

defect. // *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. – 2018. – 52(2): 205-211. doi: 10.1002/uog.19042

10. Pulignani S., Vecoli C., Borghini A., Foffa I., Ait-Ali L., Andreas si M. G. Targeted next-generation sequencing in patients with non-syndromic congenital heart disease // *Pediatric cardiology*. – 2018. – 39(4): 682689. doi: 10.1007/s00246-018-1806-y

11. Sheng W., Wang H., Ma X., Qian Y., Zhang P., Wu Y., M, D. LINE-1 methylation status and its association with tetralogy of Fallot in infants // *BMC medical genomics*. – 2012. – 5(1):20. doi: 10.1186/1755-8794-5-20

УДК 57:085.23

**Перминова К.Е., Сичкар Д.А., Макеев О.Г.
ЭКЗОСОМЫ КАК СРЕДСТВО ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ**

Кафедра медицинской биологии и генетики
Уральский государственный медицинский университет
Лаборатория технологий геной и клеточной терапии
Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**Perminova K.E., Sichkar D.A., Makeev O.G.
EXOSOMES AS A MEANS OF TARGETED DRUG DELIVERY**

Department of medical biology and genetics
Laboratory of gen-technology and cellular therapy
Institute of medical cell technologies
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: perminova.kristina00@mail.ru

Аннотация. Экзосомы являются подгруппой внеклеточных везикул размерами от 40 нм до 100 нм. Они осуществляют эנדogenous механизм межклеточной коммуникации. С момента открытия того, что на поверхности мембран экзосом имеются специфические рецепторы, которые способствуют целенаправленной передаче биологической информации конкретным «клеткам-мишеням», потенциальное использование экзосом в качестве средств доставки лекарств приобрело значительный научный интерес. Данный вид внеклеточных везикул может иметь множество преимуществ перед имеющимися в настоящее время средствами доставки лекарственных средств, таких как способность преодолевать естественные барьеры, их свойства нацеливания на клетки и защита содержимого от воздействия окружающей среды. Целью данной работы

является обобщение подходов нагрузки внеклеточных везикул экзогенными грузами и обсуждение их преимуществ и ограничений.

Annotation. Exosomes are a subgroup of extracellular vesicles ranging in size from 40 nm to 100 nm. They are an endogenous mechanism of intercellular communication. Since the discovery that there are specific receptors on the surface of exosome membranes that facilitate the targeted transfer of biological information to specific "target cells", the potential use of exosomes as drug delivery vehicles has gained considerable scientific interest. This type of extracellular vesicle may have many advantages over currently available drug delivery systems, such as the ability to overcome natural barriers, their cell-targeting properties, and the protection of the contents from environmental influences. The aim of this work is to generalize the approaches of loading extracellular vesicles with exogenous loads and to discuss their advantages and limitations.

Ключевые слова: экзосомы, внеклеточные везикулы, таргетная доставка лекарственных средств.

Key words: exosomes, extracellular vesicles, targeted drug delivery.

Введение

Клетки млекопитающих могут выделять различные типы внеклеточных везикул, включая экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела. Эта классификация основана на их внутриклеточном происхождении. Экзосомы представляют собой наноразмерные (40-100 нм) мембранные везикулы, секретируемые различными типами клеток. Считается, что экзосомы высвобождаются во внеклеточную среду из мультивезикулярных телец после их слияния с плазматической мембраной. Они передают информацию, перенося свое содержимое от донорских клеток к клеткам-реципиентам, что приводит к функциональным изменениям и/или к дифференцировке клеток-мишеней. Экзосомы осуществляют доставку и защищают специфические мРНК, регуляторные микроРНК, липиды и белки [1].

В настоящее время экзосомы применяются в медицине для ранней диагностики различных заболеваний (например, онкологических патологий), поскольку они переносят специфические биомаркеры состояния продуцирующих их клеток [1]. Исследования последних лет продемонстрировали, что экзосомы могут использоваться не только для диагностики, но и как средство доставки лекарственных средств для таргетной терапии. Несколькими авторами показаны преимущества использования экзосом в качестве наноносителей. Эти преимущества включают небольшой размер для их проникновения в глубокие ткани, отрицательный Дзета-потенциал для длительной циркуляции и деформируемый цитоскелет, а также их сходство с клеточными мембранами, что позволяет экзосомам преодолевать физиологические барьеры. Кроме того, некоторые экзосомы не подвергаются разрушающему действию со стороны клеток иммунной системы. В целом,

экзосомы являются идеальными природными наноносителями для клинического применения из-за их естественных биосовместимых характеристик.

Материалы и методы исследования

Экзосомы получают из различных клеточных культур, из тканевых эксплантатов, а также из сыворотки крови [2]. В настоящее время используются следующие методы: ультрацентрифугирование, фильтрация, хроматография с исключением размера и осаждения полимеров. Для получения сверхчистых экзосом или выделения потенциальной субпопуляции экзосом может быть применена стратегия иммуномагнитной изоляции путем таргетирования экзосомальных маркеров.

