

<https://russjcardiol.elpub.ru>  
doi:10.15829/1560-4071-2020-4081

ISSN 1560-4071 (print)  
ISSN 2618-7620 (online)

## Терапия внеклеточными везикулами: возможности, механизмы и перспективы применения

Великонивцев Ф. С., Головкин А. С.

Внеклеточные везикулы — биологические мембранные объекты, имеющие размеры <1000 нм, транспортирующие многие биологически активные молекулы (белки, микроРНК, мРНК, ДНК и т.д.), а также способные выполнять многие биологические функции и обеспечивать межклеточные взаимодействия. В настоящее время активно изучаются возможности их терапевтического применения при различных патологических состояниях и заболеваниях. В большинстве случаев в качестве клеточного источника внеклеточных везикул рассматриваются мезенхимальные стволовые клетки, а реализуемые терапевтические эффекты связывают с переносимыми микроРНК. В *in vitro* исследованиях показано, что внутриклеточные везикулы могут стимулировать регенерацию и ангиогенез, оказывать противовоспалительное, противоапоптотическое действие. Проводимые исследования, рассмотренные и структурированные нами в данном обзоре, демонстрируют перспективы клинического применения внеклеточных везикул в терапии таких патологических состояний, как окислительный стресс, ишемическое и реперфузионное повреждение тканей и органов, опухолевый рост и т.д.

**Ключевые слова:** внеклеточные везикулы, терапевтическое применение, микроРНК.

**Отношения и деятельность.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20076).

Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

Великонивцев Ф. С. — студент Института Медицинского образования Центра Алмазова, ORCID: 0000-0002-1830-8340, ResearcherID: AAY-4886-2020, Головкин А. С.\* — руководитель группы гено-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики, ORCID: 0000-0002-7577-628X, ResearcherID: I-2583-2014.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):  
golovkin\_a@mail.ru

ВВ — внеклеточные везикулы, ИЛ — интерлейкин, ЛЖ — левый желудочек, ММП — матриксные металлопротеиназы, МСК — мезенхимальные стволовые клетки, ФНО $\alpha$  — фактор некроза опухоли  $\alpha$ ,  $\alpha$ SMA — гладкомышечный актин, BDNF — нейротрофический фактор мозга, CNTF — цилиарный нейротрофический фактор, IFN $\gamma$  — интерферон- $\gamma$ , NGF — фактор роста нервов, TGF $\beta$  — трансформирующий фактор роста- $\beta$ , Th — Т-хелпер.

**Рукопись получена** 01.09.2020

**Рецензия получена** 07.09.2020

**Принята к публикации** 15.09.2020



**Для цитирования:** Великонивцев Ф. С., Головкин А. С. Терапия внеклеточными везикулами: возможности, механизмы и перспективы применения. *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(10):4081. doi:10.15829/1560-4071-2020-4081

## Extracellular vesicle therapy: effectiveness, mechanisms and application potentials

Velikonitvsev F. S., Golovkin A. S.

Extracellular vesicles are biological membrane objects sized <1000 nm, transporting many biologically active molecules (proteins, microRNA, mRNA, DNA, etc.) and performing many biological functions and providing intercellular interactions. At present, the possibilities of their therapeutic use in various pathological conditions and diseases are being actively studied. In most cases, mesenchymal stem cells are considered as a cellular source of extracellular vesicles, and the realized therapeutic effects are associated with the transferred microRNAs. *In vitro* studies have shown that intracellular vesicles can stimulate regeneration and angiogenesis, have antiinflammatory and antiapoptotic effects. The studies considered in current review demonstrate the prospects for the clinical use of extracellular vesicles in the treatment of pathological conditions such as oxidative stress, ischemia-reperfusion injury, tumor growth, etc.

**Key words:** extracellular vesicles, therapeutic use, microRNA.

**Relationships and Activities.** The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project № 19-75-20076).

Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russia.

Velikonitvsev F. S. ORCID: 0000-0002-1830-8340, ResearcherID: AAY-4886-2020, Golovkin A. S.\* ORCID: 0000-0002-7577-628X, ResearcherID: I-2583-2014.

\*Corresponding author: golovkin\_a@mail.ru

**Received:** 01.09.2020 **Revision Received:** 07.09.2020 **Accepted:** 15.09.2020

**For citation:** Velikonitvsev F. S., Golovkin A. S. Extracellular vesicle therapy: effectiveness, mechanisms and application potentials. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(10):4081. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2020-4081

Внеклеточные везикулы (ВВ) — биологические мембранные объекты, имеющие размеры <1000 нм, транспортирующие многие биологически активные молекулы (белки, микроРНК, мРНК, ДНК и т.д.), а также способные выполнять многие биологические

функции и обеспечивать межклеточные взаимодействия [1]. Известно, что часто их биологическая активность может оказываться очень высокой. В настоящее время ведется поиск новых подходов к использованию ВВ в качестве маркера и критерия диа-

гностики патологических состояний и заболеваний, индикатора заболеваний и/или эффективности проводимой терапии. Вместе с тем, все больше внимания уделяется изучению возможностей терапевтического применения ВВ. Количество сообщений об экспериментальных моделях применения ВВ с терапевтической целью в условиях *in vivo* увеличивается с каждым годом. Анализ исследований в этой области, а также определение перспектив дальнейших разработок и клинического применения, стали целью настоящего обзора.

### Потенциальные цели терапевтического применения ВВ

Ранее в многочисленных работах было показано, что ВВ могут принимать участие во многих биологических процессах, в частности, в ангиогенезе, межклеточных взаимодействиях, регуляции выживания клеток, воспалении, иммунном ответе, коагуляции, утилизации продуктов жизнедеятельности клеток [1].

Вместе с тем накапливаются результаты экспериментальных исследований о патологических состояниях и заболеваниях, при которых применение ВВ демонстрировало свою терапевтическую эффективность (табл. 1). В частности, имеются указания на стимулирующие регенерацию эффекты при ишемическом и ишемическом/реперфузионном повреждении клеток миокарда [2-12], на противоопухолевую эффективность внутриклеточных везикул [13-17], а также эффективность при терапии осложнений сахарного диабета [18-20]. Имеются данные о проостеогенном потенциале внутриклеточных везикул, что может найти применение при замещении костных дефектов [21-24]. Регенераторный потенциал рассматривается также и при повреждении печени [25-27], лёгких [28, 29], нервной ткани [30-35], кожных покровов [36, 37] и микроциркуляторного русла [38]. Перспективными могут оказаться свойства везикул оказывать стимулирующие пролиферацию действия [39-41], угнетать воспаление [42-44], снижать оксидативный стресс [45].

