроРНК, участвующие в поддержании инвазии и сохранении паразитов в организме хозяина, в настоящее время предлагают рассматривать как потенциальную мишень при конструировании вакцины для лечения и иммунизации населения в регионах с повышенной опасностью КЭ [3, 33, 35, 38].

*Использование паразитарных экзосомных микровезикулярных структур как источник биоинформативных метаболитов и транспортное средство специфических эффекторов и/или ингибиторов в медицинских технологиях диагностики, профилактики и лечения.* До настоящего времени диагностика паразитарных инфекций преимущественно использует микроскопию препаратов биоматериала. Молекулярных приемов и инструментов специфической диагностики протозойных заболеваний в России не суще-

ствует. Это связано с разнообразием патогенных паразитов и с высоким уровнем сложности их обнаружения. Полный паразитарный анализ доступен лишь в нескольких учреждениях и требует существенных финансовых затрат и высокой квалификации специалистов. Ограниченные исследования ЭМВС паразитарного генеза показали, что в их составе присутствует множество низкомолекулярных соединений, обладающих негативными или позитивными эффектами на организм человека. Экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о том, что паразитарные ЭМВС могут играть центральную роль в поддержании гомеостаза человека, его эпигенетических, иммунных и других функций и биохимических реакций. Оказалось, в частности, что патогенные простейшие и нематоды, продуцируя разнообразные ЭМВС с множеством специфических белков, липидов, микроРНК и других низкомолекулярных соединений, способны существенно модулировать врожденные и приобретенные иммунные реакции в отношении этих паразитов [2, 39]. Наличие специфических рецепторов позволяет ЭМВС избирательно осуществлять межклеточные информационные взаимодействия клеток паразита с клетками-мишенями организма хозяина.

В неблагоприятных условиях организмы животных и человека не могут успешно противостоять воздействию вирулентных факторов патогенных простейших и гельминтов, что приводит к паразитарному заболеванию и даже к смерти больного. При определенных условиях у здоровых людей или у больных в процессе восстановления организм синтезирует необходимые количества ЭМВС, компоненты которых позитивно участвуют во внеклеточных взаимодействиях паразита и организма хозяина, благоприятных для здоровья хозяина и подавляющих рост или элиминирующих патогенные паразитарные агенты. Меняя позитивно поверхностные рецепторы и модифицируя состав ЭМВС, можно конструировать и персонифицированно доставлять соответствующие специфические низкомолекулярные нутриенты, лекарственные препараты, другие эффекторы и ингибиторы в клетки-мишени или в секреторную систему организма хозяина для профилактики и лечения конкретных паразитарных инфекций [40, 41].

Специфические низкомолекулярные соединения на мембранах и внутри полости паразитарных ЭМВС рассматриваются как чувствительные молекулярные биомаркеры при диагностике инфекций, вызванных патогенными простейшими и гельминтами [2, 11, 28, 42–45]. Экзосомные белки и микроРНК начинают использовать в качестве супрессивных средств при иммунотерапии таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит, сахарный диабет 1-го типа, астма, аллергия [3, 46–48], а также хронических воспалительных патологий кишечника [49, 50].

Специфические белки и микроРНК паразитарных ЭМВС находят применение и при изготовлении новых вакцинных препаратов [2, 26, 39]. К настоящему времени известно несколько приемов введения в экзосомы различных биологически активных соединений (электропорация, пассивная диффузия, трансфекция) [7, 51]. Исследования линейных мышей, которым вводили внутривенно и интраперитонеально на протяжении 3 нед 10 доз (8,5 мкг белка



на дозу) модифицированных ЭМВС с повышенными количествами *miRNA-199a-3p* и определенных белков, не выявили у модельных животных никаких существенных признаков токсичности, иммуногенности и метаболических нарушений. В крови не менялись уровень цитокинов и количество эритроцитов; гистопатологические изменения тканей/органов (вилочковая железа, сердце, легкие, печень, почки, селезенка, мозговая ткань, мочевого пузыря и др.) также отсутствовали. На основе этих данных был сделан вывод: ЭМВС можно безопасно использовать в качестве носителя лекарственных соединений при терапии различных заболеваний [41]. Эффективность терапии паразитарных и других заболеваний с включением в нее ЭМВС зависит не только от происхождения и сроков хранения, но и от способов их введения в организм (инъекции, оральное или интраназальное применение), а также от множества других факторов и условий. Медицинское использование экзосом находится еще только на первых этапах своего развития [2, 35, 38, 52].

## Заключение

Паразитарные болезни являются одной из важнейших причин экономических и людских потерь в мире. Более 1 млрд человек во всем мире страдают от этих заболеваний [2]. Открытие ЭМВС произошло еще в начале 1980-х гг. Все эукариотические и прокариотические клетки могут выделять ЭМВС; они обнаруживаются практически во всех жидкостях организма, естественно высвобождаются и не способны к репликации.

В составе ЭМВС может присутствовать множество разнообразных низкомолекулярных биологически активных соединений, участвующих в межклеточной коммуникации, регуляции эпигенетических, метаболических, иммунных, нейроэндокринных и других процессов как у здоровых, так

и у больных людей. Это свидетельствует о том, что в природе ЭМВС имеют несомненное эволюционное и биологическое значение [5, 52–55].

В 2013 г. 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». Исследования ЭМВС, образуемых различными мультисубъединичными гельминтами и простейшими, ведутся лишь на протяжении последних нескольких лет. Их роль в патогенезе паразитарных инфекций и других состояний человека пока находится лишь на первых этапах экспериментального и клинического изучения. ЭМВС обладают рядом преимуществ при использовании в качестве диагностических маркеров из-за наличия в них большого количества специфических биомолекул и достаточно длительной сохранности последних в различных условиях [28]. ЭМВС, высвобождаемые как паразитами, так и клетками хозяина, способны существенно модифицировать врожденный, приобретенный, гуморальный и клеточный иммунитет. В медицине ЭМВС могут найти практическое применение в качестве иммуносупрессивных препаратов для снижения тяжести и прогрессирования паразитарных, аутоиммунных, воспалительных и раковых заболеваний [2, 5, 6, 8, 10, 30, 42, 56]. Низкомолекулярные соединения, связанные с ЭМВС, могут стать основой для изготовления паразитарных вакцин и выступать в качестве новых биомаркеров при диагностике различных паразитарных инфекций и нового транспортного средства для иммунных, лекарственных и других медицинских препаратов [2, 14–16, 23].

Лучшее понимание основ и механизмов возникновения и функционирования внутри- и внеклеточных микровезикулярных структур у эукариотических паразитов и млекопитающих, включая человека, позволит лучше представить, как эти молекулярные субклеточные образования могут быть использованы в практической медицине.

---

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Шендеров Борис Аркадьевич (Boris A. Shenderov)** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Конструирование и внедрение продуктов и рационов персонализированного питания» ФГБОУ ВО «МГУТУ им. К.Г. Разумовского (ПКУ)», Москва, Российская Федерация

E-mail: shenderof@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0003-3298-6508>

**Кузнецова Камаля Юнис-кызы (Kamalya Yu. Kuznetsova)\*** – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории санитарной бактериологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

E-mail: kama.123@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0003-2176-7852>

**Сергиев Владимир Петрович (Vladimir P. Sergiyev)** – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

E-mail: v.sergiev@yandex.ru

<http://orcid.org/0000-0002-1163-8419>

---

\* Автор для корреспонденции.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Riaz F., Cheng G. Exosome-like vesicles of helminths: implication of pathogenesis and vaccine development. *Ann Trans Med.* 2017; 5 (7): 175. DOI: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.0e.45>
2. Khosravi M., Mirsamadi E.S., Mirjalali H., Zali M.R. Isolation and functions of extracellular vesicles derived from parasites: the promise of a new era in immunotherapy, vaccination, and diagnosis. *Int J Nanomed.* 2020; 15: 2957–69. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S250993>
3. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75: 193–208. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>
4. Silveira J.F., Abrahamsohn P.A., Colli W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1979; 550 (2): 222–32.
5. Wu Z., Wang L., Li J., Wang L., Wu Z., Sun X. Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. *Front Immunol.* 2019; 9: 3066. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03066>
6. Skotland T., Sandvig K., Llorente A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res.* 2017; 66: 30–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
7. 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: <https://doi.org/10.3390/bioengineering6010007>
8. Mallocci M., Perdomo L., Veerasamy M., Andriantsitohaina R., Sismard G., Martinez M.C. Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2019; 30: 813–56. DOI: <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7265>
9. Nawaz M., Malik M.I., Hameed M., Zhou L. Research progress on the composition and function of parasite-derived exosomes. *Acta Trop.* 2019; 196: 30–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.004>
10. Yanez-Mo M., Siljander P.R.-M., Andreu Z., Zavec A.B., Borrás F.E., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4: 27066. DOI: <https://doi.org/10.103402/jev.v4.27066>
11. Mekonnen G.G., Pearson M., Loukas A., Sotillo J. Extracellular vesicles from parasitic helminths and their potential utility as vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2018; 17: 197–205. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1431125>
12. Vidal M. Exosomes: revisiting their role as «garbage bags». *Traffic.* 2019; 20: 815–28. DOI: <https://doi.org/10.1111/tra.12687>
13. Woith E., Fuhrmann G., Melzig M.F. Extracellular vesicles – connecting kingdoms. *Int J Mol Sci.* 2019; 2019: 205695. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20225695>
14. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic.* 2018; 19 (5): 319–27. DOI: <https://doi.org/10.1111/tra.12558>
15. 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): 620–32. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.39629>
16. Devhare P.B., Ray R.B. Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol Aspects Med.* 2018; 60: 115–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.001>
17. Record M., Silvente-Poirot M., Wakelam M.J.O. Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *J Lipid Res.* 2018; 2018: 5913161323. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.E086173>
18. Kuipers M.E., Hokke C.H., Smits H.H., Hoene E.N.M.N. Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: an overview. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2182. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02182>
19. Wang Y., Yuan W., Kimber M., Lu M., Dong L. Rapid differentiation of host and parasitic exosome vesicles using microfluidic photonic crystal biosensor. *ACS Sens.* 2018; 3 (9): 1616–21. DOI: <https://doi.org/10.1021/acssens.8b00360>
20. Buck A.H., Coakley G., Simbari F., McSorley H.J., Quintana J.F., Le Bihan T., et al. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun.* 2014; 5: 5488. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
21. Atayde V.D., Lira A., Chaparro V., et al. Exploitation of the Leishmania exosomal pathway by Leishmania RNA virus 1. *Nat Microbiol.* 2019; 4 (4). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0352-y>
22. Zhang W., Jiang X., Bao J., Wang Y., Liu H., Tang L. Exosomes in pathogen infections: a bridge to deliver molecules and link functions. *Front Immunol.* 2018; 9: 90. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00090>
23. Montaner S., Galiano A., Trelis M., Martin-Jaular L., Del Portillo H.A., Bernal D., et al. The role of extracellular vesicles in modulating the host immune response during parasitic infections. *Front Immunol.* 2014; 5: 433. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00433>
24. Bayer-Santos E., Aguilar-Bonavides C., Rodrigues S.P., Cordero E.M., Marques A.F., Varela-Ramirez A., et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *J Proteome Res.* 2013; 12 (2): 883–97. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr300947g>
25. Twu O., de Miguel N., Lustig G., Stevens G.C., Vashisht A.A., Wohlschlegel J.A., et al. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (7): e1003482. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003482>
26. Mandacaru S.C., Queiroz R.M.L., Alborghetti M.R., de Oliveira L.S., de Lima C.M.R., Bastos I.M.D., et al. Exoproteome profiling of *Trypanosoma cruzi* during amastigogenesis early stages. *PLoS One.* 2019; 14 (11): e0225386. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225386>
27. Gazzinelli-Guimaraes P.H., Nutman T.B. Helminth parasites and immune regulation. *F1000 Research.* 2018; 7: 1685. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15596.1>
28. Marti M., Johnson P.J. Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 32: 66–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.008>
29. Chow F.W.-N., Kotsovoulos G., Ovando-Vazquez C., Neophytou K., Bermudez-Barrientos J.R., et al. Secretion of an Argonaute protein by a parasitic nematode and the evolution of its siRNA guides. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (7). DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz142>
30. Campos F.M., Franklin B.S., Teixeira-Carvalho A., Filho A.L., de Paula S.C., Fontes C.J., et al. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. *Malaria J.* 2010; 9: 327. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-327>
31. Silverman J.M., Clos J., Horakova E., Wang A.Y., Wiesgigl M., Kelly I., et al. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2010; 185 (9): 5011–22. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000541>
32. Buschiazzo A., Muia R., Larriex N., Pitcovsky T., Mucci J., Campetella O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog.* 2012; 8: e1002474. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002474>
33. Pech-Canul A.C., Monteon V., Solis-Oviedo R.L. A brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res.* 2017; 2017: 3751403. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>
34. Moreira L., Serrano F., Osuna A. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13 (2): e0007163. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>
35. Olmos-Ortiz L.M., Barajas-Mendiola M.A., Barrios-Rodiles M., Castellano L.E., Arias-Negrete S., Cuellar-Mata P., et al. *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite infected mice. *Parasite Immunol.* 2017; 39: e12426. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12426>
36. Bautista-Lopez N.L., Ndao M., Camargo F.V., et al. Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *J Clin Microbiol.* 2017; 55 (3): 744–58. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.01649-16>
37. Wolk P.F., Zardo M.L., Miot H.T., Goldenberg S., Carvalho P.C., Morling P.A. Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics.* 2017; 17: 1600477. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.201600477>
38. Li Y., Liu Y., Xiu F., Wang J., Cong H., He S., et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int J Nanomed.* 2018; 13: 467–77. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S151110>
39. Samoil V., Dagenais M., Ganapathy V., Jerry Aldridge J., Glebov A., Ardini A., Paula Ribeiro P. Vesicle-based secretion in schistosomes: analysis

of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*. *Sci Rep*. 2018; 8: 3286. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21587-4>

40. 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): 6641–51. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00453>

41. Toledo R., Bernal M.D., Marcilla A. Proteomics of foodborne trematodes. *J Proteomics*. 2011; 74: 1485–503. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.029>

42. Wang L., Yu Z., Wan S., Wu F., Chen W., Zhang B., et al. Exosomes derived from dendritic cells treated with *Schistosoma japonicum* soluble egg antigen attenuate DSS-induced colitis. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 651. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00651>

43. Meningher T., Lerman G., Regev-Rudzki N., Gold D., Ben-Dov I.Z., Sidi Y., et al. Schistosomal MicroRNAs isolated from extracellular vesicles in sera of infected patients: a new tool for diagnosis and follow-up of human schistosomiasis. *J Infect Dis*. 2017; 215: 378–86. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw539>

44. Fromm B., Ovchinnikov V., Hoyer E., Bernal D., Hackenberg M., Marcilla A. On the presence and immunoregulatory functions of extracellular microRNAs in the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasite Immunol*. 2017; 39: e12399. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12399>

45. Cwiklinski K., de la Torre-Escudero E., Trelis M., Bernal D., Dufresne P., Robinson J., et al. The Extracellular vesicles of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*: biogenesis pathways and cargo molecules involved in parasite pathogenesis. *Mol Cell Proteomics*. 2015; 14: 3258–73. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.0539>

46. Roig J., Saiz M.L., Galiano A., et al. Extracellular vesicles from the helminth *Fasciola hepatica* prevent DSS-induced acute ulcerative colitis in a T-lymphocyte independent mode. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1036. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01036>

47. Smallwood T.B., Giacomini P.R., Loukas A., et al. Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Front Immunol*. 2017; 8: 453. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00453>

48. Maizels R.M. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 481–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.024>

49. Wang W., Zhou X., Cui F., Shi C., Wang Y., Men Y., et al. Proteomic analysis of exosomes derived from patients sera infected with *Echinococcus granulosus*. *Korean J Parasitol*. 2019; 57 (5): 489–97. DOI: <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.5.489>

50. Siles-Lucas M., Sanchez-Ovejero C., Gonzalez-Sanchez M., Gonzalez E., Falcon-Perez J.M., Boufana B., et al. Isolation and characterization of exosomes derived from fertile sheep hydatid cysts. *Vet Parasitol*. 2017; 236: 22–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.01.022>

51. Zhou X., Wang W., Cui F., Shi C., Ma Y., Yu Y., et al. Extracellular vesicles derived from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from patients: isolation, characterization and evaluation of immunomodulatory functions on T cells. *Int J Parasitol*. 2019; 49 (13–14): 1029–37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.08.003>

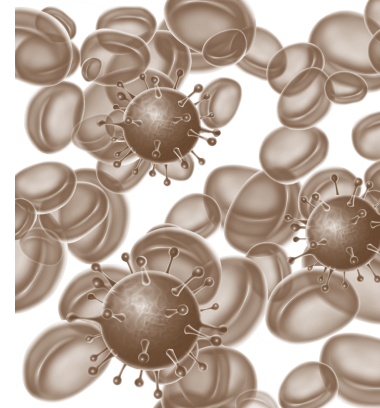
52. Coakley G., Maizels R.M., Buck A.H. Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol*. 2015; 31: 477–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.009>

53. Zheng Y., Guo X., He W., Shao Z., Zhang X., Yang J., et al. Effects of *Echinococcus multilocularis* miR-71 mimics on murine macrophage RAW264.7 cells. *Int Immunopharmacol*. 2016; 34: 259–62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.015>

54. 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): 3558–77. DOI: <https://doi.org/10.1039/c71c00592j>

55. Chen B.-Y., Sung C.W.-H., Chen C., Cheng C.-M., Lin D.P.-C., Huang C.-T., et al. Advances in exosomes technology. *Clin Chim Acta*. 2019; 493: 14–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.021>

56. Zhu G., Chen X. Aptamer-based targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 134: 65–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.005>



# Влияние *Helicobacter pylori* и вируса Эпштейна–Барр на изменение экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, PD-1, PD-L1, PD-L2 и белка LC3В в ткани рака желудка

Августинович А.В.<sup>1</sup>,  
Спирина Л.В.<sup>1,2</sup>,  
Афанасьев С.Г.<sup>1</sup>,  
Волков М.Ю.<sup>1</sup>,  
Доспан А.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», 634050, г. Томск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 634050, г. Томск, Российская Федерация

Рак желудка (РЖ) занимает 3-е место в мире по показателю смертности среди злокачественных новообразований различных локализаций. Хроническое воспаление является независимым фактором риска для данной патологии. Самыми распространенными инфекционными агентами РЖ являются *Helicobacter pylori* и вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ).

**Цель** исследования – изучение экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/ mTOR сигнального пути, а также белка LC3В ткани опухоли желудка в зависимости от инфицирования *H. pylori* и ВЭБ.

**Материал и методы.** В исследование включены 55 больных операбельным РЖ, получивших комбинированное лечение в абдоминальном отделении клиник НИИ онкологии Томского НИМЦ. Пациенты были распределены на группы в зависимости от наличия установленной методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени инфекции *H. pylori* и ВЭБ. Сформированы 4 группы: 1-я группа – больные с ДНК *H. pylori* в ткани опухоли ( $n=10$ ); 2-я группа – пациенты без ДНК *H. pylori* в ткани опухоли ( $n=45$ ); 3-я группа – больные с ДНК ВЭБ в ткани опухоли ( $n=5$ ); 4-я группа – пациенты без ВЭБ в ткани опухоли ( $n=50$ ). Сочетанная инфекция на основании обнаружения ДНК *H. pylori* и ВЭБ диагностирована у 4 больных.

Экспрессию молекулярных показателей оценивали методом ПЦР в реальном времени. Содержание белка LC3В определяли методом вестерн-блоттинга. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 12.0.

**Результаты и обсуждение.** Пациенты в исследуемых группах не различались между собой по размеру опухоли, вовлеченности регионарных лимфатических узлов. Однако в случае инфицирования *H. pylori* и при сочетанном обнаружении с ДНК ВЭБ отмечены увеличение числа больных с низкодифференцированными опухолями и сниженный ответ опухоли на неоадьювантную химиотерапию.

Выявлено увеличение экспрессии CAIX в 18,5 раза при наличии ДНК *H. pylori*, а при сочетанной инфекции данный показатель повышался в 22,1 раза по сравнению с пациентами без инфекции. У больных с ДНК *H. pylori* выявлен рост экспрессии PTEN в 1,6 раза по сравнению с больными без инфицирования *H. pylori*, что свидетельствовало об активации молекулярных сигнальных каскадов.

При наличии ДНК ВЭБ отмечено снижение экспрессии mTOR в 4,77 раза, а при сочетанном выявлении ДНК *H. pylori* и ВЭБ – в 6,35 раза по сравнению с больными, у которых не выявлены ДНК изучаемых инфекций. Выявленные факты указывают на вовлеченность изменения экспрессии компонентов сигнальных каскадов под влиянием ВЭБ, в том числе в случае сочетанной инфекции, которые могут быть связаны с агрессивностью раковых клеток.

**Ключевые слова:** рак желудка; *Helicobacter pylori*; вирус Эпштейна–Барр; транскрипционные факторы; ростовые факторы; PD-1; PD-L1; PD-L2; LC3В



В настоящее время иммуногенность опухоли связывают с рецепторами и лигандами программируемой клеточной гибели PD-1, PD-L1 и PD-L2, что в проведенном исследовании не отмечено.

Стоит отметить изменение экспрессии и содержания белка LC3B. При инфекции *H. pylori* и ВЭБ (группы 2 и 4) показан рост экспрессии и уровня LC3B в 2,8; 1,5 и 5,8 и 1,67 раза соответственно по сравнению с неинфицированными больными (группы 1 и 3). При этом при сочетанной инфекции в случае выявления ДНК обеих инфекций отмечался рост только белка в 1,65 раза по сравнению с инфицированными больными.

**Заключение.** Полученные данные подтверждают вовлеченность *H. pylori* и ВЭБ в молекулярные механизмы развития злокачественных новообразований желудка. В проведенном исследовании у незначительной части больных с РЖ при обнаружении ДНК *H. pylori* и ВЭБ возможно быстрое развитие опухолевой прогрессии за счет активации аутофагии, ангиогенеза, что подтверждается большим количеством пациентов с низкодифференцированными опухолями и увеличением количества пациентов со сниженным ответом опухоли на проведенное лечение.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

**Вклад авторов.** Идея и концептуальное решение – Афанасьев С.Г.; дизайн исследования – Спирина Л.В.; сбор и обработка материала – Доспан А.Б.; выполнение исследований – Волков М.Ю., Августинович А.В.; оформление и редактирование текста – Спирина Л.В.

**Для цитирования:** Августинович А.В., Спирина Л.В., Афанасьев С.Г., Волков М.Ю., Доспан А.Б. Влияние *Helicobacter pylori* и вируса Эпштейна–Барр на изменение экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, PD-1, PD-L1, PD-L2 и белка LC3B в ткани рака желудка // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2023. Т. 12, № 2. С. 14–22. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-2-14-22>

Статья поступила в редакцию 08.11.2022. Принята в печать 28.03.2023.

## The effect of *Helicobacter pylori* and Epstein–Barr virus on changes in the expression of transcription, growth factors, PD-1, PD-L1, PD-L2 and LC3B protein in gastric cancer tissue

Avgustinovich A.V.<sup>1</sup>,  
Spirina L.V.<sup>1,2</sup>,  
Afanas'ev S.G.<sup>1</sup>,  
Volkov M.Yu.<sup>1</sup>, Dospan A.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 634050, Tomsk, Russian Federation  
<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 634050, Tomsk, Russian Federation

Gastric cancer (GC) ranks 3<sup>rd</sup> in the world in terms of mortality among malignant neoplasms of various localizations. Chronic inflammation is an independent risk factor for this pathology. The most common infectious agents for stomach cancer are *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and Epstein–Barr virus (EBV).

**The aim** of the study was to study the transcription, growth factors, components of the AKT/mTOR signaling pathway expression, as well as the LC3B protein of gastric tumor tissue depending on infection with *H. pylori* and EBV.

**Material and methods.** The study included 55 patients with operable GC who received combined treatment in the Department of abdominal oncology, clinics of the Cancer Research Institute of TNRMС. Patients were divided into groups depending on the presence of *H. pylori* infection and EBV. 4 groups were formed: group 1 represented by patients with the presence of *H. pylori* DNA in tumor tissue ( $n=10$ ), group 2 – patients without *H. pylori* DNA in tumor tissue ( $n=45$ ), group 3 – patients with the presence of EBV DNA in tumor tissue ( $n=5$ ), group 4 – patients without EBV in tumor tissue ( $n=50$ ). Combined infection by detection DNA of *H. pylori* and EBV were diagnosed in 4 patients, 51 people were a group of patients without a combined infection.

The molecular parameters expression was evaluated by real-time PCR. The LC3B protein content was evaluated by Western blotting. The DNA of *H. pylori* and EBV in tumor tissue was detected using real-time PCR.

**Results and discussion.** Patients in the study groups did not differ in tumor size, involvement of regional lymph nodes. However, in the case of *H. pylori* infection and with combined detection with EBV DNA, there was an increase in the number of patients with low-grade tumors and a reduced tumor response to neoadjuvant chemotherapy.

An 18.5-fold increase in CAIX expression was revealed in the presence of *H. pylori* DNA, and in case of combined infection, this indicator increased 22.1-fold compared to patients without infection. In patients with the presence of *H. pylori* DNA, an increase in PTEN expression was revealed by 1.6 times compared with patients without *H. pylori* infection, which indicated the activation of molecular signaling cascades.

### Keywords:

gastric cancer;  
*Helicobacter pylori*;  
Epstein–Barr virus;  
transcriptional  
factors; growth  
factors; PD-1;  
PD-L1; PD-L2; LC3B

It was noted in the presence of EBV DNA with a decrease in mTOR by 4.77 times and with combined – AKT by 6.35 times compared with patients who did not have DNA of the studied infections. The revealed facts indicate the involvement of changes in the expression of components of signaling cascades under the influence of EBV, including in the case of combined infection, which may be associated with the aggressiveness of cancer cells.

