

УДК 579.6

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ БАКТЕРИЙ – МЕДИАТОРЫ МЕЖКЛЕТОЧНОЙ КОММУНИКАЦИИ: ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ И ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2023 г. В. М. Чернов¹, А. А. Музыкантов¹, *, Н. Б. Баранова¹, О. А. Чернова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
“Федеральный исследовательский центр “Казанский научный центр Российской академии наук”,
Казань, 420111 Россия

*e-mail: muzaleksei@mail.ru

Поступила в редакцию 24.09.2022 г.

После доработки 03.11.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Внеклеточные везикулы (ВВ), секретируемые клетками бактерий, в фокусе внимания исследователей. Они обогащены биоактивными молекулами, опосредуют межклеточную коммуникацию микро- и макроорганизмов, участвуют в адаптации бактерий к стрессовым условиям, репрограммировании клеток-мишеней, модуляции иммунореактивности у высших организмов, изменении структуры микробных сообществ и экосистем. Уникальные свойства бактериальных внеклеточных везикул (БВВ) открывают широкие перспективы их практического применения – в клинической медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии и экологии в качестве диагностических маркеров, вакцин, новых биопрепаратов и средств их доставки. Однако для реализации практических приложений необходимо решить ряд проблем. Настоящий обзор сосредоточен на проблеме неоднозначной роли БВВ в регуляции живых систем, безопасности БВВ и подходам к ее решению, связанным с инновационными технологиями.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы бактерий, медиаторы межклеточной коммуникации, малые РНК, биобезопасность, инновационные технологии, sMETASeq

DOI: 10.31857/S0555109923020046, **EDN:** LLCMZT

Внеклеточные мембранные везикулы продуцируются клетками микро- и макроорганизмов. Эти наноструктуры могут транспортировать разнообразные соединения и опосредовать межклеточную коммуникацию про- и эукариот [1]. Первые доказательства существования внеклеточных везикул у бактерий относятся к 60 гг. 20 в. [2–4]. Появление методов высокого разрешения позволило выявить у бактерий несколько категорий везикул, отражающих разные пути их формирования и функции [5–7]. Механизмы биогенеза бактериальных везикул, а также сортинга (селективной загрузки биомолекул в везикулы) пока мало исследованы – основной пул экспериментальных исследований приходится на определение функций БВВ и разработку способов их практического приложения. Большинство работ, посвященных БВВ, относится к поиску и анализу полезных свойств везикул и попыткам дать им практическое приложение. Акцент предлагаемого обзора сделан на неоднозначной роли БВВ в регуляции живых систем, их многоликости (независимо от того, продуцируются они патогенами или комменсалами, в том числе со статусом пробиотиков), отсутствии ис-

черпывающей информации относительно их содержания и функций и, в связи с этим, нерешенной проблеме оценки их безопасности. В обзоре обсуждаются новые возможности, которые открывают инновационные омикс-технологии (в частности, метод sMETASeq) для проведения исследований молекулярных механизмов взаимодействия БВВ с клетками эукариот и анализа токсигенности везикул, актуального для оценки их безопасности.

Функции, связанные со специфичным трафиком и межклеточной коммуникацией, обнаружены у внеклеточных везикул (ВВ) всех исследованных классических грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также бактерий, лишенных клеточной стенки (класс Mollicutes), ассоциированных с мельчайшими прокариотами. Эти везикулы представляют значительный интерес как для фундаментальных исследований, так и практических разработок как транспортеры биоактивных молекул и важные медиаторы в регуляции живых систем [8].

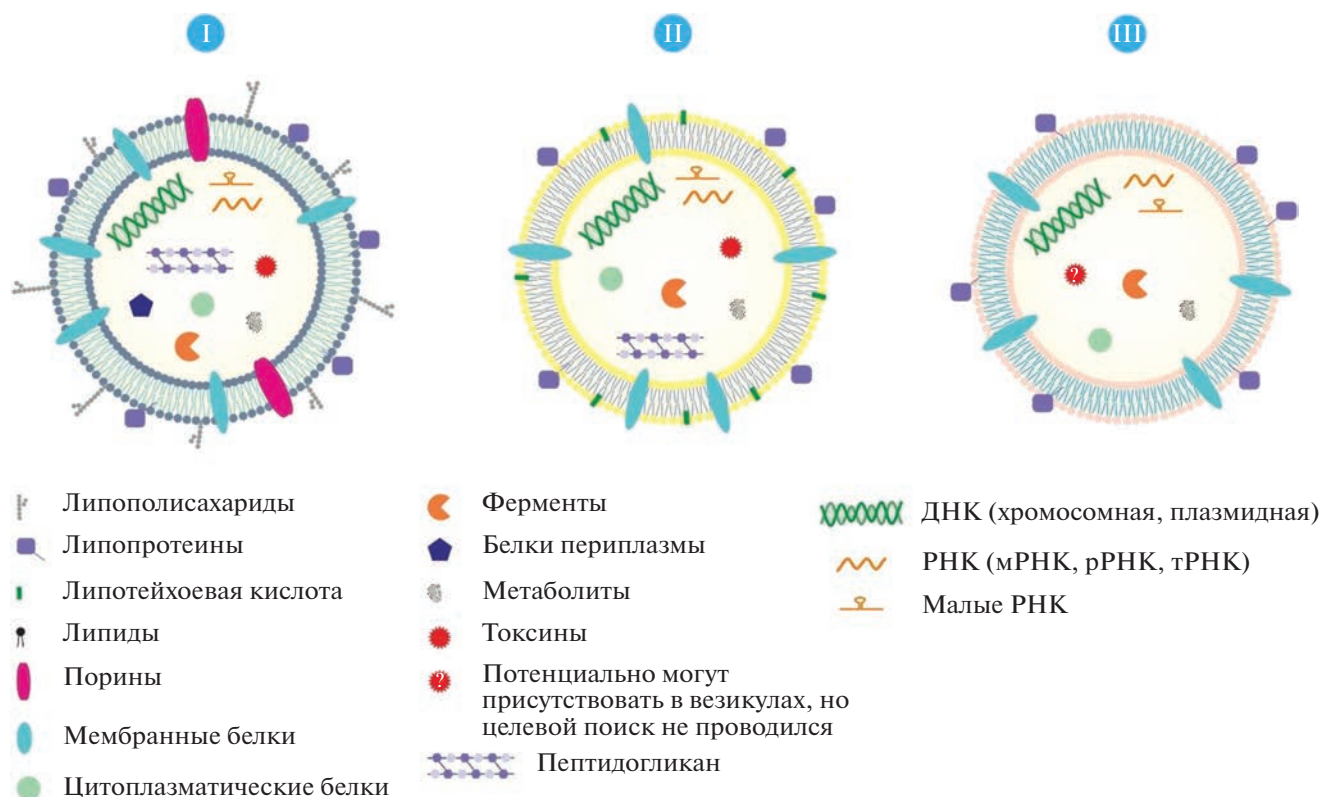


Рис. 1. Принципиальная схема структуры внеклеточных везикул бактерий: I – ВВ грамотрицательных бактерий (OM-Vs, Outer Membrane Vesicles); II – ВВ грамположительных бактерий (CMVs, Cytoplasmic Membrane Vesicles); III – ВВ молликут (EVs, Extracellular Vesicles).

ВВ, продуцируемые грамотрицательными и грамположительными бактериями, а также молликутами, содержат как общие, так и различающиеся классы соединений. В БВВ обнаруживаются токсины, метаболиты, белки, липиды, ДНК, а также РНК и некоторые другие соединения. Основные различия ВВ соответствующих микроорганизмов связаны с отсутствием клеточной стенки у молликут, а также различиями их структуры у грамположительных и грамотрицательных бактерий: наличие/отсутствие соответствующих компонентов отражается на структуре продуцируемых бактериями везикул, поверхности и содержимом везикул (рис. 1). История исследования внеклеточных везикул у грамотрицательных бактерий составляет несколько десятилетий, а грамположительных – много меньше [1]. Внеклеточные везикулы у представителей класса Mollicutes – лишенных клеточной стенки бактерий, ассоциированных с мельчайшими прокариотами, способными к самостоятельному воспроизведению, были изолированы и охарактеризованы относительно недавно и лишь у немногих видов [9–11]. В отличие от L-форм бактерий, молликуты не имеют генетической основы для синтеза клеточной стенки [12], так что сравнивать эти бактерии можно в известных пределах. Однако сравнение секретируе-

мых ими везикул, представляет значительный интерес, так как у везикул L-форм бактерий могут оказаться уникальные, не описанные ранее свойства. Пока внеклеточные везикулы L-форм бактерий не исследованы, очевидно, что этот пробел в знаниях должен быть заполнен в ближайшем будущем.