Таблица 1

#### Животные модели исследования терапевтического эффекта ВВ

Модель патологического состояния или заболевания	Животная модель	Путь введения	Эффект
Инфаркт миокарда [2-10]	Крыса [2-7, 9]	По периферии инфаркта [2-4] в/в [5-7, 9]	Увеличение фракции выброса [3, 5, 6], уменьшение КСО ЛЖ [2, 5, 6] Подавление апоптоза [3-4, 6, 7-9] Индукция ангиогенеза [3-5] Уменьшение фиброза [7, 9] Альтернативная поляризация макрофагов [7] Усиление АОС [9]
	Мышь [8, 10]	Интрамиокардиально [8, 10]	Подавление апоптоза [8] Уменьшение воспаления, альтернативная активация макрофагов [10]
Оксидативный стресс [45]	Крыса	Инъекция в орган [45]	Подавление апоптоза и стимуляция пролиферации [45]
Баллон-индуцированное повреждение сосудов [39]	Крыса	в/в [39]	Подавление пролиферации и миграции клеток, уменьшение экспрессии миозина 1E — уменьшение формирования неоинтимы [39]
Ишемия нижних конечностей [48]	Крыса	в/м [48]	Индукция ангиогенеза — улучшение перфузии [48]
Остеоартрит [42]	Крыса	Интраартикулярно [42]	Уменьшение зоны разрушения хряща Уменьшение синтеза провоспалительных цитокинов [42]
Ревматоидный артрит [43]	Крыса	Интраартикулярно [43]	Подавление дифференцировки Т-лимфоцитов [43]
Остеогенез [21-24]	Крыса [21, 24]	Имплантация коллагеновых губок с везикулами [21]	Индукция генов остеосинтеза [21, 24]
	Мышь [22, 23]	в/в [22] п/к имплантация на коллагеновых мембранах [23]	Увеличение пролиферации хондробластов [22] Усиление васкуляризации, накопление кальция и фосфора [23]
Дегенерация сетчатки [38]	Крыса	Интраорбитально [38]	Ингибирование апоптоза фоторецепторов Альтернативная активация микроглии [38]
Диабетическая ретинопатия [19]	Крыса	Интраконтинктивно [19]	Подавление сигнального каскада HMGB1 — подавление воспаления [19]
Венозный шунт [40]	Крыса	в/в [40]	Замедление гиперплазии неоинтимы, улучшение реэндотелизации [40]
Травма головного мозга [32, 33]	Крыса	в/в [32] Интраназально [33]	Индукция ангиогенеза, нейрогенеза [32] Блокада NFκB-пути [33]
Перерезка седалищного нерва [35]	Крыса	Пропитывание шовного материала [35]	Восстановление атрофированного нерва, аксональная регенерация, миелинизация [35]
Травма позвоночника [34]	Крыса	в/в [34]	Увеличение выживаемости нейронов, подавление апоптоза (микроРНК-21) [34]
Лёгочная гипертензия [28]	Крыса	в/в [28]	Уменьшение сосудистых перестроек и гипертрофии правого желудочка [28]

Таблица 1. Продолжение

Кожные раны [18, 36, 37]	Крыса	п/к [18]	Стимуляция ангиогенеза [18]
	Мышь	п/к [36] [37]	Уменьшение экспрессии $\alpha$ SMA [36] Ускорение реэпителизации и неоваскуляризации, увеличение количества кератина [37]
Трансплантация печени [44]	Крыса	в/в [44]	Замедление пролиферации клеток воспаления, уменьшение уровня IFN $\gamma$ [44]
Рассеянный склероз [30]	Мышь	в/в [30]	микроРНК-146b и другие противовоспалительные агенты — уменьшение степени демиелинизации [30]
Ишемический инсульт [12]	Мышь	в/в [12]	Уменьшение зоны инфаркта, подавление апоптоза [12]
Бронхолёгочная дисплазия [41]	Мышь	в/в [41]	Альтернативная активация макрофагов, индукция ангиогенеза [41]
Рассеянный склероз [31]	Мышь	в/в [31]	Уменьшение атрофии коры, уменьшение уровня провоспалительных цитокинов и активации микроглии [31]
Ранение лёгкого [29]	Мышь	в/в [29]	Подавление сигнальных путей воспаления, уменьшение экспрессии SAA3 — уменьшение отёка [29]
Фиброз печени [25]	Мышь	Интраперитонеально [25]	Уменьшение экспрессии коллагена и активности Smad2 — противofiбротический и противовоспалительный эффекты [25]
Острое поражение печени [26, 27]	Мышь	в/в [26, 27]	Уменьшение уровня NLRP3, каспазы-1, противовоспалительных цитокинов [26, 27]
Колит [47]	Мышь	Интраперитонеально [47]	Уменьшение выработки про- и увеличение противовоспалительных цитокинов [47]
Диабетическая нейропатия [20]	Мышь	в/в [20]	Уменьшение повреждения канальцев, экспрессии $\alpha$ SMA, ММП, Коллагена-I [20]
Апластическая анемия [46]	Мышь	в/в [46]	Увеличение гематопозитической ткани и регуляторных Т-лимфоцитов, уменьшение Th17 [46]
Карциномы [15-17]	Мышь	в/в [16]	Уменьшение размеров опухоли [15, 16]
		Внутрь опухоли [15, 17]	Увеличение апоптоза опухолевых клеток [15-17]
			Замедление ангиогенеза [16] Подавление миграции [16, 17] и пролиферации [17]
Глиобластома [13]	Мышь	в/в [13]	Увеличение апоптоза, миграции, инвазии, чувствительности к химиопрепаратам [13]
Глиома [14]	Мышь	в/в [14]	Облегчение прохождения через ГЭБ — повышение эффективности химиотерапии [14]
Рак молочной железы [51]	Мышь	в/в [50]	Увеличение доли покоящихся клеток — замедление пролиферации [50]

**Сокращения:** АОС — антиоксидантная система, в/в — внутривенно, в/м — внутримышечно, ГЭБ — гематоэнцефалический барьер, КСО ЛЖ — конечный систолический объём левого желудочка, ММП — матриксные металлопротеиназы, п/к — подкожно,  $\alpha$ SMA — гладкомышечный актин, Th — Т-хелпер.

### Источники ВВ для терапевтического применения

При выборе стратегии использования ВВ в терапевтических целях в первую очередь необходимо определиться с их клеточным источником. Очевидно, что целесообразно использовать культуру клеток как стабильный источник материала. При этом клеточная культура должна достаточно легко культивироваться, обладать известными биологическими свойствами, продуцировать большое количество ВВ.

Видовая принадлежность получаемых для экспериментального терапевтического применения ВВ представлена материалом от человека, крысы, мыши. В настоящее время в большинстве работ рассматриваются именно клетки человека в качестве источника биологического материала (рис. 1). Чаще всего это мезенхимальные стволовые клетки (МСК) костного мозга [23, 24, 30, 32, 46], пуповины [5, 9, 17, 19, 25-28, 33, 36, 40, 41, 45, 47] и жировой ткани [31, 42]. В ряде случаев источник МСК не был конкретизирован [6, 10, 22, 23, 29, 30, 39, 32, 46]. Стволовые клетки немезенхимального происхождения

выделяли из жировой ткани [8, 35, 37], использовали стволовые клетки-предшественники нервной ткани [4, 38], резидуальные стволовые клетки печени [16, 20], а также индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS cells) [48]. Иные клеточные источники: предшественники кардиомиоцитов [2, 3, 49], макрофаги [12, 14, 15, 50, 51], Т-лимфоциты [44] и гранулоциты [43]. В ряде случаев ВВ получали не из клеточных культур, а из биологических жидкостей, например, семенной жидкости [52] и плазмы крови [14, 52]. Важно отметить, что все экспериментальные работы, оценивающие терапевтический потенциал ВВ, проводились на лабораторных животных, в т.ч. и в тех случаях, когда источниками ВВ были клетки человека. Вместе с тем, ни в одной из работ не было отмечено побочных эффектов, связанных с реакциями отторжения.

