

ISSN 2311-4495
ISSN 2410-5155 (Online)
УДК 577:57.084

РЫБЫ *Danio rerio* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Калинина О. В., Самбур Д. Б., Королева Е. Е., Головкин А. С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Калинина Ольга Викторовна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: olgakalinina@mail.ru

Статья поступила в редакцию 01.11.2023
и принята к печати 24.11.2023.

Резюме

На основании литературных данных была проведена оценка возможности использования рыб *Danio rerio* в качестве модели для изучения внеклеточных везикул (ВВ). В частности, описаны модельные эксперименты по оценке вклада ВВ в регуляцию патологических и физиологических процессов (ишемические, реперфузионные, механические повреждения тканей и органов, развитие местного и системного иммунного ответа, опухолевого роста и метастазирования и т. д.), биодоступности и распределения в тканях и органах введенных ВВ, эффектов экзогенных ВВ как терапевтических агентов.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, рыбы *Danio rerio*.

Для цитирования: Калинина О.В., Самбур Д.Б., Королева Е.Е., Головкин А.С. Рыбы *Danio rerio* как модель для изучения внеклеточных везикул. Трансляционная медицина. 2023;10(6):557-565. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-557-565. EDN: NTFRNP

ZEBRAFISH AS A MODEL FOR STUDING EXTRACELLULAR VESICLES

Olga V. Kalinina, Darina B. Sambur, Elizaveta E. Koroleva,
Aleksey S. Golovkin

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Olga V. Kalinina,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: olgakalinina@mail.ru

Received 1 November 2023; accepted
24 November 2023.

Abstract

It was evaluated the feasibility of using Zebrafish as a model to study extracellular vesicles (EVs) based on literature. Particularly, it was described experimental models that were used to assess the contribution of the EVs in the regulation of pathological and physiological processes (ischemic, reperfusion, mechanical damage to tissues and organs, development of local and systemic immune response, tumor growth and metastasis, etc.), the bioavailability and the distribution of injected EVs in different tissues and organs, the effects of exogenous EVs as therapeutic agents.

Key words: extracellular vesicles, zebrafish.

For citation: Kalinina OV, Sambur DB, Koroleva EE, Golovkin AS. Zebrafish as a model for studying extracellular vesicles. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine*. 2023;10(6):557-565 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-557-565. EDN: NTFRNP

Список сокращений: ВВ — внеклеточные везикулы, ВВок — внеклеточные везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, ВВ_Zmell — внеклеточные везикулы, производные клеточной линии меланомы, ГКС — гладкомышечные клетки сосудов, ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, ЦНС — центральная нервная система, эВВэп — внеклеточные везикулы эндотелиального происхождения, CD — кластер дифференцировки, IL — интерлейкин, РМА — форбол-12-миристал-13-ацетат, TNF — фактор некроза опухолей.

Введение

В последнее десятилетие рыбы *Danio rerio* стали широко использоваться в качестве модельного организма для изучения молекулярных механизмов развития и течения различных патофизиологических состояний, для оценки эффективности терапевтических агентов и поиска

новых терапевтических подходов. По сравнению с лабораторными млекопитающими животными, такими как крысы, мыши, кролики, рыбы обладают рядом преимуществ: высоким уровнем фертильности; большим количеством особей в потомстве (50–200); коротким периодом эмбриогенеза (большинство органов, включая нервную систему, сердечно-сосудистую систему, кишечник, печень и почки, дифференцируются и функционируют уже через 5 дней после оплодотворения); высоким содержанием белков (около 70 %) и генов-ортологов (около 47 %) с *Homo sapiens*; а также простотой и экономичностью в содержании и разведении [1]. Zebrafish обладают сходством органов и тканей на анатомическом, физиологическом и молекулярном уровнях с их аналогами у млекопитающих [2]. Так, сердце *Danio rerio* имеет предсердие и желудочек, в стенках присутствуют клетки, характерные для всех трех основных слоев эпикарда, миокарда и эндокарда сердца млекопитающих

