

УДК 615.035:615.038:615.012.8

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-343-356>

Обзор | Review



Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стромальными клетками, для терапии острого респираторного дистресс-синдрома: обзор доклинических и клинических исследований

А.И. Куралесова, А.Г. Грошева, Е.Н. Генкина, И.Б. Есмагамбетов 

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098,
Российская Федерация

✉ Есмагамбетов Ильяс Булатович; esmagambetov@gamaleya.org

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В период пандемии COVID-19 диагноз острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) констатировали у 15–33% пациентов, госпитализированных с заболеваниями легких. Вследствие возросших показателей больничной летальности и недостаточной эффективности существовавших на тот момент лекарственных средств возникла необходимость применения терапии мезенхимальными стромальными клетками (МСК). Содержащиеся в секрете МСК экзосомы обладают регенеративной активностью, как и МСК, причем введение последних может быть сопряжено с риском тромбообразования. Обнадёживающие результаты доклинических испытаний препаратов на основе экзосом обуславливают их клиническое применение. Анализ актуальных данных по безопасности и эффективности инновационных препаратов на основе экзосом позволит выработать протоколы получения, хранения, транспортировки, а также оптимальные схемы применения препаратов для бесклеточной терапии ОРДС и других заболеваний легких.

ЦЕЛЬ. Анализ результатов доклинических и клинических исследований безопасности и эффективности препаратов на основе экзосом, продуцируемых МСК и предназначенных для бесклеточной терапии ОРДС и других заболеваний легких в качестве альтернативы медикаментозному лечению.

ОБСУЖДЕНИЕ. Экзосомы, важнейший компонент секретомов различных клеток, осуществляют горизонтальный перенос генетической информации и биологически активных молекул. В доклинических испытаниях установлено, что полученные из секрета МСК экзосомы обладают выраженными регенеративными свойствами, схожими с МСК, и имеют ряд преимуществ: малые размеры, исключающие тромбообразование в легочных капиллярах; проникновение через гематоэнцефалический барьер; отсутствие тератогенности; обеспечение обмена эпигеномной информацией при межклеточных взаимодействиях. Введение препаратов на основе экзосом способствует регенерации поврежденной легочной ткани при ОРДС и других заболеваниях легких. Клинические исследования подтвердили безопасность и эффективность препаратов при ингаляционном, внутривенном или сочетанном введении. Эффективность препаратов может быть повышена при совместном применении экзосом с МСК или при использовании экзосом, обогащенных гликопротеином CD24 (ключевая молекула врожденного иммунитета). Препараты на основе экзосом купируют ОРДС и другие заболевания легких благодаря своей регенеративной и иммуномодулирующей активности, а также способности снижать уровень «цитокинового шторма» и апоптоза и рассматриваются как перспективная бесклеточная (cells free) терапевтическая стратегия в лечении ОРДС.

© А.И. Куралесова, А.Г. Грошева, Е.Н. Генкина, И.Б. Есмагамбетов, 2025

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Проведенный анализ данных доклинических и клинических исследований свидетельствует о высокой эффективности терапевтического действия препаратов на основе экзосом, однако целесообразны дальнейшие исследования безопасности препаратов и определения оптимальных схем лечения ОРДС.

Ключевые слова: ОРДС; острый респираторный дистресс-синдром; МСК; мезенхимальные стромальные клетки; экзосомы; экзосомальная терапия; везикулы; доклинические исследования; клинические исследования; регенерация; врожденный иммунитет; COVID-19; секретом

Для цитирования: Куралесова А.И., Грошева А.Г., Генкина Е.Н., Есмагамбетов И.Б. Экзосомы, продуцируемые мезенхимальными стромальными клетками, для терапии острого респираторного дистресс-синдрома: обзор доклинических и клинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(3):343–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-343-356>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России «Разработка технологической платформы на основе экзосом, продуцируемых костно-мозговыми мезенхимальными стволовыми клетками человека, для создания средств терапии острого респираторного дистресс-синдрома», регистрационный номер 1023022100011-3.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Mesenchymal stromal cell-derived exosomes for acute respiratory distress syndrome treatment: A review of preclinical and clinical trials

Albina I. Kuralesova, Alla G. Grosheva, Elena N. Genkina, Ilias B. Esmagambetov✉

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

✉ Ilias B. Esmagambetov; esmagambetov@gamaleya.org

ABSTRACT

INTRODUCTION. During the COVID-19 pandemic, acute respiratory distress syndrome (ARDS) was diagnosed in 15–33% of patients hospitalised for pulmonary diseases. Hospital mortality rates increased. The existing medicinal products lacked effectiveness. Thus unconventional treatment methods were needed, such as mesenchymal stromal cell (MSC) therapy. The risk of blood clotting in the lung vessels after MSC injection made exosomes from MSC secretome a therapy of choice. Exosomes cross the blood-brain barrier and have regenerative effect similar to that of MSC. The promising results of preclinical trials for exosome-based drugs have stimulated their clinical use. Analysing their safety and effectiveness will allow us to develop protocols for their production, storage, and transportation, as well as optimal dose regimens for cell-free therapy of ARDS and other pulmonary diseases.

AIM. This study aimed to analyse performed preclinical and clinical studies on safety and efficacy of MSC-derived exosome drugs intended for cell-free ARDS therapy and other pulmonary diseases as an alternative to drug therapy.

DISCUSSION. Exosomes, the most important secretome element in various cells, carry out horizontal transfer of genetic information and bioactive molecules. Animal models show that exosomes obtained from MSC secretome have regenerative abilities similar to MSC and offer various advantages: small size excluding blood clotting in the pulmonary capillaries; ability to penetrate blood-brain barrier, non-teratogenicity, and exchange of epigenomic information in cell-cell interactions. Preclinical *in vivo* studies have shown that exosomes affect regeneration of damaged lung tissue in ARDS and other lung diseases. Clinical trials have confirmed safety and effectiveness of inhalation, intravenous or combined administration. Drug effectiveness can be increased by combining exosomes with MSC or enriching them with CD24 (key molecule of innate immunity). Due to regenerative, immunomodulatory properties of exosomes, their ability to reduce the level of cytokine storm and apoptosis, they are used to treat ARDS and

other lung diseases. Exosome preparations reverse ARDS and other diseases due to their regenerative and immunomodulatory effect, and ability to reduce cytokine storm and apoptosis. Thus exosomes are recognised as a new effective cell-free therapy.

CONCLUSIONS. Therapeutic effect of exosome-based preparations was analysed in experimental, preclinical, and clinical trials; however, further trials are required to determine ARDS safety and optimal treatment regimens.

Keywords:

ARDS; acute respiratory distress syndrome; MSCs; mesenchymal stem cells; exosomes; exosomal therapy; vesicles; preclinical trials; clinical trials; regeneration; innate immunity; COVID-19; secretome

For citation:

Kuralesova A.I., Grosheva A.G., Genkina E.N., Esmagambetov I.B. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes for acute respiratory distress syndrome treatment: A review of preclinical and clinical trials. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(3):343–356. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-25-3-343-356>

Funding. The study was carried out as a part of the State Assignment of the Federal State Budgetary Institution National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation "Development of a technological platform based on exosomes produced by human bone marrow mesenchymal stem cells to obtain therapeutics for the treatment of acute respiratory distress syndrome", registration No. 1023022100011-5.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время приобретает актуальность исследование стратегий лечения острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), который развивается вследствие различных причин (бактериальные или вирусные пневмонии, сепсис, травмы грудной клетки, отравление газами и др.) [1]. ОРДС – воспалительное альвеолярное поражение легких, характеризующееся повышением проницаемости альвеолокапиллярной мембраны. При этом формируется некардиогенный отек легких, снижается количество вентилируемых альвеол как следствие отсутствия сурфактанта [2, 3]. По мере развития воспалительного процесса возникает реакция иммунной системы по типу «цитокинового шторма», выделение провоспалительных цитокинов, биологически активных веществ в отношении сосудистой стенки, клеток – эффекторов субстанций, приводящих к повреждению альвеолоцитов и эндотелиоцитов, появлению аутореактивных клонов плазматических клеток, разрушающих клетки эпителия, и экссудативному воспалению, вследствие чего повышается летальность [4]. При развитии цитокинового шторма патогенез ОРДС быстро достигает наибольшей выраженности, что ведет к нарушению функционирования механизмов цитотоксичности клеток. ОРДС плохо поддается неспецифическому лечению. В клиниках часто ограничиваются предотвращением некардиогенного отека, используют различные методы вентилиации легких, оксигенации для уменьшения гипоксии и другие методы купирования полифункциональной недостаточности.

