

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

© 2021 г. Е. А. Супруненко<sup>а, \*</sup>, Е. А. Сазонова<sup>а</sup>, А. В. Васильев<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
Ленинские горы, 1, стр. 12, Москва, 119234 Россия

<sup>б</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: [suprunenkoe@mail.ru](mailto:suprunenkoe@mail.ru)

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 27.01.2021 г.

Принята к публикации 31.01.2021 г.

В обзорной статье представлены данные о внеклеточных везикулах (extracellular vesicles – EV), представляющих собой бислоиные фосфолипидные мембранные структуры, выделяемые разными типами клеток, содержащие белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Рассматриваются особенности их строения, биогенеза, механизмы взаимодействия с клеткой-реципиентом. Рассмотрены свойства внеклеточных везикул эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и их роль в регуляции процессов развития. Особое внимание уделено везикулам индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), их роли в поддержании плюрипотентности, а также свойствам везикул клеток, полученных в ходе направленной дифференцировки ИПСК.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, плюрипотентные стволовые клетки, паракринные регуляторы, репарация

DOI: 10.31857/S0475145021030071

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений биологии развития является изучение механизмов клеточной дифференцировки на разных этапах онтогенеза, прежде всего в эмбриогенезе.

В настоящее время хорошо изучена роль стволовых клеток и компонентов микроокружения в процессе восстановления тканей (Sun et al., 2018; Terashvili, Bosnjak, 2019; Yang et al., 2020 и др.). Считается, что стволовые клетки обеспечивают репаративные процессы за счет их способности дифференцироваться под действием микроокружения и замещать утраченную (поврежденную) ткань. Однако, все больше исследований свидетельствуют в пользу того, что помимо прямой дифференцировки стволовые клетки могут регулировать репаративный процесс посредством паракринной секреции, выступая специфическими регуляторами дифференцировок (Madrigal et al., 2014; Kopala et al., 2016). Компоненты секреции клеток, в том числе везикулярный компонент, опосредуют межклеточную коммуникацию, регулируя морфофункциональное состояние ткани и органа.

Хорошо изучена роль везикул, выделяемых клетками в постнатальный период, в механизмах паракринной регуляции процессов репарации (Rani et al., 2015; Alcaayaga-Miranda et al., 2016). Од-

нако, роль внеклеточных везикул в процессах раннего развития, поддержании плюрипотентности и дифференцировке плюрипотентных клеток изучена недостаточно.

Актуальным является изучение роли внеклеточных везикул, являющихся компонентами регуляторной системы плюрипотентных стволовых клеток, в обеспечении межклеточной коммуникации в развитии.

В данном обзоре проведен анализ данных литературы, касающихся не только структуры и свойств внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток, но и их регуляторных свойств в раннем эмбриогенезе и при моделировании дифференцировки клеток в системе *in vitro*. Проведено сопоставление свойств внеклеточных везикул эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и клеток с индуцированной плюрипотентностью (ИПСК), рассмотрены свойства везикул ИПСК с учетом их онтогенетического происхождения.

### ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ: ИСТОРИЯ, СТРУКТУРА, БИОГЕНЕЗ И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА

Первые сведения о везикулярных частицах появились в 1960-х годах. Вульф с коллегами (Wolf

et al., 1967) показали, что плазма крови, освобожденная от интактных тромбоцитов, содержит мельчайшие частицы, которые могут быть отделены посредством ультрацентрифугирования. Оказалось, что диаметр этих частиц, которые исследователи назвали “тромбоцитарная пыль”, составляет около 20–50 нм. Большая часть этого материала богата фосфолипидами и обладает коагулянтными свойствами, напоминающими свойства тромбоцитарного фактора 3 (тромбоцитарный тромбопластин). Интересно, что образовавшийся в результате ультрацентрифугирования супернатант, освобожденный от этих частиц, демонстрирует дефицит активности тромбоцитарного фактора 3. Основываясь на этих данных, авторы сделали предположение, что именно наличие данных частиц позволяет судить об “активации” тромбоцитов, т.е. о приобретении ими свойств, характеризующих их физиологическую активность.

Примерно в то же время стали появляться работы (Anderson, 1969), в которых было показано наличие мелких частиц – микровезикул в хрящевой матрице эпифизарной пластинки верхней части большеберцовой кости мыши. Предполагалось, что данные везикулы происходят из хондроцитов и могут играть определенную роль в иницировании кальцификации в эпифизе кости.

В начале 70-х годов XX века в ряде работ впервые был показан перенос мембранных компонентов между клетками (Michalke, Loewenstein, 1971; Espey, Stutts, 1972).

В середине 70-х годов XX века из плазмы крови теленка были выделены микровезикулы, размер которых так же лежал в пределах от 30 до 60 нм (Dalton, 1975). Несмотря на то, что о существовании внеклеточных везикул известно достаточно давно, общий термин “внеклеточные везикулы” был предложен только в 2011 году (Gyorgy et al., 2011). В эту категорию попадают все мембранограниченные внеклеточные структуры. В настоящее время собирательный термин “внеклеточная везикула” употребляется как синоним “мембранной везикулы” (обозначение, которое было ранее предложено для всех клеточных везикул).

В зависимости от происхождения и состава внеклеточные везикулы могут быть разделены на три больших класса: экзосомы (Exo), микровезикулы (MV), апоптотические тельца (AV), а также другие подмножества внеклеточных везикул (BV) (Raposo, Stahl, 2019) (табл. 1). Разделение на экзосомы и микровезикулы достаточно условно, потому что антигенный состав у них может быть смешанным, а разделение по размеру не является дискретным (Пантелеев и др., 2017). Следует учитывать, что большинство исследователей включает в понятие BV только экзосомы и микровезикулы, т.к. апоптотические тельца значительно отли-

чаются от них по биохимическому составу и биологической активности.

В настоящее время известны различные механизмы биогенеза внеклеточных везикул, коррелирующие с их типом (рис. 1). Так, например, известно, что микровезикулы и апоптотические тельца секретируются путем прямого наружного выпячивания клеточной мембраны (Latifkar et al., 2019). Клеточная активация или апоптоз приводит к увеличению притока ионов кальция, который запускает протеазы, такие как кальпаин или гельзолин. Эти активированные протеазы в свою очередь оказывают влияние на белки цитоскелета. Фактор ARF-6 (ADP-ribosylation factor 6) инициирует сигнальный каскад, в конечном итоге, активирующий сигнальный путь Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK). Это приводит к активации киназы легкой цепи миозина (MLC), в результате чего происходит ремоделирование цитоскелета, направленное на инициацию высвобождения микровезикул и апоптотических телец. Иницирование апоптоза активирует апоптотические ферменты, известные как каспазы. Каспаза-3 активирует ROCK или p21-активированную киназу (PAK2), которые регулируют процессы ремоделирования цитоскелета также посредством фосфорилирования MLC, что приводит к выделению апоптотических телец (Muhsin-Sharafaldine, McLellan, 2018).

