

©Коллектив авторов

## ПРОДУКЦИЯ И ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

*Н.В. Юнусова<sup>1,2</sup>, Е.Э. Дандарова<sup>1</sup>, Д.А. Сваровский<sup>1\*</sup>, Н.С. Денисов<sup>1</sup>,  
Д.Н. Костромицкий<sup>2</sup>, М.Р. Патышева<sup>2</sup>, О.В. Черемисина<sup>2</sup>, Л.В. Спирина<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет,  
634050, Томск, Московский тракт, 2; \*эл. почта: svarovsky.d.a@gmail.com

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт онкологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр, 634009, Томск, пер. Кооперативный, 5

Внеклеточные везикулы (ВВ) — клеточные структуры сферической формы мембранного происхождения размером от 40 нм до 5000 нм большой функциональной значимости, участвующие в горизонтальном переносе главным образом белков и микроРНК. Среди задействованных в интернализации ВВ механизмов эндоцитоза выделяют клатрин-зависимый эндоцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз, рафт-опосредованный эндоцитоз и макропиноцитоз. Сахарный диабет 2 типа (СД2) — часто встречающаяся группа метаболических нарушений у взрослых, заболеваемость и распространенность которых растут параллельно с эпидемией ожирения. Поскольку жировая ткань играет ключевую роль в развитии инсулинорезистентности, ВВ, секретируемые жировой тканью, могут быть своего рода трансмиттерами информации в этом процессе. ВВ адипоцитарного происхождения преимущественно поглощаются тканевыми макрофагами, самим адипоцитами, гепатоцитами и скелетными мышцами. Поглощение ВВ способствует М1 поляризации макрофагов, снижению поглощения глюкозы гепатоцитами и миоцитами за счёт переноса этими ВВ функционально активных микроРНК, влияющих на углеводный и липидный обмен. У пациентов с СД2 и нарушением толерантности к глюкозе обнаружены значительно более высокий уровень CD235a-положительных (эритроцитарных) ВВ, а также тенденция к повышению CD68-положительных (лейкоцитарных) и CD62p-положительных (тромбоциты/эндотелиальные клетки) ВВ. Уровни CD31+/CD146-положительных ВВ (эндотелиальные клетки) были сопоставимы между больными с диабетом и эугликемическими пациентами. ВВ от пациентов с диабетом предпочтительнее интернализировались моноцитами (преимущественно классическими и переходными и в меньшей степени неклассическими фракциями моноцитов) и В-клетками по сравнению с эугликемическими пациентами. Интернализация ВВ от больных с СД2 моноцитами приводила к уменьшению их апоптоза, изменению дифференцировки, подавлению в моноцитах реакций, контролирующих окислительный стресс. Таким образом, инсулинорезистентность увеличивает секрецию ВВ, которые предпочтительно интернализируются моноцитами и изменяют их функцию. ВВ рассматриваются как источники перспективных клинических маркеров инсулинорезистентности, осложнений сахарного диабета (эндотелиальной дисфункции, ретинопатии, нефропатии, нейропатии), также маркеры ВВ могут быть использованы для контроля эффективности терапии этих осложнений.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы; экзосомы; интернализация; гипергликемия; инсулинорезистентность; сахарный диабет второго типа

**DOI:** 10.18097/PBMC20216706465

### 1. СОСТАВ, ФУНКЦИИ И БИОГЕНЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой клеточные структуры сферической формы мембранного происхождения, их размеры варьируют от 40 нм до 5000 нм. Принято выделять несколько основных классов ВВ: мембранные везикулы/клеточные микрочастицы/экзосомы, экзосомы и апоптотические тельца. Также выделяют большие онкосомы, экзоферы, миграсомы, экзомеры и некоторые другие структуры [1, 2]. Экзосомы представляют собой крупные внеклеточные тельца размером от 130 нм до 1000 нм в диаметре. Особенности их образования связаны непосредственно с цитоплазматической мембраной, которая инвагинирует с последующим отделением образовавшегося пузырька. Экзосомы содержат белки адгезии, регуляторные молекулы, небольшое

количество РНК. Как и все ВВ, экзосомы выполняют ряд транспортных и регуляторных функций, важных для регуляции жизнедеятельности организма [3]. Апоптотические тельца являются довольно крупными ВВ диаметром от 800 нм до 5000 нм. Их биохимический состав во многом напоминает состав других ВВ. Как и экзосомы, они содержат большое количество фосфатидилсерина на мембране, что связано с механизмом их образования в ходе апоптоза. Апоптотические тельца образуются в ходе блеббинга клетки (процесса образования в ней пузырьков) в ходе этого апоптотического тельца формируется и получает характерное содержимое, фрагменты деградировавших клеточных органелл и хроматин. Апоптотические тельца, как и другие ВВ, могут участвовать в процессе межклеточных коммуникаций, во многом это связано с наличием сложных механизмов взаимодействия с макрофагами для последующей утилизации апоптотических

телец, однако показано, что в некоторых случаях апоптотические тельца способны передавать сигналы неспецифическим клеткам иммунной системы и клеткам других внутренних органов [3, 4].

Экзосомы — ВВ эндосомального происхождения размером от 30 нм до 130 нм. Среди всего разнообразия ВВ экзомеры привлекают к себе повышенный интерес. Это связано с гомогенностью фракции, отработанными подходами к выделению экзомером, большим разнообразием их функций, а, следовательно, и потенциалом применения в клинической практике [5-7]. Липиды цитоплазматической клеточной мембраны и экзомеры сильно отличаются по своему составу. Мембраны экзомером, вынужденных существовать продолжительное время вне клетки, характеризуются повышенным содержанием сфингомиелинов, холестерина и фосфатидилинозитола, что отвечает за большую устойчивость мембраны к протео- и липолитической активности за счёт большей мембранной стабильности [2]. Белки экзомером можно разделить на несколько групп: мембранные, цитоплазматические и секреторные. Мембранные белки экзомером представлены нетканеспецифическими и тканеспецифическими, присущими ткани, к которой относится родительская клетка экзомеры. Нетканеспецифические белки в составе экзомером представлены семейством тетраспанинов (CD63, CD81), другими трансмембранными протеинами (CD47, GNA), белками главного комплекса гистосовместимости (МНС), интегринами (ITGA/ITGB), трансферрин-связывающим рецептором (TFR2), белками семейства Rab, участвующими в клеточной адгезии [2]. Тканеспецифические белки представлены тетраспанинами эпителиоцитов (TSPAN8), лейкоцитов (CD37, CD38), NK-клеток и В-лимфоцитов (CD9), иммуноглобулином эндотелиальных клеток (PECAM-1), а также рядом белков, специфичных для различных опухолевых клеток, например, рака яичников, глиомы, рака молочной железы [2]. Цитоплазматические белки экзомером также можно разделить на способные связываться с липидной мембраной и не способные связываться с ней. К белкам со способностью к связи с липидной мембраной относят белки эндосомального транспорта (ESCRT I/II/III), белки взаимодействия с макроглобулинами (ALIX), флотиллины и кавеолы (FLOT1/2, CAV), белки теплового шока (HSPA8, HSP84), а также Тау-белки (MAPT). Остальные белки представлены другими белками теплового шока (HSP70), белками цитоскелета, 20S протеасомами, актином и тубулином [2]. Секреторные экзомеральные белки представлены цитокинами и факторами роста (TGFB1/2, IFNG, VEGFA, EGF, PDGF), а также белками клеточной адгезии и внеклеточного матрикса, фибронектином, коллагеном [1, 2]. Соотношение белков в экзомере неравноценно, так ферменты, например, GTP-азы, в том числе GTP-азы семейства Rab, занимают около 32% от всех белков, белки цитоскелета 16%, белки комплекса гистосовместимости 8%, белки теплового шока 8%, а сигнальные белки всего 4% [1].