Н. Ху с соавт. обратили внимание на то, что изменчивость результатов применения терапии в клинике обусловлена существованием двух типов ОРДС: первичного – «легочного» и вторичного – «внелегочного», который, в свою очередь, разделен на два подтипа. Деление ОРДС на группы и подгруппы основано на клинических, биологических, рентгенологических и генетических критериях и необходимо для определения фенотипа ОРДС и выбора стратегии эффективного лечения пациентов [5]. До сих пор не хватает специфических лекарственных препаратов (гормоны, антибиотики, сурфактанты), которые при этом недостаточно эффективны и не приводят к полноценному восстановлению легких.

По данным Росстата¹, с 2010 по 2019 гг. в России отмечался рост первичной заболеваемости бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). С конца 2019 г. ОРДС констатировали у 15–33% пациентов, госпитализированных с диагнозом COVID-19, что увеличило социальную и экономическую нагрузку на отделения интенсивной терапии. Разрушительное воздействие ОРДС на организм можно сравнить с последствиями злокачественных опухолей, СПИДа, обширного инфаркта [6, 7]. Были предприняты попытки использовать в лечебных целях сыворотку переболевших пациентов (реконвалесценты) и специфических антител [8]. Определенные успехи были достигнуты при применении КОВИД-глобулина. Результаты проведенных исследований показали, что «эффективность КОВИД-глобулина в дозе 1 мл/кг на фоне применения стандартной терапии превосходит

¹ <https://rosstat.gov.ru/statistic>

эффективность плацебо при лечении пациентов со среднетяжелым течением COVID-19» [9]; «назначение КОВИД-глобулина рекомендовано в дозе 1 мл/кг по принципу «чем раньше, тем лучше», но не позже 7 сут заболевания, однако противопоказано при развившемся цитокиновом шторме ранее 7 сут заболевания» [9].

Новым этапом лечения заболеваний, плохо поддающихся воздействию стандартными лекарственными препаратами, стало применение клеточной терапии. Открытие стволовых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в костном мозге (КМ) [10], жировой и других тканях [11], разработка метода получения диплоидных штаммов этих полипотентных клеток [12], изучение их дифференцировочной потенции [13] создали возможность использования МСК для восстановления поврежденных тканей [14]. Положительные результаты доклинических экспериментов обусловили трансляцию клеточной терапии в клиническую практику. На основе МСК были разработаны несколько методов для лечения заболеваний костно-мышечной системы (остеопороз) [15], аллергических [16], неврологических (болезнь Паркинсона) [17], онкологических (инвазивный рак мочевого пузыря) [18] и других заболеваний [19]. Был создан препарат NestCell® для лечения пациентов с тяжелой формой пневмонии, вызванной COVID-19² [20].

В предыдущие годы результаты экспериментов на животных [21, 22] и результаты клинических исследований [23–25] продемонстрировали, что МСК и секретом культур МСК³ могут значительно снизить воспалительный процесс и связанные с ним патологические нарушения, вызванные COVID-19 и другими инфекционными заболеваниями легких. Регенерация поврежденной ткани легких при введении МСК происходит за счет трансдифференцировки стволовых клеток и за счет паракринного/гормонального влияния, направленного на активацию выработки противовоспалительных цитокинов. Последний механизм считается доминирующим [20, 26].

Терапия на основе МСК имеет некоторые существенные недостатки: низкую стабильность препаратов, риск тромбоэмболии легочной артерии и опухолеобразования и др. [27, 28]. Установлено, что экзосомы, выделенные из МСК, обладают такими же противовоспалительными и регенеративными свойствами, как и сами клетки [29]. Преимущества экзосом заключаются в гистосовместимости, низкой иммуногенности и онкогенности, простоте хранения и высокой

стабильности. Экзосомы обеспечивают направленную доставку лекарств в клетки реципиентов. Открытие экзосом, выделенных из секрета культивируемых МСК, стало многообещающей перспективой в лечении многих тяжелых заболеваний, в том числе и ОРДС, а также позволило применять экзосомы вместо МСК [30, 31].

Экзосомы, присутствующие во всех клетках, тканях и жидкостях организма, представляют собой наночастицы размером 50–100 нм, покрытые мембраной из липидного бислоя со связанными с ней молекулами клеточной адгезии. Экзосомы имеют ряд преимуществ перед МСК, повышающих эффективность и безопасность их применения: малые размеры; низкую иммуногенность; выраженные регенеративные свойства; отсутствие туморогенности; способность проникать через гематоэнцефалический барьер; низкий риск тромбообразования в легочных капиллярах. Экзосомы обеспечивают обмен эпигеномной информацией при межклеточных взаимодействиях. Терапевтическое действие экзосом опосредовано переносом мРНК, белков и рецепторов экзосом в поврежденные ткани [32]. К другим важным преимуществам экзосом можно отнести более простые по сравнению с МСК способы их получения и хранения при лиофилизации или глубокой заморозке, что обеспечивает качественную транспортировку без потери терапевтических свойств [33, 34].

Полученные из МСК экзосомы продемонстрировали лучший терапевтический эффект на доклинических моделях ОРДС. Введение экзосом в организм подавляло агрегацию макрофагов в легочной ткани, снижало секрецию IL-27 и уровни провоспалительных факторов и повышало выживаемость животных. Применение экзосом, полученных из МСК пуповинной крови человека, приводило к снижению уровней воспалительных факторов и окислительного стресса путем индукции аутофагии *in vivo* при остром повреждении легких, индуцированном липополисахаридами (ЛПС) [35]. Экзосомы МСК, полученные из ткани КМ, регулируя метаболическое состояние макрофагов посредством ингибирования гликолиза, подавляли поляризацию макрофагов M1, что способствовало поляризации макрофагов M2 в легочной ткани и улучшало состояние легких при ОРДС [36, 37].

Таким образом, к настоящему времени накоплен большой массив данных по применению препаратов на основе экзосом для лечения ОРДС, и систематизация этих данных позволит

² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04315987>

³ Среда культивирования клеток, содержащая белковые молекулы, ростовые факторы, везикулы, в том числе экзосомы, выделяемые клетками в среду.

более предметно оценить проблемные вопросы и перспективы их применения.

Цель работы — анализ результатов доклинических и клинических исследований безопасности и эффективности препаратов на основе экзосом, продуцируемых МСК и предназначенных для бесклеточной терапии ОРДС и других заболеваний легких в качестве альтернативы медикаментозному лечению.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Доклинические исследования терапевтического действия экзосом

Анализ результатов экспериментов на животных указал на возможности терапевтического действия экзосом при воспалительных процессах различной этиологии. Н. Deng с соавт. [36] продемонстрировали, что МСК костного мозга (КМ), обладая мощными иммуномодулирующими и иммуносупрессивными свойствами вследствие секреции экзосом, улучшали состояние поврежденных сепсисом легких. Экзосомы снижали экспрессию генов, вовлеченных в гликолиз, путем ингибирования фактора транскрипции HIF-1 α . Интратрахеальное введение экзосом может быть эффективным способом лечения ЛПС-опосредованного ОРДС [36].

T.J. Morrison с соавт. [37] на модели ЛПС-опосредованного ОРДС у мышей установили, что внеклеточные везикулы из МСК КМ человека способствовали формированию противовоспалительного и высокофагоцитарного фенотипа макрофагов посредством передачи митохондрий. Модуляция функции макрофагов была связана с усилением окислительного фосфорилирования. Альвеолярные макрофаги после взаимодействия с внеклеточными везикулами МСК КМ человека снижали продукцию TNF- α и IL-8 на 58 $\pm$ 8% и 30 $\pm$ 15% соответственно, что уменьшало повреждение легких *in vivo* [37].

