

ПРИРОДНЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ ЭКЗОСОМЫ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ НАНОМЕДИЦИНЫ

Полищук А. Г., Якубович Е. И., Евтушенко В. И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Полищук Анна Генриховна,
ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова»
Минздрава России,
ул. Ленинградская, 70, пос. Песочный,
Санкт-Петербург, Россия, 197758.
E-mail: polischouka@mail.ru

*Статья поступила в редакцию 26.12.2024
и принята к печати 15.01.2025*

Резюме

Экзосомы представляют собой сферические внеклеточные нановезикулы эндосомального происхождения, функция которых заключается в инкапсулировании части содержимого родительских клеток, продуцирующих их, и транспортировке этого содержимого к целевым клеткам-реципиентам с помощью биологических жидкостей. Благодаря своим свойствам экзосомы рассматриваются как потенциальные биологические системы доставки лекарственных препаратов (ЛП) в клетки-мишени. Для медицинских целей экзосомы выделяются из различных природных источников. Использование каждого типа экзосом в терапевтических целях имеет свои преимущества, но и сопряжено в той или иной степени с рядом биологических (стабильность, иммуногенность, токсичность) и технических (масштабирование производства, стандартизация выделения, загрузка ЛП) проблем. Экзосомы, полученные из клеток человека, имеют значительный потенциал в качестве средств доставки ЛП благодаря своему эндогенному происхождению. Однако одновременно с доставкой ЛП экзосомы человека могут переносить потенциально опасные биомолекулы. Экзосомы молока сельскохозяйственных животных и экзосомоподобные везикулы, продуцируемые растениями, имеют сами по себе огромный терапевтический потенциал и безопасны в качестве средств доставки ЛП. Однако данные об их воздействии на организм человека ограничены. Искусственные экзосомы, созданные с помощью нанобиотехнологий, позволяют преодолеть многие из технических ограничений, присущих природным экзосомам. В обзоре обсуждаются сильные стороны и ограничения разных типов природных и искусственных экзосом как наноносителей для доставки ЛП, а также проблемы, связанные с их внедрением в клиническую практику.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, внеклеточные экзосомоподобные везикулы растительного происхождения, нановезикулы, тени эритроцитов, экзосомы, экзосомы молока, эритроциты

Для цитирования: Полищук А.Г., Якубович Е.И., Евтушенко В.И. Природные и искусственные экзосомы для трансляционной наномедицины. Трансляционная медицина. 2025; 12(1): 80-93. DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-80-93. EDN: YICJVA

NATURAL AND ARTIFICIAL EXOSOMES FOR TRANSLATIONAL NANOMEDICINE

Anna G. Polischouk, Elena I. Yakubovich, Vladimir I. Evtushenko

Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Anna G. Polischouk,
Granov Russian Research Center of
Radiology and Surgical Technologies,
Leningradskaya str., 70, Pesochnyy, Saint
Petersburg, Russia, 197758.
E-mail: polischouka@mail.ru

Received 26 December 2024; accepted
15 January 2025

Abstract

Exosomes are spherical extracellular nanovesicles of endosomal origin, whose function is to encapsulate part of the contents of the parent cells producing them and transport this content to the target recipient cells using biological fluids. Due to their properties, exosomes are considered as potential biological drug delivery systems. For medical purposes, exosomes are isolated from various natural sources. The use of each type of exosome for therapeutic purposes has its advantages and is associated to varying degrees with several biological (stability, immunogenicity, toxicity) and technical (production scaling-up, standardization of isolation protocols, drug loading) problems. Exosomes derived from human cells have significant potential as therapeutic drug (TD) delivery vehicles due to their endogenous origin. However, simultaneously with the delivery of TD, they can carry potentially dangerous biomolecules. Farm animal milk-derived exosomes and exosome-like plant-derived extracellular vesicles have enormous therapeutic potential in themselves and are safe as drug delivery vehicles. However, data on their effects on the human body are limited. Artificial exosomes created with the help of nanobiotechnology can overcome many of the technical limitations inherent in natural exosomes. The review discusses the strengths and limitations of different types of natural and artificial exosomes as drug delivery nanocarriers, as well as challenges associated with their implementation in clinical practice.

Key words: erythrocytes, erythrocyte ghosts, exosomes, extracellular exosome-like plant-derived vesicles, extracellular vesicles, milk-derived exosomes, nanovesicles

For citation: Polischouk AG, Yakubovich EI, Evtushenko VI. Natural and artificial exosomes for translational nanomedicine. Translational Medicine. 2025; 12(1): 80-93. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2025-12-1-80-93. EDN: YICJVA

Сокращения: ВВРП — внеклеточные везикулы растительного происхождения, ВНВ — внеклеточные везикулы, ЛП — лекарственные препараты, МЭКС — экзосомы молока, НВ — нановезикулы, НЭ — наноэритроциты, ОП — осаждение полимерами, УФ — ультрафильтрация, УЦ — ультрацентрифугирование, ЭКС — экзосомы, ЭКСП-нв — экзосомоподобные нановезикулы растений, ЭХ — эксклюзионная хроматография.

Введение

Внеклеточные везикулы (ВНВ) стали предметом исследований с 1983 года, когда было обнаружено их высвобождение из ретикулоцитов овцы во время культивирования клеток *in vitro* [1]. Последующие исследования показали, что ВНВ можно получить из клеток, тканей или жидкостей организма почти всех видов млекопитающих. ВНВ представляют собой гетерогенную группу мембранных структур,

в которой популяции различаются по биогенезу и размеру: экзосомы (30–150 нм) — везикулы эндосомального происхождения; микровезикулы (от 50–500 до 1000 нм) — везикулы, отпочковывающиеся от плазматической мембраны; апоптотические тельца (> 1000 нм) — везикулы, образующиеся в результате гибели клеток. Экзосомы (ЭКС), внеклеточные сферические нановезикулы эндосомального происхождения, обладают однослойной структурой липидного бислоя и содержат клеточные компоненты, ответственные за уникальную биологическую функцию исходной (донорской) клетки (рис. 1).

Молекулярный состав ЭКС включает различные растворимые белки, липиды, нуклеиновые кислоты, локализующиеся в везикулярной полости (cargo), ряд интегринов, встроенных в фосфолипидную мембрану, а также органеллы, такие как митохондрии [2, 3]. Состав биомолекул, содержащихся в ЭКС, зависит от состояния и происхождения клетки, секретирующей их. Функция ЭКС заключается в инкапсуляции части содержимого родительских клеток, продуцирующих ЭКС, для транспортировки его через биологические жидкости и к целевому органу-реципиенту.

Перенос биологически активных молекул из клеток-доноров в клетки-реципиенты, ЭКС играют решающую роль в межклеточной коммуникации. Многие исследования показали, что ЭКС, полученные из опухолевых клеток, способствуют формированию предметастатического микроокружения, росту и прогрессированию опухоли, иммунной супрессии, ангиогенезу, антиапоптотической передаче сигналов и увеличению лекарственной устойчивости [2]. Литературные данные позволяют предположить, что ингибирование процессов синтеза, высвобождения и поглощения ЭКС, полученных из опухолевых клеток, может использоваться в целях терапии рака.

