

ОБЗОРЫ



НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173>

© КУЩ А.А., ИВАНОВ А.И., 2023

Экзосомы в жизненном цикле вирусов и патогенезе вирусных инфекций

Кущ А.А.¹, Иванов А.И.²

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», 119991, г. Москва, Россия

Экзосомы – внеклеточные везикулы эндосомального происхождения с двухслойной мембраной, диаметром 30–160 нм. Экзосомы высвобождаются из клеток разного происхождения и определяются в различных биологических жидкостях организма. Они содержат клеточные нуклеиновые кислоты, белки, липиды, метаболиты и могут передавать содержимое клеткам-реципиентам. В биогенезе экзосом участвуют клеточные белки семейства Rab ГТФазы и системы ESCRT, которые регулируют почкование, транспорт везикул, сортировку молекул, слияние мембран, образование мультивезикулярных телец и секрецию экзосом. Из клеток, инфицированных вирусами, высвобождаются экзосомы, которые содержат геномные вирусные ДНК и РНК, а также мРНК, микроРНК, другие виды РНК, белки и вирионы. Экзосомы способны переносить вирусные компоненты в неинфицированные клетки различных органов и тканей. В настоящем обзоре проанализировано влияние экзосом на жизненный цикл широко распространенных вирусов, вызывающих серьезные заболевания человека: вирус иммунодефицита человека 1-го типа, вирус гепатита В, вирус гепатита С, SARS-CoV-2. Вирусы способны проникать в клетки путём эндоцитоза, используют молекулярные и клеточные пути с участием белков Rab и ESCRT для высвобождения экзосом и распространения вирусных инфекций. Показано, что экзосомы могут оказывать разнонаправленные действия на патогенез вирусных инфекций, подавляя или способствуя развитию вызываемых ими заболеваний. Экзосомы потенциально могут использоваться в неинвазивной диагностике как биомаркеры стадии инфекции, а экзосомы, нагруженные биомолекулами и лекарственными препаратами, – как терапевтические средства. Генетически модифицированные экзосомы – перспективные кандидаты для новых противовирусных вакцин.

Ключевые слова: обзор; экзосомы; внеклеточные везикулы; эндоцитоз; Rab ГТФазы; система ESCRT; экзоцитоз; вирус иммунодефицита человека; вирус гепатита В; вирус гепатита С; SARS-CoV-2

Для цитирования: Кущ А.А., Иванов А.И. Экзосомы в жизненном цикле вирусов и патогенезе вирусных инфекций. Вопросы вирусологии. 2023; 68(3): 181-197. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173> EDN: <https://elibrary.ru/uablap>

Для корреспонденции: Кущ Алла Александровна, д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: vitaliku@mail.ru

Участие авторов: авторы заявляют о равном участии в написании и редактировании статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Благодарность. Авторы выражают благодарность О.В. Масаловой, Р.Р. Климовой и Н.Е. Федоровой за критический анализ и ценные замечания, а также К.И. Юрлову за помощь в оформлении рисунков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.05.2023
Принята в печать 22.06.2023
Опубликована 30.06.2023

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173>

Exosomes in the life cycle of viruses and the pathogenesis of viral infections

Alla A. Kushch¹, Alexandr V. Ivanov²¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;²Institute of Molecular Biology named after V.A. Engelhardt of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

Exosomes are extracellular vesicles of endosomal origin, with a bilayer membrane, 30–160 nm in diameter. Exosomes are released from cells of different origins and are detected in various body fluids. They contain nucleic acids, proteins, lipids, metabolites and can transfer the contents to recipient cells. Exosome biogenesis involves cellular proteins of the Rab GTPase family and the ESCRT system, which regulate budding, vesicle transport, molecule sorting, membrane fusion, formation of multivesicular bodies and exosome secretion. Exosomes are released from cells infected with viruses and may contain viral DNA and RNA, as well as mRNA, microRNA, other types of RNA, proteins and virions. Exosomes are capable of transferring viral components into uninfected cells of various organs and tissues. This review analyzes the impact of exosomes on the life cycle of widespread viruses that cause serious human diseases: human immunodeficiency virus (HIV-1), hepatitis B virus, hepatitis C virus, SARS-CoV-2. Viruses are able to enter cells by endocytosis, use molecular and cellular pathways involving Rab and ESCRT proteins to release exosomes and spread viral infections. It has been shown that exosomes can have multidirectional effects on the pathogenesis of viral infections, suppressing or enhancing the course of diseases. Exosomes can potentially be used in noninvasive diagnostics as biomarkers of the stage of infection, and exosomes loaded with biomolecules and drugs - as therapeutic agents. Genetically modified exosomes are promising candidates for new antiviral vaccines.

Keywords: review; exosomes; extracellular vesicles; endocytosis; Rab GTPases; ESCRT system; exocytosis; human immunodeficiency virus; hepatitis B virus; hepatitis C virus; SARS-CoV-2

For citation: Kushch A.A., Ivanov A.V. Exosomes in the life cycle of viruses and the pathogenesis of viral infections. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 181-197. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173> EDN: <https://elibrary.ru/uablap>

For correspondence: Alla A. Kushch, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Leading Researcher of the Cell Engineering Laboratory, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia. E-mail: vitalku@mail.ru

Information about the authors:Kushch A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5659-9679>

Contribution: the authors declare equal participation in the writing and editing of the article

Funding. The research was funded by the state budget.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to O.V. Masalova, R.R. Klimova and N.E. Fedorova for critical analysis and valuable comments, as well as K.I. Yurlov for assistance in the design of the figures.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 10 May 2023

Accepted 22 June 2023

Published 30 June 2023

Введение

Экзосомы впервые были идентифицированы в культуральной жидкости ретикулоцитов. В 1983 г. две группы исследователей практически одновременно сообщили, что трансферриновые рецепторы ретикулоцитов ассоциируются с внутриклеточными везикулами небольших размеров (около 50 нм) и затем «буквально выбрасываются» (literally jettisoned) из созревающих ретикулоцитов во внеклеточное пространство [1, 2]. С.V. Harding и соавт. [1, 3] показали, что интернализированный трансферрин в клетках локализуется на большом количестве маленьких частиц внутри органелл, которые авторы назвали мультивезикуляр-

ными эндосомами (multivesicular endosomes). Мультивезикулярные эндосомы сливаются с плазматической мембраной с последующим высвобождением (экстернализацией) везикул, впоследствии названных экзосомами [4]. Было высказано предположение, что клетки могут использовать этот механизм в качестве общего способа высвобождения мембранных везикул. Это открытие вызвало огромный интерес исследователей, и с тех пор опубликованы сотни статей по экзосомам, создан специальный журнал – *Journal of Extracellular Vesicles*, сформированы специализированные общества: International Society for Extracellular Vesicles, The American Society for Exosomes and Microvesicles.

В обзоре кратко рассмотрены некоторые вопросы биогенеза и функций экзосом. Особое внимание уделено участию экзосом в вирусных инфекциях.

Характеристика экзосом

Экзосомы – внеклеточные везикулы (ВВ) с двуслойной мембраной диаметром 30–160 нм (в среднем около 100 нм), имеют эндосомное происхождение. К классическим маркерам экзосом относят CD63, CD81 и CD9, флотиллины, церамиды, TSG101 (tumor susceptibility gene 101) и Alix (apoptosis-linked gene 2 interacting protein X) [5, 6] (рис. 1). В экзосомах обнаружены липиды, белки, все известные виды РНК, метаболиты [7, 8]. После высвобождения с поверхности клетки экзосомы могут взаимодействовать с внеклеточным матриксом и (или) проникать в клетки-реципиенты [9]. Экзосомы высвобождаются из клеток различного происхождения, они обнаружены в различных биологических жидкостях: в плазме и сыворотке крови, моче, спинномозговой жидкости, грудном молоке, слюне, желудочном соке, семенной и фолликулярной жидкостях, в кале [7, 10, 11]. Эти везикулы характеризуются большой гетерогенностью по размерам и функциям [12]. Содержание (груз) экзосом различается и определяется клеточным происхождением, метаболическим статусом и окружающей средой клеток-доноров, поэтому различают многочисленные подгруппы экзосом [8]. Переноса различные биоактивные молекулы в клетки-реципиенты, экзосомы могут участвовать в регуляции транскрипции и трансляции; пролиферации, репродукции, развитии, клеточной дифференцировке, патологических процессах, в том числе в неоплазии [12, 13].

Одна из важнейших проблем изучения и применения экзосом состоит в необходимости усовершенствования методов разделения и очистки везикул. Вслед за ультрацентрифугированием, градиентным центрифугированием и ультрафильтрацией разработаны более совершенные методы и инструменты: чип ExoTIC [14], технология AF4 (asymmetric-flow field-flow fractionation) [15], метод двойной иммунофильтрации (dual-patterned immunofiltration – ExoDIF) [16]. Появились методы идентификации, оценки размеров и содержимого экзосом с использованием специальных методов микроскопии, проточной цитометрии [5]. Оценка частоты использования девяти различных методов выделения и очистки экзосом, выполненная в 2019 г., показала, что работы, в которых использовали иммуноаффинные методы, сортировку клеток по флуоресценции (FACS) и преципитацию на полимерах, составляли приблизительно 3–5%, центрифугирование в градиенте плотности – 25%, фильтрацию – 34%, ультрацентрифугирование – 58% и дифференциальное центрифугирование – 73% от общего количества всех проанализированных публикаций. Таким образом, дифференциальное центрифугирование остаётся наиболее используемым методом, однако отмечается, что в большинстве исследований использовалась комбинация этих методов [17]. Для надёжной классификации экзосом и стандартизации техноло-

гий их использования необходимо дальнейшее совершенствование методов идентификации и очистки экзосом. ВВ подразделяются на три основных типа в зависимости от места их происхождения, плотности, экспрессии маркеров и размера:

- а) экзосомы (30–150 нм);
- б) микровезикулы (100–1000 нм);
- в) апоптотические тельца (500–5000 нм) [18].

При этом следует учитывать большой разброс при определении размеров везикул [19]. В 2018 г. эксперты Международного общества внеклеточных везикул (The International Society for Extracellular Vesicles) опубликовали рекомендации, согласно которым в тех случаях, когда биогенез и отличительные свойства использованных везикул подробно не изучены, а их размеры значительно варьируют, более корректно использовать термин «экстраклеточные везикулы», в русскоязычной литературе принято обозначение ВВ. Термин «экзосомы» соответствует малым ВВ с размерами, не превышающими 200 нм [20]. Однако степень очистки везикул во многих исследованиях не определялась, и популяции везикул могли содержать как экзосомы, так и микровезикулы. В связи с этим при изложении результатов в дальнейшем мы будем использовать терминологию, приведенную в оригинальных исследованиях.

Биогенез экзосом

После проникновения в клетку компонентов внешней среды путём эндоцитоза интернализированный ма-

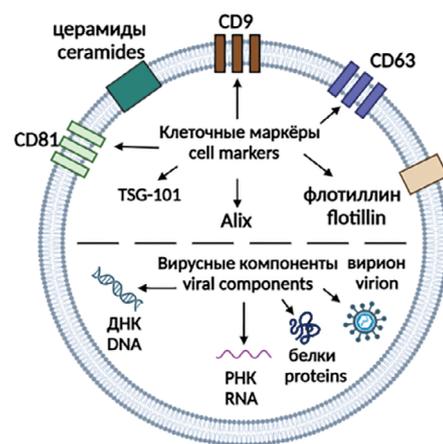


Рис. 1. Содержимое экзосом и биомаркеры.

В верхней половине – основные маркеры экзосом, представленные мембранными белками – тетраспанинами CD9, CD63, CD81 и флотиллинами; липидами – церамидами, а также компонентами клеточной системы ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport): Alix (apoptosis-linked gene 2 interacting protein X) и TSG-101 – продукт Tumor Susceptibility Gene 101 (*tsg101*). В нижней половине – вирусные компоненты, которые захватываются экзосомами в заражённых клетках, – геномные ДНК или РНК, вирусные структурные и неструктурные белки и вирионы.

Fig. 1. Exosome biomarkers and content.

In the upper half are the main markers of exosomes: membrane proteins – tetraspanins CD9, CD63, CD81 and flotillins; lipids – ceramides, components of the ESCRT system Alix and TSG-101. In the lower half – viral components that are captured by exosomes in infected cells – DNA or RNA, viral structural and non-structural proteins and virions.