### In vitro исследования

In vitro эксперименты, проведенные на культурах клеток, позволяют не только провести скрининговые ис-

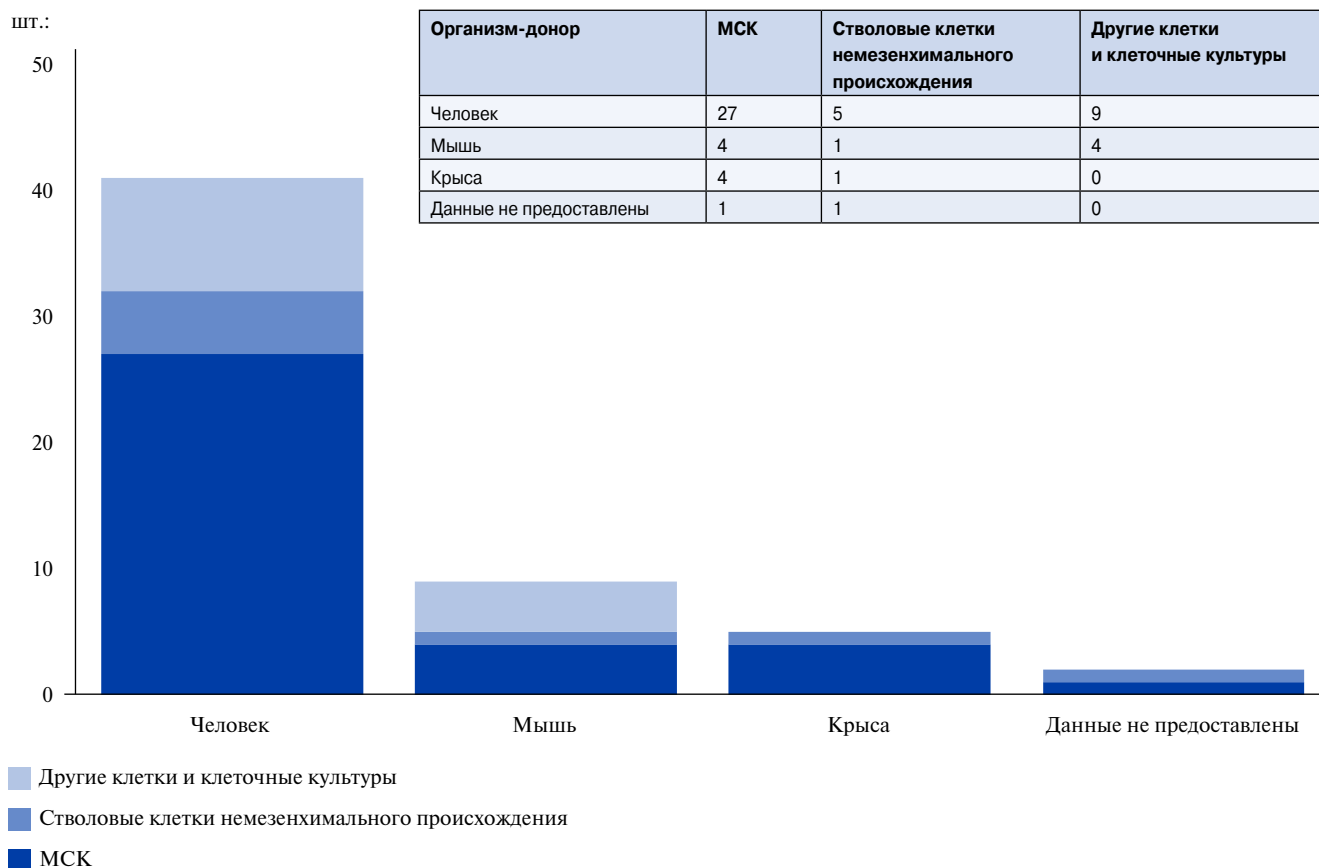


Рис. 1. Источники ВВ для терапевтического применения.

Примечание: по оси ординат — количество литературных источников.

Сокращение: МСК — мезенхимальные стволовые клетки.

следования, но также более детально изучить активные компоненты, в частности, переносимые микроРНК, а также механизмы реализации эффектов ВВ.

В условиях гипоксии кардиомиоцитов добавление ВВ приводило к увеличению выживаемости клеток [2, 6, 7, 9, 11, 49]. Входящая в состав микроРНК-21 ингибирует ген *PDCD4*, тем самым уменьшая уровень каспазы-3 [49], микроРНК-125b-5p подавляет транскрипцию *p53* и *BAK1* [6], микроРНК-486-5p подавляет апоптоз путём сайленсинга *PTEN* и активации каскада PI3K/AKT [11]. МикроРНК-132, микроРНК-210, микроРНК-146a-3p и микроРНК-181, входящие в состав ВВ, подавляли апоптоз кардиомиоцитов [3]. МикроРНК-214 увеличивала экспрессию *Bcl2/11* и *Slc8a1* в кардиомиоцитах мыши, подавляя апоптоз, и способствовала выживанию клеток [8]. Кроме того, использование ВВ может приводить снижению уровня окислительного стресса посредством активации пути Akt/Sfrp2 [9].

Действие ВВ на эндотелиоциты пупочной вены человека HUVEC проявлялось усилением пролиферации [2, 4, 7, 37, 40], миграции [4, 9, 37, 40] и ангиогенеза [2, 3, 9, 18, 37]. Данная совокупность эффектов обусловлена регуляцией белка RasGap-p120 (мик-

роРНК-132) [3], увеличением синтеза фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [37, 40], тромбоцитарного фактора роста (PDGFA), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста фибробластов 2 (FGF2) [37] и активацией сигнальных путей PI3K/AKT [18], MAPK/ERK1/2 [37, 40]. Усиление ангиогенной активности эндотелиоцитов обусловлено также усилением пролиферации и миграции, стимулированными везикулярными микроРНК-143-3p, микроРНК-291b, микроРНК-20b-5p, инсулиноподобным фактором роста [48]. На эксперименте с линией эндотелиоцитов PAEC показан противоапоптотический эффект ВВ через активацию каскада Wnt5a, увеличение экспрессии *BCL-2* и уменьшение — *каспазы-3* и *Bax* [28]. Интересно, что МСК отреагировали на введение ВВ уменьшением апоптоза за счёт увеличения экспрессии *Bcl2* при активации каскада Wnt5a [28]. На МСК действие ВВ оказалось схожим: ангиогенный эффект обусловлен индукцией генов ангиогенеза (*VEGF*, *ANG1*, *ANG2*) и остеосинтеза (*COL-1*, *ALP*, *OCN*, *OPN*) [21], а пролиферативный — экспрессией *ACAN*, *SOX-9*, *COL2A1* [53].

Пролиферативный эффект наблюдался у кератиноцитов HaCat через стимуляцию AKT и ERK сиг-