Целью настоящего обзора было описание научных достижений в области получения и исследования свойств внеклеточных везикул, а также рассмотрение областей их практического применения в биомедицине. Задачей данной работы стало описание и сопоставление требований, предъявляемых к носителям, способам адресной доставки наноконъюгатов к биологическим мишеням, выделение преимуществ применения противоопухолевых средств в составе наноконъюгатов на основе внеклеточных везикул. Отдельной задачей явилось

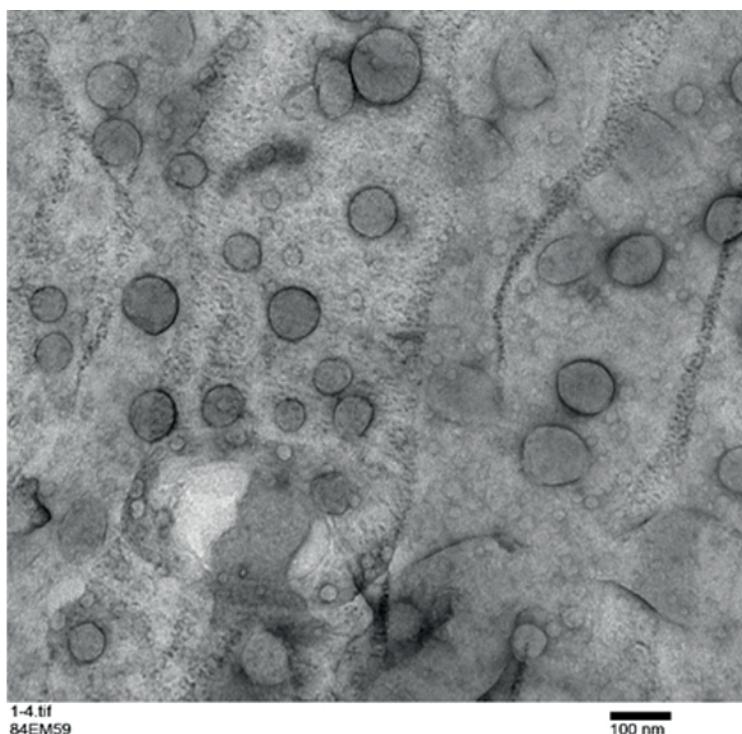


Рис. 1. Экзосомы, выделенные из кондиционной среды клеток поджелудочной железы CRL-4023. Электронная просвечивающая микроскопия. Длина масштабной линии соответствует 100 нм

Figure 1. Exosomes isolated from cell culture conditioned medium from CRL-4023 pancreatic cells. Electron transmission microscopy. The length of the scale line corresponds to 100 nm

обобщение имеющихся на настоящий момент проблем, связанных с применением внеклеточных везикул в биомедицине.

Экзосомы как средства доставки терапевтических молекул

Благодаря своей структуре и эндогенному происхождению, экзосомы имеют значительный потенциал в качестве средств доставки лекарственных средств. Они эффективно перемещаются по организму, биосовместимы, стабильны в кровотоке, обладают низкой иммуногенностью, нетоксичны и могут быть сконструированы для доставки мишень-специфических молекул путем манипулирования их молекулярным содержимым (cargo).

Загрузка экзосом лекарственными препаратами

Лекарственные препараты (ЛП) — это биологически активные соединения, которые часто обладают низкой растворимостью в воде, низкой селективностью распределения к специфическим органам, быстрой деградацией, токсичностью (накоплением в здоровых тканях) и плохой способностью проникать в клетки. В многочисленных

работах сообщалось, что ЭКС хорошо защищают введенные препараты от воздействия окружающей среды, повышая их эффективность, а также улучшают их направленную доставку и проникновение в клетки реципиента [4, 5]. Также было замечено, что, благодаря своей уникальной мембранной структуре и размеру, ЭКС легко проходят через биологический барьер и могут частично избегать иммунного ответа [4]. Однако для загрузки ЛП в существующие стабильные структуры требуются определенные стратегии. На рисунке 2 представлена схема доставки ЛП к злокачественным образованиям с использованием ЭКС. Экзосомы, нановезикулы, секретлируемые клетками, транспортируют лекарства, активно или пассивно в них загруженные, к целевым тканям и органам.

Самым простым методом загрузки ЛП является совместная инкубация лекарственного средства и ЭКС, при этом ЛП диффундирует через мембраны экзосом благодаря градиенту концентрации. Метод позволяет загружать небольшие гидрофобные молекулы (например, куркумин и паклитаксел). Коэффициент пассивной загрузки ЛП низкий (около 1%), и загрузка занимает много времени [4]. Кроме того, этот метод неприменим к гидро-

Природные источники экзосом

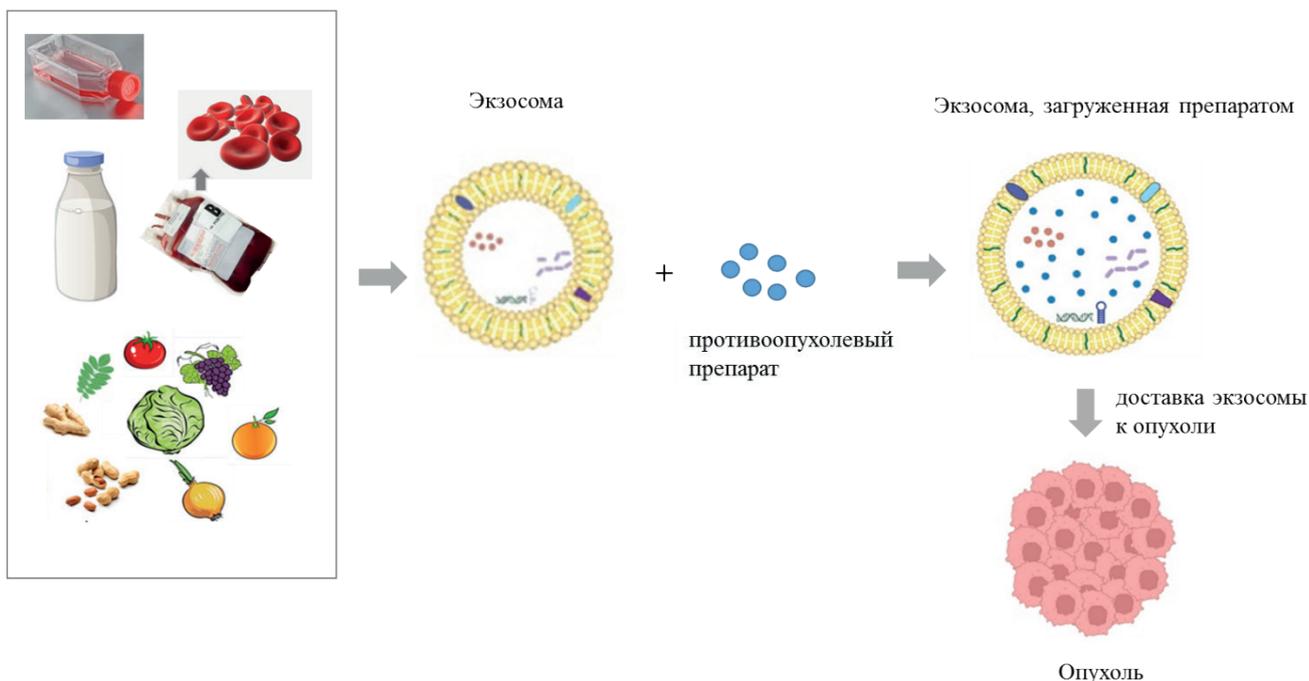


Рис. 2. Схема доставки противоопухолевых препаратов к опухоли с помощью экзосом, выделенных из природных источников

Figure 2. A scheme for the delivery of antitumor drugs to a tumor using exosomes isolated from natural sources