[3]; головной мозг состоит из переднего, среднего и заднего мозга, подобно промежуточному мозгу, конечному мозгу и мозжечку млекопитающих, в нервной ткани обнаружены миелин и мотонейроны, микроглия, астроциты, олигодендроциты, клетки Пуркинье [4]; пронефрос состоит из двух нефронов, которые происходят из промежуточной мезодермы, подобно почкам млекопитающих, пронефральный проток выстлан эпителием от клубочка до клоаки и разделен на сегменты, сравнимые с мочевыделительной системой млекопитающих, такие как проксимальный и дистальный каналы [5]. *Danio rerio* обладают схожими реакциями иммунного ответа, функциональными эквивалентами В- и Т-лимфоцитов млекопитающих. Среди лейкоцитов популяции нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов характеризуются значительным морфологическим сходством с нейтрофилами и моноцитами млекопитающих соответственно [2]. Дополнительной особенностью *Danio rerio* является высокая скорость регенерации, делающая этот организм привлекательной модельной системой для изучения механизмов восстановления поврежденных тканей, в том числе элементов сердечно-сосудистой системы после моделирования инфаркта миокарда [3] и ишемического или механического повреждения центральной нервной системы [6].

Важное значение имеет оптическая прозрачность рыб *Danio rerio* в период эмбриогенеза и на ранних личиночных стадиях. Это свойство позволяет проводить визуальное наблюдение *in vivo* не только за ранними процессами развития и органогенеза, но также дает возможность отслеживать в органах и тканях траекторию, динамику распределения и поглощения различных флуоресцирующих препаратов, в том числе новых лекарственных молекул, антител и др. В свою очередь, облегчается возможность характеристики развития изменений в органах и тканях, обусловленных их введением [1, 7].

Внеклеточные везикулы (ВВ) — мембранные объекты, продуцируемые большинством видов клеток и имеющие размеры менее 1000 нм, способные осуществлять молекулярный транспорт через внеклеточное пространство, перенося многие биологически активные молекулы (белки, некодирующие регуляторные РНК, мРНК, ДНК, метаболиты и т. д.), тем самым участвуя в регуляции таких биологических процессов, как регенерация, онкогенез, ангиогенез, коагуляция, воспаление, иммунный ответ и др. [8].

Многие современные исследования направлены на верификацию терапевтического потенциала

внеклеточных везикул и возможности их диагностического использования, в частности при онкологических, нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваниях [9, 10]. Отдельное внимание уделяется изучению регенераторного потенциала ВВ при травматическом и ишемическом повреждении микроциркуляторного русла [11–19] тканей миокарда, печени, легких, кожного покрова, а также нервных клеток [20]. Представляют большой интерес такие свойства ВВ, как стимуляция пролиферации [21–23], угнетение воспаления [24–26] и снижение окислительного стресса [27]. Помимо этого, внеклеточные везикулы интересны в качестве способа доставки различных лекарственных веществ, особенно с учетом их способности преодолевать биологические барьеры [28]. ВВ универсальны, биodeградируемы, нетоксичны, эффективны при пассивном и активном нацеливании, обладают высокой внутренней стабильностью, за счет наличия на поверхности CD47 способны избегать моноклеарной фагоцитарной системы [29]. Таргетное действие ВВ в значительной степени зависит от их поверхностного состава, обеспечивающего связывание с соответствующими рецепторами плазматической мембраны клеток-реципиентов. ВВ могут запускать как внешний, так и внутренний сигнальный каскад, высвобождая свой груз в цитоплазму [7].

Цель обзора — анализ использования модели *Danio rerio* для изучения патогенетического и терапевтического потенциала внеклеточных везикул различного клеточного происхождения на организменном уровне.

1. Модель *Danio rerio* для изучения вклада ВВ в регуляцию патологических процессов

В качестве модельного организма рыб *Danio rerio* используют на всех стадиях развития от эмбрионального до взрослой особи, скорость дифференцировки и онтогенеза личиночной стадии в совокупности с оптической прозрачностью позволяют оценивать патофизиологические процессы, протекающие в системах и органах начиная с 48 часов после оплодотворения. На протяжении десятилетий обширные исследования были посвящены функциональной роли различных популяций ВВ в системе *in vitro* или *in vivo* на моделях млекопитающих, тогда как создание трансгенных моделей *Danio rerio* открыло перспективы исследования в реальном времени биогенеза эндогенных ВВ *in vivo* и их участия в патофизиологических процессах, в том числе канцерогенезе.

