

УДК 57.083

Внеклеточные везикулы в диагностике онкологических заболеваний

Л. А. Овчинникова*, Я. А. Ломакин

Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: leyla_ovchinnikova@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.12.2024

Принята к печати 30.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27591

РЕФЕРАТ Внеклеточные везикулы (ВВ) секретируются практически всеми клетками млекопитающих и переносят различные активные биомолекулы, участвуя в межклеточных взаимодействиях. Патологические ВВ способствуют прогрессии опухоли, участвуя в таких процессах, как метастазирование, ангиогенез и уход опухолевых клеток из-под иммунного контроля. С другой стороны, выявлен потенциал ВВ как неинвазивных биомаркеров. В этом обзоре рассмотрены последние достижения в методах выделения и характеристики ВВ, молекулярные механизмы их биогенеза и роль в прогрессии рака. Кроме того, обсуждаются новые стратегии изучения молекулярного состава и профилирования ВВ для использования в диагностике методом жидкостной биопсии. Возможность использования ВВ для диагностики рака и мониторинга эффективности терапии подчеркивает их растущую значимость как универсальных диагностических инструментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внеклеточные везикулы, ВВ, онкология, экзосомы, жидкостная биопсия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВВ – внеклеточные везикулы; ВВ-ДНК – ДНК, ассоциированная с внеклеточными везикулами; ВВ-РНК – РНК, ассоциированная с внеклеточными везикулами; вкДНК – внеклеточная ДНК; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; КРР – колоректальный рак; РПЖЖ – рак поджелудочной железы; РЛ – рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; РПЖ – рак предстательной железы; circRNA – кольцевая РНК; CAF (англ. cancer-associated fibroblasts) – фибробласты, ассоциированные с опухолью; CDE (англ. CAF-derived exosomes) – экзосомы, происходящие от фибробластов, ассоциированных с опухолью; EE (англ. Early Endosome) – ранние эндосомы; ESCRT (англ. Endosomal Sorting Complex Required for Transport) – эндосомный сортировочный комплекс, необходимый для транспортировки; IDL (англ. Intermediate-Density Lipoproteins) – липопротеины промежуточной плотности; ILV (англ. intraluminal vesicles) – внутрипросветные везикулы; MVB (англ. Multivesicular bodies) – мультивезикулярные тельца; piRNA – PIWI-взаимодействующие РНК; PSA (англ. Prostate-specific antigen) – специфический антиген простаты.

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой сферические частицы, окруженные билипидным слоем, которые секретируются всеми типами клеток. Чаще всего ВВ подразделяют на экзосомы и микровезикулы (или эктосомы) в зависимости от их происхождения. Однако разнообразие ВВ выходит за рамки этой классификации. Недавние исследования выявили множество других подтипов ВВ, таких как малые эктосомы, апоптотические тельца, миграсомы, крупные онкосомы и экзоферы (англ. exophers) [1]. Кроме того, клетки могут выделять внеклеточные наночастицы, не относящиеся к везикулам, такие как супермеры (англ. supermeres), экзомеры (англ. exomeres), и супрамолекулярные атакующие частицы (англ. supramolecular attack

particles) [2]. Для создания единой стандартизированной классификации Международное общество по изучению внеклеточных везикул (ISEV) регулярно публикует и обновляет свои рекомендации (MISEV). Эти рекомендации являются важным ресурсом для исследователей, обеспечивая согласованность и точность при характеристике ВВ.

Экзосомы – наиболее широко изученный тип ВВ, имеют диаметр от 30 до 150 нм. Они формируются в процессе выделения внутрипросветных везикул (ILV) при слиянии мультивезикулярных телец (MVB) с плазматической мембраной, что приводит к секреции этих частиц во внеклеточное пространство [3, 4]. В то время как экзосомы нормальных клеток способствуют межклеточной коммуникации, транспортируя различные молекулы (например,

белки, ДНК, РНК, липиды), экзосомы, выделяемые опухолевыми клетками, участвуют в прогрессии опухоли, метастазировании, ангиогенезе, а в некоторых случаях способствуют хеморезистентности [5].

В этом обзоре проанализированы современные данные о ВВ, выделяемых опухолевыми клетками, роль ВВ в прогрессии рака и потенциал ВВ как биомаркеров.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Эффективное выделение ВВ является важным этапом их исследования, но часто представляет собой нетривиальную задачу. Было разработано множество методов очистки ВВ, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. При этом универсального метода выделения везикул не существует; выбор подхода зависит от конкретных целей исследования. Методы выделения ВВ можно классифицировать следующим образом: (i) методы с высоким выходом, но низкой чистотой (полимерная преципитация, ультрафильтрация); (ii) методы с умеренным выходом и чистотой (дифференциальное ультрацентрифугирование и гель-фильтрационная хроматография); (iii) методы с низким выходом, но высокой чистотой (градиентное ультрацентрифугирование, аффинное выделение, проточная цитометрия и микрофлюидные подходы) [6]. Часто комбинирование этих методов позволяет повысить выход и чистоту ВВ [7]. При этом постоянно разрабатываются новые методы выделения ВВ из биологических жидкостей. Один из таких подходов – EchoArc, использует высокопроизводительное устройство на основе инерционной микрофлюидики, которое эффективно изолирует свободную от клеток плазму крови для комплексного анализа РНК и ВВ. В сочетании с гель-фильтрационной хроматографией эта техника обеспечивает выход препарата ВВ, превышающий выход при использовании методов ультрацентрифугирования в 10 раз [8].

Для характеристики ВВ используются различные методы. Один из самых распространенных подходов – прямая визуализация ВВ с использованием микроскопии, включая трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ), сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), криоэлектронную микроскопию (крио-ЭМ) и атомно-силовую микроскопию (АСМ). Использование ТЭМ для визуализации ВВ часто приводит к получению изображений, где ВВ обладают чашеобразной формой из-за дегидратации образца, тогда как АСМ и крио-ЭМ помогают сохранить исходную сферическую морфологию ВВ, представляя их структуры более точно [4]. Другой метод характеристики ВВ – динамическое светорассеяние

(ДСР), основан на броуновском движении диспергированных частиц. ДСР измеряет флуктуации интенсивности рассеяния света, вызванные движением частиц, что позволяет определить их распределение по размерам. Этот метод полезен для изучения гидродинамического диаметра ВВ, предоставляя данные об их размерах и однородности в растворе. ДСР широко используется для анализа ВВ в их естественном окружении [9]. По сравнению с ДСР метод анализа траектории наночастиц (НТА) позволяет отслеживать отдельные наночастицы, что делает его особенно эффективным для анализа размеров частиц в сложных образцах. Значительным преимуществом НТА является возможность использования флуоресцентных меток, что позволяет различать частицы на основе их сигналов флуоресценции. Таким образом, НТА позволяет одновременно анализировать размеры различных индивидуальных ВВ, меченных разными флуоресцентными маркерами [10]. Хотя метод ДСР проще в использовании и позволяет получить результаты быстрее, НТА обеспечивает более высокую точность, особенно для гетерогенных образцов. Перечисленные методы дают представление о морфологии и размерах ВВ, в то время как исследование поверхностных молекул не менее важно и может указывать на происхождение ВВ. Для анализа поверхностных маркеров ВВ можно использовать проточную цитометрию, однако диаметр ВВ меньше порога обнаружения стандартных цитометров, и для преодоления этих ограничений применяют специализированные наборы. Принцип действия таких наборов основан на позитивной селекции при помощи антител к везикулярным маркерам (например, CD63, CD81), сорбированных на поверхности микрочастиц. ВВ, связавшиеся с антителами, остаются на микрочастицах и становятся видимыми для стандартных цитометров. Благодаря использованию таких наборов возможно более точно характеризовать различные подтипы ВВ по уровню экспрессии поверхностных маркеров и оценивать их функциональные свойства.

