

Научная статья

УДК 577.29

DOI: 10.37102/0869-7698_2022_225_05_3

Экзосомальные наночастицы растений: свойства и применение в биомедицине

Ж.Л. Цыденешиева, А.И. Дегтяренко, Ю.А. Югай,
Т.В. Русапетова, Ю.Н. Шкрыль 

Жаргалма Лудуповна Цыденешиева

студент

Дальневосточный федеральный университет, Институт наук о жизни и биомедицины,
Владивосток, Россия

старший лаборант

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток,
Россия

zargalma2509@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0003-3154-5209>

Антон Игоревич Дегтяренко

аспирант, младший научный сотрудник

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток,
Россия

77sat7@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0003-1819-9639>

Юлия Анатольевна Югай

кандидат биологических наук, младший научный сотрудник

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток,
Россия

yuua1992@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0002-0385-6504>

Татьяна Викторовна Русапетова

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток,
Россия

avramenko.dvo@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0002-3527-164X>

Юрий Николаевич Шкрыль

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

ФНЦ Биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток,
Россия

yn80@mail.ru

<http://orcid.org/0000-0002-3657-6058>

Аннотация. Экзосомальные наночастицы представляют собой мембранные везикулы, выделяемые разнообразными типами клеток и являющиеся консервативным механизмом межклеточной и межвидовой коммуникации в про- и эукариотических организмах. Осуществляя транспорт специфических белков, нуклеиновых кислот и низкомолекулярных метаболитов, экзосомы участвуют в регуляции процессов развития, активации иммунной системы, развитии защитного ответа на стрессовые воздействия. В последнее время большое внимание исследователей привлекают нановезикулы растений, которые являются экономичным и доступным источником таких веществ. Являясь природной транспортной системой, экзосомы растений представляют перспективную для биомедицины платформу доставки молекул как эндогенного, так и экзогенного происхождения. В обзоре представлены современные работы, посвященные изучению биогенеза растительных экзосом, их состава, а также понимания механизмов их загрузки различными терапевтическими соединениями, что является одним из определяющих факторов их возможного практического использования. Мы считаем, что дальнейшие исследования в этой области позволят существенно расширить потенциал таргетной терапии за счет применения растительных нановезикул в клинической практике.

Ключевые слова: экзосомы, адресная доставка лекарственных средств, мультивезикулярные тельца, мембранный транспорт

Для цитирования: Цыденешиева Ж.Л., Дегтяренко А.И., Югай Ю.А., Русапетова Т.В., Шкрыйль Ю.Н. Экзосомальные наночастицы растений: свойства и применение в биомедицине // Вестн. ДВО РАН. 2022. № 5. С. 25–44. http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_3.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00091).

Original article

Exosomal plant nanoparticles: properties and applications in biomedicine

Zh.L. Tsydeneshieva, A.I. Degtyarenko, Yu.A. Yugay,
T.V. Rusapetova, Yu.N. Shkryl

Zhargalma L. Tsydeneshieva

Student

Institute of Life Sciences and Biomedicine FEFU, Vladivostok, Russia

Senior Assistant

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok, Russia

zargalma2509@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0003-3154-5209>

Anton I. Degtyarenko

Postgraduate, Junior Researcher

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok, Russia

77sat7@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0003-1819-9639>

Yulia A. Yugay
Candidate of Sciences in Biology, Junior Researcher
Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok,
Russia
yuya1992@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-0385-6504>

Tatiana V. Rusapetova
Candidate of Sciences in Biology, Senior Researcher
Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok,
Russia
avramenko.dvo@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0002-3527-164X>

Yury N. Shkryl
Candidate of Sciences in Biology, Leading Researcher
Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok,
Russia
yn80@mail.ru
<http://orcid.org/0000-0002-3657-6058>

Abstract. Exosomal nanoparticles are biogenic membrane vesicles secreted by various cell types and represent a conservative mechanism of intercellular and interspecies communication in pro- and eukaryotic organisms. By transporting specific proteins, nucleic acids, and low molecular weight metabolites, exosomes are involved in the regulation of developmental processes, activation of the immune system, and the development of a protective response to stress. Recently, much attention of researchers has been attracted by plant nanovesicles, which are an economical and affordable source of their production. Being a natural transport system, plant exosomes represent a promising platform in biomedicine for the delivery of molecules of both endogenous and exogenous origin. This review presents recent publications devoted to the study of the biogenesis of plant exosomes, their composition, as well as mechanisms of loading with various therapeutic compounds, which is one of the determining factors for their possible practical use. We believe that further research in this area will significantly expand the potential of targeted therapy by using of plant nanovesicles in clinical practice.

Keywords: exosomes, targeted drug delivery, multivesicular bodies, membrane transport

For citation: Tsydeneshieva Zh.L., Degtyarenko A.I., Yugay Yu.A., Rusapetova T.V., Shkryl Yu.N. Exosomal plant nanoparticles: properties and applications in biomedicine. *Vestnik of the FEB RAS*. 2022;(5):25-44. (In Russ.). http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_3.

Funding. Financial support was provided by the Russian Science Foundation, Grant no. 22-24-00091.

В последние два десятилетия наблюдался экспоненциальный рост количества исследований, посвященных биологической характеристике нановезикул – важнейших переносчиков биологической информации, однако значительный интерес к нановезикулам растительного происхождения появился только в последние годы. Эндогенный характер образования растительных нановезикул является их натуральным и уникальным преимуществом для осуществления межклеточной коммуникации и реализации широкого спектра биологической активности. Нановезикулы могут селективно поглощаться как близлежащими, так и отдаленными клетками, перепрограммируя их своим биологически активным содержимым, в первую очередь за счет белков и рибонуклеиновых кислот.

В обзоре представлены современные работы, посвященные изучению биогенеза растительных экзосом, их состава, а также понимания механизмов их загрузки различными терапевтическими соединениями, что является одним из определяющих факторов их возможного практического использования.

Общая характеристика нановезикул

Мембранные нановезикулы (экзосомы) представляют собой биогенные образования с характерным размером от 30 до 200 нм, которые высвобождаются из клетки путем слияния мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной [1]. Известны и другие разновидности внеклеточных мембранных структур, происхождение которых отличается от экзосом. Например, частицы с размерами от 200 до 1000 нм, образующиеся путем почкования плазматической мембраны, относят уже к микровезикулам, а структуры от 1000 нм и более – к апоптотическим тельцам (продуктам распада клеток в результате программируемой клеточной гибели) [2]. Существование нановезикул у растений долгое время подвергалось сомнению, однако в последнее десятилетие были проведены исследования, доказывающие их наличие во всех органах растения [3]. Морфологически растительные нановезикулы имеют округлую форму, образованную фосфолипидным бислоем со средней толщиной 5,3 нм [4]. Липидная мембрана экзосом защищает их содержимое как от ферментативной деградации внутренней среды растения, так и негативного воздействия окружающей среды [5]. Источником для выделения нановезикул могут служить любые части растений, но чаще всего для этих целей используют листья, плоды или апопластотическую жидкость. При этом нужно отметить, что различные органы растения продуцируют неодинаковое количество нановезикул, к тому же различающихся по своему составу и свойствам, что может быть связано с их специализацией в межклеточной коммуникации [6].