Таблица 2

## Клеточные модели исследования терапевтических эффектов внутриклеточных везикул

Клеточная культура	Эффект при введении	Эффектор, механизм реализации
Кардиомиоциты H9C2 [2, 6, 7, 9, 11, 49]	Увеличение выживаемости [2, 6, 7, 9, 11, 50]	микроРНК-21 [49], микроРНК-125b-5p [6], микроРНК-486-5p [11] Сигнальный путь Akt/Sfrp2 [9]
Кардиомиоциты HL-1 [3]	Подавление апоптоза [3]	микроРНК-132, микроРНК-210, микроРНК-146a-3p, микроРНК-181 [3]
Кардиомиоциты мыши [8]	Подавление апоптоза [8]	микроРНК-214 [8]
Эндотелиоциты пупочной вены человека HUVEC [2-4, 9, 18, 37, 40]	Увеличение пролиферативной активности [2, 4, 9, 37, 40] Индукция ангиогенеза [2, 3, 9, 18, 37] Увеличение миграции [4, 9, 37, 40]	микроРНК-132 [3], микроРНК-126 [18] VEGF [37, 40], PDGFA, EGF, FGF2 [37] Сигнальные пути PI3K/AKT и MAPK/ERK1/2 [40] Сигнальный путь AKT, ERK [37]
Эндотелиоциты лёгочной артерии PAEC [28]	Антиапоптотический эффект Увеличение ангиогенеза Увеличение миграции [28]	Каскад Wnt5a [28]
Эндотелиоциты CMVECs [48]	Ангиогенный эффект [48]	микроРНК-143-3p, микроРНК-291b, микроРНК-20b-5p, ИФР [48]
Кератиноциты HaCat [37]	Пролиферативный эффект [37]	AKT, ERK сигнальный путь [37]
МСК жировой ткани свиньи PAMSC [28]	Уменьшение роста мышечной стенки [28]	Каскад Wnt5a [28]
МСК [21, 53]	Ангиогенный эффект Остеогенный эффект [21] Усиление пролиферации [53]	Индукция генов остеосинтеза и ангиогенеза (VEGF, ANG1, ANG2) [21] Экспрессия маркеров пролиферации [53]
Мононуклеары периферической крови PBMCs [5, 30]	Противовоспалительный эффект [5]	Изменение баланса цитокинов [5], подавление активации и пролиферации Т-клеток макрофагами, обработанными везикулами [30]
Классически активированные макрофаги [10, 41]	Противовоспалительный эффект [41] Поляризация в М-2 макрофаги [10]	Изменение баланса цитокинов [41] микроРНК-182 [10]
Макрофаги RAW264.7 [26, 27]	Противовоспалительный эффект [26, 27]	микроРНК-299-3p [26, 27]
Микроглия BV2 [33, 38], SV40 [38], HAPI [7]	Подавление активации и противовоспалительный эффект [7, 33, 38]	Изменение баланса цитокинов [33, 38] Подавление экспрессии провоспалительных веществ Сигнальный каскад S1P/SK1/S1PR1 [7]
Эпителиоциты почечных канальцев крысы (NRK-52E) [45]	Подавление апоптоза и увеличение пролиферации при оксидативном стрессе [45]	Каскад ERK1/2 [45]
Эпителиоидные клетки печени человека HL7702 [25]	Уменьшение дифференцировки в фибробласты [25]	Увеличение экспрессии Е-кадгерина [25]
Альвеолоциты MLE 12 [29]	Увеличение выживаемости Противоапоптотический эффект Увеличение пролиферации [29]	микроРНК-30b [29]
CD8+-цитотоксические Т-лимфоциты [44]	Ингибирование активности [44]	Замедление пролиферации [44]
CD4+Th1, Th17 [6]	Подавление дифференциации [6]	микроРНК-29a-3p, микроРНК-93-5p [6]
Хондроциты доноров с остеоартритом [42]	Противовоспалительный эффект [42]	Уменьшение уровня ММП и увеличение коллагена [42]
Гладкие миоциты сосудов VSMC [51]	Увеличение пролиферации и миграции [51]	микроРНК-222 [51]
Фибробласты [36]	Увеличение пролиферации и миграции [36]	микроРНК-21, микроРНК-23a, микроРНК-125b, микроРНК-145 [36]
Клетки фоторецепторов 661W [38]	Увеличение выживаемости [38]	Подавление апоптоза [38]
Эндотелиоциты сетчатки HRECs [19]	Противовоспалительный эффект [19]	микроРНК-126 [19]
Нейроны [12]	Увеличение выживаемости [12]	микроРНК-124 [12]
Шванновские клетки [35]	Увеличение пролиферации, миграции, миелинизации [35]	Нейротрофические факторы [35]
Клетки глиобластомы SH-SY5Y и U251 [34]	Увеличение выживаемости нейронов [34]	микроРНК-21 [34]
Клетки гепатоцеллюлярной карциномы MHCC97H, MHCC97L, HepG2, Huh7 [15]	Уменьшение инвазивности [15]	микроРНК-335-5p [15]
Клетки глиобластомы HepG2, MHCC97L, MHCC97H, Huh7 [15], T-98G, LN229 and A-172 [13]	Уменьшение роста и инвазивности опухолевых клеток [13, 15]	микроРНК-335-5p [15], микроРНК-34a [13]
Клетки аденокарциномы протока поджелудочной железы (PDAC) (Capan-1, CFPAC-1, BxPC3, Pauc-1) [17]	Уменьшение роста и инвазивности [17]	микроРНК-145-5p [17]

**Сокращения:** ИФР — инсулиноподобный фактор роста, ММП — матриксные металлопротеиназы, МСК — мезенхимальные стволовые клетки.



нальных путей [37]. Активированный внеклеточный каскад ERK1/2 приводил к подавлению апоптоза и увеличению пролиферации эпителиоцитов почечных канальцев крысы NRK-52E — уменьшалась экспрессия каспазы-3 и p38-МАР-киназы [45]. Снижение экспрессии гена *SAA3*, индуцированное везикулярной микроРНК-30b, способствовало уменьшению апоптоза и увеличению выживаемости альвеолоцитов [29].

МикроРНК-222 подавляла синтез циклин-зависимых киназ CDKN1B и CDKN1C в гладкомышечных клетках сосудов, что приводило к увеличению их пролиферации и миграции [51], а микроРНК-21, микроРНК-23a, микроРНК-125b, микроРНК-145 вызывали тот же эффект у фибробластов [36].

Клетки фоторецепторов 661W [38] и нейроны [12] показали лучшую выживаемость именно благодаря ВВ, когда в результате введения уменьшался уровень апоптоза, а в случае с нейронами была найдена ответственная за эти эффекты микроРНК-124 (снижение уровня каспазы 3) [12]. Наблюдения повторялись на шванновских клетках, в которых после воздействия ВВ увеличивался синтез нейротрофических факторов (нейротрофический фактор мозга (BDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста нервов (NGF)) и, помимо пролиферации и миграции, увеличивалась степень миелинизации [35].

Мононуклеары периферической крови (PBMCS) продемонстрировали снижение синтезируемых интерферона  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), интерлейкина (ИЛ)-1 $\beta$  и увеличение — трансформирующего фактора роста 1 $\beta$  (TGF1 $\beta$ ) и ИЛ-10 при взаимодействии с ВВ [5]. У классически активированных макрофагов снижалась экспрессия РНК провоспалительных цитокинов [41], а микроРНК-182 ингибировала активность TLR4 [10]. Применение ВВ приводило к снижению экспрессии *NLRP3*, *ИЛ-1 $\beta$* , *ИЛ-6*, *ИЛ-18* и ингибированию формирования инфламмосомы [26, 27]. Эффект обусловлен микроРНК-299-3p [26].

На клетках микроглии также продемонстрирован противовоспалительный эффект ВВ — уменьшалась экспрессия *ФНО $\alpha$* , *ИЛ-1 $\beta$* , *ИЛ-6*, *ЦОГ-2*, *CCL3* и увеличивалась экспрессия противовоспалительных *Ym1* и *Fizz1* [33, 38]. Активация сигнального каскада S1P/SK1/S1PR1 приводила к поляризации микроглиоцитов в альтернативное (M2) состояние [7].

ВВ подавляли активность CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов, замедляя пролиферацию и блокируя клеточный цикл в фазе G0. Наблюдалось уменьшение уровня экспрессии IFN $\gamma$  и перфорина [44]. МикроРНК-29a-3p угнетала ген *T-bet* (у Т-хелпера (Th)1), а микроРНК-93-5p — *STAT3* (у Th17), что приводило к изменению поляризации CD4<sup>+</sup>Th [6].

Введение ВВ в культуру хондроцитов пациентов с остеоартритом уменьшало продукцию матричных

металлопротеиназ (ММП) и увеличивало экспрессию мРНК коллагена II типа [42]. В эндотелиоцитах сетчатки HREC воздействие везикулярной микроРНК-126 приводило к уменьшению содержания каспазы-1, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-18, а также к снижению активности NLRP3-инфламмосомы [19].

ВВ богатые микроРНК-125b, уменьшали экспрессию миозина в клетках гладких мышц сосудов, что приводило к уменьшению пролиферации, миграции и как следствие замедлению формирования неоинтимы [39]. Интересно, что в данной работе осуществляли наработку ВВ, обогащенных микроРНК-125b, посредством предварительной ее трансфекции в клетки-продуценты.