БИОГЕНЕЗ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Биогенез двух основных типов ВВ – экзосом и эктосом – включает различные клеточные процессы (рис. 1). Биогенез экзосом начинается с формирования ранних эндосом путем инвагинации плазматической мембраны. Эти ранние эндосомы могут либо переносить поступающие в клетку (макро)молекулы и надмолекулярные комплексы во внутрипросветные везикулы (ILV), являющиеся предшественниками экзосом, либо транспортировать их обратно к плазматической мембране. По мере со-

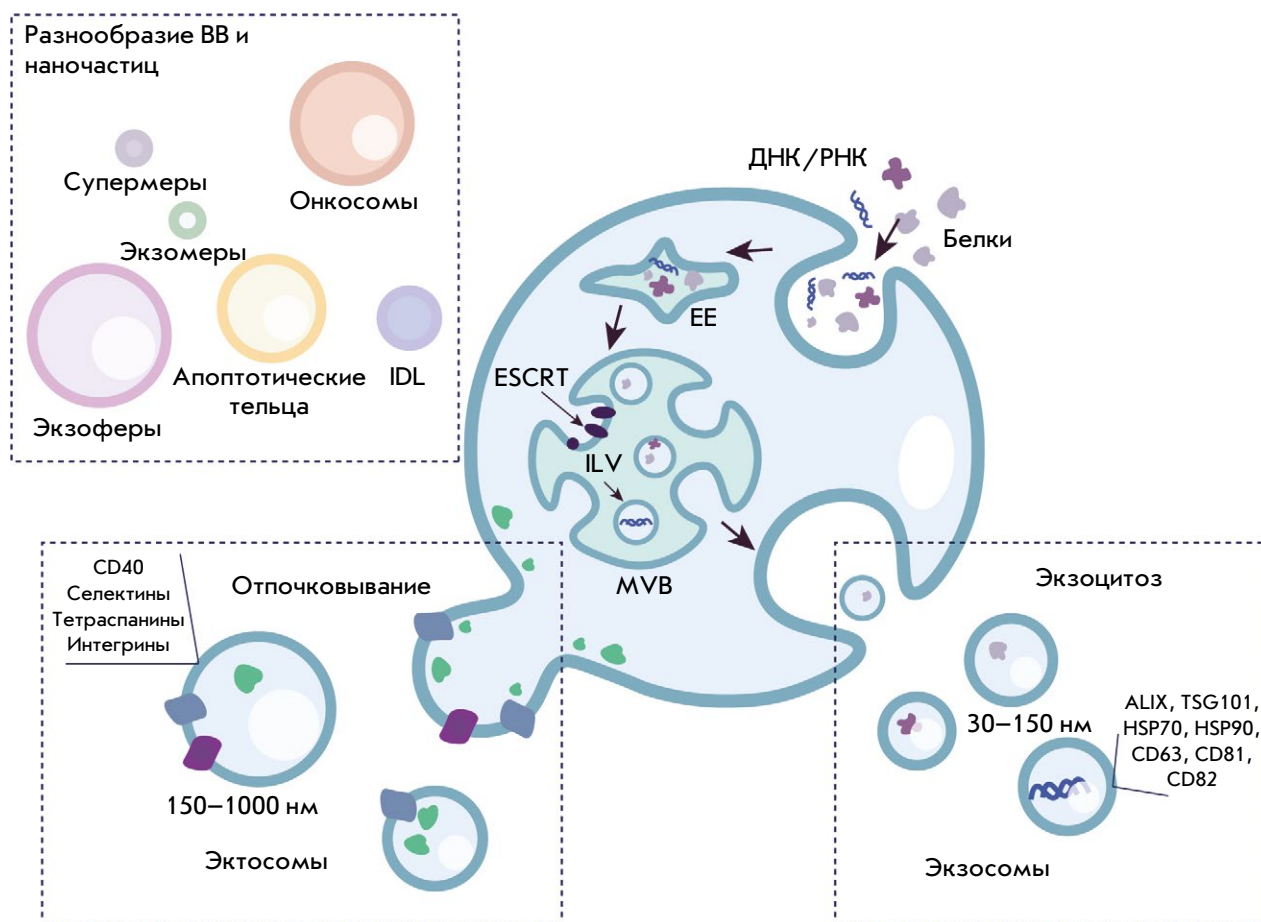


Рис. 1. Схематическое изображение биогенеза экзосом и микровезикул. Экзосомы формируются в эндоситарном пути, который начинается с инвагинации плазматической мембраны и формирования ранних эндосом (англ. Early Endosome – EE). Эти эндосомы созревают в мультивезикулярные тельца (англ. Multivesicular bodies – MVB), содержащие внутрипросветные везикулы (англ. intraluminal vesicles – ILV). После слияния MVB с плазматической мембраной, ILV выделяются в виде экзосом (30–150 нм) во внеклеточное пространство. Микровезикулы образуются путем прямого выпячивания и отпочковывания от плазматической мембраны, формируя более крупные везикулы (150–1000 нм). IDL (Intermediate-Density Lipoproteins) – липопротеины промежуточной плотности; ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) – эндосомный сортировочный комплекс, необходимый для транспортировки

зревания ранние эндосомы преобразуются в мультивезикулярные тельца (MVB), которые взаимодействуют с другими органеллами, такими как аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и фагосомы. Мультивезикулярные тельца могут сливаться с плазматической мембраной, что приводит к секреции экзосом, или сливаться с лизосомами и подвергаться деградации [11].

Существуют различные пути формирования внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярных телец. Такие пути разделяют на связанные с комплексами белков ESCRT и на не зависящие от ESCRT. Существует четыре комплекса ESCRT (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II и ESCRT-III), которые взаимодействуют с ферментами на мембране

эндосом в процессе биогенеза экзосом. Классический путь, зависящий от ESCRT, включает распознавание убиквитинированных белков в мембране эндосом субкомплексом ESCRT и опосредованное белком VPS4 образование внутрипросветных везикул. Альтернативный путь – это путь синдекансин-ALIX, при котором отпочкование везикул и сортировка грузов могут происходить независимо от ESCRT, а VPS4 играет ключевую роль на этапе финального отделения. Путь, не зависящий от ESCRT, использует церамид, генерируемый из сфингомиелина посредством nSMase2, формирующий домены липидных рафтов и инициирующий созревание внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярных телец. Таким образом, молекуляр-

ный состав выделяемых экзосом зависит от путей, через которые они проходят в процессе своего формирования. Однако существует ряд общих белков, характерных для большинства изученных экзосом. К ним относятся белки, участвующие в транспорте и слиянии мембран (семейство GTPаз Rab и аннексыны), белки, связанные с биогенезом экзосом (белки комплекса ESCRT, ALIX, TSG101), белки теплового шока (HSP70 и HSP90), тетраспанины (CD63, CD81 и CD82), а также белки цитоскелета [12]. Помимо белков, в экзосомах могут обнаруживаться характерные липиды. Липидный состав экзосом зависит от типа клеток-продуцентов, их стадии развития и функций. Например, показано, что фосфолипид BMP (бис(моноацилглицерол)фосфат) стимулирует формирование внутрипросветных везикул [13], а холестерин участвует в сборке системы ESCRT [14]. В число липидов, наиболее распространенных в мембране экзосом, входят сфингомиелин, фосфолипиды, ганглиозид GM3 и холестерин [15]. Некоторые мембранные липиды экзосом могут служить полезными диагностическими инструментами: например, экзосомы с фосфатидилсерином на поверхности происходят из злокачественных клеток [16].

Экзосомы (микровезикулы), в отличие от экзосом, отпочковываются непосредственно от плазматической мембраны клетки-продуцента (рис. 1). Молекулярные механизмы биогенеза экзосом менее изучены, однако известно, что этот процесс включает участие комплекса ESCRT и белков малых GTPаз, таких как ARF1, ARF6 и RhoA. Эти белки играют важную роль в регуляции динамики цитоскелета и ремоделировании мембран [17]. Более того, входящий кальциевый ток и перестройка бислоя играют ключевую роль в формировании экзосом, влияя на процесс их отпочкования от плазматической мембраны [18]. Экзосомы переносят широкий спектр биомолекул, включая белки, липиды и РНК, которые они передают клеткам-реципиентам, тем самым участвуя в межклеточной коммуникации [19]. Данные ВВ редко имеют специфические маркеры, однако выявлена их ассоциация с CD40, селектинами, тетраспанинами и интегринами [20]. Кроме того, их мембраны могут содержать белки и липиды клетки-продуцента [20].

ВКЛАД ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В ПРОГРЕССИЮ РАКА

Секретируемые всеми типами клеток ВВ вовлечены во многие патологические процессы в организме человека, включая прогрессию опухолей. Микроокружение опухоли, состоящее из иммунных клеток и стромальных клеток, кровеносных сосудов и внеклеточного матрикса, играет активную роль

в прогрессии опухоли [21]. Взаимодействие между микроокружением опухоли и раковыми клетками частично осуществляется через ВВ [22]. ВВ и их содержимое способны стимулировать рост и прогрессию опухоли, вызывать воспаление и способствовать уходу опухоли из-под надзора иммунной системы [23].