териал доставляется в ранние эндосомы (РЭ) (рис. 2). Затем происходит созревание РЭ, что включает снижение рН внутри органеллы, накопление в мембране фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P), а также привлечение ряда ферментов семейства рабаптинов (Rab) и их активацию. Это приводит к образованию поздних эндосом (ПЭ). ПЭ, так же как и РЭ, выполняют

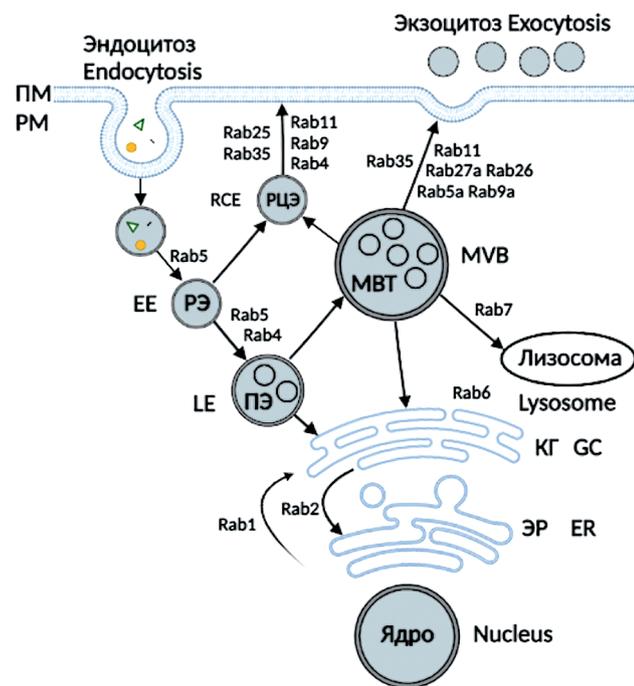


Рис. 2. Схема биогенеза экзосом и участие клеточных белков семейства Rab.

Молекулы и микрочастицы, проникающие в клетку путём эндоцитоза, условно обозначены как зелёный треугольник и жёлтый кружок. Rab5 участвует в слиянии эндоцитированных везикул с образованием ранней эндосомы (РЭ); Rab5 и Rab4 – транспорт к поздней эндосоме (ПЭ); Rab1 регулирует транспорт от эндоплазматического ретикулума (ЭР) к комплексу Гольджи (КГ). Rab2 участвует в рециркуляции и ретроградном транспорте от КГ обратно к ЭР. Rab6 регулирует перемещения внутри КГ. Rab7 регулирует эндосомальный транспорт от ПЭ и мультивезикулярных телец (МВТ) к лизосоме. Rab4 и Rab11, а также Rab 9 и Rab 25 регулируют переработку содержимого в рециклирующих эндосомах (РЦЭ) и транспортировку к плазматической мембране (ПМ). Rab27a и Rab35 участвуют в стыковке МВТ с плазматической мембраной; Rab 11 и Rab35 – в высвобождении везикул. В секреции везикул участвуют также Rab5a и Rab9a, усиливая выход экзосом.

Fig. 2. Scheme of exosome biogenesis and participation of cellular proteins of Rab family.

Molecules and microparticles that penetrate into the cell by endocytosis are conventionally designated as a green triangle and a yellow circle. Rab5 participates in the fusion of endocytized vesicles to form an early endosome (EE); Rab5 and Rab4 – to the late endosome (LE); Rab1 regulates transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi complex (GC). Rab2, on the contrary, participates in recycling and retrograde transport from GC back to ER. Rab6 regulates movements within GC. Rab7 regulates endosomal transport from LE and multivesicular bodies (MVB) to the lysosome. Rab4 and Rab11, as well as Rab 9 and Rab 25 regulate the processing of contents in recycling endosomes (RCE) and transport to the plasma membrane (PM). Rab27a and Rab35 are involved in the docking of MVB with the plasma membrane; Rab 11 and Rab35 are involved in the release of vesicles. Rab5a and Rab9a are also involved in the secretion of vesicles, enhancing the release of exosomes.

сортировку содержимого, а также сенсорную и сигнальную функции, реагируя на внутри- и внеклеточные ситуации [21]. Участки мембраны выгибаются внутрь эндосомы и отпочковываются, создавая множественные внутрипросветные (интралюминальные) везикулы (ИЛВ), которые образуют мультивезикулярные тельца (МВТ). Интернализированные материалы, инкорпорированные в ИЛВ, из МВТ направляются по одному из трёх возможных путей (рис. 2): первый – в рециклирующие эндосомы для переработки, затем к плазматической мембране или к комплексу Гольджи; второй – к лизосоме для слияния с лизосомой и деградации; третий – к плазматической мембране для слияния и высвобождения в окружающую среду в виде экзосом.

В биогенезе экзосом участвуют многочисленные клеточные белки [22]. Довольно подробно изучены белки Rab, принадлежащие семейству консервативных клеточных ГТФаз суперсемейства Ras, включающего более 60 членов, причём одна клетка может содержать более 40 различных белков Rab [23]. Участие отдельных белков Rab в разных стадиях биогенеза экзосом отражено на рис. 2. Важную роль в биогенезе экзосом также играют белки эндосомального сортировочного комплекса ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), включая ESCRT-0, -I, -II, -III и вспомогательные белки, в том числе Vps4 АТФазы. ESCRT-0, -I и -II участвуют в селективной сортировке убиквитинированных молекул; комплекс ESCRT-III и Vps4 – в инвагинации мембран и формировании ИЛВ, составляющих МВТ [24].

Роль экзосом в вирусных инфекциях

Исследования показали, что в экзосомах могут находиться и передаваться клеткам-реципиентам нуклеиновые кислоты, белки и даже вирионы оболочечных вирусов (рис. 1). Для создания условий, способствующих размножению и распространению, вирусы используют различные стратегии, влияя на регуляторные механизмы клетки и организма, в том числе на биогенез экзосом. В следующих разделах обзора будут рассмотрены основные результаты, отражающие участие экзосом в четырёх широко распространённых и социально значимых вирусных инфекциях, возбудителями которых являются вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), вирус гепатита В (ВГВ), вирус гепатита С (ВГС) и коронавирус SARS-CoV-2.

Экзосомы и инфекция ВИЧ-1

После заражения клеток ВИЧ-1 рекрутирует комплексы ESCRT-I, -II и -III, которые участвуют в процессах взаимодействия вируса с клеткой на разных стадиях жизненного цикла вируса [25]. Для сборки ВИЧ-1 привлекаются белки комплекса ESCRT-I – TSG101 и Alix. Эти же компоненты необходимы для высвобождения ВИЧ-1 из заражённой клетки [26, 27]. В процессе выхода из клетки участвует белок Gag ВИЧ-1, который накапливается и закоревается на плазматической мембране. Изучение ключевого компонента ESCRT – TSG101 с использованием системы

CRISPR/Cas9 в клетках человека, инфицированных ВИЧ-1, подтвердило колокализацию клеточного белка TSG101 с белком Gag ВИЧ-1 в местах сборки вируса. Подавление или повышение экспрессии гена TSG101 сильно влияет на выход новых вирионов из мембран заражённых клеток и на продукцию ВИЧ-1. Таким образом, взаимодействие TSG101 с Gag ВИЧ может служить потенциальной мишенью для противовирусной терапии [28–30]. Сборку вирусных частиц и секрецию экзосом также регулируют белки семейства Rab [31].

Роль экзосом в патогенезе ВИЧ-инфекции неоднозначна. Показано, что экзосомы из Т-клеток содержат большое количество молекул CD4⁺, которые конкурируют с клетками хозяина за связывание с белками ВИЧ-1, препятствуя таким образом распространению вируса. Противовирусное действие могут проявлять также экзосомы, выделяемые из семенной жидкости, грудного молока и других биологических жидкостей, подавляя репликацию ВИЧ-1 [32]. С другой стороны, экзосомы из клеток, инфицированных ВИЧ-1, способны индуцировать активацию CD4⁺-Т-лимфоцитов и репликацию вируса, в том числе в латентно инфицированных клетках, что может привести к мобилизации латентного резервуара ВИЧ в организме [33].

Экзосомы и вирус гепатита В

Несмотря на использование эффективной профилактической вакцины, гепатит В продолжает оставаться важной проблемой здравоохранения, поскольку современные методы терапии не могут вылечить хронические формы гепатита. Отчасти этому способствует отсутствие достаточно полного представления о путях сборки и высвобождения ВГВ. Считается, что входжение ВГВ в клетку происходит посредством эндоцитоза, в интернализации ВГВ и транспортировке из РЭ в ПЭ участвуют Rab5 и Rab7 [34]. Интересно, что на поздних стадиях репликации ВГВ тот же Rab7 способствует транспортировке вирусных частиц в лизосомы для их деградации [35]. Помимо белков Rab, которые действуют как молекулярные переключатели в транспорте везикул при ВГВ инфекции, вирус использует комплексы белков ESCRT [36, 37]. Важно, что интактные вирионы ВГВ могут высвобождаться в виде экзосом и передаваться не только в чувствительные, но и в нечувствительные к заражению клетки [38]. Таким образом, для обеспечения собственной репликации и распространения ВГВ использует эндоцитарный путь с участием клеточных систем Rab и ESCRT.

Исследования продемонстрировали, что экзосомы могут играть определённую роль в диагностике и лечении гепатита В. У пациентов с активной репликацией ВГВ (HBeAg-положительных) обнаружены более высокие уровни некоторых микроРНК (miR) в ВВ плазмы крови по сравнению с HBeAg-отрицательными, и уровни этих miR коррелировали с уровнями ДНК ВГВ и поверхностного антигена вируса (HBsAg) [39]. Сравнительное изучение экзосом в крови здоровых волонтеров, носителей ВГВ и больных

хроническим гепатитом В привело к выводу, что экзосомальные микроРНК могут служить биомаркерами для выявления разных стадий инфекции, вызванной ВГВ [40]. Отмечено, что тетраспанин CD63, ассоциированный с ИЛВ и экзосомами, колокализован со структурными белками ВГВ LHBs и core (Hbc). Подавление экспрессии CD63 РНК-интерференцией показало, что тетраспанин CD63 влияет на сборку ВГВ и его инфекционность [41]. Другие авторы выделяли экзосомы из культурального супернатанта гепатоцитов HepAD38, реплицирующих ВГВ (линия, аналогичная HepG2.2.15), и использовали их для обработки человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) [42]. Экзосомы проникали в моноциты, но не в лимфоциты, и это приводило к повышению экспрессии PD-L1 на поверхности моноцитов и снижению экспрессии CD69 – маркера активированных иммунных клеток. Соответственно, экзосомы, секретлируемые клетками HepAD38, способны вызывать иммуносупрессию, истощение Т-клеток и потенциально могут способствовать прогрессированию ВГВ-инфекции. В то же время препараты, ингибирующие обратную транскриптазу ВГВ (энтекавир, ламивудин и тенофовир), изменяют содержимое экзосом таким образом, что это может ослаблять иммуностимулирующий потенциал вируса [42]. Для более детальной оценки влияния экзосом на патогенез гепатита В необходимы дальнейшие исследования.

Экзосомы и вирус гепатита С

ВГС вызывает острую инфекцию, которая в большинстве случаев переходит в хронический гепатит (ХГС) и прогрессирует в фиброз, цирроз и гепатоцелюлярную карциному. ХГС определяется более чем у 50 млн людей, однако вакцины против гепатита С пока нет, а препараты прямого противовирусного действия недоступны для многих пациентов из-за высокой стоимости, не препятствуют повторному инфицированию и рецидивам гепатоцелюлярной карциномы на фоне терапии препаратами прямого противовирусного действия. Это означает, что для разработки новых средств и, главное, для понимания патогенеза инфекции необходимы более детальные знания жизненного цикла вируса и взаимодействия его с клеточными процессами. Изучение жизненного цикла ВГС показало, что он может высвобождаться из клетки в составе экзосом, пройдя эндосомальный путь [43, 44]. В прохождении этого пути участвуют две клеточные системы – ESCRT и комплекс белков семейства Rab [45–48]. Активное участие белков семейства Rab наводит на мысль о возможном получении ингибиторов, которые могут подавить или блокировать ВГС-инфекцию. Пока такие ингибиторы не получены, но поиск путей воздействия на Rab ГТФазы продолжается [49]. Белки оболочки и белок core ВГС обнаружили в ИЛВ в составе MBV, это показало, что эти белки локализованы и в экзосомах, причём для высвобождения ВГС в экзосомах критичен компонент ESCRT-0 HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) [50, 51]. Интересно, что HRS

требуется также для секреции экзосом из дендритных клеток и представления антигена через экзосомы [52]. Авторы полагают, что более полное понимание взаимодействия ВГС с клеточными путями ESCRT поможет выбрать новые мишени для противовирусной терапии широкого спектра действия [53]. Обнаружение в экзосомах структурных и неструктурных белков и РНК ВГС позволяет рассматривать экзосомы как источник циркулирующих биомаркеров, связанных с патологическими процессами при гепатите С. Это особенно важно для диагностики хронических гепатитов, так как эффективность современных неинвазивных методов признаётся международными экспертами серьёзным препятствием для успешного лечения хронических заболеваний [54, 55].

