

УДК 571.27

Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, и их роль в регуляции противоопухолевого иммунитета

В. М. Украинская^{1#}, Ю. П. Рубцов^{1#}, В. Д. Кнорре¹, М. А. Масчан², А. Г. Габитов¹,
А. В. Степанов^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, 117997 Россия

Авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.

*E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Поступила в редакцию 08.09.2019

Принята к печати 05.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-33-41

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены современные представления о внеклеточных везикулах, выделяемых опухолевыми клетками, и их влиянии на противоопухолевый иммунитет. Приведена подробная характеристика строения, состава, биогенеза и функций опухолевых везикул. Охарактеризованы механизмы взаимодействия опухолевых везикул с клетками-акцепторами. Проведен критический обзор результатов современных исследований в области опухолевого микроокружения, наиболее детально рассмотрены пути подавления или активации лимфоцитов (CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток) опухолевыми везикулами.

Опухолевые везикулы играют важную роль в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. Несмотря на то что уже изучено множество различных путей влияния везикул на иммунные клетки, открытыми остаются вопросы гетерогенности везикул и их содержимого, путей слияния/поглощения везикул клетками иммунной системы, роли мРНК в трансформации Т-клеток и других аспектах везикулярной коммуникации между клетками. Потенциальное использование везикул для направленного воздействия на противоопухолевый иммунитет, а также подавление негативного влияния этих мембранных частиц на иммунитет можно рассматривать как новые подходы терапии онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА везикулы, иммунный ответ, CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоциты, опухолевое окружение, экзосомы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CD – кластер дифференцировки; EVs – внеклеточные везикулы; Hsp – белки-шапероны; TUBB4B, TUBA1C – тубулины-бета; МНС – комплекс гистосовместимости; АПК – антигенпрезентирующие клетки; N-SMase – нейтральная сфингомиелиназа; ARF6 – фактор ADP-рибозилирования 6; ESCRT – эндосомальный комплекс сортировки; MVVs – мультивезикулярные тельца; PLD2 – фосфолипаза D2; Th – Т-хелпер; Treg – регуляторная Т-клетка; NK – натуральный киллер; TRAIL – лиганд рецептора фактора некроза опухоли 10; IL – интерлейкин; NKG2D – рецептор группы натуральных киллеров 2 тип D; PD-1 – рецептор программируемой смерти клеток; A_{2A}R – рецептор аденозина; STAT – сигнальный белок и активатор транскрипции; TGFβ – трансформирующий ростовой фактор бета; IFN-γ – интерферон-гамма; JAK – янус-киназа; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; LFA – гетеродимерный интегрин подсемейства β2-интегринов; ICAM – молекула клеточной адгезии; TCR – Т-клеточный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Новые данные о происхождении, составе и действии внеклеточных везикул (extracellular vesicles, EVs) на клетки сильно изменили представления об их функциях и значении – из разряда клеточного «мусора» они превратились в новый способ межклеточного взаимодействия. Оказалось, что эти структуры внутриклеточного (как правило) происхождения

активно участвуют в регуляции иммунного ответа, а также в других процессах, требующих обмена информацией между клетками [1, 2]. Чрезвычайно важным этапом в «биографии» везикул стало обнаружение новой функции – переноса генетического материала (обычно в форме различных типов РНК), который попадает в клетки-мишени, модулирует их фенотип и функцию на генетическом и эпигенетиче-

ском уровнях [1]. Секреция внеклеточных везикул характерна не только для нормальных, но и для опухолевых клеток, что делает их важной составляющей опухолевого окружения. Стоит подчеркнуть, что опухолевые клетки выделяют значительно больше везикул по сравнению с нормальными клетками окружающей ткани, что можно связать с ускоренной пролиферацией в условиях стресса [3–5]. Многие факторы могут влиять на продукцию везикул клетками, так, к примеру, известно, что условия низкого рН в опухолевом микроокружении важны для поддержания стабильности липидно-холестеринового состава везикул [6]. Изменение количества везикул, а также их состава, хорошо коррелирует с прогнозом и тяжестью течения многих заболеваний, что позволяет использовать их для неинвазивной диагностики [7].

Везикулы, как часть клеточного окружения, участвуют, по-видимому, в дифференцировке, делении и поддержании/изменении фенотипа клеток как в норме, так и при различных патологиях, в том числе в различных видах онкологических заболеваний [2]. Несмотря на то что опухолевые везикулы в основном подавляют иммунную систему и способствуют развитию опухоли, одновременно они содержат опухолевые антигены. Это свойство везикул потенциально может быть использовано в иммунотерапии для стимуляции противоопухолевого ответа [8].

В данном обзоре рассмотрено, каким образом опухолевые везикулы участвуют в регуляции иммунного ответа и как они влияют на функции CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в контексте опухолевого окружения.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕЗИКУЛ

Термин «внеклеточные везикулы» объединяет сферические структуры клеточного происхождения размером от 30 до 1000 нм, окруженные билипидным слоем. Везикулы относят к разным типам по их усредненным размерам и биохимическому профилю (наборам входящих в их состав компонентов). Точную классификацию типов везикул затрудняет сложность их получения в чистом виде и физического разделения отдельных типов везикул [9]. Теоретически, внеклеточные везикулы можно классифицировать по размеру или происхождению [9, 10].

1) Экзосомы – структуры диаметром 30–150 нм эндосомального происхождения, несущие характерные маркеры семейства тетраспанинов (CD9, CD63, CD81) и шаперонов (Hsp70, Hsp90).

2) Микровезикулы – частицы цитоплазматического происхождения, являющиеся отделившимися частями цитоплазматической мембраны клетки размером от 100 до 1000 нм.

3) Апоптотические тельца – большие (1000–5000 нм) части клеток, формирующиеся в процессе апоптоза.

Нами подробно рассмотрены экзосомы и микровезикулы, которые далее представлены под общим названием везикулы, или EVs.