С помощью методов визуализации в реальном времени на трансгенных моделях рыб с мем-

бранно-ассоциированной флуорофорной репортерной системой (Tg(Ola.Actb:Hsa.HRAS-EGFP, Tg(kdrl:mCherry-CAAX); Tg(mpeg1:EGFP)) были идентифицированы и отслежены траектории эндогенных ВВ, продуцируемых различными типами клеток, потенциально вовлеченных в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний [30]. Использование трехдневных личинок *Danio rerio* трансгенной линии Tg(actb2:HRAS-EGFP), экспрессирующих GFP+ универсальный трансмембранный белок, позволило идентифицировать пул эндогенных внеклеточных везикул в периферическом кровотоке и перикардальном пространстве, в котором дополнительно оценивали подвижность GFP+ ВВ под влиянием сокращения сердца [30].

Эксперименты на личинках трансгенной линии Tg(kdrl:mCherry-CAAX), экспрессирующих флуоресцирующий эндотелиально-специфичный мембраносвязанный белок, доказали быстрое перемещение эндогенных ВВ эндотелиального происхождения (эВВЭп) в периферическом кровотоке, как в артериальном, так и в венозном русле. Моделирование общей гипоксии, как одного из компонентов ишемического повреждения, на этой трансгенной линии личинок показало значительное увеличение количества эВВЭп в периферическом кровотоке по сравнению с контрольной группой, что подтвердило динамические изменения биогенеза эндотелиальных ВВ при гипоксическом повреждении тканей. Изучение траектории движения эВВЭп на двойной трансгенной линии личинок Tg(kdrl:mCherry-CAAX) + Tg(mpeg1:EGFP), в которой дополнительно присутствовали GFP+ макрофаги, продемонстрировало способность последних захватывать эВВЭп из кровотока за счет выпячивания в просвет сосудов [30].

Эксперименты на взрослых особях комбинированных трансгенных линий *Danio rerio* позволили доказать межклеточную *in vivo* коммуникацию посредством эндогенных ВВ между кардиомиоцитами, эндотелиальными клетками и резидентными макрофагами внутри тканей сердца. Макрофаги усиленно поглощали ВВ как эндотелиального, так и кардиомиоцитарного происхождения. Эндотелиальные клетки активно взаимодействовали с ВВ из кардиомиоцитов, тогда как кардиомиоциты лишь незначительно захватывали эВВЭп [30].

Гладкомышечные клетки сосудов (ГКС) являются ключевыми участниками как ранней, так и поздней стадий атеросклероза, влияя на соседние клетки посредством биоактивных молекул, в том числе упакованных во внеклеточные везикулы [31]. В экспериментах на эмбриональной модели *Danio rerio* были получены доказательства

участия пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), секретируемой гладкомышечными клетками сосудов в составе ВВ, в патогенезе атеросклероза. PCSK9 является одним из основных регуляторов рецептора липопротеинов низкой плотности, экспрессируется в эндотелиальных клетках, макрофагах, гладкомышечных клетках сосудов, а также в атеросклеротических бляшках человека. Введение в проток Кювье двухдневным эмбрионам ВВ, продуцированными гладкомышечными клетками сосудов человека (A617 from human femoral artery), сверхэкспрессирующими PCSK9, приводило к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов *IL-1 β* и *IL-8*. Более того, инъекция этих же препаратов ВВ в закрытую полость желудочка заднего мозга или внутримышечно приводила к миграции макрофагов в места инъекции, что подтверждало паракринное действие PCSK9 в составе ВВ [31].

Известно, что ВВ, секретируемые опухолевыми клетками (ВВок) и обогащенные проопухолевыми факторами (белки, факторы роста, некодирующие РНК и др.), играют важную роль в прогрессировании опухоли и метастазировании, в том числе участвуют в формировании преметастатических ниш и репрограммировании фенотипа стромальных клеток, обеспечивают перекрестную связь между клетками в микроокружении опухоли [32]. Изучение динамики биогенеза ВВок, их распределения между различными тканями и органами позволит создать новые терапевтические стратегии в лечении онкологических заболеваний. На эмбриональной модели *Danio rerio* была описана гемодинамика и внутрисосудистая локализация ВВ производных клеточной линии меланомы (BB_Zmell), полученной из трансгенной модели *mitfa-BRAF(V600E); p53(-/-)* Zebrafish. Отмечена высокая скорость поглощения ВВ эндотелиальными клетками и циркулирующими в кровотоке макрофагами. Одновременно определена внутриклеточная локализация ВВ в поздних эндосомах [33]. Дополнительно установлено, что инъекция BB_Zmell в кровоток двухдневным эмбрионам рыб вызывала поляризацию макрофагов в направлении M1 через 20 часов с момента введения и также способствовала метастатическому росту и повышению инвазивности самих опухолевых клеток Zmell, введенных в эти же эмбрионы спустя 12 часов после инъекции BB_Zmell [33].