Из нуклеиновых кислот экзомеры содержат главным образом РНК. Согласно последним данным, экзомеры содержат в себе почти все типы РНК, преимущественно матричную и микроРНК. МикроРНК экзомером участвуют в процессах регуляции экспрессии генов по механизму РНК-интерференции. Механизм сортировки РНК в экзомеры тщательно контролируется РНК-связывающим белком, способствующим процессингу первичной микроРНК, — hnRNAP2B1, связанным с белком SUMO, их комплекс распознаёт специфические мотивы микроРНК и перемещает их в экзомеру [1].

Функции экзомером очень разнообразны, многие из них до конца не изучены, основные — презентация антигенов, межклеточная коммуникация, регуляция трансляции в клетках-реципиентах по механизму РНК-интерференции, индукция ангиогенеза и ремоделирования стромы, регуляция иммунного ответа и др. Ряд из этих функций играет существенную роль в прогрессировании ожирения и инсулинорезистентности, которые будут рассмотрены в последующих частях обзора.

## 2. ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ: ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Механизм интернализации ВВ зависит от типа клетки-реципиента, состава ВВ и рецепторов на поверхности клетки-реципиента. Основными механизмами интернализации ВВ являются эндоцитоз и макропиноцитоз. Причём, по наиболее свежим данным литературы эти механизмы могут быть обусловлены как белок-белковыми взаимодействиями на поверхности клетки и ВВ, так и специфическими механизмами эндоцитоза и макропиноцитоза.

Среди задействованных в интернализации ВВ механизмов эндоцитоза выделяют клатрин-зависимый эндоцитоз (КЗЭ), кавеолин-зависимый эндоцитоз (КВЗЭ) и рафт-опосредованный эндоцитоз (РЗЭ). Макропиноцитоз предусматривает поглощение ВВ путём образования крупных инвагинаций мембраны клетки-реципиента, от которой в дальнейшем происходит отпочковывание везикул в цитоплазму. Макропиносомы обладают достаточно большими размерами, обязательно несут в себе жидкость, могут содержать попавшие в эту складчатую структуру ВВ. Макропиносомы не несут на своей поверхности специфических молекул, в отличие от кавеол или клатрин-зависимых эндомером. Формирование макропиносом происходит при участии сокращений цитоскелета, а потому подвержено регуляции Rac GTPаз и семейством PAK-киназ (p21-активируемые киназы), требует холестерина. Также для ряда клеток для успешного завершения макропиноцитоза требуется активность кислой лизосомальной липазы и наличие определённого рН внутри клетки [5, 8-11].

Для выявления наиболее предпочтительных для данного типа клеток механизмов интернализации ВВ могут использоваться ингибиторы клатрин-зависимого эндоцитоза (например, хлорпромазин и др.), кавеолин-зависимого эндоцитоза

(например, гинестеин, нистатин, филипин и др.), ингибиторы рафт-зависимого эндоцитоза, которые различным способом разрушают липидные рафты (например, фумозин B1, метил-бета-циклодекстрин, симвастатин и др.), ингибиторы макропиноцитоза (EIPA, LY294002), смешанные ингибиторы (например, диназор), ингибиторы абсорбции холестерина (например, эзетимиб и др.), ингибиторы лизосомальной липазы (например, лалистат 2), лизосомотропные агенты и др. [5, 8]. Схема, описывающая различные механизмы интернализации ВВ, и список ингибиторов этого процесса представлен на рисунке 1. Из белок-белковых взаимодействий, важных для реализации интернализации везикул, необходимо отметить механизмы с участием тетраспанинов, интегринов и механизм с вовлечением протеогликанов и лектинов.

### 3. ВАРИАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКЗОСОМ С КЛЕТКОЙ БЕЗ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ

Помимо интернализации основными вариантами взаимодействия экзосом с клеткой являются связывание ВВ с клетками, опосредуемое лиганд-рецепторными взаимодействиями без слияния мембран, и слияние мембран клеток-реципиентов и мембран ВВ [1]. Существование самостоятельного процесса слияния везикулярных мембран и плазматической мембраны клетки-реципиента, приводящее к переносу заякоренных в везикулярной мембране белков без переноса внутривезикулярных белков и микроРНК, в настоящее время оспаривается [12].

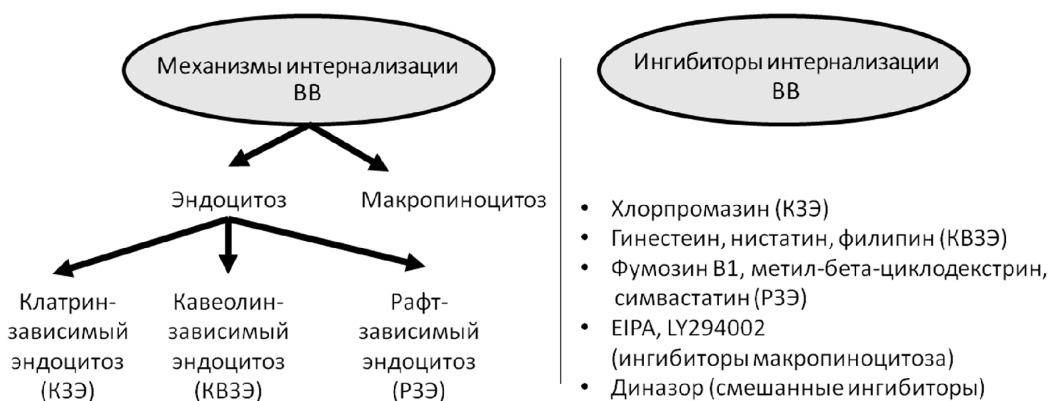
Адгезия экзосом на мембране клеток может отражать их антигенпрезентирующую функцию. Экзосомы, продуцируемые профессиональными и непрофессиональными антигенпрезентирующими клетками, содержат большое количество главных комплексов гистосовместимости МНС, что позволяет предположить наличие у экзосом антигенпрезентирующей функции, а также аллогенного распознавания [13]. Взрослые дендритные клетки распространяют аллоантигены посредством экзосомального транспорта. Также в некоторых случаях презентация антигенов через экзосомальную передачу более эффективна, чем распознавание