фильным соединениям. В связи с этими проблемами наиболее часто используются методы активной загрузки ЛП в ЭКС, к которым относятся физико-химические методы — соникация, электропорация, экструзия, многократные циклы заморозки, пермеабиллизация сапонином и методы генной инженерии [5, 6]. Принцип загрузки ЛП посредством обработки ультразвуком основан на нарушении целостности мембраны ЭКС под воздействием ультразвуковых волн, что облегчает диффузию ЛП. Этот метод совместим с гидрофильными препаратами и позволяет достичь коэффициента загрузки, близкого к 30 %. Недостатками метода являются процессы агрегации ЭКС и разрушение их мембран. Оба процесса влияют на иммунную толерантность полученных нановезикул. Кроме того, хотя с помощью ультразвукового воздействия ЛП могут проникать внутрь ЭКС, в основном они абсорбируются на поверхности ЭКС [6]. При электропорации кратковременные электрические импульсы создают микропоры в липидной бислоидной мембране, что позволяет химическим веществам проникать внутрь. В этой процедуре размер поглощенной молекулы определяет, сможет ли она успешно проникнуть в ЭКС. ЭКС сохраняет свою морфологию, если поглощенные молекулы превышают размер пор; в противном случае ЭКС могут разбухнуть, а их мембрана — разорваться. Электропорация — это быстрый метод с высокой производительностью (до 60 %). Недостатками метода являются значительная потеря целостности мембраны и разрушение молекул белков. Циклический метод замораживания-оттаивания основан на совместной инкубации ЛП и ЭКС и использует преимущества процесса разрушения и перестройки мембранной структуры ЭКС в буфере для загрузки. Мембрана ЭКС при замораживании разрушается из-за образования кристаллов льда, что позволяет гидрофильным веществам проникать внутрь до восстановления мембраны, а после оттаивания кристаллы льда исчезают, а мембрана ЭКС претерпевает реконструкцию и инкапсулирует ЛП. Загрузка ЛП при помощи сапонины использует его способность открывать поры липидной мембраны удалением из нее холестерина. К недостаткам сапонинов относится их потенциальный цитотоксический эффект. Еще одним перспективным методом загрузки ЛП является метод экструзии, при котором лекарственное средство и ЭКС продавливаются вместе через мембрану с размерами пор от 400 до 100 нм. В ходе этого процесса мембрана ЭКС разрушается, а затем вновь формируется, заключая молекулы ЛП в образующиеся нанозксомы. Кроме того, для загрузки нуклеиновых кислот исполь-

зуются метод трансфекции и методы, основанные на sequence-специфических взаимодействиях. Для загрузки белков применяются методы трансфекции векторами, сконструированными либо для обеспечения повышенной экспрессии целевого белка, либо для увеличения специфичности его доставки [7]. Эффективность загрузки ЛП в ЭКС колеблется для одного и того же метода загрузки в широком диапазоне. Объясняется это разными типами клеток, используемых в экспериментах, разными загружаемыми препаратами, разными индивидуальными протоколами экспериментов, а также сложностью количественного определения ЭКС и оценки того, инкапсулирован препарат или абсорбирован [4–6].

Проблемы производительности выделения экзосом

Кроме проблемы эффективности загрузки ЛП, существует ряд проблем, связанных с производством и очисткой ЭКС. Одной из основных проблем является низкая производительность получения ЭКС. Как правило, одна клетка выделяет всего ~50 ЭКС/мин [8, 9], поэтому для получения клинически значимого количества ЭКС требуется большое количество клеток и длительный период культивирования. Для улучшения продуктивности получения ЭКС было предложено использовать биореакторы или воздействие на клетки физическими либо химическими методами. Использование биореакторов, которые представляют собой трехмерные динамические системы культивирования клеток, повышает выход ЭКС на порядок [11]. Однако это количественное улучшение происходит в ущерб качеству, поскольку получаются везикулы большого размера. При воздействии на родительские клетки стрессами (гипоксия, низкий уровень рН, лекарственные препараты и т. д.) количество продуцируемых ими ЭКС также значительно увеличивается [11]. К сожалению, было продемонстрировано, что в условиях стресса изменяется молекулярный состав как внутри, так и на поверхности ЭКС [12]. Кроме того, стресс увеличивает контаминацию препаратов ЭКС другими везикулами, такими как апоптотические тельца.

Top-down-стратегия для увеличения производительности выделения экзосом

Top-down-стратегия заключается в том, что нечто большое разбивается на элементы меньшего размера. Так, нановезикулы (НВ) получают через разрушение мембран клеток. НВ формируются затем в результате процесса самосборки частей разрушенной мембраны. Полученные таким образом НВ имитируют биологическую сложность

природных ЭКС, но обладают меньшей гетерогенностью. При этом их количество значительно превышает количество ЭКС, полученное из одного и того же количества исходного материала. Были предложены различные методы с использованием top-down-стратегии: фильтрация, микрофлюидные устройства, азотная кавитация, соникация и экструзия. Экструзия — это технология получения НВ продавливанием суспензии клеток через мембранный фильтр с определенным размером пор (рис. 3). Последовательная экструзия через поликарбонатные мембранные фильтры с уменьшающимися размерами пор широко используется для получения НВ. Различные параметры процедуры экструзии, такие как приложенное давление, количество циклов и размер пор, температура и др., влияют на средний диаметр и распределение по размерам (полидисперсность) получаемых НВ [13].

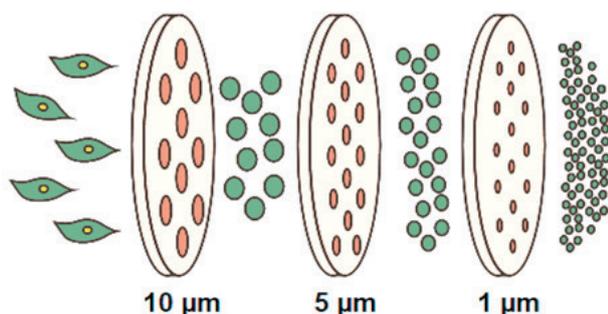


Рис. 3. Принцип получения НВ методом экструзии

Figure 3. The principle of obtaining nanovesicles by extrusion

Пример использования метода экструзии для получения НВ показан в работе Jang и соавторов. В этом исследовании НВ получали из монобластных клеток U937 человека и мышинных макрофагов Raw264.7 путем экструзии через фильтры с диаметром пор 10 мкм, 5 мкм и 1 мкм с последующим центрифугированием в градиенте плотности при 100 000 g [14]. Авторы сообщили, что полученные НВ похожи на природные ЭКС с точки зрения морфологии, размера, белковых маркеров, а также противоопухолевой эффективности после их загрузки химиотерапевтическими препаратами. Выход НВ значительно превышал (в 100 раз) таковой ЭКС. Эта исследовательская группа создала НВ из различных клеток и сообщила об их различных применениях. В том числе о том, что НВ из эмбриональных стволовых клеток могут усиливать пролиферацию клеток; НВ, полученные из мышинных фибробластов NIH3T3, могут быть использованы для эффективной доставки мРНК; НВ,

полученные из фибробластов NIH3T3 и β -клеток поджелудочной железы MIN6, могут индуцировать дифференцировку *in vivo* клеток, продуцирующих инсулин; НВ, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, могут применяться для доставки лекарств к опухолям молочной железы или для лечения повреждений спинного мозга.