Механизм образования нановезикул

Механизм образования нановезикул у растений лишь частично изучен и, по имеющимся на сегодняшний день данным, схож с биогенезом экзосом млекопитающих (рис. 1). Формирование экзосом неразрывно связано с мембранным транспортом клетки и инициируется формированием ранней эндосомы посредством инвагинации плазматической мембраны с участием регуляторных компонентов транссети аппарата Гольджи [7]. Ранняя эндосома претерпевает созревание, сопровождающееся впячиванием эндосомальной мембраны с формированием интралюминальных везикул, которые избирательно накапливают различные внутриклеточные биомолекулы. Этот процесс контролируется специальным эндосомальным сортировочным комплексом, состоящим из четырех белков ESCRT (от англ. endosomal sorting complex required for transport) и АТФазы [7]. При этом определенная часть везикул образуется и по так называемому ESCRT-независимому пути [8]. В результате этих процессов формируется мультивезикулярное тельце (МВТ), представляющее собой позднюю стадию развития эндосом. На следующем этапе биогенеза происходит слияние МВТ с плазматической мембраной или с лизосомами. В случае слияния с плазматической мембраной во внеклеточное пространство высвобождаются экзосомы [9]. Этот процесс регулируется

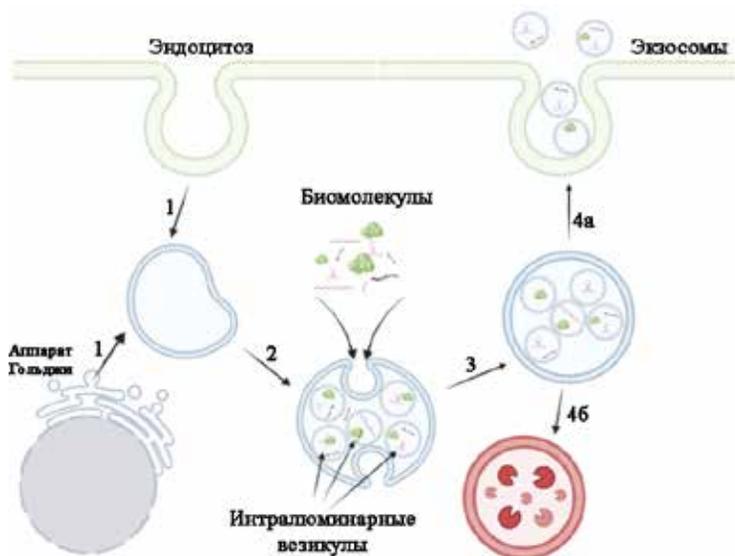


Рис. 1. Механизм образования нановезикул: 1 – формирование ранней эндосомы, 2 – созревание эндосомы, 3 – образование поздней эндосомы, или мультивезикулярного тельца (МВТ), 4а – слияние с плазматической мембраной, сопровождающееся высвобождением экзосом, 4б – слияние с лизосомой и дальнейшая деградация

комплексами белков из семейства Rab-ГТФаз и SNARE (от англ. soluble NSF attachment receptor), которые локализуются на внешней мембране MBT и после слияния остаются на ней для участия в следующем цикле [10]. При слиянии с лизосомой происходит ферментативное разложение MBT [11]. Образование экзосом связано с защитой растения от патогенов, поэтому неудивительно, что наиболее интенсивно нановезикулы образуются вблизи внеклеточных защитных структур, которые блокируют проникновение патогенов в клетку [12].

Биохимическая характеристика нановезикул

Состав нановезикул варьирует в зависимости от объекта, из которого их получают. Однако все из них содержат специфические липиды, белки, матричную РНК (мРНК), микроРНК и другие некодирующие РНК, а также низкомолекулярные соединения (рис. 2).

Нановезикулы содержат две основные группы липидов – фосфолипиды и гликолипиды, которые входят в состав мембраны и необходимы для их правильного формирования, высвобождения и адресной доставки. Во многих нановезикулах содержится фосфатидная кислота, которая модулирует деление и слияние мембран [13]. Растительные нановезикулы в большом количестве содержат трансмембранные белки, такие как тетраспанины ТЕТ (от англ. tetraspanins), участвующие в транспорте и узнавании нановезикул. Кроме того, ТЕТ являются аналогами животных белков-маркеров экзосом С93 [14] и могут служить для специфической загрузки нановезикул слитых с ними химерных белков [13]. Также в нановезикулах присутствуют специфичные для растений белки PEN (от англ. penetration; синоним SYP121, синтаксин). Белки PEN и ГТФазы Rab образуют в

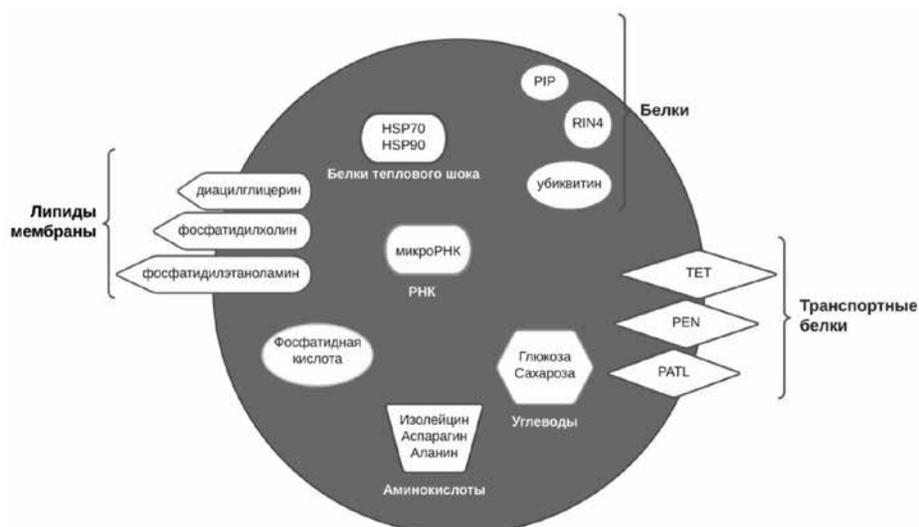


Рис. 2. Молекулярный состав нановезикул

экзосомах комплексы, стимулирующие слияние мембраны и регулирующие их транспорт [15]. Часто в составе везикул обнаруживают белки, связанные с защитной системой растения, такие как хитиназы, пероксидазы, β -глюкозидазы и др. [16]. Интересно, что при этом в нановезикулах был также обнаружен RPM1-взаимодействующий протеин-4 (RPM1-interacting protein RIN4), который является отрицательным регулятором иммунитета у растений и ингибирует развитие ответа клеток на воздействие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP, от англ. pathogen associated molecular patterns) [12]. Кроме вышеперечисленных, в экзосомах обнаруживают и большое количество других белков, трудно поддающихся классификации и, возможно, попавших в них случайно. Например, в нановезикулах из растения резуховидка Таля было идентифицировано более 200 белков, однако большая часть из них была представлена в очень незначительном количестве [13]. Некоторые распространенные примеры идентифицированных экзосомальных белков приведены в табл. 1. Очевидно, что свое влияние на состав могут оказывать вид и орган исследуемого растения, его возраст, физиологическое состояние и другие факторы, приводящие к высокой вариативности

