

Экзосомы молока в качестве агентов доставки терапевтически значимых препаратов при онкологических заболеваниях

С.Е. Седых^{1,2}, А.М. Тимофеева¹, А.Е. Кулешова¹, Г.А. Невинский^{1,2}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»; Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Контакты: Сергей Евгеньевич Седых sedyh@niboch.nsc.ru

Экзосомы – это природные нановезикулы диаметром 40–100 нм, принимающие активное участие в переносе различных биологически активных веществ, а также в межклеточной коммуникации. Природное происхождение обуславливает биологическую совместимость экзосом с культурами клеток и делает их перспективными средствами доставки противоопухолевых препаратов. В настоящее время методы искусственного получения данных нановезикул не разработаны. Препараты экзосом, полученные из опухолевых клеток, непригодны для терапии. Молоко – биологическая жидкость, которая доступна в промышленных масштабах. Оно может быть универсальным источником экзосом, используемых в лечении онкологических заболеваний. Адресная доставка противоопухолевых препаратов при помощи экзосом молока позволяет снизить токсический эффект цитостатических средств, используемых в химиотерапии. В данном обзоре рассмотрены методы выделения экзосом из молока, их дополнительная очистка, анализ биологически значимых компонентов этих везикул – белков и нуклеиновых кислот, а также перспективы применения экзосом молока в терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: молоко, экзосомы, экзосомы молока, доставка лекарств, рак, выделение, везикулы, онкология, онкологические заболевания

Для цитирования: Седых С.Е., Тимофеева А.М., Кулешова А.Е., Невинский Г.А. Экзосомы молока в качестве агентов доставки терапевтически значимых препаратов при онкологических заболеваниях. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):23–31. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-23-31.

Milk exosomes as delivery agents for therapy of cancer diseases

S.E. Sedykh^{1,2}, A.M. Timofeeva¹, A.E. Kuleshova¹, G.A. Nevinskiy^{1,2}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Prospekt Akademika Lavrentieva; Novosibirsk 630090, Russia;

²Novosibirsk National Research State University; 2 Pirogova St., Novosibirsk 630090, Russia

Contacts: Sergey Evgenievich Sedykh sedyh@niboch.nsc.ru

Exosomes are natural nanovesicles with a diameter of 40–100 nm, which are actively involved in the transfer of biologically active substances and participate in intercellular communication. The natural origin of exosomes determines its biological compatibility with cell cultures and makes them promising delivery vehicles for anticancer drugs. Methods of the artificial production of exosomes are not available, and exosome preparations obtained from tumor cells are not suitable for therapy. Milk is a biological fluid that is commercially available and may be a universal source of exosomes for treatment. Target delivery of anticancer drugs using milk exosomes can reduce the toxic effect of cytostatic agents during chemotherapy. This review discusses methods for isolating exosomes from milk, their additional purification, and analysis of their biologically significant components – proteins and nucleic acids, and prospects for using milk exosomes to treat cancer.

Key words: milk, exosomes, milk exosomes, drug delivery, cancer, isolation, vesicles, oncology, oncological diseases

For citation: Sedykh S.E., Timofeeva A.M., Kuleshova A.E., Nevinskiy G.A. Milk exosomes as delivery agents for therapy of cancer diseases. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):23–31. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-23-31.

ВВЕДЕНИЕ

Экзосомы — это природные внеклеточные нановезикулы, которые участвуют в межклеточной коммуникации и переносят ряд биологически активных веществ, таких как белки, микроРНК, матричную РНК (мРНК), ДНК и другие молекулы [1]. Соединения могут транспортироваться как внутри экзосом, так и на их поверхности [2]. Из-за своего небольшого размера (диаметр 40–100 нм) эти нановезикулы можно использовать в персонализированной терапии для доставки лекарственных средств [3]. Поскольку методы искусственного синтеза экзосом на сегодняшний день еще не разработаны, актуальной задачей является их эффективное и безопасное получение в больших количествах из природных источников. Показано, что экзосомы содержатся в различных биологических жидкостях: плазме крови, моче, слюне, молоке, околоплодных водах, асцитах, спинномозговой жидкости и др. [1]. Молоко — единственная биологическая жидкость, доступная в промышленных масштабах.

Экзосомы молока человека впервые были описаны в 2007 г. На сегодняшний день они выделены из молока человека [4], крупного рогатого скота [5], свиньи [6], валлаби [7], верблюда [8], крысы [9], лошади [10], панды [11], овцы [12] и козы [13]. Базы данных содержат около 200 статей, посвященных экзосомам и другим везикулам молока.

Наиболее изучены белки и нуклеиновые кислоты экзосом молока коровы. К сожалению, использование препаратов, полученных из него, ограничено из-за прионных заболеваний и наличия аллергии на коровий белок у большей части населения. В связи с этим большую актуальность приобретает применение экзосом молока лошади, козы и других сельскохозяйственных животных [14].