Проблемы выделения и очистки экзосом

Другая проблема связана с отсутствием метода выделения ЭКС, который бы сочетал в себе все характеристики, необходимые для получения функционально активных ЭКС в производственных масштабах. Классический метод выделения ЭКС основан на ультрацентрифугировании (УЦ). Однако при УЦ препараты ЭКС загрязняются липопротеинами, что обусловлено схожестью их размеров и плотности с ЭКС. Кроме того, ЭКС часто агрегируют в условиях экстремальных физических нагрузок [15]. Другие методы выделения ЭКС, такие как эксклюзионная хроматография (ЭХ), ультрафильтрация (УФ) или осаждение полимерами (ОП), более приспособлены для крупномасштабного производства ЭКС, но и они имеют недостатки: ЭХ — низкая производительность, высокое разбавление образцов; УФ — низкая чистота; ОП — низкая чистота, сильная агрегация ЭКС. Недавняя техническая эволюция методов выделения ЭКС связана с микрофлюидикой [16]. Имеющиеся в продаже наборы для выделения ЭКС обеспечивают удобный и простой метод выделения, но обычно имеют низкий уровень чистоты препаратов ЭКС и используются для выделения ЭКС в небольших масштабах. Однако некоторые производители утверждают, что их наборы значительно превосходят по качеству имеющиеся на сегодняшний день технологии выделения ЭКС. Например, набор ExoQuick® ULTRA EV Isolation System от System Biosciences 9 (технология осаждения ЭКС полимерами), в соответствии с описанием производителя, обеспечивает в 400 раз больший выход ЭКС по сравнению с УЦ, высокий уровень чистоты и эффективное выявление биомаркеров ЭКС. Набор позволяет изолировать ЭКС менее чем за 20 мин. [17]. Эти характеристики метода могли бы сделать его пригодным для промышленного производства, если бы его можно было соответствующим образом масштабировать. Надо учесть, однако, что существенным недостатком всех коммерческих наборов является их высокая стоимость.

Еще одна проблема связана с тем, что состав и размер ЭКС зависят от метода выделения. Это может быть объяснено метод-зависимым обогащением препаратов экзосомами различных субпо-

пуляций, контаминирующими молекулами или разными белками, адсорбирующимися на поверхности ЭКС в процессе их выделения/очистки [18].

Таким образом, необходима оптимизация методов выделения ЭКС для сохранения их свойств, повышения производительности и снижения риска побочных эффектов, вызванных контаминирующими молекулами или специфическими субпопуляциями.

Природные источники нановезикул

Эритроциты

Интерес к использованию эритроцитов для доставки лекарств объясняется наличием у них ряда преимуществ по сравнению с существующим арсеналом способов и систем доставки ЛП [19, 20]. Во-первых, они присутствуют в кровотоке в большом количестве, что обеспечивает легкость получения и выделения значительного числа клеток и возможность масштабирования производства. Во-вторых, зрелые эритроциты лишены ядра и других органелл, что обеспечивает значительное внутриклеточное пространство для реагентов и делает процесс извлечения мембран и очистки более удобным. Эти клетки удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к системам доставки. Носители ЛП, полученные из эритроцитов, не вызывают токсических побочных эффектов, поскольку они биосовместимы. Старые или поврежденные эритроциты утилизируются естественным образом в селезенке (биodeградируемость). Также они характеризуются длительным временем циркуляции в кровотоке (время жизни лекарства в кровотоке определяется временем жизни нагруженных лекарством клеток) и снижением побочных эффектов препаратов (поскольку в кровотоке отсутствуют высокие пиковые концентрации свободного препарата).

В зависимости от вида препарата эритроцит может быть использован как носитель с постепенным высвобождением ЛП, как биореактор или как система направленной доставки препарата, в первую очередь к тканевым макрофагам, печени и селезенке [20]. В первом случае в эритроцит загружается препарат, способный медленно диффундировать сквозь клеточную мембрану в кровотоки, либо недиффундирующее пролекарство, которое в эритроците превращается в диффундирующие через мембрану активные компоненты, обладающие терапевтическим эффектом. Механизм работы эритроцитов-биореакторов основан на инкапсуляции в эритроцит ферментов, способных элиминировать токсические вещества и метаболиты, циркулирующие в кровотоке, при условии, что эти метаболиты-субстраты проникают внутрь эритроцита, нагруженного ферментом, где происходит их рас-

щепление на безопасные продукты. Эритроциты являются хорошим средством доставки лекарств к внутрисосудистым мишеням, но многие другие важные терапевтические мишени (например, солидные опухоли, внесосудистые компоненты тканей, ЦНС) обычно недоступны для эритроцитов [19]. Терапевтический препарат может быть включен внутрь эритроцита или связан с его поверхностью. Для инкапсуляции ЛП в эритроциты используются электропорация и гипотонический гемолиз. Гипотонический гемолиз демонстрирует большую эффективность инкапсуляции ЛП, чем электропорация [21]. В гипотонических растворах эритроциты набухают, образуя сферу, и увеличенные отверстия в мембранах позволяют проходить терапевтическим молекулам. Затем в изотонических буферах эритроциты возвращаются к своей обычной двояковогнутой форме, и поры мембраны закрываются. Этот новый подход потенциально может обеспечить замену ферментов, утраченных при определенных заболеваниях, таких, например, как митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефалопатия [22]. Имобилизация терапевтических агентов на поверхности эритроцитов является многообещающим методом повышения стабильности взаимодействия клетки с лекарственным средством и может быть достигнута путем нековалентного связывания и ковалентной конъюгации. Нековалентная модификация поверхности включает адсорбцию терапевтических агентов на поверхности клеток посредством межмолекулярных водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил, гидрофобного контакта или других взаимодействий [4]. Например, показано, что стабильность в крови прикрепленных к эритроцитам путем нековалентной адсорбции сферических наночастиц полистирола (диаметром 200 или 500 нм) увеличивается в 3 раза, а накопление в легких — в 7 раз по сравнению с неприсоединенными наночастицами [23]. Дальнейшее увеличение направленности доставки наночастиц достигалось присоединением антител против ICAM-1 на открытую поверхность наночастиц, которые были прикреплены к эритроцитам. Нековалентная модификация поверхности относительно проста, но обладает низкой стабильностью. Ковалентное связывание ЛП с мембраной клеток возможно, в свою очередь, поскольку большинство клеток имеют на своей поверхности функциональные группы, такие как тиолы, амины и остатки сиаловой кислоты, которые могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами посредством ковалентных связей. Преимущества этих функциональных групп в том, что они доступны для мечения и обладают низкой токсичностью.

N-гидроксисукцинимидные и N-гидроксисульфосукцинимидные сшивающие агенты являются наиболее распространенными реагентами для первичной модификации аминов с помощью карбодимидных реакций. Тиольные группы цистеинсодержащих мембранных белков могут быть соединены посредством конъюгации малеимид-тиол. С помощью ковалентного связывания, например, присоединяют гиперразветвленные полиглицерины к мембранам эритроцитов для дальнейшего их использования в целях клинической визуализации при мечении флуоресцентными маркерами [24].

Наноэритросомы

Из биомиметических носителей, созданных на основе клеток крови, наноэритросомы (НЭ), полученные из эритроцитов, обладают многими преимуществами с точки зрения биodeградации, профилей высвобождения ЛП и эффективности таргетной терапии [25, 26]. У НЭ очень высокое отношение площади поверхности к объему (~ в 80 раз выше, чем у родительских эритроцитов), что способствует увеличению времени их циркуляции в крови [26]. Размеры НЭ могут достигать 100 нм, и они могут перемещаться по организму, нагруженные ЛП в высокой дозировке [27, 28]. Для введения терапевтических агентов в эритроциты необходимо удалить гемоглобин и цитоплазматическое содержимое клеток с помощью опосредованного гипотоническим раствором лизиса (гемолиза). При этом образуются НВ, образованные слоями клеточной мембраны и лишённые компонентов цитозоля (ghosts) [26, 29]. Процесс удаления не должен разрушать плазматическую мембрану клеток, но должен позволять клеткам образовывать наноразмерные капсулы. Было подсчитано, что один эритроцит может быть фрагментирован на 4000–5000 НЭ [26, 29]. Для получения НЭ используется обработка ультразвуком, экструзия и электрические импульсы. Из этих способов экструзия является наиболее эффективным методом получения однородных по размерам НЭ с минимальной потерей клеток. Благодаря биомиметическим свойствам НЭ используются для инкапсуляции ферментов, пептидов, токсинов, генетических материалов и контрастных веществ [19, 26, 27]. Целесообразность использования НЭ в качестве носителей лекарственных средств для лечения заболеваний печени, селезенки, лимфатических узлов и различных видов опухолей оценивалась во многих исследованиях. Показано, что ЛП, конъюгированные с НЭ, увеличивают эффект терапевтического воздействия на опухоли [26, 28]. Насколько нам известно, ни одно лекарственное

средство с низкой молекулярной массой не было инкапсулировано непосредственно в НЭ без конъюгации.