Один из основных источников патогенных опухолевых ВВ – фибробласты, ассоциированные с опухолью (от англ. cancer-associated fibroblasts – CAF), – являются важными компонентами микроокружения опухоли в солидных опухолях. Эти фибробласты секретируют цитокины и факторы роста, играющие ключевую роль в росте опухоли, ангиогенезе, воспалении и метастазировании [24]. Экзосомы, происходящие из фибробластов, ассоциированных с опухолью (англ. CAF-derived exosomes (CDE)), обогащены биоактивными молекулами, включая многочисленные сигнальные факторы, нуклеиновые кислоты, функциональные белки и малые метаболиты, они играют значительную роль в модуляции микроокружения опухоли, стимулируя рост опухоли, метастазирование и устойчивость к терапии [25]. Показано, что CDE, выделяемые CAF, ингибируют окислительное фосфорилирование в митохондриях, изменяют углеводный метаболизм и способствуют росту опухоли [26]. Эти ВВ содержат метаболиты, включая аминокислоты, липиды и промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, которые могут использоваться опухолевыми клетками [26]. Кроме того, такие ВВ усиливают миграционные и инвазивные способности раковых клеточных линий, таких как SKOV-3 и CAOV-3, а также стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход, что в значительной степени обусловлено повышенным содержанием TGFβ1 [27]. В модели рака молочной железы (РМЖ) на животных было показано, что CDE способствовали повышению подвижности и инвазивной активности клеток опухоли [28]. Эти экзосомы поглощались клетками опухоли, доставляя в них Wnt11, сигнальный белок, связанный с опухолевой прогрессией. В случае рака поджелудочной железы ВВ, выделяемые фибробластами, ассоциированными с опухолью, повышали уровень фактора, индуцирующего хеморезистентность (Snail), в эпителиальных клетках-реципиентах, способствуя их пролиферации и лекарственной устойчивости. Ингибирование выделения CDE показало снижение выживаемости кокультивируемых эпителиальных клеток, подчеркивая их значительную роль в поддержании лекарственной устойчивости [29].

Патогенная роль фибробластов, ассоциированных с опухолью, и выделяемых ими ВВ хорошо известна; однако механизмы, посредством которых нормальные фибробласты перепрограммируют

ся в ассоциированные с опухолью, изучены недостаточно. Одним из возможных объяснений может быть транспорт патогенных микроРНК с помощью ВВ. Установлен новый возможный путь межклеточной коммуникации, в котором клетки меланомы индуцируют трансформацию фибробластов через микроРНК, транспортируемые ВВ [30]. Показано, что ВВ, выделенные клетками меланомы, доставляют miR-92b-3p в нормальные фибробласты, и накопление этой микроРНК клетками коррелировало с их трансформацией в ассоциированные с опухолью фибробласты [29].

Асцит, представляющий собой скопление жидкости в брюшной полости, часто развивается при различных патологических состояниях, включая рак, и является еще одним компонентом микроокружения опухоли, а также важным источником ВВ [31]. Показано, что при серозном раке яичников высокой степени злокачественности асцитная жидкость содержит ВВ, происходящие преимущественно из макрофагов и фибробластов, а не из опухолевых клеток [32]. Протеомный анализ показал, что специфические маркеры ВВ в асцитной жидкости способны более точно предсказать выживаемость пациентов по сравнению с традиционными клеточными маркерами. ВВ, полученные из асцита (EXO^{Ascites}) пациентов с раком желудка, стимулировали инвазивность и ангиогенез в трехмерной аутологичной микрофлюидной системе опухолевых сфероидов. EXO^{Ascites} доставляют онкоген MET в опухолевые клетки, стимулируя онкогенные сигналы. Модифицированные ВВ, лишенные MET, снижали прогрессию опухоли, что указывает на потенциал для таргетной терапии [33].

ВВ играют значительную роль в стимуляции ангиогенеза опухоли. Например, известный индуктор ангиогенеза – Е-кадгерин – выделяется в форме экзосом [34]. Кроме того, miR-21, которая присутствует в ВВ фибробластов, ассоциированных с опухолью, доставляется в эндотелиальные клетки при множественной миеломе, где регулирует ангиогенез [35]. ВВ также способствуют формированию преметастатической ниши – микросреды, подготовленной для колонизации циркулирующих опухолевых клеток в определенных органах. ВВ, выделенные из протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, идентифицированы как переносчики фактора ингибирования миграции (MIF), ключевого элемента в формировании преметастатической ниши в печени. Блокирование MIF в этих ВВ эффективно предотвращало как образование преметастатической ниши, так и последующие метастазы в печени. Эти ВВ активировали звездчатые клетки печени и стимулировали ремоделирование внеклеточного матрикса. Данный процесс

приводил к накоплению фибронектина, который привлекает макрофаги, тем самым создавая микросреду, поддерживающую метастазы в печени [36].

Еще одно свойство ВВ в прогрессии опухолей – способность модулировать иммунный ответ. ВВ, выделенные из клеток пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, индуцировали иммунодепрессивный фенотип у моноцитов. Эти ВВ стимулировали высвобождение CCL2, CCL4 и интерлейкина-6, а также индуцировали экспрессию PD-L1, доставляя некодирующую РНК hY4 [37]. PD-L1 обнаружен также на поверхности выделенных из глиобластомы экзосом, которые демонстрировали PD-L1-зависимое ингибирование активации Т-клеток [38]. Показано, что ВВ опухоли могут быть переносчиками жирных кислот к дендритным клеткам, что приводило к накоплению липидов и усилению окисления жирных кислот, вызывая дисфункцию иммунного ответа дендритных клеток [39].

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА. ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ

ВВ могут быть выделены из всех типов биологических жидкостей человека, в том числе из крови, слез, мочи, слюны, спинномозговой жидкости (ликвор) и других. Эта универсальность делает ВВ перспективным инструментом для диагностики рака, особенно в рамках жидкостной биопсии. Жидкостная биопсия представляет собой инновационный метод анализа циркулирующих клеток опухоли, внеклеточных нуклеиновых кислот и ВВ (рис. 2). Этот малоинвазивный метод позволяет в реальном времени отслеживать прогрессию опухоли [40]. Преимуществами анализа ВВ методом жидкостной биопсии являются: (1) более высокая концентрация ВВ в биологических жидкостях по сравнению с циркулирующими опухолевыми клетками; (2) ВВ дают лучшее представление о клетках-продуцентах, чем циркулирующая ДНК; и (3) высокая биологическая стабильность ВВ в агрессивной опухолевой среде [41]. ВВ, выделенные из опухолевых клеток, несут широкий спектр цитозольных и поверхностных белков, ДНК, РНК, а также различные липиды и гликаны, в связи с чем имеют потенциал для использования при проведении скрининга ранних стадий рака, в мониторинге рака и прогнозировании ответа на терапию. Далее мы рассмотрим применение анализа ВВ для диагностики самых распространенных типов рака в рамках метода жидкостной биопсии.

Рак предстательной железы

Один из видов рака, для диагностики которого с успехом применяется жидкостная биопсия, – рак

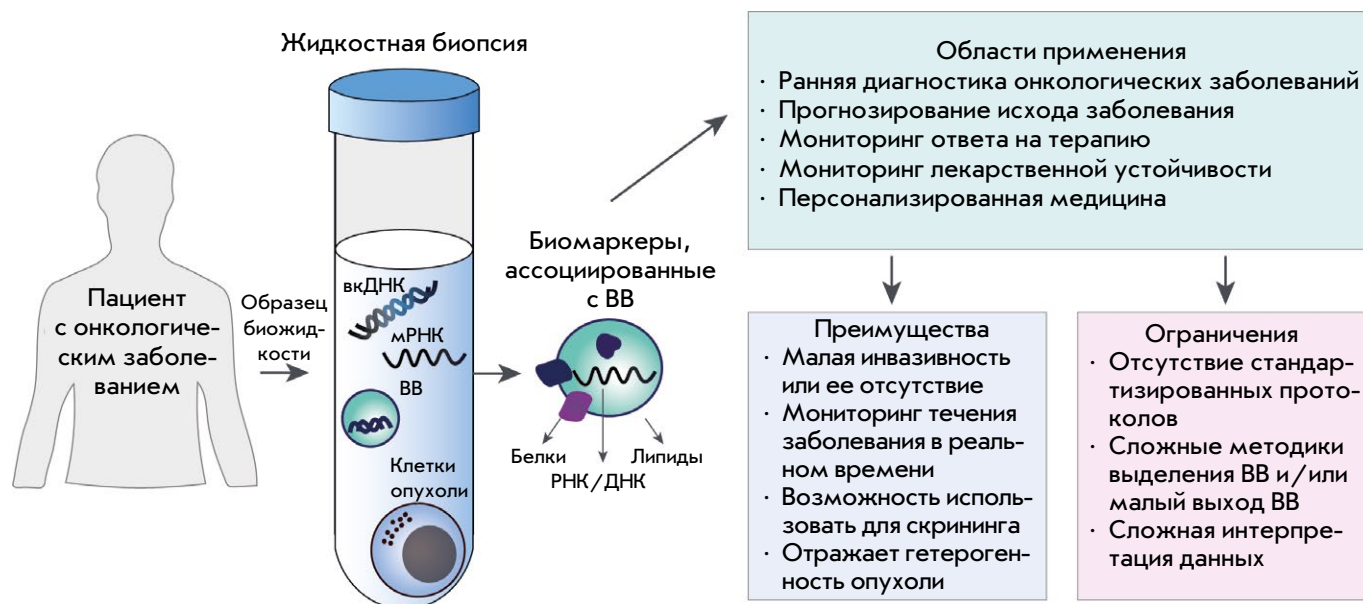


Рис. 2. Использование ВВ для диагностики рака методом жидкостной цитологии. Ключевые элементы, которые можно анализировать при помощи жидкостной цитологии, включают циркулирующую внеклеточную ДНК (вкДНК), внеклеточные везикулы (ВВ), мРНК, циркулирующие опухолевые клетки и метаболиты опухолевого происхождения

предстательной железы (РПЖ). Хотя внедрение теста на специфический антиген простаты (PSA) привело к существенному улучшению диагностики, остается потребность в биомаркерах, которые помогут точнее отслеживать прогрессирование заболевания [42]. В исследовании с использованием плазмы пациентов с РПЖ геномное профилирование ДНК, ассоциированной с ВВ (ВВ-ДНК), позволило изучить характеристики опухоли и коррелировало с прогрессированием заболевания, тогда как изучение РНК, ассоциированной с ВВ (ВВ-РНК), позволило получить представление об ответе опухоли на ранних стадиях терапии [43]. Специфические микроРНК, присутствующие в ВВ, также могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры РПЖ. В частности, miR-375, miR-21 и miR-574 обнаружили в ВВ, выделенных из сыворотки крови пациентов с РПЖ [44]. Кроме того, miR-21 и miR-375 выявлены также в ВВ, выделенных из мочи, что свидетельствует о возможности использования данных маркеров для неинвазивной диагностики [45]. Еще одна микроРНК, ассоциированная с ВВ, miR-141, обнаружена также как в сыворотке, так и в моче пациентов с РПЖ, что еще больше подчеркивает возможность использования таких маркеров для мониторинга РПЖ [46, 47]. Необходимо заметить, что и PSA также найден в ВВ, выделенных у пациентов с РПЖ, что подтверждает возможность использования ВВ в качестве источников клинически

значимой информации [48]. Наличие этих специфических микроРНК и белковых маркеров в ВВ подчеркивает их потенциальную роль как биомаркеров для раннего выявления, мониторинга прогрессирования и оценки ответа на лечение при РПЖ.

Колоректальный рак

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место по распространенности среди злокачественных опухолей в мире [49]. Традиционные методы диагностики КРР являются инвазивными и зачастую болезненными. Разработка новых неинвазивных методов диагностики может снизить уровень смертности за счет более ранней диагностики [50]. Большинство биомаркеров КРР, ассоциированных с ВВ, представляют собой РНК (в частности, микроРНК). Метаанализ 159 публикаций позволил выявить три микроРНК, общих для всех стадий заболевания: miR-146a-5p, miR-22-3p и miR-23b-3p [51]. Кроме того, обнаружены семь микроРНК, специфичных для определенных стадий КРР: стадия I – miR-301a-3p и miR-548i; стадия IIIA – miR-23a-3p; стадия IV – miR-194-3p, miR-33a-3p, miR-485-3p и miR-194-5p [51]. Однако содержание данных маркеров в биологических жидкостях заметно варьирует, что подчеркивает необходимость их дальнейшей валидации. Выявлено несколько типов ВВ-микроРНК в сыворотке крови, включая let-7a-5p, let-7c-5p, let-7f-5p, let-7d-3p, miR-423-5p,

miR-584-5p, miR-30a-5p, miR-99-5p, miR-150-5p, miR-26-5p и miR-204-5p [52]. С помощью биоинформатического анализа показано, что семейство микроРНК let-7 нацелено на ключевые гены в сигнальном пути TGF- β , включая TGF β RI и SMAD2, которые играют значительную роль в опухолевом процессе. Кроме того, выделены еще пять ВВ-микроРНК (hsa-miR-126, hsa-miR-139, hsa-miR-141, hsa-miR-29c и hsa-miR-423), обладающих высоким потенциалом в качестве маркеров КРР. При помощи базы данных miRDIIP выявлены связи между этими микроРНК и их мРНК-мишенями, участвующими в регуляции ключевых путей, таких как сигнальный путь В-клеточного рецептора и биосинтез гликосфинголипидов [53]. Длинные некодирующие РНК (lncRNA) также могут вносить вклад в прогрессию КРР и служить прогностическими маркерами заболевания [54, 55]. Потенциальными маркерами заболевания могут быть не только ВВ-РНК, но и некоторые белки, присутствующие в ВВ. Так, прионный белок PrPC, обнаруженный в ВВ при КРР, участвует в формировании условий для метастазирования. Это происходит за счет увеличения проницаемости эндотелия и усиления секреции ангиогенных факторов. Потенциально новым терапевтическим подходом, позволяющим контролировать метастазирование КРР, является сочетание химиотерапии с анти-PrPC-терапией [56].

Гепатоцеллюлярная карцинома

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – один из самых распространенных видов первичного рака печени, прогноз при котором, несмотря на достижения в лечении, остается в большинстве случаев неблагоприятным. Все больше данных свидетельствует о том, что ВВ могут служить специфическими диагностическими и даже прогностическими биомаркерами ГЦК [57]. Среди наиболее изученных экзосомных биомаркеров ГЦК выделяются микроРНК. Некоторые экзосомные микроРНК могут также использоваться для выбора стратегии лечения на поздних стадиях ГЦК [58]. Например, панель микроРНК, выявленных как потенциальные биомаркеры, включает микроРНК, гиперэкспрессируемые у пациентов с ГЦК: miR-224, miR-21, miR-210-3p, miR-93, miR-92b, miR-155, miR-665 [59]. Напротив, уровень экспрессии микроРНК как miR-718, miR-744, miR-9-3p и miR-125b снижен у пациентов с ГЦК. Объединение нескольких микроРНК в диагностические панели может повысить точность диагностики. В одном из исследований показано, что комбинация miR-26a, miR-29c и miR-199a позволяет эффективно различать пациентов с ГЦК и здоровых людей (AUC = 0.994), а также пациентов

с ГЦК и пациентов с циррозом печени (AUC = 0.965) [60]. Прогностический потенциал при ГЦК демонстрируют также и такие РНК, переносимые ВВ, как кольцевые РНК (circRNA). Например, по уровню hsa_circ_0029325 в ВВ можно предсказывать исход заболевания [61]. Другим типом РНК из ВВ, которые могут использоваться для диагностики ГЦК, являются PIWI-взаимодействующие РНК (piRNA), участвующие в прогрессии рака. Экспрессия piRNA ВВ, выделенных из сыворотки, повышена у пациентов с ГЦК, а некоторые из них (например, piR-15254, piR-1029, novel-piR-35395, novel-piR-32132 и novel-piR-43597) потенциально могут использоваться для диагностики ГЦК даже у пациентов с низкой опухолевой нагрузкой [62].

Белки ВВ также могут служить ценными прогностическими биомаркерами при ГЦК. Например, снижение уровня CD31 в ВВ пациентов с ГЦК коррелировало с рецидивом ГЦК через 12 месяцев после хирургического вмешательства [63]. Протеомное профилирование позволило сформировать панель дифференциально экспрессируемых белков – VWF, LGALS3BP, TGFB1, SERPINC1, HPX, HP, HBA1, FGA, FGG и FGB – которые могут составить основу диагностической панели ГЦК [64]. МикроРНК, circRNA, piRNA и белки ВВ представляют собой многообещающие неинвазивные биомаркеры для улучшения диагностики, прогноза и мониторинга лечения ГЦК, открывая новые возможности для персонализированного подхода к лечению пациентов.