ВВ могут быть использованы для направленной дифференцировки клеток. Например, добавление везикул МСК костного мозга к среде с остеобластами приводило к индукции генов остеосинтеза — *ALP*, *OCN*, *OPN*, *RUNX2*. Главным индуктором этого эффекта оказалась микроРНК-196a [24].

При внесении ВВ в культуру эпителиоидных клеток печени человека HL7702 снижалась экспрессия мРНК *N-кадгерина* и увеличивалась — *E-кадгерина*, тем самым участвуя в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода [25].

В одном из экспериментов на культуре клеток TZM-bl, заражённой вирусом иммунодефицита человека, было показано, что везикулы здоровых доноров способны ингибировать репликацию вирусов в клетках. Кроме того, везикулы из плазмы пациентов с вирусом иммунодефицита человека, получающих антиретровирусную терапию, также ингибируют репликацию вируса [52].

Отдельного упоминания достойны эксперименты на опухолевых клеточных линиях. Многими исследователями были приведены доказательства антиапоптотического, положительного пролиферативного действия везикул на клетки различных тканей. Однако в случае воздействия на опухолевые клетки возможны обратные эффекты (табл. 2). На клетках гепатоцеллюлярной карциномы [15], глиобластомы [13, 15], глиомы [14], а также аденокарциномы [17], показано, что ВВ способны переносить агенты, подавляющие рост и инвазивность клеток опухолей. Таковыми являются: микроРНК-335-5p [15], микроРНК-34a [13], микроРНК-145-5p (сайленсинг Smad3) [17], микроРНК-145, микроРНК-200b и микроРНК-200c [16]. Добавление везикул к клеточным линиям глиобластомы увеличивало их чувствительность к темозоломиду, т.к. он действует на фракцию покоящихся клеток [13].

Таким образом, в *in vitro* исследованиях показано, что внутриклеточные везикулы могут стимулировать регенерацию и ангиогенез, оказывать противовоспалительное, противоапоптотическое действие. Многие исследователи подчёркивают роль микроРНК, переносимых ВВ, как главных действующих агентов.

Таблица 3

## Подходы к расчёту количества используемого препарата ВВ

Объём раствора	Масса везикул	Количество везикул	Автор и год
Объём раствора и абсолютное количество частиц			
30 мкл	-	$1 \times 10^8$	Woo CH, et al. (2020) [42]
500 мкл	-	$3 \times 10^9$	Zhang, et al. (2018) [32]
500 мкл	-	$2,5 \times 10^{12}$	Deng, et al. (2019) [7]
15×2 мкл*	-	$0,5 \times 10^4$ $5 \times 10^4$ $50 \times 10^4$	Eguchi, et al. (2019) [8]
1 мкл	-	$1,09 \times 10^7 \pm 4,99 \times 10^6$	Bian, et al. (2020) [38]
-	-	$1,0 \times 10^7 - 1,0 \times 10^{10}$	Harane EI, et al. (2018) [2]
-	-	$1 \times 10^{10}, 50 \times 10^3$	Brossa A, et al. (2020) [16]
-	-	$1 \times 10^{10}$	Grange C, et al. (2019) [20]
Масса растворённых частиц			
330 мкл	250 мкг	-	Li T, et al. (2013) [25]
200 мкл	400 мкг	-	Qu Q, et al. (2020) [40]
100 мкл	30 мкг	-	Johnson TK, et al. (2019) [48]
250 мкл	100 мкг	-	Jiang L, et al. (2019) [27]
100 мкл	20 мкг	-	Li Y, et al. (2019) [46]
25 мкл	50 мкг	-	Zhao J, et al. (2019) [10]
200 мкл	400 мкг	-	Sun XH, et al. (2019) [11]
50 мкл	100 мкг	-	Zhang S, et al. (2020) [26]
-	25 мкг	-	Laso-Garcia F, et al. (2018) [31]
-	30 мкг	-	Takeuchi R, et al. (2019) [21]
-	200 мкг	-	Ma ZJ, et al. (2019) [47]
-	30-300 мкг	-	Barile L, et al. (2014) [3]
-	400 мкг	-	Ma J, et al. (2017) [5]
Масса и количество везикул			
-	150 мкг	$1,06 \times 10^9$	Riazifar M, et al. (2019) [30]
Подход 3. Получение препарата из известного количества клеток в культуре			
500 мкл	Количество выращиваемых клеток $6 \times 10^7$		Chen L, et al. (2019) [44]

Примечание: \* — 2 инъекции.

### Дозирование ВВ

Следующим важным вопросом, возникающим при использовании ВВ в терапевтических целях, является проблема нормирования вводимой дозы биопрепарата. Оказалось, что нормирование и, соответственно, стандартизация дозы используемого вещества выполняется далеко не во всех работах, а там, где она проводилась, наблюдалось разнообразие подходов, из которых можно выделить 3 основных (табл. 3).

Первый — подсчёт абсолютного количества ВВ, взятых на одно введение. Так, например, поступили в работе Woo CH, et al. (2020), взяв в растворе объёмом 30 мкл  $1 \times 10^8$  везикул, подсчитанных с использованием NTA (анализ траектории наночастиц) [42], а в исследовании Grange C, et al. (2019) взято —  $1 \times 10^{10}$  частиц [20]. Второй способ — нормирование массы растворённых частиц, как сделали в своём исследовании Zhang S, et al. (2020), взяв 100 мкг везикул и рас-

творив их в 50 мкл раствора [26], а в работе Barile L, et al. (2014) даны только массы везикул — соответственно, 30 или 300 мкг [3]. Вместе с тем возможна комбинация первого и второго подхода. Например, в публикации Riazifar M, et al. (2019) использовали 150 мкг везикул, которых в данной пробе было  $1,06 \times 10^9$  [30]. Третий подход — получение препарата ВВ из известного количества клеток в культуре. Примером в данной группе служит работа Chen L, et al. (2019), где использовали 500 мкл раствора везикул, полученных от  $6 \times 10^7$  клеток [44]. Точность и, следовательно, утилитарность данного подхода вызывает сомнения, т.к. условия культивирования, пассажи клеток, наличие индукторов и стресс-факторов могут существенно отличаться, что в итоге не позволяет гарантировать получение стандартного препарата ВВ. По-видимому, возможность применения разных методов подсчёта ВВ напрямую зависит от возможностей каждой конкретной лаборатории.

Вопрос дозы и концентрации вводимых везикул становится тем интереснее, чем больше встречается работ, рассматривающих зависимость регистрируемого эффекта от дозы вводимого вещества. Так, в некоторых работах [2, 3, 5, 8, 16, 40] сравнивали разные концентрации вводимых везикул и отмечали дозозависимое изменение эффекта — увеличение концентраций приводило к его усилению. Например, в работе El Harane N, et al. (2018) было произведено сравнение активности ангиогенеза на модели эндотелиальных клеток пупочной вены при использовании нескольких доз везикул ( $1,0 \times 10^7$ ,  $3,0 \times 10^8$ ,  $1,0 \times 10^9$ ,  $3,0 \times 10^9$ ,  $5,0 \times 10^9$ ,  $1,0 \times 10^{10}$ ), полученных от iPS клеток. При этом максимальная прибавка к скорости роста стенки сосуда и миграции эндотелиоцитов была достигнута при концентрации  $1,0 \times 10^{10}$  везикул [2].

Таким образом, учет дозы и концентрации используемых ВВ проводится не всеми исследователями, а если осуществляется, то подходы могут быть разными. Вместе с тем появляется все больше работ, в которых рассматривается взаимосвязь терапевтического эффекта вводимых ВВ и используемой дозы препарата.