W. Xu с соавт. [38] установили, что введение экзосом, выделяемых эндотелиальными прогениторными клетками (endothelial progenitor cell, EPC), оказывало защитное действие на эндотелий капилляров легких и восстанавливало их целостность. Это приводило к уменьшению интерстициального отека и повреждений в легких крыс при ОРДС (гистологические данные). Культуру EPC получали следующим способом: выделенные из КМ мононуклеарные клетки центрифугировали в градиенте плотности. После культивирования в течение 7 сут клетки проявляли фенотип эндотелиальных, что следовало из поглощения ацетилированного липопroteина низкой плотности, связывания

эндотелиально-специфического лектина и высокой экспрессии гликопротеина CD31. Эти свойства клеток подтверждали их эндотелиальную природу [38].

A. Monsel с соавт. [39] представили результаты исследования влияния везикул МСК, полученных из КМ человека, на пневмонию у мышей, индуцированную ЛПС *Escherichia coli*. Внутривенное введение 90 мкл микровезикул МСК через 4 ч после воздействия на мышей ЛПС увеличивало 72-часовую выживаемость животных на 88% благодаря секреции фактора роста кератиноцитов. Терапия приводила также к снижению инфильтрации лейкоцитов на 40%, нейтрофилов — на 53%; снижению общей концентрации белка в бронхоальвеолярном лаваже — на 22% через 24 ч по сравнению с контрольной группой мышей, получавшей фосфатно-солевой буфер (PBS); уменьшению количества клеток воспалительного инфильтрата, цитокинов, белка и бактерий вследствие усиления фагоцитоза [39].

В доклиническом исследовании Н. Kaspi с соавт. [40] использовали препарат Ехо MSC-NTF (NurOwn®, Израиль). Для получения Ехо MSC-NTF клетки МСК КМ инкубировали в среде, содержащей 1 мМ дб-цАМФ, 20 нг/мл FGF2 человека, 5 нг/мл PDGF человека и 50 нг/мл герегулина β 1. На модели ЛПС-индуцированного воспаления легких у мышей терапевтический эффект при интратрахеальном введении Ехо MSC-NTF превосходил действие Ехо MSC в снижении проявлений ОРДС. Уровень оксигенации легких повышался на 10%, утолщение альвеолярных стенок — на 43%; количество IL-6 уменьшалось в 7 раз и TNF- α — в 2,3 раза; предотвращалось повреждение легочной ткани. Количество нейтрофилов в легочной ткани снижалось на 26%, накопление фибрина возвращалось к норме [38].

Компанией BrainStorm Cell Therapeutics получен патент⁴ на способ получения экзосом из МСК КМ взрослого человека.

В работе В.А. Ткачука с соавт. [41] отмечено, что на моделях блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей интратрахеальное введение обогащенной внеклеточными везикулами (ВВ) кондиционированной среды МСК (КС-МСК) способствовало разрешению фиброза. Мыши, которым вводили лекарственное средство, демонстрировали улучшение состояния по сравнению с контролем. Для оценки состояния животных использовали балльную систему. Медиана максимального накопленного балла у контрольных животных составляла 7, а у экспериментальных (введение КС-МСК, обогащенной ВВ) — 1, что говорило о более благополучном состоянии

⁴ <https://patents.google.com/patent/AU2019252987B2>

мышей, получивших КС-МСК, обогащенную ВВ. В группе профилактики фиброза медиана максимального накопленного балла у контрольных животных составляла 9, а у экспериментальных — 5. Получены данные по эффективности компонентов секрета МСК не только для лечения фиброза легочной ткани, но и его предотвращения, а также для профилактики развития фибротических осложнений интерстициальных пневмоний, в том числе вирусных, включая коронавирусные инфекции [41].

В исследовании S. Shapira с соавт. [42] оценивалась эффективность и безопасность EXO-mCD24 (мышинный гомолог EXO-CD24 человека) при средней и тяжелой степени ОРДС. Эффективность EXO-mCD24 изучалась на моделях воспалительных заболеваний у мышей. В состав препарата входят экзосомы, обогащенные гликопротеином mCD24 (cluster of differentiation 24), который является ключевой молекулой врожденного иммунитета. Получение препарата при трансфекции ExpiFectamine™ 293 / плазмидная ДНК в культуре клеток НЕК включало следующие стадии: 1) отбор культуральной жидкости, ее последующее центрифугирование и фильтрацию (размер пор фильтра 0,22 мкм); 2) преципитацию в присутствии 30% полиэтиленгликоля (ПЭГ) и 1,5 М натрия хлорида в течение 15–16 ч и центрифугирование при 4000 об/мин; 3) растворение осадка в физиологическом растворе, диализ в PBS; концентрирование раствора экзосом в PBS на фильтре с размером пор 100 кДа [42].

В работе S. Shapira с соавт. [43] исследовали токсичность, безопасность и терапевтическое действие EXO-mCD24 при ингаляционном пути введения препарата на модели ЛПС-индуцированной сливной пневмонии у мышей. 1×10^8 и 1×10^9 экзосом в физиологическом растворе вводили животным 1 раз/сут в течение 5 сут. У животных в контрольной и экспериментальной группах отсутствовали побочные эффекты или различия в поведении. При введении 1×10^8 экзосом EXO-mCD24 сохранялось повреждение легких средней и тяжелой степени, тогда как введение 1×10^9 экзосом приводило к выраженному улучшению состояния легких, заметному снижению уровней IL-6 (с 149 до 58 пг/мл), IL-12 (с 17 до 13 пг/мл), TNF- α (с 14 до 7 пг/мл), IFN- γ (с 42 до 11 пг/мл) в образцах сыворотки крови. В бронхоальвеолярном лаваже также наблюдалось снижение маркеров воспаления. Применение EXO-mCD24 продемонстрировало его эффективность и увеличение выживаемости животных по сравнению с контрольной группой: для групп животных, получивших 1×10^{10} и 1×10^{11} экзосом, отношение рисков составило

0,069 (95% ДИ 0,016–0,292) и 0,155 (95% ДИ 0,043–0,555) соответственно [43].

Основные данные по доклиническим испытаниям препаратов экзосом приведены в *таблице 1*.

Клинические исследования препаратов на основе экзосом

О. Green с соавт. [44] отмечали, что EXO-CD24 — многообещающее лекарственное средство не только для лечения ОРДС, но и тех многих заболеваний, в отношении которых не эффективны стандартные лекарственные препараты. На нескольких моделях заболеваний у животных (абдоминальный и легочный сепсис, легочный фиброз, астма, ХОБЛ и грипп) была доказана терапевтическая эффективность EXO-CD24 [44, 45].

На основании полученных результатов доклинических исследований EXO-CD24 S. Shapira с соавт. [42, 43] и О. Green с соавт. [44] предположили, что применение экзосомом, гиперэкспрессирующих CD24, можно экстраполировать на лечение заболеваний у людей. Это обусловило переход к клиническим исследованиям (КИ) безопасности и эффективности препаратов на основе экзосом для лечения ОРДС и других заболеваний. В рандомизированных КИ использовались препараты аллогенных экзосом, полученных из МСК разных тканей человека, которые вводили пациентам со средним или тяжелым течением ОРДС ингаляционно или внутривенно. В качестве плацебо в большинстве КИ использовался физиологический раствор.

S. Shapira с соавт. [42], получив мышинный гомолог CD24 (mCD24), разработали противовоспалительный препарат EXO-CD24 на основе экзосом, обогащенных гликопротеином CD24 — молекул, участвующих в формировании врожденного иммунитета. EXO-CD24 воздействует на гиперактивные клетки иммунной системы при COVID-19, ассоциированном с ОРДС. Показано, что CD24 связан с различными DAMP (молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждением), такими как белок 1 группы высокой подвижности (HMGB1), белки теплового шока и нуклеолины. Вследствие взаимодействия CD24 с SiglecG мыши или Siglec10 человека (sialic acid binding Ig-like lectin) избирательно подавляется реакция организма на повреждение тканей [46, 47].