Содержимое экзосом значительно варьирует в зависимости от природы клеток-доноров, физиологи-

ческого состояния, изменения внутриклеточной активности, микроокружения. В связи с этим особый интерес представляют циркулирующие экзосомы, полученные только из клеток печени. К преимуществам экзосом по сравнению с циркулирующими белками и комплексами РНК можно отнести высокую стабильность в биологических жидкостях, которую обеспечивают двухслойные липидные мембраны. Важно отметить, что изменения в экзосомах могут быть обнаружены на более ранних стадиях, чем явное повреждение тканей или другие клинические и гистологические признаки, как это было установлено на модели неалкогольного стеатогепатита у мышей [56]. Диагностика гепатита С проводится серологическими и молекулярными методами, которые позволяют оценить вирусную нагрузку и иммунный статус пациента. Развитие диагностических подходов на основе экзосом может дополнить и улучшить оценку повреждения печени и выявить ранние маркеры повышенного риска развития гепатокарциномы неинвазивными методами. Одна из проблем использования экзосом как биомаркеров ХГС состоит в том, что из большого пула циркулирующих экзосом технически сложно вычленили экзосомы, образовавшиеся в клетках печени [57]. Преодоление этих трудностей откроет новые возможности в диагностике ХГС, в том числе применение жидкой биопсии.

Эксперименты показали, что очищенные экзосомы из ВГС-инфицированных клеток гепатомы человека Huh7.5.1 содержали полноразмерную вирусную РНК, белки и вирусные частицы и были способны передавать продуктивную инфекцию ВГС незаражённым гепатоцитам [58]. Кроме того, определили, что антитела от больных гепатитом С лишь частично нейтрализовали ВГС-инфекцию, переданную через экзосомы, по сравнению со свободным вирусом. Это свидетельствует о том, что передача ВГС с экзосомами потенциально может быть одним из механизмов ускользания от иммунного ответа при гепатите С [58]. Для ответа на вопрос, возможно ли распространение ВГС через экзосомы, анализировали, может ли вирус использовать экзосомы для независимой от рецепторов передачи ВГС гепатоцитам [59]. Показали, что в сыворотках крови всех пациентов, инфицированных ВГС и не ответивших на лечение (интерферон α -2b (ИФН) + рибавирин), а также некоторых лиц, не получавших лечение, присутствовали экзосомы, содержащие минус-цепь РНК ВГС, образующуюся в процессе репликации вирусной РНК. Определили, что РНК ВГС в экзосомах находилась в комплексе с белком argonaute-2 (Ago2), белком теплового шока 90 (HSP90) и микроРНК miR-122 (рис. 3). Полученные данные, по мнению авторов, доказывают возможность передачи ВГС через циркулирующие экзосомы и указывают на потенциальные терапевтические стратегии, основанные на подавлении передачи ВГС через экзосомы. Однако следует отметить, что факт обнаружения антисмысловой цепи может и не говорить о передаче вируса при участии экзосом, так как её передача в клетки не обеспечит трансляцию генома вируса и образования белков ВГС

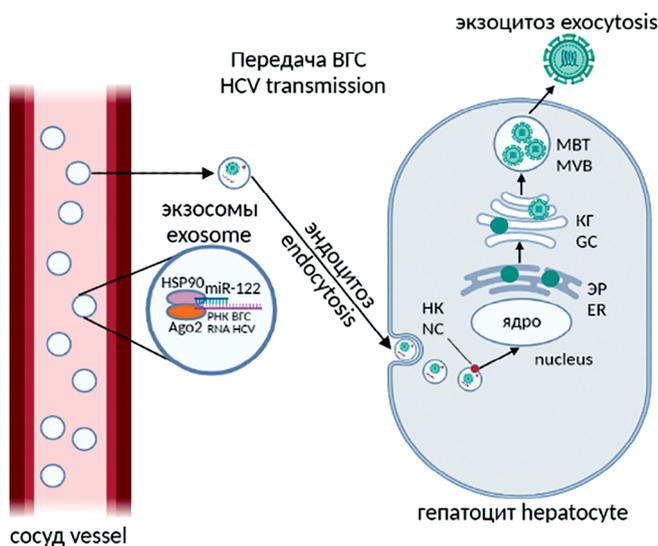


Рис. 3. Схематическое представление передачи вируса гепатита С через экзосомы.

В сыворотках крови пациентов с гепатитом С обнаружены экзосомы, содержащие РНК ВГС в комплексе с микроРНК (miR-122), белком теплового шока HSP90 и белком argonaute-2 (Ago2). Экзосомы способны проникать в незаражённые клетки, в том числе в гепатоциты, путём эндоцитоза. В гепатоцитах, захвативших экзосомы, содержащие вирусную РНК, наблюдается продуктивная ВГС-инфекция, которая может передаваться через вирусные частицы в высвобождающихся экзосомах. Таким образом, распространение вируса возможно через экзосомы, минуя клеточные рецепторы. НК – нуклеокапсид ВГС, ЭР – эндоплазматический ретикулум, КГ – комплекс Гольджи, МВТ – мультивезикулярные тельца (по T.N. Bukong и соавт. [59]).

Fig. 3. Schematic representation of hepatitis C virus transmission through exosomes.

Exosomes containing HCV RNA in combination with microRNA (miR-122), heat shock protein HSP90 and argonaute-2 protein (Ago2) were found in the blood sera of patients with hepatitis C. Exosomes are able to penetrate uninfected cells, including hepatocytes, by endocytosis. In hepatocytes that have captured exosomes containing viral RNA, a productive HCV infection is observed, which can be transmitted through viral particles in the released exosomes. Thus, the spread of the virus is possible through exosomes, bypassing cellular receptors. NC – HCV nucleocapsid, ER – endoplasmic reticulum, GC – Golgi complex, MVB – multivesicular bodies, сосуд – vessel, экзосомы – exosomes, гепатоцит – hepatocyte, ядро – nucleus, эндоцитоз – endocytosis, экзоцитоз – exocytosis (according to T.N. Bukong, et al. [59]).

– компонентов репликационного комплекса. Интересно, что экзосомы могут оказывать и противоположный эффект. Так, экзосомы, содержащие РНК ВГС, были способны транспортировать вирусную РНК к дендритным клеткам (pDC), РНК ВГС действовала на TLR7, активировала pDC, стимулировала синтез и секрецию ИФН- α , что вызывало подавление репликации ВГС и распространения вируса [60, 61].

Потенциал экзосом в терапии гепатита С

Протеомный анализ выявил около 250 белков в ВВ, полученных из первичных гепатоцитов крысы [62]. В циркулирующих ВВ здоровых людей идентифицировано около 70 белков, большинство из которых участвуют в транспорте везикул [63]. Помимо классических маркеров, обнаруженных в большинстве ВВ из других типов клеток, в экзосомах из гепатоцитов обнаружены и специфичные компоненты. Кроме того, практически все типы иммунных клеток, включая Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги, клетки Купфера и нейтрофилы, продуцируют экзосомы. В связи с этим большой интерес представляют исследования, направленные на выяснение связи между патологическими изменениями в печени и содержимом экзосом из клеток печени больных гепатитом. Исследования показали, что ВВ/экзосомы, высвобождающиеся из гепатоцитов, в отличие от экзосом из других клеток печени, имеют повышенный уровень изоформы 2E1 цитохрома P450 (CYP 2E1) и асиалогликопротеинового рецептора 1 [24]. Предполагают, что печень высвобождает CYP-содержащие ВВ для стимулирования метаболизма лекарств в других клетках, которые поглощают эти везикулы. В работе также приводится перечень молекул, обнаруженных в ВВ, которые ассоциированы с развитием патологий печени [24]. Клетки печени могут быть как донорами, так и реципиентами экзосом, что определяет сложные связи между различными клетками печени, которые осуществляются белками, а также мРНК и микроРНК. Экзосомы потенциально могут использоваться как биомаркеры при различных заболеваниях печени [64]. Так, при гепатите С в экзосомах из сыворотки крови определили увеличение содержания четырёх miR; при алкогольном гепатите экзосомы, полученные из гепатоцитов, содержат miR, которые ассоциируются с гипертрофией; при гепатоцеллюлярной карциноме в экзосомах обнаруживали молекулы CEACAM1/6 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules), связанные с прогрессированием опухоли [64].

Отмечают, что использование ВВ имеет ряд преимуществ по сравнению со свободными белками и нуклеиновыми кислотами, в том числе:

- 1) нуклеиновые кислоты не реплицируются после введения;
- 2) содержащиеся в экзосомах вещества могут обладать более низкой иммуногенностью;
- 3) обладают высокой способностью преодолевать тканевые и клеточные барьеры;

4) устойчивы к деградации протеазами в циркуляции и к замораживанию/оттаиванию при длительном хранении [65].

Один из терапевтических подходов для подавления персистентной ВГС-инфекции предлагается в работе [66]. Показано, что соединения, нарушающие эндосомальный путь формирования экзосом и выход везикул из клетки, значительно подавляют репликацию вируса в клетках Huh7.5, заражённых химерным ВГС, содержащим зелёный флуоресцирующий белок (GFP), и при этом не влияют на жизнеспособность самих клеток. Другие подходы могут быть направлены на удаление циркулирующих экзосом, содержащих вирионы или РНК ВГС, а также на предотвращение их вхождения в клетки-мишени. «Вредные» экзосомы можно вывести из кровообращения, например, с использованием методов, аналогичных удалению циркулирующих антител с помощью экстракорпорального диализа. Описаны и другие стратегии снижения или отбора конкретных типов экзосом [67, 68]. Большинство работ по оценке роли экзосом в терапии гепатита С выполнены с использованием мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (МСК). Клеточная терапия на основе МСК привлекает многих исследователей, экзогенные или активированные эндогенные МСК используются более чем в 1200 клинических испытаниях [69]. Клинические исследования показали, что терапия МСК уменьшает повреждение печени, улучшает её функцию и способствует регенерации тканей. При острой или хронической печёночной недостаточности применение МСК повышает выживаемость пациентов и обладает хорошей переносимостью и безопасностью [70]. X. Qian и соавт. в 2016 г. впервые показали способность экзосом, продуцируемых МСК, подавлять ВГС-инфекцию [71]. В этих экспериментах экзосомы, секретируемые из МСК пуповины (uMSC-Exo), были не токсичны и ингибировали репликацию ВГС *in vitro*. Этому способствовали определённые miR из экзосом. Кроме того, экзосомы из uMSC усиливали эффект ИФН- α и телупревира, используемых для лечения ХГС.

Серьёзную проблему для лечения всех заболеваний печени, в том числе гепатита С, представляет фиброз печени, возникающий при хроническом повреждении органа. Ключевую роль в этом процессе играют активированные stellate клетки печени (СКП), которые превращаются в миофибробласты, усиливающие отложение внеклеточного матрикса в печени и, как следствие, прогрессию фиброза [72]. ВВ и экзосомы могут играть разнонаправленные роли в фиброзе печени. Авторы [73] показали, что miR-19a из ВГС-инфицированных гепатоцитов активирует путь STAT3-TGF- β и в результате СКП. MiR-192 из клеток, инфицированных ВГС *in vitro*, также была способна активировать СКП путём повышения уровня TGF β в stellate клетках [74]. В других исследованиях получены противоположные эффекты. Экзосомы, полученные из стволовых клеток печени человека, подавляли профиброзную активность stellate клеток *in vivo* [75], и этот эффект связывали с достав-

кой антифиброзных miR-146a-5p через экзосомы [76]. Сообщалось, что экзосомы из МСК костного мозга могут ингибировать активацию СКП *in vivo* и *in vitro* через путь Wnt/ β -катенина [77]. Показано, что miR-486-5p, содержащаяся в экзосомах из МСК миндалин человека, связывается с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК SMO и ингибирует его экспрессию, и это приводит к инактивации СКП [78]. Определено, что при фиброзе печени miR-150-5p слабо экспрессирована, а хемокин CXCL1 экспрессирован сильно. Перенос miR-150-5p в СКП с помощью ВВ, выделяемых из МСК, ингибировало активацию СКП путём подавления экспрессии CXCL1 [79]. ВВ из сывороток здоровых мышей вводили мышам с экспериментально вызванным фиброзом печени и наблюдали снижение уровней гибели гепатоцитов, воспаления, ферментов аспартатаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы и провоспалительных цитокинов в печени и периферической крови. ВВ из сывороток фиброзных мышей такого действия не оказывали [80]. Показано, что основными мишенями ВВ были активированные СКП. В ВВ нормальных мышей по сравнению с ВВ фиброзных мышей были более высокие уровни ряда miR. Каждая miR могла независимо подавлять экспрессию фиброгенных генов в активированных СКП. Сходные результаты получены с человеческими активированными СКП в культуре: ВВ из сывороток здоровых людей снижали уровень активации СКП и содержали более высокие уровни miR, чем ВВ от пациентов с фиброзом печени.

