

УДК 57.085.23

ЭКЗОСОМЫ – ПРИРОДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕРАПИИ

© 2020 г. М. Г. Ратушняк^{1,*}, Ю. П. Семочкина¹

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: ratushnyak_marya@mail.ru; Ratushnyak_MG@nrcki.ru

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 16.06.2020 г.

Принята к публикации 11.08.2020 г.

Благодаря природному происхождению, маленькому размеру частиц и стабильности в биологических жидкостях организма экзосомы способны достигать клеток-мишеней, накапливаться в тканях, преодолевать гематоэнцефалический барьер и оказывать терапевтическое действие. Настоящий обзор посвящен анализу свойств экзосом, способам их выделения, характеристикам, хранению и перспективам использования этих наночастиц в терапии: во-первых, для стимуляции процессов регенерации, а во-вторых, для доставки лекарственных веществ в составе экзосом.

DOI: 10.1134/S1992722320040123

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Образование и характеристика экзосом
 2. Другие внеклеточные везикулы
 3. Состав и функции экзосом
 4. Способы получения и хранения экзосом
 5. Перспективы использования экзосом в диагностике и лечении
 - 5.1. Онкологические заболевания
 - 5.2. Сердечно-сосудистые заболевания
 - 5.3. Нейродегенеративные заболевания
 - 5.4. Использование экзосом стволовых клеток для стимуляции процессов регенерации
 6. Использование экзосом в качестве “контейнеров” для доставки лекарственных препаратов
- Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Решение проблем, касающихся повышения эффективности лекарственных препаратов, связывают с созданием новых методов их доставки к мишеням. Для снижения токсичности препаратов, улучшения биодоступности и пролонгации их действия используют включение действующего вещества в полимерные, биodeградируемые, биосовместимые наноразмерные носители [1]. Наиболее перспективными системами для доставки лекарств считаются липосомы и полимерные наночастицы [1], но существуют ограничения по безопасности их применения, связанные с

возможной токсичностью, раздражающим действием и аллергенностью. Поэтому задачи оптимизации доставки лекарств, особенно доставки лабильных биологически активных веществ (БАВ), еще не решены и остаются актуальными. Важный вклад в решение этой проблемы может внести использование экзосом – природных наночастиц, синтезируемых и секретируемых различными клетками человека и животных. Экзосомы были обнаружены более 50 лет назад [2, 3]. Они присутствуют почти во всех биологических жидкостях человека: кровь, моча, слюна, амниотическая и спинномозговая жидкость, желчь, слезы, грудное молоко и семенная жидкость. Благодаря природному происхождению, маленькому размеру частиц и стабильности в биологических жидкостях организма экзосомы способны достигать клеток-мишеней, накапливаться в тканях, преодолевать гематоэнцефалический барьер и оказывать терапевтическое действие [4–9]. Настоящий обзор посвящен анализу свойств экзосом, способам их выделения, характеристикам, хранению и перспективам использования этих наночастиц в терапии: во-первых, для стимуляции процессов регенерации, а во-вторых, для доставки лекарственных веществ в составе экзосом.

1. ОБРАЗОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКЗОСОМ

Экзосомы – это мембранные везикулы (пузырьки) размером от 30 до 100 нм, которые образуются и секретируются различными клетками и способны доставлять биологически активные мо-

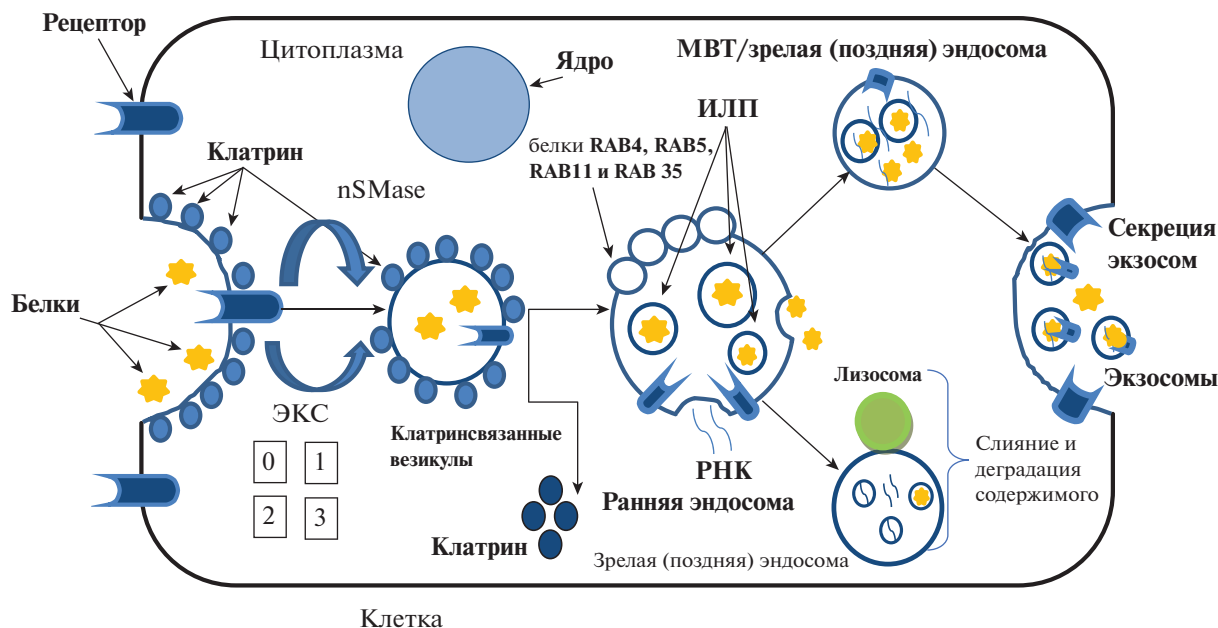


Рис. 1. Схема формирования экзосом: 0, 1, 2, 3 – компоненты эндосомального комплекса сортировки (ЭКС), nSMase – сфингомиелиназа, МВТ – мультивезикулярное тельце, ИЛП – интралюминальные пузырьки [10, 11, 13, 16].

лекулы, в том числе белки, РНК и ДНК, не только к соседним клеткам, но и в другие органы и ткани, перемещаясь с током крови и лимфы.

Экзосомы секретируются всеми типами клеток во внеклеточную среду путем слияния мультивезикулярных телц (МВТ) с клеточной мембраной (рис. 1).

Образование экзосом начинается с инвагинации микродоменов плазматической мембраны клетки, покрытых клатрином, с образованием окаймленных пузырьков. После того как пузырьки отсоединяются от плазматической мембраны, клатриновое окаймление может удаляться [10]. В результате инвагинации мембраны ранних эндосом образуются интралюминальные пузырьки (ИЛП), которые накапливаются и созревают внутри ранних эндосом. В дальнейшем из ранних эндосом происходит образование зрелых (поздних) эндосом, или так называемых МВТ, содержащих интралюминальные везикулы [11–13].

Если на мембране поздних эндосом присутствуют лизобисфосфатидная кислота и убиквитинированные белки, то они сливаются с лизосомой, что ведет к деградации их содержимого [12, 14]. Если мембрана эндосом содержит церамиды, то образовавшиеся МВТ сливаются с мембраной клетки и высвобождают экзосомы во внеклеточное пространство. На этапе формирования интралюминальных везикул – будущих экзосом – происходит их наполнение такими молекулами, как РНК, белки и низкомолекулярные соединения. Часть РНК и белков, локализованных в экзосомах, попадает в них путем пассивного захвата

содержимого цитоплазмы, прилежащей к месту формирования везикул. Однако экзосомы могут содержать специфические наборы РНК и белков, отличные от наборов РНК и белков цитоплазмы, что указывает на существование механизма направленного транспорта РНК и белков в экзосомы.

В процессе образования экзосом могут участвовать эндосомальный комплекс сортировки (ЭКС) [15] и сфингомиелиназа [11]. ЭКС – специализированный белковый комплекс, содержащий около тридцати белков, формирующих ЭКС-комплексы четырех типов: ЭКС-0, -1, -2, -3, каждый из которых функционирует на разных этапах образования экзосом [10, 11]. Комплекс ЭКС-0 распознает и изолирует убиквитинированные трансмембранные белки на эндосомальной мембране, в то время как комплексы ЭКС-1 и ЭКС-2 ответственны за инициирование локальной инвагинации эндосомальной мембраны, а компоненты ЭКС-3 необходимы для формирования интралюминальных везикул [10, 11].

При участии различных компонентов ЭКС происходит обогащение мембраны эндосом белками RAB5, RAB7, RAB11 и RAB35 и трансформация эндоцитозных пузырьков в ранние эндосомы, которые транспортируют убиквитинированные продукты в протеасомы. Белки семейства RAB являются регуляторами процесса внутриклеточного транспорта и взаимодействия внутриклеточных компартментов, а также контролируют процесс секреции экзосом. RAB5 контролирует образование эндосом, RAB7 способствует слиянию эндосомы с лизосомой и деградации ее

содержимого, а RAB11, RAB27 и RAB35 координируют секрецию экзосом во внеклеточное пространство [15]. Для диссоциации и рециркуляции ЭКС-3 требуется взаимодействие этого комплекса со специфической аденозинтрифосфотазой, ассоциированной с вакуолярным белком сортировки 4 (VPS4), контролирующим процесс отделения везикул от мембраны при формировании MBT [11].