Препараты на основе экзосом для ингаляционного введения

Препарат EXO-CD24

S. Shapira с соавт. [42] провели КИ (фаза Ib/IIa) препарата Exo-CD24 на 35 пациентах со средней и тяжелой формой COVID-19. Возрастающие

Таблица 1. Доклинические испытания препаратов экзосом на животных
Table 1. Preclinical trials of exosome preparations *in vivo*

Источник <i>Reference</i>	Экспериментальная модель <i>Experimental model</i>	Индукторы легочной патологии <i>Inductors of pulmonary pathology</i>	Описание препарата <i>Drug description</i>	Терапевтический эффект <i>Therapeutic effect</i>
[36]	C57Black/6, мыши, самцы <i>mice, males</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Экзосомы МСК костного мозга <i>Bone marrow MSC exosomes</i>	Улучшение состояния легких посредством модуляции поляризации макрофагов и подавления в них гликолиза <i>Improving lung function by modulating macrophage polarisation and inhibiting glycolysis</i>
[37]	C57Black/6, мыши, самцы <i>mice, males</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Внеклеточные везикулы МСК костного мозга <i>Bone marrow MSC extracellular vesicles</i>	Уменьшение повреждения легких путем формирования противовоспалительного и высокофагоцитарного фенотипа макрофагов <i>Reduction of lung damage by anti-inflammatory and highly phagocytic macrophage phenotype</i>
[38]	Крысы Спрег-Дуули <i>Sprague Dawley rats</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Экзосомы эндотелиальных клеток <i>Endothelial cell exosomes</i>	Восстановление эндотелия капилляров легких <i>Endothelium recovery of the lung capillaries</i>
[39]	C57Black/6, мыши / <i>mice</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Микровезикулы МСК костного мозга <i>Bone marrow MSC microvesicles</i>	Увеличение выживаемости животных <i>An increase in animal survival</i>
[40]	Мыши <i>Mice</i>	ЛПС <i>LPS</i>	Препарат компании Brainstorm ExoM-SC-NTF <i>Brainstorm company ExoMSC-NTF product</i>	Повышение уровня оксигенации легких, снижение количества воспалительных цитокинов <i>An increase in lung oxygenation, with reduced inflammatory cytokine levels</i>
[41]	Мыши <i>Mice</i>	Блеомицин <i>Bleomycin</i>	Секретом МСК, обогащенный внеклеточными везикулами <i>MSC secretome enriched with extracellular vesicles</i>	Разрешение фиброза, улучшение состояния животных по сравнению с контролем <i>Fibrosis resolving, improvement of animal health status compared to the control group</i>
[42]	Мыши <i>Mice</i>	ЛПС <i>LPS</i>	EXO-mCD24 на основе мышиных клеток <i>EXO-mCD24 based on mouse cells</i>	При высокой дозе 1×10^{10} экзосом — выраженное улучшение состояния легких и увеличение выживаемости животных <i>A significant improvement in lung status and an increase in animal survival at a high dose (1×10^{10}) of exosomes</i>

Таблица составлена авторами по данным литературы / The table is prepared by the authors using literature data

Примечание. ЛПС — липополисахарид; МСК — мезенхимальные стромальные клетки.
 Note. LPS, lipopolysaccharide; MSC, mesenchymal stromal cells.

дозы Ехо-CD24 (1×10^8 – 1×10^9 экзосом) вводили ингаляционно в течение 5 сут. Побочных эффектов, связанных с приемом препарата, не наблюдалось в течение 443–575 сут. Препарат эффективно снижал уровни провоспалительных маркеров и цитокинов. Так, уровни MIF3A, IL-17A, IL-1 β , IL-6, TGF- α , TNF- α и IL-1 α снижались на 4, 7 и 35-е сут наблюдения по сравнению с исходными уровнями (день 0); среднее значение уровня С-реактивного белка в крови составило $127,1 \pm 14,7$ мг/л ($\pm$ SEM⁵) в день 0 с дальнейшим его снижением до $66,6 \pm 10,4$ и $19,3 \pm 7,7$ мг/л на 3-е и 7-е сут соответственно [42].

I. Grigoropoulos с соавт. (Греция) [48] проведено КИ (фаза IIb) с целью подбора дозы препарата для лечения пациентов с ОРДС средней и тяжелой степени, вызванного COVID-19. Пациенты ($n=91$) получали 1×10^9 – 1×10^{10} экзосом ЕХО-CD24 в течение 5 сут. На 7-е сут оценивались эффективность и безопасность препарата; пациенты оставались под наблюдением в течение 28 сут⁶ [48].

A. Nimrod с соавт. (Израиль) исследовали препарат ЕХО-CD24 в группе 60 пациентов с ОРДС легкой и средней степени. Препарат экзосом (1×10^{10}) разводили в 1,5 мл физиологического

⁵ Стандартная ошибка среднего (standard error of the mean).

⁶ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04902183>

раствора для ингаляции и вводили с помощью стандартного струйного небулайзера 2 раза/сут в течение 5 сут⁷.

Проведенные КИ (фазы I и II) продемонстрировали отсутствие неблагоприятного воздействия на пациентов. Несмотря на уникальное сочетание экзосом (носитель) и CD24 (иммуномодулятор) в лекарственном препарате для ингаляционного введения, требуются дальнейшие его исследования на более многочисленной когорте пациентов.

Препарат haMSC-Exos (Mexcovid)

Препарат экзосом получали из МСК жировой ткани человека [49]. Клетки 4-го пассажа переносили в другой культуральный сосуд (клеточная фабрика) с плотностью $(1-1,5) \times 10^4$ /клеток/см² для получения нужной клеточной массы. По достижении 90% конфлюентности культур полную питательную среду (α -MEM, содержащая лизат тромбоцитов человека) заменяли на питательную среду без экзосом. Полную среду центрифугировали при 120000 g в течение 6 ч. Супернатант использовали в качестве среды, не содержащей экзосомы, для дальнейшего культивирования клеток и выделения экзосом. Супернатант после инкубации в течение 48 ч очищали от клеточного дебриса с помощью дифференциального центрифугирования, инкубировали с 12% ПЭГ в течение 24 ч и далее центрифугировали при 3000 g в течение 60 мин. Осадок суспендировали в PBS и центрифугировали при 120000 g в течение 70 мин [49].

Эффективность и безопасность ингаляционного введения препарата haMSCs-Exos (Mexcovid) в аэрозольной форме изучались в пилотном плацебо-контролируемом однокрупном КИ (фаза IIa), которое проводили в госпитале Ruijin Hospital (Китай), при лечении пациентов с тяжелым течением COVID-19. Семь пациентов ежедневно получали haMSCs-Exos в дозе 2×10^8 экзосом в течение 5 сут при ингаляционном введении препарата с помощью небулайзера. Все пациенты переносили лечение без проявления побочных эффектов при сохранении клинической стабильности. Отмечалась различная степень разрешения легочных поражений⁸ [50].

Препарат hMSC-Exos

hMSC-Exos — препарат на основе экзосом, полученных из МСК КМ человека по методике, изложенной Shi M-M. с соавт. [49]. В рандомизированном плацебо-контролируемом КИ (Ruijin Hospital, Китай) изучали терапевтическое действие препарата hMSC-Exos при ингаляционном введении для лечения ОРДС ($n=18$). Дизайн КИ (фаза I) был следующий: группа низких доз — ингаляции аэрозолем hMSC-Exos по 2×10^8 экзосом/сут в течение 7 сут, группа средних доз — 8×10^8 экзосом/сут, группа высоких доз — 16×10^8 экзосом/сут; фаза II: дозировка 1 — базовое лечение плюс 1/4 от МПД⁹/сут, дозировка 2 — базовое лечение плюс МПД/сут, контроль — базовое лечение плюс введение физиологического раствора¹⁰.

В ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия» (г. Самара) провели рандомизированное двойное слепое КИ по изучению безопасности и эффективности аэрозольной ингаляции при двукратном введении в течение 10 сут в дозе $(0,5-2) \times 10^{10}$ экзосом из МСК КМ при лечении пациентов с тяжелым течением пневмонии, ассоциированной с COVID-19¹¹. Ингаляционное введение экзосом призвано ускорить реабилитацию пациентов, уменьшить объем поражений легочной ткани и сократить время пребывания пациентов в стационаре.

Препараты на основе экзосом для внутривенного введения

Препарат Zofin™

Zofin™ (DrugBank ID 16519) — бесклеточный, минимально обработанный препарат, полученный из амниотической жидкости человека; содержит внеклеточные везикулы / наночастицы амниотических стволовых и эпителиальных клеток и более 300 факторов роста, цитокинов и хемокинов. Экзосомы обогащены такими молекулами, как CD63, CD81 и CD9, в дополнение к высокой экспрессии гликопротеина CD133. Цель КИ (фазы I и II) — оценить безопасность и потенциальную эффективность внутривенного введения препарата для лечения средней и тяжелой форм COVID-19 в сравнении с плацебо. Пациенты в экспериментальной группе получали препарат внутривенно по 1 мл в день 0, на 4-е и 8-е сут. Средняя концентрация везикул при их среднем размере 125,2 нм составила $5,24 \times 10^{11}$ экзосом/мл. Препарат действует

⁷ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05947747>

⁸ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04276987>

⁹ Максимально переносимая доза.

¹⁰ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04602104>

¹¹ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04491240>

<https://clinicaltrials.gov/study/NCT04602442>

как супрессор активации цитокинов для снижения тяжести COVID-19¹².

В 2021 г. компания Organicell Regenerative Medicine (США) сообщила о положительных результатах первого применения препарата в Индии: у 10 получавших препарат пациентов с COVID-19 достигнута ремиссия (исследование проходило в 4 клиниках). Далее в КИ были включены 65 пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19 (лечение было завершено к концу июня 2021 г.). Все пациенты, получившие терапию препаратом, достигли полного выздоровления¹³. В Индийский совет медицинских исследований (Council for Medical Research, ICMR) было подано заявление для получения разрешения на экстренное применение Zofin™ в качестве лекарственного средства для лечения COVID-19.

Препарат ExoFlo™

Препарат ExoFlo™, содержащий экзосомы, полученные из МСК костного мозга, продемонстрировал высокий уровень переносимости при лечении пациентов с ОРДС, ассоциированным с COVID-19. В КИ приняли участие 102 пациента, которые получали инфузии в объеме 100 мл (15 мл препарата и 85 мл физиологического раствора) в течение 60 мин на 1-е и 4-е сут лечения. Пациенты с тяжелой или критической формой COVID-19 получали одновременно стандартное лечение. Установлено, что используемая доза ExoFlo™ была безопасна для пациентов¹⁴ [51].

Компания Direct Biologics (США) сообщила о положительных результатах, полученных в КИ с применением ExoFlo™. V. Sengupta с соавт. [52] изучали безопасность и эффективность экзосом (ExoFlo™), полученных из аллогенных МСК КМ, в нерандомизированном КИ при лечении пациентов с тяжелой формой COVID-19, а также с ОРДС тяжелой и средней степени тяжести. Пациенты получали однократную дозу ExoFlo™ (15 мл) внутривенно с последующим мониторингом их состояния в течение 2 нед. после лечения. После введения ExoFlo™ не было зафиксировано побочных эффектов в течение 72 ч. Выживаемость пациентов составила 83%. Среднее соотношение парциального давления кислорода в артериальной крови к фракции вдыхаемого кислорода ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) увеличилось на 192% ($p < 0,001$). Среднее снижение количества нейтрофилов крови составило 32%

($p < 0,001$), тогда как количество CD3^+ , CD4^+ и CD8^+ лимфоцитов увеличилось на 46% ($p < 0,05$), 45% ($p < 0,05$) и 46% ($p < 0,001$) соответственно. Средний уровень С-реактивного белка, ферритина и D-димера снизился на 77% ($p < 0,001$), 43% ($p < 0,001$) и 42% ($p < 0,05$) соответственно [52]. Таким образом, исследуемый препарат благодаря благоприятному профилю безопасности, способности восстанавливать оксигенацию, подавлять цитокиновый шторм и укреплять иммунитет представляет собой перспективное лекарственное средство для лечения тяжелой формы COVID-19.

Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA, США) присвоило препарату статус перспективного лекарственного средства в области регенеративной медицины, а также разрешило проведение КИ фазы III (2023 г.). Учитывая ограниченное количество одобренных лекарственных средств с доказанной эффективностью в снижении смертности, своевременные результаты КИ фазы III будут иметь важное значение для лечения пациентов с ОРДС и в борьбе с заболеваемостью и смертностью, вызванными SARS-CoV-2¹⁵.

Препараты Zofin™ и ExoFlo™ рекомендованы FDA к применению в КИ (табл. 2).

Препарат ARDOXSO

В США проведено КИ безопасности и эффективности препарата для внутривенного введения на основе экзосом, полученных из МСК КМ, для лечения пациентов с ОРДС тяжелой степени. Дизайн КИ был следующий: 4 группы по 5 пациентов: 1 группа – введение возрастающей дозы препарата (2×10^9 , 4×10^9 , 8×10^9 экзосом) через 1 сут в течение 5 сут; 2 группа – по той же схеме введение 8×10^9 , 4×10^9 , 8×10^9 экзосом; 3 группа – введение лечебной дозы 8×10^9 , 8×10^9 , 8×10^9 экзосом; 4 группа – введение плацебо¹⁶. Полученные данные этого пилотного КИ демонстрируют потенциальную клиническую применимость препарата.

Комбинированное лечение

Применение EV-Pure™ и WJ-Pure™

Компанией Vitti Labs получен препарат на основе МСК клеток пуповины VL-P22 (EVPure) и экзосом плацентарного происхождения VL-PX10 (WJPure). Цель КИ (фаза I) – изучение

¹² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04384445>

¹³ <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/152560/100-percent-recovery-rate-for-covid-19-patients-treated-with-zofin/>

¹⁴ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04493242>

¹⁵ <https://bioinformant.com/direct-biologics-publication-in-chest/>

¹⁶ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04798716>

Таблица 2. Препараты на основе экзосом, использованные в клинических исследованиях^a

Table 2. Application of exosome-based preparations in clinical trials^a

ClinicalTrials.gov ID	Препарат <i>Preparation</i>	Состав препарата <i>Drug composition</i>	Способ введения <i>Drug administration</i>	Страна <i>Country</i>
NCT04902183	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Греция <i>Greece</i>
NCT05947747	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Израиль <i>Israel</i>
NCT04747574	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Израиль <i>Israel</i>
NCT04969172	Exo-CD24	Экзосомы аллогенных МСК <i>Exosomes of allogenic MSCs</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Израиль <i>Israel</i>
NCT05787288	Экзосомы <i>Exosomes</i>	Экзосомы клеток пуповинной крови <i>Exosomes of umbilical blood cells</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Китай <i>China</i>
NCT04276987	Мехсovid	Экзосомы МСК жировой ткани человека <i>Exosomes MSCs from human adipose tissue</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Китай <i>China</i>
NCT04602104	hMSC-Exos	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Китай <i>China</i>
NCT04491240	Экзосомы <i>Exosomes</i>	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Россия <i>Russia</i>
NCT04602442	Экзосомы <i>Exosomes</i>	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	Инг/в <i>Inh</i>	Россия <i>Russia</i>
NCT04384445	Zofin ^b	Экзосомы амниотической жидкости человека <i>Human amniotic fluid exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США, Индия <i>USA, India</i>
NCT05228899	Zofin ^b	Экзосомы амниотической жидкости человека <i>Human amniotic fluid exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05643729	Zofin ^b	Экзосомы амниотической жидкости человека <i>Human amniotic fluid exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT04493242	ExoFlo ^c	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05127122	ExoFlo ^c	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05116761	ExoFlo ^c	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT04798716	ARDOXSO	Экзосомы МСК костного мозга человека <i>Human bone marrow MSC exosomes</i>	в/в <i>i/v</i>	США <i>USA</i>
NCT05387278	EVPure <i>WJPure</i>	МСК пуповины и экзосомы из МСК плаценты / <i>MSCs from umbilical cord and exosomes from placental MSC</i>	Комб/в <i>Comb/adm</i>	США <i>USA</i>
NCT05387239	EVPure <i>WJPure</i>	МСК пуповины и экзосомы из МСК плаценты / <i>MSCs from umbilical cord and exosomes from placental MSC</i>	Комб/в <i>Comb/adm</i>	США <i>USA</i>

Таблица составлена авторами по данным литературы / The table is prepared by the authors using literature data

Примечание. МСК — мезенхимальные стромальные клетки; Инг/в — ингаляционное введение; в/в — внутривенное введение; комб/в — комбинированное введение.