Формирование экзосом связано с биогенезом эндосом и напрямую зависит от формирования интралюминальных везикул в поздней эндосоме (мультивезикулярном тельце) (Huataari, Helenius, 2011; Тамкович и др., 2016; Muhsin-Sharafaldine, McLellan, 2018; Zhang et al., 2019). Согласно общим представлениям, на первом этапе в результате инвагинации участков плазматической мембраны клетки, содержащей убиквитинированные поверхностные рецепторы, происходит формирование ранних эндосом. Причем общее распределение ранних эндосом в клетке зависит от типа клеток. Далее происходит созревание ранних эндосом и формирование поздней эндосомы (мультивезикулярного тельца), заполненной интралюминальными везикулами, которые в конечном счете и представляют собой будущие экзосомы (Kowal et al., 2014). Считается, что формирование интралюминальных везикул начинается еще в ранней эндосоме. В зависимости от типа клеток в составе одного мультивезикулярного тельца может быть несколько таких везикул. Большая часть интралюминальных везикул высвобождается в межклеточное пространство при слиянии мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной клетки. Молекулярные механизмы формирования интралюминальных везикул достаточно хорошо изучены в настоящее время. Биогенез интралюминального комплекса везикул связан в первую очередь с эндосомальным комплексом сортировки

**Таблица 1.** Основные характеристики различных типов внеклеточных мембранных везикул (по Cufaro et al., 2019 с дополнениями)

	Экзосомы	Микровезикулы	Апоптотические тельца	Большие онкосомы
Размер (диаметр)	30–100 нм	100–1000 нм	1–5 мкм	1–10 мкм
Концентрация	1.10–1.21 г/мл	–	1.16–1.28 г/мл	–
Морфология	Чашеобразная	Различные формы	Гетерогенная	Большой размер – различные формы
Липидный состав	Холестерол, церамид, сфингомиелин, низкое содержание фосфатидилсерина, липидные рафты	Высокое содержание фосфатидилсерина, холестерол	Высокое содержание фосфатидилсерина	Высокое содержание фосфатидилсерина, холестерол
Белковые маркеры	Alix, CD63, CD9, CD81	Селектины, интегрины, CD40, матриксная металлопротеиназа	Гистоны	ARF6, CK18, GAPDH, матриксная металлопротеиназа, комплекс онкогенных белков
Происхождение	Поздние эндосомы, (мультивезикулярные тельца)	Плазматическая мембрана	–	Плазматическая мембрана
Способ внеклеточного высвобождения	Экзоцитоз мультивезикулярного тельца	(Блеббинг/баддинг)	Блеббинг	Баддинг
Состав	Белки, микроРНК, ДНК*, мРНК	Белки, микроРНК, ДНК, мРНК	Белки, ДНК, микроРНК, мРНК	Белки, микроРНК, мРНК, ДНК

\* Показано в ряде работ (Guescini et al., 2010; Thakur et al., 2014; Kalra et al., 2016 и др.).

ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), который состоит примерно из двадцати белков и которые собраны в четыре комплекса (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III) и рядом вспомогательных белков, таких как, например, AAA-type ATP-ase VPS4, VTA1 и Alix (Henne et al., 2011; Colombo et al., 2013), липидов (церамиды), тетраспанина и т.д.

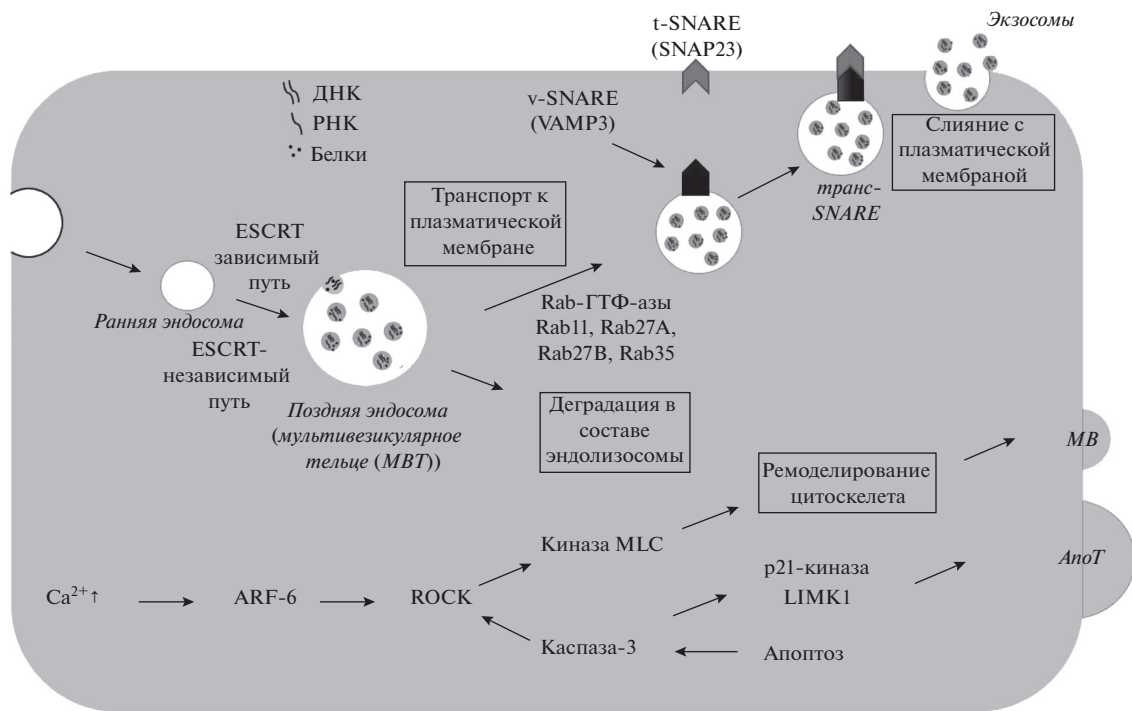
Однако, помимо данного пути биогенеза интралюминального комплекса везикул и образования мультивезикулярного тельца существуют независимые от ESCRT механизмы биогенеза экзосом. Они обеспечены, прежде всего, такими компонентами, как липиды, тетраспанины и белки теплового шока (Theos et al., 2006; Airola et al., 2013; Kowal et al., 2014; Zhang et al., 2019).

На этапе формирования мультивезикулярное тельце может либо деградировать, образуя эндоллизосому, либо непосредственно слиться с плазматической мембраной клетки, обеспечив тем самым секрецию своего содержимого – интралю-

минального комплекса везикул (экзосом) – в межклеточное пространство.

Важная роль в обеспечении регуляции биогенеза экзосом принадлежит семейству Rab ГТФ-аз. Известно, что на мембране формирующихся ранних эндосом, образуются домены, содержащие Rab4, Rab5, Rab11. Причем Rab5 является одним из главных регуляторных компонентов, обеспечивающих созревание эндосом (Huotari, Helenius, 2011; Kowal et al., 2014). В транспорт мультивезикулярных частиц к плазматической мембране и в секрецию экзосом также вовлечены несколько Rab-белков (например, Rab11, Rab27A, Rab27B и Rab35) (Jae et al., 2015; Yang et al., 2019; Mughees et al., 2020) Предполагается, что эти белки могут действовать на различные мультивезикулярные тельца (Zhang et al., 2019).

Слияние мультивезикулярных телец с плазматической мембраной приводит к высвобождению в межклеточное пространство интралюминальных везикул в виде экзосом. Это является заключительным и ключевым этапом секреции



**Рис. 1.** Формирование различных типов внеклеточных везикул (по материалам статей Muhsin-Sharafaldine, McLellan, 2018; Yang et al., 2019). ARF-6 – АДФ-рибозилирующий фактор-6; ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; MLC – легкая цепь миозина; p21-киназа (PAK2) – серин/треонин протеинкиназа; LIMK1 – LIM-киназа 1; ESCRT – комплекс эндосомальной сортировки; SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor proteins.

экзосом. Основная роль в регуляции данного этапа принадлежит белкам семейства SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptor proteins), которые непосредственно вовлечены в процесс экзоцитоза (Yang et al., 2019).

