



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2019, 2, 6-13
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

EGZOSOMY JAKO NOŚNIKI INFORMACJI W KOMUNIKACJI MIĘDZY KOMÓRKAMI NOWOTWOROWYMI

Aleksandra Grzybowska^{1,3}, Tomasz Lorenc^{2*}, Wioletta Olejarsz^{1,3}, Grażyna Nowicka^{1,3}

¹ Zakład Biochemii i Farmakogenomiki, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Banacha 1, 02-097 Warszawa

² I Zakład Radiologii Klinicznej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chatubińskiego 5, 02-004 Warszawa

³ Laboratorium Biochemii i Chemii Klinicznej, Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Banacha 1b, 02-097 Warszawa

* autor korespondujący, tel: +48 22 502 1073, e-mail: tlorenc@wum.edu.pl

Otrzymano 30.11.2018, zaakceptowany 28.01.2019, zamieszczony 7.02.2019

STRESZCZENIE

Egzosomy to sferyczne nanopęcherzyki błonowe uwalniane niemal przez wszystkie typy komórek. Jako struktury zawierające bogaty panel bioaktywnych cząsteczek pośredniczą w wymianie informacji oraz transporcie składników między komórkami, inicjując lub modulując określone procesy, zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne. Egzosomy posiadają ogromny potencjał do wykorzystania ich w diagnostyce, zapobieganiu oraz leczeniu wielu chorób, w tym nowotworów. W pracy przedstawiono aktualną wiedzę na temat egzosomów, uwzględniając w szczególności ich rolę w komunikacji między komórkami nowotworowymi oraz możliwości zastosowania w diagnostyce oraz terapii onkologicznej.

SŁOWA KLUCZOWE: egzosomy, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe, biomarkery, komunikacja międzykomórkowa, nowotwór, leki onkologiczne.

ABSTRACT

EXOSOMES AS CARRIERS OF INFORMATION BETWEEN TUMOR CELLS

Exosomes are spherical membrane nanovesicles that are released by almost all cell types. As structures containing many different bioactive molecules, they are involved in the exchange of information and in the transport of elements between cells, initiating or modulating specific physiological and pathological processes. Exosomes have an enormous potential to being used in the diagnosis, prevention and treatment of many diseases, including tumors. The paper presents current approach to exosomes - particularly their role in communication between cancer cells and the possibility of their application in diagnostics and oncological therapy.

KEYWORDS: exosomes, extracellular vesicles, biomarkers, cell communication, cancer, oncological drugs.

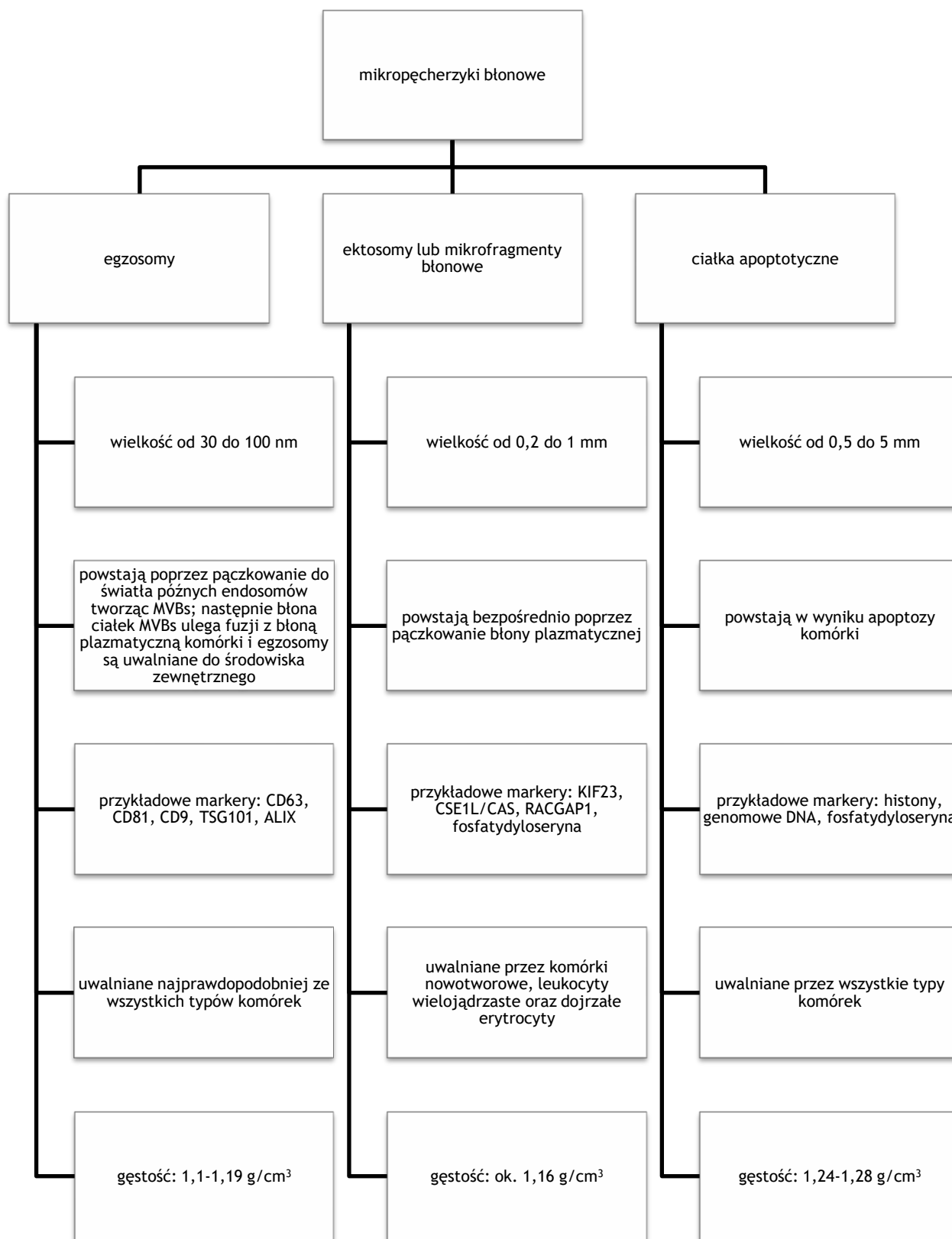
1. Wstęp

Egzosomy to sferyczne nanopęcherzyki błonowe, osiągające wielkość od 30 do 100 nm [1]. Jako nośniki biologicznych cząsteczek, tj. białek, lipidów czy materiału genetycznego odgrywają istotną rolę zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych. Biorą one udział w komunikacji międzykomórkowej, a także pełnią funkcję mediatorów modulujących aktywność innych komórek, np. aktywność immunologiczną makrofagów [2], fibroblastów, leukocytów [3]. Zdolne są do indukcji wielu procesów, np. procesu wapnienia naczyń wieńcowych [4] czy angiogenezy [5]. Badania nad tymi cząsteczkami trwają już ponad 15 lat, a temat egzosomów cieszy się coraz większym zainteresowaniem naukowców. Doniesienia na temat ich nowych funkcji oraz możliwych zastosowań w diagnostyce lub terapii pojawiają się w ostatnim czasie lawinowo. Te błonowe struktury wydzielane są zarówno przez komórki prawidłowe, jak i patologiczne. Badania naukowe wskazują, że pewne cząsteczki biologiczne transportowane w egzosomach, tj. niektóre białka i miRNA (*micro RNA*), są ściśle związane z patogenezą wielu nowotworów złośliwych, stąd też powstaje wiele publikacji dotyczących potencjalnej roli nanopęcherzyków podczas inicjacji i progresji nowotworów, a także w powstawaniu przerzutów. Wiele aktualnych badań prowadzonych jest w