Особенности экзосом молока необходимо учитывать при разработке новых терапевтических подходов к лечению различных заболеваний, в том числе онкологических. Однако в настоящее время в научной литературе содержится мало данных об использовании везикул молока, особенно экзосом, для доставки биологически активных молекул к клеткам [15]. В противоопухолевой терапии они применяются для передачи препаратов [16] и терапевтических нуклеиновых кислот [17], в том числе малых интерферирующих РНК (миРНК).

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭКЗОСОМ МОЛОКА

Для получения экзосом из молока используют различные физические, физико-химические и иммунологические методы. Общие вопросы, касающиеся выделения и характеристики экзосом, описаны в рекомендациях Международного общества по изучению внеклеточных везикул (International Society For Extracellular Vesicles, ISEV) [18]. Чаще всего используют серию центрифугирований [5] с последующим ультрацентрифугированием [19]. Принципиально важным

является одно- или двукратное центрифугирование молока на низких оборотах перед выделением экзосом [19], поскольку хранение его необезжиренных образцов может привести к загрязнению препаратов экзосом мембранами жировых глобул молока (MFGM).

Экзосомы также можно выделить с помощью гелефильтрации, которая проводится после ультрацентрифугирования или вместо него [10, 20]. Это позволяет избавиться от совыделяющихся белков в препаратах.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЭКЗОСОМ МОЛОКА

Биохимические компоненты экзосом молока — белки, липиды и нуклеиновые кислоты — могут существенно влиять на доставку терапевтических молекул. В связи с этим необходим детальный анализ содержания данных молекул в экзосомах молока, называемый экзосомикой (по аналогии с геномикой, протеомикой и другими омиксными технологиями) [21].

Согласно данным литературы, полученным, как правило, в ходе анализа экзосом молока после 1 или нескольких ультрацентрифугирований, препараты содержат тысячи разных белков и/или нуклеиновых кислот. Тривиальные вычисления показывают, что в везикулу объемом 40–100 нм не может поместиться более 100 молекул глобулярных белков среднего размера. Согласно результатам наших исследований [10, 14, 22] в препаратах экзосом, полученных с помощью стандартных методов (центрифугирования и ультрацентрифугирования), содержится всего 5–10 % экзосом. Большую же часть этих препаратов составляют соосажающиеся примеси — белки, нуклеиновые кислоты и их надмолекулярные комплексы [10, 23].

Белки экзосом молока. В статьях, посвященных протеомному анализу экзосом молока, описаны десятки, сотни и даже тысячи белков и пептидов, например 115 [24], 571 [23], 2107 [25] и 2698 [26] индивидуальных белков и их изоформ. Белки, наиболее часто представленные в экзосомах молока, приведены в табл. 1. По мнению Е.Д. Свердлова [27], эти показатели сильно преувеличены, что, скорее всего, связано с отнесением к экзосомам совыделяющихся белков и нуклеиновых кислот молока [28, 29].

Ранее нами был предложен оригинальный метод выделения экзосом, позволяющий получать препараты, практически не содержащие совыделяющихся белков [10, 14]. Согласно результатам наших исследований в состав экзосом молока лошади в основном входят актин, бутирофилин, β -лактоглобулин, лактадхерин, лактоферрин и ксантиндегидрогеназа, а также многочисленные пептиды.

Согласно данным литературы бутирофилин, лактадхерин и ксантиндегидрогеназа являются специфическими маркерами экзосом молока [28]. Поскольку α -, β - и κ -казеины, рибосомные белки, а также белки матрикса митохондрий не могут присутствовать в препаратах экзосом в соответствии с несовместимыми