Процесс формирования экзосом по ЭКС-независимому механизму отличается от предыдущего на этапе формирования инвагинированной мембраны, который идет с участием сфингомиелиназы (nSmase), расщепляющей сфингомиелин до церамида и фосфохолина. Механизм образования экзосом по ЭКС-независимому пути до конца не изучен.

Формирование и высвобождение экзосом во внеклеточное пространство осуществляются благодаря согласованному взаимодействию ряда специфических белков.

В 2013 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие везикулярного транспорта – главной транспортной системы клетки, обеспечивающей образование и секрецию экзосом, – получили Р. Шекман, Дж. Ротман и Т. Зюдхоф [17]. Дж. Ротман подробно изучил и описал процесс образования и транспорта везикул, выделил ключевые компоненты, необходимые для их формирования и перемещения [18]. Среди белков везикулярного транспорта первым был идентифицирован NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) [19], затем SNAP (soluble NSF-attachment protein) [20]. В [21] Дж. Ротман и Р. Шекман установили, что белки NSF и SNAP соответствуют продуктам ранее идентифицированных Шекманом генов SEC17 и SEC18. Авторы выяснили, что механизм внутриклеточного транспорта универсален для всех эукариот и почти полностью совпадает у дрожжей и млекопитающих. Открытые Дж. Ротманом ключевые компоненты белкового комплекса отвечают за транспорт везикул внутри клетки. NSF – чувствительный к N-этилмалеимиду фактор – представляет собой белок, участвующий во внутриклеточном транспорте и слиянии везикул, таких как MBT, с мембранами-мишенями в клетках. NSF связывается с мембранным рецептором SNARE (soluble NSF attachment receptor) только при наличии адапторных SNAP-белков [22]. Роль SNAP-белков заключается в активации NSF и передаче энергии гидролиза АТФ к SNARE-комплексу [22]. SNARE – семейство белков, связанных с цитоплазматической мембраной. Их комплексы опосредуют слияние различных мембранных органелл клетки с плазматической мембраной или другими органеллами, например лизосомами [23]. Белки SNARE-комплекса делятся на две

функциональные категории: везикулярные белки (v-SNARE) и белки принимающей органеллы или плазматической мембраны (t-SNARE, pSNARE) [23]. Формируемый ими транс-SNARE-комплекс включает в себя синтаксин-1 и SNAP-25, находящиеся на клеточной мембране, и синаптобrevин на поверхности доставляемой пресинаптической везикулы. SNARE-комплекс формируется за счет образования четырехспиральной структуры между синаптобrevином, синтаксином и SNAP-25. Синаптотагмин служит кальциевым сенсором и внутренним регулятором комплексообразования. В разных типах клеток различные комплексы SNARE участвуют в слиянии MBT с плазматической мембраной [23]. Слияние мембраны MBT с клеточной мембраной приводит к секреции экзосом во внеклеточное пространство, а слияние с лизосомой приводит к деградации содержимого везикул. Различные комплексы SNARE могут способствовать слиянию разных субпопуляций MBT внутри одного типа клеток, что позволяет секретировать несколько субпопуляций экзосом одной клеткой. В [24] изучен механизм передачи сигнала в синапсах между нейронами. Работы [17, 24] посвящены исследованию процесса выброса нейромедиатора в синаптическую щель. Зюдхов показал, что молекулы нейромедиатора находятся в везикулах и выделяются в пространство между мембранами двух нейронов [25] и что этот процесс зависит от колебаний концентрации внутриклеточного кальция [25–28]. Т. Зюдхоф открыл белок синаптотагмин-1, являющийся кальцийсвязывающим белком, взаимодействующим с фосфолипидами мембран и белками SNARE в ответ на кальциевую стимуляцию. Таким образом, работы [29–31] позволили понять, как функционирует транспортная система клетки с участием везикул, обеспечивающая секрецию экзосом, регуляцию их образования и разрушения.

2. ДРУГИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

В зависимости от происхождения и размера внеклеточных везикул, помимо экзосом, выделяют микровезикулы и апоптотические тельца [10, 11, 16]. В их состав также входят белки и функционально активные рибонуклеиновые кислоты (мРНК, микроРНК, рРНК, тРНК и др.) [32, 33].

Микровезикулы (эктосомы) – это мембранные пузырьки, секретлируемые клетками, нагруженные специфическим набором липидов, белков и нуклеиновых кислот. Размер микровезикул колеблется от 50 до 1000 нм. Главным отличием микровезикул от экзосом является их сборка на внешней мембране клетки. Биогенез и секреция микровезикул проходят по пути, характерному для определенного типа клеток. На первом этапе происходит перераспределение фосфолипидов

плазматической мембраны, в том числе экспонирование фосфатидилсерина на ее наружной поверхности. При этом образуются домены, способствующие отпочковыванию части цитоплазмы, окруженной мембраной клетки. На завершающей стадии формирования микровезикул происходит сближение точек перегиба мембраны и отделение зрелой микровезикулы во внеклеточное пространство [10]. Некоторые компоненты ЭКС-комплекса, необходимые для формирования интралюминальных везикул, вовлечены также в процессы сборки и секреции микровезикул. Например, субъединица комплекса ЭКС-1 участвует в процессе отпочковывания и сортировки содержимого в микровезикулы [10].

Апоптотические тельца в отличие от экзосом и микровезикул являются продуктами гибели клеток по механизму апоптоза, а не продуктами секреции [13]. Они окружены мембраной и содержат фрагменты хроматина и органелл. Размер апоптотических телец составляет от 50 до 5000 нм. В отличие от экзосом и микровезикул в состав апоптотических телец входят участки цитоплазмы, прилегавшие к мембране апоптотической клетки. После завершения апоптоза происходит захват и лизис апоптотических телец фагоцитами или соседними клетками. Апоптотические тельца могут содержать ДНК и РНК [34] и рассматриваются как источник трофических веществ для соседних клеток.

3. СОСТАВ И ФУНКЦИИ ЭКЗОСОМ

Известно, что экзосомы высвобождаются большинством клеток в течение всей жизни [35]. Они могут участвовать в презентации антигенов, ангиогенезе, воспалении [8, 36]. Размер, состав и функции экзосом значительно различаются для разных типов клеток [37]. Экзосомы окружены фосфолипидным бислоем. Минимальный размер экзосом составляет 30–40 нм, максимальный – 100 нм, плотность от 1.13 до 1.19 г/см³ [8, 38].

Белковый состав экзосом отражает белковый состав мембраны и цитоплазмы донорской клетки и формируется, начиная с ранней эндосомы. Экзосомы содержат цитоплазматические и мембранные белки. От ранних эндосом экзосомы получают ряд мембранных белков, таких как белки главного комплекса гистосовместимости I и II. Все экзосомы несут на своей поверхности аннексины, белки, регулирующие процессы слияния их мембран с мембраной клетки-адресата, гуанозинтрифосфат (ГТФ) семейства RAB, молекулы адгезии и рецепторы, белки из семейства тетраспанинов CD9, CD63, CD81 и CD82, белки Alix, белки ЭКС [4, 11]. Белки CD9, CD63 и CD81 чаще всего используют для идентификации экзосом. Такие белки, как TSG101 (tumour susceptibility

gene 101), клатрин и Alix, необходимы для транспорта и биогенеза экзосом.

На мембране экзосом широко представлены различные гликопротеины, в частности лектины. С помощью протеомного анализа экзосом, выделенных из плазмы крови, было обнаружено девять основных экзосомальных лектинов, в том числе COLEC10, фиколин-1, -2 и -3, маннозасвязывающий лектин сериновых протеаз-1 и -2 [39].

Мембраны экзосом содержат сфингомиелин, холестерин и гликосфинголипиды [40]. Высокое содержание в экзосомах сфинголипидов и холестерина обеспечивает структурную жесткость мембраны за счет более плотной упаковки липидов, что способствует ее большей стабильности.

Внутренними компонентами всех экзосом являются белки теплового шока: HSP60, HSP70, HSP90 [11]. Экзосомы, как было сказано ранее, содержат мРНК, длинные некодирующие РНК, микроРНК, рРНК, тРНК. Содержание тех или иных видов РНК варьирует в зависимости от источников получения экзосом. Важно отметить, что экзосомами транспортируется и микроРНК, которая может влиять на экспрессию генов в клетках-мишенях.

Кроме того, экзосомы переносят целый ряд медиаторов, в том числе цитокинов. Чаще всего в экзосомах обнаруживают фактор некроза опухоли- α [41] и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [42].

При выборе маркеров для идентификации экзосом следует учитывать условия их выделения, поскольку такие факторы, как гипоксия, низкие значения рН культуральной среды (КС) и ряд других, влияют на качественный состав экзосом [11].

Согласно данным ISEV (the International Society for Extracellular Vesicles) 2018 г., среди 100 наиболее часто встречающихся в экзосомах молекул (вне зависимости от источника их происхождения) фигурируют белки, участвующие в передаче сигналов, такие как тетраспанины (CD9, CD63, CD81), интегрины (ITB1, ITA6), факторы обмена нуклеотидов и ГТФ-связывающие белки, адапторные белки и аннексины-2, -5, -6 и -11. В то же время в базе данных ExoCarta (www.exocarta.org/) среди 100 наиболее часто встречающихся в экзосомах молекул оказывается достаточное количество и неспецифических белков, таких как актин и альфа-2-макроглобулин [9, 12].

4. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ ЭКЗОСОМ

Экзосомы выделяют из биологических жидкостей: плазмы, сыворотки, мочи, спинномозговой жидкости и грудного молока [43]. Выбор метода получения экзосом зависит от объема исследуемой жидкости и целей исследования [44]. Про-

анализируем сведения о способах получения экзосом из КС культивируемых клеток. Отметим, что они принципиально не отличаются от методов выделения этих везикул из других источников.

Основными методами выделения внеклеточных везикул, таких как экзосомы и микровезикулы, являются дифференциальное центрифугирование и ультрацентрифугирование [8, 44–47]. Для получения экзосом из КС ее собирают и проводят последовательное центрифугирование при 2000 и 10000 г для удаления из КС клеточного дебриса и погибших клеток. Полученную фракцию концентрируют с помощью ультрафильтрации с использованием центрифужных концентраторов, таких как Amicon Ultra-15 100 kDa [48]. Отметим, что для культивирования большинства клеточных линий используют фетальную бычью сыворотку, присутствие которой при выделении экзосом может давать примесь экзосом сыворотки. Для устранения такого загрязнения сыворотку следует предварительно подвергнуть ультрацентрифугированию. Для получения экзосом из КС клетки культивируют до достижения монослоя, обычно в течение 72 ч, аликвоты КС хранят при +4°C [44].

Метод ультрацентрифугирования как самостоятельный способ, так и в сочетании с другими подходами – фильтрацией, хроматографией, преципитацией с помощью антител или положительно заряженных полимеров и других реагентов – длительный, но наиболее эффективный способ получения чистых препаратов.

Выделение экзосом с помощью специальных наборов ExoQuick™ и EXO-Prep основано на осаждении микровезикул из раствора на полимер [44]. Преимуществами химического осаждения экзосом является простота процедуры, возможность использования малых объемов проб, большой выход экзосом. К недостаткам относятся низкая чистота полученных препаратов экзосом из-за загрязнения белками, которые осаждаются вместе с ними, и трудность растворения осадка.

В [46, 47] исследованы такие методы выделения экзосом, как дифференциальное центрифугирование, последовательное ультрацентрифугирование в “подушку” сахарозы и иммунопреципитация [44]. Методика выделения экзосом с использованием “подушки” сахарозы была разработана в [49–51]. В соответствии с этим методом суспензию везикул наносят на “подушку” сахарозы и центрифугируют при 110000 г в течение 2 ч [44], либо при 100000 г в течение 70 мин [49]. Суть этой методики заключается в том, что экзосомы, обладая меньшей плотностью, оказываются распределены в растворе сахарозы, в то время как более плотные агрегаты белков и нуклеиновых кислот осаждаются на дно пробирки. Далее большую часть раствора сахарозы собирают и

осуществляют промывание и концентрирование содержащихся в ней экзосом путем ультрацентрифугирования в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) [50].

Получение фракции экзосом, кроме того, возможно с помощью седиментации лектиновых агрегатов [44, 47, 52]. Одним из свойств лектинов как растительного, так и животного происхождения является способность с высокой специфичностью и относительно низкой аффинностью связывать различные углеводные фрагменты [47]. На поверхности экзосом присутствуют манноза, полилактозамин, α -2,6-сиаловая кислота и сложные N-концевые гликаны, с которыми связываются лектины. При выделении экзосом с помощью седиментации лектиновых агрегатов частично очищенную суспензию экзосом инкубируют с конконавалином А, а затем лектиновые агрегаты осаждают с помощью центрифугирования при 15000 г в течение 30 мин [46, 52], либо при 20000 г в течение 60 мин [47]. Их дезагрегацию проводят в избытке моносахаров – в 40%-ном растворе глюкозы в ФСБ в течение 4 ч. Для удаления остатков крупных лектиновых агрегатов полученную суспензию фильтруют через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Следующим этапом является ультрафильтрация с помощью Amicon-Ultra 100 kDa, промывание в ФСБ для очистки выделенных экзосом от конконавалина А и их концентрирование в растворе ФСБ [48]. Хранят препараты экзосом при –80°C [44, 46–48, 52].

В [39] разработан быстрый и эффективный способ выделения экзосом из КС с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ). Преципитация с использованием ПЭГ дает больший количественный выход экзосом и позволяет лучше сохранить их структуру [53]. ПЭГ в водном растворе образует агрегаты с экзосомами, которые легко осаждаются при низкоскоростном центрифугировании. Размер и морфологию выделенных экзосом определяли с использованием системы Nanoparticle tracking analysis. Белки-маркеры экзосом идентифицировали с помощью вестерн-блоттинга (CD81 и Tsg101) и проточной цитометрии (CD63). Показано, что полученные этим методом препараты содержат высокий уровень таких маркеров экзосом, как Tsg101, CD81 и CD63. Таким образом, данный метод позволяет получать высокоочищенные препараты экзосом.

В 2014 г. ISEV впервые были обобщены рекомендации для проведения исследований, целью которых является получение и характеристика внеклеточных микровезикул, в том числе экзосом [54]. В этой публикации помимо других указаний отмечено, что при выделении экзосом из КС необходимо избегать разрушения клеток, чтобы предотвратить загрязнение препаратов эндосомами, эктосомами и апоптотическими тельцами.

При характеристике экзосом в препаратах рекомендуется анализировать присутствие не только трансмембранных, но и цитозольных белков. Было отмечено также, что среди методов получения высокоочищенных препаратов экзосом отсутствует “золотой стандарт” [48, 54], что указывает на необходимость комплексного подхода к проблеме получения экзосом и дальнейшего совершенствования методов в данной области. В публикациях 2017 и 2018 г. ISEV продолжило анализировать успехи и обновлять рекомендации, подчеркивая актуальность вопросов стандартизации препаратов экзосом, исходя из близких перспектив клинического использования этих везикул [55, 56].

Условия хранения влияют на количество экзосом в полученных препаратах [57, 58]. ФСБ – стандартный раствор для ресуспендирования, хранения и замораживания экзосом [5, 45, 47, 52, 57]. Согласно данным [45, 47, 52, 57] экзосомы хранят при -80°C до 1 г., избегая оттаивания и повторного замораживания препаратов. Влияние условий хранения препаратов микровезикул, полученных из КС мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика человека, было изучено в [58, 59]. Было показано, что оптимальными условиями хранения препаратов микровезикул являются лиофилизация КС и добавление диметилсульфоксида в более низкой концентрации, чем при замораживании клеток. В [58] показано, что при повторном замораживании и оттаивании препаратов микровезикулы полностью разрушались.

5. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗОСОМ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ

5.1. Онкологические заболевания

Опухолевые клетки секретируют экзосомы, которые способны оказывать значительное влияние на рост и развитие злокачественных образований, их метастазирование, патологический ангиогенез, химиорезистентность и ускользание опухолевых клеток от иммунного надзора [60]. Фракции экзосом, полученные из плазмы крови онкологических пациентов, обогащены различными иммуносупрессивными молекулами, такими как FasL, PD-L1, TRAIL, и ингибирующими иммунный ответ цитокинами IL-10 и TGF- β 1, а также PGE2 [41]. В отличие от экзосом, полученных из нормальных клеток, опухоли человека продуцируют экзосомы, которые вызывают апоптоз активированных CD8⁺ Т-клеток [40]. Однако помимо иммуносупрессивного действия экзосомы опухолей содержат опухолевые антигены, различные костимулирующие белки и молекулы главного комплекса гистосовместимости, которые обеспечивают их способность стимулировать

противоопухолевый иммунный ответ [41]. Показано, что помимо иммуномодуляции опухолевые экзосомы опосредуют различные проонкогенные эффекты: способствуют росту опухоли, ремоделированию внеклеточного матрикса, стимулируют ангиогенез и пролиферацию опухолевых клеток [41, 61] и отличаются от экзосом, секретлируемых нормальными клетками [62, 63]. С использованием современных протеомных, генетических и функциональных методов показано, что экзосомы, полученные из опухолевых клеток или плазмы крови онкологических пациентов, содержат молекулы и факторы, способные передавать информацию от родительской опухолевой клетки к другим клеткам внутри и за пределами микроокружения опухоли [62]. Так, экзосомы глиобластомы несут множество биомолекул, таких как: VEGF, фактор роста фибробластов (FGF), IL-6, IL-8, эпидермальный фактор роста (EGF) и его рецепторы EGFR1 и EGFR2, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), которые усиливают пролиферацию клеток глиомы через сигнальные пути MAPK, PI3K/Akt и JAK/STAT [64]. Полученные из клеток глиомы *in vitro* экзосомы могут быть полезны в качестве источника потенциальных опухолевых биомаркеров, необходимых для разработки новых методов диагностики опухолей этого типа.

Знания о свойствах экзосом, полученных из опухолевых клеток, их биологическом составе и физиологических функциях являются основой для разработки новых способов неинвазивной диагностики опухолей [65]. Диагностические тесты с использованием экзосом могли бы способствовать выявлению опухолей на ранней стадии и наблюдению за прогрессированием разных типов рака [33, 41, 48, 60, 62]. В настоящее время такие подходы находятся в стадии разработки.