Оценка роли ВВ/экзосом в фиброзе печени позволяет заключить, что:

1) на СКП и развитие фиброза могут влиять ВВ и экзосомы из различных источников – МСК, гепатоцитов, плазмы крови, иммунных клеток;

2) действие ВВ и экзосом происходит путём переноса содержащихся в них биологически активных молекул, в том числе белков, мРНК, miR в активированные СКП;

3) ВВ и экзосомы, проникшие в активированные СКП, способны ингибировать молекулярные пути, в которых участвуют LPS/TLR, STAT3/Bcl-2/Beclin-1, TGFB/SMAD, Wnt/Beta-catenin и др.;

4) при фиброзе печени поглощение ВВ активированными СКП снижает их пролиферацию, созревание коллагена, уровень провоспалительных цитокинов и повышает аутофагию.

Таким образом, миофибробласты могут вернуться в состояние покоя [81]. Высказывается предположение, что сывороточные ВВ и экзосомы от здоровых людей по своей природе являются антифиброгенными и антифиброзными и содержат miR, которые оказывают терапевтическое действие на активированные стеллатные клетки или повреждённые гепатоциты [80]. Отмечается, что специфические изменения состава (профиля) miR в ВВ могут рассматриваться как возможные диагностические биомаркеры для дифференциации различных типов и стадий прогрессирования хронических гепатитов [82]. В то же время результаты исследования [83] показали, что ВВ/эк-

зосомы, содержащие определённые miR, могут рассматриваться и как потенциальные терапевтические агенты. Интересные данные получены при изучении натуральных киллеров (НК-клеток), которые участвуют в активации СКП [84] и могут влиять на функции клеток-мишеней через секрецию экзосом [85]. Определено, что НК-клетки (линия NK-92MI) секретируют экзосомы (НК-Ехо). После очистки НК-Ехо вносили в культуру активированных СКП человека линии LX-2 и мышам с CCl₄-индуцированным фиброзом (рис. 4). Обработка НК-Ехо значительно подавляла пролиферацию и активацию СКП *in vitro*. Кроме того, НК-Ехо снижали уровень фиброза у мышей [86]. Предположительно эффект связан с действием miR-223, которая экспрессируется в экзосомах НК-Ехо на высоком уровне. Действительно, подавление экспрессии miR-223 в НК-Ехо отменяло ингибирующее действие НК-Ехо на активацию СКП. С помощью программы Targetscan установлено, что предполагаемой мишенью miR-223 является ATG7 – один из маркеров аутофагии [87]. Экспериментальный анализ показал, что ATG7 является прямой мишенью miR-223. Так как аутофагия может участвовать в активации СКП, можно сделать вывод, что экзосомы из НК-клеток подавляют активацию СКП именно за счёт переноса miR-223, которая ингибировала аутофагию в результате взаимодействия с ATG7 [88]. Эти данные сходны с результатами, показавшими, что блокирование аутофагии ингибирует развитие фиброза печени [89, 90]. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований по разработке системы доставки экзосом для лечения патологий печени, включая хронические вирусные гепатиты. В то же время вопрос о том, каким образом клетки-реципиенты распознают ВВ и как ВВ взаимодействуют с клетками-мишенями *in vivo*, пока не решён. Упомянуты разные молекулы на поверхности клеток-реципиентов, с которыми могут связываться ВВ [91]. Модель для изучения функции ВВ *in vivo* разработали на основе анализа экспрессии CD63-фторина у эмбрионов рыбок данио. Обнаружив экзосомы в циркуляции, авторы определили, что в эндцитозе везикул участвуют патрулирующие макрофаги и эндотелиальные клетки в хвостовой части эмбриона [92]. Роль макрофагов в распознавании экзосом отмечена также в работе на мышах [93], показавшей, что в распознавании макрофагами внутривенно введённых экзосом важен отрицательный заряд фосфатидилсерина в экзосомных мембранах.

Рассматривая экзосомы, ВВ, а также ВВ, выделяемые из МСК (МСК-ВВ), отмечают растущий интерес к роли МСК-ВВ в заболеваниях печени [94]. МСК-ВВ более удобны и менее иммуногенны, чем МСК, не приживляются, имеют высокий тропизм к печени, не вызывают aberrантной дифференцировки стволовых клеток, не проявляют иммуногенности и риска канцерогенеза. Бесклеточная терапия МСК-ВВ, а также ВВ, модифицированные противовирусными молекулами, открывают новые перспективы для лечения заболеваний печени.

Экзосомы для профилактики гепатита С

Свойства экзосом позволяют рассматривать их как потенциальные вакцины. Однако пока работ в этом направлении не много. Отмечается, что, благодаря способности циркулировать в организме и достигать периферические органы, экзосомы способны улучшить распределение антигенов [95]. Показано, что экзосомы из инфицированных ВГС клеток, содержащие РНК ВГС, могут индуцировать продукцию ИФН- α в неинфицированных плазматоидных дендритных клетках [60]. Экспорт вирусной РНК с экзосомами может служить как стратегией вируса для уклонения от обнаружения патогена, так и стратегией хозяина для индукции иммунного ответа. Показана способность экзосом проникать в гепатоциты, инфицированные вирусом гепатита В, и передавать ИФН- α , активируя соответствующий противовирусный каскад [96]. Этот и другие результаты предполагают, что экзосомы могут быть не только переносчиками антигенов, но и индукторами иммунного ответа.

Экзосомы и коронавирусная инфекция

Коронавирусы могут входить в клетку путём либо прямого слияния вирусной мембраны с плазматической мембраной клетки, либо эндоцитоза. Получены данные о возможном участии экзосом во вхождении коронавируса в клетки-мишени. Установлено, что в состав белковых комплексов с клеточными рецепторами коронавируса и протеазой TMPRSS2 входят тетраспанины CD9, которые, наряду с CD81 и CD63, встроены в мембрану экзосом [97]. Образовавшиеся комплексы

обеспечивают быстрое и эффективное вхождение коронавируса. При отсутствии CD9 вирусы проникают с участием катепсинов, но гораздо позже и менее эффективно [98]. Экзосомы, высвободившиеся из клеток, инфицированных коронавирусом, могут способствовать проникновению вируса в неинфицированные клетки путём переноса молекул CD9.

Экзосомы в патогенезе COVID-19

Экзосомы у больных COVID-19 могут содержать вирусные РНК, белки и даже вирионы SARS-CoV-2 [99, 100]. В одной из работ, выполненных в этом направлении [101], выделяли экзосомы из плазмы крови 20 пациентов с COVID-19 и 8 здоровых волонтеров и провели протеомный анализ содержимого экзосом. Показано, что содержание 163 белков из 1637 идентифицированных значительно превышает таковое в экзосомах здоровых лиц. Содержание двух белков – тенасцина-С (TNC) и фибриногена- β (FGB) изменялось особенно сильно – более чем в 200 и 700 раз соответственно. Для выяснения возможности переноса содержимого экзосом в другие клетки использовали иммортализованные гепатоциты ИНН и Huh7. В клетках обеих линий наблюдали присутствие TNC и FGB, причём более высокое содержание этих белков обнаружили в гепатоцитах, обработанных экзосомами от пациентов с COVID-19. Так как TNC – иммуномодулятор, который может индуцировать хроническое воспаление [102], а повышенный уровень FGB в крови связан с сосудистыми нарушениями, наблюдаемыми при COVID-19, исследовали возможную

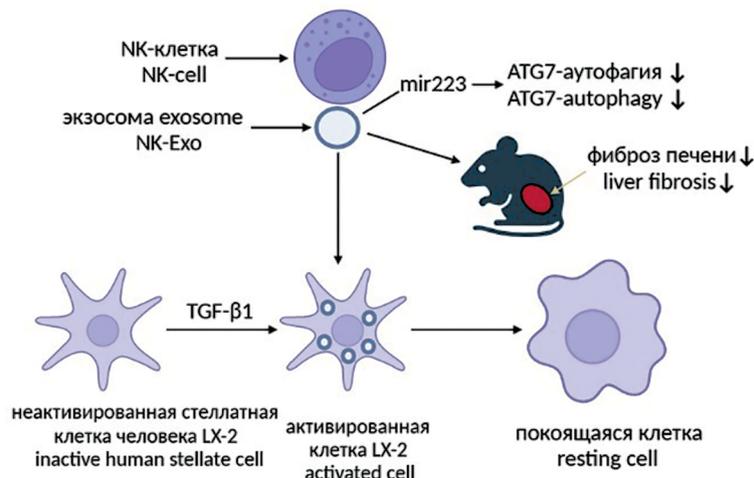


Рис. 4. Экзосомы из клеток натуральных киллеров (NK) снижают уровень экспериментального фиброза печени.

Неактивные stellatные клетки печени человека линии LX-2 активировали с помощью TGF- β 1 и затем обрабатывали экзосомами, выделенными из клеток NK – NK-Exo. В результате активность stellatных клеток была подавлена. Введение NK-Exo мышам с экспериментально вызванным фиброзом приводило к снижению уровня фиброза. Антифибротическое действие NK-Exo ассоциировалось с высоким уровнем экспрессии микроРНК miR-223, направленной на белок аутофагии ATG7 и подавление его функции. Блокада аутофагии вызывала снижение уровня фиброза печени (по L. Wang и соавт. [86, 88]).

Fig. 4. Exosomes from natural killer (NK) cells reduce the level of experimental liver fibrosis.

Inactive human hepatic stellate cells of the LX-2 line were activated with TGF- β 1 and then treated with exosomes isolated from NK cells – NK-Exo exosomes. As a result, human liver stellate cells activity was suppressed. The injection of NK-Exo into mice with experimentally induced fibrosis led to a decrease in the level of fibrosis. The antifibrotic effect of NK-Exo was associated with a high level of miR-223 expression directed at the autophagy protein ATG7 and suppression of its function. The blockade of autophagy caused a decrease in the level of liver fibrosis (according to L. Wang, et al. [86, 88]).

связь экзосом с воспалением. Для этого была изучена экспрессия фактора некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкина 6 (IL-6) и хемокинового лиганда 5 (CCL5) в гепатоцитах, подвергшихся воздействию экзосом от пациентов с COVID-19 и от здоровых лиц. Оказалось, что экспрессия цитокинов и хемокина в гепатоцитах была значительно повышена только после обработки экзосомами от пациентов с COVID-19 и ассоциировалась с активацией NF- κ B в гепатоцитах (рис. 5 а). Это указывает на потенциальную возможность экзосом из плазмы крови больных COVID-19 индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов и вызывать клинические проявления заболевания, ассоциированного с SARS-CoV-2 не только в лёгких, но и в гепатоцитах – клетках удалённого органа. Этот вывод подтверждается наблюдениями о внелёгочных проявлениях COVID-19 [103].

Роль ВВ/экзосом в инфекции SARS-CoV-2 изучалась также в опытах с эпителиальными клетками лёгких A549 [104]. Показано, что после трансдукции лентивирусом, кодирующим два неструктурных (Nsp1 and Nsp12) и два структурных (envelope E и nucleocapsid N) белки SARS-CoV-2, ВВ, выделенные из клеток A549, содержат вирусную РНК (рис. 5 б). ВВ использовали для обработки кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC-CMs). Методом qRT-PCR в кардиомиоцитах были обнаружены мРНК всех четырёх вирусных генов. Кроме того, в кардиомиоцитах, содержащих Nsp1, значительно увеличивалась экспрессия провоспалительных генов IL-1 β , IL-6 и MCP1. Полученные данные указывают на то, что клетки, которые не экспрессируют рецептор ACE2 SARS-CoV-2, могут получать вирусную генетическую информацию путём поглощения ВВ/экзосом, а экспрессия вирусных генов может способствовать усилению воспаления, что характерно для патогенеза COVID-19. В то же время ВВ/экзосомы могут доставлять ACE2 в клетки, которые не экспрессируют или слабо экспрессируют рецептор SARS-CoV-2, транспортируя белок от других клеток [105]. В плазме крови пациентов с COVID-19 идентифицировали экзосомы, содержащие ACE2 (ACE2+), и показали [106], что экзосомы ACE2+ конкурируют с клеточным ACE2 за нейтрализацию SARS-CoV-2, дозозависимо блокируя связывание вирусного S-белка с клетками ACE2+ (рис. 5 в). Экзосомы, содержащие ACE2, в 120–135 раз более эффективно блокировали связывание рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка по сравнению с рекомбинантным человеческим ACE2 (rhACE2), не связанным с везикулами [107]. Кроме того, экзосомы ACE2+ в 60–80 раз более эффективно защищали трансгенных мышей, экспрессирующих ген *ace2* человека, от повреждения лёгких и гибели после интраназального заражения SARS-CoV-2. Экзосомы ACE2+ ингибировали инфекцию вариантов α , β и δ SARS-CoV-2, содержащих мутации в RBD, с равной или более высокой эффективностью, чем штамм дикого типа. Этот результат показал, что экзосомы, содержащие ACE2, могут служить основой для разработки терапевтических средств широкого спектра действия

против существующих и будущих коронавирусов, которые используют рецептор ACE2 [108].