Таблица 1. Белки экзосом молока

Table 1. Proteins of milk exosomes

Белки Proteins	Количество белков, шт. Number of proteins	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Метод детекции Detection method	Источник Reference
Бутирофилин, κ-казеин, лактадхерин, ксантиндегидрогеназа Butyrophilin, κ-casein, lactadherin, xanthine dehydrogenase	94	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[30]
Ангиогенин-1, лактоферрин, лактопероксидаза, сульфгидрилоксидаза Angiogenin-1, lactoferrin, lactoperoxidase, sulfhydryl oxidase	920	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов с iTRAQ iTRAQ-LC MS/MS of trypsin hydrolysates	[31]
Бутирофилин, CD36, компонент системы комплемента 3, синтаза жирных кислот, лактадхерин, лактотрансферрин, белок 2, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности, полимерный рецептор иммуноглобулина, ксантиндегидрогеназа Butyrophilin, CD36, complement system component 3, fatty acid synthase, lactadherin, lactotransferrin, low-density lipoprotein receptor-related protein 2, polymeric immunoglobulin receptor, xanthine dehydrogenase	1372	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[32]
Белок, связывающий жирные кислоты, α-казеин, бутирофилин, лактадхерин, α-лактальбумин, β-лактоглобулин, ксантиндегидрогеназа Fatty acid-binding protein, α-casein, butyrophilin, lactadherin, α-lactalbumin, β-lactoglobulin, xanthine dehydrogenase	1879	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[33]
Адилофилин, бутирофилин, лактадхерин, ксантиноксидаза Adipophilin, butyrophilin, lactadherin, xanthine oxidase	2107	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[25]
Бутирофилин, лактадхерин, синтаза жирных кислот, ксантиндегидрогеназа Butyrophilin, lactadherin, fatty acid synthase, xanthine dehydrogenase	2299	Крупный рогатый скот Cattle	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов с iTRAQ iTRAQ-LC MS/MS of trypsin hydrolysates	[34]
Актин, бутирофилин, лактадхерин, лактоферрин, β-лактоглобулин Actin, butyrophilin, lactadherin, lactoferrin, β-lactoglobulin	8	Лошадь Horse	MALDI-TOF-MS/MS трипсиновых гидролизатов после 2D-электрофореза MALDI-TOF-MS/MS of trypsin hydrolysates after 2D electrophoresis	[10]
CD36, α-енолаза, синтаза жирных кислот, лактадхерин, лактотрансферрин, полимерный рецептор иммуноглобулина, ингибитор диссоциации Rab GDP, синтенин-1, ксантиндегидрогеназа CD36, α-enolase, fatty acid synthase, lactadherin, lactotransferrin, polymeric immunoglobulin receptor, Rab GDP dissociation inhibitor, syntenin-1, xanthine dehydrogenase	73	Человек Human	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[4]
β-казеин, лактоферрин, полимерный рецептор иммуноглобулина, сывороточный альбумин, тенасцин, ксантиндегидрогеназа β-casein, lactoferrin, polymeric immunoglobulin receptor, serum albumin, tenascin, xanthine dehydrogenase	115	Человек Human	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[23]

Окончание табл. 1

The end of table 1

Белки Proteins	Количество белков, шт. Number of proteins	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Метод детекции Detection method	Источник Reference
Аннексины, CD9, CD63, CD81, флотилин, субъединицы G-белка, лактадхерин, Rab, Ras-родственные белки, синтенин Annexins, CD9, CD63, CD81, flotillin, G protein subunits, lactadherin, Rab, Ras-related proteins, syntenin	2698	Человек Human	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[23]
Альбумин, церулоплазмин, комплемент C, α-глюкозидаза, фибронектин, лактотрансферрин, тромбоспондин Albumin, ceruloplasmin, complement C, α-glucosidase, fibronectin, lactotransferrin, thrombospondin	571	Свинья Pig	LC-MS/MS трипсиновых гидролизатов LC-MS/MS of trypsin hydrolysates	[23]

Примечание. MS – тандемная масс-спектрометрия; LC-MS/MS – жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией; iTRAQ – изобарические метки для относительного и абсолютного количественного определения; MALDI-TOF-MS – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с тандемной масс-спектрометрией.

Note. MS – tandem mass spectrometry; LC-MS/MS – liquid chromatography-tandem mass spectrometry; iTRAQ – isobaric tags for relative and absolute quantitation; MALDI-TOF-MS – matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

механизмами секреции [21, 35], их следует рассматривать как показатели отсутствия экзосом.

Нуклеиновые кислоты экзосом молока. В ходе исследований, проведенных в последние 10 лет, было определено содержание мРНК и микроРНК в молоке крупного рогатого скота [36], человека [37], панды [11], свиньи [6] и крысы [38].

Содержание микроРНК в экзосомах молока определяется с помощью высокопроизводительного секвенирования и технологии микрочипов. Анализ глобальных профилей экспрессии с использованием микрочипов выявил 79 различных микроРНК во фракции экзосом, 91 – в супернатанте после ультрацентрифугирования коровьего молока. Общими для обеих фракций были 39 микроРНК. Дальнейшие исследования показали, что уровень их экспрессии значительно выше в экзосомальной части по сравнению с супернатантом [39]. Были описаны около 491 микроРНК, содержащейся в экзосомах свиного молока, в том числе 176 известных микроРНК и 315 новых зрелых микроРНК. Анализ геной онтологии этих микроРНК показал, что большинство из них нацелены на гены, связанные с транскрипционными, иммунными и метаболическими процессами [40]. МикроРНК, часто встречающиеся в экзосомах молока, представлены в табл. 2.