kierunku opracowania metody, która pozwoli wykorzystać te cząsteczki jako nieocenione biomarkery w diagnostyce, rokowaniu czy terapii onkologicznej. Celem niniejszej pracy przeglądowej jest przybliżenie zagadnienia egzosomów jako cząsteczek wywierających dwukierunkowy, regulatorywny wpływ na organizm w różnych stanach patologicznych, zaś w szczególności przedstawienie ich jako nośników informacji w komunikacji między komórkami nowotworowymi, w kontekście ogromnego potencjału w diagnostyce, zapobieganiu i leczeniu nowotworów.

2. Klasyfikacja, mechanizm powstawania oraz budowa egzosomów

Przyjmuje się, iż egzosomy należą do rodziny mikropęcherzyków błonowych (*extracellular vesicles, EV*). Zasadniczo w grupie tej wyróżnia się trzy subpopulacje, tj. egzosomy (*exosomes*), ektosomy lub mikrofragmenty błonowe (*ectosomes or microvesicles*) oraz ciała apoptotyczne (*apoptotic blebs*). Pęcherzyki te wykazują znaczne podobieństwo w swojej budowie, a nawet funkcji, co nastęrcza niemałe trudności związane z ich klasyfikacją i terminologią. Główne kryteria podziału opierają się na różnicach dotyczących ich rozmiaru, właściwości fizykochemicznych oraz źródeł i mechanizmu powstawania [6,7] (ryc. 1).

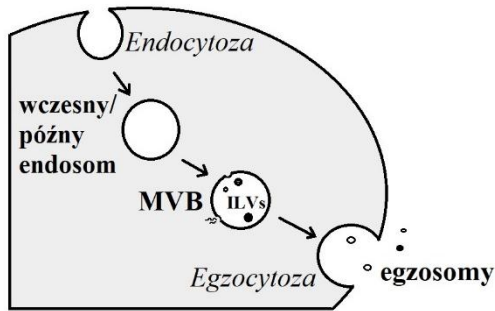


Ryc. 1. Wybrane właściwości mikropęcherzyków błonowych [6,8-10].

Biogeneza egzosomów rozpoczyna się procesem endocytozy, tj. wpuklaniem się błony komórkowej do światła komórki, tworząc wczesne endosomy. Endosomy przemieszczają się w głąb komórki zyskując miano późnych endosomów, a ich błona ulega tzw. wewnętrznemu pęcherzykowaniu. Na skutek tego wewnętrznego pączkowania, a następnie internalizacji w świetle endosomu powstają pęcherzyki ILVs (*intraluminal vesicles*), tj. prekursorzy eg-

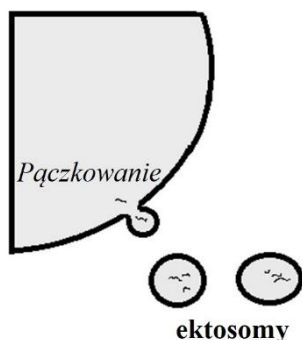
zosomów. Struktury te wzbogacane są w specyficzne dla środowiska komórkowego substancje biologiczne: proteiny, kwasy nukleinowe lub inne substancje charakterystyczne dla komórki rodzicielskiej. Endosomy gromadzące w swoim wnętrzu pęcherzyki ILVs określa się mianem ciałek wielopęcherzykowatych MVBs (*multivesicular bodies*). MVBs wędrują w kierunku powierzchni komórki, a finalnie ich błona ulega fuzji z błoną komórki rodzicielskiej,

zaś zawartość zostaje uwolniona do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Skutkuje to uwolnieniem pęcherzyków nazywanych egzozomami do środowiska zewnątrzkomórkowego (egzocytoza) (ryc. 2).



Ryc. 2. Biogeneza egzozomów.

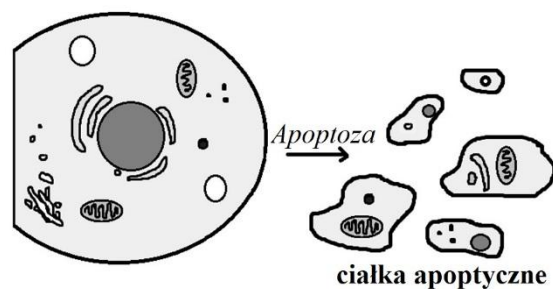
Należy podkreślić, że spośród mikropęcherzyków błonowych tylko egzozomy powstają na drodze egzocytozy. Inne EVs, tj. ciała apoptyczne czy ektosomy uwalniane są do środowiska zewnętrznego w procesie pączkowania, a więc szlak ich biogenezy nie obejmuje tworzenia ILVs, gdyż tworzenie się i zapewnianie pęcherzyków zachodzi bezpośrednio podczas uwypuklenia się błony komórki rodzicielskiej [11,12]. Ektosomy powstają w konsekwencji pączkowania, tzn. tworzenia się uwypukleń błony komórki. W ich wnętrze aplikowane są cząsteczki biologiczne, m.in. kwasy nukleinowe, proteiny i inne. Obciążone pęcherzyki odrywają się od błony komórki i przemieszczają się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. (ryc. 3). Ciała apoptyczne powstają na drodze apoptozy, czyli tzw. zaprogramowanej śmierci komórki. Proces ten związany jest z szeregiem zjawisk zachodzących w komórce, dotyczących przede wszystkim obkurczania się jej struktury, a także fragmentacji cytoplazmy. Efektem dezintegracji komórki są błonowe pęcherzyki, w których wnętrzu znajdują się resztki cytozolu oraz organelle komórkowe - tzw. ciała apoptyczne (ryc. 4).



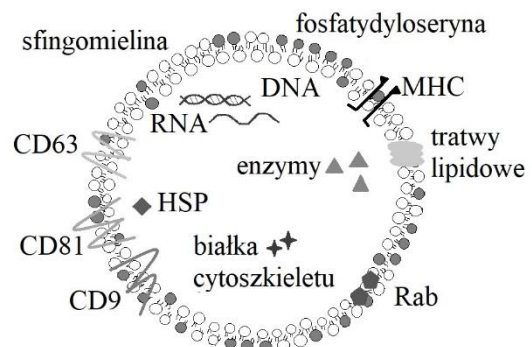
Ryc. 3. Biogeneza ektosomów.