Таблица 1

Примеры белковых компонентов нановезикул растений

Источник	Наименование	Функции	Ссылка
Резуховидка Таля (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Белок семейства транспортеров АВС-типа	Защитные реакции, трансмембранный транспорт, транспорт ионов	[13]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>), кратеростигма (<i>Craterostigma plantagineum</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	Тетраспанин-8	Сигнальные системы, защитный ответ на бактерии	[13, 18, 19, 20]

Источник	Наименование	Функции	Ссылка
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>), кратеростигма (<i>C. plantagineum</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	Аннексины D1 и D5	Транспорт ионов каль- ция и фосфолипидов	[13, 18, 20]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	RPM1- взаимодействующий белок 4	Защитные реакции, регу- ляция реакции гиперчув- ствительности	[13]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>), кратеростигма (<i>C. plantagineum</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	Пателлины 1 и 3	Клеточный цикл и деление	[13, 18, 20]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	Синтаксин-122	Защитные реакции, экзо- цитоз, внутриклеточный транспорт белка, слия- ние везикул	[13]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	H(+)-АТФаза 1 и 10	Ионный трансмембран- ный транспорт, регуля- ция внутриклеточного pH	[13, 20]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	Фосфолипаза Dα1 и Dδ	Сигнальный путь абсци- зовой кислоты, про- граммируемая клеточная гибель	[13, 20]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	GDSL эстераза/ липаза	Катаболизм глюкозино- латов и липидов	[13]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	Белок семейства NRT1 / PTR	Транспорт глюкозино- латов	[13]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>), кратеростигма (<i>C. plantagineum</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	Белок теплового шока 3, 70 кДа	Шаперон-зависимый рефолдинг белка, акти- вация при стрессе	[13, 18, 20]
Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	L-аскорбат пероксидаза 1	Ответ на окислительный стресс, биосинтез лиг- нина и фенилпропаноидов	[13]
Кратеростигма (<i>C. plantagineum</i>)	Бета-галактозидаза 3	Участие в углеводном обмене растений	[18]
Кратеростигма (<i>C. plantagineum</i>)	Пептидил-пролил- изомераза	Шаперон-зависимый рефолдинг белка	[18]
Кратеростигма (<i>C. plantagineum</i>), апельсин (<i>Citrus sinensis</i>), лимон (<i>C. limon</i>), грейпфрут (<i>C. paradise</i>), померанец (<i>C. aurantium</i>)	Субъединицы белкового комплекса коатомера ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, γ)	Мембранный транспорт в транссети аппарата Гольджи	[18, 20]

Примеры микроРНК растительных нановезикул

Источник	Название	Функции	Ссылка
Резуховидка Таля (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>miR396</i>	Снижает плотность устьиц, регулирует развитие листьев и цветков	[23]
	<i>miR156</i>	Повышает накопление антоцианов	[24]
	<i>miR398</i>	Регулирует экспрессию супероксиддисмутаза	[25]
Жимолость (<i>Lonicera xylosteum</i>), резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	<i>miR2911</i>	Подавляет некоторые вирусные инфекции	[26]
Имбирь (<i>Zingiber officinale</i>)	<i>miR1078</i>	Действует на ген лептина, который связан с липополисахарид-индуцированной экспрессией <i>IL-6</i>	[27]
	<i>miR7267</i>	Подавляет экспрессию монооксигеназы <i>Lactobacillus rhamnosus</i> в микробиоме кишечника, тем самым модулируя иммунитет	[28]
Имбирь (<i>Z. officinale</i>), грейпфрут (<i>Citrus paradisi</i>)	<i>miR-2911</i>	Подавляет инфекцию вируса гриппа (H5N1), способен подавлять репликацию вируса <i>SARS-CoV-2</i>	[28]
Капуста (<i>Brassica oleracea</i>)	<i>miR172</i>	Способствует цветению, подавляя функцию генов семейства <i>APETALA2</i>	[29]
Грейпфрут (<i>C. paradisi</i>)	<i>miR17</i>	Подавляет экспрессию комплекса гистосовместимости, тем самым ингибирует рост опухоли	[30]
Черника (<i>Vaccinium</i> spp.), кокос (<i>Cocos nucifera</i>), имбирь (<i>Z. officinale</i>), грейпфрут (<i>C. paradisi</i>), дыня (<i>Cucumis melo</i>), киви (<i>Actinidia chinensis</i>), апельсин (<i>Citrus reticulata</i>), груша (<i>Pyrus</i> spp.), соя (<i>Glycine max</i>), томат (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>miR168</i>	Регулирует функции связанного с ней белкового комплекса <i>AGO2</i>	[24, 31]
	<i>miR319</i>	Действует на фактор транскрипции TCP, контролирующий развитие листа	[24]
Соя (<i>G. max</i>), имбирь (<i>Z. officinale</i>), грейпфрут (<i>C. paradisi</i>), томат (<i>S. lycopersicum</i>), груша (<i>Pyrus</i> spp.)	<i>miR530</i>	Участвует в защитных реакциях, циркадном ритме и вторичном метаболизме	[32]
Арбуз (<i>Citrullus lanatus</i>), грецкий орех (<i>Juglans regia</i>)	<i>miR156</i>	Регулирует сигнальный путь TNF- α млекопитающих в адипоцитах; обнаружена в крови человека после перорального приема	[32, 33]

полученных данных. На белковый состав нановезикул влияет и способ их выделения. Известно, что высокоочищенные фракции экзосом из плаценты человека содержат относительно небольшое количество основных белков, тогда как большая часть других, скорее, является примесями, связанными с особенностями пробоподготовки [17]. Учитывая, что изучение растительных экзосом находится,

по сути, на начальном этапе, количество обнаруживаемых белков в них может быть также сильно преувеличено.

Нановезикулы растений также содержат значительное количество генетического материала, представленного главным образом малыми РНК. Особый интерес представляют микроРНК, которые являются важными эпигенетическими регуляторами клеточных процессов, способными специфически подавлять работу генов за счет разрушения мРНК-мишеней [1, 21]. МикроРНК часто обнаруживают во внеклеточных жидкостях растения (как в свободной форме, так и составе комплексов белок-микроРНК) по причине пассивной диффузии или активной секреции [22]. Тем не менее свободные молекулы микроРНК нестабильны и подвержены деструктивным воздействиям, тогда как упаковка внутри нановезикул позволяет избежать этих последствий и даже транспортировать их во внешнюю среду. В настоящее время известно несколько сотен представителей экзосомальных микроРНК из различных видов растений. Как и с белками, среди них можно выделить как типичные, которые обнаруживаются чаще других, так и менее распространенные микроРНК, состав которых меняется в зависимости от условий. Примеры некоторых микроРНК, обнаруженных в нановезикулах из различных растений, приведены в табл. 2.

Состав вторичных метаболитов в нановезикулах растительного происхождения все еще недостаточно изучен, но предполагается, что их наличие может быть связано с гидрофобностью самих везикул [34]. В зависимости от биохимических особенностей источника в них присутствуют флавоноиды, такие как нарингин и нарингенин, аскорбиновая кислота и другие соединения [35]. Кроме того, в нановезикулах идентифицировано несколько белков, чья функция связана со вторичным метаболизмом растений (табл. 1). Также нановезикулы содержат углеводы (глюкоза, фруктоза, сахароза и др.) и аминокислоты (аланин, аспарагин, изолейцин, треонин, лейцин и др.), концентрация которых также зависит от источника выделения [7].