Экзосомы представляют собой бислоиные структуры из мембранных липидов, секретируемые практически всеми типам клеток организма, включая как стволовые, так и уже дифференцированные клетки. Размер экзосом варьирует от 20 до 100 нм. Состав экзосом зависит от типа клеток и условий микроокружения. Экзосомы содержат различные белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Следует отметить, что компоненты экзосом очень разнообразны и их набор зависит от типа клеток, которые секретируют эти экзосомы. Известно, что в состав экзосом могут входить 4400 различных белков, 194 липидов, 1639 мРНК и порядка 764 микроРНК (Zhang et al., 2019). Такое многообразие компонентов, несомненно, свидетельствует о структурной сложности экзосом и их потенциальном функциональном разнообразии.

Обычно экзосомальные белки представлены тетраспанинами (CD9, CD63, CD81, CD82), интегринами, белками теплового шока (HSP70 и HSP90), специфическими белками, вовлеченными

ми в формирование и секрецию экзосом (ESCRT-комплекс), белками клеточной адгезии (интегрины, лактадгерин, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)), белками, определяющими биогенез мультивезикулярных телец (Tsg101, Alix, Vps, Rab – ГТФ-азы), белками, ассоциированными с мембранным транспортом; белками цитоскелета, сигнальными белками и т.д. Некоторые белки экзосом эволюционно консервативны, например, тетра-спанины, Alix и Tsg101. Ряд других белков характеризует принадлежность экзосом к определенному типу клеток, например, CD80 и CD86, которые присущи дендритным клеткам (Alcayaga-Miranda et al., 2016; Rashed et al., 2017).

Состав липидов экзосом в основном представлен липидами плазматической мембраны, такими как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин и фосфатидилинозитол. Однако, следует отметить, что их соотношение в мембранах экзосом отличается от такового в мембранах секретирующих их клеток (Тамкович и др., 2016). Также авторы отмечают, что повышенное содержание сфингомиелина и фосфатидилинозита определяет повышенную устойчивость мембран экзосом, обеспечивая защиту их от лизиса (деградации) во внеклеточной среде, в том числе в биологических жидкостях.

Липиды определяют морфологические и функциональные особенности экзосом, такие как жесткость экзосомы или особенности крепления на внешней стороне мембраны белковых молекул, обеспечивающих слияние экзосомы с плазматической мембраной клетки.

Помимо различных типов белков и липидов экзосомы включают в себя различные типы РНК: информационную РНК (messenger RNA (mRNA)), кольцевые РНК (circular RNA), некодирующие РНК (lncRNA) и различные микроРНК (Coutmans et al., 2017; Li et al., 2018). МикроРНК, как известно, способны регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путем ингибирования трансляции их мРНК-мишеней (таргетных мРНК) или индукции их деградации (Sayed, Abdellatif, 2011). В настоящее время известно, что экспрессия более 60% генов человека регулируются микроРНК. Поэтому анализ микроРНК, входящих в состав экзосом, дает наиболее полную информацию о статусе продуцирующих их клеток.

Экзосомы являются носителями связанных с мембраной сигнальных белков, включая лиганды рецептора Notch (Sheldon et al., 2010) и секреторные белки семейств Wnt и Hedgehog (НН) (Vyas et al., 2014; McGough, Vincent, 2016). Ряд авторов полагает, что сигнальные белки Wnt и НН могут либо располагаться в липидном бислое, либо связываться с мембраной экзосомы другими белками. Таким образом, в норме (при нормальном развитии) экзосомы могут обеспечивать работу трех основных сигнальных путей: Wnt, НН и Notch. При развитии патологических процессов в организме спектр сигнальных путей может быть изменен.

Экзосомы играют важную роль в межклеточной коммуникации, активно взаимодействуя с окружающими клетками, причем выявлено несколько механизмов такого взаимодействия. Регуляторная роль везикул может обеспечиваться переносом их содержимого в клетку-реципиент за счет эндоцитоза или прямого слияния мембраны везикулы с мембраной клетки-реципиента. В настоящее время известны клатрин-опосредованный эндоцитоз, а также клатрин-независимые пути слияния с мембраной (опосредованное кавеолином поглощение, макропиноцитоз, фагоцитоз и опосредованная липидным плотом интернализация) (Jeske et al., 2020). Кроме того, обеспечение регуляторной роли везикул может осуществляться за счет связи экзосомы с поверхностным рецептором клетки-реципиента. Это вызывает запуск соответствующего регуляторного каскада в клетке-реципиенте без проникновения везикулы в клетку. И, наконец, следует отметить возможность переноса специфических рецепторов на клеточную мембрану клетки-реципиента, что изменяет рецепторную специфичность последней (Zhang et al., 2019).

Наличие такого числа способов (путей), обеспечивающих взаимодействие везикул с клетками, несомненно свидетельствует об активной роли самих клеток в поглощении везикул. Встает вопрос: насколько компетентны окружающие клетки к восприятию данных регуляторов? Возможно, наличие определенной степени компетенции окружающих клеток формирует и поддерживает функционал ниши. Известны случаи полной индифферентности определенных типов клеток к регуляторному потенциалу внеклеточных везикул – например, клетки эндотелия в составе гематоэнцефалического барьера способны осуществлять лишь транзит внеклеточных везикул (Jeske et al., 2020).

### РЕГУЛЯТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Изучение регуляторного потенциала плюрипотентных стволовых клеток является не только одной из фундаментальных задач биологии развития и клеточной биологии, но и представляет потенциальный практический интерес.

При изучении предимплантационных стадий развития бластоцисты и ранних фаз имплантации (на моделях *in vitro*) обнаружено, что везикулы ЭСК поддерживают дифференциальное регулирование клеточной активности: с одной стороны, они участвуют в поддержании плюрипотентного состояния клеток ВКМ, а с другой, способны регулировать функциональное состояние клеток трофобласта, влияя на их подвижность (регулируя, таким образом, процесс имплантации) (Battaglia et al., 2019). Авторы показали наличие в полости развивающейся бластоцисты человека экзосом и мелких микровезикул. Это является свидетельством активной клеточной коммуникации, обеспечивающей взаимодействие ВКМ и трофобласта. В ходе анализа состава жидкости, полученной из полости бластоцист, авторами были выделены около 89 микроРНК, 80% из которых находились в составе внеклеточных везикул (преимущественно экзосом). Среди них можно указать miR-302a, miR-302b, miR-302c и miR-367-3p, кластер miR-302/367, miR-371a, miR-372, miR-373, семейство miR-290/miR-371, miR-17, miR-19a, miR-19b, miR20a и miR-92a (члены семейства miR17-92a-1, известного как ОнкоМикроРНК), miR-20b, miR-106a и т.д. Таким образом, в составе внеклеточных везикул, выделенных из жидкости полости бластоцисты, были обнаружены различные микроРНК, необходимые как для поддержания плюрипотентного состояния клеток ВКМ, так и усиливающие подвижность клеток трофобласта, тем самым способствуя процессу имплантации (Battaglia et al., 2019). Кроме этого, в составе везикул были обнаружены функциональные мо-

лекулы, обеспечивающие ремоделирование матрикса. Биоинформационный анализ выделенных микроРНК с помощью баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) показал, что данные микроРНК регулируют такие важные сигнальные пути как сигнальный путь поддержания плюрипотентности стволовых клеток, Hippo, MAPK, TGF- $\beta$  и Wnt. Кроме того, они регулируют клеточный цикл (точки перехода G<sub>1</sub>/S и G<sub>2</sub>/M), процессы апоптоза, структуру щелевых контактов, состояние внеклеточного матрикса (взаимодействие белков внеклеточного матрикса с рецепторами клеток) и некоторые другие процессы (Battaglia et al., 2019). Интересно, что часть микроРНК, содержащихся в полости бластоцисты, в том числе и экзосомальные микроРНК, присутствуют уже в гаметтах, причем преимущественно в ооцитах. Однако многие микроРНК впервые синтезируются клетками эмбриона (микроРНК-302a, микроРНК-302b, микроРНК-302c, микроРНК-367-3p и др.). Именно они являются ключевыми микроРНК, обеспечивающими поддержание плюрипотентности стволовых клеток (Battaglia et al., 2019).