Изменения условий окружающей среды, в том числе дефицит питательных веществ, окислительный стресс, ультрафиолетовое излучение, изменения температуры, pH, осмотического давления, влажности, селективное давление антимикробных препаратов, развитие вирусной инфекции и активация иммунореактивности вызывают у бактерий повышение уровня везикуляции и изменение спектра соединений в содержимом везикул [1, 13–15]. Принципиально важным является то, что в везикулах бактерий всех исследованных групп независимо от условий среды обнаруживаются малые некодирующие РНК – биомолекулы, с которыми связывают регуляторные функции БВВ [16].

Взаимодействие секретируемых транскриптов бактерий с геномом эукариот является сегодня важнейшим направлением исследований механизмов регуляции микробных сообществ и формирования системы “паразит – хозяин”. Особое

место в этом направлении занимают малые РНК, которые секретируются во внешнюю среду в составе БВВ [16]. Обогащенность малыми РНК — общее свойство БВВ [17–19].

У бактерий большинство малых РНК имеют длину от 50 до 250 нуклеотидов и, как и малые РНК эукариот (siRNA), они играют регуляторную роль в экспрессии генов на посттранскрипционном уровне [20]. Бактерии экспрессируют два типа малых РНК, которые также обнаруживаются у высших организмов, в том числе у человека: (1) РНК, которые картируются на последовательности консервативных молекул — тРНК (tRNA-derived fragments, tRFs) [21], и (2) Y RNAs [22]. Эти молекулы регулируют адаптацию бактерий к стрессорам и реализацию вирулентности [23]. В ряде работ [17, 24], в том числе в исследованиях авторов [25], на модели фибробластов кожи человека и *Acholeplasma laidlawii* (широко распространенной в природе бесстеночной бактерии, встречающейся у человека, животных, растений и являющейся основным контаминантом клеточных культур), было показано, что малые РНК, гомологичные последовательностям тРНК^{Met}, способны подавлять трансляцию у эукариот, входят в состав содержимого БВВ. Интернализация БВВ, транспортирующих такие молекулы, сопровождается изменением экспрессии генов, кодирующих белки разных функциональных групп, и модуляцией иммунореактивности эукариотических клеток-мишеней. В зависимости от вида бактерий, продуцирующих БВ, и типа клеток-мишеней у последних регистрируется активация сигнальных систем, связанных в том числе с усилением или подавлением иммунного ответа [17, 26]. Особые свойства и высокий уровень присутствия малых РНК в везикулах бактерий вносят существенный вклад в статус БВВ как важных медиаторов в регуляции межклеточных взаимодействий и делают их основными кандидатами в диагностические маркеры для оценки физиологических состояний и патологических процессов [18].

Между тем наличие малых РНК в пуле везикул бактерии не означает, что все везикулы, продуцируемые клетками бактерии, содержат малые РНК. Внеклеточные везикулы, продуцируемые бактериальной клеткой, гетерогенны. Они различаются по размерам, содержанию, в том числе РНК, образуют субпопуляции. Такие данные были получены в работе [27], а также в исследованиях авторов [25] (рис. 2). Поскольку разные методы микроскопии обладают как достоинствами, так и недостатками, для исследования везикул рекомендуется использовать разные варианты микроскопии. Ультраструктуру везикул (в том числе наличие у них мембраны) можно исследовать с помощью трансмиссивной электронной микроскопии, но такие объекты будут “плоскими”. Сканирующая электронная микроскопия позволяет визуализи-

ровать везикулы объемно, но не позволяет увидеть ультраструктуру и т.д. Полученные авторами обзора изображения свидетельствуют о том, что везикулы *Acholeplasma laidlawii* подобны внеклеточным везикулам, продуцируемым другими бактериями. Они окружены мембраной (рис. 2а), являются сферическими структурами (рис. 2б), имеют диаметр менее 300 нм (как видно на 2а, 2б), содержат ДНК и РНК (рис. 2г, 2ж, 2и, 2к), способны проникать в клетки других бактерий и эукариот (рис. 2г, 2д, 2и, 2к). О проникновении внеклеточных везикул *A. laidlawii* в клетки *Lactiplantibacillus plantarum* свидетельствует проникновение красителей Hoechst 33342 и акридинового оранжевого, присутствовавших только внутри везикул микоплазмы. Не все везикулы, продуцируемые клетками *A. laidlawii* в конкретных условиях, содержат РНК (рис. 2е, 2ж, 2з — флуоресценция акридинового оранжевого регистрируется не во всех сферических структурах, окрашенных DiI). Различия в содержимом везикул разных субпопуляций позволяет предположить и различный функциональный потенциал соответствующих структур [28]. Однако подходы для дифференциального выделения субпопуляций везикул, в том числе содержащих/не содержащих малые РНК, пока не разработаны, что не позволяет исследовать функции разных субпопуляций везикул в межклеточной коммуникации и оценивать их с точки зрения безопасности.

Бактериальные везикулы опосредуют взаимодействия в микробных сообществах. БВВ, по-видимому, важны для жизни биосистем. Некоторые исследователи считают внеклеточные везикулы ключевыми регуляторами межклеточной коммуникации [1], в том числе в связи с практически отсутствием межвидовых барьеров между продуцентом везикул и таргетными клетками, которые бы затрудняли их опосредованное везикулами взаимодействие; а также стабильностью везикул, способностью их к длительной циркуляции; обогащенностью биоактивными молекулами, участвующими в модуляции сигнальных систем клеток, регуляции экспрессии генов и др. Кроме того, к настоящему времени не получено жизнеспособных организмов (про- и эукариот), у которых было бы полностью нарушено образование внеклеточных везикул, в отличие от мутантов по другим сигнальным и регуляторным путям. Это может указывать на особую значимость внеклеточных везикул для микроорганизмов, их взаимодействия в микробных сообществах и с клетками эукариот. Вместе с тем, межклеточные взаимодействия, как известно, координируют не только внеклеточные везикулы. Описаны и другие агенты химической коммуникации, включая гормоны, цитокины, производные жирных кислот, оксид азота и др. И, хотя наряду с классическими путями секреции, например, гормонов и цитокинов, обнаружены способы секреции этих молекул и с помощью внеклеточных ве-