Периодическая гипоксия или гипоксия с последующей реоксигенацией является распространенным явлением при солидных опухолях, включая нейробластомы, и влияет на результаты лечения. Гипоксия оказывается одним из стимулов секре-

ции ВВ клетками опухоли, а также способствует ее дедифференцировке в сторону более незрелого фенотипа и метастазированию [34]. В экспериментах *in vitro* было установлено, что гипоксия не влияет на состав поверхностных белковых маркеров, секретируемых ВВ клеток нейробластомы, но при этом обуславливает секрецию ВВ, способных стимулировать подвижность и инвазивность клеток нейробластомы, культивированных в условиях нормоксии. В то же время ВВ, секретируемые нейробластомой в нормоксических и гипоксических условиях, отличались по составу микроРНК, в частности по количеству miR-210-3p. На двухдневной эмбриональной модели *Danio rerio* показали, что только опухолевые клетки, предварительно инкубированные с ВВ, секретированные под действием гипоксии и обогащенные miR-210-3p, после инъекции в желточный мешок были способны быстро проникать в кровоток, мигрировать в область каудального сплетения и транслоцироваться в аваскулярную каудальную область хвоста [34]. Данное исследование позволило продемонстрировать *in vivo* вклад ВВ в процесс диссеминации опухолевых клеток и метастазирования.

В модельных экспериментах с рыбами *Danio rerio* установлено, что ВВ способны влиять на функциональную активность нейронов, на поддержание миелинизации, оказывать нейропротекторное действие, а также опосредовать нейровоспалительные реакции, тем самым влияя на развитие и течение нейровоспалительных и нейродегенеративных заболеваний [10, 35]. Было проведено изучение механизмов, лежащих в основе секреции ВВ нейронами и их действия на сосудистую систему ЦНС. На модели *vps28* мутантной трансгенной линии Tg (Kdrl: eGFP; Gatal: DsRed) была показана ключевая роль белка Vps28 (vacuolar protein sorting 28), экспрессируемого нейронами, в развитии васкуляризации головного мозга и целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) за счет влияния на формирование нейронами мультивезикулярных телец. Полученные результаты свидетельствовали о том, что белок Vps28 действует как регулятор секреции нейрональных ВВ, которые, в свою очередь, связываются с эндотелиальными клетками, опосредуя ангиогенез путем транспортировки фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) [36].

2. Модель *Danio rerio* для изучения влияния ВВ на поляризацию иммунного ответа и процессы регенерации

На основе анализа транскриптома 23 207 генов было показано, что иммунные сигнальные пути

и экспрессия отдельных генов у *Danio rerio* и млекопитающих эволюционно консервативны [37]. После интрацеломического введения взрослым рыбам липополисахарида транскриптомный ответ в тканях печени, почек и мышцах на воспалительный стимул затрагивал в первую очередь гены, связанные с обнаружением, процессингом и передачей сигналов в ответ на внешние антигены, иммунные сигнальные пути и апоптоз [37]. Схожее исследование продемонстрировало возможность моделирования системного воспалительного ответа у рыб *Danio rerio* посредством инъекции липополисахарида [38].

На основе анализа транскриптома единичных клеток была выявлена гетерогенность макрофагов и дендритных клеток у взрослых рыб *Danio rerio* в зависимости от их локализации в барьерных тканях, печени и сердце [39]. Идентифицированы два типа макрофагов: провоспалительные макрофаги с потенциалом для фагоцитоза и альтернативно активированные макрофаги с потенциалом для регенерации тканей. Кроме того, охарактеризованы популяции обычных дендритных клеток с выраженной способностью к презентации антигена и популяция плазмцитоподобных дендритных клеток, обладающих антивирусными свойствами [39]. Эти исследования позволяют рассматривать *Danio rerio* в качестве ценной модели для *in vivo* изучения заболеваний, ассоциированных с воспалением.