5.2. Сердечно-сосудистые заболевания

Экзосомы могут содержать маркеры сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе острого инфаркта миокарда (ОИМ) и атеросклероза [66]. Анализ молекулярных механизмов, с помощью которых ишемизированный миокард инициирует восстановление и ремоделирование, показал, что ключевую роль в межклеточных взаимодействиях играют факторы, секретлируемые кардиомиоцитами и фибробластами в составе экзосом. В частности, при ишемии или фиброзе обнаружен перенос в экзосомах микроРНК – малых некодирующих молекул РНК, секретлируемых фибробластами сердца, которые воздействуют на кардиомиоциты, что приводит к их гипертрофии. Обнаружено, что после ОИМ секреция экзосом кардиомиоцитами происходит с новым профилем микроРНК, кото-

рый может перепрограммировать фибробласты сердца и привести к гипертрофии миокарда [67]. У пациентов после перенесенного ОИМ в плазме крови было обнаружено более высокое содержание микроРНК-208а, которая является новым маркером ОИМ, обладающим более высокой специфичностью и чувствительностью, чем стандартный биомаркер этого заболевания, такой как сердечный тропонин I [68]. Еще один потенциальный биомаркер для диагностики ОИМ, выявленный в плазме крови пациентов с ОИМ, – повышенный относительно здоровых добровольцев уровень микроРНК-499 [69]. При анализе экзосом, полученных из клеток-предшественников кардиомиоцитов, в [70] обнаружены 11 типов микроРНК, уровень которых значительно возрос при гипоксии.

5.3. Нейродегенеративные заболевания

Экзосомы можно использовать для диагностики нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона (БП) и болезнь Альцгеймера [7]. Показано, что наличие в экзосомах, полученных из кондиционированной среды линии клеток SH-SY5Y, альфа-синуклеина может свидетельствовать о БП [7], а присутствие бета-амилоида и микроРНК – о болезни Альцгеймера [71]. Для проведения диагностических исследований экзосомы могут быть выделены из спинномозговой жидкости, крови и мочи пациентов. Экзосомы, выделенные из спинномозговой жидкости, обогащены белками, которые обнаруживаются в клетках мозга, например, маркерами микроглии (CD11b и CD45), нейрон-специфической енолазой и мембранным белком 2, ассоциированным с везикулами (vesicle associated membrane protein 2), прионным белком PRNP, накопление которого приводит к дегенерации нейронов, апоптопротеином E, ассоциированным с нейродегенеративными заболеваниями [7].

5.4. Использование экзосом стволовых клеток для стимуляции процессов регенерации

В настоящее время формируется новое направление в лечении различных повреждений, в том числе повреждений мозга, с использованием стволовых клеток (СК). Возможны два механизма действия трансплантированных СК. Первый связан с тем, что СК могут дифференцироваться в клетки поврежденного органа и ускорять регенерацию благодаря появлению новых полноценных клеток. Второй механизм связывают с действием тех регуляторных факторов, которые секретируют СК. Последний механизм активно изучается и, как будет показано ниже, играет важную роль в стимуляции процессов регенерации. Известно, что комплекс БАВ, секретируемых СК, включает

в себя факторы роста, цитокины, нейротрофины, хемокины, метаболиты и биоактивные липиды [72–75]. Несмотря на обнаруженную эффективность клеточной терапии с использованием СК, препятствием к ее активному внедрению является возможность злокачественной трансформации трансплантированных клеток [76, 77].

Для стимуляции процессов регенерации актуально исследование потенциала продуктов мезенхимных стволовых клеток (МСК) [72, 74, 78] и нейральных стволовых клеток (НСК) [73, 79, 80].

МСК впервые были получены из костного мозга (МСК-КМ) в [81, 82]. МСК обнаружены практически во всех тканях: пульпе зуба, плаценте, жировой ткани (МСК-ЖТ), пуповинной крови [72]. МСК секретируют различные паракринные факторы, которые способствуют выживанию и пролиферации окружающих клеток и тем самым восстановлению поврежденной ткани [74, 78]. Совокупность всех биологически активных веществ МСК, в том числе экзосом, получила название секретома. Кондиционированная среда, в которой культивируют клетки, часто выступает в качестве объекта исследования. При этом среда, кондиционированная продуктами жизнедеятельности МСК разных типов, обладает различными спектрами БАВ.

Показано, что КС, в которой культивировали МСК-ЖТ, оказывает нейропротекторное действие на крысиной модели ишемического повреждения головного мозга. В экспериментах *in vivo* КС МСК-ЖТ, введенная через яремную вену новорожденным крысам, защищала нейроны от гибели, вызываемой гипоксией, снижая уровень апоптоза этих клеток [83].

Получены данные об эффективности терапевтического применения факторов КС МСК для лечения БП [34]. В экспериментах *in vivo* для моделирования БП крысам в медиальный пучок переднего мозга вводили 6-гидроксидофамин. Через три недели в черную субстанцию и стриатум крыс вводили КС МСК. Контрольные животные получали КС. В группе животных, которым вводили КС, авторы обнаружили увеличение количества дофаминергических нейронов (тирозингидроксилаза-положительных клеток) и наблюдали восстановление двигательной активности у крыс. При протеомной характеристике КС МСК в ней обнаружено присутствие важных нейротрофических факторов: глицин-производного нексина, галектина-1, VEGF, нейротрофического фактора головного мозга, интерлейкина-6 и глиального нейротрофического фактора [34]. Введение КС МСК человека приводило к повышению выживаемости дофаминергических нейронов в 5 раз по сравнению с группой контроля. Исполь-

зование БАВ, секретируемых МСК, может стать важным инструментом для лечения БП благодаря повышению выживаемости нейронов и сопутствующему восстановлению моторных функций.

В экспериментах *in vitro* [84] показано, что КС МСК-ЖТ оказывает защитное действие после облучения НСК и при их повреждении при действии гамма-излучения и этопозида. Эффективность защитного действия зависела от дозы облучения и была высокой только при низких дозах — до 2 Гр включительно. Эти результаты во многом объясняют описанную в литературе способность МСК оказывать защитное действие при радиационных повреждениях мозга [85–90] и впервые демонстрируют возможность секретируемых МСК-факторов повышать выживаемость НСК при действии облучения [84].

Другим потенциальным источником БАВ, оказывающих нейропротекторное действие и ускоряющих регенерацию при различных поражениях ЦНС, являются НСК.

НСК — мультипотентные клетки с неограниченной способностью к самообновлению — обнаружены во взрослом и развивающемся мозге в зоне зубчатой извилины гиппокампа и в субвентрикулярной зоне (СВЗ) в переднем мозге [9, 91, 92]. Нейрогенез в гиппокампе играет важную роль в поддержании пластичности гиппокампа и сохранении гиппокампазависимого обучения и памяти [9]. В гиппокампе в субгранулярной зоне зубчатой извилины из НСК образуются нейральные клетки-предшественники, которые пролиферируют, мигрируют и дифференцируются в нейроны и глию гранулярного слоя. Из этих зон мозга получают культуры НСК, которые содержат собственно НСК и быстро пролиферирующие ранние нейральные клетки-предшественники [92–95]. НСК также могут быть получены из эмбриональных и из индуцированных плюрипотентных СК [96]. НСК обладают терапевтическим действием, которое показано в нескольких исследованиях с введением НСК в мозг экспериментальных животных, пораженный травмой или облучением [73, 97, 98]. Положительные эффекты после трансплантации НСК могут быть вызваны как ускорением регенерации, так и ослаблением нейровоспаления. Авторы связывают терапевтический эффект трансплантации НСК с трофическими функциями введенных клеток [98].

Таким образом, накоплены убедительные доказательства терапевтической эффективности веществ, секретируемых СК. Поэтому актуальной проблемой является изучение возможности создания новых методов лечения с использованием продуктов СК. Важно подчеркнуть, что помимо растворимых БАВ терапевтическим потенциалом

обладают секретируемые СК внеклеточные везикулы, в том числе экзосомы [9, 38, 72]. Экзосомы, как указано выше, содержат специфичный набор белков, гликопротеинов, липидов, нуклеиновых кислот и других молекул и выступают таким образом в качестве носителя информации для клеток-мишеней.

Экзосомы, высвобождаемые МСК, обогащенные микроРНК, обеспечивают эндогенный ангиогенез и нейрогенез после повреждения периферических нервов у крыс, а также после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) [99–101]. Крысы линии Wistar подвергали ЧМТ с последующей инъекцией через 24 ч в хвостовую вену экзосом, полученных из КС МСК, или равного объема физиологического раствора с фосфатным буфером. Для оценки восстановления когнитивных и сенсомоторных функций проводили модифицированный водный лабиринт Морриса, оценка неврологической степени тяжести и тест проваливания лап. Животных умерщвляли через 35 дней после ЧМТ. Гистопатологический и иммуногистохимический анализы были выполнены для измерения объема поражения, оценки ремоделирования нейрососудов (ангиогенез и нейрогенез) и нейровоспаления. Лечение экзосомами значительно увеличивало количество новых эндотелиальных клеток по периферии зоны поражения и в зубчатой извилине, а также достоверно увеличивало количество незрелых и зрелых нейронов в зубчатой извилине и способствовало уменьшению нейровоспаления [101]. По сравнению с контрольными группами, получавшими физиологический раствор, у крыс, получавших экзосомы, через 34–35 дней после ЧМТ показано значительное улучшение пространственного обучения, проведенного с помощью теста в водном лабиринте Морриса, и сенсомоторного функционального восстановления, т.е. снижение неврологического дефицита.