Currently, the immunogenicity of the tumor includes receptors and ligands of programmed cell death PD-1, PD-L1 and PD-L2, which was not noted in the study.

It is worth noting the change in the expression and content of the LC3B protein. With *H. pylori* and EBV infection (group 2 and 4), an increase in expression and content of the indicator was shown by 2.8; 1.5 and 5.8; 1.67 times, consequently, compared with non-infected patients (group 1 and 3). At the same time, with a combined infection, in the case of DNA detection of both infections, there was an increase in protein alone by 1.65 times compared with infected patients.

**Conclusion.** The data obtained confirm the involvement of *H. pylori* and EBV in the molecular mechanisms of the development of malignant neoplasms of the stomach. In the conducted study, in a small part of patients with stomach cancer, when detecting *H. pylori* and EBV DNA may rapidly develop tumor progression due to the activation of autophagy, angiogenesis, which is confirmed by a large number of patients with low-grade tumors and an increase in the number of patients with a reduced tumor response to treatment.

**Funding.** The study had no sponsor support.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Contribution.** Idea and conceptual solution – Afanas'ev S.G.; design and research – Spirina L.V.; material collection – Dospan A.B.; research execution – Volkov M.Yu., Avgustinovich A.V.; text design and editing – Spirina L.V.

**For citation:** Avgustinovich A.V., Spirina L.V., Afanas'ev S.G., Volkov M.Yu., Dospan A.B. The effect of *Helicobacter pylori* and Epstein–Barr virus on changes in the expression of transcription, growth factors, PD-1, PD-L1, PD-L2 and LC3B protein in gastric cancer tissue. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* [Infectious Diseases: News, Opinions, Training]. 2023; 12 (2): 14–22. DOI: <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2023-12-2-14-22> (in Russian)

**Received** 08.11.2022. **Accepted** 28.03.2023.

**Р**ак желудка (РЖ) в течение многих лет занимал первые позиции в структуре злокачественных новообразований [1]. Согласно современным представлениям, РЖ – это генетически гетерогенное заболевание, в возникновении, росте и прогрессировании которого участвует несколько различных патофизиологических механизмов [2].

Значимым инфекционным агентом в развитии РЖ является *Helicobacter pylori*, которая опосредует онкогенез в клетках желудка [3]. Считается, что инфекция *H. pylori* и клиническая стадия болезни могут увеличить риск смерти больных РЖ [4]. Наличие *H. pylori* – один из независимых факторов риска прогрессирования и прогноза при РЖ [5].

Вторым инфекционным агентом, который, возможно, опосредует развитие РЖ, является вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ). ВЭБ ассоциируют с возникновением отдельной группы опухолей с манифестированием мутаций значимых онкогенов и онкосупрессоров [6]. Сообщалось, что РЖ, ассоциированный с ВЭБ, связан с хроническим воспалением эпителия желудка, вызванным *H. pylori* [7].

Кроме того, персистирующая сочетанная инфекция *H. pylori* и ВЭБ способствует агрессивному течению РЖ. Молекулярные механизмы, лежащие в основе агрессивности *H. pylori* и ВЭБ-опосредованного РЖ, изучены недостаточно. Установлено, что коинфекция ВЭБ и *H. pylori* усиливала экспрессию онкогенного белка ганкирина [8]. Кроме того, показана способность *H. pylori* и ВЭБ активировать аутофагию [9], универсальный процесс, принимающий активное участие в онкогенезе [10, 11].

Ассоциированный с ВЭБ рак желудка имеет ряд генетических и биологических особенностей, что сопровождается

вовлеченностью иммунной системы и высокой экспрессии PD-L1 – лиганда запрограммированной смерти 1 (programmed death ligand 1) [12]. Модификация микроокружения опухоли с привлечением большого количества иммунокомпетентных клеток также является признаком опухолей, развивающихся на фоне инфекции *H. pylori* [13, 14]. Существует связь между инфицированием *H. pylori*, ВЭБ и Her2neu-статусом опухоли [15, 16], это связано с вовлеченностью вирусных белков и онкогенных факторов в механизмы трансдукции сигнала в опухолевой клетке [17].

Изменение экспрессии транскрипционных и ростовых факторов играет важную роль в развитии РЖ [18]. Показано снижение экспрессии 4EBP1 в ткани РЖ под влиянием неоадьювантной терапии. Молекулярные маркеры, способные предсказывать развитие резистентности к противоопухолевой терапии, связаны с особенностями АКТ/mTOR сигнального пути [19]. В целом влияние *H. pylori* и ВЭБ на изменение экспрессии транскрипционных, ростовых факторов в ткани рака желудка практически не изучено.

**Цель** исследования – изучение экспрессии транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/mTOR сигнального пути, а также белка LC3B ткани опухоли желудка в зависимости от инфицирования *H. pylori* и ВЭБ.

## Материал и методы

В исследование включены 55 больных с диагнозом РЖ, проходивших комбинированное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ и в течение 2 мес получивших 8 курсов предоперационной полихимиотерапии по схеме FLOT

(доцетаксел – 50 мг/м<sup>2</sup>, внутривенно капельно в 1-й день, оксалиплатин 85 мг/м<sup>2</sup>, 2-часовая внутривенная инфузия в 1-й день; фолиат кальция (лейковорин) – 200 мг/м<sup>2</sup>, 2-часовая внутривенная инфузия в 1-й день, фторурацил – 2400 мг/м<sup>2</sup>, внутривенная 46–48-часовая инфузия в течение 2 сут).

**Критерии включения в исследование:** морфологически доказанный рак желудка T24N03 (по TNM классификации Международного противоракового союза 1980 г., пересмотр 2017 г.); больные, не получавшие ранее лечение; общее удовлетворительное состояние больного; возраст больных не старше 70 лет [статус Карновского >60%, по шкале Группы исследования рака Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 0–1]; согласие больного на лечение; отсутствие синхронных и метакронных, злокачественных опухолей.

**Критерии невключения в исследование:** общее тяжелое состояние пациента – ECOG >2; большие РЖ с метастазами при любом T и N; больные, получавшие ранее специфическое противоопухолевое лечение по поводу РЖ; больные с декомпенсированным опухолевым стенозом антрального отдела желудка, кровотечением из опухоли, кахексией, перфорацией, дисфагией; отказ пациента от лечения; наличие отдаленных метастазов по данным клинического обследования, включая лапароскопию (в том числе Су+ по данным цитологического исследования лаважа брюшной полости); гиперчувствительность к препаратам. Эффективность лечения оценивали по шкале RECIST 1.1.

Пациенты распределены на группы с учетом выявленной инфекции *H. pylori* и ВЭБ, подтвержденной методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. ДНК *H. pylori* выявлена у 10 человек, ДНК ВЭБ – у 5, сочетанная инфекция ДНК *H. pylori* и ВЭБ была диагностирована у 4 больных.

Для анализа полученных результатов были сформированы 6 групп: 1-я группа – больные с ДНК *H. pylori* в ткани опухоли (n=10); 2-я группа – пациенты без ДНК *H. pylori* в ткани опухоли (n=45); 3-я группа – больные с ДНК ВЭБ в ткани опухоли (n=5); 4-я группа – пациенты без ВЭБ в ткани опухоли (n=50). Сочетанная инфекция на основании обнаружения ДНК *H. pylori* и ВЭБ была диагностирована у 4 больных (5-я группа). Контрольная (6-я) группа включала 36 больных.

Клиническая характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Выделение ДНК («Экстракция 1000», «Вектор Бест», Россия) и последующую детекцию проводили, согласно инструкции производителя набора со стандартными контрольными материалами.

ДНК *H. pylori* и ВЭБ в биоптатах опухолевой ткани больных выявляли с использованием метода ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов, согласно инструкции производителя («Вектор Бест», Россия).

РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия). Для оценки количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) оценивали концентрацию и чистоту выделенной РНК. Концентрация РНК варьировала от 80 до

**Таблица 1.** Клинико-морфологическая характеристика больных раком желудка, включенных в исследование

Характеристика	Количество больных, абс. (%)
<b>ECOG:</b>	
0	50 (92)
1	5 (8)
<b>Пол:</b>	
мужской	42 (76)
женский	13 (24)
<b>Гистологический вариант опухоли:</b>	
высокодифференцированная аденокарцинома	2 (4)
умеренно дифференцированная аденокарцинома	16 (28)
низкодифференцированная аденокарцинома	33 (60)
недифференцированный рак	2 (4)
перстневидно-клеточный рак	2 (4)
<b>Локализация опухоли в желудке:</b>	
тело	27 (48)
антральный отдел	15 (28)
субтотальное поражение	13 (24)
<b>cTN:</b>	
T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	11 (20)
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	13 (24)
T <sub>4</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	2 (4)
T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	13 (24)
T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	7 (12)
T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>	2 (4)
T <sub>4</sub> N <sub>3</sub> M <sub>0</sub>	7 (12)

250 нг/мкл, A260/A280 = 1,95–2,05; A260/A230 = 1,90–2,31. Целостность РНК (RIN) оценивали при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, США). RIN составил 5,6–7,8.

Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора OT m-MuLV-RH («БиоЛабмикс», Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору (табл. 2). ПЦР ставили в 3 репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («БиоЛабмикс», Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК.

Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94 °С, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °С, 10 с и 2-й шаг 20 с – при температуре 60 °С. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии

**Таблица 2.** Последовательность праймеров проб исследованных генов

Ген	Последовательность
<i>PTEN</i> NM_001304717.2	F 5'-GGGAATGGAGGGAATGCT-3' R 5'-CGCAAACAACAAGCAGTGA-3'
<i>4E-BP1</i> NM_004095.3	F 5'- CAGCCCTTTCTCCCTCACT -3' R 5'- TTCCAAGCACATCAACCT -3'
<i>AKT1</i> NM_001014431.1	F 5'- CGAGGACGCCAAGGAGA -3' R 5'- GTCATCTGGTCAGGTGGTGT -3'
<i>c-RAF</i> NM_002880.3	F 5'- TGGTGTGCTCCTGCTCCCT -3' R 5'- ACTGCCTGCTACCTTACTTCTCT -3'
<i>GSK3b</i> NM_001146156.1	F 5'- AGACAAGGACGGCAGCAA -3' R 5'-CTGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'
<i>70S kinase alpha</i> NM_001272042.1	F 5'- CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3' R 5'- ACACATCTCCCTCTCCACCTT -3'
<i>m-TOR</i> NM_004958.3	F 5'- CCAAAGGCAACAAGCGAT-3' R 5'- TTCACCAACCCTCTCCAA -3'
<i>PDK1</i> NM_001278549.1	F 5'- TCACCAGGACAGCCAATACA -3' R 5'- CTCCTCGGTCCTCATCTTCA -3'
<i>GAPDH</i> NM_001256799.2	F 5'- GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'
<i>CAIX</i> NM_001216.2	F 5'-GTTGCTGTCTCGCTTGAA-3' R 5'-CAGGGTGTGAGAGGGGTGT-3'
<i>2HIF-1a</i> NM_001243084.1	F 5'- CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3' R 5'- TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'
<i>EPAS1</i> NM_001430.4	F 5'- TGGAGTATGAAGAGCAAGCCT-3' R 5'-GGGAACCTGCTCTTGCTGT-3'
<i>NFKB1</i> NM_001165412.1	F 5'-CGTGTAACCAAAGCCCTAAA-3' R 5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'
<i>RELA</i> NM_001145138.1	F 5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3' R 5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'
<i>VHL</i> NM_000551.3	F 5'- GGCAGGCGAATCTCTTGA-3' R 5'-CTATTTCTTTACTCAGCACCATT-3'
<i>PD-L2</i> NM_025239	F 5'- GTTCCACATACCTCAAGTCCAA-3' ATAGCACTGTTCACTTCCCTCTT-3'
<i>PD-L1</i> NM_001267706	F 5'- AGGGAGAATGATGGATGTGAA-3' R 5'-ATCATTACAACCACACTCACAT-3'
<i>PD-1-1</i> XM_017004293	F 5'- CTGGGCGGTGCTACAACCT3' R 5'-CTTCTGCCCTTCTCTGTCA-3'
<i>LC3</i> NM_032514.4	F 5'- CCCAAACCGCAGACACAT-3' R 5'-ATCCCACCAGCCAGCAC-3'
<i>AMPK</i> NM_006252.4	F 5'- AAGATGCCATTGGATGCACT-3' R 5'-TGAGGTGTTGAGGAACCAGAT-3'

**Примечание.** NM – номер последовательности ПНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); F – прямой праймер; R – обратный праймер.

*GAPDH*. Количественный анализ экспрессии проводили по  $2\Delta\Delta Ct$  по отношению к конститутивно-экспрессируемому гену-рефери фермента *GAPDH*.

**Получение гомогенатов:** замороженную ткань (100 мг) измельчали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,5), содержащего 2 мМ аденозинтрифосфата, 5 мМ хлорида магния, 1 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 г и 4 °С, использовали далее для приготовления проб с дитиотреитолом для проведения электрофореза.

Электрофорез проводили по Laemmli в 13% полиакриламидном геле.

**Вестерн-блоттинг:** после электрофореза переносили полипептиды на PVDF-мембрану (Immobylo, Millipore, США)

с помощью влажного переноса в блот-модуле (Bio-Rad, США). Иммунодетекцию белка LC3B в ткани проводили с использованием моноклональных антител к белку LC3B (Affinity Biosciences, США). Результаты исследования оценивали с помощью гель-документирующей системы Chemidoc (Bio-Rad, США), используя программное приложение ImageLab. Стандартизацию проводили относительно  $\beta$ -актина, относительное содержание которого в неизменной ткани принимали за 100%. Результаты выражали в процентах содержания показателей в неизменной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0, проверку нормальности распределения признака – с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как *Me* [Q1; Q3]. Тест Манна–Уитни



**Таблица 3.** Уровень экспрессии транскрипционных и ростовых факторов в ткани опухоли в зависимости от наличия ДНК *H. pylori* или вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), в том числе при их сочетанном обнаружении

Маркер	Уровень экспрессии определяемых маркеров в группах пациентов, усл. ед.					
	ДНК <i>H. pylori</i> (-) (n=45)	ДНК <i>H. pylori</i> (+) (n=10)	ДНК ВЭБ (-) (n=50)	ДНК ВЭБ (+) (n=5)	ДНК <i>H. pylori</i> и ДНК ВЭБ (+) (n=54)	контрольная группа (n=36)
NF-κB p65	1,41 [0,36; 3,26]	1,83 [1,07; 3,18]	1,38 [0,46; 3,26]	1,69 [0,01; 2,3]	6,36 [2,3; 10,41]	1,35 [0,36; 3,18]
NF-κB p50	1,36 [0,48; 6,54]	4,13 [0,68; 14,72]	1,28 [0,54; 7,84]	1,77 [0,14; 10,26]	6,01 [0,14; 11,88]	1,36 [0,54; 7,84]
VEGFR2	1,39 [0,54; 3,63] 1,24 [0,32; 3,29]	0,68 [0,19; 1,26] 1,70 [0,51; 9,06]	1,30 [0,33; 3,63] 1,38 [0,38; 5,29]	0,78 [0,63; 1,05] 0,77 [0,06; 2,0]	4,55 [0,63; 8,46] 15,7 [0,06; 31,34]	1,05 [0,33; 3,48] 1,37 [0,38; 4,17]
CAIX	0,93 [0,32; 1,98]	17,22 [2,93; 31,78]*	1,07 [0,35; 3,66]	0,27 [0,19; 14,32]	23,05 [14,32; 31,78]**	1,04 [0,34; 2,94]
HIF-1	1,78 [0,54; 8,3]	9,13 [0,02; 18,64]	1,93 [0,54; 10,13]	0,96 [0,03; 2,02]	9,14 [0,02; 18,25]	1,78 [0,54; 9,35]
HIF-2	1,0 [0,2; 3,36]	0,71 [0,13; 14,03]	0,99 [0,17; 3,36]	0,5 [0,06; 20,23]	23,78 [0,06; 47,5]	0,99 [0,17; 3,36]
VHL	0,97 [0,38; 2,0]	1,07 [0,06; 2,37]	1,0 [0,36; 2,09]	0,71 [0,16; 1,51]	27,13 [0,06; 54,19]	0,99 [0,36; 2,0]

**Примечание.** \* – значимость различий по сравнению с больными без ДНК *H. pylori* в опухоли (1-я группа),  $p < 0,05$ ; \*\* – значимость различий по сравнению с контрольной группой (6-я группа),  $p < 0,05$ .

использовали для оценки значимости различий количественных признаков. Для сравнения качественных признаков применяли критерий  $\chi^2$ . Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Пациенты в анализируемых группах не отличались по размеру опухоли и вовлеченности в патологический процесс регионарных лимфоузлов. Однако в случае инфицирования *H. pylori* и при сочетанном обнаружении с ДНК ВЭБ отмечены увеличение числа больных с низкодифференцированными опухолями и сниженный ответ опухоли на неoadъювантную химиотерапию (увеличение доли больных со стабилизаций

и прогрессированием после проведенного лечения). Выявленный факт свидетельствует об агрессивном характере течения заболевания.

В результате проведенного исследования отмечено увеличение экспрессии карбоангидразы IX (CAIX) в 18,5 раза при наличии ДНК *H. pylori*, а при сочетанном обнаружении с ДНК ВЭБ данный показатель повышался в 22,1 раза по сравнению с пациентами, отрицательными по этим патогенам (табл. 3). CAIX – важный ангиогенный фактор, вовлеченный в процессы роста и распространения опухоли, связанный с развитием гипоксии [18].

Компоненты АКТ/mTOR сигнального пути играют важную роль в сигнальной трансдукции при РЖ. Особое внимание уделяется дефициту PTEN, фосфатазе, относящейся

**Таблица 4.** Уровень экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути в ткани опухоли при наличии ДНК *H. pylori* или вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), в том числе при их сочетанном обнаружении

Компонент	Уровень экспрессии определяемых компонентов в группах пациентов, усл. ед.					
	ДНК <i>H. pylori</i> (-) (n=45)	ДНК <i>H. pylori</i> (+) (n=10)	ДНК ВЭБ (-) (n=50)	ДНК ВЭБ (+) (n=5)	ДНК <i>H. pylori</i> и ДНК ВЭБ (+) (n=4)	контрольная группа (n=36)
4EBP1	1,32 [0,62; 3,13]	1,09 [0,45; 12,82]	1,31 [0,62; 4,0]	3,13 [0,45; 4,35]	76,87 [0,45; 153,28]	1,32 [0,62; 4,0]
АКТ	1,41 [0,85; 3,4]	0,53 [0,07; 1,41]	1,27 [0,66; 3,1]	1,2 [0,33; 10,43]	0,2 [0,07; 0,33]***	1,27 [0,72; 3,4]
c-RAF	1,27 [0,54; 6,75]	3,89 [0,69; 16,11]	1,35 [0,56; 12,75]	0,93 [0,13; 2,14]	2,39 [0,05; 4,72]	1,28 [0,56; 10,5]
GSK-3β	1,05 [0,62; 2,42]	1,84 [0,16; 7,26]	1,08 [0,59; 2,19]	7,26 [4,42; 16,84]**	3,71 [0,16; 7,26]***	1,11 [0,62; 2,46]
70s 6 киназа	1,38 [0,72; 2,33]	2,93 [0,02; 43,41]	1,35 [0,72; 3,8]	1,44 [0,13; 2,63]	21,71 [0,0; 43,41]	1,38 [0,72; 3,3]
mTOR	0,99 [0,5; 1,6]	0,89 [0,19; 1,51]	1,06 [0,54; 1,6]	0,22 [0,19; 0,44]**	0,21 [0,19; 0,22]	1,0 [0,5; 1,6]
PDK	0,87 [0,51; 2,53]	1,8 [0,89; 6,89]	0,98 [0,54; 2,82]	0,3 [0,05; 1,24]	13,51 [0,3; 26,72]	0,95 [0,54; 2,53]
PTEN	1,35 [0,33; 3,77]	2,21 [1,44; 18,25]*	1,51 [0,38; 5,57]	2,13 [0,01; 43,71]	22,92 [2,13; 43,71]	1,44 [0,35; 5,57]

**Примечание.** \* – значимость различий по сравнению с больными без ДНК *H. pylori* в опухоли (1-я группа),  $p < 0,05$ ; \*\* – значимость различий по сравнению с больными без ДНК ВЭБ в опухоли (3-я группа),  $p < 0,05$ ; \*\*\* – значимость различий по сравнению с контрольной группой (6-я группа),  $p < 0,05$ .

**Таблица 5.** Уровень экспрессии PD-1, PD-L1, PD-L2, AMPK в ткани опухоли при наличии ДНК *H. pylori* или вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и их сочетанном обнаружении

Маркер	Уровень экспрессии определяемых маркеров в группах пациентов, усл. ед.					
	ДНК <i>H. pylori</i> (-) (n=45)	ДНК <i>H. pylori</i> (+) (n=10)	ДНК ВЭБ (-) (n=50)	ДНК ВЭБ (+) (n=5)	ДНК <i>H. pylori</i> и ДНК ВЭБ (+) (n=54)	контрольная группа (n=36)
PD	0,69 [0,38; 2,34]	3,64 [0,08; 14,12]	0,74 [0,35; 3,18]	1,5 [0,5; 4,65]	33,63 [0,08; 67,18]	0,78 [0,37; 3,18]
PD-L1	0,84 [0,35; 3,87]	1,82 [0,37; 6,63]	1,04 [0,35; 5,4]	0,84 [0,82; 3,76]	5,2 [3,76; 6,63]	0,84 [0,35; 3,87]
PD-L2	1,45 [0,52; 3,4]	3,15 [0,66; 7,4]	1,53 [0,54; 5,35]	0,77 [0,29; 1,7]	46,03 [0,29; 91,77]	1,53 [0,54; 5,06]
AMPK	1,2 [0,11; 2,89]	1,17 [0,41; 2,77]	1,21 [0,41; 2,77]	0,09 [0,02; 3,26]	3,96 [0,0; 7,95]	1,2 [0,29; 2,77]

к белкам-онкосупрессорам [20]. У больных с ДНК *H. pylori* выявлен рост экспрессии PTEN в 1,6 раза по сравнению с больными без *H. pylori* (табл. 4). При наличии ДНК ВЭБ и сочетанной инфекции был выявлен рост экспрессии GSK-3 $\beta$  в 6,6 и 3,3 раза соответственно по сравнению с больными без этих маркеров. Модификация экспрессионного профиля в опухоли затрагивала также экспрессию mTOR и АКТ, ключевых киназ сигнального пути. Это отмечено при наличии ДНК ВЭБ при снижении mTOR в 4,77 раза и при сочетанной АКТ в 6,35 раза по сравнению с больными, у которых не были выявлены ДНК изучаемых инфекций. Выявленные факты указывают на вовлеченность изменения экспрессии компонентов сигнальных каскадов под влиянием ВЭБ, в том числе в случае сочетанной инфекции, которая может быть связана с агрессивностью раковых клеток.

Иммуногенность опухоли связывают с рецепторами и лигандами программируемой клеточной гибели PD-1, PD-L1 и PD-L2, которая может изменяться под влиянием инфекционных агентов любого происхождения, в том числе вовлеченных в процессы онкогенеза. В проведенном исследовании изменений данных показателей не отмечено (табл. 5), что, вероятно, связано с небольшим количеством пациентов с опухолями желудка, у которых были выявлены ДНК *H. pylori* и ВЭБ.

Стоит отметить изменение экспрессии и содержания белка LC3B. При инфекции *H. pylori* и ВЭБ (2-я и 4-я группы) показан рост экспрессии и содержания показателя в 2,8; 1,5 и 5,8; 1,67 раза соответственно по сравнению с неинфицированными больными (1-я и 3-я группы) (табл. 6). При этом при сочетанной инфекции в случае выявления ДНК обеих инфекций отмечался рост только белка в 1,65 раза по сравнению с инфицированными больными.

Аутофагия является универсальным процессом адаптации клетки к неблагоприятным условиям, играет значимую роль в процессах онкогенеза и способствует не только опухолевому росту, но и развитию резистентности к противоопухолевому лечению [10, 19]. Полученные данные свидетельствуют об активации аутофагии, которая сопровождает развитие *H. pylori* и ВЭБ-ассоциированных видов РЖ, что можно использовать в персонализированной терапии опухолей данной локализации.

Хронический инфекционный процесс является значимым фактором в развитии злокачественных опухолей желудка. Отмечается активация ангиогенеза при нали-

чии как ДНК *H. pylori*, так и ДНК *H. pylori* и ВЭБ. Имеются противоречивые данные о роли CAIX, активирующей в условиях ацидоза развитие новых сосудов [21]. Повышение экспрессии CAIX показано в ткани РЖ, связанного с развитием воспалительного процесса вследствие инфицирования *H. pylori*. Полученные данные свидетельствуют о роли инфекционных агентов в трансформации клеток эпителия желудка в опухолевые. В исследовании G. Wang и соавт. показаны значимость транскрипционных и ростовых факторов в развитии опухолей желудочно-кишечного тракта, их вовлеченность в процессы опухолевой прогрессии, в том числе ангиогенез, модификация опухолевого микроокружения и т.д. [18].

Инфицирование *H. pylori* и ВЭБ сопровождается изменением активности сигнальных каскадов [15, 16], что способствует формированию значимых молекулярно-генетических маркеров опухоли [17]. В проведенном исследовании выявлена активация PTEN, одного из показателей, характеризующих сигнальный каскад (путь), при наличии признаков инфицирования *H. pylori* пациента с РЖ. При обнаружении ДНК ВЭБ и в том числе одновременно с *H. pylori* отмечено повышение экспрессии GSK-3 $\beta$  на фоне снижения уровня mPNC mTOR, АКТ. Известно, что модификация данного сигнального каскада является ключевым событием при развитии инвазивных свойств опухоли, что приведено в работе J. Xu и соавт. [22]. Вероятно, при инфицировании ВЭБ и сочетанном влиянии инфекционных агентов происходит модификация биологических свойств опухоли с формированием агрессивного фенотипа, что влияет на прогноз заболевания и эффективность противоопухолевой терапии.