комплекса МНС II. Макрофаги, играющие важную роль в адаптивном и врождённом иммунных ответах, тоже способны продуцировать экзосомы, улучшая CD4 и CD8 механизмы распознавания. Аллораспознавание на основе экзосом может быть одним из звеньев, объясняющих, например, хроническое отторжение трансплантата благодаря персистенции донорских экзосом, находящихся в лимфоидных тканях долгое время после трансплантации [14].

На мышинных моделях продемонстрировано, что ВВ опухолевого происхождения (TEVs) обладают потенциалом блокировать дифференциацию и функцию дендритных клеток, CD4+ лимфоцитов и Th1, тогда как активность регуляторных Т-клеток увеличивается с расширением пула Treg. Иммуносупрессивные эффекты TEVs были частично устранены путём блокировки иммуносупрессивной молекулы PD-L1, что подразумевает, что TEVs несут на своей поверхности PD-L1 для взаимодействия с рецепторами, или что TEVs индуцируют экспрессию PD-L1 на дендритных клетках, что было продемонстрировано у мышей. Так, связанные с TEVs PD-L1 усиливали прогрессирование опухоли, подавляли активность Т-клеток и были устойчивы к терапии антителами. Таким образом, TEVs могут создавать препятствие для дифференциации иммунных клеток, участвующих в противоопухолевом иммунитете. Они подавляют распознавание антигенов опухоли и снижают Т-клеточный ответ на опухоль. TEVs также индуцируют апоптоз CD4+CD8+ Т-клеток [13]. Также преимущественно антигенпрезентирующую функцию играют экзосомы слюны. Протеомный анализ выявил, показал, что экзосомы слюны содержат типичные белки экзосом Alix, Tsg101, Hsp70, тетраспанины, а также в большом количестве иммуноглобулин А и полимерный рецептор иммуноглобулина [15].

### 4. РОЛЬ ЭКЗОСОМ АДИПОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ОЖИРЕНИЯ И ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ.

Сахарный диабет 2 типа (СД2) — часто встречающаяся группа метаболических нарушений у взрослых, заболеваемость и распространённость



**Рисунок 1.** Механизмы интернализации ВВ и возможные ингибиторы этого процесса в эксперименте. КЗЭ — клатрин-зависимый эндоцитоз, КВЗЭ — кавеолин-зависимый эндоцитоз, РЗЭ — рафт-зависимый эндоцитоз.

которых растут параллельно с эпидемией ожирения. Сахарный диабет — девятая по значимости причина смерти во всем мире, увеличивающая риск таких осложнений, как гипертония, почечная недостаточность, инсульт и инфаркт миокарда. СД2 характеризуется инсулинорезистентностью, нарушением секреции инсулина или и тем, и другим [16]. Поскольку жировая ткань играет ключевую роль в развитии инсулинорезистентности, экзосомы, секретируемые жировой тканью, могут быть своего рода трансмиттерами информации в этом процессе [17, 18].

Хроническое воспаление малых градаций в жировой ткани является важным фактором, вызывающим развитие инсулинорезистентности. Так, Deng с соавт. обнаружили, что экзосомы, секретируемые жировой тканью мышей с ожирением, индуцируют активацию макрофагов через путь TLR4/TRIF, а ретинол-связывающий белок 4 (RBP4) в этих экзосомах играет роль в индукции макрофагов, активируя их, а также способствуют поляризации макрофагов в M1, которые секретируют провоспалительные цитокины и экзосомы [18]. Экзосомы, полученные из макрофагов жировой ткани, могут способствовать развитию инсулинорезистентности и в самих адипоцитах. Кроме того, экзосомы адипоцитарного происхождения привлекают макрофаги в печень и жировую ткань, где они секретируют TNF- $\alpha$  и IL-6, что приводит к инсулинорезистентности [17, 19].

Установлено, что ключевым моментом влияния экзосом на инсулинорезистентность тканей является экзосомальная miR-155, нацеленная на рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). Мыши с нокаутом по miR-155 были намного более чувствительны к инсулину, чем контрольная группа мышей с ожирением [20]. Более того, miR-155, обнаруженная в экзосомах, секретируемых адипоцитами, оказывает дополнительный провоспалительный эффект на макрофаги, активируя STAT1 и подавляя экспрессию STAT6. На мышинной модели было показано, что экзосомы, секретируемые адипоцитами, транспортируют miR-34a в макрофаги, тем самым подавляя поляризацию M2 через снижение экспрессии K $\ddot{u}$ rrel-подобного фактора 4 (Klf4). У человека повышенная экспрессия miR-34a в висцеральном жире у субъектов с избыточным весом/ожирением отрицательно коррелировала со снижением Klf4, но положительно — с параметрами инсулинорезистентности и метаболического воспаления [21].