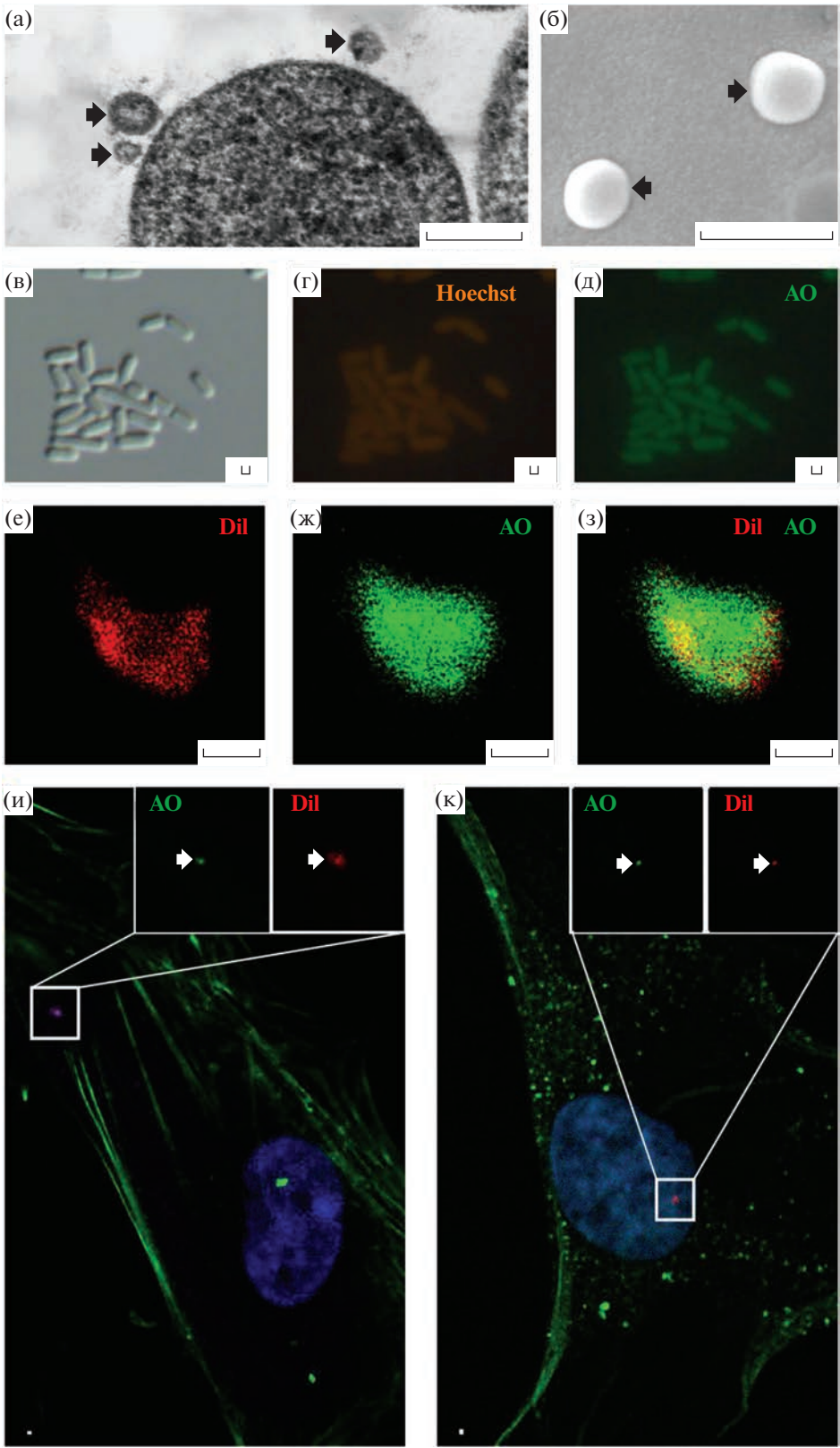


Рис. 2. Внеклеточные везикулы, продуцируемые бактериями в аксеничной (а, е–з), а также смешанной культурах (б), и взаимодействие их с клетками прокариот (в–д) и эукариот (и, к). Изображения получены с помощью ТЭМ (а), СЭМ (б), световой (в) и флуоресцентной микроскопии (г, д), конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (е–к): а – аксеничная культура *Acholeplasma laidlawii*; б – везикулы, выделенные из смешанной культуры *A. laidlawii* + *Bacillus pumilus*; в–д – клетки *Lactiplantibacillus plantarum*, инкубированные с везикулами *A. laidlawii*, окрашенными красителями Hoechst 33342 (г) и акридиновым оранжевым (д); е–з – везикулы, выделенные из аксеничной культуры *A. laidlawii*; к – фибробласты кожи человека, инкубированные с везикулами *A. laidlawii*, окрашенными красителем DiI и акридиновым оранжевым, для визуализации мембраны и РНК соответственно (ядра клеток окрашены DAPI, F-актин – с помощью антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488). Стрелками указаны везикулы бактерий. Везикулы, продуцируемые клетками *A. laidlawii*, проникают в клетки *L. plantarum* (г, д) и человека (и, к). БВВ, содержащие РНК, визуализируются в цитозоле (и) и ядре (к) фибробластов. Масштабный отрезок соответствует 500 нм. (Представленные микрофотографии получены авторами обзора).

зикул, определение “медиаторы межклеточной коммуникации” можно считать корректным отражением важных функций этих структур.

БВВ обеспечивают коммуникацию бактериальных клеток, конкуренцию и взаимопомощь, модуляцию клеточных процессов и стресс-устойчивость [29]. Опосредуемый везикулами латеральный перенос биоактивных молекул определяет возможность оперативного репрограммирования клеток-мишеней и адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды [23]. БВВ транспортируют соединения, актуальные для выживания как отдельных организмов, так и микробного сообщества в целом. В числе таких соединений – детерминанты устойчивости к антибиотикам, молекулы для формирования биопленок и чувства кворума, а также факторы вирулентности [30–32]. Присутствие этих молекул и реализация соответствующих функций обнаружены у ВВ, продуцируемых как патогенами, так и комменсалами [33, 34]. Показано, что в условиях селективного давления антимикробных препаратов БВВ, продуцируемые клетками антибиотикоустойчивых штаммов, могут осуществлять горизонтальный перенос генов и ферментов, обеспечивающих развитие резистентности к антибиотикам у чувствительных к ним бактерий. При этом в сложных ассоциатах комменсалы и патогены оказывают взаимопомощь посредством везикул. Так, БВВ *Staphylococcus aureus* и *Haemophilus influenza* в условиях селективного давления ампициллина и амоксициллина способны передавать β-лактамазу *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и стрептококкам группы А, обеспечивая появление антибиотикоустойчивости у соответствующих бактерий и их выживание в микробном сообществе [35, 36]. Полученные в исследованиях авторов результаты [37], свидетельствующие об экспрессии гена β-лактамазы, а также секретиции соответствующего фермента в составе ВВ у *A. laidlawii*, индифферентной к лактамам бактерии, ассоциированной с мельчайшими прокариотами, могут указывать на фундаментальный характер феномена бактериально-го взаимодействия, опосредуемого БВВ.

В составе ВВ ряда бактерий выявлены компоненты для формирования биопленки (щелочная

протеаза, PrpL и CdrA), молекулы quorum-sensing (хинолины и лактоны), ферменты для деградации антибиотиков и факторы вирулентности (щелочная фосфатаза, фосфолипаза С, липаза и сериновая протеаза и др.), необходимые для координации и выживания микробного сообщества [38–40]. Бактериальные токсины, в том числе Anthrax Toxin и холероген, тоже обнаруживаются в составе ВВ *Bacillus anthracis* и *Vibrio cholerae* соответственно [41, 42]. Подобные соединения, наряду с регуляторными РНК, могут не только обеспечивать защиту микробного сообщества от конкурентов, но в условиях селективного давления стрессоров способствовать изменению состава микробных сообществ и эволюции вирулентности микроорганизмов (появлению вирулентности у безвредных микробов окружающей среды, комменсалов, симбионтов, а также изменению степени вирулентности у патогенов) и развитию патологических процессов в биосистемах [43–45]. Для оперативной детекции подобных событий нужны эффективные диагностикумы. Перспективы создания эффективных инструментов для мониторинга структуры и функций микробных сообществ, оценки физиологических состояний и патологических процессов в биосистемах сегодня связывают с малыми РНК, в том числе в составе БВВ [46]. Особенности нуклеотидных последовательностей малых РНК, в том числе консервативных фрагментов тРНК, являющихся важной частью регуляторных РНК микроорганизмов, отражают таксономическую принадлежность их обладателей [47]. Сиквенс малых РНК исследуемых образцов позволяет определять структуру микробного сообщества, как и метагеномный анализ, основанный на сиквенсе ДНК, в том числе выделенной из ВВ сложных многокомпонентных систем (кровь, моча, содержимое кишечника, вода естественных водоемов и т.д.). Важным преимуществом метагеномного анализа, основанного на сиквенсе РНК, является то, что он позволяет идентифицировать в исследуемых образцах только живые активные микроорганизмы [48].

