

## Egzosomų biologinės savybės ir reikšmė eozinofilinės astmos patogenezėje

BIOLOGICAL PROPERTIES OF EXOSOMES AND ROLE IN EOSINOPHILIC ASTHMA PATHOGENESIS

AIRIDAS RIMKŪNAS<sup>1</sup>, ANDRIUS JANUŠKEVIČIUS<sup>1</sup>, KĘSTUTIS MALAKAUSKAS<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>LSMU MA Pulmonologijos klinika Pulmonologijos laboratorija, <sup>2</sup>LSMU MA Pulmonologijos klinika

**Santrauka.** Astma yra heterogeninė, lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga. Vienas dažniausių ir plačiausiai tiriamų astmos fenotipų, pasireiškiančių suaugusiesiems, yra eozinofilinė astma. Infiltravę kvėpavimo takus eozinofilai gausiai išskiria įvairias uždegimą skatinančias molekules – citokinus, chemokinus bei augimo veiksnius. Egzosomos – daugumos ląstelių tipų gaminamos ir išskiriamos membraninės nanopūslelės, kurių pagrindinė funkcija yra perduoti tarpląstelinius signalus į recipientines ląsteles, pernešant nukleino rūgštis, baltymus ir lipidus. Šios tarpląstelinės pūslelės pasižymi unikalia savybe pakankamai laisvai pereiti biologinius barjerus ir žemu imunogeniškumu bei toksiškumu, nes nėra linkusios kauptis atskirame organe arba audinyje. Be to, egzomasos galima išskirti iš visų biologinių skysčių, todėl jos gali būti naudojamos kaip biožymenys įvairių ligų diagnostikai ir stebėsenai. Uždegiminių ląstelių, įskaitant eozinofilus, egzosomų tyrimai yra perspektyvi sritis, kuri gali padėti suprasti astmos patogenezę ir ieškoti naujų gydymo būdų. Pagrindinis šios mokslinės apžvalgos dėmesys skiriamas išnagrinėti egzosomų biogenezę, sudėtį, funkcijas, išskyrimą, identifikavimą ir sąsajas su eozinofilinės astmos patogenezė.

**Reikšminiai žodžiai:** egzomasos, nanopūslelės, egzosominė mikroRNR, astma.

**Summary.** Asthma is a heterogeneous, chronic inflammatory airway disease. Eosinophilic asthma is one of the most commonly found phenotypes in adults. It is associated with increased eosinophil migration into the airways and inflammatory molecules – cytokines, chemokines, and growth factors, production. Exosomes are membranous nanovesicles produced and secreted by most cell types, whose primary function is to transmit intracellular signals by transporting nucleic acids, proteins, and lipids to recipient cells. These nanovesicles uniquely can travel through biological barriers and exhibit low immunogenicity and toxicity, as they do not accumulate in separate organs or tissues. In addition, exosomes can be isolated from all biological fluids and may serve as biomarkers in various disease diagnoses and monitoring. Research on exosomes of inflammatory cells, including eosinophils, is a promising field that may contribute to the comprehension of pathological mechanisms of asthma and novel therapy research. The main task of this scientific review will be to examine exosome biogenesis, composition, functions, isolation, identification, and role in eosinophilic asthma pathogenesis.

**Keywords:** exosomes, nanovesicles, exosomal microRNA, asthma.

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1485>

### IVADAS

Astma – tai lėtinė uždegiminė kvėpavimo takų liga. Remiantis uždegimo pobūdžiu, astma gali būti suskirstyta į bent du skirtingus fenotipus: eozinofilinė arba 2 tipo (T2) astma ir neeozinofilinė (neutrofilinė, mišri granulocitinė ir paucigranulocitinė) arba ne 2 tipo (ne T2) astma [1]. Labiausiai paplitęs suaugusiųjų astmos fenotipas yra T2 astma, kuriai būdinga kvėpavimo takų ir kraujo eozinofilija bei padidėjusi 2 tipo limfocitų pagalbininkų arba 2 tipo įgimtų limfoidinių ląstelių gaminamų citokinų interleukino 4 (IL-4), interleukino 5 (IL-5) ir interleukino 13 (IL-13) raiška. IL-5 reguliuoja eozinofilų diferenciaciją, aktyvinimą ir išgyvenamumą, o IL-4 ir IL-13 skatina B limfocitus gaminti imunoglobuliną (Ig) E [2]. Eozinofilai yra dominuojančios uždegiminio atsako plaučiuose ląstelės, kurios prisideda prie kvėpavimo takų struktūrinių pokyčių

bei hiperreaktyvumo. Lėtinio uždegimo sukeliama žala bronchuose yra priskiriama eozinofilų degranuliacijai, kai po eozinofilų stimuliavimo į tarpląstelinę aplinką išskiriamas eozinofilinių granulijų turinys [3]. Vis dėlto T2 žymenys dažnu atveju kinta nevienodai arba gali būti išreikšti tik iš dalies, todėl svarbu atrasti papildomus biožymenis, kurie padėtų tiksliau nustatyti vyraujančią astmos fenotipą [4].

Egzomasos – ląstelių išskiriamos nanopūslelės, sudarytos iš hidrofilišios šerdies (galinčios sąveikauti su vandens molekulėmis sudarant vandenilinius ryšius) ir dvigubo lipidų sluoksnio (ląstelės ir membranos struktūrinio pagrindo), atskiriančio egzomasos turinį nuo išorinės aplinkos. Skirtingų ląstelių linijų gaminamos egzomasos pasižymi santykinai panašia sfingolipidų, cholesterolio ir fosfatidilserino sudėtimi [5]. Egzosomų dydis svyruoja tarp 30–200 nm, o pūslelių viduje

randama įvairių molekulių – nukleino rūgščių (deoksiribonukleino rūgščių (DNR), ribonukleino rūgščių (RNR) ir mikroRNR (miRNR)), metabolitų, baltymų ir lipidų, būdingų egzosomą išskyrusiai ląstelei [6]. Egzosomos tarpląstelinėje aplinkoje pirmą kartą buvo aptiktos 1983 m. [7]. Tuo metu ląstelių išskiriamos egzomosos buvo laikomos ląstelių atliekomis, atsirandančiomis dėl ląstelių pažeidimo, arba šalutiniais ląstelių homeostazės produktais (metabolitais), kurie neturi reikšmingo poveikio greta esančioms ląstelėms. Valadi ir kt. nustatė, kad egzosomose gali būti pernešama genetinė medžiaga. Autorių teigimu, egzosominės RNR bei miRNR gali būti pernešamos į kitas ląsteles ir reguliuoti ląstelių taikinių funkcijas [8]. Egzosomų tūris yra prilyginamas eukariotinių ribosomų tūriui, todėl bendra egzosomų talpa gali būti lygi 100 baltymų arba mažiau ir lygi 10 000 nukleotidų arba mažiau. Egzosomų sudėtis yra glaudžiai susijusi su gaminančios ląstelės tipu bei reakcija į aplinkos poveikį – stimuliuojamos, diferencijuojančios arba streso veikiamos ląstelės išskirs skirtingos sudėties egzomas [9]. Šiuo metu įvairių ląstelių egzosomose nustatyta daugiau nei 4 400 baltymų, apie 200 lipidų, daugiau nei 1 600 informacinės RNR ir 750 miRNR [10]. Egzosomų galima aptikti visuose kūno skysčiuose, įskaitant kraują, seiles, šlapimą bei motinos pieną, todėl egzomosos tapo patraukliu mokslinių tyrimų objektu, kaip skystosios biopsijos analizė, įvairių ligų diagnostikai ir stebėsenai. Dar daugiau, vėžinių ląstelių egzomosos neša molekules, atspindinčias genetinius vėžinių ląstelių pokyčius, todėl jų identifikavimas skystosiose biopsijose gali tapti potencialiais biožymenimis diagnozuojant vėžį [11].