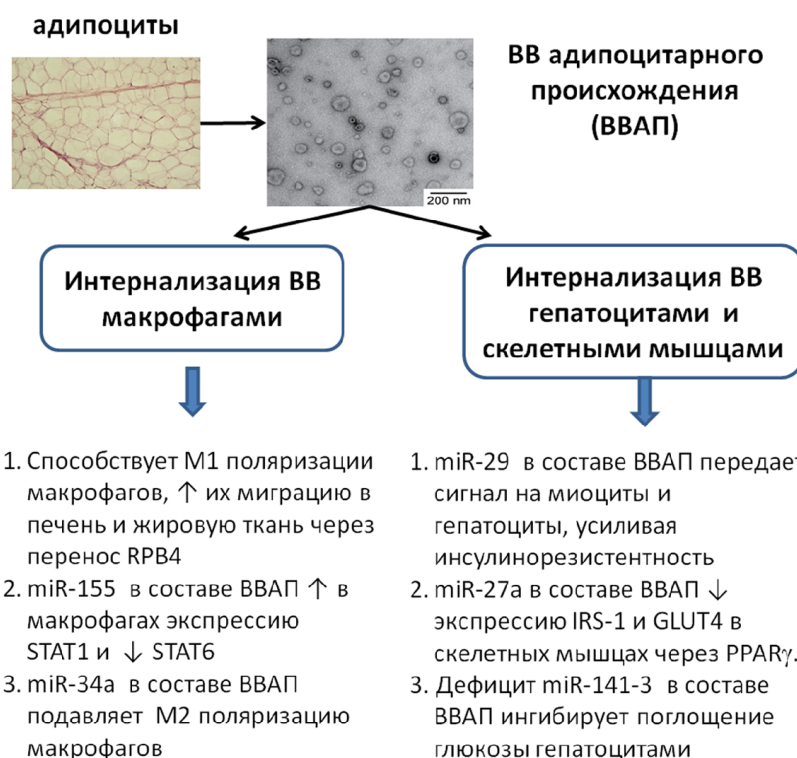
Помимо участия в индуцированной воспалением в жировой ткани инсулинорезистентности, экзосомы адипоцитарного происхождения могут также поглощаться другими инсулин-чувствительными тканями (скелетными мышцами, печенью). Так Yu и соавт. обнаружили, что происходящая из адипоцитов экзосомальная miR-27a снижает экспрессию субстрата инсулинового рецептора IRS-1 и переносчика глюкозы GLUT4 в ткани скелетных мышц за счёт воздействия на PPAR $\gamma$  [22]. Также обнаружен высокий уровень экспрессии

экзосомальной miR-29a у мышей с ожирением. miR-29a может передавать сигнал на адипоциты, миоциты и гепатоциты, индуцируя снижение чувствительности к инсулину, воздействуя на PPAR $\delta$  [23]. Другой механизм может быть связан со снижением уровней экзосомальной miR-141-3. Экзосомы, происходящие из жировой ткани, переносят гораздо меньше miR-141-3 в гепатоциты, что приводит к ингибированию поглощения глюкозы печенью и развитию инсулинорезистентности [24]. Функциональная активность ВВ/экзосом адипоцитарного происхождения, а также точки приложения и их эффекты представлены на рисунке 2.

Известно, что жировая ткань имеет сложный клеточный состав. Везикулы с разной функциональностью могут секретироваться как адипоцитами, так и стромальными клетками жировой ткани (СКЖТ). Роль ВВ, продуцируемых СКЖТ, в развитии и прогрессировании инсулинорезистентности весьма противоречива, а данные немногочисленны. Известно, что экзосомы от СКЖТ содержат как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины. Показано, что терапия мышей с ожирением экзосомами, полученными при культивировании СКЖТ, улучшает их метаболический гомеостаз, включая улучшение чувствительности к инсулину, снижение ожирения и уменьшение стеатоза печени [25]. Этими же авторами показано, что экзосомы от СКЖТ переносят к клеткам-реципиентам активный STAT3, который может улучшить чувствительность тканей к инсулину. STAT3 способствует поляризации макрофагов M1 до противовоспалительного фенотипа M2, что может значительно снижать воспаление и восстанавливать чувствительность тканей к инсулину [25]. Кроме того, экзосомы СКЖТ ингибируют адипогенез, что может иметь перспективы клинического применения для лечения ожирения [25, 26].

## 5. КОЛИЧЕСТВО, СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ОТ БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЕМ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Хотя свойства ВВ адипоцитарного происхождения стимулировать инсулинорезистентность при со-культивировании с различными клетками представлены в литературе [17-24], однако данные о количестве, составе и функциональной активности ВВ в контексте СД2, развивающегося на фоне инсулинорезистентности, весьма ограничены. У больных с СД2, пациентов с нарушением толерантности к глюкозе (НТГ) и у эугликемических пациентов без признаков инсулинорезистентности выявлена значительно более высокая концентрация ВВ у лиц с диабетом по сравнению с людьми с эугликемией ( $p=0,022$ ), причём эти изменения были более выражены для популяции белых американцев [27]. По мнению авторов, хотя липопротеины могут соосаждаться с ВВ, выраженная связь диабета и расовой принадлежности



**Рисунок 2.** Функциональная активность ВВ/экзосом адипоцитарного происхождения: точки приложения и их эффекты. ВВАП — ВВ адипоцитарного происхождения.

с концентрацией ВВ в препаратах не может быть объяснена изменениями уровня ЛПВП и ЛПНП у больных с диабетом и НТГ по сравнению с эугликемическими пациентами. У пациентов с преддиабетом и развившимся СД2 обнаружена самая высокая концентрация циркулирующих ВВ по сравнению с контрольными субъектами. С помощью проточной цитометрии у пациентов с диабетом обнаружены значительно более высокий уровень CD235a-положительных (эритроцитарных) ВВ, а также тенденция к повышению CD68-положительных (лейкоцитарных) и CD62p-положительных (тромбоциты/эндотелиальные клетки) ВВ. Уровни CD31+/CD146-положительных ВВ (эндотелиальные клетки) были сопоставимы между больными с диабетом и эугликемическими пациентами [27]. Другие данные свидетельствуют об относительном увеличении доли ВВ эндотелиального происхождения в циркуляции у больных с диабетом [28-30]. В работе Gianella и соавт. было обнаружено, что плохой метаболический контроль у пациентов с СД2 ассоциируется с более высоким уровнем ВВ тромбоцитарного происхождения по сравнению с пациентами, имеющими нормальный уровень гликированного гемоглобина A1 [31]. Кроме того, уровень циркулирующих ВВ тромбоцитарного происхождения коррелировал с уровнем IL-6 в плазме крови, что также свидетельствует о связи чрезмерного выхода этих везикул из тромбоцитов с воспалением. Впервые продемонстрировано, что в тромбоцитах от пациентов с СД2 не только активируемый протеазой рецептор 4 (PAR-4) способствует высвобождению активированных ВВ через

Ca<sup>2+</sup>-кальпаин-зависимый механизм, но также и то, что его экспрессия активируется хронической гипергликемией [31].