Интересные данные получены при обследовании пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания [109]. Представлены количественные данные изучения 1002 метаболитов в плазме крови, показавшие значительное увеличение содержания ганглиозидов GM3, которое коррелировало со снижением количества циркулирующих CD4⁺-Т-клеток у пациентов с COVID-19 и прогрессирующим увеличением показателей системного воспаления, включая С-реактивный белок, IL-6, скорость оседания эритроцитов, сывороточный ферритин и прокальцитонин по мере увеличения тяжести заболевания. Сравнительный анализ выявил сильную связь между тяжестью заболевания и обнаружением в сыворотках крови экзосом, несущих ганглиозиды (GM3) (рис. 5 г). Показано, что GD3, присутствующие на поверхности экзосом в микроокружении опухоли, подавляют функции Т-клеток, способствуя иммуносупрессии [110]. Ганглиозиды присутствуют во всех клетках позвоночных, экспрессируются на наружной поверхности плазматических мембран клеток [111], специфически связываются с регуляторными белками и другими молекулами, модулируют активность белков клеточной поверхности и действуют как рецепторы при межклеточных взаимодействиях, являются мишенями для патогенов, в том числе SARS-CoV-2 [112]. Таким образом, обнаруженные в циркуляции экзосомы, содержащие ганглиозиды, могут утяжелять течение COVID-19 через нарушение клеточных регуляторных путей и иммунного ответа [113].

Одним из проявлений COVID-19 является образование тромбов. Клиническое исследование показало, что у пациентов с COVID-19 в циркуляции присутствуют ВВ, содержащие активные молекулы CD142, тесно связанные с повышенной прокоагулянтной активностью (рис. 5 д). Высвобождение ВВ, содержащих CD142, из эндотелиальных клеток ассоциируется с провоспалительной активностью [114]. На состояние сосудистой системы при COVID-19 влияют также ВВ из тромбоцитов, нагруженные CD142. В циркуляции больных COVID-19 количество таких везикул значительно увеличивается. Определена прямая взаимосвязь между циркулирующими ВВ, происходящими из тромбоцитов, и тяжестью заболевания, что послужило основанием предложить эти везикулы в качестве биомаркеров для прогнозирования исходов у пациентов с COVID-19 [99, 115–117].

Суммируя, можно заключить, что участие экзосом, выделенных из клеток пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, в патогенезе COVID-19 определяется:

- а) содержанием вирусных РНК, белков и вирионов;
- б) переносом вирусных компонентов от мест проникновения (эпителий дыхательных путей) в другие органы;
- в) способностью изменять экспрессию клеточных генов, вовлечённых в патогенез COVID-19;
- г) усилением сосудистой дисфункции и цитокинового шторма.

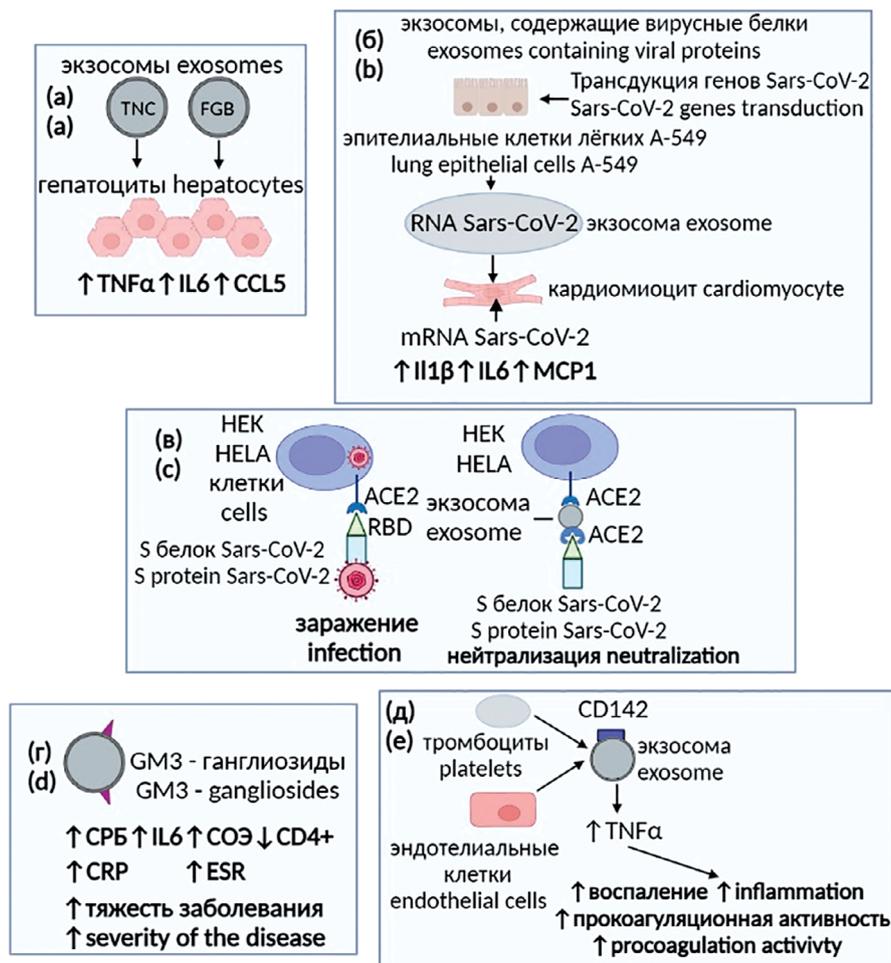


Рис. 5. Участие экзосом в патогенезе COVID-19:

- а – экзосомы, секретируемые клетками, инфицированными SARS-CoV-2, обогащены тенасцином-С (TNC) и фибриногеном-β (FGB) и, проникая в гепатоциты, инициируют продукцию TNF-α, IL-6 и CCL5 в гепатоцитах (по S. Sur и соавт. [101]);
- б – экзосомы, содержавшие гены SARS-CoV-2, вносили в культуру кардиомиоцитов и наблюдали в них экспрессию вирусных генов и значительное увеличение экспрессии генов провоспалительных цитокинов и хемокинов (по Y. Kwon и соавт. [104]);
- в – клеточный рецептор ACE2, взаимодействует с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка SARS-CoV-2, что вызывает заражение клеток (слева); в крови пациентов с COVID-19 обнаружили экзосомы, содержащие ACE2, и показали, что они конкурируют с клеточным рецептором ACE2, блокируя связывание S-белка с ACE2 клеток и нейтрализуя инфекционную активность вируса (справа) (по L. El-Shennawy и соавт. [107]);
- г – в сыворотках крови пациентов с COVID-19 обнаружили увеличение количества экзосом, несущих на поверхности ганглиозиды GM3, присутствие которых сопровождалось увеличением С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина 6 (IL-6) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ), снижением количества CD4⁺-клеток, а также коррелировало со степенью тяжести заболевания (по J.W. Song и соавт. [109]);
- д – экзосомы, высвобождающиеся из эндотелиальных клеток и тромбоцитов в циркуляцию у пациентов с COVID-19, содержат активные молекулы CD142 и обладают повышенной провоспалительной и прокоагулянтной активностью, прямо связаны с тяжестью заболевания (по W. Holnthoner и соавт. [114] и С. Balbi и соавт. [115]).

Fig. 5. Exosomes in the pathogenesis of COVID-19:

- a – exosomes secreted by cells infected with SARS-CoV-2 are enriched with tenascin-C (TNC) and fibrinogen-β (FGB) and, penetrating into hepatocytes, initiate the production of TNF-α, IL-6 and CCL5 in hepatocytes (according to S. Sur, et al. [101]);
- b – exosomes containing SARS-CoV-2 genes were introduced into the culture of cardiomyocytes and the expression of viral genes and a significant increase in the expression of proinflammatory cytokines and chemokines were observed in cardiomyocytes (according to Y. Kwon, et al. [104]);
- c – cell receptor ACE2 interacts with the receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 S protein, causing cell infection (left); exosomes containing ACE2 were found in the blood of patients with COVID-19. They competed with the ACE2 cell receptor, blocking the binding of S protein to cells and neutralizing the infectious activity of the virus (right) (according to L. El-Shennawy, et al. [107]);
- d – in the blood sera of patients with COVID-19, an increase in the number of exosomes carrying GM3 gangliosides on the surface was found. The presence of GM3-exosomes was accompanied by an increase in C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) and ESR rate, a decrease in the number of CD4⁺ cells, and also correlated with the severity of the disease (according to J.W. Song et al. [109]);
- e – exosomes released from endothelial cells and platelets into circulation of patients with COVID-19 contain active CD142 molecules and have increased pro-inflammatory and procoagulant activity, directly related to the severity of the disease (according to W. Holnthoner, et al. [114] and C. Balbi, et al. [115]).

Экзосомы в терапии и профилактике COVID-19

Широкий спектр вакцин, используемых в настоящее время, снижает уровень инфицирования SARS-

CoV-2, однако остаётся необходимость в лечении значительного числа пациентов, у которых развиваются пневмония и другие серьезные заболевания. Среди

многочисленных средств, предлагаемых для терапии, десятки опубликованных работ, а также клинических испытаний посвящены изучению возможности использования МСК различного происхождения [69]. Показано, что МСК подавляют воспаление, улучшают состояние лёгких, не вызывают побочных эффектов и статистически значимо снижают смертность пациентов с COVID-19 [118]. Авторы заключили, что использование МСК является безопасным и эффективным методом лечения COVID-19. Исследования продолжаются, так как ни одно из тестируемых средств пока не получило разрешение на использование в терапии COVID-19.

В последнее время внимание исследователей привлекает бесклеточная терапия, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с терапией МСК [119]. Она включает секретом МСК (набор факторов и биомолекул, секретируемых клетками) и ВВ/экзосомы, высвобождаемые из МСК. Анализ действия секретом МСК на повреждённые лёгкие крысы показал улучшение структуры лёгких, уменьшение α -SMA и снижение содержания коллагена. Это позволило предположить, что секретом МСК может представлять новый терапевтический подход к лечению такого серьёзного последствия COVID-19, как фиброз лёгких [120].

Предпосылками использования экзосом для лечения COVID-19 стали результаты работ, в которых анализировали действия экзосом при серьёзных повреждениях лёгких. Данные нескольких исследований показали, что ВВ/экзосомы, полученные из МСК костного мозга человека, оказывают положительное терапевтическое действие при остром повреждении лёгких и остром респираторном дистресс-синдроме у лабораторных животных [121]. Благодаря присутствию в экзосомах биологически активных молекул эти везикулы способны активировать регенерацию повреждённых тканей, подавлять выработку воспалительных цитокинов и модулировать функции иммунных клеток [122].

Одно из преимуществ экзосом состоит в их способности проникать в различные органы и ткани, что позволяет использовать их в качестве терапевтического средства при аэрозольной ингаляции (небулайзерная терапия) [123, 124]. Продемонстрировано, что ингаляция секретом и экзосом, полученных при культивировании клеток из лёгких мыши, содержащих эпителиальные, прогениторные клетки и МСК, способствует восстановлению лёгких при фиброзе. Наблюдается уменьшение накопления коллагена и пролиферации миофибробластов, восстанавливается типичная альвеолярная структура лёгких [125]. Ингаляционный способ введения менее болезненный, действует быстрее и при меньших дозах позволяет достичь такого же терапевтического эффекта, как при пероральной или инъекционной терапии [121].

Отмечают, что ВВ/экзосомы могут играть как положительную, так и отрицательную роль в коронавирусной инфекции. С одной стороны, ВВ могут подавлять инфекцию и предотвращать заражение, как это показано на примере ВВ, содержащих ACE2 или

ACE2 + TMPRSS2 [126, 127]. С другой стороны, ВВ могут способствовать вирусной инфекции, захватывая и распространяя вирус или вирусные компоненты и защищая их от иммунной системы. Кроме того, предполагают, что в периферической крови больных с SARS-CoV-2 присутствуют антагонистические экзосомы, которые могут снижать вирус-нейтрализующую способность плазмы крови реконвалесцентов и, вероятно, действуют как конкурентный ингибитор нейтрализующих антител [128].

Экзосомы используют в клинических исследованиях, направленных на лечение COVID-19 [129]. Оценивают потенциал экзосом в трех направлениях:

1) как везикул, секретируемых МСК из разных источников;

2) как везикул, содержащих специфические микроРНК и мРНК;

3) как везикул, доставляющих лекарства для лечения COVID-19.