Функции растительных нановезикул

Нановезикулы растений чаще рассматривают с точки зрения их защитной роли в системе взаимодействий растение–патоген. Для выживания растений важна быстрая реакция на различные патогены. Перестройка межклеточных органелл и структурное изменение цитоскелета, а также повышенный синтез соединений приводят к формированию физического и биохимического барьера, противостоящего заражению [36]. Подобные изменения могут осуществляться посредством быстрой и целенаправленной доставки необходимых молекул везикулами. Грибковая инфекция усиливает накопление везикул между плазматической мембраной и клеточной стенкой в клетках растений, что указывает на их важную роль в иммунном ответе [12, 37]. Например, везикулярные структуры, содержащие фенольные соединения и пероксид водорода, препятствовали заражению листьев ячменя мучнистой росой *Blumeria graminis*. При заражении арабидопсиса мучнистой росой *Golovinomyces orontii* белки PEN1 и PEN3 транспортируются экзосомами и включаются в состав клеточной стенки, выступая в качестве защитного барьера [38]. Перенос микроРНК от растения-хозяина к патогену, вызывающий сайленсинг генов вирулентности, описан и в других патосистемах, в частности: хлопчатник – *Verticillium dahliae*, пшеница – *Fusarium graminearum* [30,

31]. При этом патогены также могут транспортировать в заражаемый организм собственные микроРНК, способствуя подавлению иммунного ответа и защитных систем растения [15]. Возбудитель желтой ржавчины зерновых *Puccinia striiformis* продуцирует микроРНК-подобную РНК, ослабляющую экспрессию защитных генов [39]. Перенос специфических микроРНК *Hyaloperonospora arabidopsidis* и *Botrytis cinerea* в клетки арабидопсиса нарушает экспрессию белка AGO1 и, таким образом, нагрузку растительных нановезикул защитными микроРНК [40].

Способы загрузки нановезикул

Долгое время оставался нерешенным вопрос о наличии в клетках растений молекулярного механизма, регулирующего специфический состав экзосом. Было установлено, что профиль микроРНК нановезикул разительно отличается от профиля всех микроРНК клетки [19], что указывает на селективный характер их транспорта. Оказалось, что в белковой фракции ассоциированных с нановезикулами белками ТЕТ содержится несколько РНК-связывающих белков: AGO1 (от англ. argonaute), хеликазы и аннексины. Причем AGO1 – единственный представитель данного семейства белков, который секретируется нановезикулами и связывается именно с экзосомальными, а не клеточными микроРНК [41]. Аннексины, напротив, демонстрируют неспецифическое связывание с микроРНК, но играют важную роль в их стабилизации в составе экзосом. Комплекс ESCRT одновременно участвует в загрузке интралюминальных везикул как убиквитинилированными белками, которые в дальнейшем разрушаются лизосомами (рис. 1, 4б), так и секретируемыми в составе экзосом (рис. 1, 4а), однако точный механизм отбора белков для того или иного пути до сих пор остается не до конца изучен [8]. ESCRT-независимый путь транспортировки пока описан для относительно небольшого количества белков и, вероятно, может быть задействован в определенных узкоспециализированных процессах [9].



Рис. 3. Способы загрузки нановезикул. Прямоугольниками обозначены общие стратегии и подходы, овалами – механизмы транспортировки молекул в экзосомы (ссылки см. в тексте)

В настоящее время наибольшее число исследований посвящено использованию нативных экзосом, содержащих присущие данному виду растения биомолекулы: белки, микроРНК, вторичные метаболиты [35]. При этом терапевтический потенциал нативных нановезикул определяется главным образом видом растения [7]. Стоит отметить, что в литературе пока отсутствуют сведения о какой-либо нежелательной реакции со стороны организма-реципиента, индуцированной введением растительных нановезикул, что указывает на их безопасность и биосовместимость.

Состав экзосом также может быть искусственно изменен за счет введения как высоко-, так и низкомолекулярных целевых молекул (рис. 3). Выделяют два основных способа загрузки нановезикул: активный и пассивный. Активная загрузка включает такие методы, как обработка ультразвуком, экструзия и циклы замораживания и оттаивания, которые временно разрушают мембрану нановезикул, позволяя различным соединениям диффундировать внутрь, после чего мембрана восстанавливается [42]. Пассивная загрузка представляет собой инкубацию, в течение которой происходит загрузка экзосом лекарственными препаратами. На сегодняшний день существует 2 основных метода: инкубация нановезикул с терапевтическим соединением [43] и инкубация с клетками-донорами целевых молекул [44].

Терапевтические эффекты растительных нановезикул

В последнее десятилетие внимание исследователей привлекает возможность использования экзосом растений в качестве системы доставки лекарств. Растительное происхождение и высокая биосовместимость, а также универсальный терапевтический потенциал экзосом дает им преимущество перед синтетическими липосомами, используемыми как наноносители.

В настоящее время известно четыре основных способа введения нановезикул в организм: пероральный, трансдермальный, интраназальный и внутривенный. Выбор конкретного способа зависит от цели терапии, вводимого вещества, а также целевого органа пациента.

Пероральный способ является наиболее простым. Так как нановезикулы не подвергаются расщеплению пищевыми ферментами, они могут долго сохраняться в организме реципиента. Преимущественно этот способ выбирают при терапии желудка, толстой кишки, верхней подвздошной кишки и печени [45].

Трансдермальный способ используют в основном для доставки в кожные покровы и кровеносную систему. Существует два пути проникновения нановезикул при трансдермальном применении: физические каналы кожи с достаточным микрометровым диаметром для прохода к сосудам, а также через роговой слой. Предполагается, что после нанесения нановезикул на кожу происходит их проникновение через поверхность богатых липидами каналов на волосяных фолликулах. Нановезикулы могут достигать волосяных стержней, попадая в клетки волосяного матрикса и продвигаясь дальше путем дифференцировки клеток или путем прямого проникновения в волосяные стержни с кончика волоса. Другой путь проникновения в дерму – через роговой слой. Нановезикулы способны проникать в кожу по трансфолликулярным путям, так как их поверхность имеет бислойную гибкую структуру [46].

Интраназальная доставка требует меньших доз и приводит к более быстрому эффекту за счет всасывания терапевтического средства через слизистую носа, создает высокую концентрацию нановезикул в системном кровотоке и позволяет избежать эффекта первого прохождения препарата через печень, что, в свою очередь, позволяет использовать меньшие концентрации вещества [47]. Этот способ введения преимущественно выбирают для таргетной терапии легких и головного мозга.

Наименее распространенным способом введения нановезикул является внутривенный. Он позволяет максимально быстро создать необходимую концентрацию лекарственного препарата в крови и в органе, на который необходимо воздействовать, но при этом имеется определенный риск возникновения побочных эффектов [48].