В циркулирующих ВВ идентифицировано несколько белков (фосфо-p70S6K [Thr389], рибосомальный белок фосфо-S6RP [Ser240/244], фосфо-GSK3b [Ser9], фосфо-AKT [Ser473], активированный рецептор инсулина (phospho-IR) [Tyr], фосфо-IRS1 [Ser312], тир-фосфо-IRS1, активированный рецептор инсулиноподобного фактора роста I типа (фосфо-IGF-1R [Tyr]), рецептор лептина и фактор роста фибробластов (FGF21), участвующие в реализации инсулинового каскада в клетках. Уровень лептинового рецептора и phospho-IR в циркулирующих ВВ был снижен у лиц с диабетом. Линейный регрессионный анализ показал, что индексы инсулинорезистентности HOMA-B и HOMA-IR были связаны с концентрацией ВВ и белками инсулинового каскада в ВВ, а именно: высокий уровень HOMA-IR был связан с более низким уровнем фосфо-S6RP и высоким уровнем FGF21. Это свидетельствует, что состав ВВ отражает различные компоненты диабета как на уровне сигнальных молекул, так и на системном уровне (инсулинорезистентность) [27]. В модели инсулинорезистентности *in vitro* на первичных нейрональных клетках, праймированных инсулином в течение 48 ч, а затем подвергшихся воздействию высоких доз инсулина, показано, что инсулинорезистентность значительно стимулирует секрецию ВВ, причём в аналогичном эксперименте с использованием ингибиторов аутофагии показано, что этот процесс сопряжен с аутофагией. На этой клеточной модели уровень phospho-AKT и

phospho-GSK3b в ВВ были негативно ассоциированы с НОМА-В, в то время как фосфо-S6RP также негативно связан и с НОМА-IR [27]. Уровни активированных белков, участвующие в передаче сигналов АКТ, уменьшаются в инсулинорезистентных тканях и клетках, как было показано ранее [32], что логично отражается на уровне этих протеинов в секретируемых этими клетками везикулах.

В работе Freeman и соавт. показано, что ВВ от пациентов с диабетом предпочтительнее интернализировались моноцитами (преимущественно классическими и переходными и в меньшей степени неклассическими фракциями моноцитов) и В-клетками по сравнению с эуликемическими пациентами [27]. Поскольку в данной работе не использовались специфические ингибиторы интернализации ВВ, то высказаться о преимущественном механизме этого процесса у больных с диабетом невозможно. Анализ экспрессии генов моноцитов с интернализированными диабетическими ВВ показал, что этот процесс усиливает регуляцию антиапоптотических генов в моноцитах. Так как регуляция апоптоза является основным фактором дифференцировки моноцитов в дендритные клетки, то снижение апоптоза, вызванное воздействием диабетических ВВ может, по-видимому, привести к усилению дифференцировки моноцитов. ВВ от больных с диабетом также могут ослаблять при интернализации клетками процессы, связанные с регуляцией окислительного стресса (регуляция окислительно-восстановительного потенциала клеток, метаболизм глутатиона) [27]. Кроме того, низкие уровни антиоксидантного

фермента супероксиддисмутаза второго типа в моноцитах ранее были выявлены у лиц с СД2 [33]. Можно предположить, что интернализация ВВ, продуцирующихся в условиях гипергликемии и инсулинорезистентности, подавляет пути реакции на окислительный стресс в моноцитах, что может сопровождаться дефектами фагоцитоза. Кроме того, выявлено увеличение IL-2, IL-4, и IL-12p70 в диабетических ВВ и IL-2 в средах от моноцитов, обработанных этими везикулами, это свидетельствует о возможности везикул модифицировать воспалительный ответ. В совокупности эти результаты свидетельствуют, что инсулинорезистентность увеличивает секрецию ВВ, которые предпочтительно интернализируются моноцитами и изменяют их функцию [27]. Основные эффекты ВВ от пациентов с СД2, ассоциированные с их интернализацией моноцитами, представлены на рисунке 3.

## 6. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ИСТОЧНИКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

По данным литературы, ВВ/экзосомы могут являться источниками перспективных клинических маркеров инсулинорезистентности и осложнений сахарного диабета. Ценность такого источника обусловлена доступностью биологических жидкостей, содержащих ВВ, а также тем, что везикулярные маркеры инсулинорезистентности (плазма крови), по-видимому, являются более адекватными и



**Рисунок 3.** Основные эффекты ВВ от пациентов с СД2, ассоциированные с их интернализацией моноцитами.

воспроизводимыми. Состав ВВ отражает состояние компонентов инсулинового каскада (снижение phospho-AKT (Thyr 308), phosphoAS160), в том числе и ВВ, продуцируемых тканями-мишенями инсулина (печень, мышцы, жировая ткань). Известно, что широко распространённые и используемые в практике индексы инсулинорезистентности НОМА-В и НОМА-IR лишь косвенно отражают инсулинорезистентность на уровне организма. Молекулярные маркеры инсулинорезистентности, по мнению большинства авторов, следует искать среди компонентов инсулинового каскада, а объектом анализа должны быть вышеперечисленные ткани-мишени инсулина, что диктует необходимость работы с биопсийным материалом и на практике существенно осложняет проведение такого анализа [34]. В этом плане преимущества везикулярных маркеров совершенно очевидны.

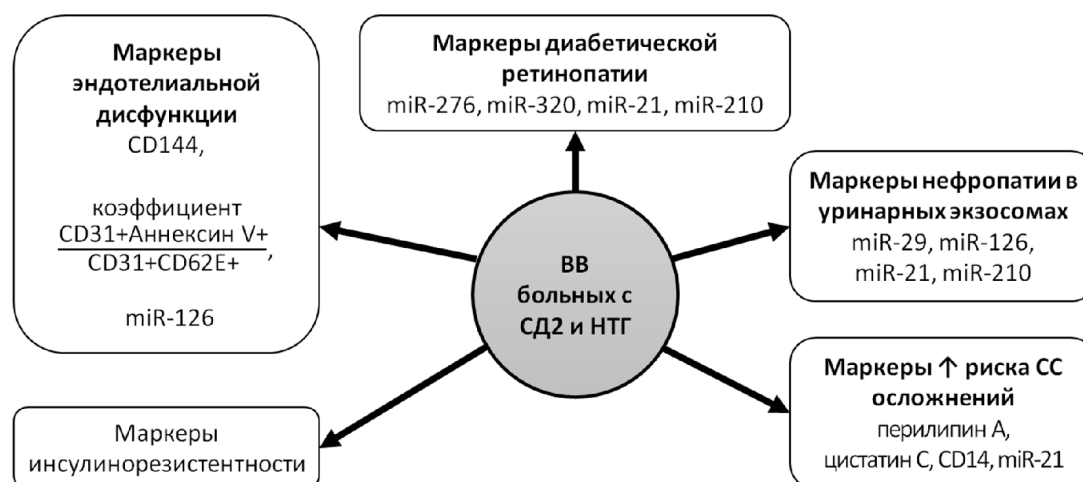
Известно, что эндотелий сосудов не является классически инсулинзависимым, но служит первичной мишенью инсулина [34, 35]. Соответственно, в условиях гипергликемии и инсулинорезистентности эндотелиальная дисфункция формируется быстро и определяет тяжесть других осложнений СД2. На модели стрептозотоцинового диабета крыс было выявлено многократное увеличение эндогенных микрочастиц размером от 220 нм до 1300 нм (разновидность ВВ) у диабетических крыс по сравнению с контролем с гиперэкспрессией поверхностного фосфатидилсерина [36]. Диабетические микрочастицы, находясь в циркуляции, формировали агрегаты и обуславливали повышенную адгезию лейкоцитов и повышенную чувствительность эндотелиоцитов к воспалительным стимулам [36]. Аналогичные данные получены и в экспериментах моделирования инсулинорезистентности *in vitro* [37]. В качестве перспективных везикулярных маркеров, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией при СД2 отмечают уровень CD31+CD144+ВВ, уровень miR-126 в циркулирующих ВВ и повышенное соотношение CD31+Annexin V+ к CD31+CD62+ ВВ, отражающее изменённый иммунный фенотип эндотелиальных ВВ [38-40].