В ранее проведенном исследовании выявлена ассоциация между PD-L1 статусом опухоли и молекулярными маркерами в опухоли [19]. Стоит отметить, что экспрессия PD-1, PD-L1, PD-L2 в опухоли не зависела от инфицирования *H. pylori* и ВЭБ, обнаруженных в материале злокачественных клеток. Однако выявлена активация аутофагии в опухоли, ассоциированной с инфицированием *H. pylori*, ВЭБ, а также при сочетанной инфекции. Аутофагия, являясь универсальным патогенетическим процессом, который определяет особенности жизнедеятельности клетки, значима и для опухолей желудочно-кишечного тракта [19, 23]. M.C. Mommersteeg и соавт. обнаружили особенности клеточного метаболизма в *H. pylori*-ассоциированных видах РЖ, что, вероятнее всего, связано с проявлением провоспалитель-

**Таблица 6.** Экспрессия и содержание LC3В в ткани опухоли в зависимости от наличия ДНК *H. pylori* и вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) или их одновременного выявления

Показатель	Уровень экспрессии LC3В в группах пациентов					
	ДНК <i>H. pylori</i> (-) (n=45)	ДНК <i>H. pylori</i> (+) (n=10)	ДНК ВЭБ (-) (n=50)	ДНК ВЭБ (+) (n=5)	ДНК <i>H. pylori</i> и ДНК ВЭБ (+) (n=54)	контрольная группа (n=36)
Экспрессия LC3В, усл. ед.	0,7 [0,32; 1,53]	2,0 [0,02; 5,62]*	0,65 [0,32; 1,45]	3,8 [0,13; 3,97]	3,9 [0,13; 3,97]	0,68 [0,31; 1,52]
Белок LC3В, %	84,1 [20,0; 139,0]	124,7 [36,89; 145,89]*	83,5 [23,65; 123,33]	139,0 [11,98; 166,56]**	139,0 [11,98; 166,56]***	84,1 [20,0; 139,0]

**Примечание.** \* – значимость различий по сравнению с больными без ДНК *H. pylori* в опухоли (1-я группа),  $p < 0,05$ ; \*\* – значимость различий по сравнению с больными без ДНК ВЭБ в опухоли (3-я группа),  $p < 0,05$ ; \*\*\* – значимость различий по сравнению с контрольной группой (6-я группа),  $p < 0,05$ .

тельных свойств и высоким риском предраковых изменений эпителия желудка, приводящих к развитию мутаций белков-онкосупрессоров и онкобелков [24]. Рост экспрессии и содержания белка LC3В, маркера аутофагосом, выявленное в проведенном исследовании свидетельствует о роли аутофагии в развитии опухолей желудка, особенно на фоне хронического воспаления, ассоциированного с инфицированием *H. pylori* и ВЭБ.

## Заключение

Таким образом, выявлено увеличение экспрессии CAIX, компонентов АКТ/мTOR сигнального пути и белка LC3В в ткани РЖ, связанное с хроническим воспалением

на фоне инфицирования *H. pylori* и ВЭБ и развитием EVB-ассоциированного РЖ. Наиболее выраженная модификация внутриклеточного сигнального пути отмечается у больных с наличием в ткани опухоли ДНК ВЭБ и при сочетанной инфекции.

Полученные данные подтверждают вовлеченность *H. pylori* и ВЭБ в молекулярные механизмы развития злокачественных новообразований желудка. В проведенном исследовании у части больных РЖ при обнаружении ДНК *H. pylori* и ВЭБ возможно быстрое развитие опухолевой прогрессии за счет активации аутофагии, ангиогенеза, что подтверждается большим количеством пациентов с низкодифференцированными опухолями и увеличением со сниженным ответом опухоли на проведенное лечение.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Августинович Александра Владимировна (Alexandra V. Avgustinovich)** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения абдоминальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Российская Федерация

E-mail: aov862@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7301-7581>

**Спирина Людмила Викторовна (Lyudmila V. Spirina)**\* – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Российская Федерация

E-mail: spirinalvl@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>

**Афанасьев Сергей Геннадьевич (Sergei G. Afanas'ev)** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением абдоминальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Российская Федерация

E-mail: afanasievsg@oncology.tomsk.ru

<http://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

**Волков Максим Юрьевич (Maksim Yu. Volkov)** – кандидат медицинских наук, врач отделения абдоминальной онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Российская Федерация

E-mail: dok75-75@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-6776-4898>

**Доспан Азияна Буяновна (Aziyana B. Dospan)** – студент VI курса медико-биологического факультета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Российская Федерация

E-mail: aziyanadospan99@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0001-7431-4764>

\* Автор для корреспонденции.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ajani J.A., D'Amico T.A., Bentrem D.J., et al. Gastric cancer, version 2.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022; 20 (2): 167–92. DOI: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0008>
2. Yeoh K.G., Tan P. Mapping the genomic diaspora of gastric cancer. *Nat Rev Cancer*. 2022; 22 (2): 71–84. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00412-7>
3. Ishaq S., Nunn L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: A state of the art review. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015; 8 (suppl 1): 6–14.
4. Ragab A.E., Al-Madboly L.A., Al-Ashrawy G.M., et al. Unravelling the in vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* effect of delphinidin-3-O-glucoside rich extract from pomegranate exocarp: Enhancing autophagy and downregulating TNF- $\alpha$  and COX2. *Antioxidants (Basel)*. 2022; 11 (9): 1752. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11091752>
5. Wang J., Liu X. Correlation analysis between *Helicobacter pylori* infection status and tumor clinical pathology as well as prognosis of gastric cancer patients. *Iran J Public Health*. 2018; 47 (10): 1529–36.
6. Lin H.C., Chang Y., Chen R.Y., et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 upregulates autophagy and promotes viability in Hodgkin lymphoma: Implications for targeted therapy. *Cancer Sci*. 2021; 112 (4): 1589–602. DOI: <https://doi.org/10.1111/cas.14833>
7. Suzuki Y., Ito S., Nomura K. et al. Multiple Epstein-Barr virus-associated gastric cancers arising in a patient with autoimmune gastritis. *Intern Med*. 2022 Sep 28. DOI: <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.0673-22>
8. Kashyap D., Baral B., Jakhmola S., et al. *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus coinfection stimulates aggressiveness in gastric cancer through the regulation of gankyrin. *mSphere*. 2021; 6 (5): 0075121. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00751-21>
9. Zhang L., Sung J.J., Yu J., et al. Xenophagy in *Helicobacter pylori*- and Epstein-Barr virus-induced gastric cancer. *J Pathol*. 2014; 233 (2): 103–12. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4351> PMID: 24633785.
10. Cao Y., Luo Y., Zou J., et al. Autophagy and its role in gastric cancer. *Clin Chim Acta*. 2019; 489: 10–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.028>
11. Spirina L.V., Avgustinovich A.V., Afanas'ev S.G., et al. Molecular mechanism of resistance to chemotherapy in gastric cancers, the role of autophagy. *Curr Drug Targets*. 2020; 21 (7): 713–21. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389450120666191127113854>
12. Naseem M., Barzi A., Brezden-Masley C., et al. Outlooks on Epstein-Barr virus associated gastric cancer. *Cancer Treat Rev*. 2018; 66: 15–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.03.006>
13. Silva R., Gullo I., Carneiro F. The PD-1:PD-L1 immune inhibitory checkpoint in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: A comprehensive review and future perspectives. *Porto Biomed J*. 2016; 1 (1): 4–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2016.03.004>
14. Shen B., Qian A., Lao W., et al. Relationship between *Helicobacter pylori* and expression of programmed death-1 and its ligand in gastric intraepithelial neoplasia and early-stage gastric cancer. *Cancer Manag Res*. 2019; 11: 3909–19. DOI: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S203035>
15. Cyprian F.S., Al-Antary N., Al Moustafa A.E. HER-2/Epstein-Barr virus cross-talk in human gastric carcinogenesis: A novel concept of oncogene/oncovirus interaction. *Cell Adh Migr*. 2018; 12 (1): 1–4. DOI: <https://doi.org/10.1080/19336918.2017.1330244>
16. Algin E., Baykara M., Yilmaz G., et al. Is there any relationship between *Helicobacter pylori* infection and human epidermal growth factor receptor 2 expression in gastric cancer? *J Cancer Res Ther*. 2020; 16 (suppl): 128–32. DOI: [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_891\\_18](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_891_18)
17. Lin J.H., Tsai C.H., Chu J.S., et al. Dysregulation of HER2/HER3 signaling axis in Epstein-Barr virus-infected breast carcinoma cells. *J Virol*. 2007; 81 (11): 5705–13. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00076-07>
18. Wang G., Cheng Z., Liu F., et al. CREB is a key negative regulator of carbonic anhydrase IX (CA9) in gastric cancer. *Cell Signal*. 2015; 27 (7): 1369–79. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.019>
19. Spirina L., Avgustinovich A., Afanas'ev S., et al. PD-L1 status in gastric cancers, association with the transcriptional, growth factors, AKT/mTOR components change, and autophagy initiation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (20): 11176. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222011176>
20. Hu M., Zhu S., Xiong S., et al. MicroRNAs and the PTEN/PI3K/Akt pathway in gastric cancer (review). *Oncol Rep*. 2019; 41 (3): 1439–54. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2019.6962>
21. Nortunen M., Huhta H., Helminen O., et al. Carbonic anhydrases II, IX, and XII in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*. 2018; 473 (5): 567–75. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2424-z>
22. Xu J., Liu D., Niu H., et al. Resveratrol reverses Doxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017; 36 (1): 19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0487-8>
23. Chen Q., Xu X.Y., Hou X.X., Chen S.C. The upregulation of proteins light chain 3 and autophagy-related 5 and the occurrence of intestinal-type gastric cancer. *J Physiol Pharmacol*. 2021; 72 (6): 8. DOI: <https://doi.org/10.26402/jpp.2021.6.08>
24. Mommersteeg M.C., Simovic I., Yu B., et al. Autophagy mediates ER stress and inflammation in *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Gut Microbes*. 2022; 14 (1): 2015238. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2015238>



DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

УДК 616.9:612.017.1

Н.В. Аронова<sup>1</sup>, Н.В. Павлович<sup>1</sup>, М.В. Цимбалистова<sup>1</sup>, С.Н. Головин<sup>2</sup>, А.С. Анисимова<sup>1</sup>

## РОЛЬ ВЕЗИКУЛ НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ИММУНОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В обзоре проведен анализ литературы, посвященной современным представлениям о феномене везикуляции и его биологической роли у патогенных бактерий – возбудителей особо опасных инфекций человека. Обобщены данные о продукции, строении, композиционном составе и функциях везикул наружных мембран (OMV – outer membrane vesicles) бактерий. В последние годы резко возрос интерес исследователей к образованию сферических структур (так называемых пузырьков или везикул) из внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Такие структуры окружены двойным слоем фосфолипидной мембраны, внешний слой которой обогащен молекулами липополисахарида. Внутреннее пространство везикул может включать различные антигены, рецепторы, адгезины, токсины, ферменты, порины и др. Образование везикул наружными мембранами бактерий признано нормальным физиологическим проявлением жизнедеятельности бактерий, направленным на адаптацию к условиям окружающей среды. Изучение биологической роли OMV показало их связь с патогенезом и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы. В обзоре приведены сведения об особенностях индукции, композиционном составе OMV и их участии в процессах пато- и иммуногенеза тяжелых инфекций, обусловленных ПБА I–II групп – грамотрицательными возбудителями чумы, туляремии, бруцеллеза, сапа, мелиоидоза, холеры, а также о формировании экстрацеллюлярных везикул у грамположительного возбудителя сибирской язвы. Особое внимание в обзоре уделено проблеме разработки безопасных и эффективных вакцинных препаратов нового поколения на основе бактериальных везикул.

**Ключевые слова:** везикулы наружной мембраны, особо опасные инфекции, патогенез, иммуногенез, вакцины.

Корреспондирующий автор: Аронова Надежда Валентиновна, e-mail: info@tularemia.ru.

Для цитирования: Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Головин С.Н., Анисимова А.С. Роль везикул наружных мембран возбудителей особо опасных инфекций в патогенезе и иммуногенезе инфекционного процесса. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

Поступила 02.10.2020. Отправлена на доработку 09.11.2020. Принята к публ. 02.04.2021.

N.V. Aronova<sup>1</sup>, N.V. Pavlovich<sup>1</sup>, M.V. Tsimbalistova<sup>1</sup>, S.N. Golovin<sup>2</sup>, A.S. Anisimova<sup>1</sup>

## The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process

<sup>1</sup>Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

<sup>2</sup>Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** The literature review is devoted to the modern concepts of the vesiculation phenomenon and its biological role in pathogenic bacteria – causative agents of particularly dangerous human infections. Data on the production, structure, composition, and functions of the outer membrane vesicles (OMV) of bacteria have been summarized. In recent years, the interest of researchers in the formation of spherical structures (so called bubbles or vesicles) from outer membrane of gram-negative bacteria has significantly increased. Such structures are surrounded by the double layer of a phospholipid membrane, the outer layer of which is enriched with lipopolysaccharide molecules. The inner space of vesicles could include various antigens, receptors, adhesins, toxins, enzymes, porins, etc. The formation of vesicles by the outer membranes of bacteria is recognized as a normal physiological manifestation of bacterial activity aimed at adaptation to environmental conditions. The investigation of the biological role of OMV showed their connection with the pathogenesis and immunogenesis of bacterial diseases. The review provides information on the peculiarity of induction, OMV composition and their participation in the processes of patho- and immunogenesis of severe infections caused by groups I–II PBA – the gram-negative causative agents of plague, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis, cholera, and formation of extracellular vesicles in a gram-positive anthrax pathogen. The particular attention is paid to the issue of developing safe and effective next-generation vaccine preparations based on bacterial vesicles.

**Key words:** outer membrane vesicles, particularly dangerous infections, pathogenesis, immunogenesis, vaccines.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nadezda V. Aronova, e-mail: info@tularemia.ru.

Citation: Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Golovin S.N., Anisimova A.S. The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:6–15. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

Received 02.10.2020. Revised 09.11.2020. Accepted 02.04.2021.

Aronova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>  
Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>  
Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Golovin S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1929-6345>  
Anisimova A.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4010-2138>

Исследование патогенеза, иммуногенеза и факторов вирулентности возбудителей особо опасных болезней (ООИ) всегда являлось приоритетным направлением в изучении бактериальных инфекций. Однако, несмотря на достигнутые успехи, некоторые аспекты взаимодействия «паразит – хозяин» до сих пор остаются до конца не выясненными. Сложность изучения этих вопросов обусловлена тем, что вирулентность бактерий реализуется сложным действием целого набора детерминант, экспрессирующихся преимущественно *in vivo*. Большинство известных факторов вирулентности возбудителей особо опасных инфекций: чумы, туляремии, бруцеллеза, холеры и др. – в значительной мере связаны со строением и функциями поверхностных структур бактерий [1, 2]. Так, клеточная стенка бактерий участвует во многих метаболических и биосинтетических процессах, в трансформации энергии и активном транспорте веществ, выполняет рецепторную и барьерную функции. Более того, именно поверхностные структуры микробной клетки осуществляют первый этап взаимодействия с защитными факторами хозяина, модулируя их ответ и обеспечивая свое выживание в неблагоприятных условиях макроорганизма. У многих вирулентных бактерий компоненты наружных мембран ответственны за токсический эффект и развитие тяжелого инфекционного процесса, т.е. они играют важную роль в реализации патогенного потенциала возбудителей инфекционных заболеваний [3].

В последние годы резко возрос интерес исследователей к явлению отшнуровывания от внешней мембраны грамотрицательных бактерий так называемых «пузырьков» или везикул (OMV – outer membrane vesicles), которое в зарубежной литературе получило название «блеббинг». Впервые образование таких структур описано у кишечной палочки и возбудителя холеры в 1966–1967 гг. [4, 5]. В 1999 г. T.J. Beveridge опубликовал работу, где обобщил разрозненные данные и показал существование процесса везикуляции у широкого круга грамотрицательных бактерий [6]. Образование везикул наружной мембраны признали нормальным физиологическим проявлением жизнедеятельности бактерий, не связанным с их деградацией. Дальнейшее изучение биологической роли везикул наружных мембран показало их связь с пато- и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы [7–9]. Позже появились работы о наличии блеббинга и у грамположительных бактерий, что свидетельствует об универсальности этого явления для функционирования микробной клетки [10].

Как установлено, везикулы грамотрицательных бактерий представляют собой отпочковывающиеся во внешнюю среду участки наружной мембраны с захватом части периплазматического содержимого [8]. Такие структуры окружены двойным слоем фосфолипидной мембраны, внешний слой которой обога-

щен молекулами липополисахарида (ЛПС). Кроме того, как в составе мембраны, так и во внутреннем пространстве везикулы могут содержать биологически активные молекулы, например различные антигены, токсины, ферменты, порины, адгезины и рецепторы [7, 11]. Ранее считалось, что OMV несут только компоненты мембран и содержимое периплазматического пространства, однако позднее было обнаружено, что в «пузырьках» могут находиться цитоплазматические белки, а также РНК и ДНК микроба [12].

Отделившись от бактериальной клетки, везикулы служат транспортными средствами для передачи факторов колонизации, патогенности и модуляции защитного ответа хозяина. Как показано, OMV осуществляют доставку токсинов к клеткам-мишеням, что является мощным механизмом вирулентности [13]. Преимущества такой системы секреции разнообразны и направлены на максимальную колонизацию экологической ниши, будь то организм хозяина, условия микробного сообщества или окружающей среды. В частности, везикулы создают защиту белковым компонентам (бактериальным ферментам или токсинам) от действия внешних протеаз чужеродного происхождения. Во-вторых, содержимое OMV представляет собой концентрированную форму факторов бактериальной клетки в их нативной конформации и окружении, формируя паттерны биологически активных молекул (PAMPs), что существенно повышает эффективность их воздействия. В-третьих, бактерии могут дистанционно воздействовать на среду обитания, без непосредственного присутствия в точке взаимодействия, что энергетически более выгодно, увеличивает скорость колонизации и обеспечивает большую устойчивость патогена к факторам неспецифической защиты хозяина. Наконец, присутствие на поверхности везикул рецепторов или адгезинов позволяет осуществлять адресное взаимодействие со специфическими мишенями [11].

Образование везикул является регулируемым индуцибельным процессом, направленным на выживание и адаптацию бактерий к изменяющимся условиям среды. При возникновении стрессовых воздействий (обедненная питательная база, изменение температуры, защита от фагов и антимикробных веществ, агрессивная среда макроорганизма) микробы отвечают повышением уровня везикуляции [7]. Следует обратить особое внимание, что при одинаковых условиях у патогенных бактерий процесс везикуляции идет более интенсивно по сравнению с непатогенными микроорганизмами. Так, энтеротоксигенная *Escherichia coli* (ETEC) продуцирует примерно в 10 раз больше везикул, чем непатогенная кишечная палочка [14]. Лейкотоксичные штаммы *Actinobacillus actinomycetemcomitans* образуют в 25 раз больше везикул, чем нелейкотоксичные [15].

Согласно экспериментальным данным некоторых исследователей, в макроорганизме бактерии с гипервезикуляцией имеют существенные преимущества в выживаемости [7].

С помощью формирования и высвобождения везикул из бактериальной клетки значительно возрастает способность патогена к преодолению механизмов природного и адаптивного иммунитета хозяина. Например, связывание нормальных или специфических антител везикулами при инфекционном процессе сопровождается уменьшением опсонизации живых микробов, что приводит к увеличению их резистентности к бактерицидному действию сыворотки и снижению эффективности фагоцитоза [7]. Взаимодействие OMV с клетками хозяина может подавлять нормальный или индуцировать патологический цитокиновый ответ на внедрение инфекционного агента, обеспечивая ему благоприятные условия для пролиферации и приживания в тканях-мишенях [7, 13].

Как установлено, биологическая активность везикул определяется их композиционным составом, который, в свою очередь, зависит как от вида микроорганизма, так и от условий их образования (макроорганизма, питательные среды с различным составом и др.) [7]. Интересно, что бактериальная клетка может варьировать включением тех или иных компонентов в везикулы, обеспечивая либо усугубление тяжести течения инфекционного процесса, либо индукцию выраженного иммунного ответа. Например, фракция ЛПС в составе везикул может обладать повышенным токсическим потенциалом по сравнению с ЛПС бактериальной клетки. В литературе описаны как модификация химической структуры везикулярных ЛПС, так и избирательные включения в OMV более токсичной субпопуляции молекул липополисахарида [7]. Кроме того, «пузырьки» содержат более высокую концентрацию биополимера, являясь как ключевыми источниками ЛПС для активации воспаления, так и «приманками», связывающими растворимые факторы защиты макроорганизма [7, 13]. Показано также, что они могут уменьшать уровень мембраносвязанной экспрессии CD14 на поверхностях макрофагов, приводя к снижению их способности запускать продукцию цитокинов, т.е. непосредственно участвовать в патогенезе инфекции [13].

Разнообразный набор антигенов белковой и липополисахаридной природы, которые несут в себе везикулы, может индуцировать адаптивный иммунитет (образование специфических антител, активацию клеток иммунологической памяти и т.д.). В связи с этим в настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию вакцин на основе бактериальных OMV. Везикулярные препараты обладают еще рядом преимуществ: биобезопасность, внутренняя адьювантность, представление антигенов в максимально нативной конформации и отсутствие воздействия на микробиоту хозяина [16]. Иллюстрацией успехов в этом направлении является разработка и

внедрение в клиническую практику везикулярной вакцины против менингококков [17].

Таким образом, анализ данных литературы убедительно свидетельствует о важном вкладе везикул бактерий в патогенез и иммуногенез инфекционного процесса. В связи с этим актуальным является изучение данного явления у возбудителей особо опасных инфекций человека, многие факторы вирулентности которых до настоящего времени не идентифицированы.

**Холера.** Наибольшее количество исследований блеббинга у возбудителей особо опасных инфекций относятся к возбудителю холеры – *Vibrio cholerae*. Как уже упоминалось, еще в 1967 г. S.N. Chatterjee и J. Das с помощью электронной микроскопии обнаружили многочисленные выпячивания мембраны у холерных вибрионов и присутствие отпочкованных от мембраны сферических мешочков (sac-like structures) диаметром преимущественно 600–800 Å [5]. Авторы предположили, что этот процесс является секреторным механизмом *V. cholerae* и связан с выделением холерного токсина. В настоящее время установлено, что такие факторы вирулентности холерного вибриона, как холерный токсин и гемолизин, выделяются бактериальной клеткой как в свободном виде через систему секреции 2-го типа, так и ассоциированными с везикулами наружной мембраной [18–20]. Эти способы доставки токсина к мишеням не являются конкурентными, так как реализуются разными механизмами взаимодействия с рецепторами организма хозяина. С помощью OMV *V. cholerae* секретирует и другие биологически активные протеазы, которые могут играть роль в цитотоксических и воспалительных реакциях [21, 22]. Система выделения факторов агрессии с помощью везикул позволяет снизить реакцию макроорганизма на биологически активные молекулы живой микробной клетки, обеспечивая ей преимущества в выживании *in vivo*. Так, например, OMV *V. cholerae* (в том числе и несущие цитолизин) индуцируют продукцию микроРНК miR-146a, которая подавляет реакции врожденного иммунного ответа и предотвращает развитие воспаления в слизистой оболочке кишечника. В противоположность этому, свободная форма токсина, наоборот, выражено стимулирует образование воспалительных факторов, таких как интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-α (TNF-α), CCL20, IL-1β и IRAK2в [23]. Помимо детерминант вирулентности, OMV холерного вибриона содержат белки с другими биологическими функциями: способствующие росту бактериальных клеток, участвующие в кишечной колонизации у кроликов и в образовании матрицы биопленки, а также различные субстраты секреторной системы 2-го типа [24]. OMV *V. cholerae* несут в себе также молекулы ЛПС и РНК [25]. T. Song *et al.* (2008) установили, что процесс формирования везикул у возбудителя холеры может регулироваться посредством малой РНК, получившей название VrgA (*Vibrio regulatory RNA of OmpA*), которая активирована в от-



вет на стресс бактериальной оболочки [26]. Действие этой регуляторной мРНК направлено на подавление производства белка OmpA, что приводит к повышению продукции везикул у холерного вибриона. Другая группа исследователей (F.G. Zingl *et al.*, 2020) установила, что на ранней стадии инфекции у млекопитающих происходит подавление транспортера фосфолипидов VacJ/Yrb, приводящее к стимуляции блеббинга *V. cholerae*. Гипервезикуляция позволяет быстро изменить состав бактериальной мембраны, накапливая в ней модифицированный глицином липополисахарид (ЛПС) и уменьшая количество порина OmpT. Такая адаптация повышает устойчивость бактерий к антимикробным пептидам и желчи, что способствует колонизации кишечника хозяина [27].

Важной функцией везикул холерного вибриона является также их участие в образовании биопленки [28]. Однако роль OMV в экологии *V. cholerae* этим не исчерпывается. Известно, что холерные вибрионы способны выживать и размножаться симбиотически в водной свободноживущей амебе *Acanthamoeba castellanii*, которая может выполнять функцию хозяина для *V. cholerae* в окружающей среде [29]. Согласно данным S.P. Valeru *et al.* (2014), гипервезикулирующий мутант *V. cholerae* с нарушенным синтезом белка A (OmpA) наружной мембраны не только достоверно увеличивал выживание вибрионов при совместном культивировании с амебами, но и подавлял жизнеспособность *A. castellanii*, даже при их обработке бесклеточной везикулярной фракцией. Таким образом, OMV могут являться фактором вирулентности для простейших [30]. Кроме того, показано, что везикулы *V. cholerae* могут играть роль ловушек и защищать бактерии от лизиса фагами [31].