С появлением коммерческих препаратов экзосом их также включают в исследования эффективности лечения. Так, проведено изучение безопасности и эффективности применения экзосом (ЕхоFlo), полученных из аллогенных МСК костного мозга, при лечении 24 пациентов с тяжёлым течением COVID-19, а также острым респираторным дистресс-синдромом средней и тяжёлой степени [130]. Внутривенное введение ЕхоFlo показало безопасность препарата, способность восстанавливать оксигенацию, подавлять цитокиновый шторм и восстанавливать иммунитет. Авторы заключили, что ЕхоFlo является многообещающим кандидатным лечебным средством при тяжёлой форме COVID-19. Суммируя данные о действии экзосом на различные клетки в лёгочной ткани, инфицированной SARS-CoV-2, авторы заключили [129], что экзосомы способны: а) взаимодействовать как с S-белком SARS-CoV-2, так и с клеточным рецептором ACE2, конкурентно подавляя проникновение вируса; б) снижать уровни провоспалительных цитокинов в сосудистых и альвеолярных клетках; повышать функции макрофагов, интерферонов, В-клеток, модулируя иммунные реакции. Эти результаты подтверждают вывод о том, что экзосомы – перспективные кандидаты для разработки вакцин.

При первых оценках возможности использования экзосом для разработки вакцин против коронавирусов за основу был принят S-белок SARS-CoV-1, вызвавший вспышку SARS в 2002–2003 гг. [131]. Препараты экзосом, содержавших S-белок, вводили мышам и показали, что двух инъекций экзосом без адьювантов было достаточно, чтобы индуцировать нейтрализующие антитела к коронавирусу. Наибольший эффект был достигнут при иммунизации вначале экзосомами, а затем аденовирусным вектором, экспрессирующим белок S. Сравнивали нейтрализующую активность антител в сыворотках крови иммунизированных мышей и сыворотках от выздоравливающих пациентов с пневмонией, вызванной SARS-CoV-1. Обнаружено, что после первой иммунизации экзосомальной вакциной и повторной стимуляции аденовирусным векто-

ром нейтрализующая активность антител превышала ту, которую наблюдали в сыворотке выздоравливающих пациентов. Высокая эффективность индукции гуморального ответа на введение экзосомальной вакцины, содержащей S-белок SARS-CoV-2, показала перспективность дальнейших исследований протективных свойств новых экзосомальных вакцин, способных предотвратить коронавирусные инфекции.

Большинство вакцин, используемых против SARS-CoV-2, предназначены для внутримышечного введения [132]. В 2022 г. сообщили о разработке и доклиническом испытании ингаляционной вакцины против COVID-19, которая после лиофилизации остаётся стабильной при комнатной температуре более трёх месяцев [133]. Вакцина содержит RBD SARS-CoV-2, конъюгированный с экзосомами из клеток лёгкого человека (рис. 6). Такая конструкция вакцины (экзосомы, содержащие на мембране RBD) увеличивает до 21 суток присутствие RBD как в слизистой оболочке дыхательных путей, так и в паренхиме лёгких. Ингаляционное введение вакцины вызывало у мышей специфические IgG-антитела к RBD в крови и IgA-антитела в слизистой оболочке. Наблюдалась индукция CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, экспрессирующих провоспалительные цитокины в лёгких животных и очищение их от псевдовируса SARS-CoV-2 после заражения. У хомячков две дозы вакцины ослабили тяжёлую пневмонию и уменьшили воспалительные инфильтраты после заражения живым SARS-CoV-2. Экзосомы, содержащие на мембране рекомбинантный RBD SARS-CoV-2 (rRBD), заслуживают дальнейших испытаний как кандидатная ингаляционная вакцина против COVID-19. К преимуществам ингаляционной вакцины можно отнести натуральное происхождение наночастиц – экзосом, несущих вирусный антиген; быструю и непосредственную доставку экзосом в слизистую респираторного тракта; отсутствие температурных ограничений при хранении и доставке вакцины, а также неинвазивный способ введения.

Заключение

Оценивая действие экзосом в вирусных инфекциях, следует отметить их двойственную роль. Способность поглощать и перемещать вирусные РНК- и ДНК-геномы, белки и вирусные частицы в неинфицированные клетки может способствовать генетической кооперации между квазивидами вирусов и улучшать их приспособленность и длительность пребывания в организме. Эти свойства позволили назвать ВВ/экзосомы троянскими конями в вирусной инфекции [134, 135]. Действительно, вирусы могут использовать экзосомы для распространения, усиления инфекции, а также защиты от иммунного ответа хозяина. В то же время получены данные о способности экзосом противодействовать вирусным инфекциям. Так, показано, что экзосомы содержат множество противовирусных факторов, которые ингибируют репликацию ВИЧ-1 [136], в том числе воздействуя на вирусный ген *tat* и его комплексы с клеточными генами [137, 138]. Положительное действие экзосом, проду-

цируемых МСК, отмечено в клинических испытаниях при острых респираторных заболеваниях [139, 140]. Экзосомы, выделенные из культуры первичных трофобластов человека, обеспечивали резистентность клеток-реципиентов к ряду изученных вирусов, в том числе вирусу осповакцины, вирусу простого герпеса 1-го типа и цитомегаловирусу.

Таким образом, процессы, в которых участвуют экзосомы, могут играть как положительную, так и отрицательную роль в патогенезе вирусных инфекций, либо способствуя развитию инфекции, либо сдерживая её развитие [141]. Важное направление использования экзосом связано с содержанием в них маркеров вирусов и вирусных инфекций, что создаёт возможность применения экзосом в качестве жидкой биопсии и неинвазивной диагностики. Натуральное происхождение из клеток человека и высокая биосовместимость позволяют применять экзосомы для доставки лекарственных препаратов. Генетически модифицированные экзосомы могут служить основой для создания

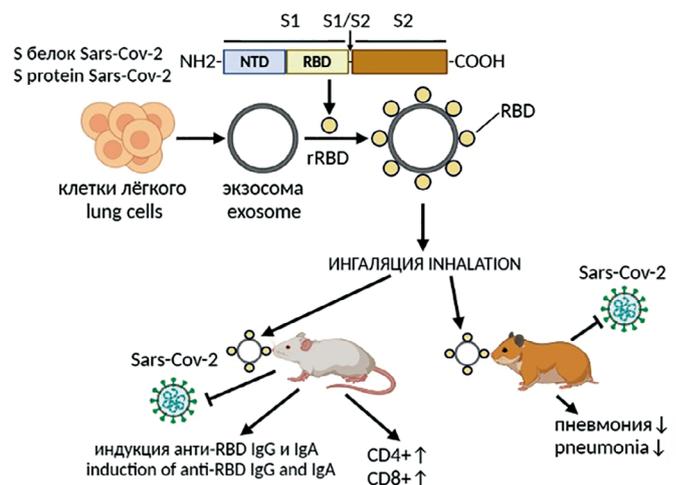


Рис. 6. Схематическое изображение получения и действия ингаляционной вакцины против SARS-CoV-2.

S-белок SARS-CoV-2 содержит домен, связывающий рецептор (RBD). Получен рекомбинантный белок RBD (rRBD). Методом малоинвазивной биопсии и трехмерного культивирования получали клетки лёгкого человека, из которых выделяли экзосомы. Экзосомы конъюгировали с rRBD SARS-CoV-2, который локализовался на мембране экзосомы. Путём ингаляции экзосомы вводили мышам и хомячкам. У мышей экзосомная вакцина вызывала индукцию анти-RBD антител классов IgG и мукозных – IgA, увеличение количества клеток CD4⁺ и CD8⁺ и клиренс вируса после заражения SARS-CoV-2. У хомячков вакцина ослабляла тяжёлую пневмонию, вызванную коронавирусом (по Z. Wang и соавт. [186], модифицировано).

Fig. 6. Schematic representation of the preparation and effects of the inhaled vaccine against SARS-CoV-2.

S protein SARS-CoV-2 contains a receptor binding domain (RBD). Recombinant protein RBD (rRBD) has been prepared. Human lung cells were obtained by minimal invasive biopsy and three-dimensional cultivation, from which exosomes were isolated. The exosomes were conjugated with rRBD, which was localized on the membrane of the exosome. Exosomes were injected into mice and hamsters by inhalation. In mice, the exosomal vaccine induced the induction of IgG and mucosal IgA anti-RBD antibodies, an increase in the number of CD4⁺ and CD8⁺ cells, and virus clearance after infection with SARS-CoV-2. In hamsters, the vaccine weakened severe pneumonia caused by coronavirus (Adapted with modification from Z. Wang, et al. [186]).

терапевтических средств и противовирусных вакцин. Очевидно, что позитивное и негативное участие экзосом в патогенезе вирусных инфекций в настоящее время недостаточно изучено и требует дальнейших расширенных исследований. Так, использование экзосом для лечебных и профилактических целей может быть опасным в связи с формированием аутоиммунных реакций из-за наличия в их структуре компонентов (в том числе и белков) человека. Усовершенствование методов выделения, очистки и стандартизации везикул, а также дальнейшие многосторонние исследования их свойств открывают перспективы для использования экзосом в борьбе с вирусными инфекциями.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 1983; 97(2): 329–39. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983; 33(3): 967–78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Harding C.V., Heuser J.E., Stahl P.D. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J. Cell Biol.* 2013; 200(4): 367–71. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>
- Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 1987; 262(19): 9412–20.
- Xie S., Zhang Q., Jiang L. Current knowledge on exosome biogenesis, cargo-sorting mechanism and therapeutic implications. *Membranes (Basel)*. 2022; 12(5): 498. <https://doi.org/10.3390/membranes12050498>
- Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primal-Bengtson B., et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016; 113(8): E968–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Wang S., Zhang K., Tan S., Xin J., Yuan Q., Xu H., et al. Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Mol. Cancer*. 2021; 20(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01298-z>
- Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020; 367(6478): eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Zeng Y., Qiu Y., Jiang W., Shen J., Yao X., He X., et al. Biological features of extracellular vesicles and challenges. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10: 816698. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.816698>
- Todd K.V., Tripp R.A. Exosome-mediated human norovirus infection. *PLoS One*. 2020; 15(8): e0237044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237044>
- Kowalczyk A., Wrzecińska M., Czerniawska-Piątkowska E., Kupczyński R. Exosomes – spectacular role in reproduction. *Biomed. Pharmacother.* 2022; 148: 112752. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112752>
- Lee I., Choi Y., Shin D.U., Kwon M., Kim S., Jung H., et al. Small extracellular vesicles as a new class of medicines. *Pharmaceutics*. 2023; 15(2): 325. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020325>
- Picca A., Guerra F., Calvani R., Coelho-Junior H.J., Bucci C., Marzetti E. Circulating extracellular vesicles: friends and foes in neurodegeneration. *Neural. Regen. Res.* 2022; 17(3): 534–42. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320972>
- Liu F., Vermesh O., Mani V., Ge T.J., Madsen S.J., Sabour A., et al. The exosome total isolation chip. *ACS Nano*. 2017; 11(11): 10712–23. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04878>
- Zhang H., Lyden D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nat. Protoc.* 2019; 14(4): 1027–53. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0126-x>
- Kang Y.T., Kim Y.J., Bu J., Cho Y.H., Han S.W., Moon B.I. High-purity capture and release of circulating exosomes using an exosome-specific dual-patterned immunofiltration (ExoDIF) device. *Nanoscale*. 2017; 9(36): 13495–505. <https://doi.org/10.1039/c7nr04557c>
- Pathan M., Fonseka P., Chitti S.V., Kang T., Sanwlani R., Van Deun J., et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic. Acids. Res.* 2019; 47(D1): D516–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1029>
- Sidhom K., Obi P.O., Saleem A. A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(18): 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- van der Pol E., Sturk A., van Leeuwen T., Nieuwland R., Coumans F. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J. Thromb. Haemost.* 2018; 16(6): 1236–45. <https://doi.org/10.1111/jth.14009>
- Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*. 2018; 7(1): 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018>
- Mulligan R.J., Yap C.C., Winckler B. Endosomal transport to lysosomes and the trans-Golgi network in neurons and other cells: visualizing maturational flux. *Methods Mol. Biol.* 2023; 2557: 595–618. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2639-9_36
- Krylova S.V., Feng D. The machinery of exosomes: biogenesis, release, and uptake. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1337. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>
- Homma Y., Hiragi S., Fukuda M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J.* 2021; 288(1): 36–55. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>
- Liu G., Yin X.M. The role of extracellular vesicles in liver pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 2022; 192(10): 1358–67. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.06.007>
- Scourfield E.J., Martin-Serrano J. Growing functions of the ESCRT machinery in cell biology and viral replication. *Biochem. Soc. Trans.* 2017; 45(3): 613–34. <https://doi.org/10.1042/BST20160479>
- Lin C.Y., Urbina A.N., Wang W.H., Thitithanyanont A., Wang S.F. Virus hijacks host proteins and machinery for assembly and budding, with HIV-1 as an example. *Viruses*. 2022; 14(7): 1528. <https://doi.org/10.3390/v14071528>
- Johnson D.S., Bleck M., Simon S.M. Timing of ESCRT-III protein recruitment and membrane scission during HIV-1 assembly. *Elife*. 2018; 7: e36221. <https://doi.org/10.7554/eLife.36221>
- Hoffman H.K., Fernandez M.V., Groves N.S., Freed E.O., van Engelenburg S.B. Genomic tagging of endogenous human ESCRT-I complex preserves ESCRT-mediated membrane-remodeling functions. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(44): 16266–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009372>
- Meusser B., Purfuerst B., Luft F.C. HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(52): 17950–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014710>
- Hadpech S., Moonmuang S., Chupradit K., Yasamat U., Tayapiwatana C. Updating on roles of HIV intrinsic factors: a review of their antiviral mechanisms and emerging functions. *Intervirology*. 2022; 65(2): 67–79. <https://doi.org/10.1159/000519241>
- Gerber P.P., Cabrini M., Jancic C., Paoletti L., Banchio C., von Bilderling C., et al. Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 2015; 209(3): 435–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409082>
- Teow S.Y., Nordin A.C., Ali S.A., Khoo A.S. Exosomes in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: threat or opportunity? *Adv. Virol.* 2016; 2016: 9852494. <https://doi.org/10.1155/2016/9852494>
- Chiozzini C., Arenaccio C., Olivetta E., Anticoli S., Manfredi F., Ferrantelli F., et al. Trans-dissemination of exosomes from HIV-1-infected cells fosters both HIV-1 trans-infection in resting CD4+ T lymphocytes and reactivation of the HIV-1 reservoir. *Arch. Virol.* 2017; 162(9): 2565–77. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3391-4>
- Hayes C.N., Zhang Y., Makokha G.N., Hasan M.Z., Omokoko M.D., Chayama K. Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 31(2): 302–9. <https://doi.org/10.1111/jgh.13175>
- Lin Y., Wu C., Wang X., Kemper T., Squire A., Gunzer M., et al. Hepatitis B virus is degraded by autophagosome-lysosome fusion