Ряд везикулярных маркеров успешно используется в качестве маркеров повышенного риска осложнений сердечно-сосудистых заболеваний при ожирении, СД2 и метаболическом синдроме (уровень перилипина А, цистатина С, CD14, miR-21, уровень дисульфид изомеразы на CD31-позитивных ВВ) [38, 41-43]. Идентифицировано несколько микроРНК в мочевых ВВ, ассоциированных с диабетической нефропатией и ренальным фиброзом. Кроме того, выявлены экзосомальные микроРНК в циркулирующих экзосомах, ассоциированные с альбуминурией у пациентов с диабетической нефропатией [44-46].

Выявлено, что ряд микроРНК, секретируемых в составе ВВ при экспериментальном или клиническом диабетах, вовлечены в патогенез диабетической ретинопатии и нейропатии и в перспективе также могут быть полезны в качестве ранних и достоверных маркеров этих осложнений [47-50]. Кроме того, вышеперечисленные маркеры могут быть использованы для контроля эффективности терапии данных осложнений [51]. ВВ как источники перспективных клинических маркеров инсулинорезистентности и осложнений сахарного диабета, представлены на рисунке 4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время функциональная значимость циркулирующих внеклеточных везикул ВВ в развитии и прогрессировании ожирения, СД2 и сопутствующей этим состояниям инсулинорезистентности интенсивно изучается. ВВ адипоцитарного происхождения преимущественно поглощаются классическими и переходными моноцитами, тканевыми макрофагами, самими адипоцитами, гепатоцитами и скелетными мышцами, что способствует М1 поляризации макрофагов, снижению поглощения глюкозы гепатоцитами и миоцитами за счёт переноса этими ВВ функционально активных микроРНК, влияющих на углеводный и липидный обмен. Пациенты с СД2 и НТГ имеют значительно более высокий уровень эритроцитарных ВВ, а также



**Рисунок 4.** ВВ как источники перспективных клинических маркеров инсулинорезистентности и осложнений сахарного диабета. СС осложнений — сердечно сосудистых осложнений.

тенденцию к повышению лейкоцитарных и CD62p-положительных (тромбоциты/эндотелиальные клетки) ВВ от пациентов с диабетом предпочтительнее интернализировались моноцитами (преимущественно классическими и переходными и в меньшей степени неклассическими фракциями моноцитов) и В-клетками по сравнению с эугликемическими пациентами. Интернализация ВВ от больных с СД2 моноцитами приводит к уменьшению их апоптоза, изменению дифференцировки, подавлению в моноцитах реакций, контролируемых окислительным стрессом. ВВ рассматриваются как источники перспективных клинических маркеров инсулинорезистентности, осложнений сахарного диабета (эндотелиальной дисфункции, ретинопатии, нефропатии, нейропатии), также маркеры ВВ могут быть использованы для контроля эффективности терапии этих осложнений.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проведено в рамках гранта Сибирского государственного медицинского университета "Молекулярные и биохимические механизмы развития инфекционных и неинфекционных соматических заболеваний на основе регуляции протеолиза и формирования метаболических нарушений".