Vaistų kūrime ir pernašoje organizme šiuo metu plačiausiai tyrinėjamos liposomos ir polimerinės nanodalelės. Vis dėlto liposomų gebėjimas stabiliai cirkuliuoti ir nesikaupiti organuose išlieka neaiškus, o polimerinės nanodalelės neišsprendžia toksiškumo problemos, kai yra naudojami biologiškai neskaidūs polimerai. Ieškant naujų vaistų pernašos būdų, nemažai dėmesio pradėta skirti egzosomoms, kurios geba pereiti hematoencefalinį barjerą, išvengti degradacijos lizosomomis, pernešti medžiagas į ląstelių citoplazmą bei pasižymi žemu imunogeniškumu ir toksiškumu dėl mažo polinkio kauptis atskirame organe arba audinyje [12, 13]. Be to, egzomosos pasižymi aukštu biologiniu suderinamumu bei galimybe nukreipti jas į reikalingus audinius arba navikus per specifinius paviršiaus receptorių [14]. Kita vertus, šiuo metu stinga duomenų, kaip standartizuoti

egzosomų atskyrimo ir gryninimo metodus, padidinti jų išeigą bei stabilumą po išskyrimo.

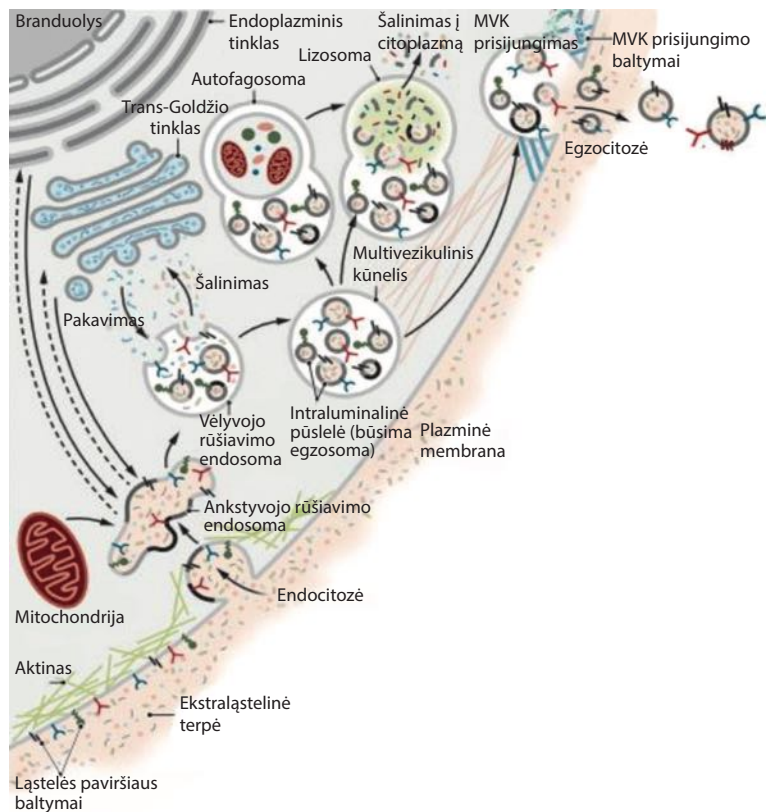
Šiame straipsnyje pateikiama trumpa egzosomų biogenezės, turinio, funkcijų, laboratorinių išgryninimo bei identifikavimo metodų ir eozinofilų kilmės egzosomų reikšmės astmos patogenezėje apžvalga.

## METODAI

Apžvalgoje pateikiama informacija, gauta iš laisvai prieinamų mokslinių periodinių leidinių „Clarivate Analytics Web of Science“, „Scopus“ ir „Springerlink“ duomenų bazėse. Informacija surinkta naudojant Nacionalinio biotechnologijų informacijos centro (NCBI) „PubMed“ ir PMC, „Google Scholar“ bei „Wiley Online Library“ paieškos sistemas. Informacijai rinkti vartoti šie reikšminiai žodžiai: eozinofilai, egzomosos, astma, 2 tipo kvėpavimo takų uždegimas, mikroRNR.

## EGZOSOMŲ BIOGENEZĖ

Egzosomų gamyba ląstelėse prasideda nuo viduląstelinio multivezikulinio kūnelio (MVK) susidarymo dvigubo plazminės membranos įlinkimo į vidų proceso metu. Pirmojo plazminės membranos įlinkimo į vidų metu susidaro puodelio formos struktūra, kuri apgaubia ląstelių paviršiaus baltymus (1 pav.). Šio proceso metu formuojasi ankstyvojo rūšiavimo endosomos – organelės, kurios rūšiuoja makromolekules ir tirpias medžiagas iš tarpląstelinės aplinkos.



1 pav. Egzosomų biogenezė. Adaptuota straipsnio autorių [6]

MVK – multivezikulinis kūnelis.

# Moksliniai darbai ir apžvalgos

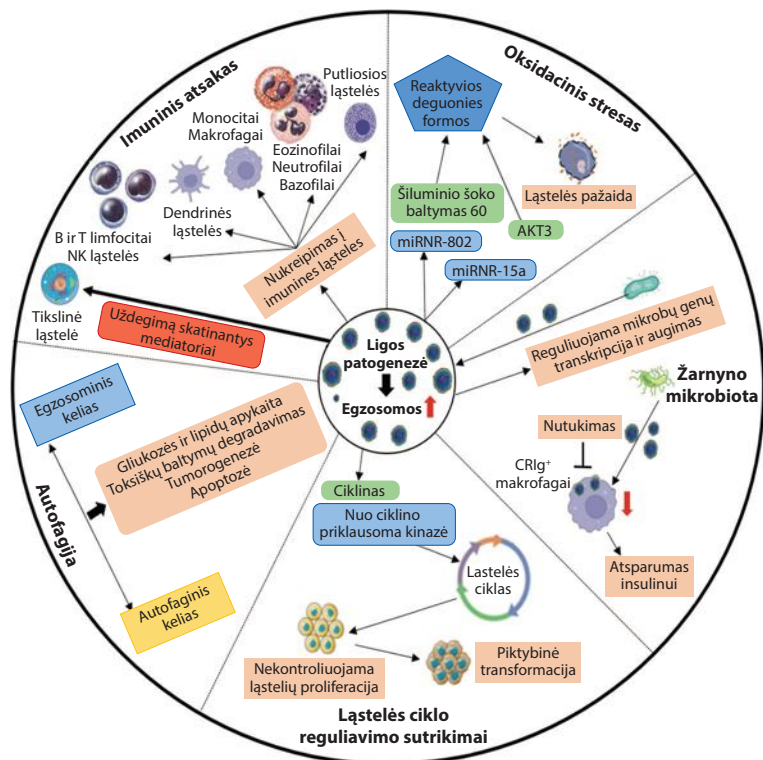
Ankstyvojo rūšiavimo endosomų pagrindinė funkcija yra pernešti medžiagas į plazminę membraną arba formuoti vėlyvojo rūšiavimo endosomas. Vėlyvojo rūšiavimo endosomos perneša medžiagas iš trans-Goldžio komplekso arba supakuoja medžiagas į intraluminalines pūsleles (ILP) ir formuoja MVK [15]. Ląstelėje susiformavę MVK gali susiliesti su lizosomomis arba autofagosomomis ir būti suskaidyti. Kitu atveju MVK gali susiliesti su ląstelės išorine plazmine membrana ir išlaisvinti viduje esančias ILP į tarpląstelinę aplinką kaip egzosomas [6].