Экзосомы молока сельскохозяйственных животных

Полученные из молока экзосомы (мЭКС) являются перспективными терапевтическими кандидатами благодаря своим уникальным свойствам и универсальным функциям. Они были впервые выявлены в 1971 году и интенсивно изучаются с 2007 года. В процессе изучения мЭКС на клеточных и животных моделях были продемонстрированы иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства мЭКС, их способность модулировать состав кишечной микробиоты, стимулировать заживление ран, а также омолаживающие эпителий свойства и способность защищать клетки кожи от повреждения ультрафиолетом [29]. Многочисленные исследования молекулярного состава мЭКС выявили, что эти везикулы чрезвычайно богаты информационными молекулами. Например, в одном исследовании показано, что мЭКС из коровьего молока содержат более 16 000 мРНК и более 800 микроРНК [30]. В другом — в мЭКС свиной было идентифицировано 176 известных и 315 новых микроРНК, а в молозиве крупного рогатого скота обнаружены повышенные уровни микроРНК, связанных с иммунитетом [31]. В мЭКС быка обнаружено более 2100 белков, многие из которых играют важную роль в регулировании процессов функционирования кишечника, клеточного роста и воспаления [32]. Еще одним уникальным свойством мЭКС является их устойчивость к низким pH, кипячению и замораживанию [33]. Гликопротеины XDH, BTN и MUC1 и поверхностные белки FLOT1, ICAM1, ALIX и EpCAM мЭКС делают их устойчивыми к пепсину [34]. Очевидно, что пероральное введение ЛП является предпочтительным методом по сравнению с внутримышечным, подкожным и внутривенным введением. Однако доставка ЛП при его пероральном введении сопряжена с огромными трудностями. Неблагоприятная среда желудочно-кишечного тракта, богатая желудочной кислотой и пищеварительными ферментами, затрудняет попадание лекарств в организм через желудок и приводит к их низкой биодоступности. Ожидается, что ЭКС молока станут новым средством пероральной доставки лекарств [35].

Компоненты молока состоят из трех основных фаз: жир, диспергированный в эмульсии «масло-в-воде» с образованием глобул молочного жира, казеины, организованные в мицеллы, и сывороточные белки [36]. мЭКС могут быть выделены из раз-

личных фаз молока, преимущественно из фракции молочной сыворотки. Однако мЭКС сложно характеризовать из-за отсутствия стандартизированных методов предварительной обработки молока, его хранения и выделения ЭКС [37]. В настоящее время для выделения мЭКС в основном используют ультрацентрифугирование (УЦ), эксклюзионную хроматографию и центрифугирование в градиенте плотности. УЦ является наиболее распространенным методом выделения мЭКС [38]. Экзосомы молока были исследованы в качестве носителей для различных лекарственных и биологических препаратов, включая противоопухолевые средства. Например, вводимый перорально паклитаксел, содержащийся в мЭКС, показал значительное ингибирование роста опухоли в ксенотрансплантах при раке легких с уменьшением системных и иммунологических побочных эффектов по сравнению с неинкапсулированным паклитакселом. мЭКС, содержащие доксорубицин, в сочетании с гиалуроновой кислотой индуцировали гибель опухолевых клеток молочной железы, а, будучи конъюгированными с доксорубицином посредством рН-расщепляемой связи, демонстрировали орган-селективное высвобождение лекарственных средств и ингибирующий эффект на клетки плоскоклеточного рака полости рта [39].

Таким образом, использование экзосом животного происхождения в качестве средства доставки ЛП имеет хорошую перспективу для применения в клинике. Но существуют опасения, связанные с безопасностью их применения. Есть доказательства того, что одновременно с доставкой терапевтических средств ЭКС человека могут доставлять потенциально опасные материалы, включая молекулы опухолевого происхождения [40], чужеродные нуклеиновые кислоты [41] и инфекционные агенты [42]. В этом плане внеклеточные везикулы растительного происхождения, обладая многими общими чертами с ЭКС человека, рассматриваются как более безопасные.

Экзосомоподобные нановезикулы растительного происхождения

Растения использовались на протяжении веков для лечения заболеваний либо целиком, либо в виде экстрактов активных соединений, таких как полисахариды, фенолы и терпеноиды. Тем не менее, только недавно исследователям удалось выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы из растительного сырья. Исследования показали, что экзосомоподобные нановезикулы (ЭКСПнв) из различных съедобных растений (грейпфрута, имбиря, винограда, моркови и др.) имеют проти-

вовоспалительное, противоопухолевое, антибактериальное, противогрибковое и антиоксидантное действие [43]. Они оказывают эти эффекты с помощью различных механизмов, таких как регуляция генной экспрессии, влияние на микробиоту кишечника, изменение активности макрофагов, и действия специфических биоактивных соединений [44]. Нановезикулы растительного происхождения по определению обладают высоким уровнем биосовместимости, поскольку они содержатся в потребляемых в настоящее время пищевых продуктах. По сравнению с наноносителями, изготовленными химическим путем, растительные ЭКСПнв неиммуногенны и нетоксичны, могут проходить через гематоэнцефалический барьер и, что удивительно, доставлять лекарства беременной матери, не оказывая влияния на плод [45]. У ЭКСПнв есть еще одно преимущество: их можно получать непрерывно и непосредственно из свежих фруктов и овощей, не прибегая к гигантским клеточным фабрикам, таким, как те, которые необходимы для получения ЭКС из клеток человека. Причем ЭКСПнв могут быть получены из различных частей растения: из его сока, мякоти, корней или семян, а также из высушенного растительного сырья [45].

Так же, как и ЭКС животного происхождения, внеклеточные везикулы растительного происхождения (ВВРП) представляют собой мембранные структуры из липидных бислоев, в полости которых содержатся белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Отличительная особенность ВВРП заключается в том, что они содержат ряд антиоксидантов (аскорбиновая кислота, глутатион, супероксиддисмутаза-1, каталаза и др.) и вторичные метаболиты, такие как флавоноиды, хлорофиллы и куркуминоиды (в зависимости от происхождения и вида растения) [46]. Размеры ВВРП схожи с размерами ЭКС животного происхождения и обычно колеблются в пределах 30–500 нм, при этом везикулы, выделенные из моркови, достигают 1500 нм. ВВРП могут иметь сферическую, овальную или чашеобразную форму и отрицательный поверхностный заряд, в зависимости от вида растения и процедуры экстракции. ВВРП проявляют высокий уровень стабильности в различных условиях окружающей среды и способны противостоять разрушению под действием определенных пищеварительных ферментов [47].