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данная работа не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П. (2016) Биологические мембраны, **33**(3), 163-175. [Tamkovich S.N., Tutanov O.S., Laktionov P.P. (2016) Biologicheskie Membrany, **33**(3), 163-175.]
2. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K., Ayre D.C., Bach J.-M., Bachurski D., Baharvand H., Balaj L., Baldacchino S., Bauer N.N., Baxter A.A., Bebawy M., Beckham C., Bedina-Zavec A., Benmoussa A., Berardi A.C., Bergese P., Bielska E., Blenkiron C., Bobis-Wozowicz S., Boilard E., Boireau W., Bongiovanni A., Borrás F.E., Bosch S., Boulanger C.M., Breakefield X., Breglio A.M., Brennan M.A., Brigstock D.R., Brisson A., Broekman M.L., Bromberg J.F., Bryl-Górecka P., Buch S., Buck A.H., Burger D., Busatto S., Buschmann D., Jørgensen M.M., Jacobsen S., Nejsum P., Østergaard O., Xu J. (2018) J. Extracell. Vesicles, **7**(1), 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
3. Sadallah S., Eken C., Schifferli J. A. (2011) Clin. Exper. Immunol., **163**(1), 26-32.
4. Xu X., Lai Y., Hua Z.C. (2019) Biosci. Rep., **39**(1), BSR20180992. DOI: 10.1042/BSR20180992.
5. Самойлова Е.М., Кальсин В.А., Беспалова В.А., Девиченский В.П., Баклаушев В.П. (2017) Гены и клетки, **12**(4), 7-19. [Samoylova E.M., Kalsin V.A., Bespalova V.A., Devichensky V.P., Baklaushev V.P. (2017) Geny i Kletki, **12**(4), 7-19.]
6. Тамкович С.Н., Юнусова Н.В., Стахеева М.Н., Сомов А.К., Фролова А.Е., Кирюшина Н.А., Афанасьев С.Г., Григорьева А.Е., Лактионов П.П., Кондакова И.В. (2017) Биомедицинская химия, **63**(2), 165-169. [Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Stakheeva M.N., Somov A.K., Frolova A.Y., Kirushina N.A., Afanasyev S.G., Grigoryeva A.E., Laktionov P.P., Kondakova I.V. (2017) Biomeditsinskaya Khimiya, **63**(2), 165-169.] DOI: 10.18097/PBMC20176302165.
7. Юнусова Н.В., Туgutova Е.А., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. (2018) Биомедицинская химия, **64**(2), 123-133. [Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. (2018) Biomeditsinskaya Khimiya, **64**(2), 123-133.] DOI: 10.18097/PBMC20186402123.
8. Li X., Chen R., Kemper S., Brigstock D.R. (2021) Front. Cell Dev. Biol., **9**, 640667. DOI: 10.3389/fcell.2021.640667
9. Swanson J.A. (2008) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **9**(8), 639-649.
10. Kerr M.C., Teasdale R.D. (2009) Traffic, **10**(4), 364-371.
11. Grimmer S., van Deurs B., Sandvig K. (2002) J. Cell Sci., **115**(14), 2953-2962.
12. Prada I., Meldolesi J. (2016) Int. J. Mol. Sci., **17**(8), 1296. DOI: 10.3390/ijms17081296.
13. Droste M., Thakur B.K., Eliceiri B.P. (2020) Front. Immunol., **11**, 606859. DOI: 10.3389/fimmu.2020.606859.
14. Hwang B., Bryers J., Mulligan M.S. (2021) J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **161**(2), e129-e134.
15. Ogawa Y., Miura Y., Harazono A., Kanai-Azuma M., Akimoto Y., Kawakami H., Yamaguchi T., Toda T., Endo T., Tsubuki M., Yanoshita R. (2011) Biol. Pharm. Bull., **34**(1), 13-23.
16. Stenvers D.J., Scheer F., Schrauwen P., la Fleur S.E., Kalsbeek A. (2019) Nat. Rev. Endocrinol., **15**(2), 75-89.
17. Deng Z.B., Poliakov A., Hardy R.W., Clements R., Liu C., Liu Y., Wang J., Xiang X., Zhang S., Zhuang X., Shah S.V., Sun D., Michalek S., Grizzle W.E., Garvey T., Mobley J., Zhang H.G. (2009) Diabetes, **58**(11), 2498-2505.
18. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Afanas'ev S.G., Kishkina A.Y., Spirina L.V. (2018) Diabetes Metab. Syndr., **12**(5), 807-812.
19. Song M., Han L., Chen F.F., Wang D., Wang F., Zhang L., Wang Z.H., Zhong M., Tang M.X., Zhang W. (2018) Cell. Physiol. Biochem., **48**(4), 1416-1432.
20. Ying W., Riopel M., Bandyopadhyay G., Dong Y., Birmingham A., Seo J.B., Ofrecio J.M., Wollam J., Hernandez-Carretero A., Fu W., Li P., Olefsky J.M. (2017) Cell, **171**(2), 372-384.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.035.
21. Pan Y., Hui X., Hoo R., Ye D., Chan C., Feng T., Wang Y., Lam K., Xu A. (2019) J. Clin. Invest., **129**(2), 834-849.
22. Yu Y., Du H., Wei S., Feng L., Li J., Yao F., Zhang M., Hatch G.M., Chen L. (2018) Theranostics, **8**(8), 2171-2188.
23. Liu T., Sun Y.C., Cheng P., Shao H.G. (2019) Biochem. Biophys. Res. Commun., **515**(2), 352-358.
24. Dang S.Y., Leng Y., Wang Z.X., Xiao X., Zhang X., Wen T., Gong H.Z., Hong A., Ma Y. (2019) Int. J. Biol. Sci., **15**(2), 351-368.
25. Zhao H., Shang Q., Pan Z., Bai Y., Li Z., Zhang H., Zhang Q., Guo C., Zhang L., Wang Q. (2018) Diabetes, **67**(2), 235-247.