- mediated by Rab7 and related components. *Protein Cell*. 2019; 10(1): 60–6. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0555-2>
36. Chou S.F., Tsai M.L., Huang J.Y., Chang Y.S., Shih C. The dual role of an ESCRT-0 component HGS in HBV transcription and naked capsid secretion. *PLoS Pathog*. 2015; 11(10): e1005123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005123>
 37. Prange R. Hepatitis B virus movement through the hepatocyte: An update. *Biol. Cell*. 2022; 114(12): 325–48. <https://doi.org/10.1111/boc.202200060>
 38. Wu Q., Glitscher M., Tonnemacher S., Schollmeier A., Raupach J., Zahn T., et al. Presence of intact hepatitis B virions in exosomes. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol*. 2023; 15(1): 237–59. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.09.012>
 39. van der Ree M.H., Jansen L., Kruize Z., van Nuenen A.C., van Dort K.A., Takkenberg R.B., et al. Plasma MicroRNA levels are associated with hepatitis B e antigen status and treatment response in chronic hepatitis B patients. *J. Infect. Dis*. 2017; 215(9): 1421–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix140>
 40. Wang D., Huang T., Ren T., Liu Q., Zhou Z., Ge L., et al. Identification of blood exosomal miRNA-1246, miRNA-150-5p, miRNA-5787 and miRNA-8069 as sensitive biomarkers for hepatitis B virus infection. *Clin. Lab*. 2022; 68(2). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210415>
 41. Ninomiya M., Inoue J., Krueger E.W., Chen J., Cao H., Masamune A., et al. The exosome-associated tetraspanin CD63 contributes to the efficient assembly and infectivity of the hepatitis B virus. *Hepatol. Commun*. 2021; 5(7): 1238–51. <https://doi.org/10.1002/hep4.1709>
 42. Kakizaki M., Yamamoto Y., Yabuta S., Kurosaki N., Kagawa T., Kotani A. The immunological function of extracellular vesicles in hepatitis B virus-infected hepatocytes. *PLoS One*. 2018; 13(12): e0205886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205886>
 43. Wang C., Liu J., Yan Y., Tan Y. Role of exosomes in chronic liver disease development and their potential clinical applications. *J. Immunol. Res*. 2022; 2022: 1695802. <https://doi.org/10.1155/2022/1695802>
 44. Bunz M., Ritter M., Schindler M. HCV egress – unconventional secretion of assembled viral particles. *Trends Microbiol*. 2022; 30(4): 364–78. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.08.005>
 45. Kulhanek K.R., Roose J.P., Rubio I. Regulation of the small GTPase Ras and its relevance to human disease. *Methods. Mol. Biol*. 2021; 2262: 19–43. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1190-6_2
 46. Elgner F., Hildt E., Bender D. Relevance of Rab proteins for the life cycle of hepatitis C virus. *Front. Cell Dev. Biol*. 2018; 6: 166. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00166>
 47. Ahmed I., Akram Z., Iqbal H.M.N., Munn A.L. The regulation of Endosomal Sorting Complex Required for Transport and accessory proteins in multivesicular body sorting and enveloped viral budding – an overview. *Int. J. Biol. Macromol*. 2019; 127: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.015>
 48. Corless L., Crump C.M., Griffin S.D., Harris M. Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J. Gen. Virol*. 2010; 91(Pt. 2): 362–72. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017285-0>
 49. Li C., Gao Z., Cui Z., Liu Z., Bian Y., Sun H., et al. Deubiquitylation of Rab35 by USP32 promotes the transmission of imatinib resistance by enhancing exosome secretion in gastrointestinal stromal tumours. *Oncogene*. 2023; 42(12): 894–910. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02600-1>
 50. Kumar S., Barouch-Bentov R., Xiao F., Schor S., Pu S., Biquand E., et al. MARCH8 ubiquitinates the hepatitis C virus nonstructural 2 protein and mediates viral envelopment. *Cell Rep*. 2019; 26(7): 1800–14.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.075>
 51. Tamai K., Shiina M., Tanaka N., Nakano T., Yamamoto A., Kondo Y., et al. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology*. 2012; 422(2): 377–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.009>
 52. Tamai K., Tanaka N., Nakano T., Kakazu E., Kondo Y., Inoue J., et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010; 399(3): 384–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.083>
 53. Barouch-Bentov R., Neveu G., Xiao F., Beer M., Bekerman E., Schor S., et al. Hepatitis C virus proteins interact with the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) machinery via ubiquitination to facilitate viral envelopment. *mBio*. 2016; 7(6): e01456-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01456-16>
 54. Younossi Z., Tacke F., Arrese M., Chander Sharma B., Mostafa I., Bugianesi E., et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2019; 69(6): 2672–82. <https://doi.org/10.1002/hep.30251>
 55. Newman L.A., Muller K., Rowland A. Circulating cell-specific extracellular vesicles as biomarkers for the diagnosis and monitoring of chronic liver diseases. *Cell Mol. Life Sci*. 2022; 79(5): 232. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04256-8>
 56. Li J., Liu H., Mauer A.S., Lucien F., Raiter A., Bandla H., et al. Characterization of cellular sources and circulating levels of extracellular vesicles in a dietary murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Commun*. 2019; 3(9): 1235–49. <https://doi.org/10.1002/hep4.1404>
 57. Shah R., Patel T., Freedman J.E. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N. Engl. J. Med*. 2018; 379(10): 958–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704286>
 58. Ramakrishnaiah V., Thumann C., Fofana I., Habersetzer F., Pan Q., de Ruiter P.E., et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(32): 13109–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>
 59. Bukong T.N., Momen-Heravi F., Kodys K., Bala S., Szabo G. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog*. 2014; 10(10): e1004424. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004424>
 60. Dreux M., Garaigorta U., Boyd B., Décembre E., Chung J., Whitten-Bauer C., et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host. Microbe*. 2012; 12(4): 558–70. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.010>
 61. Zhang S., Kodys K., Babcock G.J., Szabo G. CD81/CD9 tetraspanins aid plasmacytoid dendritic cells in recognition of hepatitis C virus-infected cells and induction of interferon-alpha. *Hepatology*. 2013; 58(3): 940–9. <https://doi.org/10.1002/hep.25827>
 62. Conde-Vancells J., Rodriguez-Suarez E., Embade N., Gil D., Matthiesen R., Valle M., et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome. Res*. 2008; 7(12): 5157–66. <https://doi.org/10.1021/pr8004887>
 63. Properzi F., Logozzi M., Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark. Med*. 2013; 7(5): 769–78. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.63>
 64. Szabo G., Momen-Heravi F. Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 14(8): 455–66. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.71>
 65. Borrelli D.A., Yankson K., Shukla N., Vilanilam G., Ticer T., Wolfram J. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease. *J. Control. Release*. 2018; 273: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.022>
 66. Lin D., Reddy V., Osman H., Lopez A., Koksai A.R., Rhadhi S.M., et al. Additional inhibition of Wnt/β-catenin signaling by metformin in DAA treatments as a novel therapeutic strategy for HCV-infected patients. *Cells*. 2021; 10(4): 790. <https://doi.org/10.3390/cells10040790>
 67. McVey M.J., Kuebler W.M. Extracellular vesicles: biomarkers and regulators of vascular function during extracorporeal circulation. *Oncotarget*. 2018; 9(98): 37229–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26433>
 68. Fendl B., Weiss R., Eichhorn T., Linsberger I., Afonyushkin T., Puhm F., et al. Extracellular vesicles are associated with C-reactive protein in sepsis. *Sci. Rep*. 2021; 11(1): 6996. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86489-4>
 69. U.S. National Library of Medicine. Available at: <https://clinicaltrials.gov/>
 70. Feng Y., Wang A.T., Jia H.H., Zhao M., Yu H. A brief analysis of mesenchymal stem cells as biological drugs for the treatment of Acute-on-Chronic Liver Failure (ACLF): safety and potency. *Curr. Stem. Cell Res. Ther*. 2020; 15(3): 202–10. <https://doi.org/10.2174/1574888X15666200101124317>
 71. Qian X., Xu C., Fang S., Zhao P., Wang Y., Liu H., et al. Exosomal microRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection. *Stem. Cells Transl. Med*. 2016; 5(9): 1190–203. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0348>
 72. Khatun M., Ray R.B. Mechanisms underlying hepatitis C virus-associated hepatic fibrosis. *Cells*. 2019; 8(10): 1249. <https://doi.org/10.3390/cells8101249>