Исследования ВВРП в первую очередь сосредоточены на их терапевтическом потенциале при лечении заболеваний. Данные свидетельствуют о том, что ВВРП играют важную роль в поддержании кишечного гомеостаза. Например, было показано, что нановезикулы (НВ) из винограда способны мигрировать через кишечный барьер и стимулиро-

вать пролиферацию стволовых клеток кишечника [48]. В том же исследовании было установлено, что у мышей, которых кормили виноградными НВ, снижался уровень смертности и прогрессирование колита, вызванного декстран сульфатом натрия (ДСН). ВВРП могут также изменять микробный состав кишечника. Например, введение мышам НВ, полученных из имбиря, приводит к увеличению популяции кишечной микрофлоры *Lactobacillaceae* и *Bacteroidaceae*, в то время как популяция *Clostridaceae* снижается [49]. В других исследованиях продемонстрированы противоопухолевые свойства ВВРП. ЭКСПнв из цитрусовых, лимона и винограда в разной степени ингибируют рост клеточных линий A375 (меланома), A549 (аденокарцинома легких) и MCF-7 (рак молочной железы) [50]. ЭКСПнв чайных цветков после внутривенной инъекции или перорального приема накапливаются в опухолях молочной железы и метастазах в легких, подавляют рост и распространение рака молочной железы [51]. ЭКСПнв, полученные из лимона, также могут специфически достигать места опухоли и активировать апоптотический процесс, опосредованный TRAIL, подавляя хронический миелоидный лейкоз *in vivo* [52]. ВВРП могут оказывать непосредственное влияние на иммунную систему [43]. Также продемонстрированы регенеративные свойства ВВРП. Так *in vitro* тесты на заживление ран показали, что ЭКСПнв из aloe vera могут усиливать миграцию кератиноцитов и фибробластов к месту раны, что указывает на их потенциал для терапии регенерации кожи [53].

Помимо того, что ЭКСПнв могут использоваться в целях терапии заболеваний сами по себе, поскольку переносят свои собственные биоактивные молекулы к органам-мишеням, они также могут применяться в качестве систем доставки ЛП [43–45]. Например, было продемонстрировано, что химиотерапевтические препараты, такие как паклитаксел, могут быть доставлены к опухолям толстой кишки с помощью ЭКСПнв из грейпфрута [54]. ЭКСПнв из грейпфрута, загруженные микроРНК miR18a, вызывают ингибирование развития метастазов в печени, а загруженные противовоспалительным препаратом метотрексатом — усиливают терапевтический эффект при колите мышей, вызванном декстран сульфатом натрия, по сравнению с ЛП в свободной форме. В другом исследовании ЭКСПнв из грейпфрута, загруженные доксорубицином или куркумином, были покрыты мембранами активированных лейкоцитов, что обеспечило эффективную доставку этих препаратов к очагам воспаления, что, в свою очередь, приводило к ингибированию роста опухолей толстой кишки и молочной железы, а также

к терапевтическому эффекту при колите, вызванном ДСН [55]. Аналогичным образом, результаты другого исследования показывают, что везикулы, полученные из грейпфрута, могут доставлять ДНК и белки, включая антитела, к клеткам-мишеням, не вызывая цитотоксической реакции. Например, ЭКСПнв, выделенные из грейпфрута и покрытые фолиевой кислотой, увеличивали таргетность доставки микроРНК miR17 (одной из мишеней miR17 являются молекулы главного комплекса гистосовместимости первого типа (МНС-1), экспрессирующиеся опухолевыми клетками) к GL-26 (фолатный рецептор) позитивным опухолям головного мозга мышей. У мышей, которым интраназально вводили этот конструктор, рост опухоли головного мозга замедлялся [56]. ЭКСПнв могут не только транспортировать различные молекулы препаратов для терапии клинических заболеваний, но и служить переносчиками для лечения заболеваний растений, вызванных грибковыми инфекциями. Например, ЭКСПнв, экстрагированные из листьев тропического растения семейства молочаевых Филлантуса нирури (лат. *Phyllanthus niruri*), при нагревании после смешивания с раствором AgNO₃, показали эффективность в лечении рака цитрусовых, вызванного бактерией *Xanthomonas axonopodis pv. allii* [44]. Эти исследования подчеркивают потенциал применения ЭКСПнв в качестве носителей ЛП.

Хотя ЭКСПнв обладают многочисленными преимуществами и потенциалом для применения в будущем, существует множество причин, по которым они еще не используются в широких масштабах. Эти причины включают в себя не только технические проблемы, связанные с их выделением и масштабированием производства, но и пробелы в знаниях, которые пока остаются в этой области. Одной из основных проблем (как и в случае с экзосомами животного происхождения) является стандартизация протокола выделения ЭКСПнв. В настоящее время нет единого идеального способа выделения ЭКСПнв, в том числе и с учетом возможности крупномасштабного промышленного производства. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, поэтому их использование и актуальность зависят от их последующего применения. Для выделения ЭКСПнв используются ультрацентрифугирование (УЦ), ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, фильтрация, осаждение полиэтиленгликолем и эксклюзионная хроматография. Если разделить эти методы на две основные категории, в зависимости от начального этапа выделения ЭКСПнв, то в большинстве исследований (примерно в 60 %) используется центрифугирование в градиенте плотности,

в то время как остальные 40 % базируются на дифференциальном центрифугировании/фильтрации/ультрацентрифугировании [44]. УЦ в градиенте плотности сахарозы является наиболее часто используемым методом, который позволяет получать ЭКСПнв с высоким уровнем чистоты. Однако это довольно трудоемкий процесс, который занимает значительное время. Кроме того, это один из наиболее дорогостоящих методов выделения. В настоящее время его коммерческая жизнеспособность не кажется многообещающей, поскольку данный метод очень трудно масштабировать, не говоря уже о том, что его воспроизводимость невысока и зависит от условий центрифугирования, включая тип используемого ротора. Осаждение полиэтиленгликолем (ПЭГ) — это неспецифичный метод выделения ЭКСПнв. Хотя он и обеспечивает относительно низкие уровни выхода и чистоты, метод достаточно прост в эксплуатации, характеризуясь при этом экономичностью и высокой скоростью выделения. Его коммерческая жизнеспособность может быть многообещающей, если удастся повысить уровень выхода и сочетать его с экономически выгодными методами дополнительной очистки осажденных ПЭГом ЭКСПнв. Эксклюзионная хроматография является одним из лучших методов выделения, поскольку она обеспечивает очень высокий уровень выхода при относительно высоком уровне чистоты, а также высокий уровень функциональной биологической активности ЭКСПнв. Однако метод чрезвычайно трудоемкий, что делает его коммерческую жизнеспособность маловероятной, если только не удастся его эффективно масштабировать.

Второй большой проблемой являются пробелы в знаниях о составе и структурных особенностях ЭКСПнв. Как, известно, большинство методов обнаружения ЭКС основаны на белковых маркерах ЭКС. В клетках млекопитающих тетраспонины CD63, CD81 и CD9 являются одними из наиболее распространенных маркеров экзосом, в то время как везикулы бактерий могут быть идентифицированы с помощью таких маркеров, как белок внешней мембраны A (OmpA) и липотейхоевая кислота. Тем не менее, существует значительно меньше информации о маркерных белках растительных везикул [57]. В одном исследовании изучалось наличие поверхностных белков на везикулах, полученных из цитрусовых, и удалось успешно идентифицировать некоторые распространенные белки-маркеры, в том числе белки, подобные пателлину-3, и белки с тяжелой цепью клатрина [58]. Однако в других работах были получены противоречивые результаты, поэтому необходимы дополнительные исследования по данному вопросу.

Заключение

В настоящем обзоре были детально рассмотрены научные достижения в области получения и исследования свойств везикул, механизмов их действия и практического применения таких структур в биомедицине. Было показано, что экзосомы, полученные из клеток человека, могут стабильно и направленно доставлять лекарственные препараты в клетки-мишени, вызывая желаемый терапевтический эффект. Были рассмотрены основные требования, предъявляемые к носителям, способам адресной доставки наноконъюгатов к биологическим мишеням. Выделены ограничивающие факторы применения вышеописанных структур, обусловленные их биологической сущностью, такие как высокая иммуногенность и потенциальный риск переноса опасных биомолекул. Отдельно было показано, что искусственные экзосомы имеют коммерческие преимущества благодаря своей высокой производительности. Можно сделать вывод о том, что искусственные аналоги экзосомоподобных нановезикул растительного происхождения и экзосом молока сельскохозяйственных животных обладают множеством преимуществ, таких как низкая иммуногенность, стабильность в желудочно-кишечном тракте и возможность широкомасштабного производства. Однако их использование на сегодняшний день ограничено недостатком фактических данных о воздействии экзогенных экзосом на организм человека и/или методов их характеристики.