Egzosomų formavimuisi būtinas endosominio rūšiavimo kompleksas (angl. *endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT). Endosominio rūšiavimo kompleksas – tai baltymų kompleksas, kurį galima suskirstyti į keturis mažesnius kompleksus (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III), su kuriais kartu veikia 1 tipo adozin trifosfazė (ATPazė), t. y. su vakuoliniu baltymų rūšiavimu susijęs baltymas (angl. *vacuolar protein sorting-associated protein 4*, VPS4). ESCRT-0 funkcija yra pernešamų medžiagų, priklausomų nuo ubikvitino, grupavimas, o ESCRT-I ir ESCRT-II prisideda prie endosominės membranos pumpuravimosi ir ILP susiformavimo. Galiausiai ESCRT-III reguliuoja suformuotų ILP atsiskyrimą nuo pūslelę gaminančios ląstelės plazminės membranos, po to ESCRT-III suardomas naudojant adozin trifosfatą (ATP), reakciją katalizuojant VPS4 [16]. ESCRT baltymų kompleksas nėra privalomas pirminiam ląstelės plazminės membranos įlinkimui į vidų, tačiau jis vėliau reguliuoja ILP susidarymą, užtikrindamas šio proceso veiksmingumą ir specifiškumą [17]. Antruoju būdu egzosomoms susidaryti ESCRT komplekso baltymai nereikalingi. ILP susidarymą ir egzosomų biogenezę reguliuoja šiluminio šoko baltymai (angl. *heat shock protein*, HSP), įvairūs lipidai, paviršiaus tetraspaninai, lizobisfosfatido rūgštis ir keramidai [6, 15, 17]. Lipidai gali lokalizuotis į specializuotus MVK endosominius regionus, kurie dėl lipidų sudėties formuojasi įlenkdami plazminę membraną į vidų (angl. *inward budding*) ir galiausiai sudarydami ILP.

Apibendrinant, egzosomų biogenezę sudaro keturi etapai: molekulių grupavimas į MVK, MVK formavimasis, MVK pernaša ir MVK susiliejęs su plazmine membrana. Kiekvieną egzosomų biogenezės etapą reguliuoja keli mechanizmai, priklausomai nuo pernešamos molekulės klasės (lipidai, baltymai arba nukleino rūgštys), egzosomas išskiriančios ląstelės tipo ir mikroaplinkos veiksnių.

## EGZOSOMINIŲ miRNR ĮTAKA BIOLOGINIŲ PROCESŲ REGULIAVIME

Egzosomų reikšmė tarpląstelinį signalų perdavimą dažnai atsiskleidžia per egzosominės miRNR [18]. miRNR yra vienos grandinės 19–25 nukleotidų ilgio RNR, kurią generuoja ribosinukleazės III tipo fermentas iš endogeninio transkripto, kuriame yra vietinė plaukų segtuko (angl. *hairpin*) struktūra [19]. miRNR veikia kaip orientacinė molekulė, nutildanti genus po transkripcijos, suporuodama bazes su tikslinėmis informacinėmis ribonukleino rūgštimis (iRNR), o tai lemia iRNR skilimą arba transliacines represijas. Nutildydamos įvairias tikslines iRNR, miRNR dalyvauja beveik visuose ląstelėje vykstančiuose procesuose – diferenciacijoje, vystymesi, homeostazės palaikyme. Dauguma miRNR lokusų randami baltymus koduojančių arba nekoduojančių transkripcijos vienetų introniniuose regionuose, o kiti – nekoduojančių transkripcijos vienetų egzoniuose regionuose [20]. miRNR kanoninio brendimo kelyje svarbiausios III tipo endonukleazės Drosha ir Dicer. Alternatyvaus miRNR brendimo kelio atveju vienas iš šių baltymų gali nedalyvauti procese. Nustatyta, kad dalis miRNR gali būti lokalizuotos pre-miRNR segtuką formuojančiuose intronuose, vadinamuose mirtronuose. Vietoj Drosha/DGRC8 (angl. *DiGeorge syndrome critical region 8*) komplekso mirtronus kerpa



2 pav. Egzosomų miRNR poveikio mechanizmai. Adaptuota straipsnio autorių [22]

AKT3 – serino-treonino kinazė 3 (angl. *serine/threonine kinase 3*); CRlg+ – imunoglobulino šeimai komplementarus receptoriai (angl. *complement receptor of the immunoglobulin superfamily*); miRNR – mikroribonukleino rūgštis; NK – natūralios žudikės.



sudėtingas ribonukleoproteinų kompleksas, vadinamas splaisosoma. Tokios subrendusios miRNR vadinamos mirtroninėmis miRNR [21].

Skirtingų tyrimų metu išsiaiškinta, kaip ląstelių išskiriamos egzozomos dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose (2 pav.). Egzozomos gali reguliuoti imuninį atsaką perkeldamos ir pateikdamos antigeninius peptidus, miRNR, pernešti uždegimą skatinančias molekules [22]. Virusų užkrėsta ląstelė gali perduoti virusinę miRNR į kitas neužkrėstas imunines ląsteles per egzozomas [23]. Dar daugiau, žarnyno epitelinių ląstelių išskirtos egzozomos gali patekti į bakterijas ir reguliuoti genų transkripciją bei augimą, o jų praradimas sukelia kolito paūmėjimą [24]. Viena iš makrofagų funkcijų žarnyne yra bakterijų ir jų produktų išvalymas. Tyrimo metu nustatytas CR1g<sup>+</sup> (Ig šeimai komplementarus receptorius) makrofagų populiacijos sumažėjimas nutukusiems tiriamiesiems. Dėl makrofagų stygiaus pašalinta mažiau cirkuliuojančių kenksmingų žarnyno mikroorganizmų turinčių egzozomų, kurios pasklido į tolimus audinius, ir buvo stebimas padidėjęs audinių uždegimas bei atsparumas insulinui [25]. Egzozomos taip pat dalyvauja autofagijos proceso reguliavime, kuris sutrinka įvairių vėžinių, neurodegeneracinių ir medžiagų apykaitos ligų metu [26].

Egzozomos gali prisidėti prie oksidacinio streso. Pelių modelyje nustatyta, kad kasos β-ląstelių kilmės egzozominės miR-15a gali migruoti per kraujotaką ir skatinti reaktyvių deguonies formų (RDF) gamybą aktyvindamos serino ir treonino kinazės 3 (angl. *serine/threonine kinase 3*, AKT3) signalinį kelią, taip sukeldamos tinklainės pažeidimą [27].