В нашем исследовании на модели взрослых рыб было установлено, что введение в целомическую полость рыб ВВ, секретируемых моноцитоподобными клетками THP-1 без стимуляции и после активации фактором некроза опухолей (TNF) или форбол-12-мирикат-13-ацетатом (PMA), вызывает изменение экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в головном мозге, печени и сердце рыб [40]. Более того, в зависимости от вида и дозы стимула, который применялся для получения фракций ВВ, менялась сила и направленность регистрируемых эффектов, что, в свою очередь, указывало на изменение качественного состава продуцируемых ВВ и свидетельствовало об их возможном влиянии на поляризацию иммунного ответа.

Исследование на эмбриональной модели *Danio rerio* подтвердило гипотезу о том, что ВВ, секретируемые клеточными линиями колоректального рака при активации в них генов эндогенных ретровирусов (HERV+ВВ), участвуют в модуляции врожденного иммунного ответа, являющегося ключевым этапом при формировании метастатической ниши [41]. В геноме человека около 8,5 %

генов представлено генами эндогенных ретровирусов (HERV), которые участвуют в ряде физиологических процессов, таких как слияние трофобластов во время развития плаценты и модуляция иммунного ответа; в то же время они могут быть вовлечены в развитие канцерогенеза, в частности колоректального рака. В ходе эксперимента инъекция HERV+BB, продуцируемых нематастатической линией колоректального рака Сасо-2 или метастатической линией SK-CO-1, в проток Кювье двухдневным эмбрионам обуславливала изменение уровня экспрессии генов провоспалительного *IL-1 β* , противовоспалительного *IL-10* и маркера активации нейтрофилов *mpx*, что свидетельствовало о роли HERV+BB в качестве иммуномодуляторов [41].

В настоящее время тестируются многочисленные стратегии лечения различных заболеваний сетчатки, включая подходы генной терапии и трансплантацию стволовых клеток. В качестве альтернативных методов рассматривают индукцию эндогенной регенерации, обусловленной резидентными плюрипотентными стволовыми клетками сетчатки взрослого человека (глия Мюллера) [42]. На модели взрослой Zebrafish был проведен скрининг BB, полученных из различных культур клеток, в том числе стволовых клеток, первичных нейрональных клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, различных опухолевых линий, а также клеток сетчатки рыб дикого типа. Оценивали их способность индуцировать пролиферативный ответ после интравитреальной инъекции в неповрежденную сетчатку. Сетчатка взрослой особи *Danio rerio* содержит клетки, которые могут восстанавливать все поврежденные типы клеток сетчатки. Оказалось, что наибольшим регенераторным потенциалом обладали BB, продуцируемые клетками С6 глиомы, однако протеомный анализ не выявил значительного обогащения BB ни одним из наиболее изученных белков, участвующих в регенерации сетчатки [42].

3. Модель *Danio rerio* для изучения BB как способа таргетной доставки различных препаратов

Внеклеточные везикулы все чаще рассматриваются в качестве средств доставки биоактивных молекул посредством внутрисосудистого введения, что предусматривает эффективность их поглощения эндотелиальными клетками, которые выстилают внутреннюю поверхность кровеносных сосудов [7]. На трансгенной модели *Danio rerio* (Tg(flk:gfp endothelial-specific transgenic fish)) было изучено влияние гемодинамики на поглощение эндотелиальными клетками сосудов BB эритроцитарного