В научных статьях сообщается о содержании 16 304 различных мРНК в экзосомах молока свиньи [24] и до 19 230 мРНК в экзосомах молока коровы [39]. Трудно представить, как такое количество мРНК может поместиться в везикуле размером 40–100 нм [27]. Поэтому следует критически относиться к информации о содержании микроРНК (и особенно мРНК) в экзосомах молока. Данные о количестве белков и микроРНК в экзосомах молока сильно преувеличе-

ны в связи с отнесением к ним совыделяющихся нуклеиновых кислот молока (как свободных, так и образующихся вследствие разрушения клеток). Следует учитывать потенциальную возможность взаимодействия нуклеиновых кислот в экзосомах молока (особенно противовоспалительный эффект и ослабление иммунного ответа) при планировании экспериментов по доставке терапевтических нуклеиновых кислот в клетки [41].

Липиды экзосом молока. Экзосомы представляют собой нановезикулы, окруженные липидным бислоем, который содержит белки, направленные во внеклеточное пространство. В связи с этим доставка фармакологически значимых соединений возможна как внутри, так и снаружи экзосом, причем гидрофильных (связанных с поверхностными белками) и гидрофобных (входящих в состав липидного бислоя) молекул. Подробный обзор липидов экзосом приведен в работе T. Skotland и соавт. [42].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКЗОСОМ МОЛОКА ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕРАПИИ РАКА

В ряде работ опубликованы результаты попыток использования экзосом, выделенных из различных клеточных линий, для адресной доставки лекарственных препаратов [43]. Однако существуют препятствия для использования этих нановезикул в качестве терапевтических продуктов: их выделение из клеточных линий требует больших затрат, а получение из образцов пациентов несовместимо с коммерческим фармацевтическим производством, поскольку необходимо много биоматериала, что также увеличивает себестоимость экзосом. К тому же белковые компоненты

Таблица 2. МикроРНК экзосом молока

Table 2. MicroRNA of milk exosomes

МикроРНК MicroRNA	Количество микроРНК, шт. Number of microRNAs	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Метод детекции Detection method	Источник Reference
2478, 1777b, 1777a, let-7b, 1224, 2412, 2305, let-7a, 200c, 141	79	Крупный рогатый скот Cattle	Анализ на микрочипах Microchip analysis	[39]
148a, let-7c, let-7a-5p, 26a, let-7f, 30a-5p, 30d	372	Буйвол Buffalo	Секвенирование РНК RNA sequencing	[44]
30d-5p, let-7b-5p, let-7a-5p, 125a-5p, 21-5p, 423-5p, let-7 g-5p, let-7f-5p, 30a-5p, 146b-5p	219	Человек Human	Секвенирование РНК RNA sequencing	[45]
22-3p, 148a-3p, 141-3p, 181a-5p, 320a, 378a-3p, 30d-5p, 30a-5p, 26a-5p, 191-5p	308	Человек* Human*	Секвенирование РНК RNA sequencing	[46]
let-7a-5p, 148a-3p, 146b-5p, let-7f-5p, let-7 g-5p, 21-5p, 26a-5p, 30d-5p	631	Человек Human	Секвенирование РНК RNA sequencing	[47]
148a-3p, 30b-5p, let-7f-5p, 146b-5p, 29a-3p, let-7a-5p, 141-3p, 182-5p, 200a-3p, 378-3p	602	Человек Human	Секвенирование РНК RNA sequencing	[48]
let-7b-5p, 92a-3p, 148a-3p, 30a-5p, let-7a-5p, 181a-5p, let-7i-5p, let-7f-1/2-5p, let-7 g-5, 200a-3p	1191	Панда Panda	Секвенирование РНК RNA sequencing	[11]
148a-3p, 182-5p, 200c-3p, 25-3p, 30a-5p, 30d-5p, 574-3p	234	Свинья Pig	Секвенирование РНК RNA sequencing	[6]
148a, let-7b, let-7a, 21, let-7c, let-7i, 26a, let-7f, 125b, 143	84	Овца Sheep	Секвенирование РНК RNA sequencing	[49]

*Преждевременные роды.

*Preterm birth.

экзосом при системном введении могут вызвать иммунный ответ [50].

Экзосомы могут быть получены в большом количестве из коровьего молока [16]. Их введение не вызывает системной токсичности и анафилактического эффекта у мышей [51]. При этом введение ненагруженных экзосом верблюжьего молока способствует значительному снижению прогрессирования опухоли молочной железы [52]. Таким образом, экзосомы молока могут быть потенциальным средством адресной доставки лекарственных средств.

Исследование использования экзосом молока для доставки химиотерапевтического агента паклитаксела продемонстрировало небольшое увеличение размера нагруженных экзосом. Авторы объяснили это частичным включением данного препарата в липидный бислой мембраны. В то же время экзосомы, содержащие лекарство, стабильны в кишечнике, что подчеркивает их пригодность для пероральной доставки лекарств [15].