^a По результатам клинических исследований все рассмотренные препараты соответствуют критериям безопасности и эффективности.

^b Регуляторные органы Пакистана разрешили использовать Zofin для лечения пациента с тяжелой формой COVID-19 (2021 г.); FDA одобрило применение Zofin для лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких.

^c FDA одобрило применение ExoFlo для лечения пациентов с угрожающими жизни осложнениями от COVID-19 (2020 г.).

Note. MSC, mesenchymal stromal cells; Inh/adm, inhalation; i/v, intravenous administration; comb/adm, combined administration.

^a According to clinical trials, all the drugs considered meet the criteria for safety and efficacy.

^b Pakistani regulatory authorities have approved the use of Zofin to treat a patient with severe COVID-19 (2021); FDA has approved the use of Zofin in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

^c FDA approved ExoFlo in patients with life-threatening COVID-19 complications (2020).

безопасности и преимуществ внутривенного введения WJPure и EVPure при лечении пациентов с COVID-19 и ОРДС средней и тяжелой степени¹⁷. Другое исследование (фаза II) было направлено на оценку преимуществ комбинации EVPure и WJPure у пациентов с COVID-19 с фиброзом легких¹⁸: экспериментальная/лечебная группа ($n=10$) – введение EVPure и WJPure на фоне стандартного лечения; группа плацебо ($n=10$) – введение криоконсервирующей среды / физиологического раствора на фоне стандартного лечения. Продолжительность исследования может составить 5 сут (лечение) с последующим периодом наблюдения в течение 12 нед.¹⁹

Совместное применение препаратов экзосом и МСК

Для повышения эффективности лечения ОРДС разрабатываются новые схемы и режимы совместного применения препаратов экзосом и МСК. М. Zarrabi с соавт. [53] представили данные рандомизированного многоцентрового КИ (фаза II) с участием 43 пациентов с COVID-19, ассоциированным с ОРДС: 11 пациентов получили внутривенно две последовательные дозы аллогенных МСК по 100×10^6 ; 8 пациентов – МСК по 100×10^6 плюс экзосомы (выделены из $200 \times 10^6 \pm 10\%$ клеток МСК и вводились ингаляционно); 24 пациента – контрольная группа. Интервал между введением препаратов составлял 48 ч. Показано, что системное введение МСК и ингаляции экзосом при использовании небулайзера были безопасными и значительно снижали уровни маркеров воспаления (IL-6, TNF- α , IFN- γ , CRP) в сыворотке крови пациентов. Смертельные исходы среди пациентов, получивших препараты экзосом и МСК, не наблюдались [53, 54].

Основные данные по КИ препаратов на основе экзосом приведены в *таблице 2*.

В 2022 г. А. Lotfy с соавт. представили данные об использовании экзосом, полученных из разных клеток (костный мозг, жировая ткань, эндометрий и др.) для лечения неврологических (эпилепсия, болезнь Паркинсона, инсульт), аутоиммунных (рассеянный склероз, ревматоидный артрит, диабет 1 типа), кардиологических и нефрологических заболеваний [55]. Приведенные ниже примеры применения препаратов на осно-

ве экзосом подтверждают, что их функциональное воздействие определяется источником МСК [56]. В экзосомах обнаружено 304 разных белковых молекул, 150 микроРНК и других биоактивных молекул [55], что в совокупности, вероятно, и определяет терапевтический эффект – восстановление различных типов тканей при патологических состояниях сердечно-сосудистой системы, заболеваниях печени, почек, легких и при неврологических расстройствах [57, 58]. Препараты экзосом изучались в следующих КИ.

Для лечения сахарного диабета I типа использовались экзосомы, полученные из МСК пуповинной крови. Экзосомы в дозах $(1,22-1,51) \times 10^6$ частиц/кг вводились дважды с интервалом в 1 нед.²⁰

В Исфаханском университете (Иран) проводилось исследование, направленное на выяснение возможностей функционального восстановления после инсульта. В экспериментах на животных было показано, что введение экзосом увеличивает количество нейробластов и эндотелиальных клеток. Экзосомы из МСК КМ вводились стереотаксически интрапаренхимально пациентам с ишемическим инсультом²¹.

В госпитале Ruijin Hospital (Китай) в нерандомизированном КИ применяли MSCs-Exos, выделенные из аллогенных МСК жировой ткани для терапии болезни Альцгеймера легкой и средней степени тяжести. Пациентам в трех группах назначали назальное введение MSCs-Exos в дозах 5 мкг, 10 мкг, 20 мкг (1 мл) 2 раза/нед. в течение 12 нед.²² [59].

В Египте инициировано исследование препарата на основе экзосом, полученных из МСК жировой ткани, аутогенно выделенной у пациентов; экзосомы предназначены для введения в пародонтальные карманы для оценки их регенеративного эффекта при лечении пародонтита²³.

Проблемные аспекты и перспективы

Препараты на основе экзосом становятся многообещающими бесклеточными терапевтическими средствами, поскольку доказана их высокая эффективность в лечении ОРДС и других заболеваний [60]. Однако не решены проблемы гетерогенности препаратов экзосом и их быстрой элиминации из организма человека [34].

¹⁷ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387278>

¹⁸ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387239>

¹⁹ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387278>

²⁰ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05387239>

²¹ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02138331>

²² <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03384433>

²³ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04388982>

²⁴ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04270006>

Остается много нерешенных технических вопросов, таких как разработка универсальных легко воспроизводимых протоколов выделения экзосом и очистки их от примесей [61], определение оптимального способа хранения и уточнение эффективных лечебных доз.

Открытие А.Я. Фриденштейном стволовых стромальных клеток и разработка Р.К. Чайлахяном метода их культивирования позволили получать значимое количество этих клеток без изменений их диплоидности и дали возможность применять как сами клетки, так и их секретом в терапевтических целях. Результаты исследований Р.К. Чайлахяна с соавт. [12] указали на неоднородность первичных клеточных клонов, выращенных *in vitro* из костного мозга; позже это было подтверждено в работах S.A. Kuznetsov с соавт. [62], а также P. Bianco с соавт. [63].

Секретом культур МСК КМ содержит экзосомы, наследующие свойства материнских клеток. Следовательно, пул получаемых экзосом так же неоднороден, как и клеточная культура МСК. Авторы многих научных работ оперируют понятием «экзосомы», получаемые из МСК различных тканей, не приводя характеристик применяемых МСК. Большинство исследований с применением стволовых МСК для лечения ОРДС и осложнений после перенесенного COVID-19 имеет следующие недостатки: а) существующие методы не всегда позволяют получить

достаточное количество экзосом для проведения серийных исследований; б) отсутствуют протоколы получения однородного материала (каждая последующая партия экзосом, полученных из МСК, может иметь уже несколько иные характеристики).

Таким образом, необходимо масштабировать выращивание клеток для получения экзосом в лечебных целях и проводить стандартизацию схемы лечения, дозировок, путей и режима введения. Основной целью будущих КИ является изучение долгосрочной безопасности, иммуногенности и эффективности препаратов на основе экзосом для проведения бесклеточной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализированы данные о препаратах на основе экзосом, выделенных из культур МСК тканей костного мозга, жировой ткани, пуповины, пуповинной крови, плаценты, и оказывающих терапевтическое действие на регенерацию легочной ткани при ОРДС. В доклинических и клинических исследованиях препараты на основе экзосом вводились как в составе комбинированной терапии, так и монотерапии. Эффективны ингаляционные, внутривенные и сочетанные способы введения препаратов. Требуется стандартизация критериев получения препаратов на основе экзосом, оптимизация эффективности схем их применения и условий долгосрочного хранения.