Рак поджелудочной железы

Рак поджелудочной железы (РПЖЖ) занимает третье место среди причин смертности, связанных с онкологическими заболеваниями [65]. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы – наиболее распространенная форма рака поджелудочной железы, составляет более 90% всех случаев этого заболевания. РПЖЖ отличается высокой летальностью с пятилетней выживаемостью менее 10% [66]. Решающее значение для улучшения прогноза данного заболевания имеет ранняя диагностика. Недавние достижения в области машинного обучения способствовали идентификации новых потенциальных биомаркеров на основе ВВ, которые могут помочь в ранней диагностике РПЖЖ. Использование машинного обучения для анализа белков ВВ позволило выявить панель из семи потенциальных биомаркеров РПЖЖ (муцин-1, сиалированный х-антиген Льюиса, ферритин, фактор роста фибробластов 2, эпидермальный фактор роста человека 3, лептин и пролактин, AUC = 0.971) [67]. Еще одним перспективным биомаркером РПЖЖ,

концентрация которого повышается в ВВ, является глипикан-1. Обнаружение глипикана-1 в ВВ продемонстрировало 100% чувствительность и специфичность для диагностики всех стадий РПЖЖ, позволяя эффективно отличить пациентов с раком поджелудочной железы от здоровых доноров или пациентов с хроническим панкреатитом ($AUC = 1.0$) [68]. Кроме того, miR-21, представленная в ВВ пациентов с РПЖЖ, также может использоваться в качестве биомаркера и прогностического фактора общей выживаемости. Показан высокий потенциал повышенных уровней miR-21 в сочетании с miR-4525 и miR-451a как биомаркеров, позволяющих идентифицировать пациентов с высоким риском рецидива и неблагоприятным прогнозом [69]. Также у пациентов с РПЖЖ обнаружен повышенный (по сравнению с контрольной группой) уровень miR-191 [70]. Некоторые гликаны и липиды ВВ также, по-видимому, обладают потенциалом в качестве диагностических инструментов РПЖЖ, что подчеркивает значимость разнообразных молекул ВВ для жидкостной биопсии этого типа рака [71].

Рак легкого

Рак легкого (РЛ), поражающий миллионы людей ежегодно, остается одним из наиболее часто диагностируемых видов рака и ведущей причиной смертности, связанной с онкологическими заболеваниями [72]. Недавние достижения в области мультиплексного профилирования ВВ и машинного обучения открыли новые возможности для изучения ВВ, выделяемых клетками рака легкого [73]. Так, на основе явления Ферстеровского резонансного переноса энергии была разработана система для детекции мембранных белков ВВ. С использованием этой системы были обнаружены потенциальные диагностические маркеры ранних стадий РЛ (CEA, PD-L1, EpCAM и CA125) [74]. Другой метод, основанный на использовании диэлектрофоретического чипа, позволил выявить повышенные уровни miR-21, miR-191 и miR-192 в ВВ, выделенных из плазмы крови пациентов с раком легких [75]. Дополнительные панели, состоящие из микроРНК, обнаруженных в ВВ, показали свою эффективность в диагностике различных подтипов РЛ на ранних стадиях. Например, miR-483-3p предложена в качестве биомаркера ранних стадий мелкоклеточного рака легкого, а miR-152-3p и miR-1277-5p – ранних стадий немелкоклеточного рака легкого [76]. Кроме того, профилирование гликанов ВВ также может использоваться для диагностики рака легкого. При помощи теста EV-GLYPH, основанного на использовании микрофлюидных подходов, идентифицированы уникальные гликаные сигнатуры ВВ нетрансформированных и злокачественно

трансформированных клеток легкого. В клиническом исследовании этот тест позволил успешно различать пациентов с ранними стадиями злокачественных новообразований в легких от пациентов с доброкачественными узлами [77].

Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным видом рака у женщин. Считается, что в странах с высоким уровнем дохода РМЖ будет диагностирован у каждой восьмой женщины до 85 лет [78]. Определение молекулярного профиля ВВ при РМЖ обладает высоким потенциалом в качестве ранней неинвазивной диагностики, прогноза и мониторинга заболевания [79]. Показано, что протеомное профилирование ВВ, выделенных из клеточных линий РМЖ, позволяет дифференцировать различные подтипы РМЖ более эффективно, чем профилирование самих опухолевых клеток [80]. Отмечено также, что белковый состав ВВ, секретируемых клетками РМЖ, в значительной степени отражает их молекулярный подтип (например, HER2-положительный или трижды негативный РМЖ) [80]. В другом исследовании анализ ВВ из плазмы пациентов с РМЖ выявил 10 кандидатных биомаркеров, уровни которых у пациентов с РМЖ были выше, чем у здоровых доноров (CD3, CD56, CD2, CD25, CD9, CD44, CD326, CD133/1, CD142 и CD14). Показано, что липидный профиль ВВ, включая сфинголипиды и фосфолипиды, значительно отличается от профиля выделяющих их опухолевых клеток, которые сильнее обогащены триглицеридами и жирными кислотами. ВВ, выделенные из плазмы пациентов с РМЖ, охарактеризованы как источники липидных биомаркеров для раннего выявления РМЖ и его подтипов (ER/PR+, HER2+ и трижды негативный РМЖ) [81]. Кроме того, микроРНК, полученные из ВВ, также могут использоваться для диагностики РМЖ [82].

Основные маркеры, упомянутые в данном обзоре, перечислены в *табл. 1*.

ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ УЛУЧШЕНИЯ ДЕТЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Эффективный поиск биомаркеров на основе ВВ требует увеличения чувствительности детекции таких маркеров по сравнению с существующими классическими методами, такими как масс-спектрометрия и вестерн-блоттинг. Применение искусственного интеллекта и методов машинного обучения способно существенно улучшить предел детекции биомаркеров на основе ВВ методом жидкостной биопсии. Один из подходов, улучшающих детекцию ВВ, – FluoPADE (англ. Fluorescence po-

Таблица 1. ВВ-ассоциированные маркеры для диагностики онкологических заболеваний

Тип биомаркера	Название	Ассоциированные патологии	Ссылка
РНК	miR-21 ↑	РПЖ	[44, 45]
		ГЦК	[59]
		РПЖЖ	[69, 70]
		РЛ	[75]
		РМЖ	[82]
	miR-141 ↑	РПЖ	[46, 47]
	miR-146a-5p ↑ miR-22-3p ↑ miR-23b-3p ↑ miR-301a-3p ↑ miR-548i ↑ miR-23a-3p ↑ miR-194-3p ↑ miR-33a-3p ↑ miR-485-3p ↑ miR-194-5p ↑	КРР	[51]
	let-7a-5p ↑ let-7c-5p ↑ let-7f-5p ↑ let-7d-3p ↑ miR-423-5p ↑ miR-584-5p ↑ miR-30a-5p ↑ miR-99-5p ↑ miR-150-5p ↑ miR-26-5p ↑ miR-204-5p ↑	КРР	[52]
	miR-126 ↑ miR-139 ↑ miR-141 ↑ miR-29c ↑ miR-423 ↑	КРР	[53]
	miR-224 ↑ miR-21 ↑ miR-210-3p ↑ miR-93 ↑ miR-92b ↑ miR-155 ↑ miR-665 ↑	ГЦК	[59]
	miR-718 ↓ miR-744 ↓ miR-9-3p ↓ miR-125b ↓	ГЦК	[59]
	miR-26a ↑ miR-29c ↑ miR-199a ↑	ГЦК	[60]
	hsa_circ_0029325 ↑	ГЦК	[61]
	piR-15254 ↑ piR-1029 ↑ novel-piR-35395 ↑ novel-piR-32132 ↑ novel-piR-43597 ↑	ГЦК	[62]
	miR-4525 ↑ miR-451a ↑	РПЖЖ	[69]
	miR-191 ↑ miR-192 ↑	РЛ	[75]
	miR-483-3p ↑ miR-152-3p ↑ miR-1277-5p ↑	РЛ	[76]
	miR-375 ↑	РПЖ	[44, 45]
	miR-574 ↑	РПЖ	[44]

Тип биомаркера	Название	Ассоциированные патологии	Ссылка
Белки	Клеточный прионный белок	KPP	[56]
	CD31	ГЦК	[63]
	Фактор Виллебранда Белок, связывающий галектин-3 Трансформирующий фактор роста бета 1 Антитромбин III Гемопексин Гаптоглобин Субъединица гемоглобина альфа 1 Фибриноген, альфа-цепь Фибриноген, гамма-цепь Фибриноген, бета-цепь	ГЦК	[64]
	Муцин-1 Сиалированный х-антиген Льюиса Ферритин Фактор роста фибробластов 2 Эпидермальный фактор роста 3 Лептин Пролактин	РПЖЖ	[67]
	Глипикан-1	РПЖЖ	[68]
	CEA PD-L1 EpcAM CA125	РЛ	[74]
	PSA	РПЖ	[48]
	Церамиды Сфингомиелины Гексозилцерамиды Лизофосфатидилхолины Лизофосфатидилэтаноламины Фосфатидилхолины Плазмалогены – фосфатидилэтаноламины с простой эфирной связью	РМЖ	[81]

Примечание. ВВ – внеклеточные везикулы; KPP – колоректальный рак; РПЖЖ – рак поджелудочной железы; РЛ – рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; РПЖ – рак предстательной железы; CA125 – антиген рака 125. CEA – раковоэмбриональный антиген; EpcAM (молекула адгезии эпителиальных клеток); PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; PSA (англ. Prostate-specific antigen) – специфический антиген простаты.

Стрелка вверх (↑) указывает на повышение, стрелка вниз (↓) – на снижение содержания РНК во внеклеточных везикулах в образцах пациентов с онкологическими заболеваниями относительно образцов здоровых доноров.

larization using aptamers for the detection of extracellular nanovesicles – поляризация флуоресценции с использованием аптамеров для обнаружения внеклеточных нановезикул [83]. Этот метод основан на использовании ДНК-аптамеров и флуоресцентной поляризации для детекции ВВ в плазме человека и культуральной среде. Специфичность анализа достигается фиксацией ВВ с помощью антител и последующей детекцией с использованием ДНК-аптамера, который нацелен на специфический биомаркер ВВ. Этот метод можно использовать для раннего выявления рака, определения микрометастазов и мониторинга минимальной остаточной болезни. Другой подход включает ДНК-кодирование ВВ для изучения их поверхностного белкового состава [84]. Преимуществом этой технологии является возможность изучения состава отдельных

экзосом. Разработан также метод, использующий наноструктурированные 3D-сенсоры, для молекулярного и функционального профилирования ВВ стволовых опухолевых клеток. Эти высокочувствительные сенсоры позволили детектировать до 10 отдельных ВВ в 10 мкл, а при подключении алгоритмов искусственного интеллекта удалось со 100% чувствительностью и специфичностью отличить опухолевые образцы от нормальных [85]. Еще один метод, DCR-IEVN (англ. – DNA cascade reaction-triggered individual EV nanoencapsulation – индивидуальная наноинкапсуляция ВВ, вызванная каскадной реакцией ДНК), позволяет инкапсулировать субпопуляции ВВ напрямую из клинических образцов сыворотки крови. При интеграции с алгоритмами машинного обучения этот подход показал высокую диагностическую точность для ГЦК [86].

Хошино и соавт. провели масштабный протеомный анализ ВВ из различных тканей, клеток и биологических жидкостей [87]. Показано, что классические маркеры ВВ, такие как CD63, TSG101, флотиллины и ALIX, недостаточно представлены в ВВ плазмы человека. Вместо них были предложены альтернативные маркеры для выделения ВВ, такие как MSN, FLNA, STOM и RAP1B. Затем, с использованием методов машинного обучения была определена панель белков ВВ, специфичных для определенных типов опухолей, которая также может применяться для диагностики рака неизвестной первичной локализации. Детектировать белки и специфические РНК в индивидуальных ВВ можно с использованием методики SPIRFISH, объединяющей технологию сенсоров интерферометрического отражения с флуоресцентной гибридизацией *in situ*, что обеспечивает высокую чувствительность и специфичность определения [88].

В современных исследованиях ВВ активно используется искусственный интеллект. Так, алгоритмы глубокого обучения применили для профилирования микроРНК на уровне отдельных ВВ [89]. Этот метод сочетает TIRF-изображение (англ. total internal reflection fluorescence microscope – метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения), которое одновременно обнаруживает несколько микроРНК *in situ* в индивидуальных ВВ, с алгоритмом для автоматизированного анализа изображений. Другой алгоритм глубокого обучения использует наноплазмонные спектры для анализа мутированных экзосомальных белков, что может быть перспективным для мониторинга эффективности терапии опухолей [90].

Ограниченная доступность некоторых биологических жидкостей побудила исследователей к разработке инновационных методов выделения ВВ. Предложено использовать наноллисты целлюлозы, которые способны эффективно захватывать ВВ из малого объема жидкости, что позволяет про-

водить последующее секвенирование малых РНК [91]. Использование жидкостной биопсии ВВ имеет множество преимуществ перед классическими методами диагностики. Во-первых, это неинвазивный метод, который способен свести к минимуму потребность в таких процедурах, как пункция или биопсия тканей, предоставляя пациентам больше вариантов и помогая отслеживать прогрессирование болезни и эффективность терапии. Также плюсом данного метода является возможность его использования для анализа всех биологических жидкостей, что позволяет всесторонне охарактеризовать различные опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВВ являются ключевыми участниками опухолевой прогрессии. Способность переносить биологически активные молекулы и изменять микроокружение опухоли делает ВВ мощными медиаторами прогрессии опухолей, метастазирования и уклонения от иммунного надзора. При этом ВВ являются перспективными инструментами для ранней диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с помощью методов жидкостной биопсии. Недавние достижения в области выделения и характеристики ВВ значительно улучшили точность и эффективность их изучения, особенно в контексте онкологии. Разработка инновационных методов, таких как высокопроизводительные микрофлюидные установки и алгоритмы машинного обучения, позволила повысить возможности детекции и анализа ВВ, более глубоко определить их молекулярный состав и функциональные свойства. Таким образом, изучение отклонений в молекулярном составе ВВ при онкологических заболеваниях открывает огромный потенциал для будущего персонализированного лечения и диагностики опухолей. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 22-14-00219.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buzas E.I. // Nat. Rev. Immunol. 2023. V. 23. № 4. P. 236–250. doi: 10.1038/s41577-022-00763-8
2. Jeppesen D.K., Zhang Q., Franklin J.L., Coffey R.J. // Trends Cell Biol. 2023. V. 33. № 8. P. 667–681. doi: 10.1016/j.tcb.2023.01.002
3. Doyle L.M., Wang M.Z. // Cells. 2019. V. 8. № 7. P. 727. doi: 10.3390/cells8070727
4. Chuo S.T.-Y., Chien J.C.-Y., Lai C.P.-K. // J. Biomed. Sci. 2018. V. 25. № 1. P. 91. doi: 10.1186/s12929-018-0494-5
5. Dai J., Su Y., Zhong S., Cong L., Liu B., Yang J., Tao Y., He Z., Chen C., Jiang Y. // Signal Transduct. Target. Ther. 2020. V. 5. № 1. P. 145. doi: 10.1038/s41392-020-00261-0
6. Clos-Sansalvador M., Monguió-Tortajada M., Roura S., Franquesa M., Borràs F.E. // Eur. J. Cell Biol. 2022. V. 101. № 3. P. 151227. doi: 10.1016/j.ejcb.2022.151227
7. Ovchinnikova L.A., Tanygina D.Y., Dzhelad S.S., Evtushenko E.G., Bagrov D.V., Gabibov A.G., Lomakin Y.A. // Heliyon. 2024. V. 10. № 24. P. e40940. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e40940
8. Leong S.Y., Lok W.W., Goh K.Y., Ong H.B., Tay H.M., Su C., Kong F., Upadya M., Wang W., Radnaa E., et al. // ACS Nano. 2024. V. 18. № 8. P. 6623–6637. doi: 10.1021/acsnano.3c12862
9. Lyu T.S., Ahn Y., Im Y.-J., Kim S.-S., Lee K.-H., Kim J., Choi Y., Lee D., Kang E., Jin G., et al. // PLoS One. 2021. V. 16. № 1. P. e0231994. doi: 10.1371/journal.pone.0231994
10. Wu S., Zhao Y., Zhang Z., Zuo C., Wu H., Liu Y. //

- Photonics. 2024. V. 11. № 2. P. 101. doi: 10.3390/photonics11020101
11. Han Q.-F., Li W.-J., Hu K.-S., Gao J., Zhai W.-L., Yang J.-H., Zhang S.-J. // *Mol. Cancer*. 2022. V. 21. № 1. P. 207. doi: 10.1186/s12943-022-01671-0
 12. Lee Y.J., Shin K.J., Chae Y.C. // *Exp. Mol. Med.* 2024. V. 56. № 4. P. 877–889. doi: 10.1038/s12276-024-01209-y
 13. Rabia M., Leuzy V., Soulage C., Durand A., Fourmaux B., Errazuriz-Cerda E., Köffel R., Draeger A., Colosetti P., Jalabert A., et al. // *Biochimie*. 2020. V. 178. P. 26–38. doi: 10.1016/j.biochi.2020.07.005
 14. Ghadami S., Dellinger K. // *Front. Mol. Biosci.* 2023. V. 10. P. 1198044. doi: 10.3389/fmolb.2023.1198044
 15. Donoso-Quezada J., Ayala-Mar S., González-Valdez J. // *Traffic*. 2021. V. 22. № 7. P. 204–220. doi: 10.1111/tra.12803
 16. Lea J., Sharma R., Yang F., Zhu H., Ward E.S., Schroit A.J. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 9. P. 14395–14407. doi: 10.18632/oncotarget.14795
 17. Teng F., Fussenegger M. // *Adv. Sci. (Weinh)*. 2020. V. 8. № 1. P. 2003505. doi: 10.1002/adv.202003505
 18. Sun M., Xue X., Li L., Xu D., Li S., Li S.C., Su Q. // *Quant. Imaging Med. Surg.* 2021. V. 11. № 11. P. 4604–4616. doi: 10.21037/qims-20-1015
 19. Surman M., Stepień E., Hoja-Łukowicz D., Przybyło M. // *Clin. Exp. Metastasis*. 2017. V. 34. № 3–4. P. 273–289. doi: 10.1007/s10585-017-9844-z
 20. Ratajczak M.Z., Ratajczak J. // *Leukemia*. 2020. V. 34. № 12. P. 3126–3135. doi: 10.1038/s41375-020-01041-z
 21. Anderson N.M., Simon M.C. // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. № 16. P. R921–R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081
 22. Guo Z., Wang G., Yun Z., Li Y., Huang B., Jin Q., Chen Y., Xu L., Lv W. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2023. V. 149. № 19. P. 17581–17595. doi: 10.1007/s00432-023-05450-2
 23. Paskeh M.D.A., Entezari M., Mirzaei S., Zabolian A., Saleki H., Naghdi M.J., Sabet S., Khoshbakht M.A., Hashemi M., Hushmandi K., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2022. V. 15. № 1. P. 83. doi: 10.1186/s13045-022-01305-4
 24. Zhou L., Yang K., Andl T., Wickett R.R., Zhang Y. // *J. Cancer*. 2015. V. 6. № 8. P. 717–726. doi: 10.7150/jca.10865
 25. Peng Z., Tong Z., Ren Z., Ye M., Hu K. // *Mol. Med.* 2023. V. 29. № 1. P. 66. doi: 10.1186/s10020-023-00665-y
 26. Zhao H., Yang L., Baddour J., Achreja A., Bernard V., Moss T., Marini J.C., Tudawe T., Seviour E.G., San Lucas F.A., et al. // *eLife*. 2016. V. 5. P. e10250. doi: 10.7554/eLife.10250
 27. Li W., Zhang X., Wang J., Li M., Cao C., Tan J., Ma D., Gao Q. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 56. P. 96035–96047. doi: 10.18632/oncotarget.21635
 28. Luga V., Zhang L., Vilorio-Petit A.M., Ogunjimi A.A., Inanlou M.R., Chiu E., Buchanan M., Hosein A.N., Basik M., Wrana J.L. // *Cell*. 2012. V. 151. № 7. P. 1542–1556. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024
 29. Richards K.E., Zeleniak A.E., Fishel M.L., Wu J., Littlepage L.E., Hill R. // *Oncogene*. 2017. V. 36. № 13. P. 1770–1778. doi: 10.1038/onc.2016.353
 30. Kewitz-Hempel S., Windisch N., Hause G., Müller L., Sunderkötter C., Gerloff D. // *J. Extracell. Vesicles*. 2024. V. 13. № 9. P. e12509. doi: 10.1002/jev.212509
 31. Geng Z., Pan X., Xu J., Jia X. // *J. Cell Commun. Signal*. 2023. V. 17. № 3. P. 391–407. doi: 10.1007/s12079-022-00698-8
 32. Vyhľádalová Kotrbová A., Gömöryová K., Mikulová A., Plešingerová H., Sladeczek S., Kravec M., Hrachovinová Š., Potěšil D., Dunsmore G., Blériot C., et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2024. V. 13. № 3. P. e12420. doi: 10.1002/jev.212420
 33. Hyung S., Ko J., Heo Y.J., Blum S.M., Kim S.T., Park S.H., Park J.O., Kang W.K., Lim H.Y., Klempner S.J., et al. // *Sci. Adv.* 2023. V. 9. № 47. P. eadk1098. doi: 10.1126/sciadv.adk1098
 34. Tang M.K.S., Yue P.Y.K., Ip P.P., Huang R.-L., Lai H.-C., Cheung A.N.Y., Tse K.Y., Ngan H.Y.S., Wong A.S.T. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 2270. doi: 10.1038/s41467-018-04695-7
 35. Miaomiao S., Xiaoqian W., Yuwei S., Chao C., Chenbo Y., Yinghao L., Yichen H., Jiao S., Kuisheng C. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 1. P. 9671. doi: 10.1038/s41598-023-36092-6
 36. Costa-Silva B., Aiello N.M., Ocean A.J., Singh S., Zhang H., Thakur B.K., Becker A., Hoshino A., Mark M.T., Molina H., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. № 6. P. 816–826. doi: 10.1038/ncb3169
 37. Haderk F., Schulz R., Iskar M., Cid L.L., Worst T., Willmund K.V., Schulz A., Warnken U., Seiler J., Benner A., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 13. P. eaah5509. doi: 10.1126/sciimmunol.aah5509
 38. Ricklefs F.L., Alayo Q., Krenzlin H., Mahmoud A.B., Speranza M.C., Nakashima H., Hayes J.L., Lee K., Balaj L., Passaro C., et al. // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. № 3. P. eaar2766. doi: 10.1126/sciadv.aar2766
 39. Yin X., Zeng W., Wu B., Wang L., Wang Z., Tian H., Wang L., Jiang Y., Clay R., Wei X., et al. // *Cell Rep.* 2020. V. 33. № 3. P. 108278. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108278
 40. Poulet G., Massias J., Taly V. // *Acta Cytol.* 2019. V. 63. № 6. P. 449–455. doi: 10.1159/000499337
 41. Yu D., Li Y., Wang M., Gu J., Xu W., Cai H., Fang X., Zhang X. // *Mol. Cancer*. 2022. V. 21. № 1. P. 56. doi: 10.1186/s12943-022-01509-9
 42. Ramirez-Garrastacho M., Bajo-Santos C., Line A., Martens-Uzunova E.S., de la Fuente J.M., Moros M., Soekmadji C., Tasken K.A., Llorente A. // *Br. J. Cancer*. 2022. V. 126. № 3. P. 331–350. doi: 10.1038/s41416-021-01610-8
 43. Casanova-Salas I., Aguilar D., Cordoba-Terreros S., Agundez L., Brandariz J., Herranz N., Mas A., Gonzalez M., Morales-Barrera R., Sierra A., et al. // *Cancer Cell*. 2024. V. 42. № 7. P. 1301–1312.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2024.06.003
 44. Li M., Rai A.J., DeCastro G.J., Zeringer E., Barta T., Magdaleno S., Setterquist R., Vlassov A.V. // *Methods*. 2015. V. 87. P. 26–30. doi: 10.1016/j.jymeth.2015.03.009
 45. Foj L., Ferrer F., Serra M., Arévalo A., Gavagnach M., Giménez N., Filella X. // *Prostate*. 2017. V. 77. № 6. P. 573–583. doi: 10.1002/pros.23295
 46. Li W., Dong Y., Wang K.J., Deng Z., Zhang W., Shen H.F. // *Neoplasma*. 2020. V. 67. № 6. P. 1314–1318. doi: 10.4149/neo_2020_191130N1234
 47. Li Z., Ma Y.-Y., Wang J., Zeng X.-F., Li R., Kang W., Hao X.-K. // *Onco Targets Ther.* 2016. V. 9. P. 139–148. doi: 10.2147/OTT.S95565
 48. Logozzi M., Angelini D.F., Iessi E., Mizzoni D., Di Raimo R., Federici C., Lugini L., Borsellino G., Gentilucci A., Pierella F., et al. // *Cancer Lett.* 2017. V. 403. P. 318–329. doi: 10.1016/j.canlet.2017.06.036
 49. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. // *CA Cancer J. Clin.* 2021. V. 71. № 3. P. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660
 50. Brenne S.S., Madsen P.H., Pedersen I.S., Hveem K., Skorpén F., Krarup H.B., Giskeødegård G.F., Laugsand E.A. // *Br. J. Cancer*. 2023. V. 129. № 5. P. 861–868. doi: 10.1038/s41416-023-02337-4
 51. Long F., Tian L., Chai Z., Li J., Tang Y., Liu M. // *Front. Med. (Lausanne)*. 2022. V. 9. P. 881788. doi: 10.3389/fmed.2022.881788