происхождения, которые способны длительно циркулировать в кровотоке по сравнению с другими BB [43]. Для этого в сердце двухдневных личинок вводили меченные DiD (1,19-Dioctadecyl-3,3,39,39-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate) BB эритроцитарного происхождения и отслеживали их интернализацию в течение 12 часов с помощью лазерной конфокальной микроскопии в реальном времени в хвосте рыб, так как было установлено, что хвостовая артерия и задняя кардинальная вена у личинок рыб имеют разные скорости кровотока, а эндотелиальное напряжение сдвига пропорционально вязкости крови. Было установлено, что BB в основном поглощались эндотелиальными клетками задней кардинальной вены через 3 часа с момента инъекции и продолжали там же накапливаться в течение последующих 12 часов, что позволило сделать заключение о влиянии низкой скорости кровотока, обусловленной снижением напряжения на стенки сосудов и изменением пульсовой волны, на увеличение эффективности поглощения BB эндотелиальными клетками [43]. Полученные результаты открывают перспективы для дальнейшего использования модели *Danio rerio* для изучения основ биомеханического поглощения BB различными клетками и органами, в частности, для разработки терапевтических стратегий при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Существенным ограничением для терапевтических препаратов является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). На модели трансгенных эмбрионов TG (fli1: GFP) рыбы с моделированием глиобластомы-астроцитомы головного мозга U-87 MG (brain neuronal glioblastoma-astrocytoma U-87 MG), меченных Brite® DiD, было доказано, что с помощью экзосом, продуцированных эндотелиальными клетками головного мозга, можно доставлять противоопухолевые препараты через ГЭБ [44]. Препараты экзосом, полученные из четырех клеточных линий глиобластомы-астроцитомы нейронов головного мозга U-87 MG (brain neuronal glioblastoma-astrocytoma U-87 MG); эндотелия (endothelial bEND.3), нейроэктодермальной опухоли (neuroectodermal tumor PFSK-1) и глиобластомы (glioblastoma A-172), были нагружены родамином 123 и введены в общую кардинальную вену пятидневным трансгенным эмбрионам TG (fli1: GFP). Через 18 часов после инъекции родамин 123 был детектирован в тканях головного мозга только при использовании в качестве средства доставки экзосом, производных эндотелиальных клеток головного мозга, которые экспрессировали больше трансмембранных белков тетраспанинов CD63 по сравнению с экзосомами, произво-

дными опухолевыми клеточными линиями U-87 MG, PFSK-1, A-172. Также эндотелиальные экзосомы bEND.3 эффективно доставляли другие противоопухолевые препараты, такие как доxorубин (doxorubicin) и паклитаксел (paclitaxel) в ткани головного мозга. Данные эксперименты *in vivo* позволили доказать возможность использования экзосом эндотелиального происхождения для эффективной доставки груза через ГЭБ [44].

Таким образом, *Danio rerio* обладает всеми необходимыми характеристиками для изучения биологических процессов *in vivo*, оценки патофизиологического и терапевтического потенциала внеклеточных везикул на организменном уровне.

Заключение

Вышеописанные эксперименты открывают новые возможности использования рыб *Danio rerio* для изучения тонких механизмов клеточной коммуникации, опосредованной внеклеточными везикулами *in vivo* в норме и при патологии. В частности, молекулярных основ клеточной миграции и формирования преметастатических ниш, поляризации иммунного ответа, биодоступности и распределения в тканях препаратов внеклеточных везикул.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-20076, <https://rscf.ru/project/19-75-20076/> / The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation No. 19-75-20076, <https://rscf.ru/project/19-75-20076/>

Список литературы / References

1. Piña B, Navarro L, Barata C, et al. Omics in zebrafish teratogenesis. In: Methods in Molecular Biology. 2018. p. 421–41. DOI: 10.1007/978-1-4939-7883-0_23.
2. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. Toxicol Pathol. 2011;39(5):759–75. DOI: 10.1177/0192623311409597.
3. Hu B, Lelek S, Spanjaard B, et al. Origin and function of activated fibroblast states during zebrafish heart regeneration. Nat Genet. 2022 Aug;54(8):1227–37. DOI: 10.1038/s41588-022-01129-5.
4. Saleem S, Kannan RR. Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and

neurospecific drug discovery. Cell Death Discov. 2018 Oct;4(1):45. DOI: 10.1038/s41420-018-0109-7.

5. Outtandy P, Russell C, Kleta R, Bockenhauer D. Zebrafish as a model for kidney function and disease. Pediatr Nephrol. 2019 May;34(5):751–62. DOI: 10.1007/s00467-018-3921-7.

6. Herzog C, Greenald D, Larraz J, et al. RNA-seq analysis and compound screening highlight multiple signalling pathways regulating secondary cell death after acute CNS injury in vivo. Biol Open. 2020 May;9(5). DOI: 10.1242/bio.050260.

7. Androuin A, Verweij FJ, van Niel G. Zebrafish as a preclinical model for Extracellular Vesicle-based therapeutic development. Adv Drug Deliv Rev. 2021;176:113815. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.025.

8. Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. Blood Rev. 2013;27(1):31–9. DOI: 10.1016/j.blre.2012.12.002.

9. Serrati S, Guida M, Di Fonte R, et al. Circulating extracellular vesicles expressing PD1 and PD-L1 predict response and mediate resistance to checkpoint inhibitors immunotherapy in metastatic melanoma. Mol Cancer. 2022 Jan;21(1):20. DOI: 10.1186/s12943-021-01490-9.