Было обнаружено, что экзосомы растений обладают выраженным противовоспалительным действием, участвуя в регуляции иммунного ответа. Благодаря способности экзосом к межвидовой транслокализации содержащиеся в них молекулы регулируют взаимодействие между кишечной микробиотой и иммунной системой хозяина, что приводит к гомеостатическому балансу [49]. При рецидивирующих воспалительных заболеваниях кишечника, таких как колит, кишечные макрофаги теряют свои толерогенные свойства. В. Wang с соавторами показали, что экзосомы, выделенные из грейпфрута, оказывают благотворное влияние на иммунный гомеостаз кишечника, усиливая противовоспалительную способность кишечных макрофагов, что в конечном итоге облегчает колит у мышей. После успешного захвата экзосом кишечными макрофагами, в них активировалась экспрессия гемоксигеназы-1 и интерлейкина (IL)-10, но в то же время подавлялась транскрипционная активность IL-6, IL-1b и фактора некроза опухоли [30]. Кроме того, нановезикулы осуществляли доставку нарингина, ключевого флаванона грейпфрута. При высвобождении из экзосом нарингин гидролизует кишечной микробиотой в его активный метаболит нарингенин, который оказывает противоопухолевое действие на модели колита у мышей, вызванного декстраном сульфата натрия [50]. Также сообщалось, что микроРНК экзосом из имбиря и грейпфрута способны специфически подавлять экспрессию генов кишечного пробиотика *Lactobacillus rhamnosus* у мышей [45].

Значительное количество исследований посвящено нановезикулам, выделенным из имбиря. Например, при загрузке их доксорубицином с целью его доставки в опухолевые клетки толстой кишки нановезикулы эффективно внедрялись в клетки опухолевой модели толстой кишки и подавляли их рост. Предположительно, нановезикулы высвобождают доксорубицин при кислом pH внеклеточной микросреды опухолей и уменьшают побочные эффекты доксорубицина [48]. Более того, экзосомы имбиря показали многообещающие результаты в сокращении колоректального онкогенеза мышей за счет уменьшения уровня провоспалительных цитокинов, а также подавления пролиферации и апоптоза эпителиальных клеток кишечника посредством снижения экспрессии циклина D1, который является маркером на ранних стадиях развития рака [51]. Наряду с вышеперечисленными эффектами экзосом имбиря известно успешное подавление ими роста опухоли за счет снижения уровня экспрессии гена сурвивина путем внутривенной нановезикулярной доставки микроРНК [52].

Противоопухолевое действие проявляют также нановезикулы из винограда. Эффект достигался за счет увеличения экспрессии генов *Lgr5*, *BM11*, служащих

маркерами стволовых клеток кишечника, и генов, регулирующих рост и пролиферацию стволовых клеток [53]. Кроме того, было установлено, что нановезикулы из лимонного сока способны ингибировать пролиферацию клеток линий карциномы легких человека A549, хронического миелоидного лейкоза LAMA84 и колоректальной аденокарциномы человека, активируя апоптотическую гибель клеток [54].

Стоит отметить, что помимо противоопухолевого действия известно об использовании экзосом растений в регенеративной медицине. Было показано, что нановезикулы винограда способны проникать в стволовые клетки кишечника, индуцировать их пролиферацию и тем самым способствовать регенерации эпителиальной ткани посредством регуляции экспрессии генов *SOX2*, *Oct4* и *Klf4*, ответственных за плюрипотентность [55]. Нановезикулы имбиря проявляли гепатопротекторную активность, снижая генерацию активных форм кислорода в поврежденной алкоголем печени мышей. Благодаря биоактивным компонентам они могут повлиять на активацию ядерного фактора NRF2. Как известно, стимуляция NRF2 приводит к экспрессии генов детоксикации печени и антиоксидантов, что в совокупности способствует гепатопротекции [48]. Также в аналогичном исследовании было показано, что нановезикулы, выделенные из брокколи, оказывают профилактическое и терапевтическое действие на острый и хронический колит, повышая уровень противовоспалительных цитокинов, а также сохраняют кишечную среду с минимальными побочными реакциями за счет регуляции АМФ-активированной киназы, контролирующей энергетический баланс клетки [49]. Нановезикулы из корней женьшеня оказывали антивозрастное и антипигментационное воздействие на дермальные фибробласты человека, обработанные ультрафиолетовым излучением, путем подавления активности β -галактозидазы, а также белков меланогенеза [55]. Нановезикулы были выделены и из пшеницы с целью изучения их влияния на регенерацию кожи на примере первичной линии клеток дермальных фибробластов человека HDF, линии клеток кератиноцитов человека HaCaT и эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC в исследованиях *in vitro*. Было показано повышение уровня экспрессии коллагена I-го типа. Помимо пролиферативных и миграционных эффектов нановезикулы являются проангиогенными по своей природе, вызывая образование трубчатой структуры в линии HUVEC человека, предположительно, они обладают способностью индуцировать образование сосудов при заживлении ран [56].

На примере нановезикул из грейпфрута, нагруженных метотрексатом, исследованы иммунологические реакции организма. При пероральном введении таких везикул они эффективно таргетируют мышинные макрофаги F4/80, локализованные в кишечнике, посредством микропиноцитоза и клатрин-зависимых клеточных путей поглощения. После введения нановезикул приостановилось уменьшение веса и сокращение длины толстой кишки. Наряду с очевидной противовоспалительной реакцией также снизилась продукция провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β и IL-6. Побочные эффекты при применении метотрексата в составе нановезикул значительно уменьшались [30]. Кроме того, микроРНК в нановезикулах, полученных из имбиря и грейпфрута, нацеленная на гены кишечного пробиотика *Lactobacillus rhamnosus*, увеличивает его рост в кишечнике мышей и стимулирует антимикробный иммунитет, обеспечивая благополучие микрофлоры кишечника [57]. Известны аналогичные исследования с использованием нановезикул из брокколи, винограда и моркови, что подтверждает значительный

потенциал нановезикул в модуляции иммунологических реакций [45]. Некоторые примеры терапевтического воздействия растительных нановезикул приведены в табл. 3.

Таблица 3

Терапевтические эффекты нановезикул из растений

Источник	Характеристика	Терапевтические эффекты	Ссылка
Лимон (<i>Citrus limon</i>)	Размеры от 50 до 80 нм, содержат белки HSP70 и HSP80	Противоопухолевая активность	[54]
Грейпфрут (<i>Citrus paradisi</i>)	Размер 82,7 нм, заряд -13,9 мВ	Таргетная доставка микроРНК, анти-микробная активность	[30]
Имбирь (<i>Zingiber officinale</i>)	Размер 189,5 нм, заряд -18,1 мВ	Способность к таргетной доставке, противоопухолевая, гепатопротекторная и антимикробная активность	[58]
Виноград (<i>Vitis vinifera</i>)	Размер 37,47 нм, заряд в диапазоне от -69,6 мВ до +2,52 мВ	Противоопухолевая, антимикробная и регенеративная активность, индукция пролиферации стволовых клеток	[53]
Морковь (<i>Daucus carota</i>)	Размер 150 нм, заряд -10,2 мВ	Стимуляция антиоксидантной системы, активация регенерации кишечного эпителия и антимикробная активность	[45]
Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	Размеры от 40 до 100 нм, содержат белок HSP70	Индукция заживления ран	[56]
Брокколи (<i>Brassica oleracea</i>)	Размеры от 18,3 до 118,2 нм, заряд -17,1 мВ	Профилактическое и терапевтическое действие на острый и хронический колит	[49]
Женьшень (<i>Panax ginseng</i>)	Размер 92,04 нм	Антивозрастное и антипигментационное действие на дермальные фибробласты человека и меланоциты человека	[55]

Заключение

Регулируемое образование нановезикул, придание им специфической биологической активности и клеточной таргетированности, а также возможность масштабирования производства нановезикул растений представляет значительный интерес для практического использования. Наряду с тем, что использование экзосом человека в отдельных случаях по своей эффективности стоит в одном ряду с терапией стволовыми клетками, уже сегодня существует ряд успешных примеров медицинского применения нановезикул растений. Однако, поскольку свойства и состав нановезикул из многих видов растений остаются не полностью изученными, требуются дальнейшие исследования, направленные на стандартизацию протоколов их выделения и характеристики, разработку технологий хранения, эффективной нагрузки и улучшения таргетированности по отношению к определенным типам клеток. Открытым для исследования остается вопрос о количественной роли экзосом у организмов, их продуцирующих, как переносчиков активных веществ и биологической информации в естественных условиях.