Таким образом, выбор наиболее подходящих для доставки лекарств наноносителей экзосомального типа будет зависеть от того, насколько успешно будут преодолены ограничения, связанные с каждым типом экзосом, а также решены общие для всех видов экзосом проблемы технологического плана, такие как стандартизация методов выделения и очистки экзосом, пригодных для массового производства, контроль качества и совершенствование методов загрузки лекарственных препаратов.

Конфликт интересов/ Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование финансировалось в рамках государственного задания Минздрава РФ № 124021600040–2. / The study was funded under the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 124021600040–2.

Список литературы / References

1. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–978. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
2. Von Schulze A, Deng F. A review on exosome-based cancer therapy. *J Cancer Metastasis Treat*. 2020;6:42. DOI:10.20517/2394-4722.2020.79.
3. Gomzikova MO, James V, Rizvanov AA. Mitochondria Donation by Mesenchymal Stem Cells: Current Understanding and Mitochondria Transplantation Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 7;9:653322. DOI: 10.3389/fcell.2021.653322.
4. Poinsot V, Pizzinat N, Ong-Meang V. Engineered and Mimicked Extracellular Nanovesicles for Therapeutic Delivery. *Nanomaterials (Basel)*. 2024 Apr 6;14(7):639. DOI: 10.3390/nano14070639.
5. Liu C, Su C. Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics*. 2019 Jan 30;9(4):1015–1028. DOI: 10.7150/thno.30853.
6. Donoso-Quezada J, Ayala-Mar S, González-Valdez J. State-of-the-art exosome loading and functionalization techniques for enhanced therapeutics: a review. *Crit Rev Biotechnol*. 2020 Sep;40(6):804–820. DOI: 10.1080/07388551.2020.1785385.
7. Ferguson SW, Nguyen J. Exosomes as therapeutics: The implications of molecular composition and exosomal heterogeneity. *J Control Release*. 2016 Apr 28;228:179–190. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.02.037.
8. Caradec J, Kharmate G, Hosseini-Beheshti E, et al. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clin Biochem*. 2014 Sep;47(13–14):1286–1292. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.06.011.
9. Wen Y, Chen Y, Wang G, et al. Factors influencing the measurement of the secretion rate of extracellular vesicles. *Analyst*. 2020 Aug 24;145(17):5870–5877. DOI: 10.1039/d0an01199a.
10. Haraszti RA, Miller R, Stoppato M, et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Mol Ther*. 2018 Dec 5;26(12):2838–2847. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.09.015.
11. Syromiatnikova V, Prokopenko A, Gomzikova M. Methods of the Large-Scale Production of Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 10;23(18):10522. DOI: 10.3390/ijms231810522.
12. Harmati M, Tarnai Z, Decsi G, et al. Stressors alter intercellular communication and exosome profile of nasopharyngeal carcinoma cells. *J Oral Pathol Med*. 2017 Apr;46(4):259–266. DOI: 10.1111/jop.12486.
13. Wen Y, Fu Q, Soliwoda A, Zhang S, et al. Cell-derived nanovesicles prepared by membrane extrusion are good substitutes for natural extracellular vesicles. *Extracell Vesicle*. 2022 Dec;1:100004. DOI: 10.1016/j.vesic.2022.100004.
14. Jang SC, Kim OY, Yoon CM, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano*. 2013 Sep 24;7(9):7698–7710. DOI: 10.1021/nn402232g.
15. Yakubovich EI, Polischouk AG, Evtushenko VI. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biologicheskie membrany`=biological membranes*. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol*. 2022;16(2):115–126. DOI: 10.1134/S1990747822030096. In Russian [Якубович Е.И., Полищук А.Г., Евтушенко В.И. Принципы и проблемы выделения экзосом из биологических жидкостей. *Биологические мембраны*. 2022;39(3):172–185].
16. Wang J, Ma P, Kim DH, et al. Towards Microfluidic-Based Exosome Isolation and Detection for Tumor Therapy. *Nano Today*. 2021 Apr;37:101066. DOI: 10.1016/j.nantod.2020.101066.
17. ExoQuick® ULTRA EV Isolation System. System Biosciences. Available from: <https://www.systembio.com/products/exosome-research/exosome-isolation/exoquick-ultra/serum-and-plasma-0/the-purest-and-highest-yielding-ev-isolation-system> (Accessed [10.12.2024]).
18. Grigorieva AE, Dyrkheeva NS, Bryzgunova OE, et al. Contamination of exosome preparations isolated from biological fluids. *Biomedical chemistry*. 2017;63(1):91–96. In Russian [Григорьева А.Е., Дырхеева Н.С., Брызгунова О.Е. и др. Контаминация препаратов экзосом, выделенных из биологических жидкостей. *Биомедицинская химия*. 2017;63(1):91–96]. DOI:10.18097/PBMC2017630191.
19. Muzykantov VR. Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010 Apr;7(4):403–27. DOI: 10.1517/17425241003610633.
20. Koleva LD, Ataullakhanov FI, Sinauridze EI. Erythrocyte as an ideal carrier for intravascular drug delivery. *Voprosy` gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii=Issues of hematology/oncology and immunopathology in pediatrics*. 2020;19(4):234–242. In Russian [Колева Л.Д., Атауллаханов Ф.И., Синауридзе Е.И. Эритроцит как идеальный носитель для внутрисосудистой доставки лекарств. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2020;19(4):234–242]. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-4-234-242>.
21. Bustamante López SC, Meissner KE. Characterization of carrier erythrocytes for biosensing applications. *J Biomed Opt*. 2017 Sep 1;22(9):91510. DOI: 10.1117/1.JBO.22.9.091510.
22. Levene M, Bain MD, Moran NF, et al. Safety and Efficacy of Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase in Mitochondrial Neurogastrointestinal

Encephalomyopathy. *J Clin Med*. 2019 Apr 5;8(4):457. DOI: 10.3390/jcm8040457.

23. Anselmo AC, Gupta V, Zern BJ, et al. Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells. *ACS Nano*. 2013 Dec 23;7(12):11129–11137. DOI: 10.1021/nn404853z.

24. Rossi NA, Constantinescu I, Kainthan RK, et al. Red blood cell membrane grafting of multi-functional hyperbranched polyglycerols. *Biomaterials*. 2010 May;31(14):4167–4178. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.137.

25. Pouliot R, Saint-Laurent A, Chypre C, et al. Spectroscopic characterization of nanoErythroosomes in the absence and presence of conjugated polyethyleneglycols: an FTIR and (31)P-NMR study. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Aug 31;1564(2):317–324. DOI: 10.1016/s0005-2736(02)00465-0.

26. Hu CM, Fang RH, Zhang L. Erythrocyte-inspired delivery systems. *Adv Healthc Mater*. 2012 Sep;1(5):537–547. DOI: 10.1002/adhm.201200138.

27. Kim SH, Kim EJ, Hou JH, et al. Oposonized erythrocyte ghosts for liver-targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):959–967. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.031.

28. Mishra PR, Jain NK. Folate conjugated doxorubicin-loaded membrane vesicles for improved cancer therapy. *Drug Deliv*. 2003 Oct-Dec;10(4):277–282. DOI: 10.1080/drd_10_4_277.