*In vitro*, на линии клеток HTR8/SVneo, являющейся наиболее точной моделью трофобласта, показано, что при культивировании данных клеток в присутствии внеклеточных везикул ЭСК происходит повышение подвижности клеток трофобласта (Desrochers et al., 2016). Причиной этого является опосредованное фосфорилирование двух киназ: MAPK сигнального пути JNK (c-Jun N-terminal kinases) и FAK (focal adhesion kinase) (P-FAK). Фосфорилирование обеспечивается взаимодействием фибронектина и ламинина (ассоциированных с внеклеточными везикулами), с соответствующими интегринами клеток трофобласта (фибронектин взаимодействует с  $\alpha 5\beta 1$ -интегрином, а ламинин — с соответствующим рецептором). В настоящее время хорошо известно, что при активации FAK увеличивается адгезионная способность клеток трофобласта, необходимая для процесса имплантации (Greening et al., 2016; Kurian et al., 2019).

Помимо регуляции подвижности клеток трофобласта, везикулы ЭСК обеспечивают поддержание плюрипотентного состояния клетками эпибласта, предотвращая тем самым их преждевременную дифференцировку (Hur et al., 2020). Показано, что добавление везикул, полученных в ходе культивирования ЭСК, в среду культивирования бластоцист мыши, приводит к сохранению плюрипотентности части клеток эпибласта на фоне начавшейся дифференцировки ВКМ в бластоцистах контрольных групп (Hur et al., 2020). Встает закономерный вопрос: каким образом везикулы, добавленные в среду инкубации и поддерживающие плюрипотентность, оказывают влияние на клетки ВКМ? Логично предположить, что

везикулы попадают в клетки ВКМ с использованием механизма трансцитоза. Такой механизм показан для клеток эндотелия в составе гематоэнцефалического барьера (Jeske et al., 2020). В этом случае клетки трофобласта должны обладать избирательной чувствительностью к везикулам, обеспечивающим поддержание плюрипотентности, трансдуцируя сигнал к клеткам ВКМ. Кроме того, следует допустить, что разный ответ клеток ВКМ и трофобласта связан с различными механизмами реализации ответа клеток на действие везикул.

Внутриклеточные механизмы реализации регуляторных воздействий, направленных на поддержание плюрипотентного состояния, в настоящее время еще недостаточно изучены. С одной стороны, в литературе есть данные, свидетельствующие о возможности эпигенетических регуляций посредством внеклеточных везикул ЭСК. Так было показано, что при культивировании ЭСК мыши в среде, не содержащей ингибиторов GSK3 $\beta$  и MEK1/2 (т.е. при индукции клеток ЭСК к дифференцировке), добавление в среду культивирования везикул ЭСК приводило к возврату части клеток в плюрипотентное состояние. Это сопровождалось снижением уровня триметилирования лизина 27 в гистоне H3 (H3K27me3) и повышением уровня экспрессии ключевых маркеров плюрипотентности Oct 3/4, Nanog. Причем авторы отмечают, что больший эффект достигался при совместном использовании экзосом и микровезикул (Hur et al., 2020).

С другой стороны, внеклеточные везикулы могут способствовать поддержанию плюрипотентного состояния путем модуляции взаимодействия компонентов внеклеточного матрикса с интегринами, находящимися на поверхности самих ЭСК, включая модуляцию классического пути регуляции интегрин/FAK (focal adhesion kinase) (Hur et al., 2020). Каким образом внеклеточные везикулы активируют FAK? Было показано, что фибронектин, ассоциированный с внеклеточными везикулами (экзосомами и микровезикулами) является ключевым регулятором, обеспечивающим поддержание плюрипотентного состояния стволовыми клетками (Hur et al., 2020). Фибронектин внеклеточных везикул способен взаимодействовать с интегринами, ассоциированными с мембранами стволовых клеток, и, тем самым, стимулировать активацию FAK, поддерживая плюрипотентное состояние данных клеток.

Заслуживает внимания тот факт, что существуют различные механизмы регуляции поддержания плюрипотентного состояния клетками человека. Известно, что в ЭСК человека фокальные контакты не образуются, и при этом активен сигнальный путь FAK (Vitillo et al., 2016). У этих клеток FAK обнаруживается на мембране и в цитоплазме, а активность дефосфорилированной FAK

относительно высока в ядре (Villa-Diaz et al., 2016). Это оказывает влияние на поддержание плюрипотентного состояния ЭСК человека (Vitulo, Kimber, 2017). Учитывая некоторые общие черты ESC и опухолевых клеток, можно предположить, что ФАК выполняет у них сходные функции (Ho et al., 2012). Nanog связывает промотор ФАК, способствуя повышению его активности, а ФАК, в свою очередь, фосфорилирует Nanog, дозозависимо повышая его активность, что способствует поддержанию плюрипотентности ЭСК.

Следует отметить, что наличие ядерной ФАК не характерно для дифференцированных клеток. Возможно, наличие неканонического (ядерного) пути регуляции ФАК и определяет механизм воздействия внеклеточных везикул, связанный с поддержанием плюрипотентного состояния клеток ЭСК.

В настоящее время имеются неоднозначные данные по поводу участия пути ФАК в регуляции самообновления и поддержания плюрипотентности стволовых клеток. Ряд авторов указывает на то, что компоненты внеклеточного матрикса (ламелин, фибронектин и витронектин), взаимодействуя с определенными типами интегринов на поверхности стволовых клеток человека, способны запускать механизмы обеспечения поддержания плюрипотентного состояния данных клеток (Braam et al., 2008; Rodin et al., 2010; Vitillo et al., 2016). Показано, что ассоциация киназ (ФАК) с интегринными определяет жизнеспособность ЭСК человека, сохранение их недифференцированного состояния. Длительное ингибирование данной киназы или снижение уровня экспрессии кодирующего ее гена приводит к дифференцировке ЭСК (Vitillo et al., 2016). Результаты других работ, проведенных на стволовых клетках мыши, свидетельствуют об обратном (Hayashi et al., 2007; Toya et al., 2015). Кроме того, авторы указывают, что именно тип белков внеклеточного матрикса определяет функциональное состояние стволовых клеток: если фибронектин и ламелин способствуют активации ФАК и Akt, вызывая дифференцировку плюрипотентных клеток, то коллаген, наоборот, способствует поддержанию плюрипотентного состояния (Hayashi et al., 2007).

Интересным является то, что различие в результате работы данного пути регуляции (поддержание самообновления или дифференцировка) определяется состоянием (типом) плюрипотентных стволовых клеток. Хорошо известно о существовании двух состояний плюрипотентности у мыши – Naïve и Primed. Плюрипотентные клетки в состоянии Naïve могут быть получены из ВКМ предимплантационных бластоцист, а в состоянии Primed – из эпибласта постимплантационных бластоцист. Плюрипотентные клетки в состоянии Naïve и Primed отличаются по цитоморфоло-

гическим характеристикам, профилю экспрессии генов и другим параметрам (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007; Chen, Lai, 2015). Последние работы (Dodsworth et al., 2020) показали, что плюрипотентные клетки человека в состоянии Naïve и Primed различаются по профилю экспрессии микроРНК. Так, при анализе микроРНК в плюрипотентных клетках человека, было показано, что Naïve состояние характеризуется наличием таких микроРНК как miR-143-3p и miR-22-3p, а miR-363-5p, семейство miR-17 (miR-18b-3p, -20b-5p, -20b-3p, -106a-5p), а семейство miR-302 характеризуют Primed состояния. Для Naïve состояния клеток человека характерен достаточно высокий уровень экспрессии miR-371-373, являющейся гомологом miR-290 мыши, также наиболее высоко экспрессируемых микроРНК в Naïve плюрипотентных клетках мыши. Таким образом, профиль экспрессии микроРНК обусловлен состоянием клеток, а не видовыми различиями. Это лишний раз подчеркивает важность оценки паттерна микроРНК как характеристического для определения функционального состояния клетки.

#### РЕГУЛЯТОРНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ

Влияние везикул ЭСК на поддержание плюрипотентного состояния клеток было косвенно показано на моделях конкретных линий дифференцировок.

Так, еще в начале XXI века было исследовано влияние внеклеточных везикул, полученных в ходе культивирования ЭСК мыши (линия ES-D3), на линию гематопоэтических стволовых клеток (Ratajczak et al., 2006). Было показано, что в определенной концентрации внеклеточные везикулы ЭСК способны повышать жизнеспособность стволовых гемопоэтических клеток, усиливать их пролиферацию, а также повышать уровень экспрессии генов – маркеров плюрипотентности (Oct-4, Nanog и Rex-1) и ранних маркеров гемопоэтических стволовых клеток (Scl, НохВ4 и GATA 2). Аналогичные данные были получены и в более поздних работах, при изучении влияния внеклеточных везикул ЭСК мыши на прогениторные клетки сетчатки – мюллеровские клетки. Было показано, что внеклеточные везикулы способны переносить специфические мРНК в клетки-мишени и стимулировать в них не только экспрессию генов-маркеров плюрипотентности, но и генов, специфичных для ранних стадий развития сетчатки, вызывая дедифференцировку данных прогениторных клеток, возобновление клеточного цикла с последующей дифференцировкой разных типов клеток сетчатки (амакриновые,

ганглиозные клетки, а также палочковых рецепторов) (Farber, Katsman, 2016).

Очевидно, регуляторный потенциал внеклеточных везикул плюрипотентных клеток не ограничен регуляцией дедифференцировок клеток-реципиентов в процессах тканевой репарации. Достаточно много исследований указывает на то, что внеклеточные везикулы ЭСК влияют на пролиферацию клеток и обладают антиапоптотическим эффектом. Так, интересные данные были получены при изучении влияния внеклеточных везикул ЭСК на процесс заживления раны у стареющих мышей. Оказалось, что экзосомы ЭСК вызывают восстановление у пожилых мышей следующих функций эндотелиальных клеток, нарушенных при старении: пролиферативной активности, миграции и формирования сосудистых трубок в месте раны (Chen et al., 2019). Кроме этого, экзосомы могут снижать окислительный стресс, повышая активность эндогенной антиоксидантной системы. Восстановление возрастной ангиогенной дисфункции авторы данного исследования связывают с наличием в экзосомах микроРНК-200А. Оказалось, что именно микроРНК-200А выступает ключевым регулятором сигнального пути KEAP 1 – Nrf2 (Kelch-like ECH-associated protein 1 – nuclear factor erythroid 2 – related factor 2), контролирующего экспрессию ряда генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, например, гемоксигеназу 1 (HO-1). Показано, что микроРНК-200А, содержащаяся в экзосомах ЭСК, снижает уровень экспрессии KEAP 1, способствуя активации Nrf2 (негативная регуляция). Такая активация Nrf2 приводит, в конечном итоге, к торможению старения (Chen et al., 2019).

Разработка методов получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) путем генетического репрограммирования соматических клеток постнатального организма, поставила вопрос о степени идентичности ИПСК и ЭСК. Этот вопрос особенно актуален, так как клетки с индуцированной плюрипотентностью в настоящее время используются не только как модель для изучения направленной дифференцировки клеток, но и в регенеративной биомедицине. Следует учитывать онтогенетическое происхождение плюрипотентных клеток.

В ряде работ было показано, что профиль экзосом ИПСК определяется тем типом клеток, из которых в результате репрограммирования был получен данный тип ИПСК. Например, было отмечено, что экзосомы ИПСК, которые были получены из кардиальных фибробластов, содержали в том числе и ряд функциональных кардиопротекторных микроРНК (микроРНК-21 и микроРНК-210) (Wang et al., 2015; Jung et al., 2017; Jeske et al., 2020). Эти свойства ИПСК, несомненно, следует учитывать при использовании раз-

личных типов ИПСК и их внеклеточных везикул, для получения заданных клеточных дифференцировок.

В некоторых работах указывается на то, что далеко не все типы функциональных регуляторов, имеющихся в самой клетке, будут присутствовать во внеклеточных везикулах. При молекулярно-генетическом анализе (секвенирование и ПЦР в реальном времени) ИПСК, полученных путем репрограммирования фибробластов мыши, было показано наличие 282 различных микроРНК, в то время как в везикулах ИПСК было представлено только 199 (Adamiak et al., 2018). Анализ показал наличие микроРНК, регулирующих поддержание плюрипотентного состояния (miR-290-295 семейства), miR-19b, miR-20a, miR-126-3p, miR-130a-3p, miR-210-3p, а также онко-микроРНК семейства miR-17-92 не только в самих ИПСК, но и в составе внеклеточных везикул. Данные микроРНК вовлечены в регуляцию ангиогенеза, клеточного цикла и процессов старения (Mendell, 2008; Gruber et al., 2014). Однако, для ряда микроРНК была показана дифференциальная экспрессия: такие микроРНК, как, например, let-7, miR-145, miR-302a-5p были преимущественно представлены во внеклеточных везикулах. Данные микроРНК регулируют клеточную пролиферацию, апоптоз и поддержание плюрипотентного состояния и самообновление (Cordes et al., 2009). Выявлено сходство сигнальных путей, посредством которых обеспечивается регуляторная активность внеклеточных везикул ЭСК и ИПСК в клетках-реципиентах. Это, например, Wnt, PI3K-Akt и MAPK сигнальные пути, которые регулируют активность элементов цитоскелета (актинового цитоскелета), фокальные контакты и процессы взаимодействия белков внеклеточного матрикса с их рецепторами (Adamiak et al., 2018).

На нескольких регенерационных моделях показано, что внеклеточные везикулы ИПСК способствуют восстановлению целостности ткани. В основе данного положительного эффекта лежат такие процессы, как регуляция пролиферации клеток, миграция клеток, снижение уровня апоптоза, ремоделирование внеклеточного матрикса и т.д. *In vitro* показано, что экзосомы ИПСК способствовали восстановлению жизнеспособности эндотелиальных клеток пуповины человека (HUVESCs) и способствовали формированию в культуре капилляро-подобных структур, после того, как данные клетки находились в условия гипергликемии (повышенное содержание глюкозы в среде культивирования (33 мМ)) (Ding et al., 2018).