Procesy te możliwe są dzięki licznym białkom oraz kompleksom białkowym występującym w dwuwarstwowej błonie. W transporcie oraz sortowaniu nanopęcherzyków w cytozolu i w kompartmentach ciałek wielopęcherzykowych [13] może uczestniczyć kompleks białkowy ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*). Złożony jest on z czterech grup białkowych, określanych jako ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II oraz ESCRT-III, które różnią się między sobą mechanizmami działania. Niektóre z nich opierają się na ubikwitinacji, jednak dokładny mechanizm ich funkcjonowania nadal nie jest do końca jasny. Białka z rodziny Rab odgrywają istotną rolę w fuzji błon

oraz w sekrecji egzozomów. Opisano kilka typów tych protein w zależności od badanych komórek. I tak na przykład, białko Rab11 zaangażowane jest podczas wapniowo-zależnego wydzielania egzozomów w ostrej białaczce szpikowej [14], a Rab35 uczestniczy w sekrecji przez komórki glejowe egzozomów bogatych w PLP [15]. Istnieją także publikacje dotyczące białek Rab27a i Rab27b, które, tak jak cała rodzina tych protein predestynowane są do pełnienia zróżnicowanych funkcji. Jako przykład może posłużyć uzupełniająca rola tych białek w sekrecji nanopęcherzyków wzbogaconych w kompleksy MHC klasy II (*major histocompatibility complex class II*) [16]. Transbłonowy kompleks białkowy SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) umożliwia fuzję MVBs z błoną komórkową, dzięki czemu nanopęcherzyki są uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [7]. Tetraspaniny, takie jak CD63, CD81, CD82, CD53 i CD37 są swoistymi biomarkerami membrany komórkowej [17]. Uważa się, że struktury te są niczym linie papilarne komórek rodzicielskich, ponieważ geneza błony egzozomów wywodzi się właśnie z nich. Mimo to budowa i skład biochemiczny błon nie są identyczne. Mikroskopia elektronowa pozwoliła stwierdzić, iż topologia białek zostaje zachowana, jednak ich część może być wyeliminowana, a inne białka błonowe ulegają przebudowie - przykładem jest fosfatydyloseryna translokowana do zewnętrznej warstwy lipidowej [18]. Ponadto analizy biochemiczne wykazują, że egzozomy są bogatsze w cholesterol i sfingomielinę w porównaniu z błoną komórkową. Charakterystyczne dla nanopęcherzyków są też straty lipidowe związane z białkami [19]. Dwuwarstwowa błona ma szerokość ok. 5 nm [20], a oprócz białek zawiera także lipidy, które odgrywają równie znaczącą rolę w procesie wydzielania nanopęcherzyków. I tak na przykład ceramidy są szczególnie istotne przy tworzeniu wgłębień w pęcherzykach. Oprócz nich opisywane są sfingomieliny, cholesterol, fosfoglicerydy i łańcuchy cukrowe, które bogato występują w zewnętrznej warstwie błony egzozomu (ryc. 5).



Ryc. 4. Biogeneza ciałek apoptycznych.



Ryc. 5. Schemat budowy egzozomu (opracowanie własne na podstawie [1,21-23]).

3. Mechanizmy wymiany informacji między egzosomami a komórkami docelowymi

Zawartość egzosomów transportowana jest nie tylko do otaczających komórek, ale również do bardziej odległych tkanek. Zdarza się nawet, iż zdolna jest do wywołania odpowiedzi ogólnoustrojowej, dlatego więc mechanizmy wymiany informacji między komórkami są szeroko rozbudowane i jeszcze nie do końca poznane. Obecnie wyróżnia się cztery sposoby komunikacji egzosomów z komórkami docelowymi: 1) bezpośrednie wiązanie egzosomu z ligandem na powierzchni komórki; 2) transportowanie receptorów między komórkami przez egzosomy; 3) dostarczanie białek lub cząsteczek zakaźnych do komórek docelowych i 4) przenoszenie informacji genetycznej, czynników transkrypcyjnych, cytokin i białek sygnalizacyjnych do komórek biorcy. W związku z obecnością specyficznych domen białkowych i receptorów na powierzchni komórek, wychwytywanie egzosomów nie jest całkowicie losowe. Zastosowany mechanizm i jego działanie, zależne są od stanu patofizjologicznego organizmu, a także rodzaju komórki źródłowej i biorczej [11]. Po wchłonięciu zaś określonego ładunku (tj. białek, lipidów, mRNA (*messenger RNA*), miRNA) funkcja lub fenotyp komórki docelowej czy nawet homeostaza komórkowa ulegają modyfikacji poprzez regulację szlaków sygnałowych, szlaków reakcji enzymatycznych lub innych mechanizmów komórkowych.

4. Występowanie i rola egzosomów w warunkach prawidłowych

Badania dotyczące występowania i roli egzosomów sięgają 1967 roku, kiedy to Peter Wolf po raz pierwszy w historii nauki opisał tzw. pył płytkowy [24]. Ówczesny autor twierdził bowiem, że komórki płytkowe w ludzkiej krwi wytwarzają małe struktury wykazujące działanie prokoagulacyjne. Dziś wiemy, że Wolf wysnuwał słuszne tezy, lecz do uwalniania egzosomów oprócz płytek krwi zdolna jest większość komórek, a ponadto nanopęcherzyki występują niemal we wszystkich płynach biologicznych, tj. w moczu, ślinie, krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie stawowym, wodach płodowych, mleku itp. Do sekrecji egzosomów wyspecjalizowane są m.in. narządy hematopoetyczne, tkanka nabłonkowa, nerwowa, nowotworowa, a nawet komórki macierzyste [7,25].

Dokładne funkcje biologiczne egzosomów nie są jeszcze w pełni poznane, jednak wiele danych wskazuje na to, iż są to pierwszoplanowe czynniki pośredniczące w oddziaływaniach międzykomórkowych, odpowiedzialne za wymianę sygnałów informacyjnych, a także istotne nośniki białek, lipidów czy fragmentów DNA (ssDNA, dsDNA), funkcjonalnego mRNA i miRNA lub długiego niekodującego RNA [26]. Istnieją też doniesienia naukowe na temat egzosomalnego mitochondrialnego DNA (mtDNA) uwalnianego przez komórki nerwowe [27] i mioblasty [28]. Oprócz komunikacji typu komórka-komórka, egzosomy zaangażowane są w transport antygenów oraz białkowych kompleksów MHC, które następnie aktywują limfocyty T [11], a także biorą udział w procesach krzepnięcia czy w zarządzaniu detrytusem komórkowym [29]. Ilość oraz panel ładunkowy tych błonowych struktur różni się w zależności od miejsca występowania oraz stanu organizmu, a co szczególnie budzi zainteresowanie - w warunkach patofizjologicznych, tj. w przebiegu infekcji wirusowej, bakteryjnej czy pasożytniczej, choroby nowotworowej, autoimmunizacyjnej [30] - stężenie nanopęcherzyków w płynach biologicznych wzrasta.