Применение экзосом молока для доставки куркумина как потенциального противоопухолевого агента позволило значительно повысить его стабильность, растворимость и биодоступность в неблагоприятных условиях пищеварительного тракта на модели клеток

колоректальной аденокарциномы человека. Было выявлено, что куркумин, нагруженный в экзосомы, выделенные из эпителиальных клеток кишечника, более эффективно абсорбируется клетками колоректальной аденокарциномы, чем куркумин в составе молочных экзосом [53].

Одной из проблем применения молочных экзосом для адресной доставки лекарственных средств является их недостаточная специфичность к клеткам-реципиентам. Показано, что экзосомы молока абсорбируются из кишечника в виде интактных частиц, которые могут быть модифицированы лигандами для удерживания в тканях-мишенях [54]. Векторы на основе экзосом молока могут быть оснащены специальными лигандами для связывания опухолеспецифических рецепторов [55]. Рецептор CD44 часто сверхэкспрессируется на поверхности различных типов раковых клеток. Специфическим лигандом данного рецептора является гиалуронан. Оснащение липидной мембраны экзосом молока молекулами гиалуронана позволяет осуществить целенаправленную доставку цитостатического агента доксорубина в клетки с повышенной экспрессией CD44 [55]. Добавление фолиевой кислоты в качестве лиганда опухолевых рецепторов к экзосомам молока, нагруженным этим химиотерапевтическим

агентом, способствует значительному ингибированию роста опухолевых клеток на модели мышинных ксено-

трансплантатов [16]. Биомолекулы, доставляемые экзосомами молока, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Биологически и терапевтически значимые молекулы, доставляемые с экзосомами молока

Table 3. Biologically and therapeutically significant molecules delivered with milk exosomes

Молекула Molecule	Растворимость в воде Water solubility	Источник экзосом молока Source of milk exosomes	Клеточные линии, используемые для доставки Cell lines used for delivery	Источ- ник Reference
Антоцианы Anthocyanins	Растворимы Soluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MDA-MB-231 (рака груди), MCF7 (рака груди), PANC1 (рака поджелудочной железы), Mia PaCa2 (рака поджелудочной железы), PC3 (рака простаты), DU145 (рака простаты), HCT116 (рака толстой кишки), OVCA432 (рака яичников), OVCA433 (рака яичников), A2780 (рака яичников), A2780/CP70 (рака яичников) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), MCF7 (breast cancer), PANC1 (pancreatic cancer), Mia PaCa2 (pancreatic cancer), PC3 (prostate cancer), DU145 (prostate cancer), HCT116 (colon cancer), OVCA432 (ovarian cancer), OVCA433 (ovarian cancer), A2780 (ovarian cancer), A2780/CP70 (ovarian cancer)	[56]
Целастрол Celastrol	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer)	[57]
Куркумин Curcumin	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	Caco-2 (рака толстой кишки), H1299 (рака легких), A549 (рака груди), HeLa (рака шейки матки), MDA-MB-231 (рака груди), T47D (рака груди) Caco-2 (colon cancer), H1299 (lung cancer), A549 (breast cancer), HeLa (cervical cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer)	[53]
Доцетаксел Docetaxel	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MB-231 (рака груди), T47D (рака груди), Beas-2B (из эпителия бронхов) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer), Beas-2B (bronchial epithelium)	[16]
Доксорубицин Doxorubicin	Растворим Soluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), MDA-MB-231 (рака груди), MCF-7 (рака груди), HEK293 (из эмбриональных клеток почки) A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), MCF-7 (breast cancer), HEK293 (embryonic kidney cells)	[55]
Паклитаксел Paclitaxel	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MB-231 (рака груди), T47D (рака груди), Beas-2B (из эпителия бронхов) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer), Beas-2B (bronchial epithelium)	[15, 16]
Малые интерфериру- ющие РНК Small interfering RNAs	Растворимы Soluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MDA-MB-231 (рака груди), MCF7 (рака груди), PANC1 (рака поджелудочной железы), Mia PaCa2 (рака поджелудочной железы), Caco-2 (рака толстой кишки), A2780 (рака яичников) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), MCF7 (breast cancer), PANC1 (pancreatic cancer), Mia PaCa2 (pancreatic cancer), Caco-2 (colon cancer), A2780 (ovarian cancer)	[17]
Витаферин А Withaferin A	Нерастворим Insoluble	Крупный рогатый скот Cattle	A549 (рака легких), H1299 (рака легких), MB-231 (рака груди), T47D (рака груди), Beas-2B (из эпителия бронхов) A549 (lung cancer), H1299 (lung cancer), MB-231 (breast cancer), T47D (breast cancer), Beas-2B (bronchial epithelium)	[16]

Таким образом, согласно результатам исследований применение экзосом молока для доставки противоопухолевых препаратов способствует значительному повышению их эффективности и снижению токсичности терапии [16].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ЭКЗОСОМ МОЛОКА И ИХ ДОСТАВКА В РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

Способность экзосом переносить мРНК и микроРНК между клетками и впоследствии опосредовать изменения экспрессии генов-мишеней в клетках-реципиентах может использоваться в терапии злокачественных опухолей. Также следует подчеркнуть потенциал экзосом молока для доставки экзогенных миРНК.