Анализ результатов исследований везикул *V. cholerae* позволил определить новое перспективное направление – создание на их основе вакцинного препарата. Активная работа ученых в этой области принесла несомненные успехи. Например, доказано, что иммунизация мышей везикулами наружной мембраны вызывает у них длительный иммунитет, полностью защищающий от повторного заражения [32, 33]. Установлено, что протективные антители после иммунизации везикулярной вакциной направлены против O-антигена и обеспечивают подавление подвижности вибрионов. Интересно отметить, что для ограничения моторики вибрионов требовались именно антители типа G [34]. В настоящее время продолжается работа по поиску способов снижения нежелательных эффектов OMV-вакцины *V. cholerae*. Как уже обнаружено, обработка препарата ретиноидной кислотой уменьшала токсические и воспалительные реакции на везикулярную вакцину, но не влияла на ее иммуногенность [35].

**Чума.** В отличие от холерного вибриона, данные о роли везикуляции в жизнедеятельности других возбудителей особо опасных инфекций весьма ограничены. Возможно, это объясняется трудностями изучения внутриклеточных инфекционных агентов,

которыми являются возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза. Например, только относительно недавно описана продукция везикул наружной мембраны у чумного микроба [36, 37]. Как оказалось, *Yersinia pestis* образует везикулы со средним размером около 100 нм, содержащие связанные с вирулентностью белки наружной мембраны, в том числе адгезин Ail, внешний фимбриальный F1-антиген и каталитически активную протеазу Pla, которая способна активировать плазминоген и деградацию  $\alpha 2$ -антиплазмина [37]. J.L. Eddy *et al.* (2014) показали, что количество белков, ассоциированных с OMV, высвобождаемых *Y. pestis*, значительно повышается при 37 °C по сравнению с 26 °C, а также увеличивается в ответ на мембранный стресс и мутации в генах, кодирующих RseA, Hfq и липопротеин Брауна (Lpp). Кроме того, авторы показали, что OMV *Y. pestis* способны связываться с компонентами внеклеточного матрикса, такими как фибронектин и ламинин. Эти данные предполагают, что *Y. pestis* может продуцировать OMV во время инфекции млекопитающих, а секреция Pla через высвобождение OMV способна оказывать влияние на исход инфекции посредством взаимодействий с такими субстратами Pla, как плазминоген и лиганд Fas [37]. Установлено также достоверное повышение везикуляции у чумного микроба при воздействии таких неблагоприятных факторов, как бактериофаг Покровской и гентамицин [38].

В настоящее время проводятся исследования по созданию на основе везикул противочумного вакцинного препарата [39, 40]. Одна из вакцин разрабатывается на основе высокостабильных микровезикул безвредной комменсальной бактерии человека *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt). Рекомбинантный штамм Bt специально сконструирован для экспрессии основных протективных антигенов возбудителя чумы – фракции 1 (F1) и LcrV (V-антигена). Исследователи показали, что везикулы полученного штамма Bt стабильно содержали F1 в мембранном слое и V-антиген в их просвете. Более того, антигены представлены в активной иммуногенной форме, так как введение вакцинных OMV интраназально приматам (*Macaca fascicularis*) вызвало нарастание титра специфических иммуноглобулинов IgG в крови и IgA в верхних и нижних дыхательных путях. Пул выявленных антител содержал фракцию, обладающую бактерицидными свойствами в отношении *Y. pestis*. Вакцинный препарат также характеризовался высокой стабильностью, термостойкостью и возможностью безыгольной доставки [39]. Другим перспективным вакцинным кандидатом является препарат везикул из мутантного гипервезикулирующего штамма чумного микроба, содержащего адьювантный малотоксичный липид A (монофосфорил липид A, MPLA). Помимо этого, авторы повысили иммуногенность мутанта с помощью введения плазмидного вектора, повышающего продукцию LcrV-антигена *Y. pestis* и уменьшающего количество



мышинного токсина и активатора плазминогена Pla. Вакцинация OMV, содержащими MPLA и повышенное количество LcrV, стимулировала клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также обеспечивала полную защиту мышей от подкожного заражения  $8 \cdot 10^5$  КОЕ и интраназального заражения вирулентным *Y. pestis*  $5 \cdot 10^3$  КОЕ [40].

**Туляремия.** *Francisella tularensis* является возбудителем тяжелого заболевания широкого круга хозяев, включая человека. Однако, несмотря на многолетние исследования, вопросы высокой патогенности туляремиального микроба открыты, а факторы вирулентности не идентифицированы. До настоящего времени остается проблемным вопрос о том, что при скудной обсемененности организма кролика животные погибают от заражения 1 м.к. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*nearctica*) [41]. В связи с этим одним из подходов к решению проблемы может быть выяснение роли везикул туляремиального микроба в патогенезе и иммуногенезе туляремиальной инфекции. Большинство исследований везикул франциселл выполнены на слабопатогенном подвиде *F. tularensis* subsp. *novicida* или вакцинном штамме *F. tularensis* [42–44]. Отличительной особенностью продукции везикул туляремиального микроба является наличие двух видов OMV. Показано, что бактерии формируют не только сферические OMV, характерные для многих микробов, но и нетипичные палочковидные структуры, обозначаемые как tubes. Биологическая роль этих образований в настоящее время точно не установлена, однако, предположительно, они могут играть роль при взаимодействии с клетками хозяина [43]. Результаты наших экспериментов по изучению продукции везикул возбудителем туляремии при различных условиях культивирования (питательные среды, температура выращивания) подтвердили образование у *F. tularensis* мембранных образований в виде сфер и трубочек.

Согласно данным W.D. McCaig *et al.* (2013), процесс образования везикул у франциселл и их состав являются регулируемые и зависят от фазы роста культуры, среды выращивания, наличия клеток хозяина и других факторов [43]. Исследования регуляции образования OMV показали, что дефицит цистеина и других незаменимых аминокислот приводит к повышенному блеббингу, тогда как гиповезикулирующие мутанты являются дефектными в ответе на этот сигнал. Таким образом, аминокислотное голодание, с которым сталкивается франциселла во время инвазии в клетке хозяина, может регулировать выработку этих мембранных структур [45]. Интересные данные получены С. Siebert *et al.* (2019), которые обнаружили, что нарушение утилизации железа (делеция в гене *fupA/B*, кодирующим Fer-Utilization Protein) приводит к повышенному образованию везикул и резистентности к фторхинолонам и гентамицину как у мутанта вакцинного штамма (*F. tularensis* LVS), так и у мутанта высоковирулентного штамма subsp. *tularensis* Schu [46]. На модели дефектного по

утилизации железа штамма LVS авторы показали, что везикулы являются ключевым элементом формирования биопленки, которая и обеспечивает, по их мнению, антибиотикоустойчивость к хинолонам и, возможно, персистенцию возбудителя [46]. OMV туляремиального микроба содержат большое количество биологически активных молекул: ЛПС, различные ферменты, а также белки, участвующие в процессах патогенеза и выживания внутри клеток хозяина [42, 43, 47]. Например, липаза FtlA *F. tularensis* с доказанной ролью в инфицировании клеток хозяина *in vivo* секретируется во внеклеточную среду как компонент везикул наружной мембраны [47]. При дальнейшем анализе с помощью электронной микроскопии установлено, что FtlA-содержащие OMV прикреплены к мембране клетки-хозяина. Эти данные свидетельствуют о том, что липаза FtlA способствует адгезии и проникновению *F. tularensis* внутрь клеток макроорганизма [47]. Важная роль везикул в развитии патогенеза туляремиальной инфекции продемонстрирована в опубликованной в 2019 г. работе J. Klimentova *et al.* [48]. При моделировании условий среды макроорганизма во время воспаления (высокая температура и низкий pH) авторы наблюдали у клинического изолята *F. tularensis* subsp. *holarctica* увеличение в несколько раз скорости образования везикул и значительное изменение содержания белка. Протеомный анализ показал, что в композиции белков, избирательно включенных в состав везикул в ответ на стрессовые условия, присутствуют известные факторы вирулентности *F. tularensis*, связанные с внутриклеточным переносом этих бактерий. Выявленные изменения также наблюдались в количестве белков, участвующих в биосинтезе и метаболизме структурных компонентов ЛПС (О-антигена, липида А), фосфолипидов и жирных кислот [48].

В настоящее время предпринимаются попытки получения бесклеточной туляремиальной везикулярной вакцины, где в качестве продуцента предложен гипervезикулирующий мутант *E. coli*, в который рекомбинирован 17-kb кластер генов от *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А) Schu S4 [49]. Авторами получены везикулы, несущие на своей поверхности О-полисахарид туляремиального микроба, который является как фактором вирулентности туляремиального микроба, так и специфическим антигеном, индуцирующим В-клеточный ответ. Иммунизация мышей BALB/c препаратом вызывала индукцию сывороточных антител IgG и IgA дыхательного тракта, специфичных к О-полисахариду *F. tularensis*. Более того, зарегистрированы увеличение средней продолжительности жизни животных при заражении *F. tularensis* Schu S4 и полная защита при заражении вакцинным штаммом [49].

**Бруцеллез.** Везикулы у бруцелл впервые были обнаружены С. Gamaso *et al.* в 1987 г. [50], однако роль OMV в жизнедеятельности этих микроорганизмов до сих пор изучена недостаточно. Так, в диссертационной работе М.М. Сальниковой (2013) показа-

но, что в ответ на действие тетрациклина вакцинный штамм *Brucella abortus* 82 отвечает повышенной везикуляцией, позволяющей ему приспособиться к негативному воздействию антибиотика и сохранить жизнеспособность. Имеются данные о том, что кроме адаптации к факторам внешней среды везикулы *B. abortus* способствуют интернализации бактерий в человеческие моноциты и подавляют их врожденный иммунный ответ, что, несомненно, способствует длительной персистенции бруцелл в клетках хозяина [51]. Некоторые исследователи предполагают, что везикулы наружной мембраны могут участвовать в проявлении гестационных осложнений бруцеллеза [52].

При изучении композиционного состава ОМВ бруцелл с помощью протеомного анализа показано наличие в их составе широкого спектра известных белков-иммуногенов [53]. Установлена также важная роль включения полноценного ЛПС в состав везикул, что обеспечивает им устойчивость к агрессивным факторам среды и сохранение иммуногенного потенциала ОМВ [54]. Разным исследовательским группам удалось доказать, что везикулы как *B. melitensis*, так и *B. abortus* стимулировали индукцию иммунных реакций у мышей: пролиферативный ответ и продукцию IFN $\gamma$  спленоцитами, выработку высоких титров специфических антител, реакции клеточного иммунитета и протекцию от заражения вирулентными штаммами [55–57]. Поэтому ОМВ бруцелл являются перспективными кандидатами для создания противобруцеллезной вакцины.

**Сап и мелиоидоз.** *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* – возбудители таких тяжелых заболеваний человека, как сап и мелиоидоз, патогенетические особенности которых изучены недостаточно. В последние годы появились работы, посвященные изучению процессов везикуляции у этих бактерий. Как установлено, везикулы *B. pseudomallei* имеют размер от 50 до 250 нм и содержат ЛПС, капсульный полисахарид и разнообразные белки, в том числе и иммуногенные [58], что дало основания рассматривать их в качестве вакцинных кандидатов. В настоящее время не существует лицензированной вакцины против сапа и мелиоидоза, поэтому ее разработка весьма актуальна. Результаты экспериментов продемонстрировали, что иммунизация мышей и макак-резусов везикулами *B. pseudomallei* индуцирует выработку у них специфических защитных антител и клеточного иммунитета, а также обеспечивает значительную защиту мышей от аэрозольного заражения и остро-летального сепсиса [59, 60]. На модели макак-резусов было продемонстрировано, что везикулярная вакцина, стимулируя выработку специфических антител, не обладает токсичностью и реактогенностью для лабораторных животных [61]. Более того, иммунизация ОМВ возбудителя мелиоидоза давала защиту у мышей и нечеловекообразных приматов против аэрозольного заражения близкородственным патогеном *B. mallei* – возбудителем сапа [62]. В качестве вакцины против

*B. mallei* исследованы также ОМВ из аттенуированных штаммов другого близкородственного микроба – *B. thailandensis*. Полученный везикулярный препарат оказался наиболее перспективным даже по сравнению с везикулами *B. pseudomallei*. Он вызывал наибольший антительный ответ и обеспечивал полную протекцию мышей от аэрозольной инфекции [63].

**Сибирская язва.** Долгое время считалось, что способностью к продукции везикул обладают только грамотрицательные бактерии. Однако в последние годы появляется все больше работ, посвященных изучению внеклеточных образований у грамположительных бактерий. Они имеют в своей основе другой биогенез и строение, но выполняют аналогичные функции [10]. Так, экстрацеллюлярные везикулы (EV) возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) имеют двойную мембрану и диаметр от 50 до 150 нм [64]. Авторы установили, что эти образования могут включать компоненты токсина и антролизин. Более того, токсинсодержащие везикулы визуализированы и внутри макрофагов, инфицированных *B. anthracis*. Это может свидетельствовать в пользу их участия в патогенезе инфекционного процесса. На основе EV сибиреязвенного микроба предпринята попытка разработки везикулярной вакцины. Показано, что иммунизация мышей везикулярным препаратом эффективно индуцировала у них продукцию IgM и удлиняла среднюю продолжительность жизни после заражения *B. anthracis* Sterne strain [64].

Таким образом, одним из подходов к пониманию некоторых нерешенных проблем инфектологии может явиться изучение везикулярного аппарата патогенных бактерий и его роли в пато- и иммуногенезе инфекционных заболеваний. Это исследовательское направление, на наш взгляд, обладает большим научным потенциалом. Анализ данных литературы показывает, что везикулы обеспечивают бактериям условия, предохраняющие их от воздействия защитных механизмов хозяина. На примере многих бактерий показано, что процесс везикуляции является общебиологическим и интенсифицируется в макроорганизме. Нельзя исключить, что именно везикулы являются триггером развития инфекции, принимая на себя первый удар мощных факторов природного иммунитета хозяина. В частности, адсорбируя на себе нормальные иммуноглобулины сыворотки крови, ОМВ снижают бактерицидное действие мембраноатакующего комплекса сыворотки на живую микробную клетку и эффективность ее фагоцитоза. Модулируя иммунные реакции, везикулы могут подавлять цитокиновый ответ и определять беспрепятственную диссеминацию бактерий к тканям-мишеням. Как известно, возбудители особо опасных инфекций человека обладают выраженной цитокинингибирующей активностью, что позволяет им уклоняться от неспецифической защиты хозяина на первых этапах инфекции. На более поздних эта-



пах везикулы могут участвовать в развитии «цитокинетического хаоса». Запуск везикулами необратимого каскада патологических реакций, возможно, в некоторых случаях объясняет слабую эффективность этиотропной терапии даже при использовании антибактериальных препаратов, активных в отношении патогена.

Особое место в исследованиях везикул занимает оценка перспективности их использования в качестве вакцинных кандидатов. Уже имеются данные об успешном клиническом применении везикулярной вакцины против менингококков. Экспериментальные испытания на биологических моделях ОМВ-препаратов из различных бактерий, включая возбудителей ООИ, продемонстрировали их безопасность и выраженные протективные свойства. Таким образом, доказана целесообразность дальнейших исследований по созданию вакцин нового поколения на основе везикул наружных мембран.

В то же время многие вопросы о везикуляции у бактерий, особенно патогенных, остаются открытыми. В первую очередь это относится к композиционному составу и его влиянию на биологические свойства везикул. Например, при каких внешних условиях везикулы обогащены протективными антигенами или токсическими субстанциями. Недостаточно изучен вопрос о различиях в процессе везикуляции у вирулентных и авирулентных штаммов возбудителей инфекций человека. В настоящее время очевидно, что биология микробной клетки *in vitro* и *in vivo* существенно отличается. При этом установлено, что образование ОМВ наиболее интенсивно идет в организме хозяина, что создает определенные трудности в изучении феномена. В связи с этим поиск экспериментальных моделей, наиболее приближенных к макроорганизму, является актуальным, а исследование везикулярного аппарата патогенных бактерий – перспективным.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### Список литературы

- Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.
- Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 3:33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
- Livorsi D.J., Stenehjem E., Stephens D.S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol.* 2011; 17:31–47. DOI: 10.1159/000324008.
- Knox K.W., Vesik M., Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(4): 1206–17. DOI: 10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966.
- Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 49(1):1–11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1.
- Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999; 181(16):4725–33. DOI: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.
- Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
- Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
- Луста К.А., Кондашевская М.В. Участие внеклеточных мембранных нановезикул бактерий в патологических процессах. *Вестник новых медицинских технологий.* Электронное издание. 2019; 2. Публикация 3–5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-2/3-5.pdf> (дата обращения 03.04.2019). DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
- Шендеров Б.А., Сеница 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; 7:118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
- Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
- Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8813. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
- Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
- 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.
- Lai C.H., Listgarten M.A., Hammond B.F. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1981; 16(4):379–89. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00989.x.
- Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
- Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
- Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106731. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
- Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
- Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel).* 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
- Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Duperthuy M., Johnson T.L., Åhlund M., Lundmark R., Oscarsson J., Sandkvist M., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
- Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
- Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
- Altindis E., Fu Y., Mekalanos J.J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(15):E1548–56. DOI: 10.1073/pnas.1403683111.
- Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci. Rep.* 2015; 5:15329. DOI: 10.1038/srep15329.
- Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
- Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonnington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
- Fong J.N.C., Yildiz F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
- Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.

30. Valeru S.P., Shanan S., Alossimi H., Saeed A., Sandström G., Abd H. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Microbiol.* 2014; 2014:610190. DOI: 10.1155/2014/610190.
31. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
32. Adriani R., Mousavi Gargari S.L., Nazarian S., Sarvary S., Noroozi N. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles secreted at various environmental conditions. *Vaccine.* 2018; 36(2):322–30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.004.
33. Sedaghat M., Siadat S.D., Mirabzadeh E., Keramati M., Vaziri F., Shafiei M., Shahcheraghi F. Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(3):212–9.
34. Wang Z., Lazinski D.W., Camilli A. Immunity provided by an outer membrane vesicle cholera vaccine is due to O-antigen-specific antibodies inhibiting bacterial motility. *Infect. Immun.* 2016; 85(1):e00626–16. DOI: 10.1128/IAI.00626-16.
35. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., Mitra S., Das S., Koley H. Retinoic acid pre-treatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine.* 2017; 35(28):3534–47. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.036.
36. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
37. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
38. Дудина Л.Г., Малкова М.А., Чернядьев А.В., Литвинцев С.Г., Бывалов А.А. Влияние специфических бактериофагов и гентамицина на морфологию и везикулообразование бактерий *Yersinia pestis* EV. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 2:50–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54.
39. Carvalho A.L., Miquel-Clopés A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(3):287–304. DOI: 10.1111/cei.13301.
40. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuncting bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2020; 88(5):e00081-20. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.
41. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П., редакторы. Туляремия. М.: Медгиз; 1960. 460 с.
42. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
43. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
44. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.
45. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
46. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J., Sjöstedt A., Maurin M., Brochier-Armanet C., Couté Y., Renesto P. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):808–22. DOI: 10.1080/22221751.2019.1615848.
47. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K.M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.-R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):c66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
48. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fcimb.2019.02304.
49. Chen L., Valentine J.L., Huang C.J., Endicott C.E., Moeller T.D., Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Boll J.M., Rosenthal J.A., Dobruchowska J., Wang Z., Heiss C., Azadi P., Putnam D., Trent M.S., Jones B.D., DeLisa M.P. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(26):E3609–18. DOI: 10.1073/pnas.1518311113.
50. Gamazo C., Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 1987; 55(3):609–15. DOI: 10.1128/IAI.55.3.609-615.1987.
51. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214.
52. Zavattieri L., Ferrero M.C., Alonso Paiva I.M., Sotelo A.D., Canellada A.M., Baldi P.C. *Brucella abortus* proliferates in decidualized and non-decidualized human endometrial cells inducing a proinflammatory response. *Pathogens.* 2020; 9(5):369. DOI: 10.3390/pathogens9050369.
53. Avila-Calderón E.D., Lopez-Merino A., Jain N., Peralta H., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493.
54. Avila-Calderón E.D., Medina-Chávez O., Flores-Romo L., Hernández-Hernández J.M., Donis-Maturano L., López-Merino A., Arellano-Reynoso B., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front Microbiol.* 2020; 11:556795. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.
55. Kaur G., Singh S., Sunil Kumar B.V., Mahajan K., Verma R. Characterization and immunogenicity of outer membrane vesicles from *Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(3):261–72. DOI: 10.1080/15321819.2015.1132231.
56. Bagheri Nejad R., Yahyaeyat R., Es-Haghi A., Nayeri Fasayi B., Zahraei Salehi T. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.* 2019; 127(12):797–804. DOI: 10.1111/apm.12997.
57. Golshani M., Amani M., Amirzadeh F., Nazeri E., Dayar Siadat S., Nejadi-Moheimani M., Arsang A., Bouzari S. Evaluation of Poly(I:C) and combination of CpG ODN plus Montanide ISA adjuvants to enhance the efficacy of outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Brucella melitensis* infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 84:106573. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106573.
58. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Höner zu Bentrop K., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14361. DOI: 10.1371/journal.pone.0014361.
59. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J., Aucoin D.P., McLachlan J.B., Roy C.J., Morici L.A. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine.* 2011; 29(46):8381–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.058.
60. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(5):747–54. DOI: 10.1128/CVI.00119-14.
61. Petersen H., Nieves W., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Proceedia Vaccinol.* 2014; 8:38–42. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.007.
62. Baker S.M., Davitt C.J.H., Motyka N., Kikendall N.L., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides cross protection against inhalational glanders in mice and non-human primates. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4):49. DOI: 10.3390/vaccines5040049.
63. Norris M.H., Khan M.S.R., Chirakul S., Schweizer H.P., Tuanyok A. Outer membrane vesicle vaccines from biosafe surrogates prevent acute lethal glanders in mice. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(1):5. DOI: 10.3390/vaccines6010005.
64. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44):19002–7. DOI: 10.1073/pnas.1008843107.

References

1. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.

2. Podladchikova O.N. [Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis]. *Problemy Osobo Opasnykh*



- Infeksii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
3. Livorsi D.J., Stenehjem E., Stephens D.S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol.* 2011; 17:31–47. DOI: 10.1159/000324008.
  4. Knox K.W., Veski M., Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(4): 1206–17. DOI: 10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966.
  5. Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 49(1):1–11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1.
  6. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999; 181(16):4725–33. DOI: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.
  7. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
  8. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
  9. Lusta K.A., Kondashevskaya M.V. [Participation of extracellular membrane nanovesicles of bacteria in pathological processes]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii. [Bulletin of New Medical Technologies]*. Electronic edition. 2019; 2. Publication 3–5. (Cited 03 Apr 2019). [Internet]. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-2/3-5.pdf>. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
  10. Shenderov B.A., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M., Tkachenko E.I. [Extracellular vesicles (exosomes) and their role in bacterial biology and the realization of their pathogenic potential]. *Ekspieriment'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya [Experimental and Clinical Gastroenterology]*. 2020; 7:118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
  11. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
  12. Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8813. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
  13. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
  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. Lai C.H., Listgarten M.A., Hammond B.F. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1981; 16(4):379–89. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00989.x.
  16. Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
  17. Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms*. 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
  18. Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytotoxin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106731. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
  19. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
  20. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
  21. Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Dupertuy M., Johnson T.L., Åhlund M., Lundmark R., Oscarsson J., Sandkvist M., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
  22. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
  23. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
  24. Altindis E., Fu Y., Mekalanos J.J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(15):E1548–56. DOI: 10.1073/pnas.1403683111.
  25. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci. Rep.* 2015; 5:15329. DOI: 10.1038/srep15329.
  26. Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
  27. Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonnington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
  28. Fong J.N.C., Yildiz F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
  29. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.
  30. Valeru S.P., Shanan S., Alossimi H., Saeed A., Sandström G., Abd H. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Microbiol.* 2014; 2014:610190. DOI: 10.1155/2014/610190.
  31. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
  32. Adriani R., Mousavi Gargari S.L., Nazarian S., Sarvary S., Noroozi N. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles secreted at various environmental conditions. *Vaccine.* 2018; 36(2):322-30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.004.
  33. Sedaghat M., Siadat S.D., Mirabzadeh E., Keramati M., Vaziri F., Shafiei M., Shahcheraghi F. Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(3):212–9.
  34. Wang Z., Lazinski D.W., Camilli A. Immunity provided by an outer membrane vesicle cholera vaccine is due to O-antigen-specific antibodies inhibiting bacterial motility. *Infect. Immun.* 2016; 85(1):e00626–16. DOI: 10.1128/IAI.00626-16.
  35. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., Mitra S., Das S., Koley H. Retinoic acid pre-treatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine.* 2017; 35(28):3534–47. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.036.
  36. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
  37. Eddy J.L., Gelda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
  38. Dudina L.G., Malkova M.A., Chernyad'ev A.V., Litvinets S.G., Byvalov A.A. [Effect of bacteriophages and gentamycin on morphology and vesicle formation of bacteria]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (2):50-4. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54.
  39. Carvalho A.L., Miquel-Clopés A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S.R., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(3):287–304. DOI: 10.1111/cei.13301.
  40. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-advantaging bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2020; 88(5):e00081-20. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.
  41. Olsuf'ev N.G., Rudnev G.P., editors. [Tularemia]. Moscow: "Medgiz"; 1960. 460 p.
  42. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
  43. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
  44. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.

45. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
46. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J., Sjöstedt A., Maurin M., Brochier-Armanet C., Couté Y., Renesto P. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and bio-film formation. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):808–22. DOI: 10.1080/22221751.2019.1615848.
47. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K. M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.-R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FliA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):c66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
48. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304.
49. Chen L., Valentine J.L., Huang C.J., Endicott C.E., Moeller T.D., Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Boll J.M., Rosenthal J.A., Dobruchowska J., Wang Z., Heiss C., Azadi P., Putnam D., Trent M.S., Jones B.D., DeLisa M.P. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(26):E3609–18. DOI: 10.1073/pnas.1518311113.
50. Gamazo C., Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 1987; 55(3):609–15. DOI: 10.1128/IAI.55.3.609-615.1987.
51. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214.
52. Zavattieri L., Ferrero M.C., Alonso Paiva I.M., Sotelo A.D., Canellada A.M., Baldi P.C. *Brucella abortus* proliferates in decidualized and non-decidualized human endometrial cells inducing a proinflammatory response. *Pathogens.* 2020; 9(5):369. DOI: 10.3390/pathogens9050369.
53. Avila-Calderón E.D., Lopez-Merino A., Jain N., Peralta H., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493.
54. Avila-Calderón E.D., Medina-Chávez O., Flores-Romo L., Hernández-Hernández J.M., Donis-Maturano L., López-Merino A., Arellano-Reynoso B., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front Microbiol.* 2020; 11:556795. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.
55. Kaur G., Singh S., Sunil Kumar B.V., Mahajan K., Verma R. Characterization and immunogenicity of outer membrane vesicles from *Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(3):261–72. DOI: 10.1080/15321819.2015.1132231.
56. Bagheri Nejad R., Yahyaraeyat R., Es-Haghi A., Nayeri Fasayi B., Zahraei Salehi T. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.* 2019; 127(12):797–804. DOI: 10.1111/apm.12997.
57. Golshani M., Amani M., Amirzadeh F., Nazeri E., Davar Siadat S., Nejati-Moheimani M., Arsang A., Bouzari S. Evaluation of Poly(I:C) and combination of CpG ODN plus Montanide ISA adjuvants to enhance the efficacy of outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Brucella melitensis* infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 84:106573. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106573.
58. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Höner zu Bentrup K., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14361. DOI: 10.1371/journal.pone.0014361.
59. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J., Aucoin D.P., McLachlan J.B., Roy C.J., Morici L.A. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine.* 2011; 29(46):8381–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.058.
60. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(5):747–54. DOI: 10.1128/CVI.00119-14.
61. Petersen H., Nieves W., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Procedia Vaccinol.* 2014; 8:38–42. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.007.
62. Baker S.M., Davitt C.J.H., Motyka N., Kikendall N.L., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides cross protection against inhalational glanders in mice and non-human primates. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4):49. DOI: 10.3390/vaccines5040049.
63. Norris M.H., Khan M.S.R., Chirakul S., Schweizer H.P., Tuanyok A. Outer membrane vesicle vaccines from biosafe surrogates prevent acute lethal glanders in mice. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(1):5. DOI: 10.3390/vaccines6010005.
64. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44):19002–7. DOI: 10.1073/pnas.1008843107.

#### Authors:

Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Anisimova A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.  
Golovin S.N. Don State Technical University. 1, Gagarin square, Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation.

#### Об авторах:

Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.  
Головин С.Н. Донской государственный технический университет. Российская Федерация, 344000, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1.

## Экзосомы и передача (эпи)генетической информации опухолевыми клетками

Е.М. Чевкина, А.М. Щербаков, А.Ю. Журавская, С.Е. Семина, А.В. Комельков, М.А. Красильников

Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Михаил Александрович Красильников [krasilnikovm@main.crc.umos.ru](mailto:krasilnikovm@main.crc.umos.ru)

В обзоре рассматриваются современные представления об экзосомах – везикулах, образующихся внутри клеток и секретируемых в окружающую среду. Они формируются на плазматической мембране клеток и представляют собой сферические структуры, ограниченные своей мембраной и содержащие различные биомолекулы, включая нуклеиновые кислоты, белки, липиды и проч. Обнаруженные в последние годы свойства экзосом перемещаться между клетками, проходить в кровяное русло, достигая самых различных тканей, и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов обеспечили пристальное внимание исследователей к изучению их биологических функций. Установлено, что экзосомы, проникая в клетки-реципиенты, могут вызывать в них целый каскад изменений на геномном (за счет интеграции ДНК) и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и проч.) уровнях. Безусловно, одним из самых интересных и значимых достижений в изучении экзосом явилось установление возможности горизонтальной передачи информации от клетки к клетке с их участием – факт, неоднократно продемонстрированный исследователями на разных моделях. В обзоре приводятся современные данные об основных характеристиках и свойствах экзосом; о роли экзосом в развитии злокачественных новообразований, в частности – об их участии в опухолевой трансформации, метастазировании, формировании лекарственной устойчивости. Заключительный раздел обзора посвящен одному из наиболее стремительно развивающихся направлений в этой области – использованию экзосом в клинической практике, в том числе для избирательной доставки противоопухолевых препаратов в опухоль.

**Ключевые слова:** экзосомы, злокачественные опухоли, микроРНК, опухолевая трансформация, метастазирование, лекарственная устойчивость, гормональная устойчивость, доставка лекарственных препаратов

DOI: 10.17650/2313-805X-2015-2-3-8-20

### Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells

E.M. Tchekina, A.M. Shcherbakov, A. Yu. Zhuravskaya, S.E. Semina, A.V. Komel'kov, M.A. Krasil'nikov

Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

In this review, we will introduce the current knowledge about exosomes – vesicles that are generated in the cells and released into the extracellular space. Exosomes are forming in the cell plasma membrane and represent the spherical shapes restricted by their membrane and contained the various biomolecules including nucleic acids, proteins, lipids etc. The intent interest to exosomes is based on their ability to horizontal transfer between the cells, to permeate into vascular system reaching the different tissues and to incorporate into the recipient cells. It was shown that exosome incorporation into the cells lead to remarkable changes in the recipient cells both in genomic level (via the integration of exosomal DNA into the host DNA) and in epigenomic level (via the modulation of the content and/or activity of the signaling proteins, microRNA etc.). Undoubtedly, one of the most interesting and perspective achievements in the exosome study is the demonstration of exosome ability to provide the horizontal transfer of the genetic information from cell to cell – the fact supported in the different studies with the various cell models. Here, we will discuss the recent data regarding the main characteristics and properties of exosomes, the role of exosomes in the tumorigenesis including neoplastic transformation, metastasis, multi-drug resistance. The final part of the review involves the most growing area in the exosome study – the possible usage of exosomes in the cancer treatment, in particular – as the specific drug delivery system.

**Key words:** exosomes, malignant tumors, microRNA, neoplastic transformation, metastasis, multi-drug resistance, hormonal resistance, drug delivery

#### Введение

Впервые термин «экзосомы» был использован в начале 80-х годов прошлого века для обозначения мембранных везикул, продуцируемых неопластическими клетками [1]. Довольно быстро такие образования были обнаружены для многих типов клеток, как нормальных, так и опухолевых [2], а в качестве основной

функции экзосом рассматривалось быстрое удаление из клеток некоторых белков, преимущественно мембраносвязанных [3]. Однако вскоре обнаружилась принципиальная особенность экзосом: благодаря своей уникальной структуре, во многом напоминающей миниатюрную копию клетки (в первую очередь за счет плазматической мембраны (ПМ) – фрагмента кле-



точной мембраны, надежно изолирующей экзосомы от внешней среды), содержимое экзосом могло достаточно долго сохраняться в неповрежденном виде. При этом состав экзосом оказался довольно разнообразным и включал практически все классы биомолекул клеток: белки, ДНК, РНК, липиды, низкомолекулярные соединения [4]. А тот факт, что экзосомы могут перемещаться между клетками, проникать в кровяное русло и достигать самых различных тканей, заставил исследователей обратить пристальное внимание на их биологические функции.

Было установлено, что экзосомы могут легко абсорбироваться на поверхности клеток и в итоге проникать внутрь клеток-реципиентов. Собственно, все современные исследования экзосом можно условно разделить на 2 направления, так или иначе связанных с этой их способностью. Во-первых, это изучение состава экзосом и влияния определенных их компонентов на те или иные свойства клеток-реципиентов, начиная от скорости деления и до опухолевой трансформации. И во-вторых, исследование возможностей экзосом как биологического средства доставки лекарственных препаратов, к тому же имеющего некоторое сходство к опухолевым клеткам.

Безусловно, одним из самых интересных и значимых достижений в изучении экзосом явилось установление возможности горизонтальной передачи информации от клетки к клетке с их участием – факт, неоднократно продемонстрированный учеными на разных моделях. Исследования показали, что экзосомы могут транспортировать в клетки-реципиенты различные биомолекулы, в том числе белки, РНК, ДНК, вирусные частицы, вызывая целый каскад изменений в клетках на геномном (за счет интеграции ДНК)

и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и проч.) уровнях [5]. И конечно, проблема злокачественных опухолей: какие экзосомы продуцируют опухолевые клетки, что за информация переносится этими экзосомами, могут ли они участвовать в опухолевой трансформации, влияют ли на метастазирование, распространение лекарственной устойчивости и проч.?

В настоящем обзоре представлены современные достижения в исследовании экзосом опухолевых клеток, обсуждаются новые представления о механизме опухолевой трансформации и прогрессии с участием экзосом, оцениваются перспективы применения экзосом в клинической практике.

### Общие представления об экзосомах

Межклеточная коммуникация является необходимым условием функционирования многоклеточного организма и может осуществляться как непосредственно с помощью межклеточных контактов, так и посредством передачи секретируемых молекул с помощью экзоцитоза. В последние 2 десятилетия был обнаружен и стал активно изучаться третий механизм межклеточной коммуникации – передача молекул с помощью так называемых экстраклеточных везикул. Везикулы представляют собой покрытые мембранным бислоем сферические структуры, обогащенные различными биомолекулами, включая все известные на сегодняшний день типы РНК, различные белки и липиды [6]. Биофизически эти структуры соответствуют фрагментам цитоплазмы, окруженным липидным бислоем с наружными доменами трансмембранных белков, обращенными во внешнюю среду (рис. 1). Для определения таких структур за время, прошедшее с момен-

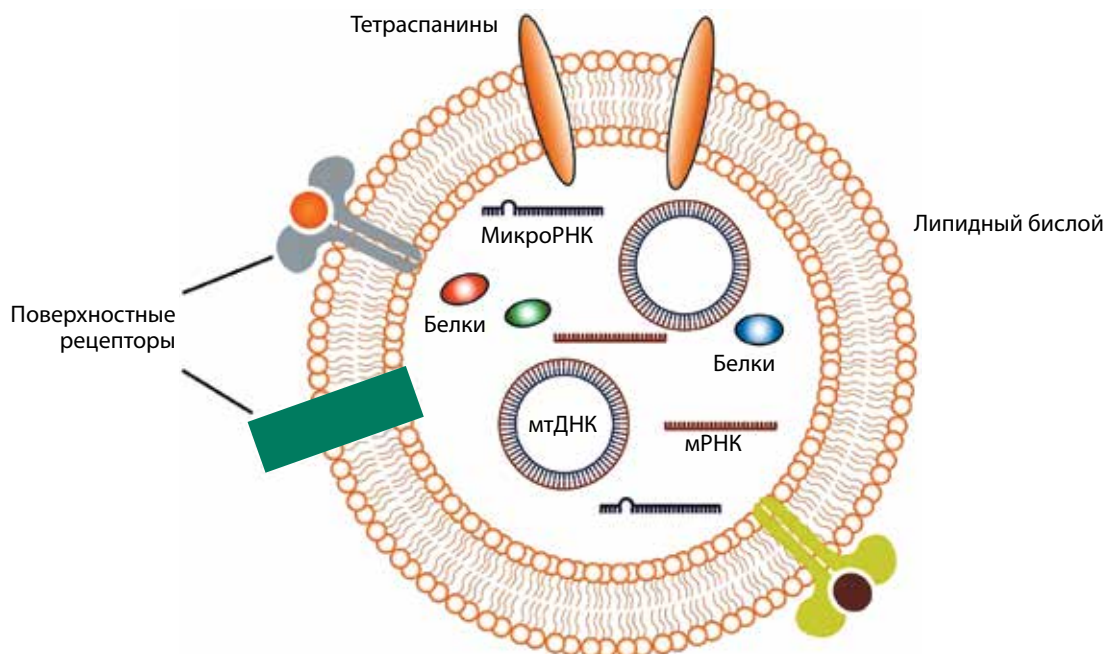


Рис. 1. Молекулярная структура экзосом. мтДНК – митохондриальная ДНК; мРНК – матричная РНК



та их открытия, использовались различные термины: «микровезикулы», «экзосомы», «мембранные фрагменты», «микрочастицы», «секретируемые везикулы» и проч. [7–10]. Термин «экзосомы» изначально употреблялся для обозначения везикулярных частиц размером от 40 до 1000 нм (позднее – до 100 нм), секретируемых культивируемыми клетками [11]. Однако происхождение этих частиц оставалось неясным. Позднее классический путь образования экзосом с формированием мультивезикулярных эндосом (МВЭ) был показан на процессе дифференцировки ретикулоцитов [6, 12], а спустя еще 10 лет аналогичный процесс был обнаружен в дендритных клетках и В-лимфоцитах [13, 14]. В дальнейшем выброс экзосом был показан и для ряда других типов нормальных клеток, включая Т-клетки, тромбоциты, тучные клетки, нейроны, олигодендроциты, клетки эпителия кишечника [4, 15].

Секретируемые клетками микровезикулярные частицы делятся на 2 класса, различающихся по механизму секреции: 1) микровезикулы, «отпочковывающиеся» непосредственно от ПМ и обладающие в среднем более крупным размером (100–1000 нм), и 2) экзосомы, секретируемые из клеток посредством слияния с ПМ МВЭ (иногда объединяемых в одно понятие с поздними эндосомами), в составе которых находятся будущие экзосомы (называемые также интралюминальными везикулами (ИЛВ)). МВЭ, в свою очередь, являются результатом слияния ранних эндосом (а также везикулярных структур, отпочковывающихся от транс-Гольджи-сети). Таким образом, очевидно, что механизм секреции экзосом является результатом везикулярного транспорта и напрямую связан с эндоцитозом.

Вкратце, первичные эндосомальные структуры с эндоцитируемым содержимым, образующиеся на ПМ посредством клатрин-зависимого, клатрин-независимого, кавеолин-зависимого, а также других форм эндоцитоза, транспортируются к ранним эндосомам [16] (согласно другим данным, все эти структуры считаются ранними эндосомами). Ранние эндосомы располагаются преимущественно на периферии клеток и часто обладают тубулярной структурой (как и везикулы, отпочковывающиеся от транс-Гольджи-сети). Поздние, или мультивезикулярные, эндосомы образуются из ранних, и в течение этого процесса происходит уменьшение pH, изменение состава белков и слияние с другими везикулами и эндосомами. Поздние эндосомы располагаются проксимально к ядру и обладают сферической формой. Некоторые специалисты выделяют этап формирования МВЭ из поздних эндосом, при этом основным отличием МВЭ считают способность образовывать собственные ИЛВ посредством инвагинации собственных мембранных участков и отпочковывания внутрь дочерних везикул [17]. Поздние эндосомы в дальнейшем либо сливаются с лизосомами, либо транспортируются к ПМ, где в результате слияния внешней мембраны МВЭ с ПМ происходит высвобождение экзосом во внеклеточную среду (рис. 2).

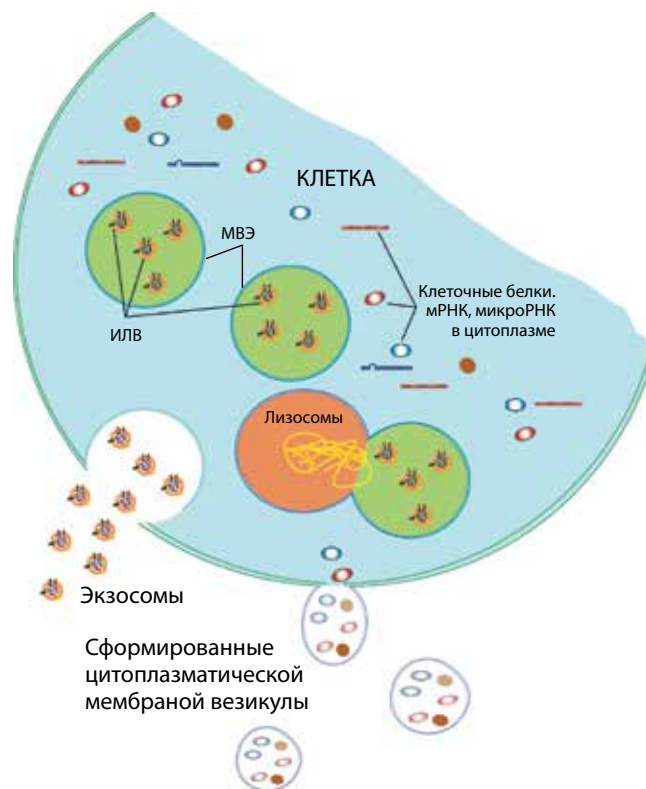


Рис. 2. Образование и созревание экзосом

Важно отметить, что многие типы клеток секретируют как экзосомы, так и микровезикулы. Это показано для тромбоцитов [18], эндотелиальных клеток [19], клеток рака молочной железы (РМЖ) [20] и др. Кроме того, существуют везикулы, соответствующие по размеру экзосомам, но образующиеся путем непосредственного отпочковывания от ПМ [21]. Более того, ряд работ указывают на то, что секретируемые экзосомы/микровезикулы, полученные от опухолевых клеток как *in vivo*, так и *in vitro*, обладают сходными размером, морфологией (по данным электронной микроскопии), плотностью (при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы), а также демонстрируют наличие как общих эндосомальных маркеров, так и маркеров ПМ [22]. Большинство исследований указывают и на то, что четкое разделение этих 2 классов везикул не только мало осуществимо технически, но и не имеет практического смысла для понимания их функций и биологического значения, поскольку они совместно и одинаковым образом воздействуют на клетки-мишени.

На сегодняшний день уже понятно, что состав содержимого экзосом не является случайным и не соответствует составу белков ПМ клеток-продуцентов, но представляет собой «микрокарты», соответствующие накоплению определенных клеточных маркеров [23]. Как осуществляется сортировка белков и других компонентов внутрь экзосом – один из важнейших вопросов, пока не имеющий однозначного ответа.

Поскольку эти структуры имеют общее эндосомальное происхождение, то вне зависимости от типа

продуцирующих их клеток они содержат ряд белков, участвующих в формировании МВЭ, таких как комплекс ESCRT (endosomal sorting complex responsible for transport) (TSG101, Alix) [24]. Другими маркерами, служащими для идентификации экзосом, являются тетраспанины (CD63, CD81 и CD9), а также белки теплового шока (HSP60, HSP70 и HSP90) [25]. Есть и маркеры экзосом, секретируемых определенными типами клеток, например белки главного комплекса гистосовместимости МНС-I и -II в экзосомах, продуцируемых антигенпрезентирующими клетками, или интегрин CD41a в экзосомах, секретируемых тромбоцитами.

Экзосомы обнаружены в большинстве тканей и практически во всех биологических жидкостях, включая кровь, грудное молоко, слюну [26], цереброспинальную жидкость, сперму, мочу [27]. В число экзосомальных белков входят малые гуанозинтрифосфатазы (ГТФазы) семейства Rab, участвующие в формировании экзосом и слиянии их с другими мембранными структурами [28], аннексины I, II, V и VI, регулирующие динамику мембран-цитоскелетных взаимодействий, а также различные молекулы адгезии и цитоскелета [29].

Механизм взаимодействия экзосом с клетками-реципиентами до конца не ясен. Исследователи рассматривают несколько вариантов такого механизма, в том числе: 1) лиганд-рецепторные взаимодействия; 2) встраивание экзосомальной мембраны в клеточную; 3) фагоцитоз экзосом клетками-реципиентами [30]. Так, описано взаимодействие изолированных экзосом В-клеток с фолликулярными дендритными клетками [31], с CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетками, приводящее к заметному усилению иммунного ответа [32]. Показано, что экзосомы, полученные из инфицированных клеток, содержат патогенные антигены, модулирующие иммунный ответ. В частности, экзосомы эндотелиальных клеток, инфицированных цитомегаловирусом, способны индуцировать специфический иммунный ответ. Экзосомы инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа макрофагов специфически связываются с Т-клетками, что обеспечивает распространение инфекции и супрессию иммунного ответа [33].

Продемонстрировано участие экзосом в функционировании эпителиальных и нервных тканей. Так, экзосомы, секретируемые клетками эпителия кишечника, участвуют в регуляции противовоспалительных процессов [34]. Экзосомы эпителиальных клеток бронхов, содержащие повышенное количество цитокинов, в случае бронхиальной астмы обеспечивают распространение противовоспалительного эффекта по всем тканям дыхательной системы [35]. Нейроны, олигодендроглиальные клетки и микроглия секретируют везикулы, которые мигрируют к определенным клеткам-мишеням. Показано участие экзосом в формировании миелина, играющего ключевую роль в функционировании и выживании нейронов [36]. Продемонстрировано, что ряд патогенных белков, вызывающих наруше-

ния центральной нервной системы, такие как прионы, супероксиддисмутаза и  $\alpha$ -синуклеин, обнаруживаются в составе экзосом и могут переноситься от клетки к клетке; наличие таких экзосом в плазме крови может использоваться в качестве маркера ранних стадий дегенеративных заболеваний [37]. Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), участвуют в устранении повреждений и регенерации тканей [38].

### Экзосомы опухолевых клеток

Исследования показали, что опухолевые клетки продуцируют экзосомы в значительно большем количестве, чем нормальные клетки. Продуцируемые клетками опухолей экзосомы обнаруживаются практически во всех биологических жидкостях организма, включая сыворотку крови, мочу, сперму, асцитные и плевральные жидкости. За счет наличия на своих мембранах адгезионных рецепторов и лигандов, специфичных для различных типов клеток и тканей, экзосомы «прицельно» взаимодействуют с определенными типами клеток, доставляя в последние биологические молекулы самого широкого спектра действия, в том числе факторы роста, цитокины, рецепторы, биоактивные липиды и различные виды РНК. Секретция экзосом показана для подавляющего большинства злокачественных опухолей и, по-видимому, является характерной чертой неопластической трансформации клеток.

Посредством переноса огромного количества информационно-молекул экзосомы осуществляют важнейшие функции при формировании первичных опухолей и опухолевой прогрессии, включая реорганизацию микроокружения и стромальных клеток [39, 40], увеличение инвазивной способности клеток [41], усиление ангиогенеза и экспрессии клетками проангиогенных факторов [42], формирование множественной лекарственной устойчивости, активацию онкогенных и антиапоптотических сигнальных путей, а также избавление от проапоптотических факторов или доставку проапоптотических факторов к клеткам, задействованным в процессах противоопухолевого иммунитета [43] (рис. 3).

Огромный фактический материал накоплен в отношении роли экзосом в подавлении противоопухолевого иммунитета, включая угнетение функций Т-лимфоцитов и натуральных киллеров (НК-клеток), а также подавление дифференцировки антигенпрезентирующих клеток. Кроме того, опухолевые экзосомы увеличивают количество и усиливают активность иммуносупрессорных клеток, способствуют активному переносу различного рода вирусов, включая вирусы, ассоциированные с канцерогенезом. Ряд данных свидетельствуют о том, что опухолевые клетки посредством секреции экзосом избавляются от химиопрепаратов (в частности, доксорубина), и этот процесс лежит в основе приобретения малигнизированными клетка-



Рис. 3. Эффекты экзосом в опухолевой ткани и микроокружении опухоли

ми устойчивости к противоопухолевой терапии [44, 45]. Отдельный пул данных касается способности экзосом изменять важнейшие функции опухолевых клеток (пролиферации, дифференцировки, выживания и др.) с помощью эпигенетических механизмов регуляции транскрипции генов посредством переноса информационных и малых РНК [46]. Эти данные во многом объясняют и феномен генетической нестабильности, лежащий в основе селекции наиболее малигнизированных клеток [47, 48]. Известно также, что экзосомы, секретируемые эмбриональными стволовыми клетками, способны эпигенетически перепрограммировать различные клетки-мишени [49]. Более того, имеются данные, указывающие на то, что экзосомы способны «передавать» клеткам-мишеням способность к метастазированию [50, 51].

Исследование состава переносимых экзосомами белков свидетельствует о том, что спектр этих белков неслучаен и напрямую зависит от типа продуцирующей их опухоли, что может быть использовано для определения маркеров конкретных заболеваний. Однако это требует дальнейших масштабных исследований.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие различные этапы биогенеза и секреции экзосом, на сегодняшний день остаются малоизвестными. Это касается формирования МВЭ, отбора содержимого ИЛВ, определения дальнейшей «судьбы» МВЭ (слияние с лизосомальным компартментом (для большинства из них) или транспорт к ПМ для последующей секреции экзосом), механизмов экзоцитоза и акцептирования экзосом клетками-мишенями (которое также может происходить как за счет непосредственного слияния мембран, так и посредством эндоцитоза) и других процессов. Известно, что формирование МВЭ зависит от убиквитин-связывающих белков. Механизмы сортировки белков включают различные виды их убиквитинирования: моноубиквитинирование служит сигналом для эндоцитоза и включения в состав МВЭ, в то время как полиубиквитинирование является сигналом для деградации в протеасомах. Предполагается, что олигоубиквитинирование также может служить сортировочным сигналом для включения в МВЭ, что

может повышать эффективность отбора [52]. Комплексы ESCRT-0, -I, -II и -III при помощи VPS-27 (vacuolar protein sorting 27) распознают моноубиквитинированные белки и обеспечивают их включение в МВЭ. Это происходит за счет привлечения белком VPS-27 комплексов ESCRT и TSG101, что приводит к активации белка AIP/Alix [53]. Этот мультибелковый комплекс инициирует сортировку белков и заключение их в отпочковывающиеся внутрь МВЭ везикулы [54].