Stwarza to możliwość wykorzystania ich w diagnostyce jako swoistych biomarkerów, a także w terapii, np. dzięki zakłóceniu receptorowego mechanizmu komunikacji międzykomórkowej.

5. Występowanie i rola egzosomów w chorobach zakaźnych

Mimo znacznego postępu w prewencji oraz leczeniu chorób zakaźnych, jaki można zaobserwować w ostatnich dekadach, choroby te nadal stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny. Dzieje się to chociażby poprzez narastającą lekooporność patogenów czy pojawianie się wciąż nowych odmian genetycznych drobnoustrojów. W poniższym rozdziale opisano wybrane zagadnienia związane z egzosomami, których być może dogłębna analiza pozwoli w przyszłości na wykorzystanie ich jako użytecznego narzędzia w walce z chorobami zakaźnymi.

W ostatnich latach udowodniono, że droga rozprzestrzeniania się retrowirusów w ustroju możliwa jest właśnie dzięki egzosomom. Opisano mechanizm, w którym cząstki składowe wirusa HIV ulegają internalizacji poprzez kompleks MVBs, a następnie jako uwolnione nanopęcherzyki infekują limfocyty T [12] - dzięki takiemu opakowaniu w fizjologicznie występującą membranę, wirusy nie są rozpoznawane przez układ odpornościowy. Nie jest to jedyny przykład newralgicznej funkcji tych struktur w rozprzestrzenianiu się choroby wirusowej. Istnieją źródła [11], z których wynika, że egzosomy są nagminnie wydzielane przez komórki wątroby zainfekowanej wirusem zapalenia wątroby typu C (*HCV*). W tym przypadku nanopęcherzyki obciążone RNA wirusa inaktywują ekspresję TLR3, a także pośredniczą w dojrzewaniu komórek dendrytycznych (*dendritic cells, DCs*). Później zaś, dzięki wytworzeniu lokalnego mikrośrodowiska, przyczyniają się do apoptozy hepatocytów. Oczywiście, powyższe przykłady znaczenia błonowych pęcherzyków podczas infekcji wirusowej to tylko wybrane aspekty ich działania. Należy wspomnieć, iż istnieje wiele szlaków na tym obszarze, które mogą być przedmiotem badań w poszukiwaniu diagnostyki lub terapii chorób wirusowych. Dogłębne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie egzosomów i ich dalsze funkcjonowanie, może sprawić, iż w codziennej praktyce klinicznej zostaną wykorzystane mechanizmy regulujące transport materiału genetycznego wirusa. Pozwoliłoby to na regulację ekspresji genów komórek gospodarza, zahamowanie oporności na leki lub wykorzystanie wewnątrzkomórkowych cytokin prozapalnych.

Jak wspomniano wcześniej, egzosomy odgrywają istotną funkcję także w rozwoju infekcji bakteryjnej. Badania na prątkach gruźlicy dowodzą, iż wytwarzane są tu dwa rodzaje nanopęcherzyków: jedne są nośnikami markerów, zaś drugie lipoglikanów i lipoprotein, dzięki czemu funkcje układu immunologicznego ulegają modulacji [31]. Oczywiście należy pamiętać, że tak jak w każdej infekcji, egzosomy mogą pełnić tu przeciwstawne zadania. Z jednej strony stymulują protekcyjne działanie układu immunologicznego poprzez wprowadzanie antygenów drobnoustrojowych, z drugiej zaś wykorzystywane są do szerzenia się infekcji poprzez aktywację transkrypcji genów czy wywoływania cytotoksyczności [32]. Istnieją dowody wskazujące na to, że pęcherzyki zewnątrz błonowe wydzielane przez bakterie gram-ujemne mogłyby posłużyć jako integralny składnik szczepionki między innymi przeciwko takim chorobom jak krztusiec, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych czy shigelloza [33].

Pasożyty także wykorzystują nanopęcherzyki, które z powodzeniem absorbowane są przez komórki żywiciela. Istnieje wiele badań, które dowodzą, iż podczas infekcji pasożytniczej egzosomy odgrywają istotną rolę nie tylko w regulacji oddziaływań między komórkami gospodarza a tym czynnikiem patogennym, ale także służą do komunikacji typu pasożyt-pasożyt, nie wspominając o występowaniu jako czynniki obronne organizmu w odpowiedzi na zakażenie. W 2016 roku opisano proces, w którym *Leishmania* zdolna jest do modulacji odporności gospodarza za pomocą egzosomów. Dzieje się to poprzez promowanie uwalniania immunosupresyjnej interleukiny-10 (*interleukin-10, IL-10*) czy też poprzez hamowanie sekrecji czynnika martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor, TNF*) i prozapalnych cytokin IL-8 i IL-12 [34]. Wyrafinowanym sposobem transmisji sygnałów w obrębie swojej populacji odznaczają się również nicienie. Do komunikacji wykorzystują one m.in. miRNA upakowane właśnie w nanopęcherzyki. Istnieją dowody, że dzięki tym niewielkim cząsteczkom pasożyty zdolne są do zmiany ekspresji genów gospodarza, co daje im duże szanse na przeżycie w ludzkim organizmie [35].

W 2017 roku opublikowano pracę, z której wynika, że egzosomy pełnią istotną rolę w rozprzestrzenianiu się prionów znanych powszechnie jako cząsteczki zakaźne wywołujące choroby neurodegeneracyjne. Dzieje się to poprzez zawarte w nich komórkowe białko prionowe pełniące kluczową rolę w tej patologii. Jako że patomechanizm choroby prionowej łączy się z mechanizmem powstawania innych, znacznie częstszych pod względem występowania chorób otępiennych, naukowcy prowadzą badania mające na celu wyjaśnienie roli egzosomalnego komórkowego białka prionowego [36].