1.1. Состав везикул

Везикулы содержат набор белков – характерных маркеров определенной клеточной линии, из которой они были выделены [11]. К примеру, белки тубулины (TUBB4B и TUBA1C) присутствуют на везикулах, выделенных из клеток рака легкого [12], а CD20 на везикулах В-клеточной лимфомы [13]. В попытках понять весь спектр влияния опухолевых EVs на иммунные клетки изучен белковый и липидный состав везикул, который более подробно представлен на *рис. 1* [14–16]. Для любых опухолевых EVs характерно присутствие тетраспанинов – CD63, CD81, CD9, количество которых может варьировать в зависимости от типа опухоли и стадии прогрессии [17]. На мембране везикул также можно обнаружить молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС классов I и II (*рис. 1*), что особенно важно для везикул, выделяемых антигенпрезентирующими клетками (АПК) [18, 19]. Кроме белков и липидов, в везикулы попадает и генетический материал: ДНК [16, 20, 21], рибосомные РНК, матричные РНК, а также микроРНК и другие некодирующие РНК. Не до конца изучен механизм, благодаря которому нуклеиновые кислоты загружаются в EVs, но обнаружено присутствие определенных «баркодов» – коротких последовательностей микроРНК и РНК – характерных именно для РНК, выделяемых из везикул [20–22]. Базы данных по молекулярному составу везикул, такие, как EVpedia [23], Vesiclepedia [24], Exocarta [25], дают подробное описание белковых и липидных компонентов, представленных в различных видах EVs.

1.2. Биогенез везикул и взаимодействие с таргетными клетками

Экзосомы и микровезикулы образуются в клетке различными путями (*рис. 2*) [26]. Микровезикулы отделяются от цитоплазматической мембраны клетки при участии белков цитоскелета (актин, миозин и др.), нейтральной сфингомиелиназы N-SMase, участвующей в образовании церамида, а также ARF6 (фактор ADP-рибозилирования 6) и фосфолипазы PLD2 [27, 28]. В формировании как микровезикул, так и экзосом принимает участие эндосомальный комплекс сортировки (ESCRT), который направляет убиквитинированные белки в мультивезикулярные тельца (Multivesicular Bodies, MVBs) [26, 29].

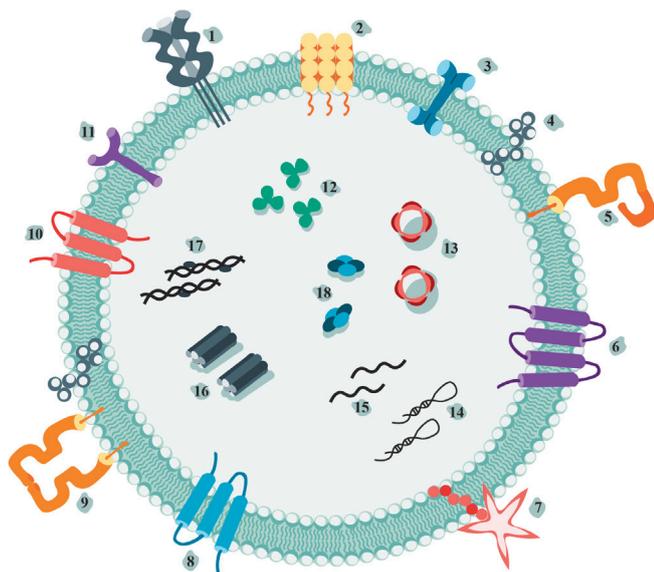


Рис. 1. Схематическое представление белкового состава типичной внеклеточной везикулы (на рисунке представлены самые распространенные компоненты опухолевой везикулы): молекулы адгезии (интегрины (11), тетраспанины (6, 7, 8, 10)), сигнальные молекулы (синтетины, аннексин V(3)), молекулы комплекса гистосовместимости (MHC I класса (5), MHC II класса (9)), белки цитоскелета (актин, миозин (16)), белки теплового шока (12), липидные структуры (церамид (4)), белки, связанные с формированием везикул (AUX/Alix (13)), белки метаболизма (GAPDH (18)) и др. 1 – FasL; 2 – ICAM-1; 3 – аннексин V; 4 – церамид; 5 – MHC I класса; 6 – тетраспанин CD81; 7 – CD80; 8 – тетраспанин CD9; 9 – MHC II класса; 10 – тетраспанин CD63; 11 – интегрины; 12 – белки шапероны, белки теплового шока (HSP); 13 – AUX/Alix; 14 – микроРНК; 15 – мРНК; 16 – актин, миозин; 17 – ДНК с белками гистонами; 18 – GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

ESCRT состоит из четырех белковых компонентов (ESCRT-0, -I, -II и -III), которые последовательно связывают белки для формирования внутриклеточных везикул [7]. Вспомогательные белки синдекан-синтегин-ALIX (ALG-2-interacting protein X), в свою очередь, инициируют отщепление экзосомы от мембраны MVBs [30]. По существующим данным альтернативным путем биогенеза EVs является образование гликолипопротеиновых доменов (липидных рафтов), в состав которых входит сфингомиелиназа N-SMase. Синтез церамида сфингомиелиназой и его накопление в мембране приводят к слиянию рафтов и образованию экзосомы в полости MVBs

[31]. Экзосомы, находящиеся в полости MVBs, выделяются во внеклеточное пространство посредством слияния мембран клетки и MVBs, и этот процесс регулируется GTP-азами семейства Rab и Ras, а также белком SNAPE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) [21, 32].

Существование нескольких путей образования EVs подтверждается многими исследованиями [33]. Так в клетках, лишенных ESCRT-белков, наблюдалось образование MVBs, хотя выделенные везикулы обладали нестандартным составом и морфологией [31]. Ингибирование или нокаут сфингомиелиназы N-SMase уменьшает продукцию везикул клетками, а также снижает уровень метастазирования и ангиогенеза в опухоли [34]. Однако самостоятельное образование EVs в результате ESCRT-независимого пути с участием сфингомиелиназы вызывает сомнение, так как подтверждено, что липидные рафты не требуются для формирования экзосом [35]. Несмотря на то что пути биогенеза EVs теоретически разделяют на ESCRT-зависимый и ESCRT-независимый, образование определенной популяции EVs может зависеть в разной степени от каждого из путей [9, 36].