Литература/References

1. Костин МП, Шмитко АД, Полищук ВБ, Хромова ЕА. Современные представления о новом коронавирусе и заболевании, вызванном SARS-CoV-2. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020;9(2):33–42. Kostin MP, Shmitko AD, Polishchuk VB, Khromova EA. Modern representations of the new coronavirus and the disease caused by SARS-CoV-2. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2020;9(2):33–42 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2020-9-2-33-42>
2. Ярошецкий АИ, Грицан АИ, Авдеев СН и др. Диагностика и интенсивная терапия острого респираторного дистресс-синдрома (Клинические рекомендации Общероссийской общественной организации «Федерация анестезиологов и реаниматологов»). *Анестезиология и реаниматология*. 2020;(2):5–39. Yaroshetskiy AI, Gritsan AI, Avdeev SN, et al. Diagnostics and intensive therapy of acute respiratory distress syndrome (clinical guidelines of the federation of anesthesiologists and reanimatologists of Russia). *Russian Journal of Anesthesiology and Reanimatology*. 2020;(2):5–39 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/anaesthesiology20200215>
3. Виноградов ВА, Скворцова ВИ, Каркищенко ВН и др. Способ лечения острого респираторного дистресс-синдрома доларгином и легочным сурфактантом. Патент Российской Федерации № 2728821 С1, 2020. Vinogradov VA, Skvortsova VI, Karkishchenko VN, et al. Method of treating acute respiratory distress syndrome with dolargin and a pulmonary surfactant. Patent of the Russian Federation № 2728821 С1, 2020 (In Russ.). EDN: KBSGQR
4. Wang J, Yang X, Li Y, et al. Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. *Virrol J*. 2021;18:117. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01588-y>
5. Xu H, Sheng S, Luo W, et al. Acute respiratory distress syndrome heterogeneity and the septic ARDS subgroup. *Front Immunol*. 2023;14:1277161. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1277161>
6. Ferguson ND, Fan E, Camporota L, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification and supplementary material. *Intensive Care Med*. 2012;38(10):1573–82. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2682-1>
7. Zhao L, Su F, Zhang N, et al. The impact of the new acute respiratory distress syndrome (ARDS) criteria on Berlin criteria ARDS patients: a multicenter cohort study. *BMC Med*. 2023;21:456. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03144-7>
8. Сизикова ТЕ, Лебединская ЕВ, Лебедев ВН, Борисевич СВ. Применение вируснейтрализующих антител для экстренной профилактики и лечения COVID-19. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021;10(4):98–104. Sizikova TE, Lebedinskaya EV, Lebedev VN, Borisevich SV. The therapeutics, based on virus specific antibodies, for special prophylactic and current of COVID-19. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2021;10(4):98–104 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-4-98-104>
9. Арутюнов АА, Авдеев СН, Батышкин ММ и др. Применение КОВИД-глобулина в терапии COVID-19. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(3):13–20. Arutyunov AG, Avdeev SN, Batyushin MM, et al. Using COVID-globulin in COVID-19 treatment. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2022;85(3):13–20 (In Russ.). <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-3-13-20>
10. Friedensteyn AI, Petrakova KV, Kuralesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hemopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230–47. <https://doi.org/10.1097/00007890-196803000-00009>

11. Мельникова ЕВ, Меркулова ОВ, Меркулов ВА. Клинические исследования препаратов клеточной терапии: опыт рассматривания зарубежными регуляторными органами. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020;22(2):139–50. Melnikova EV, Merkulova OV, Merkulov VA. Clinical trials for cellular therapy products: conclusions reached by foreign regulatory bodies. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020;22(2):139–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-2-139-150>
12. Friedensteyn AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
13. Фриденштейн АЯ, Лациник НВ, Куралесова АИ и др. Клетки-переносчики кроветворного микроокружения. В сб.: *Итоги науки и техники. Иммунология*. М: ВИНТИ; 1983. Т. 12. С. 5–28. Fridenstein AY, Latsinik NV, Kuralesova AI, et al. Cell-precursors of hemopoietic microenvironment. In: *Results of science and technology. Immunology*. Moscow: VINITI; 1983. Vol. 12. P. 5–28 (In Russ.).
14. Chailakhyan RK, Kon E, Shekhter AB, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells provide complete regeneration in a rabbit model of the Achilles tendon bundle rupture. *Int Orthop*. 2021;45(12):3263–76. <https://doi.org/10.1007/s00264-021-05168-1>
15. Гольдштейн ДВ, Макаров АВ, Фатхудинов ТХ и др. Биотрансплантат и способ лечения остеопороза. Патент Российской Федерации № 2265442 C1, 2005. Goldshstein DV, Makarov AV, Fatkhudinov TKh, et al. Biotransplant and method for treating the cases of osteoporosis. Patent of the Russian Federation № 2265442 C1, 2005 (In Russ.). EDN: HXYKOL
16. Гранов АМ, Жаринов ГМ, Зверев ОГ и др. Способ лечения аллергических заболеваний. Патент Российской Федерации № 2250773 C1, 2005. Granov AM, Zharinov GM, Zverev OG, et al. Method for treating the cases of allergic diseases. Patent of the Russian Federation № 2250773 C1, 2005 (In Russ.). EDN: HRCAYW
17. Миронов НВ, Гольдштейн ДВ, Горайнова ИИ и др. Биотрансплантат и способ лечения паркинсонизма. Патент Российской Федерации № 2259836 C1, 2005. Mironov NV, Goldshstein DV, Gorajnova II, et al. Biotransplant and method for treating the cases of parkinsonism. Patent of the Russian Federation № 2259836 C1, 2005 (In Russ.). EDN: NLVOIT
18. Гранов АМ, Жаринов ГМ, Некласова НЮ и др. Способ лечения инвазивного рака мочевого пузыря. Патент Российской Федерации № 2257219 C1, 2005. Granov AM, Zharinov GM, Neklasova NJu, et al. Method for treating noninvasive cancer of urinary bladder. Patent of the Russian Federation № 2257219 C1, 2005 (In Russ.). EDN: SARJIW
19. Шахпазян НК, Астрелина ТА, Яковлева МВ. Мезенхимальные клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2012;7(1):23–33. Shahpazian NK, Astrelina TA, Yakovleva MV. Mesenchymal stem cells from various human tissues: biological properties, quality and safety assessment for clinical use. *Cell transplantation and tissue engineering*. 2012;7(1):23–33 (In Russ.). EDN: NKDSLH
20. Деев РВ. Клеточная трансплантация в программе лечения COVID-19: пересадка стволовых стромальных (мезенхимальных) клеток. *Гены и клетки*. 2020;15(2):10–19. Deev RV. Cell transplantation in the COVID-19 treatment program: stem stromal (mesenchymal) cell transplantation. *Genes & Cells*. 2020;15(2):10–19 (In Russ.). <https://doi.org/10.23868/202004012>
21. Chailakhyan RK, Averb'yanov AV, Zabozaev FG, et al. Comparison of the efficiency of transplantation of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells cultured under normoxic and hypoxic conditions and their conditioned media on the model of acute lung injury. *Bull Exp Biol Med*. 2014;157(1):138–42. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2509-x>
22. Aslam M, Baveja R, Liang OD, et al. Bone marrow stromal cells attenuate lung injury in a murine model of neonatal chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(11):1122–30. <https://doi.org/10.1164/rccm.200902-0242OC>
23. Gorman E, Millar J, McAuley D, O'Kane C. Mesenchymal stromal cells for acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis, and COVID-19 infection: optimizing the therapeutic potential. *Expert Rev Respir Med*. 2021;15(3):301–24. <https://doi.org/10.1080/17476348.2021.1848555>
24. Walter J, Ware LB, Matthay MA. Mesenchymal stem cells: mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. *Lancet Respir Med*. 2014;2(12):1016–26. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70217-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70217-6)
25. Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. *Lancet Respir Med*. 2019;7(2):154–62. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30418-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30418-1)
26. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110(10):3499–506. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-069716>
27. Jung JW, Kwon M, Choi JC, et al. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Med J*. 2013;54(5):1293–6. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.5.1293>
28. Abraham A, Krasnodembskaya A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(1):28–38. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0205>
29. Bruno S, Deregibus MC, Camussi G. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett*. 2015;168(2):154–8. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.007>
30. Konala VB, Mamidi MK, Bhone R, et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 2016;18(1):13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.10.008>
31. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20. PMID: 3597417
32. Zhang K, Cheng K. Stem cell-derived exosome versus stem cell therapy. *Nat Rev Bioeng*. 2023;1:608–9. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00064-2>
33. Ратушняк МГ, Семочкина ЮП. Экзосомы – природные наночастицы для использования в терапии. *Российские нанотехнологии*. 2020;15(4):435–50. Ratushnyak MG, Syomochkina YuP. Exosomes – natural nanoparticles for use in therapy. *Russian nanotechnology*. 2020;15(4):435–50 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S1992722320040123>
34. Zhuang X, Jiang Y, Yang X, et al. Advances of mesenchymal stem cells and their derived extracellular vesicles as a promising therapy for acute respiratory distress syndrome: from bench to clinic. *Front Immunol*. 2023;14:1244930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1244930>
35. Liu C, Xiao K, Xie L. Advances in the use of exosomes for the treatment of ALI/ARDS. *Front Immunol*. 2022;13:971189. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.971189>
36. Deng H, Wu L, Liu M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate LPS-induced ARDS by modulating macrophage polarization through inhibiting glycolysis in macrophages. *Shock*. 2020;54(6):828–43. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001549>
37. Morrison TJ, Jackson MV, Cunningham EK, et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(10):1275–86. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0170OC>
38. Xu W, Zilong L, Lijuan H, et al. Exosomes derived from endothelial cells ameliorate acute lung injury by transferring miR-126. *Exp Cell Res*. 2018;370(1):13–23. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.06.003>
39. Monsel A, Zhu YG, Gennai S, et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell-derived microvesicles in severe pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192(3):324–36. <https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1765OC>
40. Kaspi H, Semo J, Abramov N, et al. MSC-NTF (NurOwn®) exosomes: a novel therapeutic modality in the mouse LPS-induced ARDS model. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:72. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02143-w>
41. Ткачук ВА, Акопян ЖА, Ефименко АЮ и др. Средство для лечения фиброза тканей на основе компонентов секретомы мезенхимных стромальных клеток, способ получения и применения средства. Патент Российской Федерации № RU2766707 C1, 2020. Tkachuk VA, Akopian ZhA,