### Экзосомы и микроокружение опухоли

Как уже отмечалось, одной из главных функций экзосом и других микровезикул является обеспечение межклеточной коммуникации — как с соседними клетками, так и с клетками, находящимися на удаленном расстоянии. В частности, посредством экзосом клетки опухоли влияют на клеточное микроокружение, что приводит к «созреванию» опухолевой стромы и последующей стимуляции роста опухоли [55]. В состав стромы входят клетки различного типа: опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), эндотелиальные клетки, перициты, макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и МСК [56].

ОАФ представляют собой миофибробласты, которые образовались в результате дифференцировки клеток различного типа (резидентных фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных клеток, перицитов, циркулирующих фиброцитов и МСК) [57], причем главным активатором данного процесса является TGF- $\beta$ 1 [58]. Установлено, что экзосомы, продуцируемые клетками опухоли, содержащие TGF- $\beta$  и  $\beta$ -гликан, запускают дифференцировку нормальных фибробластов в миофибробласты [59]. В дальнейшем миофибробласты стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток, способствуют росту опухоли и клеточной инвазии и в целом формируют благоприятную среду для прогрессии опухоли [57].

Особую роль экзосом в формировании стромы доказывает и тот факт, что опухоли с дефицитом экзосом не способны к росту, связанному со стимуляцией микроокружением, в тестах *in vivo* [58]. Установлено, что предотвратить дифференцировку миофибробластов можно путем нокдауна малой ГТФазы Rab27 — одного из регуляторов секреции экзосом [58].

Под действием экзосом клеток опухоли миофибробласты также могут формироваться из МСК жировой ткани (adipose tissue derived mesenchymal stem cells). Обработка МСК опухолевыми экзосомами приводит к возникновению у них характеристик, типичных для опухоль-ассоциированных миофибробластов (в частности, к продукции  $\alpha$ -актина гладкой мускулатуры), а также стимулирует экспрессию белков SDF-1, VEGF, CCL5 и TGF- $\beta$  [60, 61]. Для экзосом клеток опухоли желудка показана способность индуцировать дифференцировку МСК пуповины [62].

Таким образом, можно говорить о процессе ремоделирования стромы (качественном изменении со-



става стромы) под действием экзосом, продуцируемых клетками опухоли.

ОАФ также способны воздействовать на клетки опухоли посредством экзосом. Экзосомы, секретлируемые ОАФ, участвуют в доставке таких биоактивных молекул, как HGF, IL-6, PDGF, простагландины, протеазы и микроРНК [55, 63]. Показано, что ОАФ секретлируют экзосомы, стимулирующие образование протрузий клетками РМЖ, а также подвижность и метастатическую активность этих клеток с участием сигнального пути Wnt-PCP (planar cell polarity) [64].

Интересным представляется тот факт, что стимулировать опухолевые клетки могут и микровезикулы тромбоцитов, не относящихся к клеткам микроокружения опухоли. Микровезикулы тромбоцитов переносят тромбоцитарный интегрин CD4, активируют ERK1/2 и серин-треониновые протеинкиназы, усиливают экспрессию MT1-MMP, MMP-9, VEGF, IL-8 и HGF и стимулируют пролиферацию и инвазию клеток [49].

### **Экзосомы, трансформация и туморогенез**

Согласно ряду данных, экзосомы злокачественных клеток способны инициировать процесс опухолевой трансформации нормальных клеток. Это демонстрирует возможность клональной экспансии опухоли посредством перепрограммирования нормальных клеток при помощи экзосом. Так, экзосомы, продуцируемые клетками рака предстательной железы, стимулируют трансформацию стволовых клеток жировой ткани [65]. Процесс сопряжен с переносом экзосомами мРНК *HRAS* и *KRAS*, онкомикроРНК miR-125b, miR-130b и miR-155, малых ГТФаз. Экзосомы клеток РМЖ способны вызывать опухолевую трансформацию нормальных клеток эпителия, развивающуюся с участием пре-микроРНК (pre-miRNAs), ассоциированных с белками комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [66]. Кроме того, оказалось, что инъекция мышам экзосом, выделенных из сыворотки крови больных РМЖ, вместе с нетуморогенными эпителиальными клетками приводит к формированию у них опухолей [67].

Микровезикулы клеточных линий РМЖ и глиобластомы способны формировать фенотип, характерный для трансформированных клеток, у фибробластов и клеток эпителия благодаря совместному действию тканевой трансминазы и фибронектина [68]. При этом для поддержания трансформированного фенотипа клеткам-реципиентам необходимо постоянное присутствие микровезикул, секретлируемых опухолевыми клетками.

Установлено, что экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками, содержат онкогенные белки, ответственные за трансформацию клеток, — K-Ras, H-Ras и N-Ras, EGFR, киназы семейства Src и интегрин [69]. Примечательно, что в то же время в экзосомах обнаруживается опухолевый супрессор PTEN, сохра-

няющий свою функциональную активность и приводящий к снижению уровня фосфорилирования Akt [70].

### **Роль экзосом в формировании премеаастатических ниш**

Согласно общепринятой концепции, метастазированию опухолевых клеток предшествует образование так называемых премеаастатических ниш, обеспечивающих формирование вторичного очага роста метастазов [71]. Оказалось, что экзосомы и микровезикулы способны изменять внеклеточный матрикс и доставлять онкогенные факторы во вторичные очаги опухолевого роста [51, 72, 73]. В частности, экзосомы, секретлируемые клетками высокометастазирующих линий меланомы, усиливают рост и метастазирование первичной опухоли [73]. При этом экзосомы клеток меланомы при внутривенном введении преимущественно распределяются в «сторожевые» лимфатические узлы, подготавливая условия для миграции и роста опухолевых клеток. Данный эффект опосредуется рецепторной тирозинкиназой MET, играющей важную роль в миграции, инвазии и ангиогенезе.

Экзосомальная микроРНК miR-105, секретлируемая клетками опухоли, также играет важную роль на ранней стадии формирования премеаастатических ниш. МикроРНК miR-105 разрушает васкулярно-эндотелиальный барьер и увеличивает проницаемость сосудов и капилляров легких, печени и головного мозга, позволяя клеткам первичной опухоли проникать в кровоток и колонизировать определенные дистальные органы [74]. В формировании стромы премеаастатических ниш участвуют также экзосомальные микроРНК miR-494 и miR-542-3p, мишенью для которых служат лимфатические узлы и легочный эпителий [75]. На формирование премеаастатических ниш влияют и экзосомы, секретлируемые клетками опухолевой стромы и окружающей ткани [76, 77], поддерживая тем самым постоянно высокий уровень метастатической активности опухолевых клеток.

Отдельный интерес представляет исследование образования экзосом в условиях гипоксии — фактора, постоянно сопровождающего рост и прогрессию злокачественных опухолей. Гипоксия стимулирует «перестройку» ряда сигнальных путей в клетках опухоли и ее микроокружения [78, 79], которая ведет к появлению более агрессивного фенотипа злокачественных клеток и формированию устойчивости к радио- и химиотерапии. Экзосомы, являясь элементом межклеточной коммуникации, также участвуют в адаптации опухоли к гипоксическим условиям.

Вопрос, изменяются ли синтез экзосом клетками и содержимое экзосом при гипоксии, активно обсуждается в литературе последние 5 лет [80–86]. Хорошо известно, что программа клеточной реакции на гипоксию активируется через универсальный механизм — стабилизацию транскрипционных факторов HIF. Оказалось, что и продукция экзосом не является



исключением – снижение уровня кислорода до 1 % вызывает небольшое HIF-1 $\alpha$ -зависимое увеличение (в 1,3–1,4 раза) количества экзосом в культуральной среде от клеток РМЖ линий MCF-7 и MDA-MB-231. Более глубокая (до 0,1 % кислорода) гипоксия приводит к значительному накоплению экзосом в среде: их количество возрастает в 2 раза по сравнению с нормоксией [87]. Используя химический стабилизатор HIF-1 $\alpha$  (диметилноксалилглицин) и малые интерферирующие РНК HIF-1 $\alpha$ , авторы доказали прямое участие HIF-1 $\alpha$  в усилении продукции экзосом при гипоксии [87]. Так как экзосомы представляют собой фактор межклеточной коммуникации, их содержимое при гипоксии меняется и перестраивается вслед за изменениями внутриклеточных молекулярных путей. Показано, что в «гипоксических» экзосомах опухолевых клеток накапливается ряд специфических молекул; снижение уровня кислорода в опухоли ведет к увеличению содержания в экзосомах гипоксической микроРНК miR-210 [87], miR-135b [88], фермента, регулирующего дезаминирование (LOXL2) [85], кавеолина-1 (CAV-1) [81], тромбопластина (TF) [86], тетраспанинов (CD63 и CD81), белков теплового шока (HSP90 и HSP70), аннексина II [82]. Интересный факт обнаружили недавно М. Ага и соавт. Оказалось, что основной регулятор ответа клетки на гипоксию, HIF-1 $\alpha$ , также переносится экзосомами, распространяя среди клеток «волну» ответа на кислородное голодание [89]. Список гипоксических молекул, переносимых экзосомами, активно пополняется в настоящее время. Экзосомы, содержащие такие молекулы, попадают в соседние клетки опухоли и микроокружения и дополнительно активируют в них сигнальные пути. В частности показано, что экзосомы, секретлируемые опухолевыми клетками в состоянии гипоксии, стимулируют образование сосудов (неоангиогенез) [40, 90]. Помимо этого, совсем недавно доказана роль гипоксических экзосом в повышении инвазивности опухоли: экзосомы, секретированные в условиях гипоксии и перенесенные к клеткам в нормоксии, снижают в них экспрессию молекул межклеточной адгезии [82].

Дальнейшее исследование экзосом, продуцируемых опухолевыми клетками, поможет более точно установить особенности их влияния как на клетки самой опухоли, так и на процессы, происходящие в опухолевом микроокружении.

### **Экзосомы и лекарственная устойчивость опухолей**

Как известно, одной из характерных особенностей опухолевых клеток является способность быстро адаптироваться к окружающим условиям, в том числе и к токсическому действию внешних факторов, будь то гипоксия, облучение, цитотоксические препараты и др. Столь эффективная адаптация опухолевых клеток, приводящая в итоге к развитию лекарственной, гормональной, радио- и других вариантов резистент-

ности опухолей, основана как на действии специфических систем защиты – репарации ДНК, выведения ксенобиотиков (ABC-транспортеры), функционирующих на фоне угнетенного апоптоза, так и на способности к быстрой перестройке внутриклеточных сигнальных путей в тех случаях, когда активность отдельных сигнальных молекул заблокирована в результате действия специфических цитотоксических препаратов.

Исследования последних лет показали, что в развитии практически любого варианта резистентности опухолей могут принимать участие экзосомы, выступающие в роли переносчиков биомолекул от клетки к клетке. Речь идет о горизонтальном пути распространения резистентности, когда экзосомы, продуцируемые резистентными клетками, достигают клеток-реципиентов, модулируя у них соответствующие изменения лекарственной или другой устойчивости. Принципиальная возможность горизонтального пути развития лекарственной резистентности продемонстрирована в экспериментах по ко-культивированию чувствительных и резистентных клеток: так, на примере клеток РМЖ показано, что ко-культивирования чувствительных и доксорубицин-устойчивых клеток в течение 6 сут достаточно для того, чтобы чувствительные клетки приобрели относительно высокий уровень лекарственной устойчивости [91]. Обнаружено, что экзосомы принимают участие в распространении такой резистентности в первую очередь благодаря их способности инкапсулировать собственно ABC-транспортеры, в частности Р-гликопротеин, кодируемый геном множественной лекарственной устойчивости *MDR1*, и переносить их в клетки-реципиенты. Подобный эффект был убедительно продемонстрирован в экспериментах на линиях клеток РМЖ и рака предстательной железы: оказалось, что экзосомы, полученные от опухолевых клеток с высоким уровнем лекарственной устойчивости, отличаются высоким содержанием Р-гликопротеина, который они могут транспортировать в клетки-реципиенты [91, 92]. Но не только ABC-транспортеры являются объектами экзосомального трафика белков. Среди соединений, находящихся в составе опухолевых экзосом, были идентифицированы белки различных сигнальных каскадов, в том числе и тирозинкиназные рецепторы ростовых факторов. Оказалось, что продукция опухолевыми клетками экзосом, содержащих, в частности, HER-2/neu, оказывается достаточной для блокирования действия трастузумаба – таргетного препарата на основе моноклональных антител к HER-2/neu. В этом случае экзосомы, несущие на своей поверхности HER-2/neu, непосредственно связывают трастузумаб, снижая его эффективную концентрацию и предотвращая его взаимодействие с опухолевыми клетками [93].

Следует отметить, что состав белков экзосом необычайно разнообразен, причем экзосомы, продуцируемые опухолевыми клетками, отличает высокое содержание

белков, в той или иной степени ассоциированных с опухолевым ростом. Анализ протеома экзосом опухолевых клеток выявил присутствие в них ключевых сигнальных белков, в частности белков семейств Ras, Src, MAPK и проч. [94–96]. Проникновение таких белков в клетки-реципиенты стимулирует соответствующие сигнальные каскады, в том числе антиапоптотические, приводя тем самым к повышению общего уровня лекарственной устойчивости клеток.

Другой путь, горизонтального (от клетки к клетке) распространения лекарственной резистентности основан на передаче специфических микроРНК с участием экзосом. Сегодня микроРНК рассматриваются в качестве универсальных регуляторов экспрессии генов, не менее значимых, чем классические транскрипционные факторы, и неудивительно, что микроРНК достаточно быстро попали в сферу интересов исследователей экзосом. Оказалось, что микроРНК необычайно широко представлены в экзосомах — по разным данным, в их составе обнаруживается не менее 600 видов микроРНК [97, 98]. Среди них удалось идентифицировать микроРНК, ассоциированные с развитием лекарственной устойчивости и обнаруживаемые в экзосомах резистентных клеток. Так, в экзосомах резистентных клеток РМЖ существенно возрастает содержание микроРНК miR-100, miR-222 и miR-30a; продемонстрировано, что такие экзосомы успешно переносят микроРНК в клетки-реципиенты [98]. Вопрос о механизме развития лекарственной устойчивости под действием микроРНК остается во многом открытым. Известные сегодня немногочисленные работы на эту тему отводят центральную роль изменениям ключевых сигнальных каскадов под действием микроРНК, в том числе ответственных за регуляцию пролиферации (MAPK-сигналинг, циклинзависимая регуляция, PTEN и проч.) [98].

Сравнительно недавно продемонстрировано, что не только лекарственная, но и гормональная резистентность опухолей, в первую очередь — опухолей молочной железы, может распространяться горизонтальным путем с участием экзосомальной микроРНК. Исследователи анализировали трансфер miR-221/222, участие которых в развитии резистентности к тамоксифену достоверно установлено, в том числе показана их способность подавлять экспрессию рецептора эстрогенов [99]. Обнаружено, что тамоксифен-резистентные клетки РМЖ продуцируют экзосомы с повышенным содержанием miR-221/222, продемонстрирована способность таких экзосом проникать внутрь клеток-реципиентов и приводить к снижению гормональной зависимости этих клеток [100]. В наших экспериментах показано, что ко-культивирование чувствительных и резистентных к тамоксифену клеток РМЖ приводит к развитию устойчивости в чувствительных клетках, продемонстрировано участие в этом процессе экзосом, продуцируемых резистентными клетками. Примечательно, что вызванная подобным образом резистентность сохраняется длительное время и после разъединения клеточных культур [101].

В целом, суммируя приведенные данные, можно заключить, что межклеточные взаимодействия, в том числе реализуемые с участием экзосом, могут играть решающую роль в развитии, а главное — в распространении резистентности по всей массе опухоли, во многом определяя столь быструю адаптацию злокачественных опухолей к действию цитотоксических факторов.

### Экзосомы: от эксперимента к клинической практике

Развитие современных методов поиска лекарственных средств позволило за последние годы достичь определенных успехов в формировании арсенала противоопухолевых препаратов. С одной стороны, широкомасштабный скрининг химических библиотек предоставляет ряд перспективных молекул-кандидатов для доклинических исследований. С другой — применение в клинике практически всех разрабатываемых препаратов обнаруживает существенные проблемы, снижающие эффективность терапии. Общая и органоспецифическая токсичность, короткое время жизни молекул-кандидатов, развитие резистентности, острые психогенные реакции и лекарственная (медикаментозная) аллергия часто являются причиной неудачи в доклинических исследованиях в онкологии [102–104]. Одним из способов преодоления таких трудностей, как полагают, является разработка нетоксичных средств лекарственной доставки. Какими же свойствами должно обладать «идеальное» средство доставки препарата? Это прежде всего низкая токсичность, большее время жизни в организме, чем у переносимой молекулы, и достаточная иммунологическая совместимость с пациентом. Биологические свойства экзосом, описанные выше, делают их вполне востребованными для исследования и разработки новых средств доставки противоопухолевых препаратов. Стоит подчеркнуть, что важными конкурентными преимуществами экзосом для клинической практики являются их аутологичность (происхождение от пациента, получающего лечение) и возможность *ex vivo* манипуляций с экзосомами больного [105]. В частности, аутологичность экзосом позволит в будущем преодолеть ряд побочных эффектов, возникающих при использовании в терапии липосом (синтетических везикул) [106].

Существует 3 основных метода «упаковки» лекарственных средств в экзосомы человека [105, 107, 108]. Первый способ основан на культивировании *in vitro* клеток пациента (например, полученных из асцита) в целях наработки нативных экзосом. Выделенные таким методом экзосомы затем инкубируют с препаратом для его проникновения внутрь и «загрузки». Для пассивного проникновения препарата в экзосомы необходимо, чтобы он обладал липофильными свойствами. Второй метод заключается в инкубации препарата непосредственно с клетками пациента *ex vivo*. Клетки, обработанные лекарственным средством, на-

чинают «запаковывать» его в экзосомы и секретировать в культуральную среду. Среду собирают и выделяют из нее экзосомы, содержащие лекарственное средство. Третий метод состоит в трансфекции клеток пациента *in vitro* и позволяет включить в экзосомы необходимые последовательности ДНК, РНК и синтезированные белки [109, 110]. Использование описанных методов не нарушает аутологичности экзосом, что в будущем будет способствовать созданию лекарственных средств, не вызывающих аллергических и острых токсических реакций у пациента [105, 110].

Возможность проникновения (инкорпорирования, «загрузки») противоопухолевых средств в экзосомы продемонстрирована для нескольких классов химических соединений [105, 111]. К сожалению, даже для липофильных молекул, обладающих большим сродством к мембране экзосом, наблюдается не очень высокая степень инкорпорирования. Эффективность заполнения экзосом препаратом можно повысить с помощью различных методов: при дополнительном использовании электропорации доксорубицин проникает приблизительно в 20 % экзосом дендритных клеток [111]. Наиболее эффективным способом «упаковки» доксорубицина оказалась обработка клеток линии MCF-7 препаратом в условиях гипертермии (42 °С) в течение 1 ч [112]. Известно, что применение еще одного противоопухолевого средства, паклитаксела, ограничено высокой частотой реакций повышенной чувствительности к препарату. Инкорпорирование паклитаксела в средства доставки, в частности в экзосомы, может снизить частоту таких реакций. Обнаружено, что мезенхимальные клетки, культивируемые *in vitro*, способны интегрировать паклитаксел в экзосомы [113, 114]. Паклитаксел в экзосомах, выделенных мезенхимальными клетками, продемонстрировал высокую токсичность на клеточной линии рака поджелудочной железы человека CFPAC-1.

Некоторые противовоспалительные средства также поддаются введению в экзосомы, например куркумин. Куркумин (полифенол природного происхождения) обладает не только противовоспалительным, но и проапоптотическим, противоокислительным, противоамилоидным и даже антидепрессивным действием. В работе D. Sun и соавт. продемонстрировано проникновение куркумина в экзосомы при комнатной температуре. Куркумин, интегрированный в экзосомы, обладает улучшенными фармакологическими характеристиками: повышаются его биологическая доступность и растворимость, увеличивается стабильность препарата [115]. В перспективе такие экзосомы с куркумином могут быть использованы в сопровождающей терапии в онкологии.

В целом разработка новых средств доставки противоопухолевых препаратов в экзосомах пока находится в доклинической стадии. Только отдельные проекты переходят к I фазе клинических исследований. Более интенсивно развивается другое «экзосомное»

направление в онкологии — иммунотерапия. Первые эксперименты с экзосомами из асцита пациентов оказались достаточно успешными, и результаты I фазы исследования применения экзосом из асцита в комбинации с GM-CSF в иммунотерапии у больных раком толстой кишки были опубликованы в 2008 г. Продемонстрирована безопасность такой терапии, а также выявлено увеличение специфического иммунного противоопухолевого ответа у больных [116]. В другом исследовании В. Escudier и соавт. [117] провели вакцинирование 15 больных метастатической меланомой экзосомами из аутологичных дендритных клеток. Авторами продемонстрирована возможность дополнительной загрузки пептидов (МНС) в экзосомы для усиления специфического противоопухолевого ответа. Иммунотерапия экзосомами показывает хорошую переносимость и низкую частоту побочных эффектов.

Несмотря на то, что исследования экзосом в лабораториях ведутся с середины 1980-х годов, до клинической стадии доходит очень небольшое число проектов. Поиск по базе ClinicalTrials.gov в сентябре 2015 г. выявил всего 15 исследований по запросу “exosomes and cancer”. В исследовании NCT02507583 оценивается возможность иммунизации больных глиомой с помощью экзосом, секретлируемых гибнущими опухолевыми клетками. Клетки, полученные при хирургическом вмешательстве, обрабатывают специфической олигонуклеотидной последовательностью IGF-1R/AS ODN, затем помещают в капсулу и имплантируют больному. IGF-1R/AS ODN вызывает снижение экспрессии рецепторов IGF-1, что ведет к запуску апоптоза в опухолевых клетках. При гибели клетки продолжают секретировать экзосомы, содержащие опухолевые антигены. Экзосомы и апоптотные тельца (мембранные везикулы, образующиеся при апоптозе) постепенно попадают из капсулы-имплантата в организм больного и усиливают противоопухолевый иммунный ответ.

В настоящее время рассматривается возможность использования не только аутологичных экзосом как средства доставки препаратов, но и экзосом растительного происхождения. Ранее была показана достаточно высокая эффективность уже упомянутого выше фитоэстрогена куркумина при раке толстой кишки [118, 119]. Однако эффективность этого препарата ограничена низкой биодоступностью: даже прием высоких доз (8–12 г в день) не приводил к достаточному накоплению куркумина в тканях [118, 120]. В исследовании I фазы NCT01294072 (проводится в James Graham Brown Cancer Center) оценивается увеличение биодоступности куркумина с помощью создания конъюгатов препарата с растительными экзосомами. Будет проведено сравнение 3 групп больных раком толстой кишки: в 1-ю войдут пациенты, получающие куркумин, во 2-ю — конъюгат куркумина и растительных экзосом, а в 3-ю — больные, не получающие препараты (контрольная группа). Авторы исследования

ожидают, что применение созданных таблетированных форм конъюгатов куркумина с экзосомами позволит повысить концентрацию препарата в тканях. В декабре 2015 г. станут известны первые результаты этого исследования. Растительные экзосомы находят применение в онкологии не только как средства доставки, но и как препараты для проведения сопровождающей терапии. В исследовании NCT01668849 рассматривается возможность использования экзосом, выделенных из винограда, для снижения побочных эффектов комбинированной радио- и химиотерапии при опухолях головы и шеи.

В целом применение экзосом в доклинической и клинической онкологии развивается в 4 направлениях (рис. 4). Наиболее успешным можно считать иммунотерапию – в этой области завершены несколько клинических исследований I фазы, получены достоверные сведения об увеличении иммунного ответа при вакцинации экзосомами [116, 117, 121]. Доставке таргетных препаратов с помощью экзосом также уделяется много внимания, однако большинство проектов пока не дошло до стадии клинических исследований. Одна из причин такой ситуации – не очень высокая эффективность «загрузки» лекарственных средств в экзосомы. Постепенно приобретают популярность исследования экзосом в качестве средств доставки в опухоль специфических нуклеиновых кислот (малых интерферирующих РНК, микроРНК).