Функции EVs в опухолевом окружении могут быть различными, но практически все они так или иначе реализуются при контакте везикулы с целевой клеткой [2]. Везикулы могут переносить к поверхности/доставлять внутрь клеток белковые молекулы, по меньшей мере, четырьмя разными способами (рис. 2):

- контакт между специфическими экспонированными на внешней стороне мембраны белками везикул с рецепторами клеток-реципиентов с возможностью активации внутриклеточных сигнальных каскадов [2, 19];
- отщепление поверхностных везикулярных белков под действием внеклеточных протеаз и их дальнейшее взаимодействие с мембранными рецепторами клеток [29];
- слияние везикулярной и клеточной мембран с последующим высвобождением внутривезикулярного содержимого в цитоплазму клетки либо с образованием эндосомы [26];
- фагоцитоз и интернализация целой везикулы клеткой-реципиентом [5, 21, 37].

Взаимодействие везикулярных тетраспанинов, протеогликанов, лектинов и интегринов с мембранными рецепторами клетки-реципиента запускает процесс проникновения везикулы в клетку, который возможно заблокировать специфическим антителом к определенному везикулярному белку. К примеру, обработка везикул антителами к CD81 или CD9 или блокирование протеогликанов сульфатом гепарина снижают уровень адгезии везикул

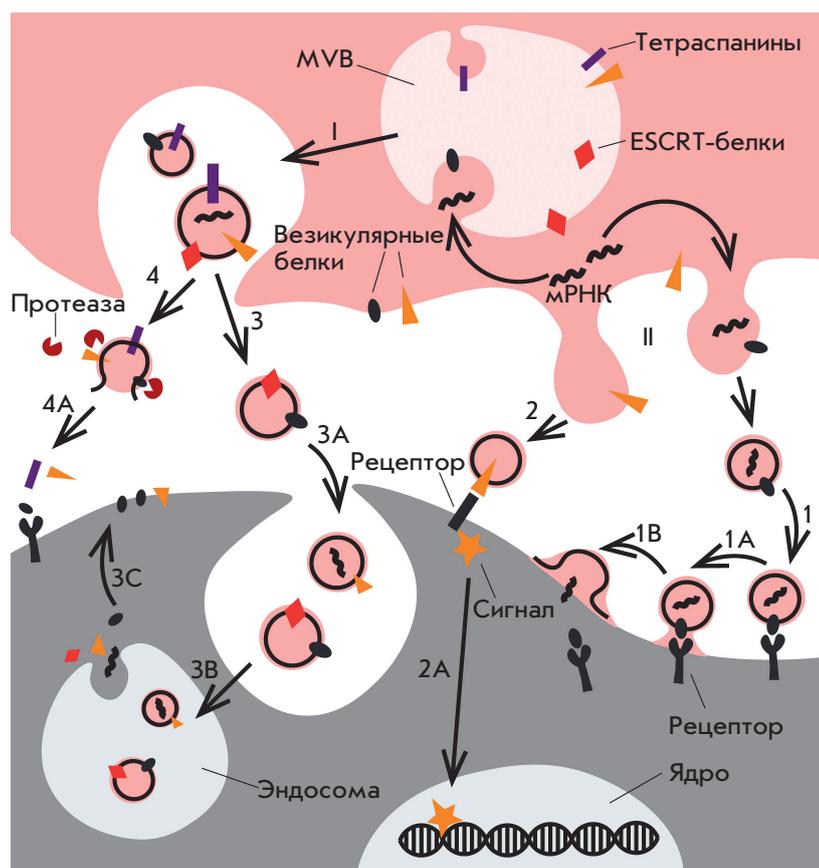


Рис. 2. Биогенез внеклеточных везикул и их поглощение таргетными клетками. Пути биогенеза внеклеточных везикул (I, II). I – образование экзосом в мультивезикулярном тельце (MVBs) при участии ESCRT-зависимого / ESCRT-независимого путей биогенеза – слияние MVBs с цитоплазматической мембраной клетки; II – образование микровезикул путем отделения от цитоплазматической мембраны клетки. Пути поглощения внеклеточных везикул таргетной клеткой (1, 2, 3, 4). 1 – взаимодействие лиганда на поверхности EVs с клеточным рецептором с дальнейшим эндоцитозом везикулярного содержимого; 1A – слияние везикулярной и клеточной мембран; 1B – высвобождение везикулярного содержимого в цитоплазму клетки; 2 – взаимодействие везикул с клеточными рецепторами; 2A – запуск внутриклеточных сигнальных каскадов; 3 – выделение внеклеточной везикулы; 3A – фагоцитоз везикулы; 3B – образование эндосомы с везикулярным содержимым; 3C – интернализация везикулярных компонентов клеткой-реципиентом; 4 – отщепление под действием протеаз мембранных везикулярных белков; 4A – взаимодействие везикулярных белков с клеточными рецепторами

к клетке-реципиенту. Процесс эндоцитоза везикулы клеткой также можно заблокировать цитохалазином В или латранкулином А, которые ингибируют компоненты цитоскелета (актин, фибронектин) [2]. Секретция везикул и их проникновение в клетку – это процессы, которые до настоящего времени исследованы и охарактеризованы по большей части *in vitro*, поэтому необходимо их изучение *in vivo*, что позволит определить физиологическую роль влияния везикул на окружающие клетки.