Показано, что МСК-КМ человека секретируют экзосомы, способные восстанавливать нарушенные неврологические функции при фокальной церебральной ишемии у мышей благодаря усилению постишемического ангио- и нейрогенеза [102]. Экзосомы, выделенные из КС МСК-КМ, собирали через 48 ч после достижения клетками монослоя. Препараты экзосом до использования хранили при -80°C . Авторы установили, что внутривенное введение экзосом (2×10^6 в 250 мкл физиологического раствора), выделенных из МСК-КМ, на 1-е, 3-и и 5-е сутки после ишемии было также эффективно, как и введение самих МСК-КМ, по данным, полученным при анализе постишемических нарушений координации движений у мышей [102]. Экзосомы, по-

лученные из МСК-КМ, улучшали постишемические нарушения так же, как и МСК-КМ, и индуцировали длительную защиту, восстановление неврологических функций и оказывали нейропротекторное действие, повышая выживаемость нейронов в ишемизированном стриатуме через 4 нед после инсульта, что выражалось в увеличении плотности нейронов NeuN⁺ и усилении ангио- и нейрогенеза. Авторы показали, что МСК-КМ стимулируют процессы регенерации по паракринному механизму.

Данные о биологически значимых эффектах экзосом могут быть использованы для разработки методов лечения после перенесенного ишемического инсульта. В [103] показана возможность использования экзосом, полученных из НСК человека, в экспериментах *in vivo* для стимуляции восстановления мозга на мышинной модели инсульта. Экзосомы получали из КС НСК при достижении культурой 80%-ной конфлюэнтности. Свежевыделенные экзосомы вводили в 200 мкл в ФСБ из расчета $2.7 \times 10^{11} \pm 10\%$ везикул/кг в течение первых 28 ч после инсульта. При трехкратном введении экзосом, полученных из НСК, в хвостовую вену наблюдали уменьшение зоны инфаркта и увеличение числа метаболически-активных клеток в области пенумбры, что сопровождалось улучшением результатов функциональных тестов, таких как “ходьба по бревну”, “висячий провод”, “подвешивание за хвост” [103]. Различия в объеме пораженных участков мозга после лечения экзосомами НСК были подтверждены данными магнитно-резонансной томографии (МРТ). Введение экзосом из НСК мышам уже через 2 ч после тромбоэмболического инсульта не только улучшало неврологические показатели, но и значительно сокращало объем поражения, а также приводило к подавлению системных воспалительных процессов. Выживаемость мышей в группе, получавшей экзосомы НСК, была выше, чем в контрольной. Отметим, что в сравнении с экзосомами из МСК, введенными по аналогичной схеме, экзосомы НСК продемонстрировали большую эффективность [103]. Исследование активности микроглии в условиях эксперимента показало, что введение экзосом НСК способствовало переходу микроглии в М2-фенотип, который, как известно, способствует снижению хронического нейровоспаления [103].

В [104] оценивали терапевтический потенциал экзосом, полученных из культуры НСК человека линии Н9, для устранения последствий острого инсульта на модели ишемического инсульта у свиней. Экзосомы ($2.7 \times 10^{10} \pm 10\%$ везикул/кг) вводили внутривенно через 2, 14 и 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА).

Оценку терапевтического действия экзосом НСК проводили с помощью МРТ через 1 и 84 дня после ОСМА. Функциональное восстановление исследовали с помощью поведенческих тестов и анализа походки животных. При лечении поврежденных областей мозга экзосомами НСК обнаружено отсутствие внутричерепного кровоизлияния (0 из 7) по сравнению с контрольной группой (7 из 8) при данном типе повреждения. Через одни сутки после ОСМА у животных, получавших экзосомы НСК, наблюдались значительное уменьшение объема поражения головного мозга и уменьшение отека мозга по сравнению с контрольной группой. Экзосомы НСК способствовали сохранению целостности белого вещества головного мозга через 84 дня после ОСМА. В группе животных, получавших экзосомы НСК, наблюдались улучшение исследовательского поведения и более быстрое восстановление параметров пространственно-временной ориентации. Авторы [104] пришли к выводу о том, что эффективное лечение ишемического инсульта на экспериментальных моделях как у грызунов, так и у свиней, свидетельствует о том, что экзосомы НСК могут быть использованы для устранения последствий инсульта у человека.

Есть несколько преимуществ использования экзосом, полученных из НСК, по сравнению с введением самих клеток [9]. Во-первых, большое количество экзосом может быть доставлено в головной мозг путем интраназального введения. Во-вторых, в отличие от клеточной терапии вероятность развития опухоли после введения экзосом отсутствует. В-третьих, снижен риск развития тромбоза (обструкции мелких кровеносных сосудов) при внутривенном или интраназальном введении экзосом, поскольку экзосомы – это везикулы очень маленького размера, способные преодолевать гематоэнцефалический, а также эндотелиальный барьер путем трансцитоза. Таким образом, экзосомы, обеспечивающие бесклеточную терапию, могут помочь повысить эффективность лечения и улучшить качество жизни пациентов без побочных эффектов, возможных при клеточной терапии.

Исучено использование интраназального способа введения экзосом, полученных из МСК-КМ человека, при эпилептическом статусе у мышей, который вызывали введением пилокарпина [105]. Показано, что экзосомы уже через 6 ч после введения достигали гиппокампа. У мышей, получавших экзосомы, были обнаружены меньшая потеря глутаматергических и ГАМКергических нейронов и снижение нейровоспаления в гиппокампе. Нейропротекторные и противовоспалительные эффекты экзосом сочетались с длительным сохранением

ем нормального нейрогенеза в гиппокампе и когнитивных функций [105].

Представленные данные свидетельствуют о перспективности создания терапевтических препаратов для стимуляции процессов регенерации на основе экзосом СК, в том числе для лечения поражений ЦНС.

6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОСОМ В КАЧЕСТВЕ “КОНТЕЙНЕРОВ” ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

В настоящее время в центре внимания многих исследователей находятся разработка и проверка систем доставки лекарств на основе экзосом. Особые перспективы контролируемой доставки лекарств с использованием этих везикул заключаются в том, что полученные из клеток экзосомы обеспечивают возможность преодоления биологических барьеров и доставки встроенных генов или лекарственных средств в целевую ткань, что является серьезной проблемой для синтетических носителей.

Лекарственные формы на основе экзосом могут применяться при широком спектре заболеваний, таких как онкологические, инфекционные, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные [106]. Для загрузки терапевтических препаратов используют три основных подхода: загрузка экзосом, выделенных из клеток *ex vitro*; загрузка клеток лекарством, которое затем включается в продуцируемые ими экзосомы; трансфекция или инфицирование родительских клеток ДНК, кодирующей терапевтически активные соединения, которые затем включаются в экзосомы [106]. Каждый подход имеет свои преимущества и ограничения, которые определяются типом терапевтического препарата, типом заболевания и условиями, необходимыми для стабилизации используемого действующего вещества в экзосоме.

Наиболее часто для загрузки малых липофильных молекул используют совместную инкубацию с экзосомами или экзосомоподобными везикулами. Так, куркумин, доксорубин и паклитаксел, а также родамин-123 могут быть загружены в экзосомы путем инкубации с везикулами при комнатной температуре. Показано использование экзосом для доставки в опухоль куркумина, который наряду с противовоспалительными, противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами обладает низкой биодоступностью из-за высокой гидрофобности и нестабилен в растворах, что является одним из основных барьеров для клинического использования куркумина в лечении рака и других заболеваний, связанных с воспалением.

В [107] использованы экзосомы для доставки куркумина мышам с септическим шоком, индуцированным введением липополисахарида (ЛПС). Препарат был включен в экзосомы путем его смешивания с везикулами, полученными из опухолевой линии клеток мыши EL-4. Показано, что экзосомы повышают растворимость и стабильность куркумина *in vitro*, а также его биодоступность *in vivo* [107]. Экзосомальный куркумин обладал высокой противовоспалительной активностью и был способен накапливаться в клетках-мишенях в значительно более высоких концентрациях, чем свободный куркумин. Для того чтобы определить активность экзосом в качестве средства доставки и их способность оказывать терапевтические эффекты, было проведено сравнение терапевтической эффективности экзосомального и липосомального куркумина *in vivo* у мышей, которым внутривенно вводили ЛПС. Противовоспалительную активность экзосомального куркумина оценивали по уровню IL-6 и TNF- α в сыворотке крови через 16 ч после введения [107]. Уровень обоих цитокинов был значительно ниже в группе мышей, получавших экзосомальный куркумин, по сравнению с контролем. Смертность мышей в группе, получавшей экзосомальный куркумин, была достоверно ниже, чем в группе мышей, получавших липосомальный куркумин в эквивалентной концентрации [107]. Таким образом, исследование показало способность экзосом переносить гидрофобные препараты, такие как куркумин, усиливая его противовоспалительное действие [107].

Экзосомы способны осуществлять доставку лекарств через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [4]. В [108] исследовано действие противоопухолевых препаратов, включенных в экзосомы, выделенные из клеток различных линий, на модели первичной опухоли мозга у эмбрионов рыбок Данио-рерио. Полученные экзосомы инкубировали с родамином-123 и паклитакселом или доксорубицином. С помощью метода ксенотрансплантации клетки нейрональной глиобластомы-астроцитомы U-87 MG вводили в желудочек мозга эмбрионам рыбок Данио-рерио. Через двое суток эмбрионы с ксенотрансплантатами рака мозга анестезировали и проводили инъекцию 2.3×10^{-3} мкл 0.2 мг/мл доксорубина в ФСБ, 0.2 мг/мл доксорубина с 200 мкг/л по общему белку экзосом или только ФСБ. Инъекции были сделаны в общую кардинальную вену. Ткань головного мозга анализировали на наличие флуоресценции родамина-123. В результате показано, что лекарственные вещества эффективно накапливались в опухоли и обеспечивали терапевтическую активность. Это, с одной стороны, свидетельствовало о способности экзосом доставлять

лекарства через ГЭБ, а с другой – о значительной терапевтической эффективности противоопухолевых препаратов при таком способе доставки по сравнению с внутривенным введением лекарств.