#### ***In vivo* исследования**

Важным аспектом для определения эффектов ВВ является выбор животной модели, пути введения препарата. Чаще всего патологические состояния и заболевания моделировали на крысах и мышах, а путями введения были подкожные, внутривенные или внутриорганные инъекции (табл. 1). Однако встречались и неординарные подходы, например, раствором везикул пропитывали шовный материал [35] и коллагеновые мембраны перед имплантацией в костные дефекты для усиления остеогенеза [23].

Введение везикул может приводить к изменению показателей гемодинамики, например, уменьшению среднего артериального давления, уменьшению систолического и конечного диастолического давления левого желудочка (ЛЖ) [4], уменьшению внутреннего объема ЛЖ, конечно-диастолического объема ЛЖ, повышению фракции выброса [5] при сердечной недостаточности. У животных, которым вводились везикулы, повышалось количество рецепторов к PDGF-D, что положительно влияло на формирования сосудов в области инфаркта [5]. Подтверждением терапевтического эффекта также можно считать снижение уровня мозгового и предсердного натрийуретических пептидов [8].

При терапии моделированного инфаркта миокарда в результате введения ВВ уменьшается зона инфаркта [4], размер рубца [3], площадь фиброза [7]. Интересно, что экзосомы, полученные от МСК, подвергшихся воздействию гипоксии, оказывают более сильные кардиопротективные эффекты при инфаркте, чем полученные от клеток без воздействий [6].

А везикулы, модифицированные специфическим МПТ-пептидом (ischemic myocardium-targeted peptide), показали более высокую таргетность [6].

Введение везикул может стимулировать реэнтотелизацию, уменьшать уровень ММП-2 и ММП-9, ингибировать гиперплазию неоинтимы в случае их местного применения при протезировании сосудов. Совокупность всех эффектов приводила к увеличению просвета сосуда и пиково-систолической скорости [40].

Влияние вводимых ВВ на формирование неоинтимы было показано в эксперименте с моделированием повреждения эндотелия. Было показано, что содержащаяся во ВВ микроРНК-125b уменьшает экспрессию миозина-1E, что подавляет пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток в сосудах [39]. Эффекты от использования ВВ не всегда могут быть позитивными. Например, везикулярная микроРНК-222 увеличивала пролиферацию эндотелиоцитов (путём действия на ингибиторы CDK CDKN1B и CDKN1C), вследствие чего усиливалась гиперплазия интимы сонной артерии после её перевязки [51].

Введение везикул животным с лёгочной гипертензией приводило к уменьшению эндотелиально-мезенхимальной трансформации (выше уровень CD31+ клеток и ниже уровень гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA)) и увеличению устойчивости к апоптозу через Wnt5a-каскад. Следствием этого являлось уменьшение систолического давления правого желудочка, его фиброза и гипертрофии, а также уменьшение толщины стенок артерий [28].

Интересно, что везикулы, полученные из культуры МСК, при культивировании которых моделировался трёхмерный внеклеточный матрикс, в эксперименте с повреждением головного мозга оказались эффективнее в отношении индукции ангиогенеза, усиления нейрогенеза (увеличены маркеры BrdU и NeuN) и супрессии воспаления (меньше CD68+ клеток) [32]. Это наблюдение может говорить о важности микроокружения и вообще условий культивирования клеток, генерирующих везикулы.

В дополнение к неординарным методам терапевтического применения ВВ можно привести пример использования раствора экзосом, которым пропитывали шовный материал, использующийся при восстановлении пересеченного седалищного нерва. В данном эксперименте были отмечены положительные нейротрофические эффекты, связанные с выделением факторов роста (BDNF, CNTF, NGF). Эффекты заключались в усилении аксональной регенерации и миелинизации и обратном развитии невротической атрофии икроножной мышцы, по состоянию которой судили об эффекте терапии [35].

Экзосомы способны подавлять воспалительную реакцию за счёт переноса как противовоспалительных цитокинов, так и микроРНК. Так, например, на модели рассеянного склероза показано, что



микроРНК-146b, противовоспалительные цитокины, белок теплового шока-70, галектин-1, ингибиторный цитокин макрофагов-1, латентный-трансформирующий фактор роста бета-связывающего белка 1 приводили к уменьшению макрофагальной и лимфоцитарной инфильтрации в головном мозгу, где аналогично уменьшилась демиелинизация и как следствие улучшились моторные навыки по сравнению с контрольной группой [30].

Аналогичные результаты относительно подавления активности микроглии получены для рассеянного склероза — уменьшался уровень провоспалительных цитокинов, из которых ключевым в патогенезе является ИЛ-17A, а также  $IFN\gamma$ ,  $ФНО\alpha$ . Как следствие, отмечались снижение воспаления и регресс клинических симптомов. Противовоспалительный эффект был достигнут путём угнетения синтеза генов каскада  $IFN\gamma$  [41], а также путём прямой супрессии транскрипции данного цитокина [44]. Также возможно накопление  $I\kappa B\alpha$  (за счёт подавления её инактивации) — ингибирующей субъединицы каскада  $NF\kappa B$ , что приводило к уменьшению нейровоспаления, индуцированного микроглией [33]. Противовоспалительный эффект может быть обусловлен уменьшением синтеза ИЛ-1 $\beta$ , ММП (в частности, ММП-13) [42].

Добавление везикул при терапии экспериментальной дегенерации сетчатки приводило как к подавлению активности микроглии, так и к подавлению апоптоза фоторецепторов, что проявлялось более высокими показателями остроты зрения. В данном случае терапевтический эффект везикул связан с наличием специфических микро-РНК, которые обуславливают внутриклеточные эффекты: репрессию генов *ЦОГ-2*, *CCL-3*, прерывание каскадов  $NF-\kappa B$ ,  $ФНО$ ,  $МАРК$ , ИЛ-17 [38]. МикроРНК-30b-3p ответственна за супрессию гена *SAAT3* и как следствие за уменьшение фосфорилирования важных белков воспаления:  $NF-\kappa B$ ,  $I\kappa B-\alpha$ ,  $ERK$ ,  $MEK1/2$ ,  $p38MARK$ ,  $JNK$ . Это приводило к подавлению воспаления при модуляции острого повреждения лёгкого [29].

При диабетической нефропатии наблюдалось уменьшение уровня ММП, отложение коллагена в интерстиции и клубочке, подавление экспрессии генов коллагена-I,  $TGF\beta$ ,  $\alpha SMA$ , лиганда (FAS-рецептора) FAS-L, хемокинового лиганда 3 (*CCL3*),  $IFN\gamma$ , опосредованное введением ВВ [20]. Однако применение ВВ не снизило гипергликемию и потерю веса, что говорит о том, что факторы, содержащиеся в них, не способны влиять на регуляцию метаболизма глюкозы в целом. Однако, в свою очередь, при диабетической ретинопатии микроРНК-126 уменьшала глюкозо-опосредованную активацию экспрессии *HMGB1* и угнетала активацию  $NLRP3$ -инфламмосомы [19]. Это приводило к уменьшению воспаления и улучшению общего состояния, что указывает на потенциальную их применимость в качестве симптоматической терапии.

Перспективным может оказаться применение ВВ в терапии хронических воспалительных заболеваний, ассоциированных с фиброзом. Так, их введение в организм мыши с фиброзом печени приводило к ингибированию каскада  $TGF\beta$  за счёт уменьшения фосфорилирования  $Smad2$ , как следствие — к уменьшению воспаления, снижению образования коллагена I и III, падению уровня маркеров фиброза и маркеров эпителиально-мезенхимальной трансформации, а также к нормализации уровня аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови [25].