*Работы авторов по тематике обзора поддержаны Российским научным фондом (проект № 14-15-00362) и Российским фондом фундаментальных исследований (проекты № 14-04-31119 (раздел об исследованиях в гипоксии) и № 14-04-01706).*

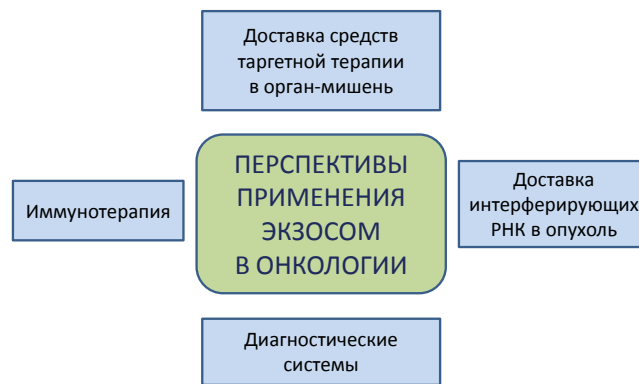


Рис. 4. Перспективы применения экзосом в клинической практике

Кроме того, отдельно стоит упомянуть возможность диагностических процедур с анализом экзосом онкологического больного, а также прогностического мониторинга. С одной стороны, накапливаются сведения о корреляциях белкового/ДНК/РНК-профиля экзосом (например, из асцита) и опухолевых клеток. С другой, пока нет четкого представления о том, какой выигрыш даст профилирование экзосом для клинико-лабораторных исследований [122]. Таким образом, исследования экзосом открывают ряд новых и уникальных возможностей в онкологии, и дальнейшие шаги помогут внедрить некоторые из экспериментальных разработок в клиническую практику.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Trams E.G., Lauter C.J., Salem N. Jr, Heine U. Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981;645(1):63–70.
- Keller S., Sanderson M.P., Stoeck A., Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 2006;107(2):102–8.
- Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983;97(2):329–39.
- Simons M., Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(4):575–81.
- Ogorevc E., Kralj-Iglic V., Veranic P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. *Radiol Oncol* 2013;47(3):197–205.
- Bellingham S.A., Guo B.B., Coleman B.M., Hill A.F. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol* 2012;3:124.
- Holme P.A., Solum N.O., Brosstad F. et al. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 1994;72(5):666–71.
- Hess C., Sadallah S., Hefti A. et al. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 1999;163(8):4564–73.
- Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19(2):43–51.
- Gyorgy B., Szab T.G., Pásztoi M. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(16):2667–88.
- Harding C., Heuser J., Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* 1984;35(2):256–63.
- Pan B.T., Teng K., Wu C. et al. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985;101(3):942–8.
- Zitvogel L., Regnault A., Lozier A. et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998;4(5):594–600.
- Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996;183(3):1161–72.
- Thery C., Ostrowski M., Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9(8):581–93.
- Piper R.C., Katzmann D.J. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:519–47.
- Taylor D.D., Gercel-Taylor C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated



- immunosuppressive microenvironments. *Semin Immunopathol* 2011;33(5):441–54.
18. Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnhrer R. et al. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999;94(11):3791–9.
19. Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R. et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007;110(7):2440–8.
20. Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C. et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 2009;19(22):1875–85.
21. Booth A.M., Fang Y., Fallon J.K. et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 2006;172(6):923–35.
22. Kesimer M., Scull M., Brighton B. et al. Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* 2009;23(6):1858–68.
23. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907–20.
24. Mathivanan S., Lim J.W., Tauro B.J. et al. Proteomic analysis of A33 immunopurified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(2):197–208.
25. Graner M.W., Alzate O., Dechkovskaia A.M. et al. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes. *FASEB J* 2009;23(5):1541–57.
26. Lasser C., Alikhani V.S., Ekström K. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 2011;9:9.
27. Street J.M., Barran P.E., Mackay C.L. et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med* 2012;10:5.
28. Pfeffer S.R. Two Rabs for exosome release. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):3–4.
29. Choi D.S., Kim D.K., Kim Y.K., Gho Y.S. Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics* 2013;13(10–11):1554–71.
30. Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2(8):569–79.
31. Denzer K., van Eijk M., Kleijmeer M.J. et al. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 2000;165(3):1259–65.
32. Robbins P.D., Morelli A.E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol* 2014;14(3):195–208.
33. Garrus J.E., von Schwedler U.K., Pornillos O.W. et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 2001;107(1):55–65.
34. van Niel G., Raposo G., Candalh C. et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001;121(2):337–49.
35. Prado N., Marazuela E.G., Segura E. et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* 2008;181(2):1519–25.
36. Bakhti M., Winter C., Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 2011;286(1):787–96.
37. Kujala P., Raymond C.R., Romeijn M. et al. Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog* 2011;7(12):e1002449.
38. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J. et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009;5(1):54–63.
39. Marhaba R., Klingbeil P., Nuebel T. et al. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr Mol Med* 2008;8(8):784–804.
40. Park J.E., Tan H.S., Datta A. et al. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics* 2010;9(6):1085–99.
41. Graves L.E., Ariztia E.V., Navari J.R. et al. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* 2004;64(19):7045–9.
42. Al-Nedawi K., Meehan B., Kerbel R.S. et al. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(10):3794–9.
43. Ichim T.E., Zhong Z., Kaushal S. et al. Exosomes as a tumor immune escape mechanism: possible therapeutic implications. *J Transl Med* 2008;6:37.
44. Safaei R., Larson B.J., Cheng T.C. et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4(10):1595–604.
45. Shedden K., Xie X.T., Chandaroy P. et al. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003;63(15):4331–7.
46. Skog, J., Würdinger T., van Rijn S. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10(12):1470–6.
47. Viswanathan M., Sangiliyandi G., Vinod S.S. et al. Genomic instability and tumor-specific alterations in oral squamous cell carcinomas assessed by inter-(simple sequence repeat) PCR. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):1057–62.
48. Camussi G., Deregibus M.C., Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19(1):7–12.
49. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752–60.
50. Hao S., Ye Z., Li F. et al. Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Exp Oncol* 2006;28(2):126–31.
51. Jung T., Castellana D., Klingbeil P. et al. CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* 2009;11(10):1093–105.
52. Qu J.L., Qu X.J., Qu J.L. et al. The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Acta Oncol* 2009;48(8):1173–80.
53. Wöllert T., Hurley J.H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 2010;464(7290):864–9.
54. Katzmann D.J., Stefan C.J., Babst M., Emr S.D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* 2003;162(3):413–23.
55. Roma-Rodrigues C., Fernandes A.R., Baptista P.V. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:179486.
56. van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011;728(1–2):23–34.
57. Otranto M., Sarrazy V., Bonté F. et al. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 2012;6(3):203–19.
58. Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J. et al. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene* 2015;34(3):290–302.
59. Webber J., Steadman R., Mason M.D. et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010;70(23):9621–30.
60. Cho J.A., Park H., Lim E.H. et al. Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol Oncol* 2011;123(2):379–86.
61. Cho J.A., Park H., Lim E.H., Lee K.W. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012;40(1):130–8.
62. Gu J., Qian H., Shen L. et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF- $\beta$ /Smad pathway. *PLoS One* 2012;7(12):e52465.

63. Thuma F., Zoller M. Outsmart tumor exosomes to steal the cancer initiating cell its niche. *Semin Cancer Biol* 2014;28:39–50.
64. Luga V., Wrana J.L. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res* 2013;73(23):6843–7.
65. Abd Elmageed Z.Y., Yang Y., Thomas R. et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 2014;32(4):983–97.
66. Melo S.A., Sugimoto H., O'Connell J.T. et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;26(5):707–21.
67. Zhang X., Yuan X., Shi H. et al. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 2015;8:83.
68. Antonyak M.A., Li B., Borouh L.K. et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(12):4852–7.
69. Ji H., Greening D.W., Barnes T.W. et al. Proteome profiling of exosomes derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells reveal differential expression of key metastatic factors and signal transduction components. *Proteomics* 2013;13(10–11):1672–86.
70. Putz U., Howitt J., Doan A. et al. The tumor suppressor PTEN is exported in exosomes and has phosphatase activity in recipient cells. *Sci Signal* 2012;5(243):ra70.
71. Psaila B., Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):285–93.
72. Peinado H., Lavotshkin S., Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 2011;21(2):139–46.
73. Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883–91.
74. Zhou W., Fong M.Y., Min Y. et al. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell* 2014;25(4):501–15.
75. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95.
76. Luga V., Zhang L., Vitoria-Petit A.M. et al. Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell* 2012;151(7):1542–56.
77. Ono M., Kosaka N., Tominaga N. et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2014;7(332):ra63.
78. Schonemberger M.J., Kovacs W.J. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:42.
79. Zimna A., Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *Biomed Res Int* 2015;2015:549412.
80. Yang Y., Yang X., Yang Y. et al. Exosomes: a promising factor involved in cancer hypoxic microenvironments. *Curr Med Chem* 2015. [Epub ahead of print].
81. Vered M., Lehtonen M., Hotakainen L. et al. Caveolin-1 accumulation in the tongue cancer tumor microenvironment is significantly associated with poor prognosis: an *in-vivo* and *in-vitro* study. *BMC Cancer* 2015;15:25.
82. Ramteke A., Ting H., Agarwal C. et al. Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog* 2015;54(7):554–65.
83. Chiarini F., Lonetti A., Evangelisti C. et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta* 2015. [Epub ahead of print].
84. Belting M., Christianson H.C. Role of exosomes and microvesicles in hypoxia-associated tumour development and cardiovascular disease. *J Intern Med* 2015;278(3):251–63.
85. Yoon J.H., Kim J., Kim K.L. et al. Proteomic analysis of hypoxia-induced U373MG glioma secretome reveals novel hypoxia-dependent migration factors. *Proteomics* 2014;14(12):1494–502.
86. Svensson K.J., Kucharzewska P., Christianson H.C. et al. Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(32):13147–52.
87. King H.W., Michael M.Z., Gleadle J.M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* 2012;12:421.
88. Umezū T., Tadokoro H., Azuma K. et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* 2014;124(25):3748–57.
89. Aga M., Bentz G.L., Raffa S. et al. Exosomal HIF1 $\alpha$  supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* 2014;33(37):4613–22.
90. Tadokoro H., Umezū T., Ohyashiki K. et al. Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2013;288(48):34343–51.
91. Pasquier J., Galas L., Boulangé-Lecomte C. et al. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 2012;287(10):7374–87.
92. Corcoran C., Rani S., O'Brien K. et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. *PLoS One* 2012;7(12):e50999.
93. Ciravolo V., Huber V., Ghedini G.C. et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J Cell Physiol* 2012;227(2):658–67.
94. Dutta S., Reamtong O., Panvongsa W. et al. Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(9):1989–99.
95. Keerthikumar S., Gangoda L., Liem M. et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* 2015;6(17):15375–96.
96. Demory Beckler M., Higginbotham J.N., Franklin J.L. et al. Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Mol Cell Proteomics* 2013;12(2):343–55.
97. Villagrasa A., Álvarez P.J., Osuna A. et al. Exosomes derived from breast cancer cells, small trojan horses? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2014;19(3–4):303–13.
98. Chen W.X., Liu X.M., Lv M.M. et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PLoS One* 2014;9(4):e95240.
99. Zhao J.J., Lin J., Yang H. et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem* 2008;283(45):31079–86.
100. Wei Y., Lai X., Yu S. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147(2):423–31.
101. Семина С.Е., Багров Д.В., Красильников М.А. Межклеточные взаимодействия и развитие гормональной резистентности клеток рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):50–5. [Semina S.E., Bagrov D.V., Krasil'nikov M.A. Intercellular interactions and progression of hormonal resistance of breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2015;2(2):50–5. (In Russ.)].
102. Zhang W., Meng Y., Liu N. et al. Insights into chemoresistance of prostate cancer. *Int J Biol Sci* 2015;11(10):1160–70.
103. Hong S., Tan M., Wang S. et al. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(5):909–21.
104. Fakhoury M. Drug delivery approaches for the treatment of glioblastoma multiforme. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2015:1–9.

105. Batrakova E.V., Kim M.S. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* 2015. [Epub ahead of print].
106. Tila D., Ghasemi S., Yazdani-Arazi S.N. et al. Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery. *J Biomater Appl* 2015;30(1):3–16.
107. Urbanelli L., Buratta S., Sagini K. et al. Exosome-based strategies for diagnosis and therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2015;10(1):10–27.
108. Guo L., Guo N. Exosomes: Potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;95(3):346–58.
109. Lasser C. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications: biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle. *Exp Opin Biol Ther* 2015;15(1):103–17.
110. Gyorgy B., Hung M.E., Breakefield X.O., Leonard J.N. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:439–64.
111. Tian Y., Li S., Song J. et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014;35(7):2383–90.
112. Yang Y., Chen Y., Zhang F. et al. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress. *Int J Hyperthermia* 2015;31(5):498–506.
113. Pascucci L., Coccè V., Bonomi A. et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release* 2014;192:262–70.
114. Duchi S., Dambrosio P., Martella E. et al. Thiophene-based compounds as fluorescent tags to study mesenchymal stem cell uptake and release of taxanes. *Bioconjug Chem* 2014;25(4):649–55.
115. Sun D., Zhuang X., Xiang X. et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 2010;18(9):1606–14.
116. Dai S., Wei D., Wu Z. et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 2008;16(4):782–90.
117. Escudier B., Dorval T., Chaput N. et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med* 2005;3(1):10.
118. Núñez-Sánchez M.A., González-Sarriás A., Romo-Vaquero M. et al. Dietary phenolics against colorectal cancer – from promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol Nutr Food Res* 2015;59(7):1274–91.
119. Bandyopadhyay D. Farmer to pharmacist: curcumin as an anti-invasive and antimetastatic agent for the treatment of cancer. *Front Chem* 2014;2:113.
120. Shehzad A., Wahid F., Lee Y.S. Curcumin in cancer chemoprevention: molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials. *Arch Pharm(Weinheim)* 2010;343(9):489–99.
121. Pitt J.M., Charrier M., Viaud S. et al. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol* 2014;193(3):1006–11.
122. Shender V.O., Pavlyukov M.S., Ziganshin R.H. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(12):3558–71.

© А.А. ШЕПТУЛИН, 2014  
УДК 616.1/8-022:579.835.12

## **ИНФЕКЦИЯ *HELICOBACTER PYLORI*: ЧТО ЕЩЕ, КРОМЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕЛУДКА?**

*Шептулин А.А.*

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России

---

*Установлено значение инфекции *Helicobacter pylori* (HP) в возникновении хронического гастрита, язвенной болезни, MALT-лимфомы и рака желудка. В последние годы изучалась возможная роль HP-инфекции в развитии других заболеваний. Выявлена доказанная или вероятная положительная связь HP-инфекции с такими заболеваниями, как аденома толстой кишки и колоректальный рак, болезни печени, ишемическая болезнь сердца, идиопатическая железододефицитная анемия и идиопатическая тромбоцитопения. Значение HP-инфекции в развитии гастроэзофагеальной рефлюксной болезни пока еще однозначно не определено. В то же время обнаружена отрицательная связь между HP-инфекцией и бронхиальной астмой, а также хроническими воспалительными заболеваниями кишечника. Патофизиологические и клинические аспекты взаимоотношений HP-инфекции и названных заболеваний требуют дальнейших исследований.*

*Ключевые слова: *Helicobacter pylori*; гастроэнтерологические и негастроэнтерологические заболевания.*

### **HELICOBACTER PYLORI INFECTION: WHAT ELSE BESIDES GASTRIC PROBLEMS?**

*A.A. Sheptulin*

I.M. Sechneov First Moscow State Medical University, Russia

*The role of *Helicobacter pylori* infection (HPI) in the development of chronic gastritis, ulcer disease, MALT-lymphoma, stomach cancer, and other diseases is considered. HPI is directly or indirectly associated with colon adenoma and colorectal cancer, hepatic disorders, coronary heart disease, idiopathic iron deficiency anemia and thrombocytopenia. The role of HPI in the development of gastroesophageal reflux disease remains to be elucidated. HPI is negatively related to bronchial asthma and chronic inflammatory intestinal diseases. Pathophysiological and clinical aspects of HPI and the aforementioned pathologies await further investigations.*

*Key words: *Helicobacter pylori*; gastroenterological and other diseases.*



В настоящее время определена связь инфекции *Helicobacter pylori* (*HP*) с развитием хронического гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, MALT-лимфомы и рака желудка. Проведение эрадикации *HP* при этих заболеваниях признано обязательным, поскольку оно приводит к прекращению рецидивирования язвенной болезни, предотвращает дальнейшее прогрессирование хронического гастрита, уменьшает риск развития рака желудка, вызывает регрессию MALT-лимфомы желудка. Вместе с тем в последние годы изучалась возможная связь *HP*-инфекции с другими, в том числе негастроэнтерологическими заболеваниями, и результаты проведенных исследований оказались неоднозначными, а порой и прямо противоположными [1]. В зависимости от полученных результатов все изучавшиеся гастроэнтерологические и негастроэнтерологические заболевания можно разделить на 3 группы: заболевания с доказанным или возможным неблагоприятным влиянием *HP*-инфекции на их развитие; заболевания, при которых роль *HP*-инфекции пока еще однозначно не определена; заболевания, в развитии которых *HP*-инфекция играет, возможно, прогностическую роль.

К гастроэнтерологическим заболеваниям, в развитии которых определено доказано или возможно участие *HP*-инфекции, следует в первую очередь отнести злокачественные опухоли и аденомы толстой кишки.

Проведенный метаанализ 10 исследований показал, что относительный риск (ОР) развития аденом толстой кишки у *HP*-положительных лиц выше, чем у *HP*-отрицательных, и составляет 1,58 [2]. Сравнительное исследование, проведенное недавно в Германии и включившее 1712 больных с колоректальным раком и 1669 здоровых лиц контрольной группы, позволило сделать вывод о более высоком риске развития рака левых отделов толстой кишки при наличии *HP*-инфекции (ОР 1,22) [3]. Самое крупное исследование, в которое вошли 156 000 больных, подвергшихся гастроскопии и колоноскопии, дало основание заключить, что при наличии *HP*-ассоциированного хронического гастрита ОР развития гиперпластических полипов составляет 1,24, аденоматозных полипов — 1,52, ворсинчатых аденом и аденом с высокой степенью дисплазии — 1,97, аденокарциномы толстой кишки — 2,35 [4].

Единственная выдвинутая гипотеза объясняет повышенный риск развития аденом и рака толстой кишки при наличии *HP*-инфекции возникающей гипергастринемией и последующим изменением вследствие этого пролиферативной активности колоноцитов [4—6]. Эта гипотеза подкрепляется экспериментальными данными, свидетельствующими о способности гастрин усилять пролиферацию клеток опухолей толстой кишки [7].

Большой интерес представляют взаимоотношения между *HP*-инфекцией и заболеваниями печени и желчевыводящих путей. Так, была выявлена независимая связь между обнаружением ДНК *HP* в гепатоцитах и вирусными гепатитами В и С, причем характеристики микроорганизмов, найденных в гепатоцитах, совпада-

ли с таковыми у бактерий, выделенных со слизистой оболочки желудка. По мнению авторов, это свидетельствует о ретроградном пути их проникновения в печень. Примечательно, что у больных с алкогольным поражением печени и аутоиммунным гепатитом ДНК *HP* в гепатоцитах обнаружить не удалось [8].

Показано, что обнаружение ДНК *CagA*-штамма *HP* в гепатоцитах у больных с инфекцией вирусом гепатита С ассоциировано с большей выраженностью поражений печени по шкале METAVIR, что может свидетельствовать об участии *HP* в прогрессировании вирусного гепатита С и цирроза печени [9].

Достоверно более высокая частота выявления антител к *HP* у больных с первичным билиарным циррозом по сравнению с показателями у лиц контрольной группы (соответственно 54 и 31%) может свидетельствовать, по мнению некоторых авторов, об участии иммунного ответа на *HP*-инфекцию в патогенезе указанного заболевания [10].

Изучалась связь между начальными проявлениями печеночной энцефалопатии и уровнем аммиака в крови у больных с циррозом печени, с одной стороны, и их инфицированностью *HP* — с другой. Оказалось, что у таких пациентов *HP*-инфекция выявлялась значительно чаще, чем у больных без признаков печеночной энцефалопатии (соответственно в 63 и 37% случаев), а уровень аммиака в крови был существенно выше. Эрадикация *HP* приводила к снижению уровня аммиака в крови и улучшению результатов психометрических проб [11]. Правда, метаанализ 9 исследований, включивших 699 больных с циррозом печени, не подтвердил положительного влияния эрадикации *HP* на уровень аммиака в крови [12].

*HP* был обнаружен в желчи, слизистой оболочке желчного пузыря, а также в самих желчных конкрементах, в связи с чем эта инфекция рассматривается сейчас как один из факторов патогенеза желчно-каменной болезни, который способствует развитию воспаления в желчном пузыре и изменению коллоидных свойств желчи [13].

Метаанализ 10 исследований, выполненных в период с 2002 по 2011 г., подтвердил более высокую частоту *HP*-инфекции у больных со злокачественными новообразованиями желчного пузыря и желчных протоков [14]. При этом обнаружение ДНК *HP* у больных с холангиокарциномой коррелировало с более выраженной экспрессией маркера клеточной пролиферации Ki67 [15].

Некоторые авторы полагают, что о возможной роли *HP* в развитии упомянутых опухолей свидетельствует резкое снижение заболеваемости раком желчного пузыря в Голландии за последние 30 лет. В значительной мере это объясняется увеличением частоты ранних холецистэктомий при желчно-каменной болезни, но нельзя не отметить, что этот процесс протекает параллельно со снижением инфицированности *HP* и уменьшением частоты рака желудка [16].

Значительное число исследований было посвящено изучению возможной связи между *HP*-инфекцией и

ишемической болезнью сердца (ИБС). Было не только подтверждено более частое обнаружение *HP* у больных ИБС, но и выявлена корреляция между наличием этой инфекции и толщиной стенки сонной артерии, выраженностью кальциноза коронарных артерий по данным компьютерной томографии, показано уменьшение вероятности развития их рестеноза после эрадикации *HP* [17—19].

Идентифицированы факторы, с помощью которых *HP*-инфекция способна реализовывать свое неблагоприятное влияние в отношении развития ИБС. К ним, в частности, были отнесены повышение уровня общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, триглицеридов, аполипопротеина В, С-реактивного белка [20, 21]. Кроме того, показано, что *HP* может связываться с фактором Виллебранда и увеличивать агрегационную способность тромбоцитов. Вырабатываемые микроорганизмами цитокины и цитотоксины оказывают повреждающее действие на эндотелий сосудов, а антитела к *HP* могут давать перекрестные реакции с белками теплового шока. Наконец, ДНК *HP* была обнаружена в атеросклеротических бляшках [19, 22].

Тем не менее противоречивость результатов не позволила согласительному совещанию Европейской рабочей группы по изучению *HP*-инфекции «Маастрихт-4» считать доказанной патогенетическую роль *HP*-инфекции в развитии ИБС [23]. Недавно опубликованные данные когортных исследований большой популяционной группы (9953 человека) не подтвердили наличие корреляции между *HP*-инфекцией и уровнем смертности от сердечно-сосудистых заболеваний [24].

Можно считать доказанной связь между *HP*-инфекцией и такими заболеваниями, как идиопатическая (т.е. без установленной определенной причины) железodefицитная анемия и идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура. Проведенный метаанализ 15 исследований (из них 5 рандомизированных контролируемых исследований) выявил положительную связь между идиопатической железodefицитной анемией и *HP*-инфекцией и эффективность проведения в таких случаях эрадикации *HP*, способствующей повышению уровня гемоглобина и более быстрому ответу на терапию препаратами железа [25, 26].

В качестве основного фактора, приводящего к развитию идиопатической железodefицитной анемии при *HP*-инфекции, рассматривается уменьшение всасывания железа в условиях измененного внутрижелудочного рН [27]. Другой возможной причиной считается способность *HP*-инфекции вызывать окислительный стресс с последующим повышением уровня малонового альдегида и снижением уровня ферритина [28].

Согласительное совещание «Маастрихт-4» определило уровень доказательности связи идиопатической железodefицитной анемии и *HP*-инфекции как очень высокий (1a), подтвержденный рандомизированными контролируемыми исследованиями [23]. Британская гастроэнтерологическая ассоциация рекомендовала обязательное тестирование на *HP*-инфекцию во время

проведения гастроскопии у больных с железodefицитной анемией с последующей эрадикацией в случае ее подтверждения [29].

Длительно протекающая *HP*-инфекция может приводить к атрофическим изменениям в слизистой оболочке тела желудка и становится, таким образом, одним из факторов, способствующих развитию  $V_{12}$ -дефицитной анемии [30]. Согласительное совещание «Маастрихт-4» отметило возможность такой связи, хотя и посчитало уровень ее доказательности очень низким (3b) [23].

Что касается идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, то ее связь с *HP*-инфекцией в настоящее время считается установленной (уровень доказательности 1b, согласно согласительному совещанию «Маастрихт-4»), и проведение эрадикации у таких больных дает прекрасный отдаленный эффект [31]. Причинным фактором развития идиопатической тромбоцитопенической пурпуры при *HP*-инфекции считаются перекрестные реакции антител к *HP* с тромбоцитами (по типу молекулярной мимикрии), способствующие агрегации тромбоцитов и их апоптозу [32, 33].

В последние годы опубликовано большое число работ, посвященных возможной связи между *HP*-инфекцией и такими заболеваниями, как сахарный диабет и метаболический синдром. Несмотря на то что систематический обзор 9 исследований подтвердил существование корреляции между *HP*-инфекцией и наличием инсулинорезистентности [34], в других публикациях, посвященных частоте *HP*-инфекции при сахарном диабете и метаболическом синдроме, ее связи с нарушениями моторики желудка, осложнениями сахарного диабета, а также уровнем грелина и лептина, изменению массы тела больных после эрадикации *HP*, приведены противоречивые результаты, что обусловило заключение о необходимости продолжения исследования указанной проблемы [35, 36].

Спорной остается также связь между *HP*-инфекцией и такими неврологическими заболеваниями, как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера. Предполагается, что *HP* за счет высвобождения провоспалительных цитокинов — интерлейкинов 1 $\beta$ , 6, фактора некроза опухолей  $\alpha$  — может косвенно оказывать воздействие на нервную ткань. Кроме того, антитела к *HP* могут путем молекулярной мимикрии перекрестно реагировать с дофаминергическими нейронами, способствуя в итоге развитию нейродегенеративных заболеваний [37, 38].

Многовариантный анализ показал, что у больных с *HP*-инфекцией отмечается более высокий риск возникновения болезни Альцгеймера (ОР 1,45) [39]. При наличии *HP*-инфекции у больных с указанным заболеванием наблюдаются более выраженные когнитивные нарушения, а эрадикация *HP* позволяет повысить выживаемость у таких пациентов [40, 41]. Правда, другие исследования, выполненные в Японии и включавшие большую группу пациентов с болезнью Альцгеймера (385 человек), не подтвердили более высокую частоту выявления у них *HP*-инфекции [42].

Более высокая частота выявления антител к *HP* у беременных с преэклампсией послужила основанием для предположения о возможной роли *HP*-инфекции в развитии этого осложнения. Как известно, патогенез преэклампсии беременных продолжает оставаться недостаточно ясным: в нем принимают участие такие факторы, как эндотелиальная дисфункция, повышение артериального давления, нарушение коагуляции. Возможная роль *HP*-инфекции в таких случаях сводится к ее способности повышать агрегацию тромбоцитов, а также вызывать развитие перекрестных реакций между антителами к *HP* и клетками цитотрофобласта [43, 44].