Были проведены исследования по доставке противоопухолевого препарата доксорубицина, включенного в экзосомы, на мышинной модели рака молочной железы как *in vitro*, так и *in vivo* [4, 6]. Экзосомы выделяли из КС незрелых дендритных клеток (ДК) мыши. В незрелые ДК была введена плазида pEGFP-C1-iRGD-Lamp2b, кодирующая гибридный белок, состоящий из лизосомассоциированного мембранного гликопротеина Lamp2b, который присутствует на мембранах экзосом, и пептида iRGD, являющегося лигандом αV интегрина – белка, широко представленного на поверхности многих опухолевых клеток. Таким образом, экзосомы, полученные из КС этих клеток, имели лиганд αV интегрина, связанный с белком Lamp2b. Очищенные экзосомы были загружены доксорубицином посредством электропорации с эффективностью инкапсуляции до 20%. Клетки рака молочной железы человека линии MDA-MB-231 (2.0×10^6 клеток в 50 мкл ФСБ в смеси с 50 мкл матригеля) вводили в область жировых подушечек молочных желез самкам мышей *pude* для индукции опухоли. iRGD-экзосомы продемонстрировали высокую эффективность связывания и проникновения в клетки рака молочной железы MDA-MB-231 *in vitro*, что было показано с помощью конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Для оценки накопления экзосом *in vivo* iRGD-экзосомы и контрольные экзосомы были мечены флуоресцентным красителем DiR. Успешную доставку экзосом в клетки контролировали по изменению уровня флуоресценции в участках опухоли с помощью системы *in vivo* имиджинга Maestro. Авторы показали преимущество iRGD-экзосом в способности доставлять доксорубицин в опухолевую ткань и ингибировать рост опухоли *in vivo* по сравнению с контрольными экзосомами, не имеющими специфических векторных молекул на своей поверхности. Полученные данные свидетельствуют о перспективах создания целевых препаратов на основе экзосом с высокой противоопухолевой активностью [6].

Другим способом загрузки экзосом действующим веществом является культивирование клеток в присутствии лекарственного препарата, который затем высвобождается в КС в составе экзосом. Показано, что экзосомы, полученные из КС клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 после инкубации клеток с такими противоопухолевыми препаратами, как паклитаксел, эпопозид, карбоплатин, иринотекан, эпирубицин

и митоксантрон, обладали высокой антипролиферативной активностью в отношении линии клеток рака поджелудочной железы человека и индуцировали HSP-специфические ответы NK-клеток [109]. Белки теплового шока могут увеличить иммуногенность опухоли и индуцировать ответы естественных клеток-киллеров. Экзосомы, полученные из клеток гепатоцеллюлярной карциномы при добавлении противоопухолевых препаратов, содержали больше белков HSP60, HSP70 и HSP90. Исследование показало, что цитотоксичность NK-клеток после обработки такими экзосомами повышалась в отношении клеток-мишеней K562 и HepG2 благодаря высвобождению гранзима В.

Как упоминалось ранее, экзосомы способны переносить РНК, в том числе микроРНК и миРНК, использование которых в качестве терапевтических агентов в настоящее время исследуется при целом ряде заболеваний, а также митохондриальную и геномную ДНК. РНК и ДНК недостаточно стабильны во внеклеточном пространстве. Поэтому экзосомы были предложены в качестве носителей для переноса нуклеиновых кислот. Так, многие исследователи подтвердили возможность использования экзосом для доставки определенных микроРНК в клетки-мишени и, как следствие, запуска в них РНК-интерференции [110].

Заместительная терапия микроРНК – это перспективная стратегия лечения злокачественных новообразований. Способы лечения, основанные на использовании микроРНК, могут быть эффективными, но их клиническое применение затруднено из-за отсутствия соответствующих систем доставки. В некоторых опухолях человека, имеющих эпителиальное происхождение (а это наиболее часто встречающиеся опухоли), присутствует повышенная экспрессия рецептора EGF, который может служить мишенью для доставки лекарств. EGF обладает митогенными и неоангиогенными свойствами, что не позволяет использовать его в качестве вектора для доставки лекарственных средств в опухоль. Для клинического применения необходим альтернативный лиганд. Пептид GE11 специфически связывается с EGFR, но его митогенная активность меньше, чем у EGF [111]. В [111] была исследована доставка микроРНК в опухоли с использованием GE11-позитивных экзосом. Экзосомы, выделенные из линии клеток почки эмбриона человека 293 (HEK293), были нагружены микроРНК let-7a, относящимися к опухолевым супрессорам, которые, как показано в [112], снижают экспрессию таких проонкогенных факторов, как HMGA2 и белки семейства RAS. Для создания GE11-пози-

тивных экзосом была использована КС клеток линии НЕК293, которые стабильно экспрессируют GE11 [111]. Клетки НЕК293, экспрессирующие GE11, трансфицировали синтетическим let-7a. Полученные из КС экзосомы нагружали флуоресцентной меткой XenoLight DiR и вводили в хвостовую вену (1 мкг очищенных экзосом) мышам линии RAG2^{-/-}, которым предварительно были привиты подкожно клетки опухоли молочной железы человека линии HCC70. Через 24 ч местоположение экзосом контролировали с использованием системы визуализации *in vivo* (IVIS). По оценкам исследователей накопление в опухолях GE11-положительных экзосом было в 3 раза выше, чем при использовании контрольных GE11-негативных экзосом [111]. Через четыре недели еженедельных инъекций исследовали развитие опухолей. GE11-позитивные экзосомы, содержащие let-7, ингибировали рост и развитие опухоли *in vivo*, однако не влияли на экспрессию белка HMGA2 и белков семейства RAS в ксенотрансплантатах опухолей, что указывает на присутствие других генов-мишеней в клетках HCC70 [111]. Авторы показали, что GE11-позитивные экзосомы являются многообещающим средством доставки лекарств в EGFR-экспрессирующие опухоли [111].

Экзосомы можно использовать и для доставки таких крупных молекул, как белки. Это может быть востребовано в лечении заболеваний, связанных с недостаточностью тех или иных ферментов. Так, у пациентов с БП обнаружены низкие уровни антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, пероксидаза и супероксиддисмутаза, в клетках базальных ядер и черной субстанции головного мозга, что ведет к развитию окислительного стресса, нейровоспаления и нейродегенерации в этих структурах [113, 114]. Одним из мощнейших компонентов антиоксидантных систем клетки является каталаза – единственная молекула, способная дезактивировать до 1 млн свободных радикалов в секунду. Доставка каталазы в пораженные участки ЦНС представляется перспективным средством в борьбе с БП при условии создания такой формы препарата, которая позволяла бы эффективно преодолевать ГЭБ. В исследовании [113] на мышинной модели БП было продемонстрировано проникновение экзосом, нагруженных каталазой, во все отделы мозга, в том числе в зоны поражения черной субстанции, как при внутривенном, так и при интраназальном введении, при этом интраназальный способ введения оказался более эффективным. Через 23 дня после повреждения у животных, получавших терапию экзосомами, содержащими каталазу, наблюдалось существенное снижение микроглиоза и астроцитоза наряду с трехкратным увеличением

числа дофаминергических нейронов в зоне поражения по сравнению с контрольной группой и с группой животных, получавших в качестве терапии чистую каталазу. В этом исследовании каталаза была включена в экзосомы с использованием нескольких методов: инкубация при комнатной температуре с 0.2%-ным сапонином или без него, циклы замораживания–оттаивания, обработка ультразвуком и процедура экструзии [113]. Анализ методом вестерн-блоттинга показал, что обработка ультразвуком и экструзия приводят к наиболее эффективному включению каталазы в экзосомы. С помощью флуоресцентной микроскопии показано накопление экзосом преимущественно в клетках эндотелия сосудов головного мозга, в нейронах и микроглии, что указывает на их способность проникать через ГЭБ и доставлять каталазу в ткани мозга. Инкапсуляция каталазы в экзосомы способствует сохранению ее ферментативной активности и снижению ее иммуногенности, что обуславливает преимущество экзосом по сравнению со свободной каталазой при БП.

Еще одним способом является выделение нагруженных лекарственным препаратом экзосом из генетически модифицированных клеток. Показано, что макрофаги, которые были трансфицированы *ex vivo* плазмидой, несущей терапевтические гены, например ген каталазы, способны передавать соответствующий генетический материал (ДНК и РНК) в нервные клетки посредством экзосом [106, 115]. Внутривенное введение таких макрофагов животным увеличивало уровень экспрессии каталазы в головном мозге, приводя к трехкратному уменьшению воспаления, выраженному нейропротекторному эффекту и улучшению двигательной функции на мышинной модели БП. Исследование показало, что трансфицированные макрофаги секретируют экзосомы, содержащие плазмидную ДНК и мРНК, активную каталазу и NF-κB – фактор транскрипции, участвующий в регуляции экспрессии данного гена. При этом тропизм макрофагов к очагам воспаления в ЦНС способствовал тому, что высвобождение экзосом, их последующий захват и увеличение синтеза каталазы в клетках-мишенях происходили именно в поврежденных участках мозга. Таким образом, генетически модифицированные макрофаги могут стать высокоэффективной системой для целевой доставки генов при лечении воспалительных и нейродегенеративных заболеваний.