10. Ruan J, Miao X, Schlüter D, et al. Extracellular vesicles in neuroinflammation: Pathogenesis, diagnosis, and therapy. Mol Ther. 2021 Jun;29(6):1946–57. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.04.020.

11. El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: In vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. Eur Heart J. 2018;39(20):1835–47. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy012.

12. Ma J, Zhao Y, Sun L, et al. Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. Stem Cells Transl Med. 2017;6(1):51–9. DOI: 10.5966/sctm.2016-0038.

13. Zhu LP, Tian T, Wang JY, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. Theranostics. 2018;8(22):6163–77. DOI: 10.7150/thno.28021.

14. Deng S, Zhou X, Ge Z, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cardiac damage after myocardial infarction by activating S1P/SK1/S1PR1 signaling and promoting macrophage M2 polarization. Int J Biochem Cell Biol. 2019;114(May):105564. DOI: 10.1016/j.biocel.2019.105564.

15. Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, et al. Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. J Biol Chem. 2019;294(31):11665–74. DOI: 10.1074/jbc.RA119.007537.

16. Ni J, Liu X, Yin Y, et al. Exosomes derived from TIMP2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance the repair effect in rat model with myocardial infarction possibly by the Akt/ SFRP2 pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019. DOI: 10.1155/2019/1958941.
17. Zhao J, Li X, Hu J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res*. 2019 Jun;115(7):1205–16. DOI: 10.1093/cvr/cvz040.
18. Sun XH, Wang X, Zhang Y, Hui J. Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Thromb Res*. 2019;177:23–32. DOI: 10.1016/j.thromres.2019.02.002.
19. Bian B, Zhao C, He X, et al. Exosomes derived from neural progenitor cells preserve photoreceptors during retinal degeneration by inactivating microglia. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). DOI: 10.1080/20013078.2020.1748931.
20. Song Y, Li Z, He T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124. *Theranostics*. 2019;9(10):2910–23. DOI: 10.7150/thno.30879.
21. Wang D, Gao B, Yue J, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells expressing miR-125b inhibit neointimal hyperplasia via myosin IE. *J Cell Mol Med*. 2019 Feb;23(2):1528–40. DOI: 10.1111/jcmm.14060.
22. Qu Q, Pang Y, Zhang C, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–14. DOI: 10.1186/s13287-020-01639-1.
23. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(1):104–16. DOI: 10.1164/rccm.201705-0925OC.
24. Woo CH, Kim HK, Jung GY, et al. Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). DOI: 10.1080/20013078.2020.1735249.
25. Zhu D, Tian J, Wu X, et al. G-MDSC-derived exosomes attenuate collagen-induced arthritis by impairing Th1 and Th17 cell responses. *Biochim Biophys Acta — Mol Basis Dis*. 2019 Dec;1865(12):165540. DOI: 10.1016/j.bbdis.2019.165540.
26. Chen L, Huang H, Zhang W, et al. Exosomes derived from T regulatory cells suppress CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte proliferation and prolong liver allograft survival. *Med Sci Monit*. 2019;25:4877–84. DOI: 10.12659/MSM.917058.
27. Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Apr;4(2):34. DOI: 10.1186/scrt194.
28. Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:332–43. DOI: 10.1016/j.addr.2020.04.004.
29. De Jong OG, Kooijmans SAA, Murphy DE, et al. Drug Delivery with Extracellular Vesicles: From Imagination to Innovation. *Acc Chem Res*. 2019;52(7):1761–70. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00109.
30. Scott A, Sueiro Ballesteros L, Bradshaw M, et al. In Vivo Characterization of Endogenous Cardiovascular Extracellular Vesicles in Larval and Adult Zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(9):2454–68. DOI: 10.1161/ATVBAHA.121.316539.
31. Greco MF, Rizzuto AS, Zarà M, et al. PCSK9 Confers Inflammatory Properties to Extracellular Vesicles Released by Vascular Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct;23(21):13065. DOI: 10.3390/ijms232113065.
32. Hyenne V, Lefebvre O, Goetz JG. Going live with tumor exosomes and microvesicles. *Cell Adhes Migr*. 2017 Mar;11(2):173–86. DOI: 10.1080/19336918.2016.1276694.
33. Hyenne V, Ghoroghi S, Collot M, et al. Studying the Fate of Tumor Extracellular Vesicles at High Spatiotemporal Resolution Using the Zebrafish Embryo. *Dev Cell*. 2019;48(4):554–572.e7. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.01.014.
34. Fusco P, Fietta A, Esposito MR, et al. miR-210-3p enriched extracellular vesicles from hypoxic neuroblastoma cells stimulate migration and invasion of target cells. *Cell Biosci*. 2023 May;13(1):89. DOI: 10.1186/s13578-023-01045-z.
35. Jin T, Gu J, Li Z, et al. Recent advances on extracellular vesicles in central nervous system diseases. *Clin Interv Aging*. 2021 Feb;16:257–74. DOI: 10.2147/CIA.S288415.
36. Dong X, Jiang D, Wang L, et al. VPS28 regulates brain vasculature by controlling neuronal VEGF trafficking through extracellular vesicle secretion. *iScience*. 2022 Apr;25(4):104042. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104042.
37. Forn-Cuní G, Varela M, Pereiro P, et al. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Sci Rep*. 2017;7(Febuary 2016):41905. DOI: 10.1038/srep41905.
38. Ma Y, Fedorov AV, Kondratov KA, et al. Organ-specific LPS-induced inflammatory gene expression in adult Zebrafish. *Med Immunol*. 2021 Nov;23(5):1069–78. DOI: 10.15789/1563-0625-OSL-2357.
39. Zhou Q, Zhao C, Yang Z, et al. Cross-organ single-cell transcriptome profiling reveals macrophage and dendritic cell heterogeneity in zebrafish. *Cell Rep*. 2023 Jul;42(7):112793. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112793.
40. Sambur DB, Kalinina OV, Aquino AD, et al. Extracellular vesicles secreted by activated THP-1 cells