29. Gupta N, Patel B, Ahsan F. Nano-engineered erythrocyte ghosts as inhalational carriers for delivery of fasudil: preparation and characterization. *Pharm Res*. 2014 Jun;31(6):1553–1565. DOI: 10.1007/s11095-013-1261-7.

30. Barathan M, Ng SL, Lokanathan Y, et al. Milk-Derived Extracellular Vesicles: A Novel Perspective on Comparative Therapeutics and Targeted Nanocarrier Application. *Vaccines (Basel)*. 2024 Nov 15;12(11):1282. DOI: 10.3390/vaccines12111282.

31. Ishikawa H, Rahman MM, Yamauchi M, et al. mRNA Profile in Milk Extracellular Vesicles from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *Viruses*. 2020 Jun 20;12(6):669. DOI: 10.3390/v12060669.

32. Li J, Shang X, Zhang S, et al. Breed-Related Differential microRNA Expression and Analysis of Colostrum and Mature Milk Exosomes in Bamei and Landrace Pigs. *Int J Mol Sci*. 2024 Jan 4;25(1):667. DOI: 10.3390/ijms25010667.

33. García-Martínez J, Pérez-Castillo ÍM, Salto R, et al. Beneficial Effects of Bovine Milk Exosomes in Metabolic Interorgan Cross-Talk. *Nutrients*. 2022 Mar 30;14(7):1442. DOI: 10.3390/nu14071442.

34. Adriano B, Cotto NM, Chauhan N, et al. Milk exosomes: Nature's abundant nanoplatform for theranostic applications. *Bioact Mater*. 2021 Feb 2;6(8):2479–2490. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.009.

35. Tian MY, Hao DX, Liu Y, et al. Milk exosomes: an oral drug delivery system with great application potential. *Food Funct*. 2023 Feb 6;14(3):1320–1337. DOI: 10.1039/d2fo02013k.

36. Roy D, Ye A, Moughan PJ, et al. Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species-A Review. *Front Nutr*. 2020 Oct 6;7:577759. DOI: 10.3389/fnut.2020.577759.

37. Wijenayake S, Eisha S, Tawhidi Z, et al. Comparison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk. *PLoS One*. 2021 Sep 30;16(9):e0257633. DOI: 10.1371/journal.pone.0257633.

38. Li X, Su L, Zhang X, et al. Recent Advances on the Function and Purification of Milk Exosomes: A Review. *Front Nutr*. 2022 Jun 9;9:871346. DOI: 10.3389/fnut.2022.871346.

39. Zhang Q, Xiao Q, Yin H, et al. Milk-exosome based pH/light sensitive drug system to enhance anticancer activity against oral squamous cell carcinoma. *RSC Adv*. 2020 Jul 29;10(47):28314–28323. DOI: 10.1039/d0ra05630h.

40. Lugini L, Valtieri M, Federici C, et al. Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*. 2016 Aug 2;7(31):50086–50098. DOI: 10.18632/oncotarget.10574.

41. Cossetti C, Lugini L, Astrologo L, et al. Soma-to-germline transmission of RNA in mice xenografted with human tumour cells: possible transport by exosomes. *PLoS One*. 2014 Jul 3;9(7):e101629. DOI: 10.1371/journal.pone.0101629.

42. Canitano A, Venturi G, Borghi M, et al. Exosomes released in vitro from Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells contain EBV-encoded latent phase mRNAs. *Cancer Lett*. 2013 Sep 1;337(2):193–199. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.05.012.

43. Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, et al. The Potentiality of Plant-Derived Nanovesicles in Human Health-A Comparison with Human Exosomes and Artificial Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 28;23(9):4919. DOI: 10.3390/ijms23094919.

44. Karamanidou T, Tsouknidas A. Plant-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutic Nanocarriers. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 24;23(1):191. DOI: 10.3390/ijms23010191.

45. Alzahrani FA, Khan MI, Kameli N, et al. Plant-Derived Extracellular Vesicles and Their Exciting Potential as the Future of Next-Generation Drug Delivery. *Biomolecules*. 2023 May 15;13(5):839. DOI: 10.3390/biom13050839.

46. Woith E, Guerriero G, Hausman JF, et al. Plant Extracellular Vesicles and Nanovesicles: Focus on Secondary Metabolites, Proteins and Lipids with Perspectives on Their Potential and Sources. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 2;22(7):3719. DOI: 10.3390/ijms22073719.

47. Rome S. Biological properties of plant-derived extracellular vesicles. *Food Funct*. 2019 Feb 20;10(2):529–538. DOI: 10.1039/c8fo02295j.

48. Ju S, Mu J, Dokland T, et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol Ther.* 2013 Jul;21(7):1345–57. DOI: 10.1038/mt.2013.64.

49. Teng Y, Ren Y, Sayed M, et al. Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota. *Cell Host Microbe.* 2018 Nov 14;24(5):637–652.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2018.10.001.

50. Stanly C, Alfieri M, Ambrosone A, et al. Grapefruit-Derived Micro and Nanovesicles Show Distinct Metabolome Profiles and Anticancer Activities in the A375 Human Melanoma Cell Line. *Cells.* 2020 Dec 21;9(12):2722. DOI: 10.3390/cells9122722.

51. Chen Q, Li Q, Liang Y, et al. Natural exosome-like nanovesicles from edible tea flowers suppress metastatic breast cancer via ROS generation and microbiota modulation. *Acta Pharm Sin B.* 2022 Feb;12(2):907–923. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.08.016.

52. Raimondo S, Naselli F, Fontana S, et al. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget.* 2015 Aug 14;6(23):19514–19527. DOI: 10.18632/oncotarget.4004.

53. Kim MK, Choi YC, Cho SH, et al. The Antioxidant Effect of Small Extracellular Vesicles Derived from Aloe vera Peels for Wound Healing. *Tissue Eng Regen Med.* 2021 Aug;18(4):561–571. DOI: 10.1007/s13770-021-00367-8.

54. Wang B, Zhuang X, Deng ZB, et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Mol Ther.* 2014 Mar;22(3):522–534. DOI: 10.1038/mt.2013.190.

55. Wang Q, Ren Y, Mu J, et al. Grapefruit-Derived Nanovectors Use an Activated Leukocyte Trafficking Pathway to Deliver Therapeutic Agents to Inflammatory Tumor Sites. *Cancer Res.* 2015 Jun 15;75(12):2520–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3095.

56. Zhuang X, Teng Y, Samykutty A, et al. Grapefruit-derived Nanovectors Delivering Therapeutic miR17 Through an Intranasal Route Inhibit Brain Tumor Progression. *Mol Ther.* 2016 Feb;24(1):96–105. DOI: 10.1038/mt.2015.188.

57. Kameli N, Dragojlovic-Kerkache A, Savelkoul P, et al. Plant-Derived Extracellular Vesicles: Current Findings, Challenges, and Future Applications. *Membranes (Basel).* 2021 May 29;11(6):411. DOI: 10.3390/membranes11060411.

58. Pocsfalvi G, Turiák L, Ambrosone A, et al. Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *J Plant Physiol.* 2018 Oct; 229:111–121. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.07.006.

Информация об авторах:

Полищук Анна Генриховна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России;

Якубович Елена Игоревна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России;

Евтушенко Владимир Иванович, д.б.н., руководитель лаборатории генной инженерии ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А. М. Гранова» Минздрава России.

Authors information:

Anna G. Polischouk, PhD, senior researcher, laboratory of genetic engineering, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies;

Elena I. Yakubovich, PhD, leading researcher, laboratory of genetic engineering, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies;

Vladimir I. Evtushenko, Dr.habil., head of the laboratory of genetic engineering, Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies.