

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-47-59>

Перспективы анти-EVs-терапии в аспекте меланомы кожи

В.А. Шитиков, Е.Н. Кособокова*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Василий Андреевич Шитиков vasilbox@yandex.ru

Введение. Внеклеточные везикулы (EVs) играют большую роль в прогрессировании меланомы кожи: способствуют ускользанию от иммунитета, приобретению резистентности к лекарственной терапии и метастазированию. Воздействуя на процесс сборки EVs, а также выделившиеся везикулы опухолевых клеток и их микроокружения, можно добиться значительного снижения количества везикул, способных передавать сигналы и транспортировать макромолекулы. Таким образом, блокирование данной системы передачи информации на разных ее уровнях может быть новым способом лекарственной терапии злокачественных новообразований. На данный момент существует ряд малых синтетических молекул, нарушающих синтез экзосом и микровезикул (ингибиторы нейтральной сфингомиелиназы, кальпаина, Rho-ассоциированных протеинкиназ), а также их конъюгаты для борьбы с экзосомальными механизмами устойчивости к терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. Помимо угнетения сборки EVs в качестве мишени таргетной терапии рассматривают мембранные белки EVs (семейство белков теплового шока HSPA/HSP70, ламининсвязывающих интегринов $\alpha 3\beta 1$ и $\alpha 6\beta$). Идентифицированы также некоторые рецепторы, обеспечивающие специфическое слияние везикул с клетками-реципиентами (CD46-рецептор, участвующий в интернализации экзосом линии клеток опухоли с метастазами в мозг, SK-Mel-28, множество адгезивных молекул, принадлежащих к семейству интегринов, иммуноглобулинов и селектинов, а также CD44 и тетраспанинов).

Цель исследования – рассмотрение имеющегося опыта воздействия на биогенез EVs опухолей для разработки возможной терапевтической стратегии лечения меланомы кожи, вышедшей из-под контроля иммунных и таргетных препаратов.

Материалы и методы. В работе представлены результаты исследований EVs меланомы кожи и способов влияния на EVs-коммуникацию. Поиск соответствующих источников произведен в системах Web of Science, PubMed, eLibrary.ru. Использовали также инструмент Elicit для поиска научных статей.

Заключение. В данной работе проанализировано действие малых синтетических молекул, моноклональных антител и регуляторных РНК на разные звенья биогенеза EVs опухоли: сборку, секрецию EVs, а также их транспорт. Сделаны выводы о состоятельности анти-EVs-терапии на сегодняшний момент и возможности ее применения в аспекте меланомы кожи.

Ключевые слова: EVs, внеклеточные везикулы, меланома кожи, терапия

Для цитирования: Шитиков В.А., Кособокова Е.Н. Перспективы анти-EVs-терапии в аспекте меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(2):47–59.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-47-59>

Prospects for anti-EVs therapy in the context of skin melanoma

Vasily A. Sheetikov, Ekaterina N. Kosobokova*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Vasily Andreevich Sheetikov vasilbox@yandex.ru

Background. Extracellular vesicles (EVs) play a major role in the progression of skin melanoma: contributing to immune evasion, acquisition of resistance to drug therapy and metastasis. By affecting the assembly process of EVs as well as the secreted vesicles of tumor cells and their microenvironment, a significant reduction in the number of vesicles capable of transmitting signals and transporting macromolecules can be achieved. Thus,

blocking this information transmission system at its different levels may be a new way of drug therapy of malignant neoplasms. Currently, there are a number of small synthetic molecules that disrupt the synthesis of exosomes and microvesicles (inhibitors of neutral sphingomyelinase, calpain, Rho-associated protein kinases) and their conjugates to combat exosomal mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitor therapy. In addition to inhibition of EVs assembly, membrane proteins of EVs (heat shock protein family HSPA/HSP70, laminin-binding integrins $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta$) are considered as targets of targeted therapy. Some receptors providing specific fusion of vesicles with recipient cells have also been identified (CD46 receptor involved in the internalization of exosomes of a tumor cell line with brain metastases, SK-Mel-28, many adhesive molecules belonging to the family of integrins, immunoglobulins and selectins, as well as CD44 and tetraspanins).

Aim. To review the available attempts to influence the biogenesis of tumor EVs (EVs) in order to develop a possible therapeutic strategy for the treatment of skin melanoma that has escaped the control of immune and targeting drugs.

Materials and methods. In this work we present the results of research on melanoma of skin EVs and ways to influence EVs communication. The relevant sources were searched in Web of Science, PubMed, eLibrary.ru. The Elicit tool for searching scientific articles was also used.

Conclusion. In this work we analyzed the effect of small synthetic molecules, monoclonal antibodies and regulatory RNAs on different parts of tumor EVs biogenesis: assembly, secretion of EVs, and their transport. Conclusions are drawn about the validity of anti-EVs therapy to date and the possibility of its application in the aspect of skin melanoma.

Keywords: EVs, extracellular vesicles, skin melanoma, treatment

For citation: Sheetikov V.A., Kosobokova E.N. Prospects for anti-EVs therapy in the context of skin melanoma. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(2):47–59. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-2-47-59>

Введение

Транспорт биологически активных макромолекул с помощью внеклеточных везикул (Extracellular Vesicles, EVs) — это один из главенствующих способов межклеточной коммуникации. Опухолевые клетки (ОК) и их микроокружение не исключение, взаимная связь между ОК, окружающей их стромой и другими отдаленными клетками организма способствует ускользанию от иммунитета [1], приобретению резистентности к лекарственной терапии (ЛТ) [2] и метастазированию [3]. Блокирование данной системы передачи информации на разных ее уровнях может быть новым способом ЛТ злокачественных новообразований [4, 5].

Разные типы везикул отличаются не только размером и составом, но и механизмом образования. Данные процессы во многом фундаментальны и происходят в большинстве клеток человека. Однако в ОК биогенез EVs усилен [6, 7] и играет большую роль в развитии устойчивости ЛТ, что уже говорит о возможности использования блокирования опорных путей сборки EVs как еще одного механизма цитостатического действия. Для ограничения количества мишеней теоретически можно выделить наиболее важные в передаче определенного сигнала популяции EVs и преобладающий способ их образования, т.е. каким типом EVs они являются (экзосомами или микровезикулами — МВ).

В аспекте меланомы кожи описанная стратегия, даже при вероятном отсутствии таргетности и наличии ряда побочных эффектов, может быть оправдана проблемой развития лекарственной устойчивости

к таргетной терапии или вторичной резистентности к ингибиторам иммунологических контрольных точек (ИКТИ). Стоит вспомнить исследование научной группы М. Poggio и соавт., доказавшей важность экзосомальной фракции PD-L1 (лиганд белка программированной гибели клеток 1) в развитии резистентности к ИКТИ [8]. Производилась оценка клеточного состава лимфатических узлов (ЛУ) и маркеров истощения Т-клеток после инъекции ОК дикого типа и мутантов с опосредованной CRISPR/Cas9 делецией Rab27a и PD-L1. В результате показано, что экзосомный PD-L1 ОК подавляет активацию Т-клеток в дренирующем ЛУ в отличие от мембранной фракции PD-L1. К тому же удаление экзосомного PD-L1 ингибировало рост опухоли даже у моделей, устойчивых к анти-телам (АТ) против PD-L1 (сингенные модели колоректального и рака предстательной железы) [8].

Сочетание блокирования EVs-коммуникации с уже использующейся тактикой лекарственного лечения меланомы кожи, возможно, способно отсрочить время наступления резистентности и появления новых метастазов.

В обзоре после краткого описания разных звеньев биогенеза EVs рассмотрены потенциальные блокаторы EVs-коммуникации, которые применялись на моделях меланомы кожи и других опухолей, с оценкой перспективности их применения в ЛТ.

Материалы и методы

В работе представлены результаты исследований EVs меланомы кожи и способов влияния на

EVs-коммуникацию. Поиск соответствующих источников проведен в системах Web of Science, PubMed, eLibrary.ru. Использовали также инструмент Elicit для поиска научных статей. Поиск охватил за период 1975–2023 гг. Информационный поиск имел как библиографический (в PubMed, eLibrary.ru, Web of Science), так и полнотекстовый (в Elicit) характер. Поиск проводили по булевой и диалоговой моделям. Для управления данными применяли программу Zotero.

Рассмотрены для включения в обзор только оригинальные исследовательские статьи, написанные на английском или русском языках. Исследования включали, если в них были зафиксированы или описаны попытки угнетения EVs-коммуникации: подавление синтеза EVs или предотвращение взаимодействия EVs с клетками-реципиентами, сопровождающееся внешними изменениями экспериментальной модели в сравнении с контролем. Для предоставления полной картины изучаемого вопроса также включали статьи, опровергающие успешность применения ранее предсказанных мишеней и блокаторов.

Исключали исследования, где возможное влияние на EVs-коммуникацию не подтверждалось с помощью NTA (анализа траекторий наночастиц), иммуноферментного анализа маркеров везикул или другими методами подтверждения качественных и количественных изменений популяций везикул. Кроме того, исключали все исследования, для которых не удалось получить полный текст.

Анализ статей проводился на основе выявления статистических ошибок: использование неподходящих методов проверки гипотез, проблема множественных сравнений, способы сравнения групп, не соответствующие типу признака.

Блокирование образования EVs

В большинстве случаев блокирование соединений, участвующих в биогенезе EVs, выполняется с целью фундаментального изучения природы опухоли. Сегодня применение ингибиторов синтеза EVs не стандартизовано, многие исследования недооценивают вероятность применения данных реактивов в опасных для живой клетки дозах, поэтому в нашем обзоре будут рассмотрены ингибиторы синтеза EVs, показавшие эффективность в нетоксичных для клетки дозах [9]. К тому же неспецифические взаимодействия ингибиторов и плеiotропный эффект их мишеней в клетке также являются главными препятствиями для реального клинического применения описанных блокаторов.

Рассмотрим основные пути образования EVs в аспекте меланомы кожи и результаты попыток нокаута и ингибирования разных звеньев данных механизмов.

Биогенез экзосом

Экзосомы представляют собой разновидность EVs эндосомального происхождения. Существует 2 основных пути сборки экзосом (рис. 1, а):

- 1) ESCRT-зависимый путь (ESCRT – endosomal sorting complex required for transport), при котором компоненты эндосомального комплекса сортировки последовательно рекрутируются в мембрану эндосомы. Этот процесс начинается с домена Hrs, который связывается с фосфатидилинозитол-3-фосфатом, 3,5-бисфосфатом и убиквитинированным белком. ESCRT направляет убиквитинированные белки в мультивезикулярные тельца (Multivesicular Bodies, MVBs), образуя в последних внутрипросветные везикулы (Intraluminal Vesicles, ILVs).
- 2) Церамидзависимый путь основан на образовании липидных рафт, в которых сфингомиелин превращается в церамид нейтральной сфингомиелиназой (nSMase). Эти обогащенные участки мембраны эндосомы имеют структурный дисбаланс между монослоями, вызывающий загиб мембраны внутрь и образование внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярного тельца [10].

Образовавшиеся мультивезикулярные тельца транспортируются в плазматическую мембрану, и в результате слияния внутрипросветные везикулы (ILV) высвобождаются во внеклеточную среду и теперь называются экзосомами. Слияние MVB с плазматической мембраной представляет собой строго регулируемый многоступенчатый процесс, который включает транспортировку MVB по микротрубочкам, стыковку на плазматической мембране и SNARE-опосредованное слияние (soluble N-ethylmaleimide-sensitive component attachment protein receptor – растворимый N-этилмалеимид-чувствительный белковый рецептор присоединения).

Ингибирование нейтральной сфингомиелиназы

Одним из перспективных способов нарушения секреции EVs оказалось блокирование главного фермента церамидозависимого пути образования экзосом, нейтральной сфингомиелиназы. Ингибирование или нокаут сфингомиелиназы снижает уровень метастазирования и ангиогенеза в опухоли [5].

Мощным и специфичным ингибитором нейтральной сфингомиелиназы (nSMase) является проходящее через клеточные мембраны соединение GW4869 [11]. Индуцированное GW4869 ингибирование секреции экзосом в культуре клеток мышинной меланомы B16-BL6 снижало пролиферацию клеток (количество выделенных EVs после обработки уменьшалось приблизительно в 3 раза, снижая количество

клеток примерно в 1,42 раза по сравнению с контролем) [12].

В 2021 г. разработана комбинация экзосомного ингибитора (GW4869) и индуктора ферроптоза (Fe^{3+}) с использованием амфифильной гиалуроновой кислоты [13] для борьбы с экзосомальными механизмами устойчивости к терапии ИКТИ [8, 14]. Испытания описанной комбинации в сконструированном наноблоке показало активацию иммунного ответа против клеток меланомы B16F10, стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов и иммунологической памяти. Нанозлемент (НЭ) усиливает реакцию иммунокомпетентных клеток при блокаде контрольной точки PD-L1. Ферроптоз ОК модулирует иммунозначимый воспалительный ответ и обеспечивает активацию и созревание дендритных клеток костного мозга.

Научная группа получила НЭ, где в роли амфифильного носителя выступает конъюгат гиалуроновой кислоты с 5β -холановой кислотой. Fe^{3+} координируется с полифенолом конъюгата, а GW4869 инкапсулируется в гидрофобную фазу НЭ. GW4869 из НЭ значительно снижал экзосомный биомаркер CD63 клеток B16F10 на вестерн-блотте, при этом свободный GW4869 оказывал меньшее влияние на CD63. Снижение секреции экзосом соответственно резко снижает уровень экзосомального PD-L1, о важности которого говорилось в начале.

Затем мышей, несущих опухоль B16F10, использовали для определения экзосомного ингибирования НЭ *in vivo*. При проведении вестерн-блоттинга выделенных из опухолевой ткани экзосом белковые полосы CD63 и PD-L1 в группе клеток, обработанных НЭ, были едва заметны, что указывает на значительное ингибирование GW4869 биогенеза опухолевых везикул, в том числе несущих PD-L1.

Проверено влияние лечения на систему противоопухолевого ответа: изолированно НЭ с GW4869 способствовали созреванию дендритных клеток на 36,7 %. Комбинированное лечение анти-PD-L1 с НЭ увеличивало время выживания мышей C57BL/6 с прививаемыми B16F10 клетками. Максимальная продолжительность жизни при анти-PD-L1 терапии составляла 31 день наблюдения. Лечение НЭ при комбинации с ИКТИ и в виде монотерапии обеспечивало время максимальной продолжительности жизни, выходящее за период 60-дневного наблюдения [13].

Несмотря на успех приведенной разработки в предотвращении резистентности к ИКТИ, отсутствие таргетного действия подобных НЭ может стать причиной побочных эффектов, связанных с ингибированием нейтральной сфингомиелиназы в здоровых клетках. Например, острое образование церамида, опосредованное nSMase, и его последующее превращение в сфингозин-1-фосфат (один из метаболитов

обмена церамидов) необходимо для правильного функционирования эндотелия микрососудов человека. Таким образом, терапевтические стратегии, направленные на значительное снижение образования церамидов (в том числе ингибирование nSMase), могут оказаться пагубными для микроциркуляторного русла [15]. Проникновение препарата на основе GW4869 через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) может повлиять на модуляцию постсинаптических потенциалов [16] и память [17].

Специфичные Rab-ГТФазы как возможные мишени

Основным недостатком многих ингибиторов сборки EVs, как уже упоминалось ранее, является отсутствие таргетности действия, поэтому при выборе новых кандидатов в роли слабого звена опухолевой коммуникации могут выступать Rab-ГТФазы, имеющие тканеспецифичные формы. Они играют центральную роль в образовании транспортных носителей из донорной мембраны, перемещении этих носителей по цитоскелетным путям и, наконец, закреплении и слиянии с правильной акцепторной мембраной [18], в том числе обеспечивая транспорт и слияние MVB с плазматической мембраной.

Небольшие Rab GTPases (например, RAB27A, RAB27B и RAB11) [19], как полагают, участвуют в биогенезе и секреции экзосом. Показано, что РНК-интерференция RAB27A в клетках меланомы снижает продукцию экзосом [20]. RAB27A способствует стыковке MVBs и слиянию с плазматической мембраной, тогда как RAB27B помогает в переносе пузырьков из комплекса Гольджи в MVBs и в мобилизации MVBs в богатую актином зону под плазматической мембраной. RAB27A играет важную роль в транспорте не только EVs, но и меланосом в меланоцитах [21], при этом RAB27A сверхэкспрессируется в меланомах разного вида по сравнению с доброкачественными невусами [20, 22, 23]. Таким образом, специфичные Rab-ГТФазы потенциально могут быть мишенями в анти-EVs-терапии.

В данном обзоре мы разбирали только часто используемые ингибиторы синтеза EVs, которые подтвердили свою эффективность в нетоксичных для клетки дозах [9] и имеющих опыт применения на культурах клеток и мышинных моделях меланомы. С более широким описанием данных соединений можно ознакомиться в обзоре M. Catalano и L. O'Driscoll [11].

Биогенез микровезикул

Помимо описанных ранее экзосом и способов ингибирования их секреции существуют и другие виды EVs (MB и апоптотические тельца) со своими механизмами биогенеза и мишенями для блокировки.

Несмотря на преобладание исследований, посвященных экзосомам, полученным из меланомы, МВ также могут способствовать развитию и прогрессированию заболевания. Показано, что различные клеточные линии меланомы высвобождают МВ, которые демонстрировали способность повышать метастатический потенциал [24–26]. Наконец, МВ могут участвовать во взаимодействиях «опухоль — строма» [27] и подавлять иммунный ответ [28].

Так, МВ образуются за счет нуклеации плазматической мембраны в межклеточное пространство, которая начинается с кластеризации трансмембранных белков и липидов в различных доменах (рис. 1, б). Рекрутируемые и мембранно-ассоциированные белки, такие как тетраспанины (в основном все еще неопознанные), могут быть вовлечены в сортировку компонентов, аналогичную экзосомальной. Активация ферментов, высвобождение и накопление Ca^{2+} ,

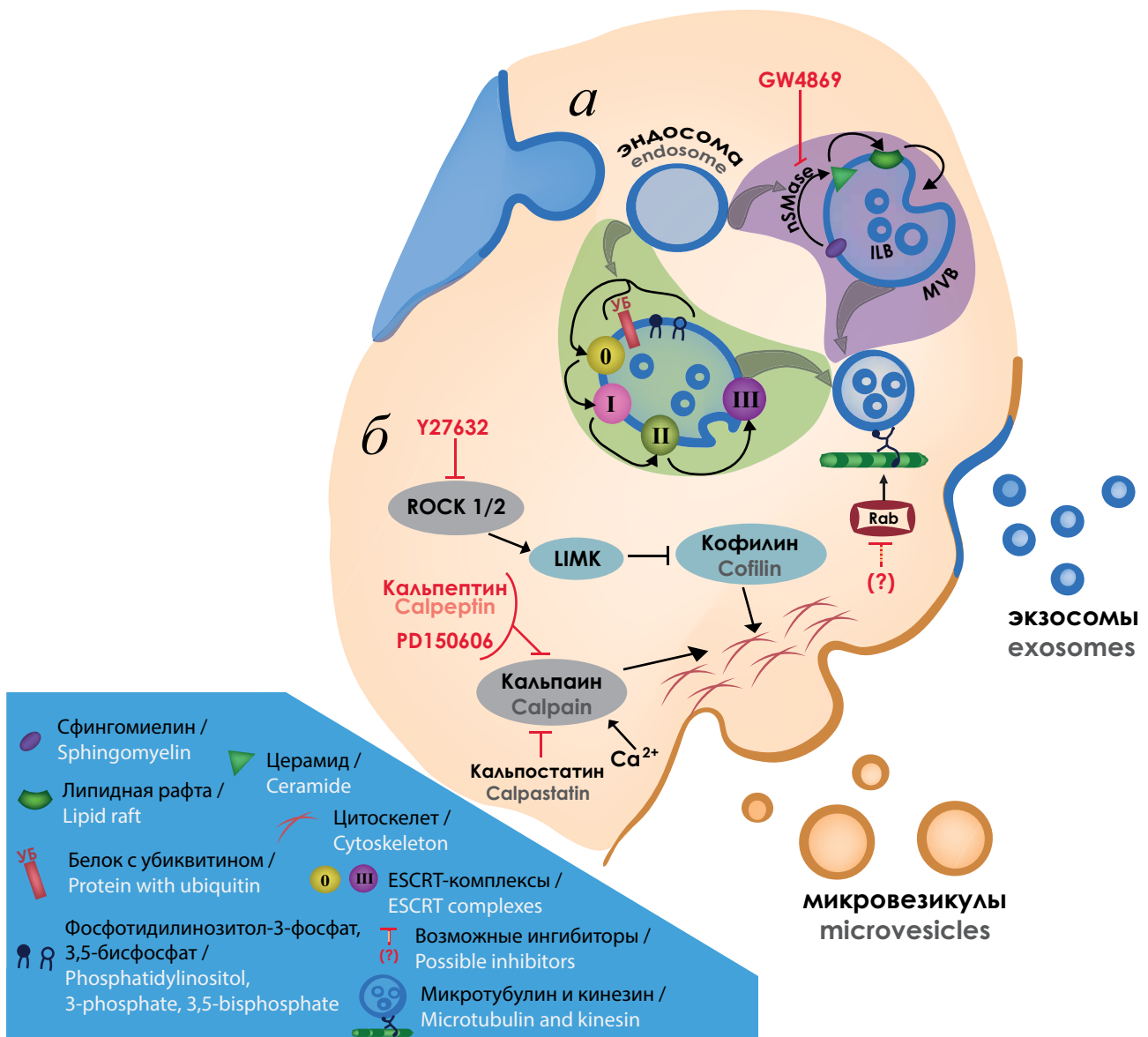


Рис. 1. Биогенез внеклеточных везикул и ингибиторы, блокирующие на разных этапах сборку EVs: а — биогенез экзосом, ингибирование нейтральной сфингомиелазы и белки Rab, которые могут играть роль специфической мишени при меланоме кожи (зеленым выделением обозначен ESCRT-зависимый путь, фиолетовым — церамидзависимый путь); б — биогенез микровезикул, ингибиторы кальпаина и ROCK 1/2, приводящие к блокированию перестройки цитоскелета; LIM-киназа (LIMK) представляет собой актинсвязывающую киназу, которая фосфорилирует члены семейства кофилинов — группу белков, деполимеризующих актиновые филаменты

Fig. 1. Biogenesis of extracellular vesicles (EVs) and inhibitors blocking EVs assembly at different stages: а — biogenesis of exosomes, inhibition of neutral sphingomyelinase and Rab proteins, which may play a role of a specific target in skin melanoma (green highlighting indicates ESCRT-dependent pathway, purple indicates ceramide-dependent pathway); б — biogenesis of microvesicles, and inhibitors of calpain and ROCK 1/2 leading to blocking cytoskeleton rearrangement; LIM kinase (LIMK) is an actin-binding kinase that phosphorylates members of the cofilin family, a group of proteins that depolymerize actin filaments

что характерно и важно для развития меланомы [29], вызывают деградацию компонентов цитоскелета. Почкованию наружу способствует выведение фосфатидилсерина (PS) с помощью специфических транслоказ (флоппаза, скремблаза). По мере того, как цитоскелет локально распадается и становится более проходимым, цитозольные белки и генетический материал сортируются в просвете мембранного выпячивания. Для почкования также необходима инициация сигнального каскада ARF6 (ADP ribosylation factor 6 – фактор рибозилирования аденозиндифосфата 6) посредством активации и рекрутирования PLD/ERK (extracellular signal-regulated kinase – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; phospholipase D – фосфолипазы D) и фосфорилирования MLCK (Myosin Light-Chain Kinase – киназа легкой цепи миозина), что вызывает сокращение актомиозина и отщепление MB [10].

Ингибиторы кальпаина

Ингибиторы одной из цитозольных цистеиновых кальцийзависимых протеаз (кальпаина) используются во многих работах для подавления секреции MB, например, предварительная обработка тромбоцитов кальпептином существенно ингибировала образование MB (снижение на 70 %) [30–32]. Предполагается, что участие кальпаина в ремоделировании цитоскелета играет важную роль при формировании MB, однако точный механизм влияния кальпаинов на синтез MB пока неизвестен.

При повышении уровня кальция кальпаин активируется (во многом с помощью ко-активаторов) и далее может взаимодействовать с многочисленными белковыми субстратами [33]. Кальпаин-опосредованный протеолиз участвует в таких процессах как клеточная адгезия, миграция клеток, пролиферация и апоптоз, способствует ангиогенезу [34–37].

В настоящий момент у человека выявлено примерно 15 изоформ данного белка [38, 39], но не все из них функционируют как активная протеаза (в частности, кальпаин 6 неклассический). Показано, что экспрессия главных кальпаинов (m- и μ -кальпаины) повышена в злокачественных клетках человека [40, 41].

Ингибиторы кальпаина делятся на пептидные и непептидные соединения. Пептидные ингибиторы из-за действия через активный центр не обладают достаточной селективностью, блокируя действие и других цистеиновых протеаз (к которым в том числе относятся каспазы и катепсины, играющие большую роль в апоптозе). Именно неселективность пептидных ингибиторов и плохие показатели фармакокинетики ограничивают их терапевтический потенциал.

Непептидные ингибиторы обеспечивают большую специфичность против кальпаинов, взаимодействуя через аллостерические сайты. Но даже в случае

специфического ингибирования кальпаина из-за его плейотропной роли мы можем столкнуться с более сложной реакцией клеток, чем изолированное снижение выделяемых MB. Например, рядом исследований выявлена проапоптотическая роль кальпаина при лекарственно индуцированном апоптозе в культуре клеток меланомы. Ингибирование активности кальпаина PD150606 или кальпептином частично блокировало активацию каспаз-4 и -7 и апоптоз, индуцированный цисплатином и адриамицином [42].

Активация каспаз-4 и -7, по-видимому, опосредовалась активностью кальпаина, поскольку она блокировалась ингибиторами кальпаина кальпептином и PD150606, даже когда GRP78 (главный ингибитор активации каспаз-4 и -7) ингибировался siRNA.

Выяснено, что активация кальпаина является ранним и решающим событием в механизме апоптоза, о чем свидетельствует значительная защита от гибели клеток в образцах меланомы, обработанных ингибиторами кальпаина, MDL28170, кальпептином и PD150606, где наблюдается переменное, но значительное снижение активности каспаз-3, -7 [43, 44].

Ингибиторы кальпаинов (MDL28170 и кальпептин) экзогенно стимулируют аутофагию в клетках меланомы, которая может функционировать как благоприятная реакция на стресс, препятствующая механизмам клеточной смерти, индуцируемым цисплатином [45]. Однако не следует забывать о том, что при неоплазии аутофагия может быть как про-, так и антиопухолевой в зависимости от конкретной ткани и стадии опухоли [46]. Доступные в настоящее время данные о меланоме подтверждают как защитные, так и противоопухолевые свойства. Например, кальпаинзависимый клиренс белка аутофагии p62/SQSTM1 (играет решающую роль в качестве фактора сборки убиквитинированных белков и органелл и в конечном итоге разрушается в результате аутофагии) вносит вклад в онколитическую активность вируса Δ PK при меланоме [47].

В культуре клеток меланомы кожи, помимо всеобъемлюще синтезирующихся кальпаинов (m- и μ -кальпаины, кальпаины 14, 7 и др.), найден мышечно-специфический кальпаин 3 и два его варианта сплайсинга (hMr78 и hMr84). Рассматривается проапоптотическая роль тканеспецифического кальпаина 3 и его 2 нестабильных изоформ, чему соответствует понижение экспрессии изоформ кальпаина 3 при сравнении биоптатов доброкачественных невусов с неоплазиями разной степени злокачественности, обладающих соответствующей устойчивостью к апоптозу [39]. Так, в моделях со сверхэкспрессией одного из вариантов сплайсинга кальпаина 3 меланомы (hMr84) последовательно увеличивалась внутриклеточная продукция активных форм кислорода, которая приводила к окислительной модификации фосфолипидов

(образованию F2-изопростанов) и повреждению ДНК. Такие события приводили к неблагоприятной судьбе клеток, на что указывает снижение клеточной пролиферации и клеточная гибель [48].

В итоге на данный момент трудно оценить, играет ли повышенная экспрессия вариантов кальпаина 3, наблюдаемая во все еще жизнеспособных клетках, роль в поддержании или противодействии механизму апоптоза. Функции кальпаина 3 и его взаимодействие с главными кальпаинами (μ - и m -изоформы) рождает множество теорий, например о существовании «сети кальпаинов», которая представляет собой перекрестное взаимодействие между кальпаином 3 и m -, μ -изоформами. Кроме того, в клетках скелетных мышц ряд цитоскелетных и миофибриллярных белков, β -катенин, I κ B α , компоненты системы синтеза белка и кальпаистатин были идентифицированы как протеолитические субстраты кальпаина 3 [39]. Внутриклеточное распределение вариантов кальпаина 3 в цитоплазме и ядрышках позволяет предположить, что их роль может определять пространственное расположение в клетке.

Обработка клеток меланомы A7 кальпептином приводила к снижению выработки филамина А, который опосредует клеточную сигнализацию и транспортирует факторы транскрипции в клеточное ядро. Расщепление филамина А кальпаином приводит к ремоделированию цитоскелета и увеличению подвижности клеток меланомы [49]. Клетки через 16 ч после обработки кальпептином демонстрировали нарушение пролиферации на 86,5 % ($p < 0,01$), миграции на 82,1 % ($p < 0,01$) и образования колоний [50].

Недавно исследователи продемонстрировали, что клетки меланомы способны переключаться между мезенхимальной и амeboидной подвижностью: клетки меланомы перемещаются мезенхимально в ответ на провоспалительные цитокины, тогда как после экспрессии эмбрионального рецептора EphA2 они приобретают амeboидный стиль подвижности, приводящий к метастатическому распространению [50]. На клетках меланомы, сверхэкспрессирующих EphA2 или RacN17 (имитация первых шагов к мезенхимально-амeboидному переходу), показана способность кальпептина активировать малую ГТФазу RhoA, передающую сигналы, приводящие к повышению сократительной способности актомиозина, необходимой для амeboидного движения [51]. В дальнейшем были синтезированы ингибиторы Rho-ассоциированных ГТФаз, о которых будет сказано ниже.

Система «кальпаин – кальпаистатин» играет противоположные роли в росте и метастатической диссеминации меланомы. Это было доказано путем сравнения подкожно имплантируемых меланом B16F10 в контрольной мыши и генномодифицированной модели, сверхэкспрессирующей кальпаистатин (есте-

ственный и специфичный негативный регулятор кальпаина).

На 16-й день наблюдалась тенденция к снижению массы опухоли, плотности сосудов в мышечной модели со сверхэкспрессией кальпаистатина по сравнению с контролем ($1,7 \pm 0,3$ г против $3,2 \pm 0,8$ г; $9,2 \pm 0,5$ против $12,2 \pm 1,4$ сосуда/HPF; $p = 0,06$). Инфильтрат CD3 был значительно снижен у мышечной модели со сверхэкспрессией кальпаистатина ($p = 0,03$). Кроме того, у трансгенных вариантов рекрутирование CD4⁺ и NK-клеток было значительно снижено ($p = 0,02$ и $p = 0,004$ соответственно), и снижение количества CD8-клеток в этой группе было особенно заметным ($0,7 \pm 0,1$ против $5,2 \pm 1,5$ клетки/HPF; $p = 0,0003$).

Полученные данные демонстрируют, что ингибирование кальпаина фактически увеличивает диссеминацию меланомы, главным образом за счет уменьшения апоптоза и увеличения подвижности клеток меланомы при заметном ограничении инфильтрации иммунных клеток в опухолевую нишу [52]. Такие противоположные эффекты могут быть объяснены различной ролью кальпаинов в ОК и здоровых специализированных клетках.

Таким образом, в настоящее время применение даже специфичных непептидных ингибиторов кальпаина приводит к сложным фенотипическим изменениям, которые не имеют однозначного противоопухолевого эффекта в отношении меланомы кожи. Кальпаины участвуют в цисплатин- и адриамицин-индуцированном апоптозе, амeboидной трансформации, ингибируют защитную аутофагию, играют важную роль в метастазировании [53]. В свою очередь, многогранный функционал кальпаинов приводит к довольно парадоксальным фенотипическим последствиям его ингибирования, например, может ограничивать рост меланомы, васкуляризацию и инфильтрацию иммунными клетками, но парадоксальным образом усиливать ее распространение в регионарные ЛУ [50].

Перед внедрением ингибиторов кальпаинов в клинику к тому же стоит проблема возможных побочных эффектов, которые продемонстрированы в опытах по нокаутированию генов кальпаина 1 и 2, где в зависимости от нокаутированного кальпаина могла проявиться дисфункция тромбоцитов или вовсе нежизнеспособность с эмбриональной стадией [54–56].

Необходимо продолжить изучать связь между образованием МВ и активацией кальпаинов разных типов для выявления новых мишеней, намного меньше задействованных в фундаментальных процессах и имеющих тканеспецифичные формы (в частности, специфичные Rab-белки, участвующие в транспорте мультивезикулярных телец), а также рассматривать применение регуляторных РНК для специфичной блокировки.

Ингибирование Rho-ассоциированных протеинкиназ

Rho-ассоциированная протеинкиназа (ROCK) играет решающую роль в пролиферации и миграции различных типов клеток, воздействуя на цитоскелет [11].

Ранее сообщалось, что ингибитор ROCK Y-27632 ингибирует рост клеток меланомы мышинных моделей. Однако обнаружено, что ингибиторы ROCK способствуют росту и миграции клеток меланомы человека *in vitro*. В итоге Y-27632 усиливал рост и миграцию клеток меланомы с BRAF-мутацией, но оказывал негативное влияние на клетки меланомы дикого типа или первичные меланоциты [57]. Следовательно, действие ингибитора ROCK на клетки меланомы зависит от клеточного контекста, и применение ингибитора ROCK при лечении меланомы требует дальнейшего изучения.

Влияние на секретируемые EVs

Помимо ингибиторов сборки и секреции EVs, в будущем арсенал анти-EVs-терапии могут пополнить препараты, прерывающие EVs-коммуникацию на последующих уровнях передачи информации с помощью EVs (рис. 2). Выделенные EVs меланомы кожи имеют множество маркеров, связанных с их происхождением, которые можно использовать как таргетные мишени [58].

Первые экспериментальные попытки блокирования EVs опухоли осуществлялись с помощью моноклональных АТ (МкАТ), направленных на характерные для любых EVs человека поверхностные маркеры [10]. Например, на трансмембранные белки тетраспанины (CD63, CD81, CD9), участвующие в сортировке груза в EVs (причем и в экзосомы, и, предположительно, в МВ) и слиянии везикул с клеткой-реципиентом.

N. Nishida-Aoki и соавт. оценили влияние анти-CD9- и анти-CD63-АТ на мышиную модель ксенотрансплантата метастатического рака молочной железы. АТ против тетраспанинов вводили внутривенно в количестве 45 мкг/мышь 3 раза (6, 9, 12-й дни после имплантации опухоли). По истечении 35-дневного наблюдения и дальнейшей диссекции не выявлено статистически значимых различий в размерах первичной опухоли у мышей, получавших лечение анти-CD9 или анти-CD63, по сравнению с мышами в контрольных группах. Во время лечения не наблюдалось значительного снижения массы тела, что позволяет предположить, что АТ не вызывали побочных эффектов у мышей. Уровни плотности кровеносных сосудов в опухолевой ткани мышей, получавших лечение АТ против CD9, были такими же, как и в контрольной опухолевой ткани, тогда как плотность сосудов в экспериментальной группе

с применением АТ против CD63 была даже незначительно увеличена [59].

После 35 дней от момента имплантации были найдены и оценены метастатические клетки в мышинной модели, с помощью которых было выяснено, что применение АТ к CD63 приводило к низкой частоте метастазирования, а АТ к CD9 в меньшей степени, но все же снижало образование метастазов. Количество метастатических очагов было значительно снижено у мышей, получавших как анти-CD9, так и анти-CD63. Дополнительно была проверена зависимость между количеством опухолевых EVs и терапией. Результаты свидетельствуют о том, что, по крайней мере, АТ против CD63 снижало количество EVs, накапливающихся в органах мышей [59].

Несмотря на значительное угнетение метастазирования, необходимо понимать, что данное исследование проводилось на мышинной модели с прививаемой человеческой опухолью. Следовательно, применение АТ к тетраспанинам, характерным для всех EVs человека, как ни странно, имеет большой успех в лечении мышинной модели, однако в случае терапии человека способно привести к катастрофическим последствиям. Необходимо искать специфичные мишени для EVs опухоли человека.

Подобная попытка использовать тетраспанины EVs опухоли в качестве мишени и тем самым прервать EVs-коммуникацию была предпринята M.F. Santos и соавт. Они разработали моновалентное Fab-АТ, направленное против тетраспанина CD9 человека, и продемонстрировали его эффективность в блокировании интернализации EV, полученных из клеток меланомы, и ядерного переноса их грузовых белков в клетки-реципиенты. Далее научная группа продемонстрировала действие синтезированного АТ на модели колоректального рака (SW480/SW620). Моновалентное Fab-АТ против CD9 предотвращало транспорт EVs из клеток SW620 в SW480, тем самым ингибируя их фенотипическую трансформацию [60], но и в этом случае применение подобного АТ ограничено неспецифичностью мишени.

Удивительно, но в качестве возможной специфичной мишени многих опухолевых EVs рассматривают семейство белков теплового шока А (HSPA, включает 12 высококонсервативных молекулярных белков-шаперонов). Важно отметить, что HSPA и другие HSP (например, HSPC2/HSP90AB1 или HSP27) были указаны в качестве конститутивных EVs-белков. При этом мембранная локализация индуцированного стрессом HSPA/HSP70 специфична только для EVs опухолевого происхождения и была предложена в качестве потенциального биомаркера диагностики или лечения [61, 62]. Однако значение HSPAs в EVs-опосредованной коммуникации пока не до конца известно [63].

На будущие способы доставки нанотерапевтических средств и эффективность уже существующих методов контроля секретируемых EVs опухоли могут повлиять фундаментальные исследования, изучающие механизмы их транспорта в межклеточном пространстве (см. рис. 2, б). Например, на модельной линии клеток рака молочной железы было

показано, что не только конвекция межклеточной жидкости влияет на транспорт, но и связывание EVs с внеклеточным матриксом [64]. К тому же P.A. Sariano и соавт. продемонстрировали возрастающее присутствие ламининсвязывающих интегринов $\alpha 3 \beta 1$ и $\alpha 6 \beta 1$ в EVs по мере увеличения злокачественного потенциала клеток, что может говорить об увеличении

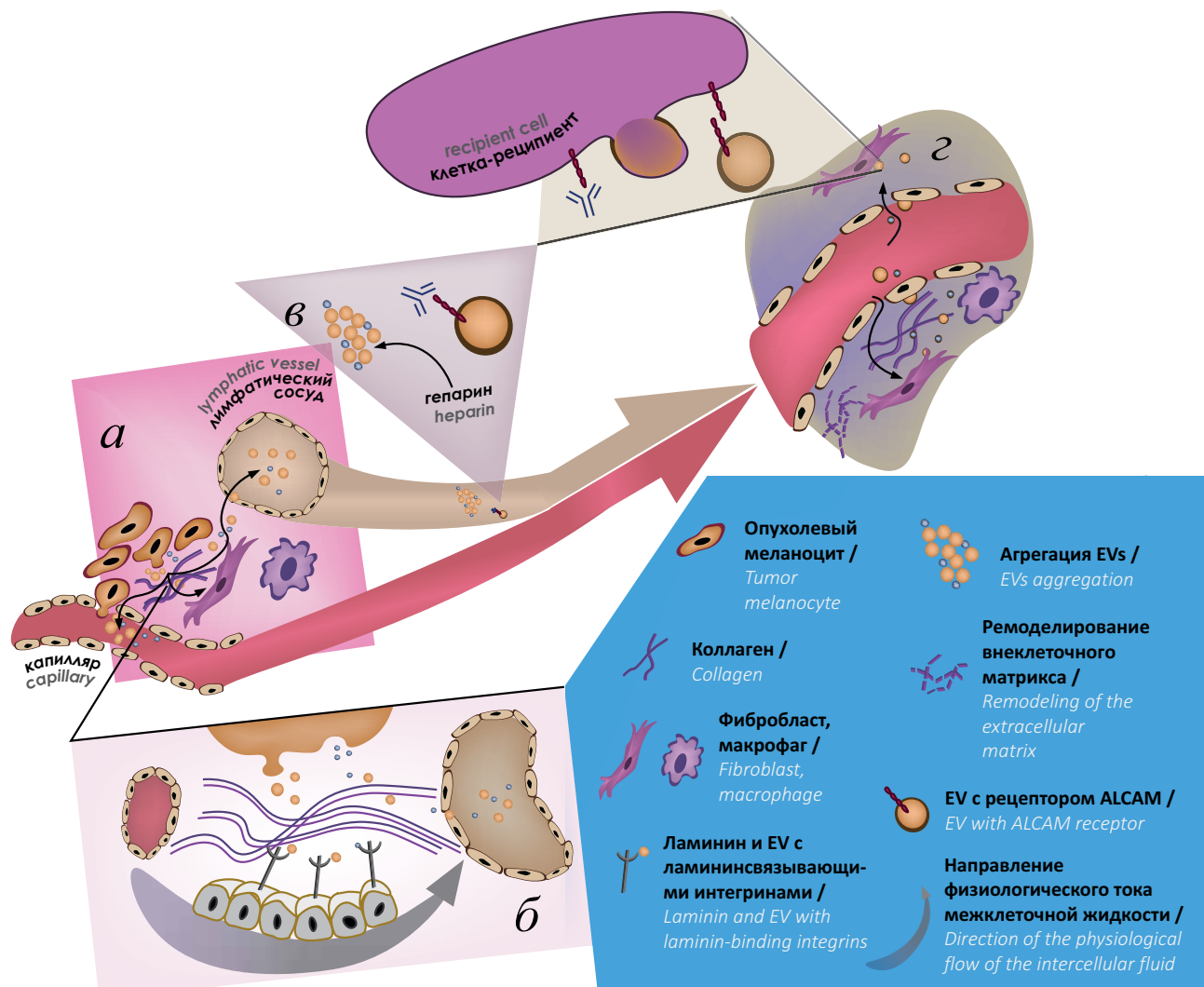


Рис. 2. Транспорт внеклеточных везикул (EVs) от места образования до конечной мишени и способы влияния на секретируемые EVs: а – векторы перемещения выделяемых опухолевой клеткой EVs; б – особенности транспорта EVs в межклеточном пространстве опухоли: часть EVs, имеющих ламининсвязывающие интегрин, остается в структуре внеклеточного матрикса, несвязанная когорта EVs перемещается по направлению физиологического тока межклеточной жидкости; в – имеющиеся способы влияния на секретируемые EVs; з – блокирование специфического слияния EVs с клеткой-мишенью и подготовка метастатической ниши в случае успешной EVs-коммуникации (за счет ремоделирования внеклеточного матрикса, увеличения проницаемости сосудов, рекрутирования иммунных клеток и активации фибробластов); ALCAM – рецептор, позволяющий EVs специфично сливаться с клеткой-реципиентом. Блокирование данного рецептора как на мембране клетки-реципиента, так и на EVs с помощью моноклональных антител приводит к частичному нарушению EVs-коммуникации

Fig. 2. Transport of extracellular vesicles (EVs) from the place of formation to the final target and ways of influence on secreted EVs: a – vectors of movement of EVs secreted by a tumor cell; б – features of extracellular vesicle transport in the tumor intercellular space: part of EVs having laminin-binding integrins remains in the structure of the extracellular matrix, the unbound cohort of EVs moves along the direction of physiological intercellular fluid flow; в – available ways to influence secreted EVs; з – blocking the specific fusion of EVs with the target cell and preparing the metastatic niche in case of successful EVs-communication (by remodeling the extracellular matrix, increasing vascular permeability, recruiting immune cells and activating fibroblasts); ALCAM is a receptor that allows EVs to specifically fuse with the recipient cell. Blocking this receptor both on the membrane of the recipient cell and on EVs using monoclonal antibodies leads to partial disruption of EVs-communication

интенсивности изменений в микроокружении опухоли по мере опухолевой прогрессии.

Протеом EVs из-за сложности селективного выделения везикул до сих пор пополняется новыми данными, для ознакомления с протеомным анализом и его результатами в изучении EVs меланомы рекомендуется обзор M. Surman и соавт. [65].

Предотвращение взаимодействия EVs с клеткой-реципиентом

Последним важным звеном в EVs-коммуникации является взаимодействие с клеткой-мишенью, блокирование передачи информации на данном уровне — тоже перспективное направление анти-EVs-терапии. Так, замечена способность гепарина влиять на поглощение EVs опухолевого, а также неопухолевого происхождения клетками-реципиентами (см. рис. 2, в) [66]. Инкубация EVs, полученных из клеток глиомы, с гепарином привела к образованию структур, наблюдаемых с помощью просвечивающей электронной микроскопии, причем EVs четко видны внутри этих структур. Включение гепарина значительно уменьшало перенос меченных EVs к клеткам-мишеням [67]. Способность опосредовать взаимодействие между клетками и EVs также выявлена у низкомолекулярных гепаринов и гепариноидов [68, 69].

Как уже сказано в самом начале обзора, EVs способны подготавливать нишу для метастазирования. Подобные механизмы в метастазировании меланомы обнаружены не только в ЛУ [58], но и в головном мозге. Ученые идентифицировали рецепторы, участвующие в интернализации экзосом (полученных из линии клеток опухоли с метастазами в мозг, SK-Mel-28), в эндотелиальные клетки ГЭБ человека (клетки hCMEC/D3). Смесь нейтрализующих АТ против интегринов $\alpha 5$ и αV снижала поглощение экзосомы на 11,8 %, в то время как применение малых интерферирующих РНК CD46 снижало его на 39,0 %. Иммуногистохимический анализ подтвердил присутствие CD46 в эндотелиальных клетках капилляров головного мозга человека. Эти результаты позволяют предположить, что CD46 является основным рецептором для поглощения экзосом, полученных из SK-Mel-28, эндотелиальными клетками ГЭБ человека (клетками hCMEC/D3) [70]. Ограничивающим фактором данной стратегии является не только существование и других рецепторных систем, приводящих к слиянию EV с клеткой-реципиентом, но и иные механизмы влияния EVs на клетку-мишень: взаимодействие между специфичными EVs-белками, которые могут быть даже отщеплены от везикулы, и рецепторами клетки с дальнейшей активацией вторичных мессенджеров, фагоцитоз и интернализация целой везикулы [71].

Еще одним примером обнаруженной адгезивной молекулы, обеспечивающей специфическое погло-

щение EVs опухолью клеткой-реципиентом, может служить ALCAM/CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule — молекула адгезии активированных лейкоцитарных клеток). Данная молекула способствует стимулирующей роли EVs при метастазировании колоректального рака и рака яичников в брюшину [72]. АТ к ALCAM ухудшали поглощение EVs (см. рис. 2, в). С помощью нокаута гена ALCAM системой редактирования CRISPR-Cas9 в клетках доноров и реципиентах, а также оценки адгезии EVs с последними было выяснено, что ALCAM способна как к гомофильным взаимодействиям ALCAM — ALCAM, так и к гетерофильным, связываясь с альтернативными лигандами (см. рис. 2, г).

Рецепторные системы, обеспечивающие специфичное слияние EVs, на самом деле, имеют множество адгезивных молекул. Например, в описанном ранее исследовании дополнительно подтвердили результаты предыдущих отчетов, указывающих на то, что $\beta 1$ -интегрины также участвуют в процессах слияния EVs с клеткой-реципиентом. В других публикациях освещается множество адгезивных молекул, принадлежащих к семейству интегринов, иммуноглобулинов и селектинов, а также CD44 и тетраспанинов [73–76].

Заключение

Блокируя EVs-коммуникацию на разных ее этапах, возможно предотвращать или отдалять развитие резистентности меланомы кожи к ЛТ, метастазирование и пролиферацию ОК.

Влияние на сборку и секрецию EVs одновременно является и самым радикальным методом вмешательства и при этом наиболее эффективным. Как оказалось, многие применяемые ингибиторы синтеза EVs в качестве мишеней используют multifunctional элементы внутриклеточной регуляции, большая часть из которых давно имеет статус потенциальной мишени даже без своего влияния на синтез EVs (например, система «кальпостатин — кальпаин»). Однако применение некоторых распространенных в фундаментальных исследованиях соединений имеет большие риски из-за неоднозначного или парадоксального действия на опухоль *in vivo* (ингибиторы кальпаина, Y-27632).

Несмотря на сложность вмешательства в фундаментальные процессы клетки, сейчас есть удачные исследования применения НЭ с GW4869 в лечении меланомы кожи мышинных моделей, которые показали преимущество перед классической терапией ИКТИ. Между тем даже здесь есть нюансы, связанные с церамидной регуляцией тонуса сосудов и действием на нейросинаптическую передачу.

Стоит учесть то, что даже молекулярные участники фундаментальных процессов могут иметь

тканеспецифичные формы, подходящие для таргетного воздействия. В случае меланомы такими слабыми звеньями синтеза EVs могут являться небольшие Rab-ГТФазы (например, RAB27A, RAB27B и RAB1).

В случае опасности применения ингибиторов синтеза EVs вследствие их неоправданного системного цитопатического действия с развитием серьезных побочных эффектов нам остается опсонизировать уже выделившиеся EVs или блокировать их взаимодействие с клеткой-реципиентом. Есть интересные исследования, показывающие перспективность опсонизации EVs-опухоли с последующим снижением риска метастазирования, однако в данных экспериментах используются неспецифичные для человеческого организма мишени. Необходимо выявить по имеющимся базам данных протеома EVs возможные мишени с дальнейшей разработкой чувствительных МКАТ. Помимо тактики опсонизации EVs рассматривается и блокировка рецепторов EVs, с помощью которых происходит контакт и слияние с клеткой-реципиентом (CD46 как предположительно основной рецептор экзосом для поглощения эндотелиальными клетками ГЭБ человека).

В данной работе проанализировано действие малых синтетических молекул, МКАТ и регуляторных РНК на разные звенья биогенеза EVs опухоли: сборку, секрецию EVs, а также их транспорт. Описываемое направление является актуальным для разработки таргетных препаратов и вакцин, применимых в лечении меланомы кожи и в особенности профилактики метастазирования. Вместе с тем остаются общие вопросы о нахождении баланса между эффективностью и специфичностью действия препарата. Кроме того, блокирование EVs-коммуникации на уровне сборки EVs имеет больше проблем, касающихся специфичности действия и возможных системных побочных эффектов, из-за схожести биохимических процессов и их участников в разных типах клеток. Однако и попытки воздействовать на освободившиеся EVs не в мышинной модели могут иметь более скромные результаты по причине большого количества EVs в системном кровотоке со схожими мишенями на поверхности. На фоне предыдущих уровней прерывания биогенеза опухолевых везикул крайне интересными являются исследования, посвященные нарушению взаимодействия EVs с клеткой-реципиентом и интернализации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yanfang L., Yan G., Xuetao C. The exosomes in tumor immunity. *OncoImmunology* 2015;4(9):6. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1027472
2. Yang Q., Xu J., Gu J. et al. Extracellular vesicles in cancer drug resistance: Roles, mechanisms, and implications. *Adv Sci (Weinh)* 2022;9(34):e2201609. DOI: 10.1002/advs.202201609
3. Tucci M., Mannavola F., Passarelli A. et al. Exosomes in melanoma: A role in tumor progression, metastasis and impaired immune system activity. *Oncotarget* 2018;9(29):20826–37. DOI: 10.18632/oncotarget.24846
4. Samireh J., Ephraim A.A., Sharad K. et al. Inhibition of microvesiculation sensitizes prostate cancer cells to chemotherapy and reduces docetaxel dose required to limit tumor growth *in vivo*. *Sci Rep* 2015;5(2):13. DOI: 10.1038/srep13006
5. Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K. et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem* 2013;288(15):10849–59. DOI: 10.1074/jbc.M112.446831
6. Brinton L.T., Sloane H.S., Kester M. et al. Formation and role of exosomes in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(4):659–71. DOI: 10.1007/s00018-014-1764-3
7. Kilinc S., Paisner R., Camarda R. et al. Oncogene regulated release of extracellular vesicles. *Dev Cell* 2021;56(13):1989–2006. DOI: 10.1016/j.devcel.2021.05.014
8. Poggio M., Hu T., Chien-Chun P. et al. Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and memory. *Cell* 2019;177(2):414–27. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.016
9. Namee N.M., Catalano M., Mukhopadhyay A. et al. An extensive study of potential inhibitors of extracellular vesicles release in triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2023;23(654):12. DOI: 10.1186/s12885-023-11160-2
10. Kalra H., Gregor P.C., Mathivanan D. et al. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Mol Sci* 2016;17(2):170. DOI: 10.3390/ijms17020170
11. Catalano M., O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: A review of EV inhibitors. *Extracell* 2019;9(1):22. DOI: 10.1080/20013078.2019.1703244
12. Matsumoto A., Takahashi Y., Nishikawa M. et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Sci* 2017;108(9):1803–10. DOI: 10.1111/cas.13310
13. Wang G., Xie L., Li B. et al. A nanounit strategy reverses immune suppression of exosomal PD-L1 and is associated with enhanced ferroptosis. *Nat Commun* 2021;12(1):12. DOI: 10.1038/s41467-021-25990-w
14. Van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Mol Cell Biol* 2018;19(4):213–28. DOI: 10.1038/nrm.2017.125
15. SenthilKumar G., Katunaric B., Zirgibel Z. et al. Necessary role of acute ceramide formation in the human microvascular endothelium during health and disease. *bioRxiv* 2023;1(1):34. DOI: 10.1101/2023.06.02.543341
16. Wheeler D., Knapp E., Bandaru V.R. TNF α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *J Neurochem* 2009;109(5):1237–49. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06038.x
17. Tabatadze N., Savonenko A., Song H. Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *J Neurosci Res* 2010;88(13):2940–51. DOI: 10.1002/jnr.2243818
18. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(8):513–25. DOI: 10.1038/nrm2728

19. Savina A., Vidal M., Colombo M. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002;115(12):2505–15. DOI: 10.1242/jcs.115.12.2505
20. Peinado H., Aleckovic M., Lavotshkin S. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012;18(6):883–91. DOI: 10.1038/nm.2753
21. Bahadoran P., Aberdam E., Mantoux F. Rab27a: A key to melanosome transport in human melanocytes. *J Cell Biol* 2001;152(4):843–50. DOI: 10.1083/jcb.152.4.84322
22. Guo D., Lui G.Y.L., Lai S.L. et al. RAB27A promotes melanoma cell invasion and metastasis via regulation of pro-invasive exosomes. *Int J Cancer* 2019;144(12):3070–85. DOI:10.1002/ijc.32064
23. Ostrowski M., Carmo N.B., Krumeich S. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010;12(1):19–30. DOI: 10.1038/ncb2000
24. Poste G., Nicolson G.L. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(1):399–403. DOI: 10.1073/pnas.77.1.399
25. Liao C.F., Lin S.H., Chen H.C. et al. CSE1L, a novel microvesicle membrane protein, mediates Ras-triggered microvesicle generation and metastasis of tumor cells. *Mol Med* 2012;18(1):1269–80. DOI: 10.2119/molmed.2012.00205
26. Clancy J.W., Sedgwick A., Rosse C. et al. Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumor-derived microvesicles. *Nat Commun* 2015;21(6):21. DOI: 10.1038/ncomms7919
27. Zhao X.P., Wang M., Song Y. Membrane microvesicles as mediators for melanoma-fibroblasts communication: Roles of the VCAM-1/VLA-4 axis and the ERK1/2 signal pathway. *Cancer Lett* 2015;360(2):125–33. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.01.032
28. Martinez-Lorenzo M.J., Anel A., Alava M.A. et al. The human melanoma cell line MeJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Cell Res* 2004;295(2):315–29. DOI: 10.1016/j.yexcr.2003.12.024
29. Haoran Z., Zhe C., Aijun Z. et al. The role of calcium signaling in melanoma. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):17. DOI: 10.3390/ijms23031010
30. Fox J.E., Austin C.D., Reynolds C.C. et al. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *Biol Chem* 1991;266(20):13289–95. PMID: 2071604
31. Smith P.A., Fitzsimons J.T., Loker J.E. et al. 5-hydroxytryptamine as a possible inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of the leech, *Haemaphys sanguisuga*. *Comp Biochem Physiol* 1975;52(1):65–73. DOI: 10.1016/0306-4492(75)90015-5
32. Yano Y., Shiba E., Kambayashi J. et al. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb Res* 1993;71(5):385–96. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90163-I
33. Siklos M., BenAissa M., Thatcher G.R. Cysteine proteases as therapeutic targets: Does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin* 2015;5(6):506–19. DOI: 10.1016/j.apsb.2015.08.001
34. Letavernier B., Zafrani B., Nassar D. et al. Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(2):335–42. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.240242
35. Hua T., Robitaille M., Roberts-Thomson S.J. et al. The intersection between cysteine proteases, Ca²⁺ signalling and cancer cell apoptosis. *Biochim Biophys Mol Cell Res* 2023;1870(7):13. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2023.119532
36. Youn J.-Y., Wang T., Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOS1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res* 2009;104(1):50–9. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178467
37. Dewitt S., Hallett M. Leukocyte membrane “expansion”: A central mechanism for leukocyte extravasation. *J Leukoc Biol* 2007;81(5):1160–4. DOI: 10.1189/jlb.1106710
38. Sorimachi H., Hata S., Ono Y. Calpain chronicle – an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2011;87(6):287–327. DOI: 10.2183/pjab.87.287
39. Spinozzi S., Albini S., Best H., Richard I. Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2021;1869(5):44. DOI: 10.1016/j.bbapap.2021.140616
40. Shiba E., Kambayashi J.I., Sakon M. et al. Ca²⁺-dependent neutral protease (calpain) activity in breast cancer tissue and estrogen receptor status. *Breast Cancer* 1996;3(1):13–7. DOI: 10.1007/BF02966957
41. Moretti D., Del Bello B., Cosci E. et al. Novel variants of muscle calpain 3 identified in human melanoma cells: Cisplatin-induced changes *in vitro* and differential expression in melanocytic lesions. *Carcinogenesis* 2009;30(6):960–7. DOI: 10.1093/carcin/bgp098
42. Jiang C., Mao Z.G., Kelly A.A.-K. et al. Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 2009;30(2):197–204. DOI: 10.1093/carcin/bgn220
43. Del Bello B., Moretti D., Gamberucci A. et al. Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: A major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. *Oncogene* 2007;26(19):2717–26. DOI: 10.1038/sj.onc.1210079
44. Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L. et al. Calpain-mediated bid cleavage and calpain-independent bak modulation: Two Separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002;22(9):3003–13. DOI: 10.1128/MCB.22.9.3003-3013.2002
45. Del Bello B., Toscano M., Moretti D. et al. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells. *PLoS One* 2013;8(2):14. DOI: 10.1371/journal.pone.0057236
46. Rosenfeldt M.T., Ryan K.M. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 2011;32(7):955–63. DOI: 10.1093/carcin/bgr031
47. Colunga A., Bollino D., Schech V. et al. Calpain-dependent clearance of the autophagy protein p62/SQSTM1 is a contributor to Δ PK oncolytic activity in melanoma. *Gene Therapy* 2014;21(4):371–8. DOI: 10.1038/gt.2014.6
48. Moretti D., Del Bello B., Allavena G. et al. Calpain-3 impairs cell proliferation and stimulates oxidative stress-mediated cell death in melanoma cells. *PLoS One* 2015;10(2):22. DOI: 10.1371/journal.pone.0117258
49. O’Connell M.P., Fiori J.L., Baugher K.M. et al. Wnt5A activates the calpain-mediated cleavage of filamin A. *J Invest Dermatol* 2009;129(7):1782–9. DOI: 10.1038/jid.2008.433
50. Salimi R., Bandaru S., Devarakonda S. et al. Blocking the cleavage of filamin A by calpain inhibitor decreases tumor cell growth. *Anticancer Res* 2018;38(4):2079–85. DOI:10.21873/anticancer.12447
51. Taddei M.L., Giannoni E., Morandi A. et al. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun Signal* 2014;1(12):12. DOI: 10.1186/1478-811X-12-24
52. Raimbourg Q., Perez J., Vandermeersch S. et al. The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PLoS One* 2013;8(4):13. DOI: 10.1371/journal.pone.0060469
53. Chen J., Wu Y., Zhang L. et al. Evidence for calpains in cancer metastasis. *J Cell Physiol* 2019;234(6):8233–40. DOI: 10.1002/jcp.27649
54. Arthur J.S., Elce J.S., Hegadorn C. et al. Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: Calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 2000;20(12):4474–81. DOI: 10.1128/MCB.20.12.4474-4481.2000