Wiedza na temat znaczenia patogenów w procesie nowotworzenia nadal nie jest wystarczająca. Warto jednak podkreślić, iż nie są one jedynie determinantą powszechnie znanych nam chorób, ale stanowią również czynnik predykcijny w procesie kancerogenezy [37,38]. Fakt ten wskazuje na konieczność szerszego zdefiniowania zależności między onkogenozą a czynnikami zakaźnymi. Wydaje się, że wirusy, takie jak wirus Epsteina-Barr (*EBV*), wirus brodawczaka ludzkiego (*HPV*), wirus mięsaka Kaposiego (*KSHV*) czy wirus zapalenia wątroby typu B (*HBV*) i C (*HCV*) są najszerzej jak dotąd poznanymi patogenami o znaczeniu onkogennym. Ich rolę w procesie nowotworzenia przypisuje się przede wszystkim wydzielanym egzosomom. Badania naukowe dowodzą, iż zawierają one onkoproteiny odpowiedzialne m.in. za tworzenie mikrośrodowiska guza, hamowanie odpowiedzi immunologicznej w komórkach gospodarza, indukcję przewlekłego stanu zapalnego, a także promowanie nadmiernej proliferacji zainfekowanych komórek poprzez oddziaływanie na ich metabolizm i zachodzący tam proces transkrypcji [39]. Jednak nawet pobieżna analiza przytoczonych w tym rozdziale przykładów mechanizmów oddziaływania cząstek zakaźnych na organizm gospodarza pozwala zauważyć, że w chorobach zakaźnych z reguły współistnieją przewlekły stan zapalny oraz destabilizacja układu odpornościowego, co w następstwie może skutkować rozwojem procesu nowotworzenia.

6. Znaczenie egzosomów w procesach inicjacji, progresji nowotworu oraz rozwoju przerzutów

Kancerogeneza (*ang. carcinogenesis*) to długotrwały proces prowadzący do powstania nowotworu. Uważa się, że impuls do tychże zmian ma podłoże ściśle genetyczne, jednak szlak nowotworzenia składa się z szeregu procesów,

w których nieobojętne są wzajemne oddziaływania komórek, kontekst niszy tkankowej oraz zjawiska zachodzące na poziomie całego organizmu. Właśnie dlatego na przestrzeni lat możemy zaobserwować wzrost zainteresowania znaczeniem klinicznym egzosomów w procesie onkogenezy. Okazuje się, że jako mediatory transportujące bioaktywne cząstki w komunikacji komórkowej, cząsteczki te zdolne są do wprowadzania zmian w mikrośrodowisku guza poprzez regulację odporności, angiogenezy, apoptozy, modulowanie komórek zrębowych czy transfer cech onkogennych z pierwotnie zajętej tkanki rakowej do komórek docelowych, tworząc przerzuty.

Istotnym znaczeniem egzosomów w inicjacji i progresji guza jest ich zdolność do regulacji niezależnej od komórek syntezy miRNA [40]. Zauważono także, iż te drobne struktury błonowe pochodzące z nowotworowej tkanki płucnej, selektywnie dostarczają miRNA-210 do komórek śródbłonna, tym samym promując angiogenezę guza [41]. W tym miejscu należy podkreślić słowo „selektywnie”, bowiem zauważono, iż białka powierzchniowe egzosomów sprzyjają niejako organotropizmowi i cząsteczki egzosomalne umożliwiają przerzuty specyficzne dla danego narządu [42]. Przenieszone do cytoplazmy komórki docelowej miRNA powoduje obniżenie ekspresji specyficznych genów, zmieniając tym sposobem jej funkcję. Jednak nie tylko materiał genetyczny (onkogeny) transportowany w tych nanopęcherzykach wpływa na rozwój raka. Przeprowadzone w 2015 roku badania z zakresu proteomiki wykazały, że komórki niedrobnokomórkowego raka płuc wydzielają egzosomy zawierające onkoproteiny, które pobudzają kancerogenezę [43]. W 2017 roku opublikowano wyniki badań, które sugerują, że komórki posiadające choćby pojedynczą mutację onkogenu, po zadziałaniu czynnika rakotwórczego wykazują zwiększony wychwyty nanopęcherzyków transportujących czynniki onkogenne [44]. Fakt ten przemawia więc za tym, iż egzosomy stymulują transformację komórek, a ponadto mogą sprzyjać powstawaniu przerzutów.

Dualny wpływ egzosomów wydzielaných przez komórki nowotworowe na układ immunologiczny również rzutuje na rozwój choroby. Poprzez te struktury możliwe są np.: 1) hamowanie dojrzewania i różnicowania komórek dendrytycznych, 2) aktywacja makrofagów podczas inwazji i w przerzutach, 3) regulowanie cytotoxiczności komórek NK (*natural killer cells*), 4) uszkodzenie lub regulacja funkcji limfocytów T i B oraz 5) stymulacja przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [11].

- 1) Tłumienie poprzez egzosomy procesów dojrzewania i różnicowania DCs w mikrośrodowisku guza powoduje, że te komórki, które z zasady powinny prezentować antygeny limfocytom T i aktywować ich wczesną odpowiedź immunologiczną, stają się niezdolne do pełnienia swojej funkcji, co przyczynia się do progresji nowotworu. Ponadto stwierdzono, że nanopęcherzyki pochodzące z komórek rakowych indukują ekspresję IL-6. Badacze zakładają, iż powyższe mechanizmy związane są przede wszystkim z transportowanymi przez egzosomy cząsteczkami, tj. TGF- β , IL-6 i PGE-2 [45].
- 2) Aktywacja makrofagów przez nanopęcherzyki wydzielane przez komórki nowotworowe przede wszystkim reguluje inwazję guza i przerzuty. Docelowo dzieje się to poprzez zmniejszenie wydzielania takich bioaktywnych cząsteczek, jak IFN γ , IL-16 czy tkankowego inhibitora metaloproteinazy-1, zaś zwiększenie wydzielania, np. IL-8. Rok temu opisano fakt, iż egzosomy uwalniane przez komórki przewodowego gruczołakoraka trzustki

biorą udział w tworzeniu mikrośrodowiska, co sprzyja przerzutom do wątroby [46].

- 3) Regulowanie cytotoksyczności komórek NK ma różny efekt w rozwoju raka. Z jednej strony terapia chorób nowotworowych wątroby takimi lekami jak np. cisplastyne stymuluje komórki do wydzielania egzosomów bogatych w białka HSP (*heat shock proteins*), które pobudzają komórki NK do odpowiedzi immunologicznej [47], zaś z drugiej strony egzosomy wydzielane przez komórki raka piersi hamują ich cytotoksyczność [48].
- 4) Niestety, egzosomy pochodzące z komórek rakowych wpływają także na proliferację, aktywację i apoptozę limfocytów T. Różnicowanie tychże limfocytów w komórki efektorowe T_c (CD8+) lub T_h (CD4+) jest niezbędne w procesach przeciwnowotworowych. Badania nad rakiem nosogardzieli wykazały, iż zaburzenia tychże mechanizmów mają związek z nanopęcherzykami transportującymi miRNA [49]. Okazuje się, że wydzielane struktury mogą też indukować apoptozę limfocytów, o ile ich błonowa dwuwarstwa zawiera białko Fas. Eksperymenty naukowe na szczurach ukazały egzosomy jako cząsteczki obniżające aktywację limfocytów T_c [50]. Wpływ egzosomów na limfocyty B jak dotąd nie jest jeszcze do końca poznany. Istnieją doniesienia, że egzosomy pochodzące z komórek śródbłonka serca uwalniają TGF- β , który hamuje proliferację limfocytów T. Obserwacje te przemawiają za tym, iż regulacja funkcji limfocytów B przez egzosomy sprowadza się do wywołania immunosupresji na komórki T efektorowe [51].
- 5) Egzosomy produkowane przez limfocyty B przede wszystkim transportują cząsteczki prezentujące antygeny nowotworowe do wykonawczych komórek odpornościowych, dzięki czemu następuje wzrost reaktywności przeciwnowotworowej [52]. Przenoszone mogą być np. cząsteczki MHC I, MHC II, CD86 i HSP. Ta właściwość nanopęcherzyków daje naukowcom duże pole manewru w dziedzinie nowych metod terapii przeciwnowotworowych, o czym będzie mowa w następnym rozdziale.