На данный момент требуются новые знания о биогенезе экзосом растительно-го происхождения ввиду относительной малоизученности процессов, лежащих в основе их образования у разных видов. Более глубокое понимание механизмов формирования нановезикул у растений, а также факторов окружающей среды, влияющих на их количество и содержание в них биологически активных молекул, необходимо для оптимизации производства препаратов на основе экзосом растений. Дальнейшее изучение регуляции свойств растительных нановезикул с помощью методов метаболической и генетической инженерии растений-продуцентов имеет особую актуальность ввиду возможности управления количеством и составом таких естественных компонентов экзосом, как низкомолекулярные биологически активные вещества и малые РНК. Пероральное применение препаратов экзосом будет требовать макроскопических количеств очищенного препарата и, следовательно, технология производства различных типов экзосом должна быть максимально оптимизирована. По этим же причинам крайне важно будет подтвердить в многочисленных экспериментах стабильность и безопасность естественных нановезикул при использовании в качестве средств доставки в различных матрицах пищевых продуктов.

В целом растительные везикулы характеризуются низкой иммуногенностью, отсутствием цитотоксичности, естественной противовоспалительной активностью и высокой биосовместимостью. Совместно эти качества позволят им внести важный вклад в разработку терапевтических препаратов для наномедицины.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Yang M., Liu X., Luo Q., Xu L., Chen F. An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy // *J. Nanobiotechnology*. 2020. Vol. 18, N 1. Article number: 100.
2. György B., Szabó T.G., Pásztói M. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. Vol. 68, N 16. P. 2667–2688.
3. An Q., Bel A.J.E. van Hückelhoven R. Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? // *Plant Signal. Behav.* 2007. Vol. 2, N 1. P. 4–7.
4. Garaeva L., Kamyshinsky R., Kil Y. et al. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells *in vitro* // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, N 1. Article number: 6489.
5. Pérez-Bermúdez P., Blesa J., Soriano J.M., Marcilla A. Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017. Vol. 98. P. 40–50.
6. Li X., Bao H., Wang Z. et al. Biogenesis and function of multivesicular bodies in plant immunity // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9. Article number: 979.
7. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. Vol. 75, N 2. P. 193–208.
8. Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs // *Traffic*. 2009. Vol. 10, N 7. P. 925–937.
9. Niel G. van D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. Vol. 19, N 4. P. 213–228.
10. Cui Y., Gao J., He Y., Jiang L. Plant extracellular vesicles // *Protoplasma*. 2020. Vol. 257, N 1. P. 3–12.
11. Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes // *Science*. 2020. Vol. 367, N 6478. Article number: eaau6977.
12. An Q., Ehlers K., Kogel K.-H., Van Bel A.J.E., Hückelhoven R. Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant *MLA12*-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus // *New Phytol.* 2006. Vol. 172, N 3. P. 563–576.
13. Rutter B.D., Innes R.W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins // *Plant Physiol.* 2017. Vol. 173, N 1. P. 728–741.

14. Akuma P., Okagu O.D., Udenigwe C.C. Naturally occurring exosome vesicles as potential delivery vehicle for bioactive compounds // *Front. Sustain. Food Syst.* 2019. Vol. 3. Article number: 23.
15. Cai Q., He B., Wang S. et al. Message in a bubble: shuttling small RNAs and proteins between cells and interacting organisms using extracellular vesicles // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2021. Vol. 72. P. 497–524.
16. Samuel M., Bleackley M., Anderson M., Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes in cross kingdom regulation: a viewpoint from plant-fungal interactions // *Front. Plant Sci.* 2015. Vol. 6. Article number: 766.
17. Burkova E.E., Grigor'eva A.E., Bulgakov D.V. et al. Extra purified exosomes from human placenta contain an unpredictable small number of different major proteins // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, N 10. Article number: 2434.
18. Woith E., Guerriero G., Hausman J.-F. et al. Plant extracellular vesicles and nanovesicles: Focus on secondary metabolites, proteins and lipids with perspectives on their potential and sources // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, N 7. Article number: 3719.
19. Cai Q., Qiao L., Wang M. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes // *Science.* 2018. Vol. 360, N 6393. P. 1126–1129.
20. Pocsfalvi G., Turiák L., Ambrosone A. et al. Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations // *J. Plant Physiol.* 2018. Vol. 229. P. 111–121.
21. Jimenez-Jimenez S., Hashimoto K., Santana O. et al. Emerging roles of tetraspanins in plant inter-cellular and inter-kingdom communication // *Plant Signal. Behav.* 2019. Vol. 14, N 4. Article number: e1581559.
22. Caillaud M.-C., Wirthmueller L., Sklenar J. et al. The plasmodesmal protein PDLP1 localises to haustoria-associated membranes during downy mildew infection and regulates callose deposition // *PLoS Pathog.* 2014. Vol. 10, N 10. Article number: e1004496.
23. Liu D., Song Y., Chen Z., Yu D. Ectopic expression of miR396 suppresses *GRF* target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis* // *Physiol. Plant.* 2009. Vol. 136, N 2. P. 223–236.
24. Xiao J., Feng S., Wang X. et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables // *PeerJ.* 2018. Vol. 6. Article number: e5186.
25. Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA // *Mol. Cell.* 2004. Vol. 14, N 6. P. 787–799.
26. Zhou Z., Li X., Liu J. et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses // *Cell Res.* 2015. Vol. 25, N 1. P. 39–49.
27. Fairfax B.P., Vannberg F.O., Radhakrishnan J. et al. An integrated expression phenotype mapping approach defines common variants in *LEP*, *ALOX15* and *CAPNS1* associated with induction of IL-6 // *Hum. Mol. Genet.* 2010. Vol. 19, N 4. P. 720–730.
28. Kalarikkal S.P., Sundaram G.M. Edible plant-derived exosomal microRNAs: exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2 // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2021. Vol. 414. Article number: 115425.
29. Liang G., Zhu Y., Sun B. et al. Assessing the survival of exogenous plant microRNA in mice // *Food Sci. Nutr.* 2014. Vol. 2, N 4. P. 380–388.
30. Wang B., Zhuang X., Deng Z.B. et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit // *Mol. Ther.* 2014. Vol. 22, N 3. P. 522–534.
31. Campo S., Peris-Peris C., Sire C. et al. Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the *Nramp6* (*natural resistance-associated macrophage protein 6*) gene involved in pathogen resistance // *New Phytol.* 2013. Vol. 199, N 1. P. 212–227.
32. Kalarikkal S.P., Sundaram G.M. Inter-kingdom regulation of human transcriptome by dietary microRNAs: emerging bioactives from edible plants to treat human diseases? // *Trends Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 118, pt A. P. 723–734.
33. Liang H., Zhang S., Fu Z. et al. Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma // *J. Nutr. Biochem.* 2015. Vol. 26, N 5. P. 505–512.
34. Hansen L.L., Nielsen M.E. Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry? // *J. Exp. Bot.* 2017. Vol. 69, N 1. P. 59–68.
35. Dad H.A., Gu T.W., Zhu A.Q. et al. Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatfroms // *Mol. Ther.* 2021. Vol. 29, N 1. P. 13–31.
36. Frey N.F. dit, Robatzek S. Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. Vol. 12, N 4. P. 437–443.
37. Wang F., Shang Y., Fan B. et al. *Arabidopsis* LIP5, a positive regulator of multivesicular body biogenesis, is a critical target of pathogen-responsive MAPK cascade in plant basal defense // *PLoS Pathog.* 2014. Vol. 10, N 7. Article number: e1004243.