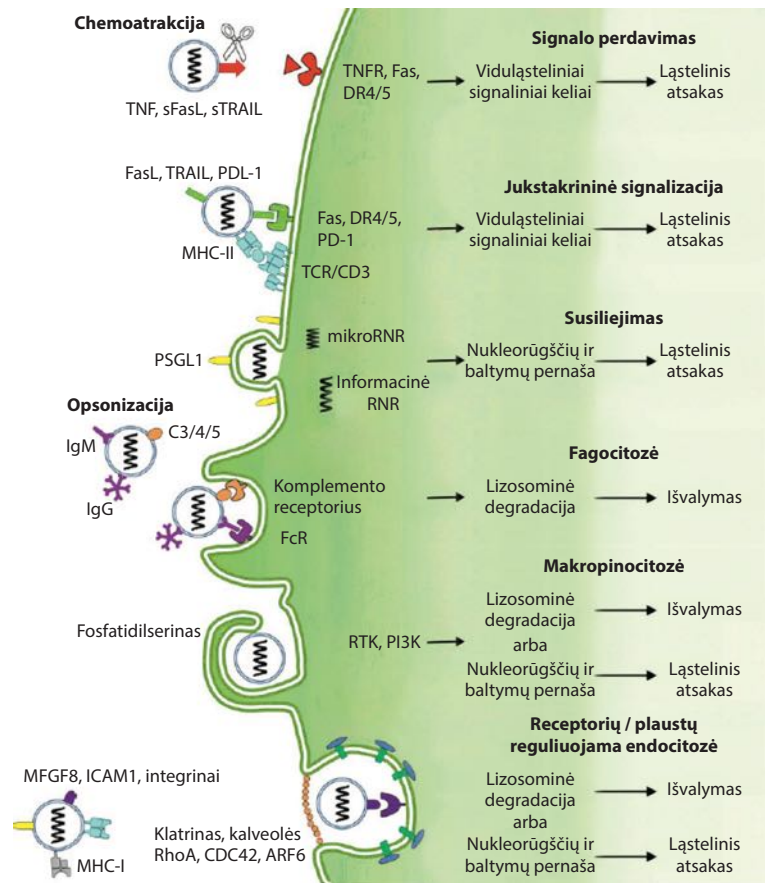
Ląstelių dauginimasis ir dalijimasis – tai viena pagrindinių ląstelių fiziologinių funkcijų. Augimo veiksniai, hormonai ir onkogenų produktai gali skatinti arba slopinti šiuos procesus. Tiriant egzozomines RNR pastebėta, kad žiedinės RNR, nutaikytos į miR-217, pagreitina ląstelių ciklą ir skatina jų proliferaciją, o minėti ląstelės ciklo sutrikimai gali sukelti piktybinę žmogaus kepenų ląstelių transformaciją [22].

## TARPLĄSTELINIŲ SIGNALŲ PERDAVIMAS EGZOSOMOMIS

Egzozomas išskiria dauguma ląstelių tipų, todėl jos gali tarpininkauti tarp vienos ir kitos ląstelės lokaliai ir sistemiskai. Pasiekusios tikslinę ląstelę, egzozomos į jų vidų gali patekti keletu būdų (3 pav.). Į ląstelę

priimtos egzozomos gali susiliesti su jau egzistuojančiomis ankstyvojo rūšiavimo endosomomis, tada suirti ir išleisti savo turinį į citoplazmą arba būti supakuotos į naujus MVK. Kitu atveju į ląstelę patekusios egzozomos gali būti suardomos lizosomų. Egzozomų įsisavinimo ir išskyrimo keliai gali persidengti, todėl ilgainiui bet kurioje ląstelėje susiformuoja mišri egzozomų populiacija, kurią sudaro ir endogeniškai pagamintos, ir į ląstelę patekusios egzozomos [6].

Egzozomos paviršiuje esantys transmembraniniai ligandai tetraspaninai, integrinai, audinių suderinamumo kompleksai (angl. *major histocompatibility complex*, MHC), tarpląstelinė adhezijos molekulė 1 (angl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) gali tiesioginiu arba nuo kontakto priklausomu (jukstra-



3 pav. Egzozomų patekimo į recipientines ląsteles būdai ir ląstelinis atsakas. Adaptuota straipsnio autorių [29]

ARF6 – adenozindifosfato-ribosilinio veiksnys 6 (angl. *adenosine diphosphate-ribosylation factor 6*); CDC42 – guanozino trifosfatazių Rho šeimos narys (angl. *cell division cycle 42*); CD3 – T ląstelių koreceptoriai (angl. *cluster of differentiation 3*); C3/4/5 – komplemento komponentai; DR4/5 – mirties receptoriai; MFGE8 – pieno riebalų lašelių epidermio augimo veiksnys 8 (angl. *milk fat globule-epidermal growth factor 8*); MHC – audinių suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*); FasL – Fas ligandas (2 tipo transmembraninis baltymas); FcR – antikūno Fc regioną atpažįstantis receptoriai; ICAM-1 – tarpląstelinė adhezijos molekulė 1 (angl. *intercellular adhesion molecule 1*); Ig – imunoglobulinas; PDL-1 – užprogramuotos ląstelės mirties baltymo 1 ligandas (angl. *programmed death-ligand 1*); PI3K – fosfoinozidido 3-kinazė (angl. *phosphoinositide 3-kinase*); PSGL-1 – P-selektino glikoproteino ligandas 1 (angl. *P-selectin glycoprotein ligand 1*); RhoA – Ras homologinių genų šeimos narys A (angl. *Ras homolog gene family member A*); RTK – receptorių tirozino kinazės (angl. *receptor-tyrosine kinases*); TCR – T ląstelių receptoriai (angl. *T cell receptor*); TRAIL – su naviko nekrozės veiksniumi susijęs apoptozę inicijuojantis ligandas (angl. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*).

# Moksliniai darbai ir apžvalgos

krininiu) signalo perdavimo būdu tiesiogiai jungtis su recipientinės ląstelės paviršiaus receptoriais ir sužadinti signalinę kaskadą, kuri suaktyvina tikslinę ląstelę. Tai yra dažnas būdas perduoti ląstelinius signalus, susijusius su imunomoduliacija ir apoptoze [28].

Ląstelės gali bendrauti su kitomis ląstelėmis gamindamos tirpias signalines molekules (cheminius tarpininkus) į aplinką ir kraujotaką. Šie tarpininkai gali būti citokinai, augimo veiksniai, hormonai, neurotransmiteriai, druskų jonai bei egzosomos. Tirpus signalo perdavimas apima proteolitinį ligandų skilimą nuo egzosominio paviršiaus ir sąveiką su ląstelių paviršiaus membranos receptoriais. Metaloproteinazėms atskėlus membraninius Fas ligandus (angl. *type I integral membrane protein*), su naviko nekrozės veiksniumi (angl. *tumor necrosis factor*, TNF) susijusį apoptozę sukeltiantį ligandą (angl. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) ir TNF susidaro tirpūs citokinai. Vieno tyrimo metu nustatyta, kad iš kraujo plazmos išskirtos egzosomos, kurių membranos paviršiuje aptikta Fas ir TRAIL ligandų raiška, sukėlė Jurkat T ląstelių apoptozę, sumažindamos transkripcijos veiksnio NF- $\kappa$ B (angl. *nuclear factor*, aktyvuotų B ląstelių branduolinio veiksnio kappa-lengvosios grandinės stipriklis), signalizacijos adapterio baltymo CD3-zeta ir peptidų pernešėjų reguliatoriaus tirozino ir baltymų kinazės (angl. *Janus kinase 3*, JAK3) raišką [29].