Результаты исследования и их обсуждение

Методы загрузки экзосом терапевтическим грузом

При применении экзосом для таргетной терапии одной из основных задач является достижение эффективной загрузки терапевтических грузов в экзосомы. Липосомы и другие синтетические носители могут быть загружены интересующими лекарствами в процессе синтеза, в то время как экзосомы выделяются из родительских клеток, так что они должны подвергаться загрузке груза либо непосредственно после образования, либо в свои донорские клетки на первом этапе. Также методы загрузки подразделяются на пассивные и активные.

Пассивные методы загрузки экзосом

1. Инкубация лекарственных средств с экзосомами

Экзосомы инкубируют с лекарствами, и лекарства диффундируют в экзосомы по градиенту концентрации. Эффективность загрузки зависит от гидрофобности молекул препарата. Гидрофобные лекарственные средства могут взаимодействовать с липидными слоями мембраны везикул. Например, в одном исследовании авторы успешно загрузили фермент каталазу и тетрамерный белок 250 kDa в экзосомы, полученные из клеточной линии RAW264.7 в буфере PBS при комнатной температуре в течение 18 ч [3]. Основным недостатком этого метода может быть его низкая производительность.

2. Инкубация с донорскими клетками

Донорские клетки обрабатываются лекарством, и эти клетки затем выделяют экзосомы, загруженные лекарством. Pascucci и др. обработали ММСК SR4987 низкой дозой паклитаксела в течение 24 ч, затем промыли клетки и переселили их в новый флакон со свежей средой [4]. Через 48 ч культивирования собирали клеточную кондиционированную среду и выделяли экзосомы. Нагруженные паклитакселом экзосомы из обработанных клеток обладали значительной антипролиферативной активностью в отношении клеток поджелудочной железы человека CFPAC-1, по сравнению с экзосомами из необработанных клеток.

Активные методы загрузки

1. Сонификация

Экзосомы из донорских клеток смешивают с лекарственными препаратами или белками и затем подвергают ультразвуковой обработке с помощью

гомогенизатора. Механическая сила сдвига зонда гомогенизатора нарушает целостность мембраны экзосом и позволяет лекарству диффундировать в экзосомы во время этой деформации мембраны. Целостность мембран экзосом восстанавливается в течение часа, когда экзосомы инкубируются при 37°C [5].

2. Электропорация

Этот метод основывается на создании небольших пор в мембране экзосомы путем приложения электрического поля к экзосомам, взвешенным в проводящем растворе. Электрический ток нарушает фосфолипидный бислой экзосом, что приводит к образованию временных пор. Лекарства или нуклеотиды могут впоследствии диффундировать внутрь экзосом через поры. Целостность мембраны экзосомы затем восстанавливается после процесса загрузки препарата. Этот метод широко используется для загрузки микроРНК в экзосомы, поскольку эти молекулы относительно велики и не могут самопроизвольно диффундировать в экзосому, как это делают небольшие гидрофобные молекулы. Электропорация приводит к более высокой нагрузке микроРНК по сравнению с химической трансфекцией [6]. Однако электропорация может вызвать агрегацию РНК и нестабильность экзосомы, что приводит к низкой нагрузочной способности.

3. Экструзия

Экзосомы из донорских клеток смешивают с лекарственным средством, и смесь загружают в липидный экструдер на основе шприца с пористыми мембранами 100-400 нм при контролируемой температуре. Во время экструзии мембрана экзосомы разрушается и смешивается с лекарством. До сих пор неясно, изменяет ли жесткая механическая сила, используемая в этом методе, свойства мембраны, такие как Дзета-потенциал, и структуры мембранных белков. Fuhrmann и др. сообщают, что загрузка экзосом, выделенных из клеток рака молочной железы MDA-MB231, порфирином методом экструзии изменяет Дзета-потенциал исходных экзосом и вызывает цитотоксичность, в то время как загруженные порфирином экзосомы, полученные другими методами, не проявляют значительной цитотоксичности [7].

4. Циклы замораживания и оттаивания

В этой процедуре лекарственные препараты инкубируют с экзосомами при комнатной температуре в течение фиксированного количества времени, а затем смесь быстро замораживают при температуре -80 °C или в жидком азоте и размораживают при комнатной температуре. Этот процесс повторяется не менее 3 циклов для обеспечения инкапсуляции препарата [8]. Однако этот метод может индуцировать агрегацию экзосом, что приводит к широкому распределению экзосом с лекарственной нагрузкой по размерам. Емкость загрузки лекарственного средства методом замораживания/оттаивания обычно ниже, чем у методов ультразвука или экструзии.

Выводы

Различные подходы, используемые для загрузки грузов в экзосомы, имеют различную эффективность, которая зависит от свойств груза, таких как

гидрофильность, гидрофобность и молекулярная масса. Однако эффективность загрузки - не единственный фактор, который необходимо учитывать. Целостность и стабильность мембран экзосом также важны для доставки лекарств. Хотя загрузка терапевтических средств в экзосомы с помощью ультразвука и экструзии приводит к хорошей производительности, другие исследования показали, что целостность мембраны нарушается, и структура мембраносвязывающего белка может изменяться, что влияет на терапевтический эффект загруженных лекарственными препаратами экзосом. Поэтому необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, экзосомы являются одним из идеальных и конкурентоспособных наноносителей для доставки лекарственных средств, сочетающим в себе маленький размер частиц с нецитотоксическими эффектами, высокой способностью переносить лекарства и низким иммуногенным профилем. Однако важно проведение дополнительных исследований для улучшения методов масштабного производства, которые обеспечат беспрецедентную эффективность экзосом в лечении многих опасных для жизни состояний, в том числе тех, которые лишены средств таргетной доставки для обеспечения эффективной фармакотерапии.

Список литературы:

1. Batrakova E.V. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery/ Batrakova E.V., Kim M.S.// *J Control Release* – 2016. - №219. – P. 396–405.
2. Lucia Mincheva-Nilsson Isolation and Characterization of Exosomes from Cultures of Tissue Explants and Cell Lines/ Lucia Mincheva-Nilsson, Vladimir Baranov, Olga Nagaeva, and Eva Dehlin// *Current Protocols in Immunology* – 2016. - №115. – P.1-21
3. Haney M.J. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy./ Haney M.J., Klyachko N.L., Zhao Y.L., Gupta R., Plotnikova E.G., He Z.J., *et al* // *J Control Release* – 2016. - №207. – P. 18-30.
4. Ascucci L. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery/ Ascucci L., Cocce V., Bonomi A., Ami D., Ceccarelli P., Ciusani E., *et al.* // *J Control Release* – 2018. - №192. – P. 262-270.
5. Kim M.S. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells/ Kim M.S., Haney M.J., Zhao Y., Mahajan V., Deygen I., Klyachko N.L., *et al.* // *Nanomed-Nanotechnol* – 2016. - №12. – P. 655-664.
6. Wahlgren J. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes/ Wahlgren J., Karlson T.D., Brisslert M., Sani F.V., Telemo E., Sunnerhagen P., *et al.* // *Nucleic Acids Res* – 2016. - №40. – P. 130 - 136
7. Fuhrmann G. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins/ Fuhrmann G., Serio A., Mazo M., Nair R., Stevens M.M.// *J Control Release* – 2017. - №106. – P. 35-44.

8.Sato Y.T. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes/
Sato Y.T., Umezaki K., Sawada S., Mukai S., Sasaki Y., Harada N., et al.// Sci Rep
- 2020. - №6. – P. 219 - 233.

УДК 577.121.2

**Петров А.В., Марсянова Ю.А.
ИЗМЕНЕНИЕ СТЕПЕНИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ
ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕФИЦИТЕ
ОКСИДА АЗОТА**

Кафедра биологической химии с курсом КЛД ФДПО
ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России
Рязань, Российская Федерация

**Petrov A.V., Marsyanova Y.A.
CHANGE IN THE VALUE OF ENDOGENIC INTOXICATION OF RAT
ERYTHROCYTES IN EXPERIMENTAL NITROGEN OXIDE DEFICIENCY**

Кафедра биологической химии с курсом КЛД ФДПО
Ryazan State Medical University
Ryazan, Russian Federation

E-mail: ¹chasedflea089@icloud.com, ²yuliyamarsyanova@yahoo.com

Аннотация. Накопление веществ низкой и средней молекулярной массы служит показателем степени эндогенной интоксикации. Материалом для исследования служила плазма и эритроциты крыс сток Wistar, которые были разделены на 2 группы: получавших в качестве модулятора дефицита оксида азота L-NAME в дозировке 25 мг/кг массы тела и группу контроля. Результаты. Уровень метаболитов NO в плазме животных опытной группы оказался достоверно ниже. Накопление малонового диальдегида в эритроцитах крыс, получавших L-NAME, указывает на индукцию перекисного окисления липидов. Степень эндогенной интоксикации достоверно повысилась у животных экспериментальной группы и оказалась более выраженной в части спектра, отражающей накопление метаболитов пуринового обмена. Выводы. Дефицит NO приводит к индукции ПОЛ мембран эритроцитов и повышению степени эндогенной интоксикации.

Annotation. The accumulation of substances of low and medium molecular weight serves as an indicator of the value of endogenous intoxication. The material for the study was the plasma and erythrocytes of Wistar stock-malerats, which were divided into 2 groups: those who received L-NAME as a modulator of nitric oxide deficiency at a dosage of 25 mg / kg of body weight and a control group. Results. The level of NO metabolites in the plasma of the experimental group was significantly lower. The accumulation of malondialdehyde in the erythrocytes of rats treated with