Istotny wpływ egzosomów na progresję nowotworu ma także regulacja lekooporności. Wyniki badań dowodzą, iż guz jest w stanie usuwać lek z wnętrza komórki właśnie przy pomocy tych pęcherzyków. Ponadto leki przeciwnowotworowe oparte na działaniu przeciwciał mogą mieć obniżony efekt terapeutyczny poprzez występowanie konkurencji między lekiem, a ładunkiem molekularnym egzosomu. Możliwe jest też egzosomalne przenoszenie genów odpowiedzialnych za lekooporność między komórkami nowotworowymi [53,54].

7. Potencjał egzosomów w diagnostyce, zapobieganiu i leczeniu nowotworów

Jak wspomniano wyżej, egzosomy to stabilne struktury obecne w większości płynów ustrojowych, a ich wydzielana ilość zwiększa się w warunkach patologicznych, w tym w przebiegu choroby nowotworowej. Ich zawartość wykazuje znaczne podobieństwo do komórek rodzicielskich, a więc odzwierciedla zmieniony stan komórek pochodzenia nowotworowego w postaci chociażby zmian genetycznych. Ponadto, swoiste markery białkowe egzosomów także częściowo pokrywają się z białkami endosomu (np. białka z rodziny Rab, aneksyny, tetraspaniny, cząsteczki adhezyjne komórek nabłonkowych); przypuszczalnie mogą one po-

stąpić jako egzosomalne markery w płynnej biopsji raka piersi, jajnika, trzustki, prostaty, jelita grubego czy glejaka [21]. Cechy te czynią je wartościowym źródłem w biopsji płynów do diagnostyki choroby nowotworowej [55-57].

Wydaje się, że z uwagi na dogodność i niewielką inwazyjność pobrania od chorego płynu ustrojowego w porównaniu z obecnie stosowaną metodą chirurgiczną pobrania fragmentu tkanki do biopsji, nanopęcherzyki mogą w przyszłości z powodzeniem wyprzeć tradycyjną metodę. Aby potwierdzić powyższą tezę, warto przytoczyć choćby jeden przykład. Otóż w 2016 roku opublikowano imponujące wyniki dotyczące raka piersi. Dowodzą one, że egzosomalne markery pozyskane z surowicy chorych kobiet precyzyjnie informują o ich stanie klinicznym, a ponadto można zastosować je nie tylko jako krążące wskaźniki tego schorzenia, lecz także jako wskaźniki stadium zaawansowania czy stopnia odpowiedzi na leczenie [58,59]. Z kolei, jako marker prognostyczny raka nosogardzieli, mogą posłużyć nanopęcherzyki zawierające miR-24-3p, którego funkcję sprowadza się do hamowania odpowiedzi limfocytów T [60]. Wspominając rozdział na temat organotropizmu egzosomów nowotworowych, warto dodać, iż rozwój badań proteomicznych pozwolił zdefiniować pewne integryny, definiujące tendencję do przerzutów. I tak na przykład, integryny $\alpha 6 \beta 4$ i $\alpha 6 \beta 1$ przyczyniają się do przerzutów do płuc, zaś integryna $\alpha v \beta 5$ związana jest z przerzutami do wątroby. W przyszłości takie dane można zastosować do przewidywania przerzutów, a nawet wykorzystać w terapii [42].

Właściwości immunomodulacyjne i regeneracyjne egzosomów również zachęcają do prób stosowania ich w celach terapeutycznych. Przeprowadzono badania, w których z krwi zdrowych dawców wyizolowano nanopęcherzyki pochodzące z komórek NK, zawierające określone markery. Okazało się, że w warunkach *in vitro* i *in vivo*, cząsteczki te wykazywały działanie cytotoksyczne przeciwko kilku rodzajom raka, a także niewielką aktywność immunologiczną [61]. Pozwoliło to zauważyć, iż poza rolą transmisji białek i materiału genetycznego, egzosomy mogą pełnić także określone funkcje immunologiczne, stąd mogłyby być one wykorzystane jako szczepionki w immunoterapii komórek nowotworowych. Obecnie zakończono już I i II fazę badań klinicznych, gdzie wykorzystano szczepionki przeciwnowotworowe zawierające egzosomy wydzielane przez komórki dendrytyczne. Metoda opiera się na zdolności DCs do prezentowania antygenów nowotworowych limfocytom T i generowania odpowiedzi przeciwnowotworowej w zaawansowanych nowotworach złośliwych [62,63]. Widząc ogromny potencjał egzosomów jako terapeutycznych cząsteczek przeciwnowotworowych, warto wspomnieć, że źródłem nanopęcherzyków mogą być także inne komórki, w tym odpowiednio modyfikowane genetycznie [64].

Niedawne wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania egzosomów także w terapii przeciwnowotworowej. W ubiegłym roku na przykład, wykazano, że po podaniu paklitakselu wraz z nanopęcherzykami wyizolowanymi z mleka krowiego, stabilność leku zwiększa się, zaś jego toksyczność spada w porównaniu z podaniem samego terapeutycznego [65]. Inne analizy pozwoliły stwierdzić, że egzosomy można zastosować jako nośniki leków przeciwnowotworowych do miejsca guza. Okazuje się, że taki sposób podania leku niweluje jego niepożądane efekty związane z podaniem drogą dożylną [66,67].

8. Podsumowanie

Na przestrzeni niecałych dwóch dekad, przeprowadzone badania naukowe wykazały, iż egzosomy pełnią istotną rolę w ludzkim organizmie. Mnogość ich funkcji dotyczy nie tylko stanu fizjologii, lecz również i choroby, dlatego świat medycyny otwarty jest na korzyści, jakie można osiągnąć dzięki umiejętnemu posługiwaniu się tymi strukturami. Niestety, istnieje jeszcze wiele zagadnień dotyczących egzosomalnych pęcherzyków, które nadal nie są do końca poznane. Pożądane jest zbadanie ich biologicznego mechanizmu działania i bardziej szczegółowa analiza ich zawartości. Ponadto, wyzwaniem jest także opracowanie optymalnej metody izolacji populacji nanostruktur, które później można by zastosować w diagnostyce lub terapii. Na szczęście, prężnie rozwijający się postęp technologii, proteomiki czy genomiki daje nadzieję na sukces w wykorzystaniu egzosomów jako użytecznego narzędzia w medycynie.