38. Meyer D., Pajonk S., Micali C. et al. Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments // *Plant J.* 2009. Vol. 57, N 6. P. 986–999.
39. Wang B., Sun Y., Song N. et al. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst-milR1*), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene // *New Phytol.* 2017. Vol. 215, N 1. P. 338–350.
40. Weiberg A., Wang M., Lin F.M. et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways // *Science.* 2013. Vol. 342, N 6154. P. 118–123.
41. He B., Cai Q., Qiao L. et al. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles // *Nat. Plants.* 2021. Vol. 7. P. 342–352.
42. Fuhrmann G., Serio A., Mazo M., Nair R., Stevens M.M. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins // *J. Control. Release.* 2015. Vol. 205. P. 35–44.
43. Vashisht M., Rani P., Onteru S.K., Singh D. Curcumin encapsulated in milk exosomes resists human digestion and possesses enhanced intestinal permeability *in vitro* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017. Vol. 183. P. 993–1007.
44. Luan X., Sansanaphongpricha K., Myers I. et al. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforams for drug delivery // *Acta Pharmacol. Sin.* 2017. Vol. 38. P. 754–763.
45. Mu J., Zhuang X., Wang Q. et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles // *Mol. Nutr. Food Res.* 2014. Vol. 58, N 7. P. 1561–1573.
46. Gu T.W., Wang M.Z., Niu J. et al. Outer membrane vesicles derived from *E. coli* as novel vehicles for transdermal and tumor targeting delivery // *Nanoscale.* 2020. Vol. 12, N 36. P. 18965–18977.
47. Moss L.D., Sode D., Patel R., Lui A., Hudson C., Patel N.A., Bickford P.C. Intranasal delivery of exosomes from human adipose derived stem cells at forty-eight hours post injury reduces motor and cognitive impairments following traumatic brain injury // *Neurochem Int.* 2021. Vol. 150. Article number: 105173.
48. Zhuang X., Deng Z.B., Mu J. et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage // *J. Extracell. Vesicles.* 2015. Vol. 4, N 1. Article number: 28713.
49. Deng Z., Rong Y., Teng Y. et al. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell amp-activated protein kinase // *Mol. Ther.* 2017. Vol. 25, N 7. P. 1641–1654.
50. Inês Amaro M., Rocha J., Vila-Real H. et al. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice // *Food Res. Int.* 2009. Vol. 42, N 8. P. 1010–1017.
51. Zhang M., Viennois E., Prasad M. et al. Edible ginger-derived nanoparticles: a novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer // *Biomaterials.* 2016. Vol. 101. P. 321–340.
52. Li Z., Wang H., Yin H. et al. Arrowtail RNA for ligand display on ginger exosome-like nanovesicles to systemic deliver siRNA for cancer suppression // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, N 1. Article number: 14644.
53. Ju S., Mu J., Dokland T. et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis // *Mol. Ther.* 2013. Vol. 21, N 7. P. 1345–1357.
54. Raimondo S., Naselli F., Fontana S. et al. *Citrus limon*-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, N 23. P. 19514–19527.
55. Cho E.G., Choi S.Y., Kim H. et al. *Panax ginseng*-derived extracellular vesicles facilitate anti-senescence effects in human skin cells: an eco-friendly and sustainable way to use ginseng substances // *Cells.* 2021. Vol. 10, N 3. Article number: 486.
56. Şahin F., Koçak P., Güneş M.Y. et al. *In vitro* wound healing activity of wheat-derived nanovesicles // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019. Vol. 188, N 2. P. 381–394.
57. Suharta S., Barlian A., Hidajah A.C. et al. Plant-derived exosome-like nanoparticles: a concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient // *J. Food Sci.* 2021. Vol. 86, N 7. P. 2838–2850.
58. Lin Y., Lu Y., Li X. Biological characteristics of exosomes and genetically engineered exosomes for the targeted delivery of therapeutic agents // *J. Drug Target.* 2020. Vol. 28, N 2. P. 129–141.

REFERENCES

1. Yang M., Liu X., Luo Q., Xu L., Chen F. An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *J. Nanobiotechnology*. 2020;18(1):100.
2. György B., Szabó T.G., Pásztói M. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci*. 2011;68(16):2667-2688.
3. An Q., Bel A.J.E. van, Hüchelhoven R. Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? *Plant Signal. Behav*. 2007;2(1):4-7.
4. Garaeva L., Kamyshinsky R., Kil Y. et al. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells *in vitro*. *Sci. Rep*. 2021;11(1):6489.
5. Pérez-Bermúdez P., Blesa J., Soriano J.M., Marcilla A. Extracellular vesicles in food: Experimental evidence of their secretion in grape fruits. *Eur. J. Pharm. Sci*. 2017;98:40-50.
6. Li X., Bao H, Wang Z. et al. Biogenesis and function of multivesicular bodies in plant immunity. *Front. Plant Sci*. 2018;9:979.
7. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci*. 2018;75(2):193-208.
8. Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009;10(7):925-937.
9. Niel G. van D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2018;19(4):213-228.
10. Cui Y., Gao J., He Y., Jiang L. Plant extracellular vesicles. *Protoplasma*. 2020;257(1):3-12.
11. Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367:eaau6977.
12. An Q., Ehlers K., Kogel K.-H., Van Bel A.J.E., Hüchelhoven R. Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant *MLA12*-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus. *New Phytol*. 2006;172(3):563-576.
13. Rutter B.D., Innes R.W. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiol*. 2017;173(1):728-741.
14. Akuma P., Okagu O.D., Udenigwe C.C. Naturally occurring exosome vesicles as potential delivery vehicle for bioactive compounds. *Front. Sustain. Food Syst*. 2019;3:23.
15. Cai Q., He B., Wang S. et al. Message in a bubble: shuttling small RNAs and proteins between cells and interacting organisms using extracellular vesicles. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2021;72:497-524.
16. Samuel M., Bleackley M., Anderson M., Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes in cross kingdom regulation: a viewpoint from plant-fungal interactions. *Front. Plant Sci*. 2015;6:766.
17. Burkova E.E., Grigor'eva A.E., Bulgakov D.V. et al. Extra purified exosomes from human placenta contain an unpredictable small number of different major proteins. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(10):2434.
18. Woith E., Guerriero G., Hausman J.-F. et al. Plant extracellular vesicles and nanovesicles: Focus on secondary metabolites, proteins and lipids with perspectives on their potential and sources. *Int. J. Mol. Sci*. 2021;22(7):3719.
19. Cai Q., Qiao L., Wang M. et al. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*. 2018;360(6393):1126-1129.
20. Pocsfalvi G., Turiák L., Ambrosone A. et al. Protein biocargo of citrus fruit-derived vesicles reveals heterogeneous transport and extracellular vesicle populations. *J. Plant Physiol*. 2018;229:111-121.
21. Jimenez-Jimenez S., Hashimoto K., Santana O., Aguirre J., Kuchitsu K. Emerging roles of tetraspansins in plant inter-cellular and inter-kingdom communication. *Plant Signal. Behav*. 2019;14(4):e1581559.
22. Caillaud M.-C., Wirthmueller L., Sklenar J. et al. The plasmodesmal protein PDLP1 localises to haustoria-associated membranes during downy mildew infection and regulates callose deposition. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004496.
23. Liu D., Song Y., Chen Z., Yu D. Ectopic expression of miR396 suppresses *GRF* target gene expression and alters leaf growth in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant*. 2009;136(2):223-236.
24. Xiao J., Feng S., Wang X. et al. Identification of exosome-like nanoparticle-derived microRNAs from 11 edible fruits and vegetables. *Peer J*. 2018;6:e5186.
25. Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*. 2004;14(6):787-799.
26. Zhou Z., Li X., Liu J. et al. Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Res*. 2015;25(1):39-49.