- Efimenko AYU, et al. Agent for treating tissue fibrosis based on components of mesenchymal stromal cell secretome, method for preparing and using the agent. Patent of the Russian Federation № RU2766707 C1, 2020 (In Russ.). EDN: CBDVKA
42. Shapira S, Schwartz R, Tsiodras S, et al. Inhaled CD24-enriched exosomes (EXO-CD24) as a novel immune modulator in respiratory disease. *Int J Mol Sci.* 2023;25(1):77. <https://doi.org/10.3390/ijms25010077>
 43. Shapira S, Shimon BM, Hay-Levi M, et al. A novel platform for attenuating immune hyperactivity using EXO-CD24 in COVID-19 and beyond. *EMBO Mol Med.* 2022;14(9):e15997. <https://doi.org/10.15252/emmm.202215997>
 44. Green O, Shenberg G, Baruch R, et al. Inhaled exosomes genetically manipulated to overexpress CD24 (EXO-CD24) as a compassionate use in severe ARDS patients. *Biomedicines.* 2023;11(9):2523. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11092523>
 45. Liu Y, Zheng P. CD24-Siglec interactions in inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2023;14:1174789. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1174789>
 46. Fang X, Zheng P, Tang J, et al. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol.* 2010;7:100–3. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.119>
 47. Chen G-Y, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses. *Science.* 2009;323(5922):1722–5. <https://doi.org/10.1126/science.1168988>
 48. Grigoropoulos I, Tsioulos G, Kastrissianakis A, et al. The safety and potential efficacy of exosomes overexpressing CD24 (EXO-CD24) in mild-moderate COVID-19 related ARDS. *Resp Res.* 2024;25:151. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02759-5>
 49. Shi M-M, Yang Q-Y, Monsel A, et al. Preclinical efficacy and clinical safety of clinical-grade nebulized allogenic adipose mesenchymal stromal cells-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2021;10(10):e12134. <https://doi.org/10.1002/jev2.12134>
 50. Zhu Y-G, Shi M-M, Monsel A, et al. Nebulized exosomes derived from allogenic adipose tissue mesenchymal stromal cells in patients with severe COVID-19: a pilot study. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):220. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02900-5>
 51. Lightner AL, Sengupta V, Qian S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle infusion for the treatment of respiratory failure from COVID-19: A randomized, placebo-controlled clinical trial. *Chest.* 2023;164(6):1444–53. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2023.06.024>
 52. Sengupta V, Sengupta S, Lazo A, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19. *Stem Cells Dev.* 2020;29(12):747–54. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0080>
 53. Zarrabi M, Shahrabaf MA, Nouri M, et al. Allogenic mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles in COVID-19 induced ARDS: a randomized controlled trial. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):169. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03402-8>
 54. Hashemian SM R, Aliannejad R, Zarrabi M, et al. Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):91. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02165-4>
 55. Lotfy A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):66. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03287-7>
 56. Börger V, Bremer M, Ferrer-Tur R, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1450. <https://doi.org/10.3390/ijms18071450>
 57. Xun C, Ge L, Tang F, et al. Insight into the proteomic profiling of exosomes secreted by human OM-MSCs reveals a new potential therapy. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110584. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110584>
 58. Hassanzadeh A, Rahmani H, Markov A, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer: overview of development, challenges, and opportunities. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):297. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02378-7>
 59. Xie X, Song Q, Dai C, et al. Clinical safety and efficacy of allogenic human adipose mesenchymal stromal cells-derived exosomes in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a phase I/II clinical trial. *Gen Psychiatr.* 2023;36(5):e101143. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2023-101143>
 60. Lee BC, Kang I, Yu KR. Therapeutic features and updated clinical trials of mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes. *J Clin Med.* 2021;10(4):711. <https://doi.org/10.3390/jcm10040711>
 61. Шевелева ОН, Домарацкая ЕИ, Паюшина ОВ. Внеклеточные везикулы и перспективы их использования для регенерации тканей. *Биологические мембраны.* 2019;36(1):3–14. Sheveleva ON, Domoratskaya EI, Payushina OV. Extracellular vesicles and prospects of their use for tissue regeneration. *Biological Membranes.* 2019;36(1):3–14 (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0233475518050109>
 62. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997;12(9):1335–47. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>
 63. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105(12):1663–8. <https://doi.org/10.1172/JCI10413>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Все авторы разрабатывали концепцию рукописи, участвовали в написании текста и формулировке выводов.

Благодарности. Выражаем признательность коллегам, высказавшим критические замечания в адрес нашей статьи.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. All the authors conceptualised, drafted the manuscript, and formulated the conclusions.

Acknowledgements. We would like to thank our colleagues for their critical comments on our article.

Об авторах / Authors

Куралесова Альбина Ивановна, д-р биол. наук / Albina I. Kuralesova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2935-1325>

Грошева Алла Германовна, канд. биол. наук / Alla G. Grosheva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0951-5380>

Генкина Елена Николаевна / Elena N. Genkina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7594-0473>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук / Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Поступила 28.03.2025

После доработки 11.07.2025

Принята к публикации 12.09.2025

Received 28 March 2025

Revised 11 July 2025

Accepted 12 September 2025