9. Wykaz skrótów

DCs	<i>dendritic cells</i> , komórki dendrytyczne
dsDNA	<i>dual stranded DNA</i> , dwuniciowe DNA
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> , endosomalny kompleks sortujący
EVs	<i>extracellular vesicles</i> , zewnątrzkomórkowe pęcherzyki błonowe
HSP	<i>heat shock proteins</i> , białko szoku cieplnego
ILVs	<i>intraluminal vesicles</i> , pęcherzyki wewnątrz światła endosomu
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , główny układ zgodności tkankowej
miRNA	<i>micro RNA</i> , mikroRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i> , informacyjny RNA
MVBs	<i>multivesicular bodies</i> , ciała wielopęcherzykowe
PLP	<i>pyridoxal phosphate</i> , fosforan pirydoksalu
SNARE	<i>soluble N - ethylmaleimide - sensitive factor attachment protein receptor</i> , transbłonowy kompleks białkowy
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , jednoniciowe DNA
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , czynnik martwicy nowotworów

10. Bibliografia

- Zhang C, Ji Q, Yang Y, Li Q, Wang Z, Exosome: Function and Role in Cancer Metastasis and Drug Resistance, *Technol Cancer Res Treat*, 2018, 17, 1-12.
- Cai C, Koch B, Morikawa K, Suda G, Sakamoto N, Rueschenbaum S, Akhras S, Dietz J, Hildt E, Zeuzem S, Welsch C, Lange CM, Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Induce Long-Lasting Immunity Against Hepatitis C Virus Which Is Blunted by Polyunsaturated Fatty Acids, *Front Immunol*, 2018, 9, 723.
- Couto N, Caja S, Maia J, Strano Moraes MC, Costa-Silva B, Exosomes as emerging players in cancer biology, *Biochimie*, 2018, 155, 2-10.
- Bakhshian Nik A, Hutcheson JD, Aikawa E, Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification, *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4, 78.
- Xian X, Gong Q, Li C, Guo B, Jiang H, Exosomes with Highly Angiogenic Potential for Possible Use in Pulp Regeneration, *J Endod*, 2018, 44, 751-758.
- Vlaeminck-Guillem V, Extracellular Vesicles in Prostate Cancer Carcinogenesis, Diagnosis, and Management, *Front Oncol*, 2018, 8, 222.
- Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Thery C, Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses, *Traffic*, 2011, 12, 1659-1668.
- McBride JD, Rodriguez-Menocal L, Badiavas EV, Extracellular Vesicles as Biomarkers and Therapeutics in Dermatology: A Focus on Exosomes, *J Invest Dermatol*, 2017, 137, 1622-1629.
- Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA, Extracellular vesicles: roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation, *Hum Reprod Update*, 2016, 22, 182-193.
- Wojtowicz A, Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Characterization and biological role of extracellular vesicles, *Postepy Hig Med Dosw*, 2014, 68, 1421-1432.
- Wang J, Sun X, Zhao J, Yang Y, Cai X, Xu J, Cao P, Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases, *Front Pharmacol*, 2017, 8, 300.
- Urbanelli L, Magini A, Buratta S, Brozzi A, Sagini K, Polchi A, Tancini B, Emiliani C, Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate, *Genes (Basel)*, 2013, 4, 152-170.
- Stahl PD, Raposo G, Exosomes and extracellular vesicles: the path forward, *Essays Biochem*, 2018, 62, 119-124.
- Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI, Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner, *Traffic*, 2005, 6, 131-143.
- Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, Manrique-Hoyos N, Jung S, Lauterbach MA, Bakhti M, Gronborg M, Mobius W, Rhee J, Barr FA, Simons M, Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C, *J Cell Biol*, 2010, 189, 223-232.
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fangel I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas RP, Goud B, Benaroch P, Hacohen N, Fukuda M, Desnos C, Seabra MC, Darchen F, Amigorena S, Moita LF, Thery C, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat Cell Biol*, 2010, 12, 19-30; sup pp 11-13.
- Hemler ME, Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19, 397-422.
- Kharaziha P, Ceder S, Li Q, Panaretakis T, Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle, *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826, 103-111.
- Brouwers JF, Aalberts M, Jansen JW, van Niel G, Wauben MH, Stout TA, Helms JB, Stoorvogel W, Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes, *Proteomics*, 2013, 13, 1660-1666.
- Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegman AP, Leimgruber A, Moller A, Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma, *J Extracell Vesicles*, 2015, 4, 27031.
- Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J, Exosomes in Cancer Diagnostics, *Cancers (Basel)*, 2017, 9, 8.
- Wesolowska A, Piwocka K, Exosomal microRNAs as a part of the cell-cell communication in cancer, *Postepy Biochem*, 2017, 63, 110-118.
- Lu M, Xing H, Yang Z, Sun Y, Yang T, Zhao X, Cai C, Wang D, Ding P, Recent advances on extracellular vesicles in therapeutic delivery: Challenges, solutions, and opportunities, *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 119, 381-395.
- P. W, The nature and significance of platelet products in human plasma, *Br J Haematol*, 1967 13, 269-288.
- Mathivanan S, Simpson RJ, ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA, *Proteomics*, 2009, 9, 4997-5000.
- De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C, Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications, *Front Immunol*, 2015, 6, 203.
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF, Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA, *J Neural Transm (Vienna)*, 2010, 117, 1-4.
- Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, Battistelli M, Falcieri E, Battistin L, Agnati LF, Stocchi V, C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction, *Exp Cell Res*, 2010, 316, 1977-1984.
- Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z, Progress in Exosome Isolation Techniques, *Theranostics*, 2017, 7, 789-804.