73. Devhare P.B., Sasaki R., Shrivastava S., Di Bisceglie A.M., Ray R., Ray R.B. Exosome-mediated intercellular communication between hepatitis C virus-infected hepatocytes and hepatic stellate cells. *J. Virol.* 2017; 91(6): e02225-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02225-16>
74. Kim J.H., Lee C.H., Lee S.W. Exosomal transmission of microRNA from HCV replicating cells stimulates transdifferentiation in hepatic stellate cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2019; 14: 483–97. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.006>
75. Bruno S., Pasquino C., Herrera Sanchez M.B., Tapparo M., Figliolini F., Grange C., et al. HLSC-derived extracellular vesicles attenuate liver fibrosis and inflammation in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol. Ther.* 2020; 28(2): 479–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.10.016>
76. Chiabotto G., Ceccotti E., Tapparo M., Camussi G., Bruno S. Human liver stem cell-derived extracellular vesicles target hepatic stellate cells and attenuate their pro-fibrotic phenotype. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 777462. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.777462>
77. Rong X., Liu J., Yao X., Jiang T., Wang Y., Xie F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Stem. Cell Res. Ther.* 2019; 10(1): 98. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1204-2>
78. Kim J., Lee C., Shin Y., Wang S., Han J., Kim M., et al. sEVs from tonsil-derived mesenchymal stromal cells alleviate activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through miR-486-5p. *Mol. Ther.* 2021; 29(4): 1471–86. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.025>
79. Du Z., Wu T., Liu L., Luo B., Wei C. Extracellular vesicles-derived miR-150-5p secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits CXCL1 expression to attenuate hepatic fibrosis. *J. Cell Mol. Med.* 2021; 25(2): 701–15. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16119>
80. Chen L., Chen R., Kemper S., Cong M., You H., Brigstock D.R. Therapeutic effects of serum extracellular vesicles in liver fibrosis. *J. Extracell. Vesicles.* 2018; 7(1): 1461505. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1461505>
81. Bruno S., Chiabotto G., Camussi G. Extracellular vesicles: a therapeutic option for liver fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(12): 4255. <https://doi.org/10.3390/ijms21124255>
82. Hwang S., Yang Y.M. Exosomal microRNAs as diagnostic and therapeutic biomarkers in non-malignant liver diseases. *Arch. Pharm. Res.* 2021; 44(6): 574–87. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01338-2>
83. Zhou Y., Wang X., Sun L., Zhou L., Ma T.C., Song L., et al. Toll-like receptor 3-activated macrophages confer anti-HCV activity to hepatocytes through exosomes. *FASEB J.* 2016; 30(12): 4132–40. <https://doi.org/10.1096/fj.20160696R>
84. Fasbender F., Wiedera A., Hengstler J.G., Watzl C. Natural killer cells and liver fibrosis. *Front. Immunol.* 2016; 7: 19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00019>
85. Neviani P., Wise P.M., Murtadha M., Liu C.W., Wu C.H., Jong A.Y., et al. Natural killer-derived exosomal miR-186 inhibits neuroblastoma growth and immune escape mechanisms. *Cancer Res.* 2019; 79(6): 1151–64. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0779>
86. Wang L., Wang Y., Quan J. Exosomes derived from natural killer cells inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Hum. Cell.* 2020; 33(3): 582–9. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00371-5>
87. Target Scan Human. Whitehead Institute for Biomedical Research. Available at: <http://www.targetscan.org>
88. Wang L., Wang Y., Quan J. Exosomal miR-223 derived from natural killer cells inhibits hepatic stellate cell activation by suppressing autophagy. *Mol. Med.* 2020; 26(1): 81. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00207-w>
89. Ye H.L., Zhang J.W., Chen X.Z., Wu P.B., Chen L., Zhang G. Ursodeoxycholic acid alleviates experimental liver fibrosis involving inhibition of autophagy. *Life Sci.* 2020; 242: 117175. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117175>
90. Zhang Y., Hua L., Lin C., Yuan M., Xu W., Raj D.A., et al. Pien-Tze-Huang alleviates CCl4-induced liver fibrosis through the inhibition of HSC autophagy and the TGF- β 1/Smad2 pathway. *Front. Pharmacol.* 2022; 13: 937484. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.937484>
91. Avalos P.N., Forsthoefel D.J. An emerging frontier in intercellular communication: extracellular vesicles in regeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10: 849905. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.849905>
92. Verweij F.J., Revenu C., Arras G., Dingli F., et al. Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes in vivo. *Dev. Cell.* 2019; 48(4): 573–89.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.004>
93. Matsumoto A., Takahashi Y., Nishikawa M., Sano K., Morishita M., Charoenviriyakul C., et al. Role of phosphatidylserine-derived negative surface charges in the recognition and uptake of intravenously injected B16BL6-derived exosomes by macrophages. *J. Pharm. Sci.* 2017; 106(1): 168–75. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.07.022>
94. Wu R., Fan X., Wang Y., Shen M., Zheng Y., Zhao S., et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in liver immunity and therapy. *Front. Immunol.* 2022; 13: 833878. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833878>
95. Schorey J.S., Harding C.V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1181–9. <https://doi.org/10.1172/JCI81132>
96. Yao Z., Qiao Y., Li X., Chen J., Ding J., Bai L., et al. Exosomes exploit the virus entry machinery and pathway to transmit alpha interferon-induced antiviral activity. *J. Virol.* 2018; 92(24): e01578-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01578-18>
97. Hassanpour M., Rezaie J., Nouri M., Panahi Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104422. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104422>
98. Earnest J.T., Hantak M.P., Li K., McCray P.B. Jr., Perlman S., Gallagher T. The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *PLoS Pathog.* 2017; 13(7): e1006546. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006546>
99. Barberis E., Vanella V.V., Falasca M., Caneperio V., Cappellano G., Raineri D., et al. Circulating exosomes are strongly involved in SARS-CoV-2 infection. *Front. Mol. Biosci.* 2021; 8: 632290. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.632290>
100. Bansal S., Perincheri S., Fleming T., Poulson C., Tiffany B., Bremner R.M., et al. Cutting edge: circulating exosomes with COVID spike protein are induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) vaccination prior to development of antibodies: a novel mechanism for immune activation by mRNA vaccines. *J. Immunol.* 2021; 207(10): 2405–10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637>
101. Sur S., Khatun M., Steele R., Isbell T.S., Ray R., Ray R.B. Exosomes from COVID-19 patients carry tenascin-C and fibrinogen- β in triggering inflammatory signals in cells of distant organ. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(6): 3184. <https://doi.org/10.3390/ijms22063184>
102. Mills J.T., Schwenzer A., Marsh E.K., Edwards M.R., Sabroe I., Midwood K.S., et al. Airway epithelial cells generate pro-inflammatory tenascin-C and small extracellular vesicles in response to TLR3 stimuli and rhinovirus infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1987. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01987>
103. Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., Nair N., Mahajan S., Sehrawat T.S., et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(7): 1017–32. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3>
104. Kwon Y., Nukala S.B., Srivastava S., Miyamoto H., Ismail N.I., Jousma J., et al. Detection of viral RNA fragments in human iPSC cardiomyocytes following treatment with extracellular vesicles from SARS-CoV-2 coding sequence overexpressing lung epithelial cells. *Stem. Cell Res. Ther.* 2020; 11(1): 514. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02033-7>
105. Wang J., Chen S., Bihl J. Exosome-mediated transfer of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) from endothelial progenitor cells promotes survival and function of endothelial cell. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2020; 2020: 4213541. <https://doi.org/10.1155/2020/4213541>
106. Coccozza F., Névo N., Piovesana E., Lahaye X., Buchrieser J., Schwartz O., et al. Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *J. Extracell. Vesicles.* 2020; 10(2): e12050. <https://doi.org/10.1002/jev2.12050>
107. El-Shennawy L., Hoffmann A.D., Dashzeveg N.K., McAndrews K.M., Mehl P.J., Cornish D., et al. Circulating ACE2-expressing extracellular vesicles block broad strains of SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* 2022; 13(1): 405. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27893-2>
108. Ching K.L., de Vries M., Gago J., Dancel-Manning K., Sall J., Rice W.J., et al. ACE2-containing defensosomes serve as decoys to inhibit SARS-CoV-2 infection. *PLoS Biol.* 2022; 20(9): e3001754. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001754>
109. Song J.W., Lam S.M., Fan X., Cao W.J., Wang S.Y., Tian H., et al. Omics-driven systems interrogation of metabolic dysregulation in COVID-19 pathogenesis. *Cell Metab.* 2020; 32(2): 188–202.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.016>

110. Shenoy G.N., Loyall J., Berenson C.S., Kelleher R.J. Jr., Iyer V., Balu-Iyer S.V., et al. Sialic acid-dependent inhibition of T cells by exosomal ganglioside GD3 in ovarian tumor microenvironments. *J. Immunol.* 2018; 201(12): 3750–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801041>
111. Schnaar R.L. The biology of gangliosides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2019; 76: 113–48. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2018.09.002>
112. Fantini J., Chahinian H., Yahi N. Leveraging coronavirus binding to gangliosides for innovative vaccine and therapeutic strategies against COVID-19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 538: 132–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.015>
113. Hall M.W., Joshi L., Leal L., Ooi E.E. Immune immunomodulation in coronavirus disease 2019 (COVID-19): strategic considerations for personalized therapeutic intervention. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 74(1): 144–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa904>
114. Holthöner W., Bonstingl C., Hromada C., Muehleder S., Zipperle J., Stojkovic S., et al. Endothelial cell-derived extracellular vesicles size-dependently exert procoagulant activity detected by thromboelastometry. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 3707. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03159-0>
115. Balbi C., Burrello J., Bolis S., Lazzarini E., Biemmi V., Pianezzi E., et al. Circulating extracellular vesicles are endowed with enhanced procoagulant activity in SARS-CoV-2 infection. *EBioMedicine.* 2021; 67: 103369. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103369>
116. Cappellano G., Raineri D., Rolla R., Giordano M., Puricelli C., Vilaro B., et al. Circulating platelet-derived extracellular vesicles are a hallmark of SARS-Cov-2 infection. *Cells.* 2021; 10(1): 85. <https://doi.org/10.3390/cells10010085>
117. Tahyra A.S.C., Calado R.T., Almeida F. The role of extracellular vesicles in COVID-19 pathology. *Cells.* 2022; 11(16): 2496. <https://doi.org/10.3390/cells11162496>
118. Yang C.W., Chen R.D., Zhu Q.R., Han S.J., Kuang M.J. Efficacy of umbilical cord mesenchymal stromal cells for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Front. Immunol.* 2022; 13: 923286. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.923286>
119. Tan M.I., Alfarafiga N.M., Septiani P., Barlian A., Firmansyah M., Faizal A., et al. Potential cell-based and cell-free therapy for patients with COVID-19. *Cells.* 2022; 11(15): 2319. <https://doi.org/10.3390/cells11152319>
120. Bari E., Ferrarotti I., Saracino L., Perteghella S., Torre M.L., Richeldi L., et al. Mesenchymal stromal cells secretome for post-COVID-19 pulmonary fibrosis: a new therapy to treat the long-term lung sequelae? *Cells.* 2021; 10(5): 1203. <https://doi.org/10.3390/cells10051203>
121. Gardin C., Ferroni L., Chachques J.C., Zavan B. Could mesenchymal stem cell-derived exosomes be a therapeutic option for critically ill COVID-19 patients? *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2762. <https://doi.org/10.3390/jcm9092762>
122. Perets N., Hertz S., London M., Offen D. Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice. *Mol. Autism.* 2018; 9: 57. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0240-6>
123. Elahi F.M., Farwell D.G., Nolte J.A., Anderson J.D. Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells. *Stem. Cells.* 2020; 38(1): 15–21. <https://doi.org/10.1002/stem.3061>
124. Allan D., Tieu A., Lalu M., Burger D. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for regenerative therapy and immune modulation: Progress and challenges toward clinical application. *Stem. Cells Transl. Med.* 2020; 9(1): 39–46. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0114>
125. Dinh P.C., Paudel D., Brochu H., Popowski K.D., Gracieux M.C., Cores J., et al. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 1064. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14344-7>
126. Coccozza F., Névo N., Piovesana E., Lahaye X., Buchrieser J., Schwartz O., et al. Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *J. Extracell. Vesicles.* 2020; 10(2): e12050. <https://doi.org/10.1002/jev2.12050>
127. Inal J.M. Decoy ACE2-expressing extracellular vesicles that competitively bind SARS-CoV-2 as a possible COVID-19 therapy. *Clin. Sci. (Lond).* 2020; 134(12): 1301–4. <https://doi.org/10.1042/CS20200623>
128. Askenase P.W. COVID-19 therapy with mesenchymal stromal cells (MSC) and convalescent plasma must consider exosome involvement: Do the exosomes in convalescent plasma antagonize the weak immune antibodies? *J. Extracell. Vesicles.* 2020; 10(1): e12004. <https://doi.org/10.1002/jev2.12004>
129. Rezaabakhsh A., Mahdipour M., Nourazarian A., Habibollahi P., Sokullu E., Avci Ç.B., et al. Application of exosomes for the alleviation of COVID-19-related pathologies. *Cell Biochem. Funct.* 2022; 40(5): 430–8. <https://doi.org/10.1002/cbf.3720>
130. Sengupta V., Sengupta S., Lazo A., Woods P., Nolan A., Bremer N. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19. *Stem. Cells Dev.* 2020; 29(12): 747–54. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0080>
131. Kuate S., Cinatl J., Doerr H.W., Ueberl K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology.* 2007; 362(1): 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.011>
132. Sharma K., Koirala A., Nicolopoulos K., Chiu C., Wood N., Britton P.N. Vaccines for COVID-19: Where do we stand in 2021? *Paediatr. Respir. Rev.* 2021; 39: 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.pr-rv.2021.07.001>
133. Wang Z., Popowski K.D., Zhu D., de Juan Abad B.L., Wang X., Liu M., et al. Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine. *Nat. Biomed. Eng.* 2022; 6(7): 791–805. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00902-5>
134. Altan-Bonnet N. Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 32: 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.004>
135. Badierah R.A., Uversky V.N., Redwan E.M. Dancing with Trojan horses: an interplay between the extracellular vesicles and viruses. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021; 39(8): 3034–60. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1756409>
136. Sun L., Wang X., Zhou Y., Zhou R.H., Ho W.Z., Li J.L. Exosomes contribute to the transmission of anti-HIV activity from TLR3-activated brain microvascular endothelial cells to macrophages. *Antiviral. Res.* 2016; 134: 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.013>
137. Welch J.L., Kaddour H., Schlievert P.M., Stapleton J.T., Okeoma C.M. Semen exosomes promote transcriptional silencing of HIV-1 by disrupting NF-κB/Sp1/Tat circuitry. *J. Virol.* 2018; 92(21): e00731-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00731-18>
138. Chen J., Li C., Li R., Chen H., Chen D., Li W. Exosomes in HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2021; 16(5): 262–70. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000694>
139. Abraham A., Krasnodembkaya A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Stem. Cells. Transl. Med.* 2020; 9(1): 28–38. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0205>
140. Popowski K.D., Dinh P.C., George A., Lutz H., Cheng K. Exosome therapeutics for COVID-19 and respiratory viruses. *View (Beijing).* 2021; 2(3): 20200186. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200186>
141. Rangel-Ramírez V.V., González-Sánchez H.M., Lucio-García C. Exosomes: from biology to immunotherapy in infectious diseases. *Infect. Dis. (Lond).* 2023; 55(2): 79–107. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2149852>