Ко второй группе заболеваний, в развитии которых роль *HP*-инфекции до сих пор четко не определена, относится гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ). Начало исследований, посвященных этой проблеме, датируется 1997 г., когда J. Labenz и соавт. [45] опубликовали данные, согласно которым у больных язвенной болезнью в течение 3 лет после эрадикации *HP* вдвое возрастает частота ГЭРБ. После этого на страницы журналов хлынул поток публикаций, посвященных этому вопросу. Большую популярность получила точка зрения о протективном действии *HP*-инфекции в отношении развития ГЭРБ. В частности, показано наличие отрицательной связи между *HP*-инфекцией и относительным риском возникновения рефлюкс-эзофагита (ОР 0,67), пищевода Барретта (ОР 0,46) и аденокарциномы пищевода (ОР 0,516) [46].

В качестве причин, способствующих возникновению ГЭРБ после эрадикации *HP*, называют обусловленные ею повышение секреции соляной кислоты за счет уменьшения выраженности фундального гастрита и снижение тонуса нижнего пищеводного сфинктера в результате уменьшения продукции гастрина, что в итоге провоцирует гастроэзофагеальный рефлюкс соляной кислоты. Последующие работы, однако, показали, что тонус нижнего пищеводного сфинктера после эрадикации *HP* не снижается и продолжительность времени снижения рН в пищеводе менее 4,0 в таких случаях не возрастает [47, 48]. Это дало некоторым авторам основание назвать гипотезу о повышении частоты кислого гастроэзофагеального рефлюкса после эрадикации *HP* «сказкой о безумной соляной кислоте» (tale of crazy acid) [49].

Проблеме связи *HP*-инфекции и ГЭРБ был посвящен специальный раздел согласительного совещания «Маастрихт-4». Согласно его заключению, *HP*-инфекция действительно реже встречается у больных ГЭРБ и правомерно говорить об отрицательной связи между этой инфекцией и такими заболеваниями, как пищевод Барретта и аденокарцинома пищевода. В то же время, согласно рекомендациям указанного совещания, нет связи между наличием или отсутствием *HP*-инфекции и выраженностью симптомов ГЭРБ и эффективностью ее лечения. Эрадикация *HP* не вызывает развития ГЭРБ и не способствует ее обострению, поэтому наличие ГЭРБ не должно служить препятствием для проведения эра-

дикации *HP*, если для этого есть соответствующие показания [23].

Последние публикации по проблеме связи *HP*-инфекции и ГЭРБ остаются противоречивыми. Приводятся данные как о протективной роли *HP*-инфекции в развитии ГЭРБ, так и о неблагоприятном влиянии этой инфекции на течение заболевания [50—53]. Недавно опубликованный метаанализ 10 исследований привел к заключению, что частота симптомов ГЭРБ после эрадикации *HP* оказывается ниже, чем у тех больных, у которых ее не проводили [54]. По-видимому, эта проблема пока еще далека от своего окончательного решения.

В группе заболеваний, для которых характерна отрицательная связь с *HP*-инфекцией, можно назвать бронхиальную астму и хронические воспалительные заболевания кишечника.

Результаты нескольких метаанализов свидетельствовали о более низком риске развития бронхиальной астмы при наличии *HP*-инфекции. При этом показатели ОР составили 0,81 для детей и 0,84—0,88 для взрослых [55—57]. По мнению ряда авторов, возможный протективный механизм действия *HP* при бронхиальной астме реализуется через Т-супрессорные клетки; *HP* ускользает от адаптивного иммунного ответа, репрограммируя дендритные клетки, что ведет к повышению иммунотолерантности [58].

В экспериментальных исследованиях, выполненных на мышах, показано, что *HP* уменьшает гиперчувствительность бронхов и предупреждает бронхоальвеолярную инфильтрацию эозинофилами и Th2- и Th17-лимфоцитами при действии аллергенов, причем эта способность исчезает после эрадикации *HP* [59]. После опубликования этих данных выдвинутое предположение, что рост заболеваемости бронхиальной астмой, наблюдаемый в последние годы, является в какой-то мере одним из последствий эрадикации *HP*, уже не выглядит столь уж нелепым.

T. Rokkas [5] привел результаты метаанализа 35 работ, подтвердивших наличие отрицательной связи между *HP*-инфекцией и хроническими воспалительными заболеваниями кишечника. При этом показатели ОР для неспецифического язвенного колита составили 0,516, для болезни Крона — 0,405. Убедительного объяснения этих данных пока еще не представлено, однако предполагается, что протективное действие *HP* в данном случае также реализуется через иммунные механизмы.

Таким образом, обзор публикаций последних лет показывает, что, с одной стороны, проблема связи *HP*-инфекции с развитием заболеваний выходит далеко за пределы заболеваний желудка, а с другой стороны, эта связь может быть очень неоднозначной. Конечно, преждевременно пока еще говорить о протективной роли *HP*-инфекции при некоторых заболеваниях, но установленная отрицательная корреляция между их возникновением и *HP*-инфекцией требует своего объяснения, что невозможно сделать без дальнейших патофизиологических и клинических исследований.

## Сведения об авторе:

Шептулин Аркадий Александрович — д-р мед. наук, проф. каф. пропедевтики внутренних болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; e-mail: arkalshep@gmail.com

## ЛИТЕРАТУРА

1. Циммерман Я.С. *Helicobacter pylori*-инфекция: внежелудочные эффекты и заболевания (критический анализ). В кн.: Циммерман Я.С. *Нерешенные и спорные проблемы современной гастроэнтерологии*. М.; 2013: 187—99.
2. Hong S.N., Lee S.M., Kim J.H. et al. *Helicobacter pylori* infection increases the risk of colorectal adenomas: cross-sectional study and meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57(8): 2184—94.
3. Zhang Y., Hoffmeister W., Weck M.N. et al. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: evidence from a large population-based case-control study in Germany. *Am. J. Epidemiol.* 2012; 175: 441—50.
4. Sonnenberg A., Genta R.M. *Helicobacter pylori* is a risk factor for colonic neoplasms. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108: 208—15.
5. Rokkas T. H.pylori and the colon. In: *Symposium «H. pylori infection and reas of uncertainties & controversies». XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group*. Ljubljana; 2012.
6. Selgard M., Bornschein J., Rokkas Th., Malfertheiner P. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and extragastric intestinal malignancies. *Helicobacter*. 2012; 17 (Suppl. 1): 30—5.
7. Chueca E., Lanas A., Piazuelo E. Role of gastrin-peptides in Battett's and colorectal carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18: 6560—70.
8. Silva L.D., Rocha A.M., Rocha G.A. The presence of *Helicobacter pylori* in the liver depends on the Th1, Th17 and Treg cytokine profile on the patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106: 748—54.
9. Esmat G., El-Bendary M., Zakarya S. et al. Role of *Helicobacter pylori* in patients with HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma: possible association with disease progression. *J. Viral Hepat.* 2012; 19: 473—79.
10. Shapira Y., Agmon-Levin N., Renaudineau Y. et al. Serum markers of infections in patients with primary biliary cirrhosis: evidence of infection burden. *Exp. Mol. Pathol.* 2012; 93: 386—90.
11. Agrawal A., Gupta A., Chandra M., Koowar S. Role of *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of minimal hepatic encephalopathy and effect of its eradication. *Indian J. Gastroenterol.* 2011; 30: 29—32.
12. Qin S.Y., Jiang H.X., Ning H.J. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on blood ammonia levels in cirrhotic patients: a systemic review. *Hepatogastroenterology.* 2012; 59: 2576—81.
13. Lee J.W., Lee D.H., Lee J.I. et al. Identification of *Helicobacter pylori* in gallstone, bile and other hepatobiliary tissues of patients with cholecystitis. *Gut Liver.* 2010; 4: 60—7.
14. Zhou D., Wang J.D., Weng M.Z. et al. Infections of *Helicobacter spp.* in the biliary system are associated with biliary tract cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 25: 447—54.
15. Boonyanugomol W., Chomvarin C., Stripa B. et al. *Helicobacter pylori* in Thai patients with cholangiocarcinoma and its association with biliary inflammation and proliferation. *HPB (Oxford)*. 2012; 14: 177—84.
16. Alexander S., Lemmens V.E., Houterman S. et al. Gallbladder cancer: a vanishing disease? *Cancer Causes Control.* 2012; 23: 1705—9.
17. Chen B.F., Xu X., Deng Y. et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and serum interleukin-18 in patients with carotid atherosclerosis. *Helicobacter*. 2013; 18: 124—8.
18. Park M.J., Choi S.H., Kim D. et al. Association between *Helicobacter pylori* seropositivity and the coronary artery calcium score in a screening population. *Gut Liver.* 2011; 5: 321—7.
19. Kowalski M., Pawlik M., Konturek M., Konturek S. *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57 (Suppl. 3): 101—11.
20. Al-Ghamdy A., Jiman-Fatani A.A., El-Banna H. Role of Chlamydia pneumonia, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus in coronary artery disease. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2011; 24: 95—101.
21. Huang B., Chen Y., Xie Q. et al. CagA-positive *Helicobacter pylori* strains enhanced coronary atherosclerosis by increasing serum Ox-LDL and HsCRP in patients with coronary heart disease. *Dig. Dis. Sci.* 2011; 56: 109—14.
22. Fagoonee S., De Angelis C., Elia C. et al. Potential link between *Helicobacter pylori* and ischemic heart disease: does the bacterium elicit thrombosis? *Minerva Med.* 2011; 101: 121—5.
23. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht IV Florence Consensus report. *Gut.* 2012; 61: 646—64.
24. Schöttker B., Adamu M.A., Weck M.N. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and major cardiovascular events: a population-based cohort study. *Atherosclerosis.* 2012; 220: 569—74.
25. Qu X.H., Huang X.L., Xiong P. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16: 886—96.
26. Xia W., Vilchis J., Mera R. et al. Survey of anaemia and *Helicobacter pylori* infection in adolescent girls in Suihua, China and enhancement of iron intervention effects by H. pylori eradication. *Br. J. Nutr.* 2012; 108: 357—62.
27. Vitale G., Barbaro F., Ianiro G. et al. Nutritional aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2011; 57: 369—77.
28. Soundaravally R., Pukazhvandthen P., Zachariah B., Hamide A. *Helicobacter pylori* infection among school children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2013; 56: 519—22.
29. Goddard A.F., James M.W., McIntyre A.S., Scott B.B. British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anemia. *Gut.* 2011; 60: 1309—16.
30. Lahner E., Annibale B. Pernicious anemia: new insights from a gastroenterological point of view. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15: 5121—8.
31. Kikushi T., Kobayashi T., Yamashita T. et al. Eight-year follow-up of patients with immune thrombocytopenic purpura related to H. pylori infection. *Platelets.* 2011; 22: 59—62.
32. Franceschi F., Christodoulides N., Kroll M.H., Genta R.M. *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 766—7.
33. Ahn Y.S. Triple play of H. pylori in ITP. *Blood.* 2010; 115(21): 4155—56.
34. Polyzos S.A., Kountouras J., Zavos C., Deretzi G. The association between *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance: a systemic review. *Helicobacter.* 2011; 16: 79—88.
35. Albaker W.I. *Helicobacter pylori* infection and its relationship to metabolic syndrome: is it a myth or fact. *Saudi J. Gastroenterol.* 2011; 17: 165—9.
36. Papamichael K.X., Papaioannou G., Karga H. et al. *Helicobacter pylori* infection and endocrine disorders: is there a link? *World J. Gastroenterol.* 2009; 15: 2101—7.
37. Kountouras J., Zavos C., Deretzi G. et al. *Helicobacter pylori* may play an important role in both axonal type Guillain-Barre syndrome and acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2011; 113: 520.
38. Nielsens H.H., Qui J. Treatment of *Helicobacter pylori* infection and risk of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurology.* 2012; 19: 864—9.
39. Letenneur L. H.pylori & the brain. In: *Symposium «H. pylori infection and areas of uncertainties & controversies». XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group*. Ljubljana; 2012.
40. Roubaud-Baudron C., Krolak-Salmon P., Quadrio I. et al. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection in Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol. Aging.* 2012; 33: 1009—19.
41. Kountouras J., Boziki M., Gavalas E. et al. Five-year survival after *Helicobacter pylori* eradication in Alzheimer disease patients. *Cogn. Behav. Neurol.* 2010; 23: 199—204.
42. Shiota S., Murakami K., Yoshiwa A. et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J. Neurol.* 2011; 258: 1460—3.
43. DenHollander W.J., Schalekamp-Timmermans S., Holster I.L. *Helicobacter pylori* colonization and pre-eclampsia: the generation R study. XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group. Madrid, 2012. Abstracts. *Helicobacter.* 2013; 18 (Suppl. 1): 115.
44. Franceschi F., Di Simone N., D'Ippolito S. et al. Antibodies anti-Cag A cross-react with trophoblast cells: a risk factor for pre-eclampsia? *Helicobacter.* 2012; 17: 426—34.
45. Labenz J., Blum A.L., Bayerdörffer E. et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology.* 1997; 112: 1442—7.
46. Atherton J. *Critical views on the potential benefits of H. pylori infection*. *Symposium «H. pylori infection and areas of uncertainties & controversies». XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group*. Ljubljana; 2012.



47. Wu J.C., Cham F.K., Wong S.K. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on esophageal acid exposure in patients with reflux esophagitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 545—52.
48. Grande M., Cadeddu F., Villa M. et al. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease. *World J. Surg. Oncol.* 2008; 6: 74—81.
49. Zullo A., Hassan Z., Repici A., Bruzzese V. *Helicobacter pylori* eradication and reflux disease onset: Did gastric acid get «crazy». *World J. Gastroenterol.* 2013; 19: 86—9.
50. Chyng S.J., Lim S.H., Choi J. et al. *Helicobacter pylori* serology inversely correlated with the risk and severity of reflux esophagitis in *Helicobacter pylori* endemic area: a matched case-control study of 5616 health check-up Koreans. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2011; 17: 267—73.
51. Ashktorab H., Entezari O., Nouraei M. et al. *Helicobacter pylori* protection against reflux esophagitis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57: 2924—8.
52. Wang P.C., Hs C.S., Tseng T.C. et al. Male sex, hiatus hernia and *Helicobacter pylori* infection associated with asymptomatic erosive esophagitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27: 586—91.
53. Polat F.R., Polat S. The effect of *Helicobacter pylori* on gastroesophageal reflux disease. *JSLs.* 2012; 16: 260—3.
54. Saad A.M., Choudhary A., Bechtold M.L. Effect of *Helicobacter pylori* treatment on gastroesophageal reflux disease (GERD): meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand. J. Gastroenterol.* 2012; 47: 129—35.
55. Zevit N., Balicer R.D., Cohen H.A. et al. Inverse association between *Helicobacter pylori* and pediatric asthma in a high prevalence population. *Helicobacter.* 2012; 17: 30—5.
56. Wang Q., Yu J., Zhang G. Association between asthma and *Helicobacter pylori*: a meta-analysis. *Helicobacter.* 2013; 18: 41—53.
57. Zhou X., Wu J., Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 3: 460—8.
58. Oertly M., Müller A. *Helicobacter pylori* targets dendritic cells to induce immunotolerance, promote persistence and confer protection against allergic asthma. *Gut Microbes.* 2012; 3: 566—71.
59. Arnold I.C., Dehzad N., Reuter S. et al. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 3088—93.

## REFERENCES

1. Zimmerman Ya.S. *Helicobacter pylori* infection: a wioleotnie effects and diseases (a critical analysis) // In: *Zimmerman Ya.S. Outstanding and controversial problems of modern gastroenterology.* M.: 2013: 187—99 (in Russian).
2. Hong S.N., Lee S.M., Kim J.H. et al. *Helicobacter pylori* infection increases the risk of colorectal adenomas: cross-sectional study and meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57(8): 2184—94.
3. Zhang Y., Hoffmeister W., Weck M.N. et al. *Helicobacter pylori* infection and colorectal cancer risk: evidence from a large population-based case-control study in Germany. *Am. J. Epidemiol.* 2012; 175: 441—50.
4. Sonnenberg A., Genta R.M. *Helicobacter pylori* is a risk factor for colonic neoplasms. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108: 208—15.
5. Rokkas T. H. *pylori* and the colon. In: *Symposium «H. pylori infection and reas of uncertainties & controversies». XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group.* Ljubljana; 2012.
6. Selgard M., Bornschein J., Rokkas Th., Malfertheiner P. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and extragastric intestinal malignancies. *Helicobacter.* 2012; 17 (Suppl. 1): 30—5.
7. Chueca E., Lanás A., Piazuelo E. Role of gastrin-peptides in Battett's and colorectal carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2012; 18: 6560—70.
8. Silva L.D., Rocha A.M., Rocha G.A. The presence of *Helicobacter pylori* in the liver depends on the Th1, Th17 and Treg cytokine profile on the patient. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106: 748—54.
9. Esmat G., El-Bendary M., Zakarya S. et al. Role of *Helicobacter pylori* in patients with HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma: possible association with disease progression. *J. Viral Hepat.* 2012; 19: 473—79.
10. Shapira Y., Agmon-Levin N., Renaudineau Y. et al. Serum markers of infections in patients with primary biliary cirrhosis: evidence of infection burden. *Exp. Mol. Pathol.* 2012; 93: 386—90.
11. Agrawal A., Gupta A., Chandra M., Koowar S. Role of *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of minimal hepatic encephalopathy and effect of its eradication. *Indian J. Gastroenterol.* 2011; 30: 29—32.
12. Qin S.Y., Jiang H.X., Ning H.J. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on blood ammonia levels in cirrhotic patients: a systemic review. *Hepatogastroenterology.* 2012; 59: 2576—81.
13. Lee J.W., Lee D.H., Lee J.I. et al. Identification of *Helicobacter pylori* in gallstone, bile and other hepatobiliary tissues of patients with cholecystitis. *Gut Liver.* 2010; 4: 60—7.
14. Zhou D., Wang J.D., Weng M.Z. et al. Infections of *Helicobacter spp.* in the biliary system are associated with biliary tract cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 25: 447—54.
15. Boonyanugomol W., Chomvarin C., Stripa B. et al. *Helicobacter pylori* in Thai patients with cholangiocarcinoma and its association with biliary inflammation and proliferation. *HPB (Oxford).* 2012; 14: 177—84.
16. Alexander S., Lemmens V.E., Houterman S. et al. Gallbladder cancer: a vanishing disease? *Cancer Causes Control.* 2012; 23: 1705—9.
17. Chen B.F., Xu X., Deng Y. et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and serum interleukin-18 in patients with carotid atherosclerosis. *Helicobacter.* 2013; 18: 124—8.
18. Park M.J., Choi S.H., Kim D. et al. Association between *Helicobacter pylori* seropositivity and the coronary artery calcium score in a screening population. *Gut Liver.* 2011; 5: 321—7.
19. Kowalski M., Pawlik M., Konturek M., Konturek S. *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57 (Suppl. 3): 101—11.
20. Al-Ghamdy A., Jiman-Fatani A.A., El-Banna H. Role of Chlamydia pneumonia, *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus in coronary artery disease. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2011; 24: 95—101.
21. Huang B., Chen Y., Xie Q. et al. CagA-positive *Helicobacter pylori* strains enhanced coronary atherosclerosis by increasing serum Ox-LDL and HsCRP in patients with coronary heart disease. *Dig. Dis. Sci.* 2011; 56: 109—14.
22. Fagoonee S., De Angelis C., Elia C. et al. Potential link between *Helicobacter pylori* and ischemic heart disease: does the bacterium elicit thrombosis? *Minerva Med.* 2011; 101: 121—5.
23. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht IV Florence Consensus report. *Gut.* 2012; 61: 646—64.
24. Schöttker B., Adamu M.A., Weck M.N. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and major cardiovascular events: a population-based cohort study. *Atherosclerosis.* 2012; 220: 569—74.
25. Qu X.H., Huang X.L., Xiong P. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16: 886—96.
26. Xia W., Vilchis J., Mera R. et al. Survey of anaemia and *Helicobacter pylori* infection in adolescent girls in Suihua, China and enhancement of iron intervention effects by *H. pylori* eradication. *Br. J. Nutr.* 2012; 108: 357—62.
27. Vitale G., Barbaro F., Ianiro G. et al. Nutritional aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 2011; 57: 369—77.
28. Soundaravally R., Pukazhvandthen P., Zachariah B., Hamide A. *Helicobacter pylori* infection among school children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2013; 56: 519—22.
29. Goddard A.F., James M.W., McIntyre A.S., Scott B.B. British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anemia. *Gut.* 2011; 60: 1309—16.
30. Lahner E., Annibale B. Pernicious anemia: new insights from a gastroenterological point of view. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15: 5121—8.
31. Kikushi T., Kobayashi T., Yamashita T. et al. Eight-year follow-up of patients with immune thrombocytopenic purpura related to *H. pylori* infection. *Platelets.* 2011; 22: 59—62.
32. Franceschi F., Christodoulides N., Kroll M.H., Genta R.M. *Helicobacter pylori* and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 766—7.
33. Ahn Y.S. Triple play of *H. pylori* in ITP. *Blood.* 2010; 115(21): 4155—56.
34. Polyzos S.A., Kountouras J., Zavos C., Deretzi G. The association between *Helicobacter pylori* infection and insulin resistance: a systemic review. *Helicobacter.* 2011; 16: 79—88.
35. Albaker W.I. *Helicobacter pylori* infection and its relationship to metabolic syndrome: is it a myth or fact. *Saudi J. Gastroenterol.* 2011; 17: 165—9.
36. Papamichael K.X., Papaioannou G., Karga H. et al. *Helicobacter pylori* infection and endocrine disorders: is there a link? *World J. Gastroenterol.* 2009; 15: 2101—7.
37. Kountouras J., Zavos C., Deretzi G. et al. *Helicobacter pylori* may play an important role in both axonal type Guillain-Barre syndrome and acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2011; 113: 520.
38. Niessen H.H., Qui J. Treatment of *Helicobacter pylori* infection and risk of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurology.* 2012; 19: 864—9.

39. Letenneur L. *H. pylori* & the brain. In: *Symposium «H. pylori infection and areas of uncertainties & controversies». XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group*. Ljubljana; 2012.
40. Roubaud-Baudron C., Krolak-Salmon P., Quadrio I. et al. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection in Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol. Aging*. 2012; 33: 1009—19.
41. Kountouras J., Boziki M., Gavalas E. et al. Five-year survival after *Helicobacter pylori* eradication in Alzheimer disease patients. *Cogn. Behav. Neurol.* 2010; 23: 199—204.
42. Shiota S., Murakami K., Yoshiwa A. et al. The relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer's disease in Japan. *J. Neurol.* 2011; 258: 1460—3.
43. DenHollander W.J., Schalekamp-Timmermans S., Holster I.L. *Helicobacter pylori* colonization and pre-eclampsia: the generation R study. XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group. Madrid, 2012. Abstracts. *Helicobacter*. 2013; 18 (Suppl. 1): 115.
44. Franceschi F., Di Simone N., D'Ippolito S. et al. Antibodies anti-Cag A cross-react with trophoblast cells: a risk factor for pre-eclampsia? *Helicobacter*. 2012; 17: 426—34.
45. Labenz J., Blum A.L., Bayerdörffer E. et al. *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 1997; 112: 1442—7.
46. Atherton J. *Critical views on the potential benefits of H. pylori infection*. Symposium «H. pylori infection and areas of uncertainties & controversies». XXV<sup>th</sup> International Workshop of European Helicobacter Study Group. Ljubljana; 2012.
47. Wu J.C., Cham F.K., Wong S.K. et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on esophageal acid exposure in patients with reflux esophagitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002; 16: 545—52.
48. Grande M., Cadeddu F., Villa M. et al. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease. *World J. Surg. Oncol.* 2008; 6: 74—81.
49. Zullo A., Hassan Z., Repici A., Bruzzese V. *Helicobacter pylori* eradication and reflux disease onset: Did gastric acid get «crazy». *World J. Gastroenterol.* 2013; 19: 86—9.
50. Chyng S.J., Lim S.H., Choi J. et al. *Helicobacter pylori* serology inversely correlated with the risk and severity of reflux esophagitis in *Helicobacter pylori* endemic area: a matched case-control study of 5616 health check-up Koreans. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2011; 17: 267—73.
51. Ashktorab H., Entezari O., Nouraie M. et al. *Helicobacter pylori* protection against reflux esophagitis. *Dig. Dis. Sci.* 2012; 57: 2924—8.
52. Wang P.C., Hs C.S., Tseng T.C. et al. Male sex, hiatus hernia and *Helicobacter pylori* infection associated with asymptomatic erosive esophagitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27: 586—91.
53. Polat F.R., Polat S. The effect of *Helicobacter pylori* on gastroesophageal reflux disease. *JSLs*. 2012; 16: 260—3.
54. Saad A.M., Choudhary A., Bechtold M.L. Effect of *Helicobacter pylori* treatment on gastroesophageal reflux disease (GERD): meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand. J. Gastroenterol.* 2012; 47: 129—35.
55. Zevit N., Balicer R.D., Cohen H.A. et al. Inverse association between *Helicobacter pylori* and pediatric asthma in a high prevalence population. *Helicobacter*. 2012; 17: 30—5.
56. Wang Q., Yu J., Zhang G. Association between asthma and *Helicobacter pylori*: a meta-analysis. *Helicobacter*. 2013; 18: 41—53.
57. Zhou X., Wu J., Zhang G. Association between *Helicobacter pylori* and asthma: a meta-analysis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 3: 460—8.
58. Oertly M., Müller A. *Helicobacter pylori* targets dendritic cells to induce immunotolerance, promote persistence and confer protection against allergic asthma. *Gut Microbes*. 2012; 3: 566—71.
59. Arnold I.C., Dehzad N., Reuter S. et al. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 3088—93.

Поступила 16.01.14  
Received 16.01.14