27. Fairfax B.P., Vannberg F.O., Radhakrishnan J. et al. An integrated expression phenotype mapping approach defines common variants in *LEP*, *ALOX15* and *CAPNS1* associated with induction of IL-6. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(4):720-730.
28. Kalarikkal S.P., Sundaram G.M. Edible plant-derived exosomal microRNAs: exploiting a cross-kingdom regulatory mechanism for targeting SARS-CoV-2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2021;414:115425.
29. Liang G., Zhu Y., Sun B. et al. Assessing the survival of exogenous plant microRNA in mice. *Food Sci. Nutr.* 2014;2(4):380-388.
30. Wang B., Zhuang X., Deng Z.B. et al. Targeted drug delivery to intestinal macrophages by bioactive nanovesicles released from grapefruit. *Mol. Ther.* 2014;22(3):522-534.
31. Campo S., Peris-Peris C., Sire C. et al. Identification of a novel microRNA (miRNA) from rice that targets an alternatively spliced transcript of the *Nramp6* (*natural resistance-associated macrophage protein 6*) gene involved in pathogen resistance. *New Phytol.* 2013;199(1):212-227.
32. Kalarikkal S.P., Sundaram G.M. Inter-kingdom regulation of human transcriptome by dietary microRNAs: emerging bioactives from edible plants to treat human diseases? *Trends Food Sci. Technol.* 2021;118(A):723-734.
33. Liang H., Zhang S., Fu Z. et al. Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma. *J. Nutr. Biochem.* 2015;26(5):505-512.
34. Hansen L.L., Nielsen M.E. Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry? *J. Exp. Bot.* 2017;69(1):59-68.
35. Dad H.A., Gu T.W., Zhu A.Q. et al. Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatforms. *Mol. Ther.* 2021;29(1):13-31.
36. Frey N.F. dit, Robatzek S. Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009;12(4):437-443.
37. Wang F., Shang Y., Fan B. et al. Arabidopsis LIP5, a positive regulator of multivesicular body biogenesis, is a critical target of pathogen-responsive MAPK cascade in plant basal defense. *PLoS Pathog.* 2014;10(7):e1004243.
38. Meyer D., Pajonk S., Micali C. et al. Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *Plant J.* 2009;57(6):986-999.
39. Wang B., Sun Y., Song N. et al. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst-milR1*), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytol.* 2017;215(1):338-350.
40. Weiberg A., Wang, M., Lin, F.M. et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science.* 2013;342(6154):118-123.
41. He B., Cai Q., Qiao L. et al. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nat. Plants.* 2021;7:342-352.
42. Fuhrmann G., Serio A., Mazo M., Nair R., Stevens M.M. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J. Control. Release.* 2015;205:35-44.
43. Vashisht M., Rani P., Onteru S.K., Singh D. Curcumin encapsulated in milk exosomes resists human digestion and possesses enhanced intestinal permeability *in vitro*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017;183:993-1007.
44. Luan X., Sansanaphongpricha K., Myers I. et al. Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery. *Acta Pharmacol. Sin.* 2017;38:754-763.
45. Mu J., Zhuang X., Wang Q. et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014;58(7):1561-1573.
46. Gu T.W., Wang M.Z., Niu J. et al. Outer membrane vesicles derived from: *E. coli* as novel vehicles for transdermal and tumor targeting delivery. *Nanoscale.* 2020;12(36):18965-18977.
47. Moss L.D., Sode D., Patel R., Lui A., Hudson C., Patel N.A., Bickford P.C. Intranasal delivery of exosomes from human adipose derived stem cells at forty-eight hours post injury reduces motor and cognitive impairments following traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 2021;150:105173.
48. Zhuang X., Deng Z.B., Mu J. et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *J. Extracell. Vesicles.* 2015;4(1):28713.
49. Deng Z., Rong Y., Teng Y. et al. Broccoli-derived nanoparticle inhibits mouse colitis by activating dendritic cell amp-activated protein kinase. *Mol. Ther.* 2017;25(7):1641-1654.
50. Inês Amaro M., Rocha J., Vila-Real H. et al. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Res. Int.* 2009;42(8):1010-1017.

51. Zhang M., Viennois E., Prasad M. et al. Edible ginger-derived nanoparticles: a novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. *Biomaterials*. 2016;101:321-340.
52. Li Z., Wang H., Yin H. et al. Arrowtail RNA for ligand display on ginger exosome-like nanovesicles to systemic deliver sirna for cancer suppression. *Sci. Rep.* 2018;8(1):14644.
53. Ju S., Mu J., Dokland T. et al. Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Mol. Ther.* 2013;21(7):1345-1357.
54. Raimondo S., Naselli F., Fontana S. et al. *Citrus limon*-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*. 2015;6(23):19514-19527.
55. Cho E.G., Choi S.Y., Kim H. et al. *Panax ginseng*-derived extracellular vesicles facilitate anti-senescence effects in human skin cells: an eco-friendly and sustainable way to use ginseng substances. *Cells*. 2021;10(3):486.
56. Şahin F., Koçak P., Güneş M.Y. et al. *In vitro* wound healing activity of wheat-derived nanovesicles. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019;188(2):381-394.
57. Suharta S., Barlian A., Hidajah A.C. et al. Plant-derived exosome-like nanoparticles: a concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. *J. Food Sci.* 2021;86(7):2838-2850.
58. Lin Y., Lu Y., Li X. Biological characteristics of exosomes and genetically engineered exosomes for the targeted delivery of therapeutic agents. *J. Drug Target.* 2020;28(2):129-141.