На моделях повреждения печени (индуцированный CCl<sub>4</sub> фиброз печени мыши; перевязка желчного протока) было показано, что внеклеточные везикулы ИПСК в значительной степени



способствуют снижению фибротизации ткани печени, снижая пролиферацию и активацию звездчатых клеток печени (клеток Ито) (Povero et al., 2019). Об этом свидетельствовало снижение уровня экспрессии ряда про-фибротических маркеров:  $\alpha$ -гладкомышечного актина, коллагена I $\alpha$ 1, фибронектина и тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (TIMP-1). Кроме этого, анализ транскриптома показал, что у активированных клеток Ито под действием внеклеточных везикул ИПСК происходит изменение уровня экспрессии примерно 300 генов (60 генов снижает уровень экспрессии, а 235 генов – повышает). В составе внеклеточных везикул ИПСК были также выявлены некоторые микроРНК (микроРНК-10b-5p, микроРНК-302-3p и микроРНК-92b-3p), обладающих потенциальными антифибротическими свойствами. Следует отметить, что уровень данных микроРНК был достаточно высок

На моделях старения кожи *in vitro* (фотостарение (уф-облучение 315 нм) и естественное старение (культивирование более 30 пассажей)) было показано, что экзосомы ИПСК снижают в фибробластах кожи уровень экспрессии ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы и матриксной металлопротеиназы 1/3, стимулируют пролиферацию и миграцию фибробластов, а также восстанавливают экспрессию коллагена I типа, заметно пониженную при старении (Oh et al., 2018; Jeske et al., 2020).

*In vivo*, на модели реперфузированного инфаркта миокарда у мышей, было проведено сравнение результатов применения внеклеточных везикул ИПСК и самих ИПСК для репарации повреждений сердечно-сосудистой системы (Adamiak et al., 2018). Было показано, что применение внеклеточных везикул ИПСК и самих ИПСК приводит к улучшению функции левого желудочка. Однако, применение экзосом приводило к более полному восстановлению функций левого желудочка сердца, чем трансплантация самих ИПСК. *In vitro* экзосомы ИПСК стимулируют ангиогенез и способствуют миграции эндотелиальных клеток. Кроме того, в данной работе было продемонстрировано важное преимущество применения внеклеточных везикул ИПСК по сравнению с самими ИПСК: при трансплантации ИПСК наблюдали образование тератом.

В настоящее время широко изучается возможность изменения регуляторных возможностей паракринного компонента плюрипотентных клеток в процессе направленной дифференцировки.

Так, известно, что при терапии инфаркта миокарда внеклеточные везикулы, полученные от дифференцированных из ИПСК кардиомиоцитов, обладают более высокой способностью стимулировать регенерацию, чем сами ИПСК. Везикулы способствуют восстановлению сердечной ткани после инфаркта посредством регуляции

аутофагии в кардиомиоцитах в условиях гипоксии (Santoso et al., 2020).

На модели ишемии конечности мыши было показано, что экзосомы эндотелиальных клеток-производных ИПСК способствуют репарации сосудистой системы за счет стимуляции ангиогенеза. Было показано, что при направленной дифференцировке эндотелиальных клеток из ИПСК, в них в значительной степени возрастает уровень микроРНК-199b-5p. Эта микроРНК – один из ключевых регуляторов ангиогенеза, оказывающих стимулирующее действие на данный процесс. Функциональная роль этой микроРНК состоит в Jagged-1-зависимой регуляции VEGFR2. *In vitro* было показано, что экзосомы эндотелиальных клеток, производных ИПСК, усиливают пролиферацию, миграцию и формирование эндотелиальных сосудистых трубок в культуре HUVECs (Ye et al., 2019).

Кроме того, было показано стимулирующее воздействие везикул, полученных от дифференцированных из ИПСК нейронов, на клетки первичной культуры гранулярных клеток зубчатой извилины головного мозга человека: происходило усиление пролиферации клеток и наблюдалась их нейральная дифференцировка (Sharma et al., 2019).

Направление дифференцировки ИПСК определяет регуляторные свойства их везикул. Так, были сопоставлены результаты действия на кортикальные сфероиды везикул клеток-производных ИПСК и клеток, полученных в результате нейральной и мезодермальной (кардиомиоцитарной) дифференцировки этих ИПСК (Marzano et al., 2019). Оказалось, что везикулы, полученные от недифференцированных ИПСК, способствовали значительному усилению пролиферации клеток сфероида (оценивалось число клеток, включивших метку BrdU). Такой эффект отсутствовал при использовании в эксперименте везикул, полученных от клеток обеих линий дифференцировки. Везикулы клеток, полученных в ходе нейральной дифференцировки (т.е. нейральных стволовых клеток), способствовали интенсивному росту аксонов у клеток кортикальных сфероидов (оценивалось по наличию  $\beta$ III-tubulin положительных клеток). Такого эффекта не наблюдалось при использовании внеклеточных везикул, полученных от недифференцированных ИПСК или клеток линии мезодермального направления дифференцировки. Таким образом, специфика действия везикул проявляется только в процессе дифференцировки ИПСК. При этом параллельно снижается регуляционная активность везикул, обеспечивающая общие функции клеток, такие как пролиферативная активность. Так, в популяции плюрипотентных клеток основная роль везикул – поддержание плюрипотентного состояния. В то же время, с началом клеточных дифференцировок основной

функцией везикул становится регуляция последовательных этапов дифференцировки клеток.

Таким образом, изучение паракринного везикулярного компонента плюрипотентных стволовых клеток даст возможность более полно судить о механизмах клеточных регуляций в раннем развитии и в регенерационных процессах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, как один из компонентов паракринной секреции клеток, обеспечивают межклеточную коммуникацию. Благодаря наличию в них факторов, регулирующих функции клеток, они обеспечивают поддержание гомеостаза ткани или усиливают направленные изменения клеток в ходе онтогенетических и регенерационных процессов. Конкретный набор этих факторов зависит от состояния клеток – продуцентов везикул. Внеклеточные везикулы плюрипотентных стволовых клеток, благодаря наличию в них мРНК ряда транскрипционных факторов, поддерживают определенную степень дедифференцировки клеток. Поскольку везикулы содержат белки – компоненты основных сигнальных путей, они также способны регулировать специфические дифференцировки клеток-реципиентов. Например, они могут регулировать ангиогенез за счет компонентов Notch-сигналинга (McGough, Vincent, 2016). Кроме того, везикулы могут регулировать дифференцировку клеток на посттранскрипционном уровне, поскольку содержат микроРНК. Следует учитывать, что показана определенная рецепторная специфичность везикул для компетентных клеток. Это способствует повышению специфичности регуляторного потенциала везикул.

К настоящему времени накоплены некоторые данные о роли внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток в регуляции раннего развития млекопитающих, в том числе, человека. Эти данные свидетельствуют о становлении дифференциальной регуляторной специфичности везикул еще в предимплантационный период. С одной стороны, внеклеточные везикулы способны обеспечивать поддержание плюрипотентного состояния клеток. С другой стороны, они регулируют функционирование клеток эмбриона (например, подвижность клеток трофобласта при имплантации). Такая специфика регуляторных возможностей сохраняется в ходе дальнейших дифференцировок. Об этом свидетельствуют данные, полученные на разных экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Важно, что регуляторная активность везикул, связанная с поддержанием плюрипотентности стволовых клеток, постепенно снижается, но не утрачивается полностью. В то же время регуляторная активность везикул, связанная с направленной дифференцировкой плюри-

потентных стволовых клеток, постепенно повышается. Выявленные особенности регуляторных возможностей разных внеклеточных везикул (везикул плюрипотентных клеток и везикул клеток-производных плюрипотентных клеток), могут служить основой для разработки методов их дифференциального использования для репараций тканей.

Следует учитывать, что регуляция пролиферативной активности клеток везикулами плюрипотентных клеток может осуществляться благодаря наличию в них микроРНК, обеспечивающих контроль этапов клеточного цикла. С этим может быть связано проявление онкогенного потенциала везикул плюрипотентных стволовых клеток. Тем не менее, данные литературы указывают на то, что внеклеточные везикулы обладают более низкой иммуногенностью и меньшей вероятностью индукции опухолей, чем сами стволовые клетки (Taheri et al., 2019).