Получению экзосом для снижения окислительного стресса при БП из генетически модифицированных клеток посвящено исследование [114]. В этой работе удалось добиться высокой эф-

фективности продукции экзосом клетками линий HEK293 и hMSC-TERT53 путем встраивания специального бустерного фрагмента в конструкцию плазмиды, включающего в себя гены STEAP3, SDC4 и NadB. STEAP3 участвует в экзосомном биогенезе, синдекан-4 (SDC4) поддерживает расщепление эндосомальных мембран с образованием MBT, фрагмент L-аспартатоксидазы NadB, возможно, усиливает клеточный метаболизм в качестве модулятора цикла лимонной кислоты. Комбинированная экспрессия этих генов способствуют тому, что трансфицированные клетки увеличивают продукцию экзосом в 15–40 раз в зависимости от своего состояния [114]. В качестве терапевтического агента использовали мРНК-каталазы. Чтобы увеличить включение целевой мРНК в экзосомы, авторы модифицировали один из универсальных маркеров экзосом – CD63 – конъюгировав его на C-конце с белком L7Ae, который входит в состав рибосом у архей и способен связывать РНК, содержащие последовательность C/D_{бок}. Для того чтобы повысить высвобождение действующего вещества в клетках мозга, в ходе трансфекции в клетки были также внедрены гены коннексина 43 (Cx43) – белка, формирующего транспортные каналы в мембранах экзосом и RVG-Lamp2b, который увеличивал накопление экзосом в мозге путем связывания с никотиновым ацетилхолиновым рецептором нейронов. Показано, что полученные экзосомы, несущие мРНК-каталазы, способны предотвратить гибель нейрональных клеток, вызванную 6-гидроксидофамином (6-OHDA) *in vitro* и *in vivo* при подкожной имплантации трансфицированных клеток животным с индуцированной БП. Уменьшение нейровоспаления было подтверждено снижением уровня экспрессии в мозге таких маркеров, как GFAP, специфического микроглиального маркера Iba1, TNF α , CD11b, и сопровождалось увеличением числа дофаминергических нейронов в зоне черной субстанции при иммуногистохимическом исследовании [114]. Таким образом, показан потенциал для терапевтического применения системы доставки мРНК-каталазы с помощью экзосом для ослабления нейротоксичности и нейровоспаления на мышинной модели БП *in vitro* и *in vivo*. Отметим, для достижения аналогичного эффекта требовалось повторное введение концентрированных экзосом, загруженных каталазой *ex vivo*. Имплантируемые клетки-продуценты экзосом, разработанные в этом исследовании, впервые позволили эффективно производить и доставлять экзосомы, содержащие мРНК-каталазы *in situ*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экзосомы присутствуют во всех без исключения биологических жидкостях организма и служат переносчиками биологически активных молекул между различными клетками. Представленные данные демонстрируют возможности использования экзосом в неинвазивной диагностике с учетом знаний о биохимических особенностях тех или иных тканей, которые влияют на состав экзосом. Среда, кондиционированная клетками разных типов, может служить источником экзосом с заданными свойствами. Специфичность, распространенность, стабильность и биодоступность экзосом делают их привлекательными и экономически выгодными биомаркерами для использования в клинической лабораторной диагностике различных заболеваний.

Благодаря своему небольшому размеру и точному происхождению экзосомы способны избегать фагоцитоза или деградации макрофагами и циркулировать в течение продолжительного времени в организме [4]. В отличие от типичных наносистем, таких как липосомы или полимерные наночастицы, экзосомы могут избежать лизосомальной деградации, доставляя лекарственные препараты непосредственно в цитоплазму клеток-мишеней. Одним из важных преимуществ использования экзосом в качестве средства доставки лекарств является их способность преодолевать гематоэнцефалический барьер [4].

Совершенствование методов получения высокоочищенных, тщательно охарактеризованных экзосом, обладающих биологической безопасностью и природной способностью переносить нуклеиновые кислоты, белки и другие терапевтические молекулы, имеет большое практическое значение. Для того чтобы терапевтические средства на основе экзосом стали доступными для пациентов, необходимо разработать масштабируемые, воспроизводимые и соответствующие надлежащей производственной практике (GMP) протоколы получения экзосом на основании нормативно-правовой базы.

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1363 от 25.06.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нанолечения. Концепции доставки лекарств в нанонауке / Под редакцией Лампрехт Алф. Пер. с англ. Таратина О.В., науч. ред. Клячко Н.Л. М.: Научный мир, 2010. 232 с.
2. Trams E.G., Lauter C.J., Salem N., Jr., Heine U. // Biochim. Biophys. Acta. 1981. V. 645. № 1. P. 63.

3. *Panteleev M.A., Abaeva A.A., Balandina A.N. et al. // Biochemistry Moscow Supplement Series a-Membrane and Cell Biology. 2017. V. 11. № 3. P. 187.*
4. *Ha D., Yang N., Nadithe V. // Acta Pharm. Sin. B. 2016. V. 6. № 4. P. 287.*
5. *Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. № 8. P. 569.*
6. *Tian Y., Li S., Song J. et al. // Biomater. 2014. V. 35. № 7. P. 2383.*
7. *Vella L.J., Hill A.F., Cheng L. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 2. P. 173.*
8. *Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1820. № 7. P. 940.*
9. *Vogel A., Upadhyaya R., Shetty A.K. // EBioMedicine. 2018. V. 38. P. 273.*
10. *Cocucci E., Meldolesi J. // Trends Cell. Biol. 2015. V. 25. № 6. P. 364.*
11. *Colombo M., Raposo G., Thery C. // Annu Rev. Cell. Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 255.*
12. *Kalra H., Drummen G. P., Mathivanan S. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V. 17. № 2. P. 170.*
13. *Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. // J. Proteomics. 2010. V. 73. № 10. P. 1907.*
14. *Kobayashi T., Gu F., Gruenberg J. // Semin Cell Dev Biol. 1998. V. 9. № 5. P. 517.*
15. *Lafourcade C., Sobo K., Kieffer-Jaquinod S. et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 7. P. e2758.*
16. *Haqqani A.S., Delaney C.E., Tremblay T.-L. et al. // Fluids and Barriers of the CNS. 2013. V. 10. № 1. P. 4.*
17. *Nadezhdina E.S. // Биохимия. 2014. Т. 79. № 4. С. 485.*
18. *Waters M.G., Griff I.C., Rothman J.E. // Curr. Opin. Cell. Biol. 1991. V. 3. № 4. P. 615.*
19. *Weidman P.J., Melancon P., Block MR., Rothman J.E. // J. Cell. Biol. 1989. V. 108. № 5. P. 1589.*
20. *Clary D.O., Griff I.C., Rothman J.E. // Cell. 1990. V. 61. № 4. P. 709.*
21. *Griff I.C., Schekman R., Rothman J.E., Kaiser C.A. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 17. P. 12106.*
22. *Malhotra V., Orci L., Glick B.S. et al. // Cell. 1988. V. 54. № 2. P. 221.*
23. *Fader C.M., Sanchez D.G., Mestre M.B., Colombo M.I. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1793. № 12. P. 1901.*
24. *Südhof T.C. // Annu. Rev. Neurosci. 2004. V. 27. № 1. P. 509.*
25. *Matteoli M., Takei K., Perin M.S. et al. // J. Cell. Biol. 1992. V. 117. № 4. P. 849.*
26. *Mignery G.A., Johnston P.A., Südhof T.C. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 11. P. 7450.*
27. *Takei K., Stukenbrok H., Metcalf A. et al. // J. Neurosci. 1992. V. 12. № 2. P. 489.*
28. *Davletov B.A., Südhof T.C. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 46. P. 28547.*
29. *Jahn R., Südhof T.C. // J. Neurochem. 1993. V. 61. № 1. P. 12.*
30. *Südhof T.C., Petrenko A.G., Whittaker V.P., Jahn R. // Prog. Brain. Res. 1993. V. 98. P. 235.*
31. *Walch-Solimena C., Jahn R., Südhof T.C. // Curr. Opin. Neurobiol. 1993. V. 3. № 3. P. 329.*
32. *Mathivanan S., Fahner C.J., Reid G.E., Simpson R.J. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. D1241.*
33. *Тамкович С.Н., Тутанов О.С., Лактионов П.П. // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. № 3. С. 163.*
34. *Teixeira F.G., Carvalho M.M., Panchalingam K.M. et al. // Stem Cells Transl Med. 2017. V. 6. № 2. P. 634.*
35. *Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 6. P. 1153.*
36. *Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. // Int. J. Cancer. 2005. V. 113. № 5. P. 752.*
37. *Hu G., Drescher K.M., Chen X.M. // Front Genet. 2012. V. 3. P. 56.*
38. *Konala V.B., Mamidi M.K., Bhone R. et al. // Cytotherapy. 2016. V. 18. № 1. P. 13.*
39. *Weng Y., Sui Z., Shan Y., Hu Y. et al. // Analyst. 2016. V. 141. № 15. P. 4640.*
40. *Wieckowski E.U., Visus C., Szajnik M. et al. // J. Immunol. 2009. V. 183. № 6. P. 3720.*
41. *Saleem S.N., Abdel-Mageed A.B. // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 1. P. 1.*
42. *Tang K., Zhang Y., Zhang H. et al. // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 1282.*
43. *Gardiner C., Di Vizio D., Sahoo S. et al. // J. Extracell. Vesicles. 2016. V. 5. P. 32945.*
44. *Shtam T.A., Samsonov R.A., Volnitskiy A.V. et al. // Biomed. Khim. 2018. V. 64. № 1. P. 23.*
45. *Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. // Curr. Protoc. Cell. Biol. 2006. V. Ch. 3. P. Unit 3.22.*
46. *Shtam T.A., Kovalev R.A., Varfolomeeva E.Y. et al. // Cell. Commun. Signal. 2013. V. 11. P. 88.*
47. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V. et al. // Prostate. 2016. V. 76. № 1. P. 68.*
48. *Штам Т.А., Нарыжский С.Н., Ланда С.Б. и др. // Цитология. 2012. Т. 54. № 5. С. 430.*
49. *Zhang Z., Wang C., Li T. et al. // Oncol. Lett. 2014. V. 8. № 4. P. 1701.*
50. *Lamparski H.G., Metha-Damani A., Yao J.Y. et al. // J. Immunol. Methods. 2002. V. 270. № 2. P. 211.*
51. *Driedonks T.A.P., Nijen Twilhaar M.K., Nolte-'t Hoen E.N. M. // J. Extracell. Vesicles. 2019. V. 8. № 1. P. 1552059.*
52. *Shtam T.A., Samsonov R.B., Volnitskiy A.V. et al. // Biochemistry Moscow-Supplement Series B-Bio-medical Chemistry. 2018. V. 12. № 2. P. 167.*
53. *Andreu Z., Rivas E., Sanguino-Pascual A. et al. // J. Extracell. Vesicles. 2016. V. 5. P. 31655.*
54. *Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F. et al. // J. Extracell. Vesicles. 2014. V. 3. P. 26913.*
55. *Witwer K.W., Soekmadji C., Hill A.F. et al. // J. Extracell. Vesicles. 2017. V. 6. № 1. P. 1396823.*