Pūslelių ir ląstelių susiliejimas yra procesas, kurio metu pūslelė susijungia su ląstelės plazminė membrana arba kitomis ląstelių organelėmis. Naudojant fluorescencinį lipidų maišymo ir membranos susiliejimo tyrimo metodą, nustatyta, kad monocitų kilmės nanopūslelės susilieja su aktyvuotų trombocitų plazminė membrana ir perneša audinių veiksnių ir selektino P ligandą 1 (angl. *P-selectin glycoprotein ligand 1*, PSGL-1). Egzosomos adhezijos receptoriais integrinai prisitvirtina prie ląstelės, o tetraspaninių mikrodomenai palengvina egzosomų susiliejimą. Po susiliejimo su ląstelėmis pastebėta, kad fluorescenciniais dažais pažymėtos egzosomos sąveikauja su citoplazmoje esančiomis mikropūslelėmis [29]. Manoma, kad egzosomai sąveikaujant su ląstele tirpių signalinių molekulių nuo kontakto priklausomu arba susiliejimo būdais jų pernešamos medžiagos gali patekti į citoplazmą ir sukelti ląstelinį atsaką. Vis dėlto didelis egzosomų populiacijų heterogeniškumas išlieka pagrindiniu iššūkiu aiškinantis tarpląstelinį signalo perdavimą egzosomomis.

Fagocitozė – tai organizmo gebėjimas praryti, suvirškinti ir pašalinti mikrobus, svetimkūnius ir negyvas ląsteles. Kitaip tariant, tai baltymo aktino valdomas mechanizmas, kuriam reikia specifinių opsonino receptorių – kristalizuojamo Ig molekulės fragmento (Fc) ir komplemento, šalinimo receptorių arba Toll tipo receptorių (angl. *Toll-like receptor*, TLR). Pagrindinės

fagocituojančios ląstelės yra makrofagai, neutrofilai ir dendritinės ląstelės, o šis procesas buvo pasiūlytas kaip vienas iš bendrų egzosomų patekimo į ląsteles būdų. Fagocitozė yra laipsniškas procesas, kurio metu fagocituojančių ląstelių membranos deformacijos apgaubia tarpląstelinėje aplinkoje esančias daleles ir suformuoja fagosomą. Po to fagosomos membrana susilieja su citoplazmoje esančiomis lizosomomis, susidaro fagolizosoma. Paskutinio etapo metu lizosomų granulijų hidroliziniai baltymai patenka į fagolizosomą ir suardo jos turinį. Tyrimo metu nustatyta, kad egzosomų fagocitozė priklauso nuo aktino citoskeleto, fosfoinozotido 3 kinazės (PI3K) ir dinamino 2 [30]. Šiuo metu stinga duomenų, ar fagocitozė yra tik ląstelių atliekų pašalinimo procesas, ar tai gali būti laikoma dar vienu egzosomų tarpląstelinio ryšio perdavimo būdu.

Receptorių reguliuojamai endocitozei reikalingas ligandas egzosomos paviršiuje, kuris susijungtų su specifiniais ląstelės plazminės membranos receptoriais. Tai dar vadinama klatrino sukelta endocitoze, kurios metu susidaro klatrino ir kitų baltymų kompleksai, padengiantys membraną ir skatinantys membranos įlinkimą į vidų, formuojant pūslelę. Egzosomų endocitozė gali būti reguliuojama lipidinių „plaustų“ (angl. *lipid rafts*). Tai gyvūnų ląstelių plazminėje membranoje esantys dinaminiai ir heterogeniniai mikrodomenai, sudaryti iš tarpusavyje sąveikaujančių sfingolipidų ir cholesterolio, susietų vandenilinėmis jungtimis tarp angliavandenių fragmentų ir van der Valso jėgų tarp riebalų rūgščių grandinių. Iš tarpląstelinės aplinkos į ląstelę endocitozės būdu patekusios egzosomos gali būti siunčiamos į lizosomas, kuriose vyksta egzosomų suardymas arba perrūšiavimas į naujas endosomas plazminėje membranoje. Makropinocitozės metu aktino gijų suformuojami išsikišimai skatina ląstelės plazminės membranos įlinkimą į vidų, taip nespecifiškai endocituojamas tarpląstelinis skystis ir mažos dalelės. Egzosomų endocitozė nepriklausomai nuo pobūdžio – makropinocitozė arba tarpininkaujama receptorių ir lipidinių plaustų – visada lemia pūslelių pernašą į endosominį kelią, kuriame egzosomos gali būti suskaidomos lizosomų, perdirbamos ląstelėje arba išskiriamos į tarpląstelinę aplinką [28].

## EGZOSOMŲ IŠSKYRIMAS IR IDENTIFIKAVIMAS

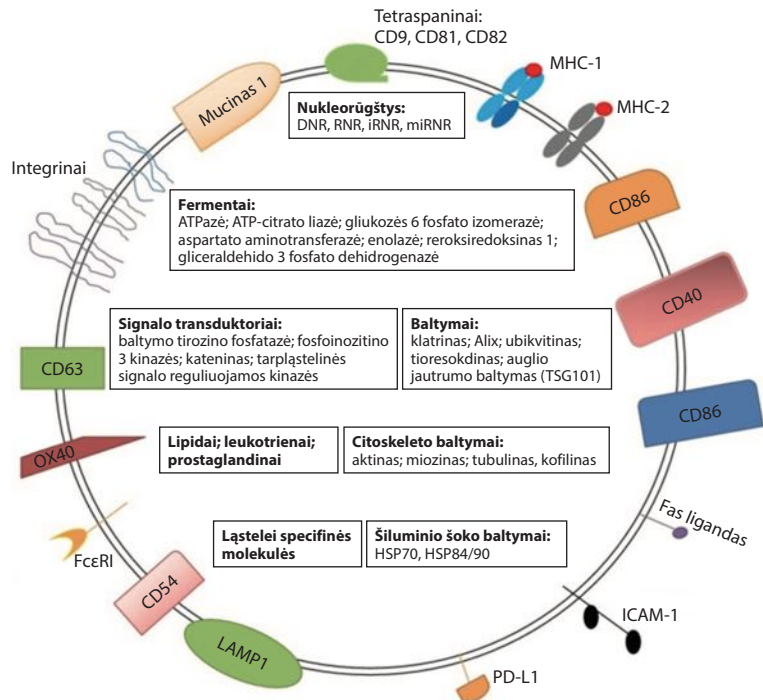
Egzosomos gali būti identifikuojamos pagal specifinius paviršiaus baltymus (4 pav.). Proteominiai tyrimai parodė, kad egzosomose yra specifinis ląstelių baltymų pogrupis, kuris priklauso nuo egzosomas išskiriančios ląstelės tipo, ir bendri baltymai iš endosomų, plazminės membranos bei citozolio [31]. Visos egzosomos dėl savo endosominės kilmės turi membraninius pernašos ir susiliejimo baltymus – guanozintrifosfatazes, adenozindifosfato ribosilino veiksnį 6 (ARF6), aneksinus, flotiliną, tetraspaninus – CD9, CD37, CD53, CD63,

CD81, CD82; HSP70, HSP90; su MVK biogeneze susijusius baltymus Alix, naviko jautrumo baltymą (TSG)-101 bei su lipidais susijusius baltymus ir fosfolipazes [5, 6, 31].