Таким образом, можно сделать вывод, что разнообразие EVs и их белкового состава, множественные варианты взаимодействия EVs с таргетными клетками характеризуют EVs как многофункциональную составляющую любого физиологического и патофизиологического процесса. Везикулы могут выполнять различные функции в зависимости от их клеточного происхождения – начиная с регуляции иммунных реакций, подавления опухолевой инвазии, заканчивая ролью межклеточных коммуникаторов. Изучение того, как подобные нанобразования в составе клеточного окружения могут оказывать диаметрально противоположные эффекты, позволит использовать везикулы в качестве мишеней для противоопухолевой терапии или «жидкой биопсии» для диагностики развития опухоли [38].

2. ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ: ИММУННЫЙ ОТВЕТ И РОЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ ВЕЗИКУЛ

В опухолевом окружении присутствуют разные популяции клеток, формирующие строму (фибробласты) и иммунологическое окружение (опухолевые лимфоциты, макрофаги, миелоидные супрессорные клетки и др.). Комплекс реакций иммунного ответа осуществляют Т-лимфоциты, которые не только инициируют, стимулируют (CD4⁺ Т-лимфоциты, Т-хелперные клетки (Th)) или регулируют (регуляторные Т-клетки, Treg) иммунный ответ, но и разрушают инфицированные или опухолевые клетки (CD8⁺ Т-киллерные клетки, цитотоксические Т-лимфоциты). Логичным завершением Т-клеточного иммунного ответа являются уничтожение опухолевых клеток и образование клеток памяти [8]. В свою очередь, опухолевые клетки пользуются различными способами «ускользания» от иммунного ответа, одним из которых, по существующим данным, является выделение опухолевых везикул.

Идентифицированы следующие механизмы, посредством которых опухолевые везикулы могут способствовать избеганию иммунного ответа опухолями (рис. 3):

(1) активация апоптоза у CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов [39];

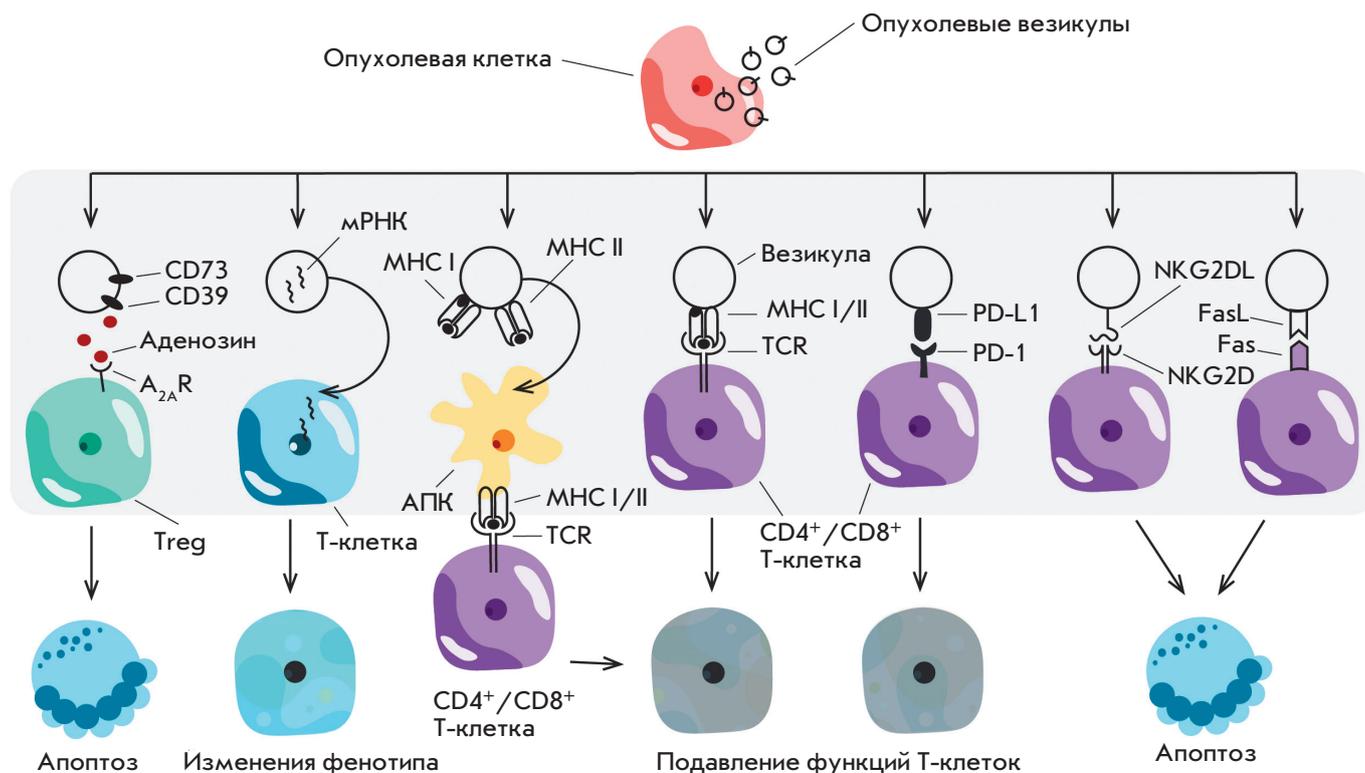


Рис. 3. Влияние опухолевых везикул на различные популяции Т-лимфоцитов. На рисунке представлены эффекты, которые секретируемые опухолевые везикулы могут оказывать на Т-клетки

(2) смещение фенотипа CD4⁺ клеток в сторону Treg-лимфоцитов [40, 41];

(3) передача везикулами и презентация опухолевого антигена клетками, не относящимися к профессиональным АПК или незрелым АПК, вызывающим анергию Т-лимфоцитов в отсутствие костимулирующих сигналов [42–44];

(4) регулируемое подавление Т-клеточного иммунного ответа, который зависит от разных механизмов [45];

(5) перепрограммирование макрофагов в M2-фенотип (поддерживает опухоли) [39, 46, 47];

(6) снижение скорости пролиферации NK-клеток [40].

Далее подробно рассмотрены пути, показанные на рис. 3, через которые опухолевые везикулы могут воздействовать на CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоциты.

3. НЕГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ, ВЫЗВАННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ВЕЗИКУЛ С ПОВЕРХНОСТНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

3.1. Везикулы индуцируют апоптоз CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов

Выделение опухолевыми клетками EVs, несущих на себе факторы активации апоптоза, рассматрива-

ется как один из механизмов иммуносупрессии [48, 49]. При инкубации с Fas⁺ Т-клетками EVs, несущие на себе высокоактивный мембранный белок FasL, способствуют выделению в цитозоль цитохрома с, потере мембранного потенциала митохондриями, активации каспаз и фрагментации ДНК хроматина в Т-клетках [48, 50, 51]. Коэкспрессия FasL и TRAIL на поверхности секретируемых опухолевых EVs также приводит к индукции апоптоза в CD8⁺ Т-клетках [52]. Везикулы, выделяемые опухолевыми клетками, вызывают апоптоз Th1-клеток через взаимодействие галектин-9/Tim-3 [53]. В свою очередь, везикулы, полученные из нормальных клеток (фибробластов или дендритных клеток), не вызывают апоптоз активированных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [54].

Экспериментально доказано, что в Т-клетках, находящихся в опухолевом окружении, также может наблюдаться снижение экспрессии молекулы CD3 ζ , что приводит к анергии Т-клеток и коррелирует с уменьшением выброса таких цитокинов, как IL-2, IL-7 и IL-15. Этот эффект могут оказывать содержащие FasL⁺ везикулы, которые, взаимодействуя с Fas⁺-лимфоцитами, снижают количество молекул CD3 ζ и JAK3 (Janus kinase 3, тирозин-специфичная протеинкиназа 3) в первично активированных

Т-клетках и способствуют переходу клеток в апоптотическое состояние [55].

Система NKG2D/NKG2DL также играет немаловажную роль в выживании иммунных клеток [56, 57]. Рецептор NKG2D (The Natural Killer Group 2D, рецептор группы естественных киллерных клеток) присутствует на мембране NK-клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов [58]. Лигандом (NKG2DL) данного рецептора служат МНС I-подобные молекулы и UL-16-связывающие белки, слабо представленные на поверхности нормальных нестрессированных клеток. Появление этих молекул на мембране активируется клеточным стрессом – вирусной инфекцией или опухолевой трансформацией [59]. Опухолевые EVs, экспрессирующие различные NKG2DL, связывают NKG2D на поверхности NK-клеток и CD8⁺ Т-клеток, что приводит к ослаблению цитотоксических функций Т-клеток [60–62].

3.2. Подавление активации Т-клеток через взаимодействие PD-L1/PD-1

Физиологической ролью рецептора PD-1 (Programmed death-1) иммунных клеток является регулирование чрезмерной активации лимфоцитов. При взаимодействии с лигандом (PD-L1) рецептор PD-1 передает внутрь Т-клетки негативный сигнал, ингибирующий пролиферацию Т-клеток и усиливающий их апоптоз. Недавние исследования показали, что на опухолевых везикулах присутствует PD-L1, с помощью которого они могут подавлять активацию Т-клеток [47, 63, 64]. В частности, клетки меланомы выделяют PD-L1⁺ везикулы, количество PD-L1 в которых прямо пропорционально уровню IFN- γ , секретируемого лимфоцитами [65]. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что клетки гепатоцеллюлярной карциномы также выделяют PD-L1⁺ везикулы, которые ингибируют CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты посредством взаимодействия PD-L1/PD-1 [66, 67]. При взаимодействии PD-L1 позитивных везикул с Т-клетками эффект супрессии пропадает при предварительной инкубации с anti-PD-L1-антителом, которое блокировало PD-L1 на везикулах [67].

3.3. Выделение иммуносупрессорного аденозина

Аденозин известен как один из иммуносупрессорных факторов [40]. Взаимодействуя с одной из изоформ рецептора аденозина A_{2A}R, экспрессируемого на поверхности Т-клеток, он повышает уровень сАМФ в CD4⁺ Т-клетках, тем самым подавляя их активацию [40]. Гидролиз АТФ в аденозин осуществляет CD39 (АТФ-гидролаза), которая конвертирует АТФ в 5'-АМФ, и CD73 (5'-нуклеаза), превращающая 5'-АМФ в аденозин [68].

Опухолевые везикулы нередко несут оба этих фермента (то есть являются CD73⁺CD39⁺), что негативно сказывается на Т-клетках в опухолевом окружении [69]. CD73⁺CD39⁺ везикулы индуцируют продукцию аденозина, а при более длительном контакте везикул с клетками также активируют синтез инозина [70]. Инозин поддерживает длительную активацию A_{2A}R-рецептора на Treg-клетках, которые в свою очередь оказывают сильный супрессорный эффект на CD4⁺ Т-клетки [71]. Оказалось, что такой непрямой сигнал от опухолевых везикул намного сильнее, чем от самих клеток, что подтверждает большой вклад EVs в межклеточное взаимодействие [72].

4. ИЗМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ПОВЕДЕНИЯ ПРИ ПОПАДАНИИ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВНУТРЬ КЛЕТКИ

4.1. Везикулярная РНК модулирует функции Т-клеток

Везикулы содержат различные типы РНК, самыми многочисленными и разнообразными видами являются мРНК и микроРНК. В меньших количествах были найдены 18S и 28S рибосомные РНК и ДНК. База данных EchoCarta, основанная на 286 исследованиях, насчитывает около 6 тысяч охарактеризованных микроРНК и мРНК, выделенных из EVs [73]. Горизонтальный перенос мРНК от везикулы к клетке-мишени может влиять на уровень транскрипции некоторых генов, которые, к примеру, участвуют в подавлении/усилении функций Т-клеток, в частности, ответственных за продукцию и секрецию провоспалительных цитокинов и других биологически активных молекул.