Малые интерферирующие РНК являются потенциальным поколением новых терапевтических средств. С ростом знаний о молекулярных механизмах эндогенной РНК-интерференции увеличиваются возможности использования миРНК в качестве лекарственных средств на основе нуклеиновых кислот для терапии многих заболеваний, в том числе различных видов рака.

Несмотря на большой терапевтический потенциал, использование миРНК затрудняется из-за отсутствия

эффективных способов их доставки в клетку. В качестве альтернативных вариантов переноса миРНК в клетки рассматривают полимерные наночастицы, липиды и липосомы, пептиды и синтетические наночастицы. Наиболее развита сегодня система доставки с помощью липосом [58]. Однако данные методы не решают проблему неспецифического таргетирования и иммунного ответа. Преимуществом экзосом молока является их способность к адресной доставке содержимого в клетки кишечника и стабильность в желудочно-кишечном тракте [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка биосовместимых методов доставки лекарственных препаратов *in vitro* и *in vivo* имеет большое значение для молекулярной фармакологии. Практическое использование экзосом молока имеет большие перспективы. Основными проблемами, ограничивающими их применение в терапии различных заболеваний, в том числе различных видов рака, являются недостаточный уровень исследования белков и нуклеиновых кислот, входящих в состав экзосом и совыделяющихся с ними, тропность экзосом молока к различным клеткам и тканям.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Colombo M., Raposo G., Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:255–89. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Sawada S.I., Sato Y.T., Kawasaki R. et al. Nanogel hybrid assembly for exosome intracellular delivery: Effects on endocytosis and fusion by exosome surface polymer engineering. *Biomater Sci* 2020;8:619–30. DOI: 10.1039/c9bm01232j.
- Bunggulawa E.J., Wang W., Yin T. et al. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *J Nanobiotechnology* 2018;16:81. DOI: 10.1186/s12951-018-0403-9.
- Admyre C., Johansson S.M., Qazi K.R. et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol* 2007;179(3):1969–78. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1969.
- Yamada T., Inoshima Y., Matsuda T., Ishiguro N. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J Vet Med Sci* 2012;74(11):1523–5. DOI: 10.1292/jvms.12-0032.
- Gu Y., Li M., Wang T., et al. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PLoS One* 2012;7. DOI: 10.1371/journal.pone.0043691.
- Modepalli V., Kumar A., Hinds L.A. et al. Differential temporal expression of milk miRNA during the lactation cycle of the marsupial tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *BMC Genomics* 2014;15:1012. DOI: 10.1186/1471-2164-15-1012.
- Yassin A.M., Abdel Hamid M.I., Farid O.A. et al. Dromedary milk exosomes as mammary transcriptome nano-vehicle: their isolation, vesicular and phospholipidomic characterizations. *J Adv Res* 2016;7:749–56. DOI: 10.1016/j.jare.2015.10.003. Available at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-1012>.
- Hock A., Miyake H., Li B. et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *J Pediatr Surg* 2017;52(5):755–9. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2017.01.032.
- Sedykh S.E., Purvinish L.V., Monogarov A.S. et al. Purified horse milk exosomes contain an unpredictable small number of major proteins. *Biochim Open* 2017;4:61–72. DOI: 10.1016/j.biopen.2017.02.004.
- Ma J., Wang C., Long K. et al. Exosomal microRNAs in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) breast milk: Potential maternal regulators for the development of newborn cubs. *Sci Rep* 2017;7:1–11. DOI: 10.1038/s41598-017-03707-8.
- Gao H.N., Guo H.Y., Zhang H. et al. Yak milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells in hypoxic environment. *J Dairy Sci* 2019;102(2):985–96. DOI: 10.3168/jds.2018-14946.
- González M.I., Martín-Duque P., Desco M., Salinas B. Radioactive labeling of milk-derived exosomes with ^{99m}Tc and *in vivo* tracking by SPECT imaging. *Nanomaterials* 2020;10(6):1062. DOI: 10.3390/nano10061062.
- Sedykh S.E., Kuleshova A.E., Purvinish L.V. et al. Horse milk exosomes: isolation, microscopic and biochemical analysis, and prospects of use. *Biotechnologiya* 2020;36(5):62–71. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-5-62-71.
- Agrawal A.K., Aqil F., Jeyabalan J. et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine* 2017;13(5):1627–36. DOI: 10.1016/j.nano.2017.03.001.
- Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J., Gupta R.C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett* 2016;371(1):48–61. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.020.
- Aqil F., Munagala R., Jeyabalan J. et al. Milk exosomes – natural nanoparticles for siRNA delivery. *Cancer Lett* 2019;449:186–95. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.02.011.

18. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E. 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. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
19. Zonneveld M.I., Brisson A.R., van Herwijnen M.J.C. et al. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J Extracell Vesicles* 2014;3:24215. DOI: 10.3402/jev.v3.24215.
20. Blans K., Hansen M.S., Sørensen L.V. et al. Pellet-free isolation of human and bovine milk extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* 2017;6(1):1294340. DOI: 10.1080/20013078.2017.1294340.
21. De la Torre Gomez C., Goreham R.V., Bech Serra J.J. et al. "Exosomics" – a review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk. *Front Genet* 2018;9. DOI: 10.3389/fgene.2018.00092.
22. Sedykh S.E., Purvinish L.V., Burkova E.E. et al. Analysis of peptides and small proteins in preparations of horse milk exosomes, purified on anti-CD81-Sephacrose. *Int Dairy J* 2021;117:104994. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.104994.
23. Chen T., Xi Q.-Y., Sun J.-J. et al. Revelation of mRNAs and proteins in porcine milk exosomes by transcriptomic and proteomic analysis. *BMC Vet Res* 2017;13(1). DOI: 10.1186/s12917-017-1021-8.
24. Liao Y., Alvarado R., Phinney B., Lönnérdal B. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *J Proteome Res* 2011;10(4):1746–54. DOI: 10.1021/pr101028k.
25. Reinhardt T.A., Lippolis J.D., Nonnecke B.J., Sacco R.E. Bovine milk exosome proteome. *J Proteomics* 2012;75(5):1486–92. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.11.017.
26. Van Herwijnen M.J.C., Zonneveld M.I., Goerdal S. et al. Comprehensive proteomic analysis of human milk-derived extracellular vesicles unveils a novel functional proteome distinct from other milk components. *Mol Cell Proteomics* 2016;15(11):3412–23. DOI: 10.1074/mcp.M116.060426.
27. Sverdlov E.D. Amedeo Avogadro's cry: what is 1 µg of exosomes? *Bioessays* 2012;34(10):873–5. DOI: 10.1002/bies.201200045.
28. Sedykh S.E., Burkova E.E., Purvinish L.V. et al. Milk exosomes: isolation, biochemistry, morphology, and perspectives of use. In: *Extracellular vesicles and their importance in human health*. Rijeka, Croatia: IntechOpen; 2020.
29. Burkova E.E., Dmitrenok P.S., Bulgakov D.V. et al. Exosomes from human placenta purified by affinity chromatography on sepharose bearing immobilized antibodies against CD81 tetraspanin contain many peptides and small proteins. *IUBMB Life* 2018;70(11):1144–55. DOI: 10.1002/iub.1928.
30. Koh Y.Q., Peiris H.N., Vaswani K. et al. Characterization of exosomes from body fluids of dairy cows. *J Anim Sci* 2017;95(9):3893–904. DOI: 10.2527/jas2017.1727.
31. Yang M., Song D., Cao X. et al. Comparative proteomic analysis of milk-derived exosomes in human and bovine colostrum and mature milk samples by iTRAQ-coupled LC-MS/MS. *Food Res Int* 2017;92:17–25. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.11.041.
32. Samuel M., Chisanga D., Liem M. et al. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci Rep* 2017;7(1):5933. DOI: 10.1038/s41598-017-06288-8.
33. Benmoussa A., Gotti C., Bourassa S. et al. Identification of protein markers for extracellular vesicle (EV) subsets in cow's milk. *J Proteomics* 2019;192. DOI: 10.1016/j.jprot.2018.08.010.
34. Reinhardt T.A., Sacco R.E., Nonnecke B.J., Lippolis J.D. Bovine milk proteome: quantitative changes in normal milk exosomes, milk fat globule membranes and whey proteomes resulting from *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Proteomics* 2013;82:141–54. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.02.013.
35. Burgoyne R.D., Duncan J.S. Secretion of milk proteins. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3(3):275–86. DOI: 10.1023/a:1018763427108.
36. Hata T., Murakami K., Nakatani H. et al. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(2):528–33. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.04.135.
37. Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 2010;1(1):7. DOI: 10.1186/1758-907X-1-7.
38. Izumi H., Kosaka N., Shimizu T. et al. Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *PLoS One* 2014;9(2):e88843. DOI: 10.1371/journal.pone.0088843.
39. Izumi H., Tsuda M., Sato Y. et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J Dairy Sci* 2015;98(5):2920–33. DOI: 10.3168/jds.2014-9076.
40. Zhang L., Chen T., Yin Y. et al. Dietary microRNA – a novel functional component of food. *Adv Nutr* 2019;10(4):711–21. DOI: 10.1093/advances/nmy127.
41. Benmoussa A., Provost P. Milk microRNAs in health and disease. *Compr rev food sci food saf* 2019;18(3):703–22. DOI: 10.1111/1541-4337.12424.
42. Skotland T., Hessvik N.P., Sandvig K., Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res* 2019;60(1):9–18. DOI: 10.1194/jlr.R084343.
43. Smyth T., Kullberg M., Malik N. et al. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J Control Release* 2015;199:145–55. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.013.
44. Chen Z., Xie Y., Luo J. et al. Milk exosome-derived miRNAs from water buffalo are implicated in immune response and metabolism process. *BMC Vet Res* 2020;16(1):123. DOI:10.1186/s12917-020-02339-x.
45. Leiferman A., Shu J., Upadhyaya B. et al. Storage of extracellular vesicles in human milk, and microRNA profiles in human milk exosomes and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019;69(2):235–8. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002363.
46. Chen T., Xi Q.-Y., Ye R.-S. et al. Exploration of microRNAs in porcine milk exosomes. *BMC Genomics* 2014;15(1):100. DOI: 10.1186/1471-2164-15-100.
47. Kim K.-U., Kim W.-H., Jeong C.H. et al. More than Nutrition: therapeutic potential of breast milk-derived exosomes in cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21(19):7327. DOI: 10.3390/ijms21197327.
48. Mirza A.H., Kaur S., Nielsen L.B. et al. Breast milk-derived extracellular vesicles enriched in exosomes from mothers with type 1 diabetes contain aberrant levels of microRNAs. *Front Immunol* 2019;10:2543. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02543.
49. Quan S., Nan X., Wang K. et al. Characterization of sheep milk extracellular vesicle-miRNA by sequencing and comparison with cow milk. *Animals* 2020;10(2):331. DOI: 10.3390/ani10020331.
50. Hagiwara K., Ochiya T., Kosaka N. A paradigm shift for extracellular vesicles as small RNA carriers: from cellular waste elimination to therapeutic applications. *Drug Deliv Transl Res* 2014;4(1):31–7. DOI: 10.1007/s13346-013-0180-9.
51. Somiya M., Yoshioka Y., Ochiya T. Biocompatibility of highly purified bovine milk-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2018;7(1):1440132. DOI: 10.1080/20013078.2018.1440132.
52. Badawy A.A., El-Magd M.A., AlSadrah S.A. Therapeutic effect of camel milk and its