Mikroaplinka ir ląstelių tipas gali turėti įtakos egzosomų turiniui bei jų biologinių žymenų kiekiui. Šiuo metu plačiausiai naudojami egzosomų žymenys yra tetraspaninai CD9, CD63 ir CD81, Alix, flotilinas, TSG101, keramidas ir su Ras sistema susijęs baltymas Rab-5B. Pirmieji egzosomų tyrimai atlikti jas išskiriant diferenciniu ultracentrifugavimu [33]. Vėliau ultracentrifugavimo atsisakyta dėl galutinio produkto užteršimo panašaus dydžio dalelėmis, egzosominių agregatų susidarymo, brangios įrangos poreikio ir laiko kaštų [34]. Ultrafiltravimas pagrįstas membranų su specifiniu porų skersmeniu naudojimu, norint išskirti iš anksto nustatyto dydžio daleles [35]. Didesnės dalelės pašalinamos pirmiausia, naudojant filtrus, kurių porų skersmuo yra 0,8 ir 0,45 μm, todėl lieka gana daug egzosomų turintis filtratas. Pabrėžtina, jog ultrafiltracija turi mažesnę egzosomų išeigą ir grynumą, o RNR ir miRNR kokybė yra prastesnė, palyginti su ultracentrifugavimu.

Naujesni išskyrimo metodai paremti egzosomų paviršiuje esančiais specifiniais receptoriais, naudojant šių baltymų (antigenų) ir jų antikūnų imunoafinę sąveiką. Dažniausiai naudojami antikūnai sujungti su magnetiniais rutuliukais prieš specifinius egzosomų paviršiaus žymenis tetraspaninus CD9, CD63 ir CD81. Naudojant magnetinį lauką, mėginys su egzosomomis yra praleidžiamas per kolonėlę su porėtu filtru. Magnetine žyme pažymėtos egzosomos yra sulaikomos kolonėlės magnetiniame lauke. Galiausiai kolonėlė pašalinama iš magnetinio stovo ir išplaunama elucijos buferiu. Kiti egzosomų išskyrimo metodai apima mikroskysčių technologijas, dydžio išskyrimo chromatografiją, komercinius egzosomų precipitacijos rinkinius [36].

Egzosomoms patvirtinti mėginiuose dažniausiai naudojami specialūs mikroskopavimo instrumentai, pvz., „Nanosight“ („Malvern Panalytical“, Jungtinė Karalystė), arba transmisijos elektronų mikroskopija (TEM), kuriais galima vertinti egzosomas pagal jų dydį bei ultrastruktūras [37]. Egzosomas taip pat galima aptikti naudojant specifinius antikūnus prieš minėtus egzosomų paviršiaus baltymus tėkmės citometrijos ir imunofermentinės (ELISA) analizės metodais arba identifikuoti specifinius egzosomų baltymus WesternBlot metodu. Pavienių egzosomų identifika-



4 pav. Egzosomų sudėties bei paviršiaus žymenų apžvalga. Adaptuota straipsnio autorių [32]

ATP – adenozintrifosfatas (angl. *adenosine triphosphate*); CD – ląstelių paviršiaus žymuo (angl. *cluster of differentiation*); LAMP1 – su lizosomomis susijęs membraninis baltymas 1 (angl. *lysosomal associated membrane protein 1*); MHC – audinių suderinamumo kompleksas (angl. *major histocompatibility complex*); OX40 – navikų nekrozės veiksnio receptorių superšeimos narys (angl. *tumour necrosis factor receptor*); PD-L1 – programuotos ląstelės mirties ligandas 1 (angl. *programmed death-ligand 1*).

vimas, išskyrimas bei analizė gali suteikti reikšmingos informacijos apie egzosomų biologines savybes ir jų naudojimą imunoterapijoje bei vakcinų gamyboje [38].

## EOZINOFILO IŠSKIRIAMŲ EGZOSOMŲ BIOLOGINĖS SAVYBĖS SERGANT ASTMA

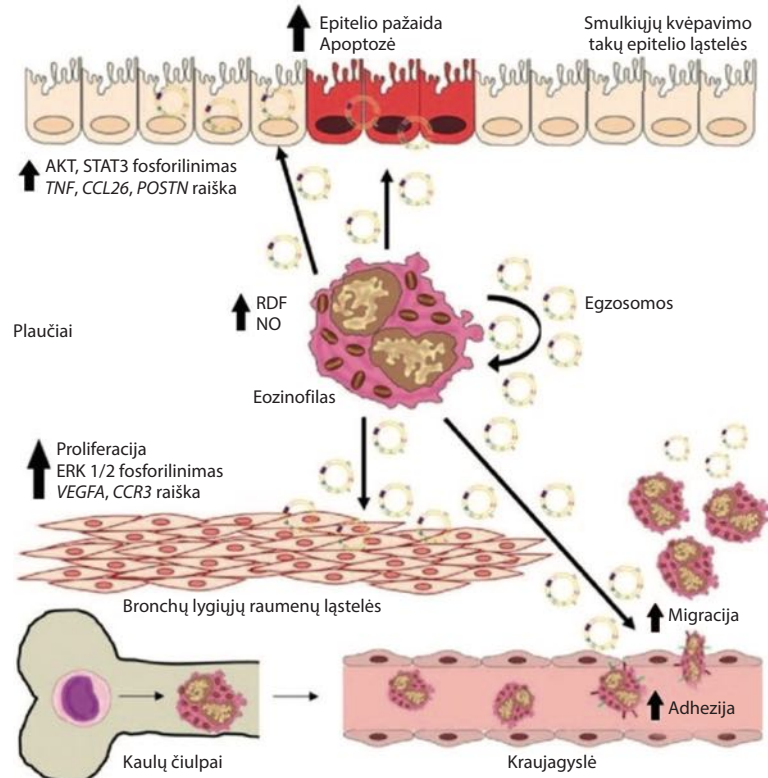
Per pastarąjį dešimtmetį sparčiai augant mokslininkų susidomėjimui įvairių ląstelių egzosomomis, dėmesys atkreiptas ir į eozinofilus. Mazzeo ir kt. pirmieji nustatė, kad eozinofiluose yra funkcionuojančių MVK, kurie susiliejimo su plazmine membrana metu į aplinką gali išskirti nanopūsles, membranos struktūra, dydžiu bei baltymais panašias į egzosomas [39]. Tyrėjų teigimu, eozinofilų citoplazmoje esantys MVK membrana gali įlįnti iš vidaus ir formuoti endosomines pūsles, o suformuotas pūsles išskirti į aplinką. Šios pūslelės pasižymi egzosomoms būdinga paviršiaus tetraspaninų CD9, CD63 bei Alix baltymų raiška, o proteominė masių spektrometrinė analizė rodo, kad eozinofilų egzosomų turinys panašus į eozinofilų antrinių granulių specifinius baltymus. Kiekybinių eozinofilų baltymų skirtumų egzosomose tarp sergančiųjų astma ir sveikų asmenų nenustatyta, tačiau sergančiųjų astma eozinofilų egzosomų gamyba buvo reikšmingai didesnė, todėl egzosomos galėtų tapti potencialiais biožymenimis sergant astma [39].