Опухоль и ее микроокружение активно участвуют в индукции активных Treg, способствуя превращению CD4⁺CD25⁻ наивных Т-клеток в CD4⁺CD25⁺ Treg. EVs также могут индуцировать CD4⁺CD25⁻ Т-клетки к переходу в фенотип CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клеток. Эта конверсия наивных Т-клеток в Treg-клетки требует фосфорилирования и сопутствующей активации факторов транскрипции Smad2/3 (Similar to Mothers Against Decapentaplegic 2/3) и STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [74, 75]. Повышенная интенсивность образования Treg приводит к дисбалансу в составе иммунных клеток в опухолевом микроокружении, что индуцирует TGF β -зависимый механизм апоптоза популяций эффекторных Т-клеток. В свою очередь, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клетки также могут выделять EVs, которые вызывают подавление пролиферации Т-хелперов 1 типа (Th1) и CD8⁺ Т-клеток и снижение секреции ими IFN- γ [74–76].

При доказанном увеличении количества Treg-клеток в опухоли количество дифференцированных

Th1- и Th17-лимфоцитов в то же время уменьшается, что приводит к развитию Treg/Th-дисбаланса [77, 78]. Такой дисбаланс сопровождается обнаружением в таргетных клетках специфических микроРНК miR-29a-3p и miR-21-5p, имеющих везикулярное происхождение [79]. Накапливаясь в клетках, данные микроРНК могут влиять на различные сигнальные пути, связанные с подавлением активации Т-клеток. Активация MAPK1-пути (митоген-активированной протеинкиназы), STAT3/JAK1 и других путей в CD4⁺ Т-клетках посредством везикулярной микроРНК приводит к нарушению цитокинового профиля Th- и Th17-клеток, а в случае Treg способствует смене лимфоцитарного фенотипа [80, 81].

Влияние везикулярной мРНК на функции Т-лимфоцитов напрямую зависит от того, являются ли Т-клетки наивными или активированными. Обнаружено, что опухолевые везикулы значительно увеличивали уровень экспрессии генов с доказанной функцией регуляции иммунитета у активированных CD4⁺ Т-клеток, в то время как у нестимулированных клеток экспрессия генов незначительно возрастала только для FAS1, IL-10, PTGS2 и, наоборот, снижалась для DPP4, CD40LG и NT5E [82].

4.2. Активация/подавление Т-клеток везикулами, несущими на поверхности антигенпрезентирующие комплексы

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) также могут выделять везикулы. Более того, данные везикулы несут МНС II (главный комплекс гистосовместимости II типа) и могут опосредованно стимулировать активированные, но не наивные CD4⁺ Т-клетки. МНС I⁺ везикулы, полученные из АПК, также могут активировать наивные CD8⁺ Т-клетки [51]. Этот процесс определяется взаимодействием TCR (Т-клеточного рецептора) на мембране Т-лимфоцитов с комплексом МНС-пептид при наличии дополнительного ко-стимулирующего сигнала от молекул CD28/V7 либо молекул адгезии LFA-1/ICAM-1, представленных на поверхности везикул. Известно, что взаимодействие TCR и МНС при отсутствии ко-стимулирующих сигналов приводит к Т-клеточной

анергии, то есть неспособности клеток в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора делиться и секретировать цитокины [83, 84].

Установлено, что везикулы, выделенные из клеток меланомы, также могут переносить МНС I от опухолевых клеток к АПК, с чем сопряжено изменение профиля экспрессии рецепторов на поверхности АПК. Вероятно, цитокины и мРНК везикулярного происхождения оказывают иммуносупрессорный эффект на АПК, что приводит к уменьшению количества МНС I и молекул CD40 на поверхности клеток [83]. Смещение фенотипа АПК в сторону иммуносупрессорного уменьшает возможность стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, что также может быть механизмом «ускользания» опухолевых клеток от иммунного ответа [83, 84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, следует сказать, что в современной литературе существуют указания на то, что внеклеточные везикулы, выделяемые опухолями, могут быть важным фактором в формировании иммуносупрессорного микроокружения. Негативное влияние на иммунитет может осуществляться рецепторными взаимодействиями между таргетными клетками и везикулами, вызывающими анергию или апоптоз Т-клеток. Везикулы и их содержимое могут поглощаться таргетными клетками, что также приведет к передаче иммуносупрессорного сигнала. Действие везикул может быть одной из причин резистентности к терапии и фенотипических изменений в клетках опухоли, индуцированных химио- и радиотерапией. Поскольку действие EVs на клетки иммунитета, в частности Т-клетки, изучено слабо, характеристика EV и идентификация молекулярных механизмов, лежащих в основе их связывания и биологического эффекта, являются актуальной задачей с научной и практической точки зрения. ●

Написание глав 1, 2, 3.1, 3.2 выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-29-04087 мк, глав 3.3 и 4 – при поддержке гранта РФФИ № 17-74-30019.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. // Nat. Cell Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 654–659.
- Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R.F. // J. Extracell. Vesicles. 2014. V. 3. № 1. P. 24641.
- Lv L.-H., Wan Y.-L., Lin Y., Zhang W., Yang M., Li G.-L., Lin H.-M., Shang C.-Z., Chen Y.-J., Min J. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 19. P. 15874–15885.
- Lespagnol A., Duflaut D., Beekman C., Blanc L., Fiucci G., Marine J.-C., Vidal M., Amson R., Telerman A. // Cell Death Differ. 2008. V. 15. № 11. P. 1723–1733.
- Brinton L.T., Sloane H.S., Kester M., Kelly K.A. // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 4. P. 659–671.
- Ludwig N., Whiteside T.L., Reichert T.E. // Intern. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 19. P. 4684.
- Bebelmann M.P., Smit M.J., Pegtel D.M., Baglio S.R. // Pharmacology & Therapeutics. 2018. V. 188. P. 1–11.
- Czernek L., Döchler M. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 2017. V. 65. № 4. P. 311–323.
- Barros F.M., Carneiro F., Machado J.C., Melo S.A. // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 730.
- Aiello S., Rocchetta F., Longaretti L., Faravelli S., Todeschini