56. *Thery C., Witwer K.W., Aikawa E. et al.* // J. Extracell. Vesicles. 2018. V. 7. № 1. P. 1535750.
57. *Witwer K.W., Buzas E.I., Bemis L.T. et al.* // J. Extracell. Vesicles. 2013. V. 2. № 10. P. 3402.
58. *Romanov Y.A., Volgina N.E., Dugina T.N. et al.* // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. V. 167. № 1. P. 131.
59. *Романов Ю.А., Волгина Н.Е., Дугина Т.Н. и др.* // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2019. № 1. С. 12.
60. *Тихонова М.В., Литвинов Д.В., Карачунский А.И. и др.* // Онкопедиатрия. 2017. Т. 4 (2). С. 141.
61. *Kucharzewska P., Christianson H.C., Welch J.E. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013. V. 110. № 18. P. 7312.
62. *Whiteside T.L.* // Expert Rev. Mol. Diagn. 2015. V. 15. № 10. P. 1293.
63. *Wieckowski E., Whiteside T.L.* // Immunol. Res. 2006. V. 36. № 1–3. P. 247.
64. *Chistiakov D.A., Chekhonin V.P.* // Tumour Biol. 2014. V. 35. № 9. P. 8425.
65. *Meng X., Muller V., Milde-Langosch K. et al.* // Oncotarget. 2016. V. 7. № 13. P. 16923.
66. *Nouraei N., Mowla S.J.* // Front Genet. 2015. V. 6. P. 232.
67. *Bang C., Batkai S., Dangwal S. et al.* // J. Clin. Invest. 2014. V. 124. № 5. P. 2136.
68. *Wang G.K., Zhu J.Q., Zhang J.T. et al.* // Eur. Heart. J. 2010. V. 31. № 6. P. 659.
69. *Adachi T., Nakanishi M., Otsuka Y. et al.* // Clin. Chem. 2010. V. 56. № 7. P. 1183.
70. *Gray W.D., French K.M., Ghosh-Choudhary S. et al.* // Circ Res. 2015. V. 116. № 2. P. 255.
71. *Van Giau V., An S.S.* // J. Neurol. Sci. 2016. V. 360. P. 141.
72. *Drago D., Cossetti C., Iraci N. et al.* // Biochimie. 2013. V. 95. № 12. P. 2271.
73. *Acharya M.M., Christie L.A., Hazel T.G. et al.* // Cell. Transplant. 2014. V. 23. № 10. P. 1255.
74. *Baraniak P.R., McDevitt T.C.* // Regen Med. 2010. V. 5. № 1. P. 121.
75. *Constantin G., Marconi S., Rossi B. et al.* // Stem Cells. 2009. V. 27. № 10. P. 2624.
76. *Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В. и др.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 3. С. 245.
77. *Niwa O., Barcellos-Hoff M.H., Globus R.K. et al.* // Ann. ICRP. 2015. V. 44. № 3–4. P. 7.
78. *Barhum Y., Gai-Castro S., Bahat-Stromza M. et al.* // J. Mol. Neurosci. 2010. V. 41. № 1. P. 129.
79. *Bacigaluppi M., Pluchino S., Peruzzotti-Jametti L. et al.* // Brain. 2009. V. 132. Pt. 8. P. 2239.
80. *Blurton-Jones M., Kitazawa M., Martinez-Coria H. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009. V. 106. № 32. P. 13594.
81. *Friedenstein A.J., Deriglasova U.F., Kulagina N.N. et al.* // Exp. Hematol. 1974. V. 2. № 2. P. 83.
82. *Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V.* // Cell. Tissue Kinet. 1987. V. 20. № 3. P. 263.
83. *Wei X., Du Z., Zhao L. et al.* // Stem Cells. 2009. V. 27. № 2. P. 478.
84. *Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Высоцкая О.В. и др.* // Молекулярная медицина. 2018. Т. 16. № 6. С. 28.
85. *Hu K.X., Sun Q.Y., Guo M., Ai H.S.* // Br. J. Radiol. 2010. V. 83. № 985. P. 52.
86. *Kudo K., Liu Y., Takahashi K. et al.* // J. Radiat. Res. 2010. V. 51. № 1. P. 73.
87. *Lange C., Brunswig-Spickenheier B., Cappallo-Obermann H. et al.* // PLoS One. 2011. V. 6. № 1. P. e14486.
88. *Chang P., Qu Y., Liu Y. et al.* // Cell. Death. Dis. 2013. V. 4. P. e685.
89. *Soria B., Martin-Montalvo A., Aguilera Y. et al.* // Front Cell. Neurosci. 2019. V. 13. P. 204.
90. *Liao H., Wang H., Rong X. et al.* // Biomed. Res. Int. 2017. V. 2017. P. 1948985.
91. *Adams K.V., Morshead C.M.* // Prog. Neurobiol. 2018. V. 170. P. 2.
92. *Bonner J.F., Haas C.J., Fischer I.* // Methods. Mol. Biol. 2013. V. 1078. P. 65.
93. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / Под ред. Пальцева М.А. ОАО “Издательство “Медицина”, издательство “Шико”. 2009. Т. 2. 163 с.
94. *Gage F.H.* // Science. 2000. V. 287. № 5457. P. 1433.
95. *Gage F.H., Ray J., Fisher L.J.* // Annu. Rev. Neurosci. 1995. V. 18. P. 159.
96. *Darbinyan A., Kaminski R., White M.K. et al.* // Methods. Mol. Biol. 2013. V. 1078. P. 45.
97. *Acharya M.M., Christie L.A., Lan M.L. et al.* // Cancer. Res. 2011. V. 71. № 14. P. 4834.
98. *Acharya M.M., Rosi S., Jopson T., Limoli C.L.* // Cell. Transplant. 2015. V. 24. № 4. P. 691.
99. *Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H. et al.* // FEBS Lett. 2015. V. 589. № 11. P. 1257.
100. *Qing L., Chen H., Tang J., Jia X.* // Neurorehabil Neural Repair. 2018. V. 32. № 9. P. 765.
101. *Zhang Y., Chopp M., Meng Y. et al.* // J. Neurosurg. 2015. V. 122. № 4. P. 856.
102. *Doepfner T.R., Herz J., Gorgens A. et al.* // Stem Cells Transl. Med. 2015. V. 4. № 10. P. 1131.
103. *Webb R.L., Kaiser E.E., Scoville S.L. et al.* // Transl. Stroke Res. 2018. V. 9. № 5. P. 530.
104. *Webb R.L., Kaiser E.E., Jurgielewicz B.J. et al.* // Stroke. 2018. V. 49. № 5. P. 1248.
105. *Long Q., Upadhyia D., Hattiangady B. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2017. V. 114. № 17. P. E3536.
106. *Batrakova E.V., Kim M.S.* // J. Control. Release. 2015. V. 219. P. 396.

107. *Sun D., Zhuang X., Xiang X. et al.* // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 9. P. 1606.
108. *Yang T., Martin P., Fogarty B. et al.* // *Pharm. Res.* 2015. V. 32. № 6. P. 2003.
109. *Ly L.H., Wan Y.L., Lin Y. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 19. P. 15874.
110. *Lee Y., El Andaloussi S., Wood M.J.* // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № R1. P. R125.
111. *Ohno S., Takanashi M., Sudo K. et al.* // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 1. P. 185.
112. *Lee Y.S., Dutta A.* // *Genes. Dev.* 2007. V. 21. № 9. P. 1025.
113. *Haney M.J., Klyachko N.L., Zhao Y. et al.* // *J. Control. Release.* 2015. V. 207. P. 18.
114. *Kojima R., Bojar D., Rizzi G. et al.* // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1305.
115. *Haney M.J., Zhao Y., Harrison E.B. et al.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 4. P. e61852.