influence the expression of inflammation-related genes in *Danio rerio* organs. *Neurochemistry*. 2024;1. In Russian [Самбур Д.Б., Калинина О.В., Акино А.Д. и др. Внеклеточные везикулы, секретируемые активированными клетками ТНР-1, влияют на экспрессию генов воспаления в органах *Danio rerio*. *Нейрохимия*. 2024;1].

41. Ferrari L, Cafora M, Rota F, et al. Extracellular vesicles released by colorectal cancer cell lines modulate innate immune response in zebrafish model: The possible role of human endogenous retroviruses. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul;20(15):3669. DOI: 10.3390/ijms20153669.

42. Didiano D, Abner JJ, Hinger SA, et al. Induction of a proliferative response in the zebrafish retina by injection of extracellular vesicles. *Exp Eye Res*. 2020 Nov;200(3):108254. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108254.

43. Qin X, Zhang K, Qiu J, et al. Uptake of oxidative stress-mediated extracellular vesicles by vascular endothelial cells under low magnitude shear stress. *Bioact Mater*. 2022 Mar;9:397–410. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.038.

44. Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio Rerio*. *Pharm Res*. 2015 Jun;32(6):2003–14. DOI: 10.1007/s11095-014-1593-y.

Информация об авторах:

Калинина Ольга Викторовна, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», профессор кафедры лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Самбур Дарина Борисовна, клинический ординатор кафедры лабораторной медицины и генетики Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины»;

Королева Елизавета Евгеньевна, лаборант-исследователь Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Головкин Алексей Сергеевич, д.м.н., руководитель группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории аутоиммунных и аутовоспалительных заболеваний научно-исследовательского центра неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр

персонализированной медицины», профессор кафедры клеточной биологии и гистологии Института медицинского образования ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Authors information:

Olga V. Kalinina, Doctor of Medicine, Associate Professor, Leading Researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center for Personalized Medicine; Professor at the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre;

Darina B. Sambur, clinical resident of the Department of Laboratory Medicine and Genetics, Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre; research laboratory assistant at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center for Personalized Medicine;

Elizaveta E. Koroleva, research laboratory assistant at the Institute of Molecular Biology and Genetics of the Almazov National Medical Research Centre;

Aleksey S. Golovkin, Doctor of Medicine, Head of the Group of Genetic Cell Engineering, Institute of Molecular Biology and Genetics of the Almazov National Medical Research Centre; Leading Researcher at the Research Laboratory of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases, Research Center of Unknown, Rare and Genetically Determined Diseases of the World-Class Research Center for Personalized Medicine; Professor at the Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education of the Almazov National Medical Research Centre.