- M., Cassis L., Pezzuto F., Tomasoni S., Azzollini N., Mister M., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11518.
11. Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F. // *Immunol. Rev.* 2013. V. 251. № 1. P. 125–142.
 12. Hurwitz S.N., Rider M.A., Bundy J.L., Liu X., Singh R.K., Meckes D.G. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 52. P. 86999–87015.
 13. Haderk F., Schulz R., Iskar M., Cid L.L., Worst T., Willmund K.V., Schulz A., Warnken U., Seiler J., Benner A., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 13. P. eaah5509.
 14. Robbins P.D., Morelli A.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14. № 3. P. 195–208.
 15. Zhang B., Yin Y., Lai R.C., Lim S.K. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 518.
 16. Guescini M., Guidolin D., Vallorani L., Casadei L., Gioacchini A.M., Tibollo P., Battistelli M., Falcieri E., Battistin L., Agnati L.F., et al. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 12. P. 1977–1984.
 17. Théry C., Ostrowski M., Segura E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. V. 9. № 8. P. 581–593.
 18. Greening D.W., Gopal S.K., Xu R., Simpson R.J., Chen W. // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2015. V. 40. P. 72–81.
 19. Kahlert C., Kalluri R. // *J. Mol. Med.* 2013. V. 91. № 4. P. 431–437.
 20. Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 7. P. 3869–3875.
 21. Abels E.R., Breakefield X.O. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2016. V. 36. № 3. P. 301–312.
 22. Batagov A.O., Kuznetsov V.A., Kurochkin I.V. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12 Suppl 3. P. S18.
 23. Kim D.-K., Kang B., Kim O.Y., Choi D., Lee J., Kim S.R., Go G., Yoon Y.J., Kim J.H., Jang S.C., et al. // *J. of Extracellular Vesicles.* 2013. V. 2. № 1. P. 20384.
 24. Kalra H., Simpson R.J., Ji H., Aikawa E., Altevogt P., Askenase P., Bond V.C., Borràs F.E., Breakefield X., Budnik V., et al. // *PLoS Biology.* 2012. V. 10. № 12. P. e1001450.
 25. Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Saffar H.A., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilamkurthi N., et al. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 4. P. 688–692.
 26. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. // *Nat. Cell Biol.* 2019. V. 21. № 1. P. 9–17.
 27. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brugger B., Simons M. // *Science.* 2008. V. 319. № 5867. P. 1244–1247.
 28. Ghossoub R., Lembo F., Rubio A., Gaillard C.B., Bouchet J., Vitale N., Slavik J., Machala M., Zimmermann P. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 1. P. 3477.
 29. Christ L., Raiborg C., Wenzel E.M., Campsteijn C., Stenmark H. // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. № 1. P. 42–56.
 30. Hoshino D., Kirkbride K.C., Costello K., Clark E.S., Sinha S., Grega-Larson N., Tyska M.J., Weaver A.M. // *Cell Rep.* 2013. V. 5. № 5. P. 1159–1168.
 31. Kalra H., Drummen G., Mathivanan S. // *IJMS.* 2016. V. 17. № 2. P. 170.
 32. Hessvik N.P., Llorente A. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. V. 75. № 2. P. 193–208.
 33. Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. // *Traffic.* 2009. V. 10. № 7. P. 925–937.
 34. Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K., Yoshioka Y., Takeshita F., Ochiya T. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 15. P. 10849–10859.
 35. Willert T., Hurley J.H. // *Nature.* 2010. V. 464. № 7290. P. 864–869.
 36. Maas S.L.N., Breakefield X.O., Weaver A.M. // *Trends in Cell Biology.* 2017. V. 27. № 3. P. 172–188.
 37. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. // *J. Proteomics.* 2010. V. 73. № 10. P. 1907–1920.
 38. Wiklander O.P.B., Brennan M.Á., Lötval J., Breakefield X.O., EL Andaloussi S. // *Science Translational Medicine.* 2019. V. 11. № 492. P. eaav8521.
 39. de Vrij J., Maas S.L.N., Kwappenberg K.M.C., Schnoor R., Kleijn A., Dekker L., Luider T.M., de Witte L.D., Litjens M., van Strien M.E., et al. // *Int. J. Cancer.* 2015. V. 137. № 7. P. 1630–1642.
 40. Whiteside T.L. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. № 1. P. 245–251.
 41. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. // *Cell.* 2008. V. 133. № 5. P. 775–787.
 42. Matzinger P. // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. V. 12. P. 991–1045.
 43. Schwartz R.H. // *Science.* 1990. V. 248. № 4961. P. 1349–1356.
 44. Steinman R.M., Turley S., Mellman I., Inaba K. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. № 3. P. 411–416.
 45. van Parijs L., Abbas A.K. // *Science.* 1998. V. 280. № 5361. P. 243–248.
 46. Shinohara H., Kuranaga Y., Kumazaki M., Sugito N., Yoshikawa Y., Takai T., Taniguchi K., Ito Y., Akao Y. // *J. Immunol.* 2017. V. 199. № 4. P. 1505–1515.
 47. Gabrusiewicz K., Li X., Wei J., Hashimoto Y., Marisetty A.L., Ott M., Wang F., Hawke D., Yu J., Healy L.M., et al. // *Oncoimmunology.* 2018. V. 7. № 4. P. e1412909.
 48. Andreola G., Rivoltini L., Castelli C., Huber V., Perego P., Deho P., Squarcina P., Accornero P., Lozupone F., Lugini L., et al. // *J. Exp. Med.* 2002. V. 195. № 10. P. 1303–1316.
 49. Keryer-Bibens C., Pioche-Durieu C., Villemant C., Souquère S., Nishi N., Hirashima M., Middeldorp J., Busson P. // *BMC Cancer.* 2006. V. 6. P. 283.
 50. Wieckowski E.U., Visus C., Szajnik M., Szczepanski M.J., Storkus W.J., Whiteside T.L. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 6. P. 3720–3730.
 51. Sprent J. // *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2005. V. 35. № 1. P. 17–20.
 52. Martínez-Lorenzo M.J., Anel A., Alava M.A., Piñeiro A., Naval J., Lasierra P., Larrad L. // *Exp. Cell Res.* 2004. V. 295. № 2. P. 315–329.
 53. Klibi J., Niki T., Riedel A., Pioche-Durieu C., Souquère S., Rubinstein E., Le Moulec S., Guigay J., Hirashima M., Guemira F., et al. // *Blood.* 2009. V. 113. № 9. P. 1957–1966.
 54. Wieckowski E., Whiteside T.L. // *Immunol. Res.* 2006. V. 36. № 1–3. P. 247–254.
 55. Taylor D.D., Gerçel-Taylor Ç., Lyons K.S., Stanson J., Whiteside T.L. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. № 14. P. 5113.
 56. González S., López-Soto A., Suarez-Alvarez B., López-Vázquez A., López-Larrea C. // *Trends Immunol.* 2008. V. 29. № 8. P. 397–403.
 57. Ljunggren H.-G. // *Immunity.* 2008. V. 28. № 4. P. 492–494.
 58. Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W., Xiong N., Carlyle J.R., Raulet D.H. // *Immunity.* 2002. V. 17. № 1. P. 19–29.
 59. Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., Raulet D.H. // *Nature.* 2005. V. 436. № 7054. P. 1186–1190.
 60. Clayton A., Mitchell J.P., Court J., Linnane S., Mason M.D., Tabi Z. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 11. P. 7249–7258.
 61. Clayton A., Tabi Z. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2005. V. 34. № 3. P. 206–213.
 62. Lundholm M., Schröder M., Nagaeva O., Baranov V., Widmark A., Mincheva-Nilsson L., Wikström P. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. P. e108925.
 63. Theodoraki M.-N., Yerneni S.S., Hoffmann T.K., Gooding W.E., Whiteside T.L. // *Clin. Cancer Res.* 2018. V. 24. № 4. P. 896–905.