Использование ВВ в терапии повреждения печени выявило противовоспалительное действие микроРНК-299-3p, заключающееся в подавлении синтеза провоспалительных цитокинов,  $NLRP3$ , каспазы-1, что уменьшает повреждение клеток и увеличивает их выживаемость [26]. В дополнение к этому, снижаются уровни ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 [27]. Подавление воспаления выражается в уменьшении размера очага некроза органа и уменьшении цитолиза (снижение уровня аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы) [25, 27]. Противовоспалительный эффект при колите проявляется снижением синтеза провоспалительных цитокинов ( $IFN\gamma$ ,  $ФНО\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-17) и увеличением противовоспалительных (ИЛ-10,  $TGF\beta 1$ ) [47].

Баланс Т-лимфоцитов зачастую является показателем, позволяющим мониторировать течение заболевания. Например, при апластической анемии введение везикул увеличивало соотношение  $Treg/Th17$ , действуя через сфингозиновый рецептор  $S1P$ , а также приводило к увеличению гематопоетической ткани и уменьшению жировой в костном мозге [46]. При ревматоидном артрите подавление дифференцировки  $Th1$  и  $Th17$  ассоциировалось с улучшением состояния. Этот эффект реализовался посредством микроРНК-29a-3p, действующей на T-bet (для  $Th1$ ), и микроРНК-93-5p, действующую на  $STAT3$  (для  $Th17$ ) [43].

Увеличение выживаемости клеток при окислительном стрессе при введении везикул обусловлено подавлением апоптоза (через репрессию каспаз и сигнальных  $MAP$ -киназ) и индукцией пролиферации (через активацию сигнального каскада  $ERK1/2$ ) [45], а также усилением действия антиоксидантной системы за счёт индукции синтеза супероксиддисмутазы (через активацию пути  $Akt/Sfrp2$ ) [9]. ВВ, обогащенные микроРНК-21 и  $PTEN$ -siRNA (малая интерферирующая РНК), оказывают также противоапоптотический эффект и приводят к повышению выживаемости нейронов и улучшению локомоторных функций [34]. Подавление апоптоза нейронов при ишемическом инсульте приводило к улучшению общего состояния и было связано с ингибирующим действием микроРНК-124 на убиквитин-специфическую протеазу-14 ( $USP-14$ ) [12].

Регенераторный потенциал везикул находит свое применение при индукции остеогенеза. Доказано, что везикулярная микроРНК-196а способствовала индукции генов, ответственных за остеосинтез: *ALP*, *OCN*, *OPN*, *Runx2* [24]. В других исследованиях установлено, что под действием везикул происходит усиление экспрессии остеогенных факторов — *OCN* — и ангиогенных — *VEGF* [21, 23], а также увеличиваются концентрации кальция и фосфора и фосфорилированных белков [23].

Индукция ангиогенеза — важный фактор, стимулирующий заживление ран. Это было проиллюстрировано в экспериментах по регенерации кожных повреждений, где введение везикул способствовало ускорению заживления за счёт индукции ангиогенеза [36, 37], а также ускорения эпителизации и усиленному отложению кератина в ткани [37]. Кроме того, на модели кожных ран при сахарном диабете показано, что микроРНК-126, содержащаяся в везикулах, оказывала эффект за счёт увеличения фосфорилирования АКТ и активации каскада Р13К/АКТ [18]. При ишемии нижних конечностей эффект роста сосудов, обусловленный действием микроРНК-143-3р, микроРНК-291b, микроРНК-20b-5р, улучшал трофику тканей [48].

При экспериментальной терапии злокачественных новообразований показано потенциальное противоопухолевое действие везикул. Так, на модели почечно-клеточной карциномы показано, что везикулы влияют на несколько механизмов: замедление роста, подавление миграции и индукция апоптоза. Также происходит повышение микроРНК-Let7b, микроРНК-200b, микроРНК-200с, микроРНК-223. Эффекты угнетения опухолевого роста были опосредованы снижением экспрессии целого ряда генов под воздействием везикулярных микроРНК: *EGFR* (микроРНК-145), *ZEB2* (микроРНК-200с), *ММП1* (микроРНК-145 и микроРНК-200b) [16].

МикроРНК-335-5р ингибировала рост гепатоцеллюлярной карциномы за счёт уменьшения пролиферации её клеток и увеличения апоптоза [15]. При те-

рапии аденокарциномы поджелудочной железы найдена схожая роль микроРНК-145-5р — снижение экспрессии *Smad3*, что блокировало клеточный цикл и также замедляло пролиферацию, индуцировало апоптоз и уменьшало миграцию, и как результат — уменьшало темп роста опухоли [17].

При эксперименте с глиобластомой выявлены дополнительные эффекты — везикулы, нагруженные микроРНК-34а, увеличивали чувствительность клеток опухоли к химиопрепаратам [13]. Это может быть связано как с сайленсингом онкогена *MYCN*, так и с уменьшением пролиферации клеток опухоли — против таких клеток наиболее эффективен применявшийся темозоламид. Другие исследователи пришли к выводу, что доставка к клеткам глиомы через гематоэнцефалический барьер улучшалась, а период циркуляции препарата, заключённого в везикулы, увеличивался [14]. Везикулы М1-макрофагов увеличивают чувствительность опухолевых клеток рака молочной железы к химиопрепаратам путём активации NFκB-пути, а М2-макрофагов — оставляют клетки в покоем состоянии, не давая им пролиферировать [50].

### Заключение

Таким образом, экспериментальные разработки терапевтического применения ВВ демонстрируют их потенциальную эффективность. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* подтверждена возможность регуляторного влияния ВВ на такие процессы, как апоптоз, пролиферация, дифференцировка и т.д., что открывает перспективы их клинического применения в терапии таких патологических состояний, как окислительный стресс, ишемическое и реперфузионное повреждение тканей и органов, опухолевый рост и т.д.

**Отношения и деятельность.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-75-20076).

### Литература/References

- Yuana Y, Sturk A, Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.* 2013;27(1):31-9. doi:10.1016/j.blre.2012.12.002.
- El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: In vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J.* 2018;39(20):1835-47. doi:10.1093/eurheartj/ehy012.
- Barile L, Lionetti V, Cervio E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):530-41. doi:10.1093/cvr/cvu167.
- Bian S, Zhang L, Duan L, et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med.* 2014;92(4):387-97. doi:10.1007/s00109-013-1110-5.
- Ma J, Zhao Y, Sun L, et al. Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(1):51-9. doi:10.5966/sctm.2016-0038.
- Zhu LP, Tian T, Wang JY, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. *Theranostics.* 2018;8(22):6163-77. doi:10.7150/thno.28021.
- Deng S, Zhou X, Ge Z, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cardiac damage after myocardial infarction by activating S1P/SK1/S1PR1 signaling and promoting macrophage M2 polarization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;114(May):105564. doi:10.1016/j.biocel.2019.105564.
- Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, et al. Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. *J Biol Chem.* 2019;294(31):11665-74. doi:10.1074/jbc.RA119.007537.
- Ni J, Liu X, Yin Y, et al. Exosomes derived from TIMP2-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance the repair effect in rat model with myocardial infarction possibly by the Akt/SFRP2 pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; doi:10.1155/2019/1958941.
- Zhao J, Li X, Hu J, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization. *Cardiovasc Res.* 2019;115(7):1205-16. doi:10.1093/cvr/cvz040.
- Sun XH, Wang X, Zhang Y, Hui J. Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/P13K/AKT signaling pathway. *Thromb Res.* 2019;177:23-32. doi:10.1016/j.thromres.2019.02.002.