# Moksliniai darbai ir apžvalgos

Kita tyrėjų komanda vertino sergančiųjų astma kraujo eozinofilų egzosomų poveikį plaučių struktūrinėms ląstelėms kompleksinių kultūrų modelyje *in vitro* [40]. Tyrimo metu nustatyta, kad sergančiųjų astma eozinofilų išskirtos egzosomos gali prisidėti prie kvėpavimo takų pažeidimo, veikiant plaučių struktūrinių ląstelių biologines savybes bei baltymų gamybą (5 pav.). Po inkubacijos su sergančiųjų astma eozinofilų egzosomomis smulkiųjų kvėpavimo takų epitelio ląstelių apoptozė, uždegiminių žymenų genų raiška bei signalinio keitiklio ir transkripcijos aktyvatoriaus 3 (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) ir baltymų kinazės B signalinio kelio fosforilimas reikšmingai padidėjo [40]. Be to, sergančiųjų astma eozinofilų egzosomos skatino bronchų lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją, taip prisidedant prie kvėpavimo takų remodeliacijos vystymosi.

Nustatius, kad sergančiųjų astma eozinofilų egzosomų gamyba yra reikšmingai padidėjusi, atliktas tyrimas, siekiant išsiaiškinti, ar eozinofilų išskiriamos egzosomos gali autokrininiu būdu reguliuoti pačių eozinofilų biologines funkcijas [41]. Tyrimo metu vertinta eozinofilų adhezija, adhezijos molekulių raiška, apoptozė, migracija bei RDF gamyba po inkubacijos su sveikų arba astma sergančių asmenų eozinofilų egzosomomis. Nustatyta, kad eozinofilų išskiriamos egzosomos turi chemotaktinį poveikį, skatina eozinofilų adheziją bei didina adhezijos molekulių ICAM-1 ir integrino  $\alpha 2$  raišką [41]. RDF yra svarbus imuninei sistemai, palaikant redukcijos ir oksidacijos reakcijų pusiausvyrą bei yra susiję su įvairių ląstelių signalinių kelių aktyvavimu: išsiskleidusio baltymo atsaku (angl. *unfolded protein response*, UPR) bei KEAP1-NRF2 (angl. *Kelch-like ECH-associated protein – erythroid-derived 2-related factor 2*) signaliniu keliu [42]. Endoplazminio tinklo oksidacinis stresas – tai ląstelės būklė, kai dėl endoplazminio tinklo funkcinių pokyčių pradeda kauptis išsiskleidę arba netinkamai sulankstyti baltymai. Endoplazminio tinklo stresas suaktyvina UPR signalinį kelią – adaptyvią reakciją, kuri sumažina išsiskleidusių baltymų kiekį, kad išlaikytų ląstelių gyvybingumą ir funkciją [43]. KEAP1-NRF2 signalinis kelias yra pagrindinis ląstelių apsaugos nuo RDF ir elektrolitų sukeliama oksidacinio streso reguliatorius [44]. Eozinofilinės kilmės egzosomos skatina autokrinę deguonies radikalų gamybą eozinofiluose [41], taip prisidedant prie kvėpavimo takų hiperreaktyvumo bei oksidacinio streso audiniuose.



5 pav. Eozinofilų egzosomų reikšmė sergant astma. Adaptuota straipsnio autorių [40]

AKT – serino ir treonino kinazė (angl. *serine/threonine kinase 1*); CCL26 – eotaksinas 3 (angl. *C-C motif chemokine ligand 3*); CCR3 – C-C chemokino receptoriaus 3 (angl. *C-C chemokine receptor 3*); ERK – tarpląstelinė signalo reguliuojama kinazė (angl. *Extracellular signal-regulated kinase*); NO – azoto oksidas; POSTN – periostinas (angl. *Periostin*); RDF – reaktyvos deguonies formos (angl. *Reactive oxygen species*); STAT3 – signalinio keitiklio ir transkripcijos 3 aktyvatorius (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*); TNF – naviko nekrozės veiksnys (angl. *tumour necrosis factor*); VEGFA – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (angl. *vascular endothelial growth factor A*).

Įvertinus eozinofilų egzosomų dydį, skirtumų tarp sergančiųjų astma ir sveikų asmenų nenustatyta: abiejų grupių egzosomų dydis buvo apie 175 nm, o kito tyrimo atveju – apie 162 nm [40, 42]. Atlikus eozinofilų egzosomų turinio analizę, masių spektrometrijos ir Western blot metodais nustatyti pagrindiniai eozinofilų antrinių granulių citotoksiniai baltymai: eozinofilų peroksidazė (angl. *eosinophils peroxidase*, EPO), eozinofilų katijoninis baltymas (angl. *eosinophils cationic protein*, ECP) ir pagrindinis bazinis baltymas (angl. *major basic protein*, MBP), periostinas bei keliasdešimt kitų baltymų, susijusių su adhezija, ląstelės signalo reguliavimu, redukcijos ir oksidacijos reakcijomis, uždegimu ir metabolizmu.

Įrodyta, kad egzosomos, kurios yra viena iš mažiausių tarpląstelinė pūslelių, išsiskiriančių iš ląstelių, turi skirtingas nukleorūgštis, įskaitant miRNR. miRNR gali reguliuoti ląstelių augimą ir metabolizmą, slopindamos genų raišką po transkripcijos. miRNR moduliuoja tiek pirminį, tiek antrinį imuninį atsaką, o miR-21, miR-146a ir miR-155 yra įvardijamos kaip pagrindinės imuninio atsako miRNR astmos patogenezėje

[45]. Be to, taikant naujos kartos sekoskaitos analizę nustatyta, kad cirkuliuojančių egzosominių miR-128, miR-140-3p, miR-196b-5p ir miR-486-5p raiška buvo reikšmingai didesnė sergant sunkia astma, palyginti su sveikais asmenimis [46]. Kiekviena miRNR gali taikytis į skirtingą genų skaičių, dėl šios priežasties bet kokie miRNR lygio pokyčiai gali paveikti daugelį signalinių kelių ir reikšmingai prisidėti prie ligos patogenezės [47]. Šiuo metu stinga duomenų apie miRNR, esančias neseniai identifikuojuose skirtinguose eozinofilų potipiuose [48] bei jų gaminamose egzosomose. Šie tyrimai reikšmingai prisidėtų prie ligos patogenezėje dalyvaujančių molekulinų signalinių kelių išaiškinimo bei terapinių taikinių ir biožymenų paieškos sergant astma.

Taigi, eozinofilų išskiriamos egzosomos gali reguliuoti tiek pačių eozinofilų biologines funkcijas, tiek veikti kitas struktūrines ląsteles, taip prisidėdamos prie patofiziologinių mechanizmų vystymosi bei palaikymo.