26. Ji Z., Cai Z., Gu S., He Y., Zhang Z., Li T., Wei Q., Wang J., Ke C., Li L. (2021) *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 734810. DOI: 10.3389/fbioe.2021.734810.
27. Freeman D.W., Noren Hooten N., Eitan E., Green J., Mode N.A., Bodogai M., Zhang Y., Lehrmann E., Zonderman A.B., Biragyn A., Egan J., Becker K.G., Mattson M.P., Ejiogu N., Evans M.K. (2018) *Diabetes*, **67**(11), 2377-2388.
28. Esposito K., Maiorino M.I., di Palo C., Gicchino M., Petrizzo M., Bellastella G., Saccomanno F., Giugliano D. (2011) *Diabetes Obes. Metab.*, **13**(5), 439-445.
29. Feng B., Chen Y., Luo Y., Chen M., Li X., Ni Y. (2010) *Atherosclerosis*, **208**(1), 264-269.
30. Li S., Wei J., Zhang C., Li X., Meng W., Mo X., Zhang Q., Liu Q., Ren K., Du R., Tian H., Li J. (2016) *Cell. Physiol. Biochem.*, **39**(6), 2439-2450.
31. Giannella A., Ceolotto G., Radu C.M., Cattelan A., Iori E., Benetti A., Fabris F., Simioni P., Avogaro A., Vigili de Kreutzenberg S. (2021) *Cardiovasc. Diabetol.*, **20**(1), 77. DOI: 10.1186/s12933-021-01267-w.
32. Kim B., Sullivan K.A., Backus C., Feldman E.L. (2011) *Antioxidants Redox Signal.*, **14**(10), 1829-1839.
33. Bauer S., Wanninger J., Neumeier M., Wurm S., Weigert J., Kopp A., Bala M., Schäffler A., Aslanidis C., Buechler C. (2011) *Exp. Mol. Pathol.*, **90**(1), 101-106.
34. Дедов И.И., Ткачук В.А., Гусев Н.Б., Ширинский В.П., Воронников А.В., Кочегура Т.Н., Майоров А.Ю., Шестакова М.В. (2018) Сахарный диабет, **21**(5), 364-375. [Dedov I.I., Tkachuk V.A., Gusev N.B., Shirinsky V.P., Vorotnikov A.V., Kochegura T.N., Mayorov A.Y., Shestakova M.V. (2018) *Diabetes Mellitus*, **21**(5), 364-375.]
35. Żbikowski A., Blachnio-Zabielska A., Galli M., Zabielski P. (2021) *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(14), 7427. DOI: 10.3390/ijms22147427.
36. Feng Q., Stork C.J., Xu S., Yuan D., Xia X., la Penna K.B., Guo G., Sun H., Xu L.C., Siedlecki C.A., Brundage K.M., Sheaffer N., Schell T.D., He P. (2019) *J. Physiol.*, **597**(3), 781-798.
37. Gao W., Guo X., Wang Y., Jian D., Li M. (2020) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **523**(3), 685-691.
38. la Marca V., Fierabracci A. (2017) *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(9), 1974. DOI: 10.3390/ijms18091974.
39. Osman A., Benameur T., Korashy H.M., Zeidan A., Agouni A. (2020) *Biomedicines*, **8**(10), 409. DOI: 10.3390/biomedicines8100409.
40. Berezin A.E., Kremzer A.A., Samura T.A., Berezina T.A., Kruzliak P. (2015) *J. Endocrinol. Invest.*, **38**(8), 865-874.
41. Eguchi A., Lazic M., Armando A.M., Phillips S.A., Katebian R., Maraka S., Quehenberger O., Sears D.D., Feldstein A.E. (2016) *J. Mol. Med.*, **94**(11), 1241-1253.
42. Kranendonk M.E., de Kleijn D.P., Kalkhoven E., Kanhai D.A., Uiterwaal C.S., van der Graaf Y., Pasterkamp G., Visseren F.L., SMART Study Group (2014) *Cardiovasc. Diabetol.*, **13**, 37. DOI: 10.1186/1475-2840-13-37.
43. Sun X.D., Han L., Lan H.T., Qin R.R., Song M., Zhang W., Zhong M., Wang Z.H. (2021) *Aging*, **13**(14), 18718-18739.
44. Osipova J., Fischer D.C., Dangwal S., Volkmann I., Wiedera C., Schwarz K., Lorenzen J.M., Schreiver C., Jacoby U., Heimhalt M., Thum T., Haffner D. (2014) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **99**(9), E1661-E1665. DOI: 10.1210/jc.2013-3868.
45. Saenz-Pipaon G., Echeverria S., Orbe J., Roncal C. (2021) *J. Clin. Med.*, **10**(10), 2046. DOI: 10.3390/jcm10102046.
46. Kim H., Bae Y.U., Jeon J.S., Noh H., Park H.K., Byun D.W., Han D.C., Ryu S., Kwon S.H. (2019) *J. Transl. Med.*, **17**(1), 236. DOI: 10.1186/s12967-019-1983-3.
47. Zampetaki A., Willeit P., Burr S., Yin X., Langley S.R., Kiechl S., Klein R., Rossing P., Chaturvedi N., Mayr M. (2016) *Diabetes*, **65**(1), 216-227.
48. Li X., Wang J., Qian H., Wu Y., Zhang Z., Hu Z., Xie P. (2021) *Front. Genet.*, **12**, 719312. DOI: 10.3389/fgene.2021.719312.
49. Gonçalves N.P., Yan Y., Ulrichsen M., Venø M.T., Poulsen E.T., Enghild J.J., Kjems J., Vægter C.B. (2020) *Biomedicines*, **8**(11), 450. DOI: 10.3390/biomedicines8110450.
50. Kasimu A., Apizi X., Talifujiang D., Ma X., Fang L., Zhou X. (2021) *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, Online first. DOI: 10.1016/j.endinu.2021.01.007.
51. Cui X., Zhu L., Zhai R., Zhang B., Zhang F. (2021) *Am. J. Translat. Res.*, **13**(5), 3942-3953.

Поступила в редакцию: 24. 11. 2021.  
После доработки: 03. 12. 2021.  
Принята к печати: 09. 12. 2021.

PRODUCTION AND INTERNALIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES  
IN NORMAL AND UNDER CONDITIONS OF HYPERGLYCEMIA AND INSULIN RESISTANCE

*N.V. Yunusova<sup>1,2</sup>, E.E. Dandarova<sup>1</sup>, D.A. Svarovsky<sup>1\*</sup>, N.S. Denisov<sup>1</sup>,  
D.N. Kostromitsky<sup>2</sup>, M.R. Patysheva<sup>2</sup>, O.V. Cheremisina<sup>2</sup>, L.V. Spirina<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Siberian State Medical University,

2 Moskovsky tract, Tomsk, 634050 Russia; \*e-mail: svarovsky.d.a@gmail.com

<sup>2</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,

5 Kooperativny str., Tomsk, 634009 Russia

Extracellular vesicles (EVs) are spherical structures of cell membrane origin, ranging in the size from 40 nm to 5000 nm. They are involved in the horizontal transfer of many proteins and microRNAs. The mechanisms EV internalization include clathrin-dependent endocytosis, caveolin-dependent endocytosis, raft-mediated endocytosis, and macropinocytosis. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a common group of metabolic disorders in adults; the incidence and prevalence increase in parallel with the obesity epidemic. Since adipose tissue plays a crucial role in the development of insulin resistance, EVs secreted by adipose tissue can be a kind of information transmitter in this process. EVs of adipocytic origin are predominantly absorbed by tissue macrophages, adipocytes themselves, hepatocytes, and skeletal muscles. This contributes to the M1 polarization of macrophages, a decrease in glucose uptake by hepatocytes and myocytes due to the transfer of functionally active microRNAs by these EVs, which affect carbohydrate and lipid metabolism. Patients with T2DM and impaired glucose tolerance have significantly higher levels of CD235a-positive (erythrocyte) EVs, as well as a tendency to increase CD68-positive (leukocyte) and CD62p-positive (platelets/endothelial cells) EVs. The levels of CD31+/CD146-positive BB (endothelial cells) were comparable between diabetic and euglycemic patients. EVs from diabetic patients were preferably internalized by monocytes (mainly classical and intermediate monocyte fractions and to a lesser extent by non-classical monocyte fractions) and B cells compared to euglycemic patients. Internalization of EVs from patients with T2DM by monocytes leads to decreased apoptosis, changes in differentiation, and suppression of reactions controlling oxidative stress in monocytes. Thus, insulin resistance increases secretion of EVs, which are preferentially internalized by monocytes and influence their function. EVs are considered as sources of promising clinical markers of insulin resistance, complications of diabetes mellitus (endothelial dysfunction, retinopathy, nephropathy, neuropathy), and markers of EVs can also be used to monitor the effectiveness of therapy for these complications.

**Key words:** extracellular vesicles; exosomes; internalization; hyperglycemia; insulin resistance; type 2 diabetes mellitus

**Funding.** The study was performed with financial support of Siberian State Medical University “Molecular and biochemical mechanisms of the infectious and non-infectious somatic diseases based on the proteolysis regulation and the formation of metabolic disorders”.

Received: 24.11.2021, revised: 03.12.2021, accepted: 09.12.2021.