Бактериальные везикулы опосредуют взаимодействие клеток бактерий и хозяина. К настоящему времени опубликовано немало сообщений, свидетельствующих, что БВВ кишечной микробио-

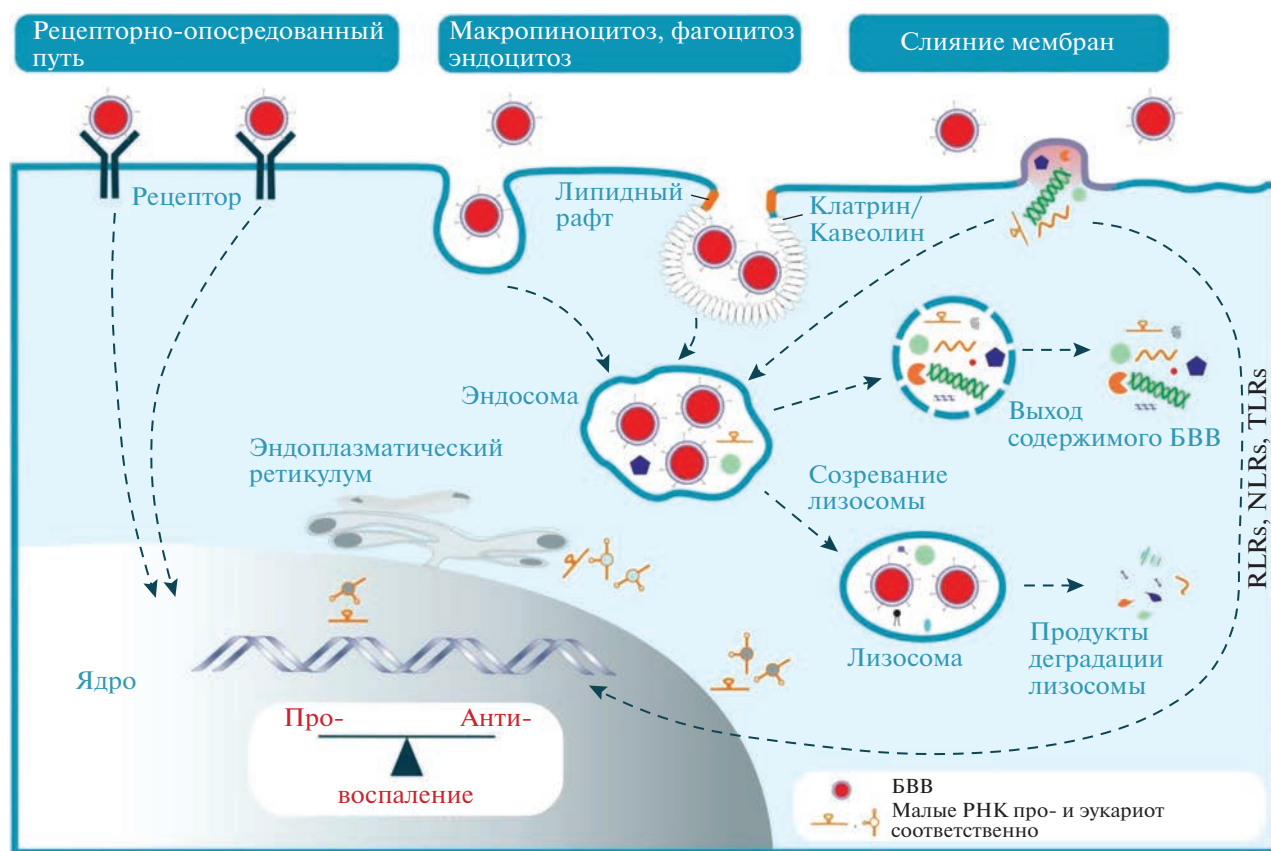


Рис. 3. Основные пути интернализации внеклеточных везикул бактерий и эффекты в отношении клеток эукариот. NLRs – NOD-подобные рецепторы, RLRs – RIG-I-подобные рецепторы, TLRs – Toll-подобные рецепторы, сенсоры врожденного иммунитета, которые узнают структуры, характерные для микробов (MAMPs), поврежденных клеток (DAMPs, Damage-Associated Molecular Patterns) или нуклеиновых кислот на клеточной поверхности, в эндолизосомах или цитоплазме.

ты способны преодолевать эпителиальный барьер кишечника, проникать в кровоток, лимфатическую систему и оказывать влияние на разные органы и системы высших организмов [49–51]. Это свойство БВВ может усиливаться в случае “текучести кишечника”, ассоциированной с нарушением структуры кишечной микробиоты организма. В модельных исследованиях получены данные, указывающие на способность БВВ преодолевать гематоэнцефалический барьер, инфицировать иммунocyты [52, 53], изменять экспрессию многих генов, в том числе регуляторов иммуно- и нейрореактивности, модулировать нормальные и патологические процессы у высших организмов. Однако молекулярные механизмы взаимодействия БВВ с клетками хозяина еще не вполне ясны. Считается, что основным механизмом модуляции, опосредованной БВВ, является эпигенетическая модификация, ассоциированная с действием малых РНК и метилаз, транспортируемых везикулами [54]. В этой связи внимание исследователей к роли везикул в живых системах сосредоточено на малых РНК как важных модуляторах сигнальных систем

эукариотических клеток, регуляторах экспрессии белков взаимодействующих организмов. Вместе с тем очевидно, что липиды и белки БВВ могут тоже вносить существенный вклад в процессы взаимодействия. Многофункциональность БВВ, связанная с их обогащенностью разнообразными биомолекулами, определяет возможность реализации различных сценариев взаимодействия с эукариотической клеткой и его результата. К настоящему времени описано три способа взаимодействия БВВ с клетками высших эукариот [55], из которых два связаны с непосредственной интернализацией везикул, а один с рецепторно-опосредованным путем (рис. 3).

БВВ несут набор молекул, известных как микроб-ассоциированные молекулярные паттерны (MAMPs, Microbe-Associated Molecular Patterns), которые распознаются специфическими рецепторами, экспрессируемыми эпителиальными и иммунными клетками хозяина. Эти рецепторы (TLRs, RLRs, NLRs) – базовые элементы врожденного иммунитета, определяют активацию сигнальных систем, связанных с иммунореактивно-

стью хозяина [56, 57]. Все пути взаимодействия БВВ с эукариотической клеткой запускают сигнальные системы, обуславливающие активацию про- и противовоспалительных реакций хозяина, но баланс в значительной мере определяется составом везикул наиболее представленной субпопуляции. Итог зависит от содержимого БВВ, в том числе паттерна малых РНК, способных регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. В зависимости от вида бактерии, а также способа формирования БВВ могут содержать липополисахариды с известной функцией мощного неспецифического индуктора инфламмы, а также варианты наборов малых РНК и белков, определяющих модуляцию иммунореактивности. При этом БВВ и патогенов и комменсалов могут вызывать однонаправленные эффекты. Активация иммунной системы, нацеленная на удаление носителей чужеродных антигенов, обуславливает также развитие воспалительных реакций, а угнетение иммунной системы, направленное на подавление воспалительных процессов, может обеспечивать персистенцию инфекционного агента. Способность индуцировать про- или противовоспалительные медиаторы в этом случае не может быть маркером негативного или позитивного потенциала и, соответственно, свидетельством вирулентности или, напротив, безопасности БВВ. Для анализа безопасности БВВ нужны биомаркеры, позволяющие оценивать как потенциал вирулентности БВВ, выраженный в профиле везикулярного вирулома, ассоциированного с факторами бактериальной вирулентности соединений, в том числе белков и малых РНК, так и его актуализацию, выраженную в ответных реакциях реципиента, в том числе профиле транскриптов. Считается, что сегодня такими маркерами могут быть малые РНК [58]. Эти молекулы, способные к интерференции с транскриптами про- и эукариотических клеток, могут изменять экспрессию соответствующих генов, и, таким образом, модулировать метаболизм клеток-мишеней [17]. В этой связи анализ профиля всего пула малых РНК БВВ и/или клеток взаимодействующих организмов в исследуемых образцах позволяет оценить как потенциал вирулентности конкретного микроба (на основе везикулярного паттерна малых РНК), так и реализацию этого потенциала на основе паттерна малых РНК реципиента, отражающего ответные реакции [47]. Применение такого алгоритма представляется актуальным как для фундаментальных исследований функций БВВ, так и практических приложений соответствующих структур.