30. Carretero-Gonzalez A, Otero I, Carril-Ajuria L, de Velasco G, Manso L, Exosomes: Definition, Role in Tumor Development and Clinical Implications, *Cancer Microenviron*, 2018, 11, 13-21.
31. Athman JJ, Wang Y, McDonald DJ, Boom WH, Harding CV, Wearsch PA, Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of Mycobacterium tuberculosis Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages, *J Immunol*, 2015, 195, 1044-1053.
32. Jones LB, Bell CR, Bibb KE, Gu L, Coats MT, Matthews QL, Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition, *Biomedicines*, 2018, 6.
33. Anand D, Chaudhuri A, Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications, *Mol Membr Biol*, 2016, 33, 125-137.
34. Atayde VD, Hassani K, da Silva Lira Filho A, Borges AR, Adhikari A, Martel C, Olivier M, Leishmania exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions, *Cell Immunol*, 2016, 309, 7-18.
35. Quintana JF, Babayan SA, Buck AH, Small RNAs and extracellular vesicles in filarial nematodes: From nematode development to diagnostics, *Parasite Immunol*, 2017, 39.
36. Hartmann A, Muth C, Dabrowski O, Krasemann S, Glatzel M, Exosomes and the Prion Protein: More than One Truth, *Front Neurosci*, 2017, 11, 194.
37. Masrou-Roudsari J, Ebrahimpour S, Causal role of infectious agents in cancer: An overview, *Caspian J Intern Med*, 2017, 8, 153-158.
38. Paavonen J, Karunakaran KP, Noguchi Y, Anttila T, Bloigu A, Dillner J, Hallmans G, Hakulinen T, Jellum E, Koskela P, Lehtinen M, Thoresen S, Lam H, Shen C, Brunham RC, Serum antibody response to the heat shock protein 60 of Chlamydia trachomatis in women with developing cervical cancer, *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189, 1287-1292.
39. Wu J, Yang J, Ding J, Guo X, Zhu XQ, Zheng Y, Exosomes in virus-associated cancer, *Cancer Lett*, 2018, 438, 44-51.
40. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E, Perelman LT, Melo CA, Lucci A, Ivan C, Calin GA, Kalluri R, Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis, *Cancer Cell*, 2014, 26, 707-721.
41. Cui H, Seubert B, Stahl E, Dietz H, Reuning U, Moreno-Leon L, Ilie M, Hofman P, Nagase H, Mari B, Kruger A, Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumorigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes, *Oncogene*, 2015, 34, 3640-3650.
42. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Slop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis, *Nature*, 2015, 527, 329-335.
43. Clark DJ, Fondrie WE, Yang A, Mao L, Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes, *J Proteomics*, 2016, 133, 161-169.
44. Abdouh M, Hamam D, Gao ZH, Arena V, Arena M, Arena GO, Exosomes isolated from cancer patients' sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to onc-suppressor-mutated cells, *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36, 113.
45. Liu Y, Xiang X, Zhuang X, Zhang S, Liu C, Cheng Z, Michalek S, Grizzle W, Zhang HG, Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells, *Am J Pathol*, 2010, 176, 2490-2499.
46. Giovannetti E, van der Borden CL, Frampton AE, Ali A, Firuzi O, Peters GJ, Never let it go: Stopping key mechanisms underlying metastasis to fight pancreatic cancer, *Semin Cancer Biol*, 2017, 44, 43-59.
47. Lv LH, Wan YL, Lin Y, Zhang W, Yang M, Li GL, Lin HM, Shang CZ, Chen YJ, Min J, Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses *in vitro*, *J Biol Chem*, 2012, 287, 15874-15885.
48. Wen SW, Sceneay J, Lima LG, Wong CS, Becker M, Krumeich S, Lobb RJ, Castillo V, Wong KN, Ellis S, Parker BS, Moller A, The Bio-distribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer-Derived Exosomes, *Cancer Res*, 2016, 76, 6816-6827.
49. Klubi J, Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, Rubinstein E, Le Moulec S, Guigay J, Hirashima M, Guemira F, Adhikary D, Mautner J, Busson P, Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells, *Blood*, 2009, 113, 1957-1966.
50. Soderberg A, Barral AM, Soderstrom M, Sander B, Rosen A, Redox-signaling transmitted in trans to neighboring cells by melanoma-derived TNF-containing exosomes, *Free Radic Biol Med*, 2007, 43, 90-99.
51. Song J, Chen X, Wang M, Xing Y, Zheng Z, Hu S, Cardiac endothelial cell-derived exosomes induce specific regulatory B cells, *Sci Rep*, 2014, 4, 7583.
52. Di Bonito P, Ridolfi B, Columba-Cabezas S, Giovannelli A, Chiozzini C, Manfredi F, Anticoli S, Arenaccio C, Federico M, HPV-E7 delivered by engineered exosomes elicits a protective CD8(+) T cell-mediated immune response, *Viruses*, 2015, 7, 1079-1099.
53. Ciravolo V, Huber V, Ghedini GC, Venturelli E, Bianchi F, Campiglio M, Morelli D, Villa A, Della Mina P, Menard S, Filipazzi P, Rivoltini L, Tagliabue E, Pupa SM, Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy, *J Cell Physiol*, 2012, 227, 658-667.
54. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB, Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells, *Mol Cancer Ther*, 2005, 4, 1595-1604.
55. Rak J, Extracellular vesicles - biomarkers and effectors of the cellular interactome in cancer, *Front Pharmacol*, 2013, 4, 21.
56. Tang MK, Wong AS, Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer, *Cancer Lett*, 2015, 367, 26-33.
57. Li Y, Zheng Q, Bao C, Li S, Guo W, Zhao J, Chen D, Gu J, He X, Huang S, Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis, *Cell Res*, 2015, 25, 981-984.
58. Zhao Z, Yang Y, Zeng Y, He M, A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis, *Lab Chip*, 2016, 16, 489-496.
59. Rupp AK, Rupp C, Keller S, Brase JC, Ehehalt R, Fogel M, Moldenhauer G, Marme F, Sultmann H, Altevogt P, Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage, *Gynecol Oncol*, 2011, 122, 437-446.
60. Ye SB, Zhang H, Cai TT, Liu YN, Ni JJ, He J, Peng JY, Chen QY, Mo HY, Jun C, Zhang XS, Zeng YX, Li J, Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting FGF11 and serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma, *J Pathol*, 2016, 240, 329-340.
61. Lugini L, Cecchetti S, Huber V, Luciani F, Macchia G, Spadaro F, Paris L, Abalsamo L, Colone M, Molinari A, Podo F, Rivoltini L, Ramoni C, Fais S, Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes, *J Immunol*, 2012, 189, 2833-2842.
62. Pitt JM, Andre F, Amigorena S, Soria JC, Eggermont A, Kroemer G, Zitvogel L, Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy, *J Clin Invest*, 2016, 126, 1224-1232.
63. Li R, Chibbar R, Xiang J, Novel EXO-T vaccine using polyclonal CD4(+) T cells armed with HER2-specific exosomes for HER2-positive breast cancer, *Onco Targets Ther*, 2018, 11, 7089-7093.
64. Gilligan KE, Dwyer RM, Engineering Exosomes for Cancer Therapy, *Int J Mol Sci*, 2017, 18, 1122.
65. Agrawal AK, Aqil F, Jeyabalan J, Spencer WA, Beck J, Gachuki BW, Alhakeem SS, Oben K, Munagala R, Bondada S, Gupta RC, Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel, *Nanomedicine*, 2017, 13, 1627-1636.
66. Federici C, Petrucci F, Caimi S, Cesolini A, Logozzi M, Borghi M, D'Illo S, Lugini L, Violante N, Azzarito T, Majorani C, Brambilla D, Fais S, Exosome release and low pH belong to a framework of resistance of human melanoma cells to cisplatin, *PLoS One*, 2014, 9, e88193.
67. Jang SC, Kim OY, Yoon CM, Choi DS, Roh TY, Park J, Nilsson J, Lotvall J, Kim YK, Gho YS, Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors, *ACS Nano*, 2013, 7, 7698-7710.