55. Azam M., Andrabi S.S., Sahr K.E. et al. Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* 2001;21(6):2213–20. DOI: 10.1128/MCB.21.6.2213-2220.2001
56. Dutt P., Croall D.E., Arthur J.S. et al. m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol* 2006;6(3):11. DOI: 10.1186/1471-213X-6-3
57. Chang F., Zhang Y., Mi J. et al. ROCK inhibitor enhances the growth and migration of BRAF-mutant skin melanoma cells. *Cancer Sci* 2018;109(11):3428–37. DOI: 10.1111/cas.13786
58. Leary N., Walser S., He Y. et al. Melanoma-derived extracellular vesicles mediate lymphatic remodelling and impair tumour immunity in draining lymph nodes. *J Extracell Vesicles* 2022;11(2):e12197. DOI: 10.1002/jev2.12197
59. Nishida-Aoki N., Tominaga N., Takeshita F. et al. Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis. *Mol Ther* 2017;25(1):181–91. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.10.009
60. Santos M.F., Rappa G., Fontana S. et al. Anti-human CD9 fab fragment antibody blocks the extracellular vesicle-mediated increase in malignancy of colon cancer cells. *Cells* 2022;11(16):2474. DOI: 10.3390/cells11162474
61. Gobbo J., Marcion G., Cordonnier M. et al. Restoring anticancer immune response by targeting tumor-derived exosomes with a HSP70 peptide aptamer. *J Natl Cancer Inst* 2016;108(3). DOI: 10.1093/jnci/djv330
62. Chanteloup G., Cordonnier M., Isambert N. et al. Monitoring HSP70 exosomes in cancer patients' follow up: A clinical prospective pilot study. *J Extracell Vesicles* 2020;9(1): 1766192. DOI: 10.1080/20013078.2020.1766192
63. Sojka D.R., Abramowicz A., Adamiec-Organisciok M. et al. Heat shock protein A2 is a novel extracellular vesicle-associated protein. *Sci Rep* 2023;13(1):4734. DOI: 10.1038/s41598-023-31962-5
64. Sariano P.A., Mizenko R.R., Shirure V.S. et al. Convection and extracellular matrix binding control interstitial transport of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2023;12(4):e12323. DOI: 10.1002/jev2.12323
65. Surman M., Stępień E., Przybyło M. Melanoma-derived extracellular vesicles: Focus on their proteome. *Proteomes* 2019;7(2):21. DOI: 10.3390/proteomes7020021
66. Maguire C.A., Balaj L., Sivaraman S. et al. Microvesicle-associated AAV vector as a novel gene delivery system. *Mol Ther* 2012;20(5):960–71. DOI: 10.1038/mt.2011.303
67. Atai N.A., Balaj L., van Veen H. et al. Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *J Neurooncol* 2013;115(3):343–51. DOI: 10.1007/s11060-013-1235-y
68. Gamperl H., Plattfaut C., Freund A. et al. Extracellular vesicles from malignant effusions induce tumor cell migration: inhibitory effect of LMWH tinzaparin. *Cell Biol Int* 2016;40(10):1050–61. DOI: 10.1002/cbin.10645
69. Manandhar S., Park J., Kothandan V.K. et al. Properties of heparinoids premixed with tumor-derived extracellular vesicles. *Bioconjug Chem* 2018;29(11):3757–67. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00637
70. Kuroda H., Tachikawa M., Yagi Y. et al. Cluster of differentiation 46 is the major receptor in human blood–brain barrier endothelial cells for uptake of exosomes derived from brain-metastatic melanoma cells (SK-Mel-28). *Mol Pharm* 2019;16(1):292–304. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00985
71. Украинская В.М., Рубцов Ю.П., Кнорре В.Д. и др. Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, и их роль в регуляции противоопухолевого иммунитета. *Acta Naturae* 2019;11(4):33–41. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-33-41
72. Cardeñes B., Clares I., Bezós T. et al. ALCAM/CD166 is involved in the binding and uptake of cancer-derived extracellular vesicles. *Int J Mol Sci* 2022;23(10):5753. DOI: 10.3390/ijms23105753
73. Kowal J., Tkach M., Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;2(1):116–25. DOI: 10.1016/j.ceb.2014.05.004
74. Willms E., Cabañas C., Mäger I. et al. Extracellular vesicle heterogeneity: subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol* 2018;9:738. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00738
75. Nazarenko I., Rana S., Baumann A. et al. Surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res* 2010;70(4):1668–78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470
76. Reyes R., Cardeñes B., Machado-Pineda Y., Cabañas C. Tetraspanin CD9: A key regulator of cell adhesion in the immune system. *Front Immunol* 2018;9:863. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00863

Вклад авторов

В.А. Шитиков: написание текста рукописи;
Е.Н. Кособокова: редактирование рукописи.

Author's contributions

V.A. Sheetikov: writing the text of the manuscript;
E.N. Kosobokova: editing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.А. Шитиков / V.A. Sheetikov: <https://orcid.org/0009-0007-7520-3397>
Е.Н. Кособокова / E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

Статья поступила: 25.11.2023. **Принята к публикации:** 26.02.2024.
Article received: 25.11.2023. **Accepted for publication:** 26.02.2024.