- exosomes on MCF7 cells *in vitro* and *in vivo*. *Integr Cancer Ther* 2018;17(4):1235–46. DOI: 10.1177/1534735418786000.
53. Carobolante G., Mantaj J., Ferrari E., Vllasaliu D. Cow milk and intestinal epithelial cell-derived extracellular vesicles as systems for enhancing oral drug delivery. *Pharmaceutics* 2020;12(3):226. DOI: 10.3390/pharmaceutics12030226.
54. Betker J.L., Angle B.M., Graner M.W., Anchordoquy T.J. The potential of exosomes from cow milk for oral delivery. *J Pharm Sci* 2019;108(4):1496–1505. DOI: 10.1016/j.xphs.2018.11.022.
55. Li D., Yao S., Zhou Z. et al. Hyaluronan decoration of milk exosomes directs tumor-specific delivery of doxorubicin. *Carbohydr Res* 2020;493:108032. DOI: 10.1016/j.carres.2020.108032.
56. Munagala R., Aqil F., Jeyabalan J. et al. Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types. *Cancer Lett* 2017;393:94–102. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.02.004.
57. Aqil F., Kausar H., Agrawal A.K. et al. Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer. *Exp Mol Pathol* 2016;101(1):12–21. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.05.013.
58. Tatiparti K., Sau S., Kashaw S., Iyer A. siRNA Delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials* 2017;7(4):77. DOI: 10.3390/nano7040077.
59. Shandilya S., Rani P., Onteru S.K., Singh D. Small interfering RNA in milk exosomes is resistant to digestion and crosses the intestinal barrier *in vitro*. *J Agric Food Chem* 2017;65(43):9506–13. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03123.

Вклад авторов

С.Е. Седых: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
А.М. Тимофеева, А.Е. Кулешова, Г.А. Невинский: обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи.

Authors's contribution

S.E. Sedykh: obtaining data for analysis, review of publications on the topic of the article, article writing;
A.M. Timofeeva, A.E. Kuleshova, G.A. Nevinsky: review of publications on the topic of the article, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Е. Седых / S.E. Sedykh: <http://orcid.org/0000-0003-0882-8171>
А.М. Тимофеева / A.M. Timofeeva: <http://orcid.org/0000-0002-1270-7164>
Г.А. Невинский / G.A. Nevinsky: <http://orcid.org/0000-0002-4988-8923>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10055).

Financing. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 18-74-10055).