Проблемы и перспективы практического использования БВВ. Исчерпывающих представлений о структуре, составе и функциях, а главное, безопасности БВВ пока нет ни для одного бактериального вида или штамма. Однако уникальные способности БВВ модулировать защитные и па-

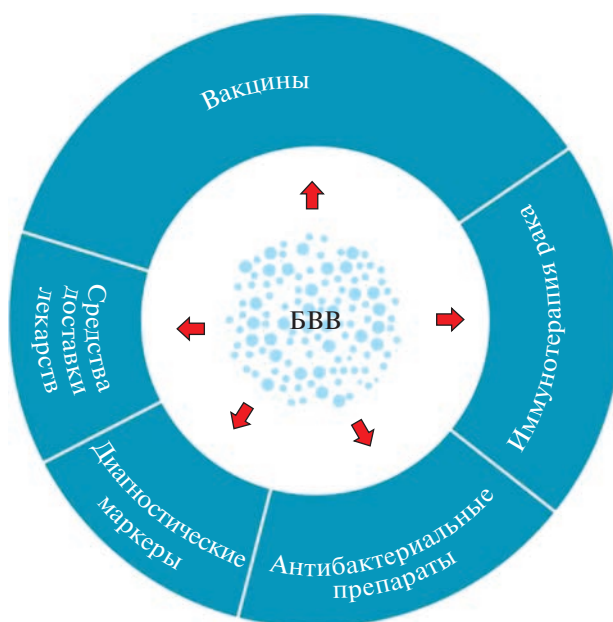


Рис. 4. Основные направления практических приложений БВВ для биомедицины. Схема построена на основе анализа опубликованных данных [8] и отражает относительное количество работ в соответствующих направлениях.

тогенные процессы у микро- и макроорганизмов уже сегодня стремятся направить в практическое русло. Активность исследований в этом направлении отражена на рис. 4, где суммированы данные по зарегистрированным на настоящий момент преclinicalным испытаниям инструментов, основанных на БВВ. Помимо этого, в последнее время обсуждаются возможности использования БВВ комменсалов, имеющих статус пробиотических бактерий, в качестве постбиотиков нового типа [59].

Способность БВВ преодолевать эпителиальные, эндотелиальные и гематоэнцефалические барьеры представляется перспективной для таргетной терапии онкологических заболеваний, ряда психических расстройств, персистентных инфекций [52]. Например, бактериальные везикулы предлагается использовать для лечения язвы, ассоциированной с *Helicobacter pylori* [60]. Природные свойства БВВ транспортировать соединения открывают перспективы использования везикул в качестве средства доставки лекарственных препаратов, а также носителей антигенов, индуцирующих активацию иммунной системы. В этой связи бактериальные наноструктуры привлекают большое внимание как принципиально новый потенциально эффективный биотехнологический инструмент для лечения онкологических заболеваний.

В результате использования нативных свойств БВВ и инжиниринга получены наноструктуры,

которые могут накапливаться в опухолях, активировать таргетный иммунный ответ и способствовать эффективному уничтожению опухоли [61–63]. Недавно были опубликованы сенсационные результаты, свидетельствующие о том, что введение модельным животным нативных БВ, полученных от *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* и *Lactobacillus acidophilus*, приводит к стимуляции экспрессии генов-супрессоров опухолей и активации противоопухолевых иммунных реакций в опухолевых тканях [64]. Эти результаты способствовали взрыву интереса к везикулам комменсалов и интенсификации работ в этом новом направлении [65, 66]. Однако очевидно, что для внедрения БВ в клинику потребуются преодолеть серьезные препятствия, связанные с детальным анализом везикулярного содержимого и оценкой безопасности везикул.

Значительное внимание исследователей направлено также на использование вакцинного, в том числе адъювантного, потенциала БВВ. Учитывая то, что надежная вакцина должна содержать не только целевые антигены, но и несколько патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns), БВВ могут полностью отвечать этим критериям и, по мнению ряда исследователей, стать эффективной основой для вакцин [61, 67]. Способность БВВ патогенов индуцировать эффективный иммунный ответ, обеспечивающий защиту от инфекции, был продемонстрирован в ряде исследований [68, 69]. Основанные на БВВ вакцины против *Neisseria meningitidis*, *H. pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* и *Shigella flexneri* показали свою эффективность на животных моделях [68, 69]. Однако практическое распространение пока получила только вакцина против менингита. Основанная на БВВ *N. meningitidis* (серотип В) вакцина используется сегодня в разных регионах мира, она одобрена регуляторами Кубы, Новой Зеландии, Европы и США [70, 71]. Помимо паттерна неспецифических антигенов, БВ *N. meningitidis* несут целевые антигены и, соответственно, являются как специфичными триггерами иммунного ответа, так и адъювантами [72]. В качестве целевых антигенов используют PorA. Поскольку структура PorA у штаммов *N. meningitidis* варьирует, вакцина с использованием соответствующего антигена является штамм-специфичной, что ограничивает ее эффективность в случае эпидемии, вызванной другим штаммом или штаммами. Для преодоления этой проблемы на основе везикул биоинженерных штаммов *N. meningitidis* созданы вакцины, содержащие поливалентные PorA [73].

Для усиления антигенных свойств, индуцирующих адаптивный и естественный иммунитет, а также для снижения токсигенности БВВ подвергаются модификации. Различные варианты успешного инжиниринга везикул, модулирующего их характеристики [61], широко представлены в пуб-

ликациях [8]. Большие надежды возлагают на использование наночастиц для покрытия везикул, обеспечивающих снижение негативных эффектов и усиление нужных свойств [74]. Предлагаются варианты БВВ, покрытых наночастицами золота (BM-AuNPs), наночастицами бычьего сывороточного альбумина (BN-EV), а также нагруженных наночастицами (NP-EV), являющихся более стабильными и более сильными иммуностимуляторами, чем нативные бактериальные везикулы [75, 76]. Возможность связывания бактериофагов с липополисахаридами БВВ из-за структурного родства поверхности везикул и исходных бактерий и последующей нейтрализации везикул, снижающей, соответственно их клиническую ценность, предлагается преодолевать тоже с помощью новых конструкций и модификаций везикулярной поверхности. Например, предлагается применение полиэтиленгликоля или ингибиторов системы комплемента для покрытия везикулярной поверхности, а также использование гибридных мембран для покрытия везикул [77, 78].

Предполагается, что наличие природных адгезинов на поверхности БВВ может быть полезным для антиадгезионной терапии патогенов. Вследствие конкуренции БВВ и клеток патогенов за лиганды клеток хозяина клетки патогенов в значительной мере остаются несвязанными с мишенями и, соответственно, легко распознаются иммунной системой. Практическое подтверждение этому уже есть. Возможность успешной блокады адгезии *H. pylori* к эпителиальным клеткам желудка с помощью БВ *H. pylori* была продемонстрирована в работе [79]. Между тем, адгезины БВВ могут запускать опасный каскад сигнальных путей у высших организмов [80], приводящих к серьезным патологиям в долгосрочной перспективе. Более того, помимо адгезинов, как уже отмечалось, БВВ несут многие другие биоактивные молекулы, набор которых меняется в зависимости от условий среды. При этом выявить полный спектр соединений в составе БВВ пока не удастся [42], что ограничивает возможности исследований репертуара функций и оценки безопасности этих наноструктур.

Развитие омикс-технологий определило принципиальные возможности проведения анализа содержимого везикул. Однако существующие проблемы препаративного выделения и очистки БВВ [8], а также некоторые ограничения методов мульти-омикс-профилирования препятствуют получению точных данных [81]. Информация о полном спектре соединений в составе везикул и закономерностях его изменений в разных условиях среды отсутствует даже для классических, хорошо исследованных бактерий [82]. Более того, алгоритмы исследований функций и вирулентности везикул остаются пока нестандартизированными, что существенно затрудняет сравнение данных, по-

лученных разными исследовательскими коллективами, и проведение анализа безопасности БВВ [83]. Кроме того, в популяциях ВВ, секретируемых бактериальными штаммами, как уже отмечалось, обнаруживаются субпопуляции везикул, которые различаются в отношении размера и состава содержимого везикул. Специфические молекулярные маркеры для дифференциальной детекции субпопуляций ВВ пока не описаны ни для одного вида бактерий, что не позволяет исследовать динамику, состав и функции соответствующих наноструктур в разных условиях среды. Все опубликованные к настоящему времени данные — результаты исследований тотальных пулов БВВ, выделенных из сложных ассоциатов биосистем или аксеничных культур патогенных бактерий и комменсалов. Наконец, малые РНК БВВ отражают еще один уровень сложности в динамичном взаимодействии хозяин-патоген и рассматриваются сегодня наряду с белками как важный класс факторов вирулентности грамположительных и грамотрицательных бактерий [23]. Полученные данные указывают на то, что miRNA-подобная регуляция экспрессии ключевых сенсоров и регуляторов иммунитета, обнаруженная при исследовании взаимодействия БВВ с эукариотическими клетками, является общим механизмом взаимодействия бактерий с клетками высших организмов, обуславливающим патогенез или симбиоз [27, 58]. В этой связи профиль малых РНК в составе везикул и ответные реакции эукариотических клеток, ассоциированные с модуляцией транскриптомного профиля, должны быть в фокусе внимания исследователей функций везикул, анализа их токсичности и, соответственно биобезопасности.

Нерешенная проблема безопасности БВВ в значительной мере компрометирует идею их клинического приложения. В этой связи ряд исследователей предлагает использовать для практических целей везикулы, продуцируемые комменсалами, которые имеют статус пробиотиков, как потенциально безопасные БВВ. Однако, поскольку все вышеуказанные проблемы также характерны и для ВВ пробиотиков, а проведение оценки безопасности самих пробиотических бактерий до сих пор не стандартизировано [84], подобный подход не представляется приемлемым.

Пока единственным безопасным практическим применением БВВ может быть использование их в качестве диагностических маркеров [85]. Определение структуры микробиоты у человека на основании данных сиквенса ДНК, выделенной из БВВ биофлюидов, уже получило распространение в клинической практике [86]. Обогащенность БВВ малыми РНК открывает новые диагностические перспективы БВВ, в том числе возможность детекции изменений физиологических процессов у отдельных микроорганизмов и в микробных сообществах, модуляции структуры и

функций микробиоты человека, животных, растений, а также почвы, водных систем и регистрации сукцессии на основе сиквенса малых РНК в исследуемых образцах [47]. Технологии, которые позволяют этой возможности реализоваться в ближайшем времени, уже появились.

Новые технологии для практического приложения и оценки безопасности БВВ. Для оценки присутствия микробов в образцах сегодня используют два основных варианта геномных технологий — ДНК-сиквенс отдельных маркерных генов или их фрагментов, например, вариабельных областей 16S рРНК (16S рДНК-seq) [87], либо ДНК-сиквенс по методу дробовика (shotgun DNA-seq). К сожалению, оба варианта не позволяют оценить жизнеспособность, а также активность идентифицированных микроорганизмов, определить актуальные метаболические пути и оценить изменения биохимических процессов в микробных сообществах и биосистемах в ответ на стимул. Инновационный метод, основанный на глобальном секвенировании малых РНК в исследуемых образцах — sMETASeq (small RNA Metagenomics by Sequencing) [47] открывает возможность решения таких задач. При исследовании одного образца он позволяет проводить количественную и качественную оценку всего пула малых РНК, представленных в образце, и на основании сиквенсов РНК определять структуру микробного сообщества. В отличие от метагеномных методов, основанных на ДНК, sMETASeq позволяет: 1) получать информацию о составе живых активных организмов, а также происходящих в их клетках транскрипционных процессах; 2) исследовать взаимосвязь между малыми РНК организма хозяина и микробным составом, а также между структурой микробного сообщества и пулом малых РНК микробов и организма хозяина; наконец, (3) определять ответные реакции организма на конкретные стимулы, микроорганизмы или их компоненты.

Этот метод может использоваться для анализа различных типов образцов от биоптатов тканей до биофлюидов. Поскольку мишенью sMETASeq являются небольшие РНК (<50 нуклеотидов), то даже деградированные молекулы РНК в образце оказываются ценными для идентификации микробов в образце. Впрочем, локализация малых РНК в везикулах (как и связь с некоторыми белками) в значительной мере защищает эти молекулы от деградации [47, 88].

Обогащенность БВВ малыми РНК и стабильность этих молекул в составе везикул позволяет использовать их в качестве диагностических маркеров для оценки динамического равновесия процессов в живых системах, прогрессивных/регрессивных изменений экосистем, развития заболеваний у высших организмов и эффективности лечения [18, 47]. Применение sMETASeq для гло-

бального секвенирования малых РНК внеклеточных везикул, продуцируемых клетками микро- и макроорганизмов в сложных ассоциатах, и появление новых биоинформатических инструментов для анализа нуклеотидных последовательностей могут определить прорывные решения проблем мониторинга биосистем, разработки экспресс-теста изменений в экосистемах при селективном давлении биотических и абиотических стрессоров.

Первые работы в этом направлении уже появились. Недавно стартовал международный проект “AQUACOSM VIMS-Ehux” по изучению динамики внеклеточных везикул микроорганизмов в природных водных системах и определению факторов, влияющих на профиль везикул в окружающей среде [19]. Эти исследования основаны на анализе малых РНК БВВ. Они направлены на создание моделей распределения и функций БВВ в водной среде, актуальных для экологического и биогеохимического понимания изменения природных экосистем, и разработку эффективной системы реагирования. Наличие малых РНК в выделенных из морской воды везикулах микробов позволило авторам оценить интерференционный потенциал соответствующих молекул при действии разных факторов, а также определить таксономический профиль обитателей среды и, соответственно, охарактеризовать структуру и функции микробиоты. В рамках этой работы международной команды исследователей были получены уникальные данные, подтверждающие многоликость БВВ, неоднозначность роли везикул микроорганизмов в регуляции биосистем [19]. Авторы продемонстрировали, что вне селективного давления неблагоприятных факторов внеклеточные везикулы микроорганизмов водных экосистем благотворно влияют на физиологию клеток-продуцентов и способствуют стабильности микробиоты водной среды. Однако в условиях селективного давления биотических и/или абиотических стрессоров, индуцирующих развитие вирусной инфекции, везикулы, напротив, благоприятствуют инфекционному процессу, способствуют распространению инфекционного агента и глобальному изменению микробиома экосистемы. Эти результаты подчеркивают многогранность БВВ и необходимость сосредоточения усилий фундаментальной и прикладной науки на поиске решения проблемы, связанной с оценкой их безопасности. Развитие подходов, основанных на использовании инновационной технологии sMETASeq для модельных систем *in cellulo* и *in vivo*, может определить прогресс в решении проблемы оценки безопасности БВВ, нацеленных на практическое применение. Оптимальным базовым модельным организмом для проведения таких работ является *Caenorhabditis elegans* [89, 90], так как алгоритм оценки влияния БВВ в отношении этого организ-

ма уже разработан [91]. Относительная доступность соответствующего подхода позволяет надеяться на внедрение его в практику в самом ближайшем будущем.

БВВ транспортируют соединения широкого спектра и опосредуют межклеточную коммуникацию как внутри царства прокариот, так и между царствами прокариот и эукариот. Очевидно, что исследование этих наноструктур весьма актуально как для понимания механизмов выживания отдельных бактерий и сложных микробных сообществ в разных условиях среды, так и способов взаимодействия микро- и макроорганизмов, определяющих взаимную выгоду или фатальный исход, трансформацию комменсалов в патогены и развитие патологических процессов, а также для разработки мониторинга микробиоты экосистем и создания системы контроля появления новых патогенов, эмерджентных инфекций. Способность БВВ обеспечивать быструю адаптацию бактерий к неблагоприятным условиям, в том числе антимикробным препаратам, а также уничтожение бактерий-конкурентов открывает перспективы использования этих наноструктур для решения проблемы антибиотикоустойчивости. Способность БВВ преодолевать эпителиальные, эндотелиальные и гематоэнцефалические барьеры, вызывать эпигенетическую модификацию и иммунную модуляцию открывает перспективы применения их в таргетной терапии инфекционных и неинфекционных, в том числе онкологических заболеваний, в качестве лекарств и средств их доставки, а также вакцин. Однако для реализации этих практических приложений еще предстоит решить проблемы, связанные со стандартизацией выделения и очистки БВВ, анализа их структуры и функций, наконец, оценки безопасности *in vitro*, *in cellulo*, *in vivo*.

Преодоление соответствующих проблем потребует объединения усилий представителей как фундаментальной, так и прикладной науки. Результаты этих усилий могут определить прорывные решения в медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии, фармакологии, а также экологии и открыть новые научные направления. Вместе с тем, безопасным и доступным практическим приложением уже сегодня может быть использование БВВ в качестве диагностических маркеров модуляции физиологических процессов у высших эукариот и динамических сдвигов в экосистемах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Woith E., Fuhrmann G., Melzig M.F. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 22. P. 5695.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225695>

2. Bishop D., Work E.J.B.J. // Biochem. J. 1965. V. 96. № 2. P. 567–576.
<https://doi.org/10.1042/bj0960567>
3. Knox K., Cullen J., Work E.J.B.J. // Biochem. J. 1967. V. 103. № 1. P. 192–201.
<https://doi.org/10.1042/bj1030192>
4. Bladen H.A., Waters J.F. // J. Bacteriol. 1963. V. 86. № 6. P. 1339–1344.
<https://doi.org/10.1128/jb.86.6.1339-1344.1963>
5. Avila-Calderón E.D., Ruiz-Palma M.D.S., Aguilera-Arreola M.G., Veldázquez-Guadarrama N., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., et al. // Front Microbiol. 2021. V. 12. P. 557902.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
6. Briaud P., Carroll R.K. // Infect. Immun. 2020. V. 88. e00433–20.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00433-20>
7. Tarashi S., Zamani M.S., Omrani M.D., Fateh A., Moshiri A., Saedisomeolia A. et al. // J. Immunol. Res. 2022. V. 2022. P. 8092170.
<https://doi.org/10.1155/2022/8092170>
8. Xie J., Li Q., Haesebrouck F., Van Hoecke L., Vandembroucke R.E. // Trends Biotechnol. 2022. V. 40. № 10. P. 1173–1194
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.005>
9. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Grygorieva T.Y., Trushin M.V. et al. // J. Proteomics. 2014. V. 110. P. 117–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.020>
10. Gaurivaud P., Ganter S., Villard A., Manso-Silvan L., Chevrete D., Boulé C. et al. // PLoS One. 2018. V. 13. № 11. e0208160.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208160>
11. de Souza L.F.L., Campbell G., Arthuso G.G.S., Gonzaga N.F., Alexandrino C.R., Assao V.S. et al. // Braz. J. Microbiol. 2022. V. 53. № 2. P. 1081–1084.
<https://doi.org/10.1007/s42770-022-00726-0>
12. Razin S., Hayflick L. // Biologicals. 2010. V. 38. № 2. P. 183–190.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.008>
13. Toyofuku M., Nomura N., Eberl L. // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. № 1. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
14. Mozaheb N., Mingeot-Leclercq M.-P. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 600221.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600221>
15. Potter M., Hanson C., Anderson A.J., Vargis E., Britt D.W. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 21289.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78357-4>
16. Stanton B.A. // Genes (Basel). 2021. V. 12. № 7. P. 1010.
<https://doi.org/10.3390/genes12071010>
17. Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W. et al. // PLoS Pathog. 2016. V. 12. № 6. e1005672.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672>
18. Pita T., Feliciano J.R., Leitão J.H. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 24. P. 9634.
<https://doi.org/10.3390/ijms21249634>
19. Schatz D., Schleyer G., Saltvedt M.R., Sandaa R.A., Feldmesser E., Vardi A. // ISME J. 2021. V. 15. № 12. P. 3714–3721.
<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01018-5>
20. Majdalani N., Vanderpool C.K., Gottesman S. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 40. P. 93–113.
<https://doi.org/10.1080/10409230590918702>
21. Kumar P., Anaya J., Mudunuri S.B., Dutta A. // BMC Biol. 2014. V. 12. P. 78.
<https://doi.org/10.1186/s12915-014-0078-0>
22. Chen X., Sim S., Wurtmann E.J., Feke A., Wolin S.L. // RNA. 2014. V. 20. № 11. P. 1715–1724.
<https://doi.org/10.1261/rna.047241.114>
23. Diallo I., Provost P. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 5. P. 1627.
<https://doi.org/10.3390/ijms21051627>
24. Zhang H., Zhang Y., Song Z., Li R., Ruan H., Liu Q. et al. // Int. J. Med. Microbiol. 2020. V. 310. № 1. P. 151356.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151356>
25. Музыкантов А.А., Рожина Э.В., Фахруллин Р.Ф., Гомзикова М.О., Золотых М.А., Чернова О.А. и др. // Acta Naturae. 2021. T. 13. № 4. C. 82–88.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11506>
26. Cecil J.D., O'Brien-Simpson N.M., Lenzo J.C., Holden J.A., Chen Y.Y., Singleton W. et al. // PLoS One. 2016. V. 11. № 4. e0151967.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151967>
27. Sahr T., Escoll P., Rusniok C., Bui S., Pehau-Arnaudet G., Lavieu G. et al. // Nat. Commun. 2022. V. 13. № 1. P. 762.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28454-x>
28. Turner L., Bitto N.J., Steer D.L., Lo C., D'Costa K., Ramm G. et al. // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 1466.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01466>
29. Gottesman S., Storz G. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011. V. 3. a003798.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>
30. Haning K., Cho S.H., Contreras L.M. // Front. Cell Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 96.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00096>
31. Острик А.А., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. // Успехи биологической химии. 2021. T. 61. C. 229–252.
<https://doi.org/10.31857/S0555109920040121>
32. Stork M., Di Lorenzo M., Welch T.J., Crosa J.H. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 9. P. 3479–88.
<https://doi.org/10.1128/JB.00619-06>
33. Michaux C., Verneuil N., Hartke A., Giard J.C. // Microbiol. 2014. V. 160. P. 1007–1019.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.076208-0>
34. Beisel C.L., Storz G. // Mol. Cell. 2011. V. 41. P. 286–297.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.12.027>
35. Stubbendieck R.M., Vargas-Bautista C., Straight P.D. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1234.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
36. Nahui Palomino R.A., Vanpouille C., Costantini P.E., Margolis L. // PLoS Pathogens. 2021. V. 17. № 5. e1009508.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009508>
37. Uddin M.J., Dawan J., Jeon G., Yu T., He X., Ahn J. // Microorganisms. 2020. V. 8. № 5. P. 670.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050670>

38. Koeppen K., Nymon A., Barnaby R., Bashor L., Li Z., Hampton T.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2021. V. 118. № 28. e2105370118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105370118>
39. Muraca M., Putignani L., Fierabracci A., Teti A., Perilongo G. // *Discov. Med.* 2015. V. 19. № 106. P. 343–348.
40. Brameyer S., Plener L., Müller A., Klingl A., Wanner G., Jung K. // *J. Bacteriol.* 2018. V. 200. № 15. e00740–17. <https://doi.org/10.1128/JB.00740-17>
41. Lee J., Lee E.Y., Kim S.H., Kim D.K., Park K.S., Kim K.P. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 6. P. 2589–2595. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-12>
42. Schaar V., Uddback I., Nordstrom T., Riesbeck K. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2014. V. 69. № 1. P. 117–120. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt307>
43. Toyofuku M., Morinaga K., Hashimoto Y., Uhl J., Shimamura H., Inaba H. et al. // *ISME J.* 2017. V. 11. P. 1504–1509. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.13>
44. Rueter C., Bielaszewska M. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020. V. 10. P. 91. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00091>
45. Zhao Z., Wang L., Miao J., Zhang Z., Ruan J., Xu L. et al. // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 806. P. 151403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151403>
46. Ahmadi Badi S., Moshiri A., Fateh A., Rahimi Jamnani F., Sarshar M., Vaziri F. et al. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01610>
47. Mjelle R., Aass K.R., Sjursen W., Hofsløi E., Sætrom P. // *iScience*. 2020. V. 23. № 5. P. 101131. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101131>
48. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 44. P. 19002–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008843107>
49. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. // *mBio*. 2021. V. 12. № 3. e0053421. <https://doi.org/10.1128/mBio.00534-21>
50. Kuipers M.E., Hokke C.H., Smits H.H., Nolte-’t Hoen E.N.M. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 12. № 9. P. 2182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02182>
51. Chang X., Wang S.L., Zhao S.B., Shi Y.H., Pan P., Gu L. et al. // *Mediators Inflamm.* 2020. V. 2020. P. 1945832. <https://doi.org/10.1155/2020/1945832>
52. Hua Y., Wang J., Huang M., Huang Y., Zhang R., Bu F. et al. // *Emerg. Microbes Infect.* 2022. V. 11. № 1. P. 1281–1292. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2065935>
53. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 15329. <https://doi.org/10.1038/srep15329>
54. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Malygina T.Y. et al. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2018. V. 365. № 18. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny185>
55. Marsh J.W., Hayward R.J., Shetty A.C., Mahurkar A., Humphrys M.S., Myers G.S.A. // *Brief. Bioinform.* 2018. V. 19. № 6. P. 1115–1129. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx043>
56. Tulkens J., Vergauwen G., Van Deun J., Geeurickx E., Dhondt B., Lippens L. et al. // *Gut*. 2020. V. 69. № 1. P. 191–193. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317726>
57. Bhattarai Y. // *Neurogastroenterol. Motil.* 2018. V. 30. № 6. e13366. <https://doi.org/10.1111/nmo.13366>
58. Diallo I., Ho J., Lambert M., Benmoussa A., Hussein Z., Lalaouna D. et al. // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. № 9. e1010827. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010827>
59. Yaghoubfar R., Behrouzi A., Ashrafi F., Shahryari A., Moradi H.R., Choopani S. et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 22119. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79171-8>
60. Cuesta C.M., Guerri C., Ureña J., Pascual M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 8. P. 4235. <https://doi.org/10.3390/ijms22084235>
61. Rodrigues M., Fan J., Lyon C., Wan M., Hu Y. // *Theranostics*. 2018. V. 8. № 10. P. 2709–2721. <https://doi.org/10.7150/thno.20576>
62. Vdovikova S., Gilfillan S., Wang S., Dongre M., Wai S.N., Hurtado A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 7434. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25308-9>
63. O'Donoghue E.J., Krachler A.M. // *Cell. Microbiol.* 2016. V. 18. № 11. P. 1508–1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
64. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. № 3. P. 171–84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2297>
65. Díaz–Garrido N., Badia J., Baldomà L. // *J. Extracell. Vesicles*. 2021. V. 10. № 13. e12161. <https://doi.org/10.1002/jev2.12161>
66. Wegh C.A.M., Geerlings S.Y., Knol J., Roeselers G., Belzer C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 19. P. 4673. <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>
67. Molina–Tijeras J.A., Gálvez J., Rodríguez–Cabezas M.E. // *Nutrients*. 2019. V. 11. № 5. P. 1038. <https://doi.org/10.3390/nu11051038>
68. Li M., Zhou H., Yang C., Wu Y., Zhou X., Liu H., Wang Y. // *J. Control. Release*. 2020. V. 323. P. 253–268. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
69. Gilmore W.J., Johnston E.L., Zavan L., Bitto N.J., Kaparakis–Liaskos M. // *Mol. Immunol.* 2021. V. 134. P. 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.02.027>
70. Nanou A., Zeune L.L., Bidard F.C., Pierga J.Y., Terstappen L.W.M.M. // *Breast Cancer Res.* 2020. V. 22. № 1. P. 86. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01323-5>
71. Kim O.Y., Dinh N.T., Park H.T., Choi S.J., Hong K., Gho Y.S. // *Biomaterials*. 2017. V. 113. P. 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.037>
72. Li Y., Wu J., Qiu X., Dong S., He J., Liu J. et al. // *Bioact. Mater.* 2022. V. 20. P. 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.05.037>
73. Chen Q., Bai H., Wu W., Huang G., Li Y., Wu M. et al. // *Nano Lett.* 2020. V. 20. № 1. P. 11–21. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02182>

74. *Bachmann M.F., Jennings G.T.* // Nat. Rev. Immunol. 2010. V. 10. № 11. P. 787–796.
<https://doi.org/10.1038/nri2868>
75. *Huang W., Zhang Q., Li W., Chen Y., Shu C., Li Q. et al.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1379.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01379>
76. *Macia L., Nanan R., Hosseini-Beheshti E., Grau G.E.* // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 21. № 1. P. 107.
<https://doi.org/10.3390/ijms21010107>
77. *Sierra G.V., Campa H.C., Varcacel N.M., Garcia I.L., Izquierdo P.L., Sotolongo P.F. et al.* // NIPH. Ann. 1991. V. 14. P. 195–210.
78. *Micoli F., MacLennan C.A.* // Semin. Immunol. 2020. V. 50. P. 101433.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101433>
79. *Koeberling O., Delany I., Granoff D.M.* // Clin. Vaccine Immunol. 2011. V. 18. № 5. P. 736–42.
<https://doi.org/10.1128/CVI.00542-10>
80. *Peeters C.C., Rümke H.C., Sundermann L.C., Rouppe van der Voort E.M., Meulenbelt J., et al* // Vaccine. 1996. V. 14. № 10. P. 1009–1015.
[https://doi.org/10.1016/0264-410x\(96\)00001-1](https://doi.org/10.1016/0264-410x(96)00001-1)
81. *Benne N., van Duijn J., Kuiper J., Jiskoot W., Slütter B.* // J. Control. Release. 2016. V. 234. P. 124–134.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.033>
82. *Camacho A.I., Irache J.M., de Souza J., Sánchez-Gómez S., Gamazo C.* // Vaccine. 2013. V. 31. № 32. P. 3288–3294.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.020>
83. *Hu C.M., Fang R.H., Luk B.T., Zhang L.* // Nat. Nanotechnol. 2013. V. 8. № 12. P. 933–938.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2013.254>
84. *Dehaini D., Wei X., Fang R.H., Masson S., Angsantikul P., Luk B.T. et al.* // Adv. Mater. 2017. V. 29. № 16. .
<https://doi.org/10.1002/adma.201606209>
85. *Wang D., Dong H., Li M., Cao Y., Yang F., Zhang K., et-Dai W., Wang C., Zhang X.* // ACS Nano. 2018. V. 12. № 6. P. 5241–5252.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08355>
86. *Ricci V., Carcione D., Messina S., Colombo G.I., D'Alessandra Y.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 23. P. 8959.
<https://doi.org/10.3390/ijms21238959>
87. *Hamady M., Knight R.* // Genome Res. 2009. V. 19. № 7. P. 1141–1152.
<https://doi.org/10.1101/gr.085464.108>
88. *Dauros-Singorenko P., Blenkiron C., Phillips A., Swift S.* // FEMS Microbiol. Lett. 2018. V. 365. № 5. fny023.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fny023>
89. *Poupert C., Chassard C., Nivoliez A., Bornes S.* // Front. Nutr. 2020. V. 7. P. 135.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00135>
90. *Baenas N., Wagner A.E.* // Genes Nutr. 2019. V. 14. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/s12263-019-0641-y>
91. *George D.T., Behm C.A., Hall D.H., Mathesius U., Rug M., Nguyen K.C. et al.* // PLoS One. 2014. V. 9. № 9. :e106085.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106085>

Extracellular Vesicles of Bacteria Mediate Intercellular Communication: Practical Applications and Biosafety (Review)

V. M. Chernov^a, A. A. Mouzykantov^a, *, N. B. Baranova^a, and O. A. Chernova^a

^a Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

*e-mail: muzaleksei@mail.ru

Extracellular vesicles, secreted by bacterial cells, are the focus of close attention of researchers. They are enriched with bioactive molecules, mediate the intercellular communication of micro- and macroorganisms, participate in the adaptation of bacteria to stressful conditions, reprogramming target cells, modulating immunoreactivity in higher organisms, changing the structure of microbial communities and ecosystems. The unique properties of bacterial extracellular vesicles (BEVs) open up broad prospects for their practical application – in clinical medicine, agriculture, biotechnology and ecology as diagnostic markers, vaccines, new biological products and means of their delivery. However, to implement the practical applications, a number of problems need to be solved. This review focuses on the ambiguous role of BEVs in the regulation of living systems, the problem of assessing the safety of BEVs and approaches to its solution related to innovative technologies.

Keywords: extracellular vesicles of bacteria, mediators of intercellular communication, small RNAs, practical applications, biosafety, innovative technologies, sMETASeq