Регуляторные возможности внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток могут различаться в связи с разным онтогенетическим происхождением самих клеток (ЭСК и ИПСК), а также в связи с типом клеток, из которых были получены ИПСК в результате репрограммирования. Мы полагаем, что у клеток с индуцированной плюрипотентностью может проявляться гистотипическая память, определяющая специфичность их внеклеточных везикул. Для плюрипотентных стволовых клеток разных клеточных типов уже выявлены важные закономерности дифференциальной регуляторной активности внеклеточных везикул. Эти данные могут служить основой для разработки способов повышения адресности воздействий, направленных на стимуляцию репарации тканей.

Таким образом, при анализе направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, необходимо учитывать характеристики регуляторных возможностей везикулярной паракринной компоненты. На ряде моделей показано, что использование внеклеточных везикул плюрипотентных стволовых клеток предпочтительнее использования самих плюрипотентными клеток. Это позволяет рассматривать внеклеточные везикулы как альтернативу клеточной трансплантации для репарации тканей.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность профессору Владимиру Александровичу Голиченкову и ведущему научному сотруднику Ольге Владимировне Бурлаковой за обсуждение и ценные замечания.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-04136мк).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящий обзор не содержит описания выполненных авторами исследований с использованием животных в качестве объектов и с участием людей.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

## ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы внесли одинаковый вклад в подготовку материалов и написание обзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пантелеев М.А., Абаева А.А., Нечипуренко Д.Ю. и др.* Физиология и патология внеклеточных везикул // Онкогематология. 2017. Т 12. № 1. С. 62–70.
- Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П.* Экзосомы: механизмы, возникновения, состав, транспорт, биологическая активность, использование в диагностике // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. № 1. С. 163–175.
- Adamiak M., Cheng G., Bobis-Wozowicz S. et al.* Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived extracellular vesicles are safer and more effective for cardiac repair than iPSCs // *Circ. Res.* 2018. V. 122. № 2. P. 296–309.
- Alcayaga-Miranda F., Varas-Goboy M., Khoury M.* Harnessing the angiogenic potential of stem cell-derived exosomes for vascular regeneration // *Stem Cells Int.* 2016.
- Airola M., Hannun Y.* Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases // *Handb Exp. Pharmacol.* 2013. V. 215. P. 57–76.
- Anderson H.* Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage // *J. Cell Biol.* 1969. V. 41. № 1. P. 59–72.
- Battaglia R., Palini S., Vento M. et al.* Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 84. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36452-7>
- Braam S., Zeinstra L., Litjens S. et al.* Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin // *Stem Cells.* 2008. V. 26(9). P. 2257–2265.
- Brons I., Smithers L., Trotter M. et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos // *Nature.* 2007. V. 12. № 448(7150). P. 191–195.
- Capalbo A., Ubaldi F-M., Cimadomo D. et al.* MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoblast cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment // *Fertil. Steril.* 2016. V. 105. P. 225–235.
- Chen B., Sun Y., Zhang J. et al.* Human embryonic stem cell-derived exosomes promote pressure ulcer healing in aged mice by rejuvenating senescent endothelial cells // *Stem Cell Research & Therapy.* 2019. V. 10. P. 142. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1253-6>
- Chen Y., Lai D.* Pluripotent states of human embryonic stem cells // *Cell Reprogram.* 2015. V. 17. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.1089/cell.2014.0061>
- Colombo M., Moita C., Niel G. et al.* Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. № 24. P. 5553–5565.
- Cordes K., Sheehy N., White M. et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity // *Nature.* 2009. V. 460. P. 705–710.
- Coumans F., Brisson A., Buzas E.* Methodological guidelines to study extracellular vesicles // *Circ. Res.* 2017. V. 120. № 10. P. 1632–1648.
- Cufaro M., Pieragostino D., Lanuti P. et al.* Extracellular vesicles and their potential use in monitoring cancer progression and therapy: The contribution of proteomics // *J. Oncol.* 2019. 1639854. <https://doi.org/10.1155/2019/1639854>
- Dalton A.* Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus “virus-like” particles // *J. Natl. Cancer Inst.* 1975. V. 54. № 5. P. 1137–1148.
- Desrochers L., Bordeleau F., Reinhart-King C. et al.* Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11958. <https://doi.org/10.1038/ncomms11958>
- Ding Q., Sun R., Wang P. et al.* Protective effects of human induced pluripotent stem cell-derived exosomes on high glucose-induced injury in human endothelial cells // *Exp. Ther. Med.* 2018. V. 15. P. 4791.
- Dodsworth B., Hatje K., Rostovskaya M. et al.* Profiling of naive and primed human pluripotent stem cells reveals state-associated miRNAs // *Scientific Reports.* 2020. V. 10. P. 10542. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67376-w>
- Espey L., Stutts R.* Exchange of cytoplasm between cells of the membrana granulosa in rabbit ovarian follicles // *Biology of Reproduction.* 1972. V. 6. № 1. P. 168–175.
- Farber D., Katsman D.* Embryonic stem cell-derived microvesicles: could they be used for retinal regeneration? // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2016. V. 854. P. 563–569.
- Greening D., Nguyen H., Elgass K. et al.* Human endometrial exosomes contain hormone-specific cargo modulating trophoblast adhesive capacity: insights into endometrial-embryo interactions // *Biol. Reprod.* 2016. V. 94. P. 38.
- Gruber A., Grandy W., Balwierz P. et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs contribute to pluripotency by inhibiting regulators of multiple differentiation pathways. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. P. 9313–9326.
- Gyorgy B., Szabo T., Paszoti M. et al.* Membrane Vesicles, Current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. V. 68. № 16. P. 2667–2688.
- Guescini M., Genedani S., Stocchi V. et al.* Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA // *J. Neural Transm.* 2010. V. 117. P. 1–4.

- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 9222–9227.
- Hayashi Y., Furue M., Okamoto T. et al. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal // Stem Cells. 2007. V. 25. № 12. P. 3005–3015.
- Henne W., Buchkovich N., Emr S. The ESCRT pathway // Dev. Cell. 2011. V. 21. № 1. P. 77–91.
- Ho B., Olson G., Figel S. et al. Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated // J. Biol. Chem. 2012. V. 25. № 287(22). P. 18656–18673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322883>
- Hur Y., Cerione R., Antonyak M. Extracellular vesicles and their role in stem cell biology // Stem. Cells. 2020. V. 38. P. 469–476.
- Hur Y., Feng S., Wilson K. et al. Embryonic stem cell-derived extracellular vesicles maintain ESC stemness by activating FAK // Dev. Cell. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.017>
- Huotari J., Helenius A. Endosome maturation // EMBO J. 2011. V. 30. № 17. P. 3481–3500.
- Jae N., McEwan D., Manavski Y. et al. Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles // FEBS Lett. 2015. V. 589. № 20. P. 3182–3188.
- Jeske R., Bejoy J., Marzano M. et al. Human pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles: Characteristics and applications // Tissue Engineering: Part B. 2020. V. 26. № 2. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0252>
- Jung J., Fu X., Yang P. Exosomes generated from iPSC-derivatives: New direction for stem cell therapy in human heart diseases // Circ. Res. 2017. V. 120. № 2. P. 407–417.
- Kalra H., Drummen G., Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 170. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Konala V., Mamidi M., Bhone R. et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration // Cytotherapy. 2016. V. 18. № 1. P. 13–24.
- Kowal J., Tkach M., Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes // Curr. Opin. Cell Biol. 2014. V. 29. P. 116–125.
- Kurian N., Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo-uterine cross talk during implantation and in pregnancy // J. Assist. Reprod. Genet. 2019. V. 36. P. 189–198.
- Latifkar A., Hur Y., Sanchez J. et al. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function // J. Cell. Sci. 2019. V. 132. № 13. <https://doi.org/10.1242/jcs.222406>
- Li S., Lin Z., Jiang X. et al. Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools // Acta Pharmacol. Sin. 2018. V. 39. № 4. P. 542–551.
- Madrigal M., Rao K., Riordan N. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods // J. Transl. Med. 2014. V. 12. P. 260.
- Marzano M., Bejoy J., Cheerathodi M. et al. Differential effects of extracellular vesicles of lineage-specific human pluripotent stem cells on the cellular behaviors of isogenic cortical spheroids // Cells. 2019. V. 8. P. 993. <https://doi.org/10.3390/cells8090993>
- McGough I., Vincent J.-P. Exosomes in developmental signalling // Development. 2016. V. 143. P. 2482–2493. <https://doi.org/10.1242/dev.126516>
- Mendell J. miRNAs roles for the miR-17-92 cluster in development and disease // Cell. 2008. V. 133. P. 217–222.
- Michalke W., Loewenstein W. Communication between cells of different type // Nature. 1971. V. 232. № 5306. P. 121–122.
- Mughees M., Chung H., Wajid S. Vesicular trafficking-related proteins as the potential therapeutic target for breast cancer // Protoplasma. 2020. V. 257. № 2. P. 345–352.
- Muhsin-Sharafaldine M., McLellan A. Apoptotic vesicles: deathly players in cancer-associated coagulation // Immunol. Cell. Biol. 2018.
- Oh M., Lee J., Kim Y. et al. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells ameliorate the aging of skin fibroblasts // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 6. P. 1715. <https://doi.org/10.3390/ijms19061715>
- Povero D., Pinatel E., Leszczynska A. et al. Human induced pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles reduce hepatic stellate cell activation and liver fibrosis // JCI Insight. 2019. V. 5. № 4.
- Rani S., Ryan A., Griffin M. et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications // Mol. Ther. 2015. V. 23. № 5. P. 812–823.
- Raposo G., Stahl P. Extracellular vesicles: A new communication paradigm? // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2019. V. 20. № 9. P. 509–510.
- Rashed M., Kanlikilicer P., Rodriguez-Aguayo C. et al. Exosomal miR-940 maintains SRC-mediated oncogenic activity in cancer cells: A possible role for exosomal disposal of tumor suppressor miRNAs // Oncotarget. 2017. V. 8. № 12. P. 20145–20164.
- Ratajczak J., Miekus K., Kucia M. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery // Leukemia. 2006. V. 20. № 5. P. 847–856.
- Rodin S., Domogatskaya A., Ström S. et al. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511 // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28. № 6. P. 611–615.
- Santoso M., Ikeda G., Tada Y. et al. Exosomes from induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote autophagy for myocardial repair // J. Am. Heart. Assoc. 2020. V. 9. № 6.
- Sayed D., Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease // Physiol. Rev. 2011. V. 91. P. 827–887.
- Sharma P., Mesci P., Carromeu C. et al. Exosomes regulate neurogenesis and circuit assembly // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. № 32. P. 16086–16094.
- Sheldon H., Heikamp E., Turley H. et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes // Blood. 2010.

- V. 116. P. 2385–2394.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239228>
- Sun Z., Li F., Zhou X. et al. Stem cell therapies for chronic obstructive pulmonary disease: current status of pre-clinical studies and clinical trials // *J. Thorac. Dis.* 2018. V. 10. № 2. P. 1084–1098.  
<https://doi.org/10.21037/jtd.2018.01.46>
- Taheri B., Soleimani M., Aval S. et al. Induced pluripotent stem cell-derived extracellular vesicles: A novel approach for cell-free regenerative medicine // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. № 6. P. 8455–8464.
- Terashvili M., Bosnjak J. Stem cell therapies in cardiovascular disease // *J. Cardiothoracic and Vascular Anesthesia.* 2019. V. 33. № 1. P. 209–222.
- Tesar P., Chenoweth J., Brook F. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells // *Nature.* 2007. V. 12. № 448(7150). P. 196–199.
- Thakur B., Zhang H., Becker A. et al. Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection // *Cell Res.* 2014. V. 24. P. 766–769.
- Theos A., Truschel S., Tenza D. et al. A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis // *Dev. Cell.* 2006. V. 10. № 3. P. 343–354.
- Theunissen T., Powell B., Wang H. et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency // *Cell. Stem. Cell.* 2014. V. 2. № 15(4). P. 471–487.
- Toya S., Wary K., Mittal M. et al. Integrin  $\alpha 6\beta 1$  expressed in ESCs instructs the differentiation to endothelial cells // *Stem. Cells.* 2015. V. 33. № 6. P. 1719–1729.
- Villa-Diaz L., Kim J., Laperle A. et al. Inhibition of focal adhesion kinase signaling by integrin  $\alpha 6\beta 1$  supports human pluripotent stem cell self-renewal // *Stem. Cells.* 2016. V. 34. № 7. P. 1753–1764.
- Vitillo L., Baxter M., Iskender B. et al. Integrin-associated adhesion kinase protects human embryonic stem cells from apoptosis, detachment and differentiation // *Stem. Cell. Rep.* 2016. V. 7. P. 167–176.
- Vitillo L., Kimber S. Integrin and FAK regulation of human pluripotent stem cells // *Curr. Stem. Cell. Rep.* 2017. V. 3. № 4. P. 358–365.  
<https://doi.org/10.1007/s40778-017-0100-x>
- Vyas N., Walvekar A., Tate D. et al. Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 7357.  
<https://doi.org/10.1038/srep0735>
- Wang Y., Zhang L., Li Y. et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium // *Int. J. Cardiol.* 2015. V. 192. № 61.
- Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma // *Br. J. Haematol.* 1967. V. 13. № 3. P. 269–288.
- Yang L., Peng X., Li Y. et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes exosome secretion by regulating RAB35 and SNAP23 in hepatocellular carcinoma // *Mol. Cancer.* 2019. V. 3. № 1. P. 78.
- Yang X., Meng Y., Han Z. et al. Mesenchymal stem cell therapy for liver disease: Full of chances and challenges // *Cell Biosci.* 2020. V. 10. № 123.
- Ye M., Ni Q., Qi H. et al. Exosomes derived from human induced pluripotent stem cells-endothelial cells promotes postnatal angiogenesis in mice bearing ischemic limbs // *Int. J. Biol. Sci.* 2019. V. 15. № 1. P. 158–168.
- Zhang Y., Liu Y., Liu H. et al. Exosomes: Biogenesis, biological function and clinical potential // *Cell Biosci.* 2019. V. 15. № 9. P. 19.

## Extracellular Vesicles of Pluripotent Stem Cells

E. A. Suprunenko<sup>1, \*</sup>, E. A. Sazonova<sup>1</sup>, and A. V. Vasiliev<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, bldg. 12, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

\*e-mail: suprunenkoe@mail.ru

The review article presents data on extracellular vesicles (EV), the bilayer phospholipid membrane structures secreted by different types of cells, containing proteins, lipids and nucleic acids. We examine the features of their structure, biogenesis, mechanisms of interaction with the recipient cell, etc. The properties of extracellular vesicles of embryonic stem cells (ESCs) and their role in the regulation of developmental processes are considered. Particular attention is paid to the vesicles of induced pluripotent stem cells (iPSCs), their role in maintaining pluripotency, as well as the specificity of cell vesicles obtained during directed iPSC differentiation.

**Keywords:** extracellular vesicles, pluripotent stem cells, paracrine regulators, reparation