12. Song Y, Li Z, He T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124. *Theranostics*. 2019;9(10):2910-23. doi:10.7150/thno.30879.
13. Wang B, Wu ZH, Lou PY, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted exosomes overexpressing microRNA-34a ameliorate glioblastoma development via down-regulating MYCN. *Cell Oncol*. 2019;42(6):783-99. doi:10.1007/s13402-019-00461-z.
14. Bai L, Liu Y, Guo K, et al. Ultrasound Facilitates Naturally Equipped Exosomes Derived from Macrophages and Blood Serum for Orthotopic Glioma Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11(16):14576-87. doi:10.1021/acsami.9b00893.
15. Wang F, Li L, Pontek K, et al. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2018;67(3):940-54. doi:10.1002/hep.29586.
16. Brossa A, Fonsato V, Grange C, et al. Extracellular vesicles from human liver stem cells inhibit renal cancer stem cell-derived tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2020;1-13. doi:10.1002/ijc.32925.
17. Ding Y, Cao F, Sun H, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Lett*. 2019;442:351-61. doi:10.1016/j.canlet.2018.10.039.
18. Ding J, Wang X, Chen B, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Deferoxamine Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis. *Biomed Res Int*. 2019; doi:10.1155/2019/9742765.
19. Zhang W, Wang Y, Kong Y. Exosomes derived from mesenchymal stem cells modulate miR-126 to ameliorate hyperglycemia-induced retinal inflammation via targeting HMGB1. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(1):294-303. doi:10.1167/jovs.18-25617.
20. Grange C, Tritta S, Tapparo M, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles inhibit and revert fibrosis progression in a mouse model of diabetic nephropathy. *Sci Rep*. 2019; doi:10.1038/s41598-019-41100-9.
21. Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, Kobayashi T. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. *PLoS One*. 2019;14(11):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0225472.
22. Otsuru S, Desbordes L, Guess AJ, et al. Extracellular vesicles released from mesenchymal stromal cells stimulate bone growth in osteogenesis imperfecta. *Cytotherapy*. 2018;20(1):62-73. doi:10.1016/j.jcyt.2017.09.012.
23. Narayanan R, Huang CC, Ravindran S. Hijacking the Cellular Mail: Exosome Mediated Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016; doi:10.1155/2016/3808674.
24. Qin Y, Wang L, Gao Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep21961.
25. Li T, Yan Y, Wang B, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev*. 2013;22(6):845-54. doi:10.1089/scd.2012.0395.
26. Zhang S, Jiang L, Hu H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- $\alpha$  ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage. *Life Sci*. 2020;246(January):117401. doi:10.1016/j.lfs.2020.117401.
27. Jiang L, Zhang S, Hu H, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate acute liver failure by reducing the activity of the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;508(3):735-41. doi:10.1016/j.bbrc.2018.11.189.
28. Zhang S, Liu X, Ge LL, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes improve pulmonary hypertension through inhibition of pulmonary vascular remodeling. *Respir Res*. 2020;21(1):1-12. doi:10.1186/s12931-020-1331-4.
29. Yi X, Wei X, Lv H, et al. Exosomes derived from microRNA-30b-3p-overexpressing mesenchymal stem cells protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting SAA3. *Exp Cell Res*. 2019;383(2):111454. doi:10.1016/j.yexcr.2019.05.035.
30. Riazifar M, Mohammadi MR, Pone EJ, et al. Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS Nano*. 2019;13(6):6670-88. doi:10.1021/acs.nano.9b01004.
31. Laso-García F, Ramos-Cejudo J, Carrillo-Salinas FJ, et al. Therapeutic potential of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells in a model of progressive multiple sclerosis. *PLoS One*. 2018;13(9):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0202590.
32. Zhang Y, Chopp M, Zhang ZG, et al. Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Int*. 2017;111:69-81. doi:10.1016/j.neuint.2016.08.003.
33. Thomi G, Surbek D, Haesler V, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1207-z.
34. Kang J, Li Z, Zhi Z, et al. MiR-21 derived from the exosomes of MSCs regulates the death and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury. *Gene Ther*. 2019;26(12):491-503. doi:10.1038/s41434-019-0101-8.
35. Chen J, Ren S, Duscher D, et al. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote sciatic nerve regeneration via optimizing Schwann cell function. *J Cell Physiol*. 2019;234(12):23097-110. doi:10.1002/jcp.28873.
36. Fang S, Xu C, Zhang Y, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor- $\beta$ /SMAD2 Pathway During Wound Healing. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(10):1425-39. doi:10.5966/sctm.2015-0367.
37. Ren S, Chen J, Duscher D, et al. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1152-x.
38. Bian B, Zhao C, He X, et al. Exosomes derived from neural progenitor cells preserve photoreceptors during retinal degeneration by inactivating microglia. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). doi:10.1080/20013078.2020.1748931.
39. Wang D, Gao B, Yue J, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells expressing miR-125b inhibit neointimal hyperplasia via myosin IIE. *J Cell Mol Med*. 2019;23(2):1528-40. doi:10.1111/jcmm.14060.
40. Qu Q, Pang Y, Zhang C, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit vein graft intimal hyperplasia and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1-14. doi:10.1186/s13287-020-01639-1.
41. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(1):104-16. doi:10.1164/rccm.201705-0925OC.
42. Woo CH, Kim HK, Jung GY, et al. Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1). doi:10.1080/20013078.2020.1735249.
43. Zhu D, Tian J, Wu X, et al. G-MDSC-derived exosomes attenuate collagen-induced arthritis by impairing Th1 and Th17 cell responses. *Biochim Biophys Acta — Mol Basis Dis*. 2019;1865(12):165540. doi:10.1016/j.bbdis.2019.165540.
44. Chen L, Huang H, Zhang W, et al. Exosomes derived from t regulatory cells suppress CD8<sup>+</sup> cytotoxic t lymphocyte proliferation and prolong liver allograft survival. *Med Sci Monit*. 2019;25:4877-84. doi:10.12659/MSM.917058.
45. Zhou Y, Xu H, Xu W, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):34. doi:10.1186/scrt194.
46. Li Y, Wang F, Guo R, et al. Exosomal sphingosine 1-phosphate secreted by mesenchymal stem cells regulated Treg/Th17 balance in aplastic anemia. *IUBMB Life*. 2019;71(9):1284-92. doi:10.1002/iub.2035.
47. Ma ZJ, Wang YHY, Li ZG, et al. Immunosuppressive effect of exosomes from mesenchymal stromal cells in defined medium on experimental colitis. *Int J Stem Cells*. 2019;12(3):440-8. doi:10.15283/ijsc.18139.
48. Johnson TK, Zhao L, Zhu D, et al. Exosomes derived from induced vascular progenitor cells promote angiogenesis in vitro and in an in vivo rat hindlimb ischemia model. *Am J Physiol — Hear Circ Physiol*. 2019;317(4):H765-76. doi:10.1152/ajpheart.00247.2019.
49. Xiao J, Pan Y, Li XH, et al. Cardiac progenitor cell-derived exosomes prevent cardiomyocytes apoptosis through exosomal miR-21 by targeting PDCD4. *Cell Death Dis*. 2016;7(6):1-10. doi:10.1038/cddis.2016.181.
50. Walker ND, Elias M, Guio K, et al. Exosomes from differentially activated macrophages influence dormancy or resurgence of breast cancer cells within bone marrow stroma. *Cell Death Dis*. 2019;10(2). doi:10.1038/s41419-019-1304-z.
51. Wang Z, Zhu H, Shi H, et al. Exosomes derived from M1 macrophages aggravate neointimal hyperplasia following carotid artery injuries in mice through miR-222/CDKN1B/CDKN1C pathway. *Cell Death Dis*. 2019;10(6). doi:10.1038/s41419-019-1667-1.
52. Welch JL, Kaddour H, Winchester L, et al. Semen Extracellular Vesicles from HIV-1 Infected Individuals Inhibit HIV-1 Replication in Vitro, and Extracellular Vesicles Carry Antiretroviral Drugs in Vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2020;83(1):90-8. doi:10.1097/QAI.0000000000002233.
53. Lu K, Li H yin, Yang K, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1). doi:10.1186/s13287-017-0563-9.