## APIBENDRINIMAS

Egzosomos – svarbus tarpląstelinio bendravimo būdas tarp to paties arba skirtingo tipo ląstelių, kuriomis gali būti perduodamos įvairios signalinės molekulės. Ląstelių sąveika su egzosomomis gali sukelti įvairius stimuliuojančius arba slopinančius funkcinis pokyčius, susijusius su išgyvenamumu, proliferacija, angiogeneze, žaizdų gijimu, genų transkripcija, metabolitų reguliacija, apoptoze, mediatorių gamyba, imuninės sistemos reguliavimu, ląstelių migracija, invazyvumu bei metastazavimu. Minėtos savybės pabrėžia egzosomų reikšmę skirtingų ligų patogenezėje, o jų tyrimai gali padėti įgyti naujų terapinių metodų išvalgų. Sergant astma, eozinofilų išskiriamos egzosomos veikia uždegiminę mikroaplinką bei pačius eozinofilus, o tai gali sukelti simptomų paūmėjimą arba palengvėjimą. Egzosomų tyrimai iš įvairių biologinių mėginių gali suteikti reikšmingos informacijos apie vyraujančius patofiziologinius mechanizmus sergant astma bei kitomis ligomis.

Gauta 2024 08 21  
Priimta 2024 08 27

## LITERATŪRA

- Hussain M, Liu G. Eosinophilic asthma: pathophysiology and therapeutic horizons. *Cells*. 2024;13(5):384.
- Ricciardolo FLM, Sprio AE, Baroso A, Gallo F, Riccardi E, Bertolini F, et al. Characterization of T2-low and T2-high asthma phenotypes in real-life. *Biomedicines*. 2021;9(11):1684.
- Nakagome K, Nagata M. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation. *Front Immunol*. 2018;9:2220.
- Frossing L, Klein DK, Hvidtfeldt M, Obling N, Telg G, Erjefält JS, et al. Distribution of type 2 biomarkers and association with severity, clinical characteristics and comorbidities in the BREATHE real-life asthma population. *ERJ Open Res*. 2023;9(2):00483–2022.
- Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res*. 2019;60(1):9–18.
- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977.
- Harding CV, Heuser JE, Stahl PD. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J Cell Biol*. 2013;200(4):367–71.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654–9.
- Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol*. 2018;9:738.
- Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:D1241–4.
- Aqil F, Gupta RC. Exosomes in cancer therapy. *Cancers*. 2022;14(3):500.
- Giacobino C, Canta M, Fornaguera C, Borrós S, Cauda V. Extracellular vesicles and their current role in cancer immunotherapy. *Cancers*. 2021;13(9):2280.
- Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in Danio rerio. *Pharm Res*. 2015;32(6):2003–14.
- Patil SM, Sawant SS, Kunda NK. Exosomes as drug delivery systems: a brief overview and progress update. *Eur J Biopharm*. 2020;154:259–69.
- Hu Y-B, Dammer EB, Ren R-J, Wang G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Trans Neurodegener*. 2015;4(1):18.
- Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;29:116–25.
- Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(4):452–7.
- Bhorne R, Del Vecchio F, Lee GH, Bullock MD, Primrose JN, Sayan AE, et al. Exosomal microRNAs (exomiRs): small molecules with a big role in cancer. *Cancer Lett*. 2018;420:228–35.
- Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1202–7.
- Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376–85.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130(1):89–100.
- Li C, Ni YQ, Xu H, Xiang QY, Zhao Y, Zhan JK, et al. Roles and mechanisms of exosomal non-coding RNAs in human health and diseases. *Signal Transduct Target. Ther*. 2021;6(1):383.
- Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(14):6328–33.
- Liu S, da Cunha AP, Rezende RM, Cialic R, Wei Z, Bry L, et al. The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA. *Cell Host Microbe*. 2016;19(1):32–43.
- Luo Z, Ji Y, Gao H, Gomes Dos Reis FC, Bandyopadhyay G, Jin Z, et al. CR1g(+) macrophages prevent gut microbial DNA-containing extracellular vesicle-induced tissue inflammation and insulin resistance. *Gastroenterology*. 2021;160(3):863–74.
- Xu J, Camfield R, Gorski SM. The interplay between exosomes and autophagy – partners in crime. *J Cell Sci*. 2018;131(15).
- Kamalden TA, Macgregor-Das AM, Kannan SM, Dunkerly-Eyring B, Khaliddin N, Xu Z, et al. Exosomal microRNA-15a transfer from the pancreas augments diabetic complications by inducing oxidative stress. *Antiox Redox Signal*. 2017;27(13):913–30.
- Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021;19(1):47.
- McKelvey KJ, Powell KL, Ashton AW, Morris JM, McCracken SA. Exosomes: mechanisms of uptake. *J Circ Biomark*. 2015;4:7.
- Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010;11(5):675–87.



# Moksliniai darbai ir apžvalgos

31. Kugeratski FG, Hodge K, Lilla S, McAndrews KM, Zhou X, Hwang RF, et al. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol.* 2021;23(6):631–41.
32. Mortaz E, Alipoor SD, Varahram M, Jamaati H, Garssen J, Mumby SE, et al. Exosomes in severe asthma: update in their roles and potential in therapy. *Biomed Res Int.* 2018;2018:2862187.
33. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018;7(1):1535750.
34. Linares R, Tan S, Gounou C, Arraud N, Brisson AR. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2015;4:29509.
35. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: general methodologies and latest trends. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8545347.
36. Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman M, Singh S, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep.* 2019;9(1):5335.
37. Soo CY, Song Y, Zheng Y, Campbell EC, Riches AC, Gunn-Moore F, et al. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. *Immunology.* 2012;136(2):192–7.
38. Santos P, Almeida F. Exosome-based vaccines: history, current state, and clinical trials. *Front Immunol.* 2021;12:711565.
39. Mazzeo C, Cañas JA, Zafra MP, Rojas Marco A, Fernández-Nieto M, Sanz V, et al. Exosome secretion by eosinophils: a possible role in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(6):1603–13.
40. Cañas JA, Sastre B, Rodrigo-Muñoz JM, Fernández-Nieto M, Barranco P, Quirce S, et al. Eosinophil-derived exosomes contribute to asthma remodelling by activating structural lung cells. *Clin Exp Allergy* 2018;48(9):1173–85.
41. Cañas JA, Sastre B, Mazzeo C, Fernández-Nieto M, Rodrigo-Muñoz JM, González-Guerra A, et al. Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *J Leukoc Biol.* 2017;101(5):1191–9.
42. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(12):2977–92.
43. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Ant Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):89–102.
44. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 2013;1(1):45–9.
45. Sharma R, Tiwari A, McGeachie MJ. Recent miRNA research in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2022;22(12):231–58.
46. Suzuki M, Konno S, Makita H, Shimizu K, Kimura H, Kimura H, et al. Altered circulating exosomal RNA profiles detected by next-generation sequencing in patients with severe asthma. *Eur Respir J.* 2016;48(60):PA3410.
47. Alipoor SD, Adcock IM, Garssen J, Mortaz E, Varahram M, Mirsaedi M, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2016;791:395–404.
48. Kanda A, Yun Y, Bui DV, Nguyen LM, Kobayashi Y, Suzuki K, et al. The multiple functions and subpopulations of eosinophils in tissues under steady-state and pathological conditions. *Allergol Int.* 2021;70(1):9–18.