64. Poggio M., Hu T., Pai C.-C., Chu B., Belair C.D., Chang A., Montabana E., Lang U.E., Fu Q., Fong L., et al. // *Cell*. 2019. V. 177. № 2. P. 414–427.
65. Chen G., Huang A.C., Zhang W., Zhang G., Wu M., Xu W., Yu Z., Yang J., Wang B., Sun H., et al. // *Nature*. 2018. V. 560. № 7718. P. 382–386.
66. Li P., Liu D., Chen J., Wu J., Zhang G., Wang C., Chen J., Hu B., Li C. // *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2019. V. 12. № 5. P. 5333–5340.
67. Kim D.H., Kim H., Choi Y.J., Kim S.Y., Lee J.-E., Sung K.J., Sung Y.H., Paek C.-G., Jung M., Han B., et al. // *Exp. Mol. Med*. 2019. V. 51. № 8. P. 1–13.
68. Clayton A., Al-Taei S., Webber J., Mason M.D., Tabi Z. // *J. Immunol*. 2011. V. 187. № 2. P. 676–683.
69. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., et al. // *Blood*. 2007. V. 110. № 4. P. 1225–1232.
70. Welihinda A.A., Kaur M., Greene K., Zhai Y., Amento E.P. // *Cell. Signal*. 2016. V. 28. № 6. P. 552–560.
71. Muller L., Simms P., Hong C.-S., Nishimura M.I., Jackson E.K., Watkins S.C., Whiteside T.L. // *Oncoimmunology*. 2017. V. 6. № 8. P. e1261243.
72. Smyth L.A., Ratnasothy K., Tsang J.Y.S., Boardman D., Warley A., Lechler R., Lombardi G. // *Eur. J. Immunol*. 2013. V. 43. № 9. P. 2430–2440.
73. Li J., Tian T., Zhou X. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019. V. 137. P. 27–34.
74. Strauss L., Bergmann C., Whiteside T.L. // *J. Immunol*. 2009. V. 182. № 3. P. 1469–1480.
75. Szajnik M., Czystowska M., Szczepanski M.J., Mandapathil M., Whiteside T.L. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 7. P. e11469.
76. Czystowska M., Strauss L., Bergmann C., Szajnik M., Rabinowich H., Whiteside T.L. // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2010. V. 88. № 6. P. 577–588.
77. Charbonneau B., Moysich K.B., Kalli K.R., Oberg A.L., Vierkant R.A., Fogarty Z.C., Block M.S., Maurer M.J., Goergen K.M., Fridley B.L., et al. // *Cancer Immunol. Res*. 2014. V. 2. № 4. P. 332–340.
78. Duan M.-C., Zhong X.-N., Liu G.-N., Wei J.-R. // *J. Immunol. Res*. 2014. V. 2014. P. 730380.
79. Zhou J., Li X., Wu X., Zhang T., Zhu Q., Wang X., Wang H., Wang K., Lin Y., Wang X. // *Cancer Immunol. Res*. 2018. V. 6. № 12. P. 1578–1592.
80. Zheng Y., Wang Z., Deng L., Zhang G., Yuan X., Huang L., Xu W., Shen L. // *Clin. Immunol*. 2015. V. 157. № 1. P. 65–77.
81. Chalmin F., Ladoire S., Mignot G., Vincent J., Bruchard M., Remy-Martin J.-P., Boireau W., Rouleau A., Simon B., Lanneau D., et al. // *J. Clin. Invest*. 2010. V. 120. № 2. P. 457–471.
82. Muller L., Mitsuhashi M., Simms P., Gooding W.E., Whiteside T.L. // *Sci. Rep*. 2016. V. 6. № 1. P. 20254.
83. Chen L., Hasni M.S., Jondal M., Yakimchuk K. // *Autoimmunity*. 2017. V. 50. № 6. P. 370–376.
84. Guery L., Hugues S. // *Front. Immunol*. 2013. V. 4. P. 59.