52. Bakhsh T., Alhazmi S., Farsi A., Yusuf A.S., Alharthi A., Qahl S.H., Alghamdi M.A., Alzahrani F.A., Elgaddar O.H., Ibrahim M.A., et al. // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. № 1. P. 8902. doi: 10.1038/s41598-024-58536-3
53. Ma J., Wang P., Huang L., Qiao J., Li J. // *BMC Med. Genomics.* 2021. V. 14. № 1. P. 60. doi: 10.1186/s12920-021-00905-2
54. Hu D., Zhan Y., Zhu K., Bai M., Han J., Si Y., Zhang H., Kong D. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. V. 51. № 6. P. 2704–2715. doi: 10.1159/000495961
55. Yu M., Song X.-G., Zhao Y.-J., Dong X.-H., Niu L.-M., Zhang Z.-J., Shang X.-L., Tang Y.-Y., Song X.-R., Xie L. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 618967. doi: 10.3389/fonc.2021.618967
56. Yun C.-W., Lee J.-H., Go G., Jeon J., Yoon S., Lee S.-H. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. № 9. P. 2144. doi: 10.3390/cancers13092144
57. Sasaki R., Kanda T., Yokosuka O., Kato N., Matsuoka S., Moriyama M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 6. P. 1406. doi: 10.3390/ijms20061406
58. Liu M., Lai Z., Yuan X., Jin Q., Shen H., Rao D., Huang D. // *Mol. Med.* 2023. V. 29. № 1. P. 136. doi: 10.1186/s10020-023-00731-5
59. Sorop A., Constantinescu D., Cojocaru F., Dinischiotu A., Cucu D., Dima S.O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. P. 4997. doi: 10.3390/ijms22094997
60. Yang J., Dong W., Zhang H., Zhao H., Zeng Z., Zhang F., Li Q., Duan X., Hu Y., Xiao W. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 927251. doi: 10.3389/fcell.2022.927251
61. Yin K.-L., Sun T., Duan Y.-X., Ye W.-T., Ming Li, Liao R. // *Discov. Oncol.* 2024. V. 15. № 1. P. 212. doi: 10.1007/s12672-024-01060-7
62. Rui T., Wang K., Xiang A., Guo J., Tang N., Jin X., Lin Y., Liu J., Zhang X. // *Int. J. Nanomedicine.* 2023. V. 18. P. 1989–2001. doi: 10.2147/IJN.S398462
63. Juratli M.A., Pollmann N.S., Oppermann E., Mohr A., Roy D., Schnitzbauer A., Michalik S., Vogl T., Stoecklein N.H., Houben P., et al. // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. № 1. P. 5322. doi: 10.1038/s41598-024-55888-8
64. Zhao L., Shi J., Chang L., Wang Y., Liu S., Li Y., Zhang T., Zuo T., Fu B., Wang G., et al. // *ACS Omega.* 2021. V. 6. № 1. P. 827–835. doi: 10.1021/acsomega.0c05408
65. Ilic I., Ilic M. // *World J. Gastroenterol.* 2022. V. 28. № 32. P. 4698–4715. doi: 10.3748/wjgv28.i32.4698
66. Connor A.A., Gallinger S. // *Nat. Rev. Cancer.* 2022. V. 22. № 3. P. 131–142. doi: 10.1038/s41568-021-00418-1
67. Hinestrosa J.P., Sears R.C., Dhani H., Lewis J.M., Schroeder G., Balcer H.I., Keith D., Sheppard B.C., Kurzrock R., Billings P.R. // *Commun. Med. (London).* 2023. V. 3. № 1. P. 146. doi: 10.1038/s43856-023-00351-4
68. Melo S.A., Luecke L.B., Kahlert C., Fernandez A.F., Gammon S.T., Kaye J., LeBleu V.S., Mittendorf E.A., Weitz J., Rahbari N., et al. // *Nature.* 2015. V. 523. № 7559. P. 177–182. doi: 10.1038/nature14581
69. Kawamura S., Iinuma H., Wada K., Takahashi K., Minezaki S., Kainuma M., Shibuya M., Miura F., Sano K. // *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2019. V. 26. № 2. P. 63–72. doi: 10.1002/jhbp.601
70. Goto T., Fujiya M., Konishi H., Sasajima J., Fujibayashi S., Hayashi A., Utsumi T., Sato H., Iwama T., Ijiri M., et al. // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. № 1. P. 116. doi: 10.1186/s12885-018-4006-5
71. Zhang W., Campbell D.H., Walsh B.J., Packer N.H., Liu D., Wang Y. // *J. Nanobiotechnology.* 2022. V. 20. № 1. P. 446. doi: 10.1186/s12951-022-01641-0
72. Thai A.A., Solomon B.J., Sequist L.V., Gainor J.F., Heist R.S. // *Lancet.* 2021. V. 398. № 10299. P. 535–554. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00312-3
73. Huang G., Zheng W., Zhou Y., Wan M., Hu T. // *Acta Pharm. Sin. B.* 2024. V. 14. № 9. P. 3855–3875. doi: 10.1016/j.apsb.2024.06.010
74. Xiao S., Yao Y., Liao S., Xu B., Li X., Zhang Y., Zhang L., Chen Q., Tang H., Song Q., et al. // *Nano Lett.* 2023. V. 23. № 17. P. 8115–8125. doi: 10.1021/acs.nanolett.3c02193
75. Chen J., Xu Y., Wang X., Liu D., Yang F., Zhu X., Lu Y., Xing W. // *Lab. Chip.* 2019. V. 19. № 3. P. 432–443. doi: 10.1039/c8lc01193a
76. Jiang Y.-F., Wei S.-N., Geng N., Qin W.-W., He X., Wang X.-H., Qi Y.-P., Song S., Wang P. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 17201. doi: 10.1038/s41598-022-22194-0
77. Zhou Q., Niu X., Zhang Z., O'Byrne K., Kulasinghe A., Fielding D., Möller A., Wuethrich A., Lobb R.J., Trau M. // *Adv. Sci. (Weinh).* 2024. V. 11. № 33. P. e2401818. doi: 10.1002/advs.202401818
78. Britt K.L., Cuzick J., Phillips K.-A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2020. V. 20. № 8. P. 417–436. doi: 10.1038/s41568-020-0266-x
79. Bandu R., Oh J.W., Kim K.P. // *Proteomics.* 2024. V. 24. № 11. P. e2300062. doi: 10.1002/pmic.202300062
80. Rontogianni S., Synadaki E., Li B., Liefwaard M.C., Lips E.H., Wesseling J., Wu W., Altelaar M. // *Commun. Biol.* 2019. V. 2. P. 325. doi: 10.1038/s42003-019-0570-8
81. Dorado E., Doria M.L., Nagelkerke A., McKenzie J.S., Maneta-Stavarakaki S., Whittaker T.E., Nicholson J.K., Coombes R.C., Stevens M.M., Takats Z. // *J. Extracell. Vesicles.* 2024. V. 13. № 3. P. e12419. doi: 10.1002/jev2.12419
82. Lee Y., Ni J., Beretov J., Wasinger V.C., Graham P., Li Y. // *Mol. Cancer.* 2023. V. 22. № 1. P. 33. doi: 10.1186/s12943-023-01741-x
83. Pham C.V., Chowdhury R., Patel S., Jaysawal S.K., Hou Y., Xu H., Jia L., Zhang Y.-M., Wang X., Duan W., et al. // *J. Extracell. Vesicles.* 2024. V. 13. № 9. P. e12502. doi: 10.1002/jev2.12502
84. Wu D., Yan J., Shen X., Sun Y., Thulin M., Cai Y., Wik L., Shen Q., Oelrich J., Qian X., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3854. doi: 10.1038/s41467-019-11486-1
85. Haldavnekar R., Venkatakrishnan K., Tan B. // *ACS Nano.* 2022. V. 16. № 8. P. 12226–12243. doi: 10.1021/acsnano.2c02971
86. Li X., Liu Y., Fan Y., Tian G., Shen B., Zhang S., Fu X., He W., Tao X., Ding X., et al. // *ACS Nano.* 2024. V. 18. № 17. P. 11389–11403. doi: 10.1021/acsnano.4c01310
87. Hoshino A., Kim H.S., Bojmar L., Gyan K.E., Cioffi M., Hernandez J., Zambirinis C.P., Rodrigues G., Molina H., Heissel S., et al. // *Cell.* 2020. V. 182. № 4. P. 1044–1061.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009
88. Troyer Z., Gololobova O., Koppula A., Liao Z., Horns F., Elowitz M.B., Tosar J.P., Batish M., Witwer K.W. // *ACS Nano.* 2024. V. 18. № 39. P. 26568–26584. doi: 10.1021/acsnano.4c03679
89. Zhang X.-W., Qi G.-X., Liu M.-X., Yang Y.-F., Wang J.-H., Yu Y.-L., Chen S. // *ACS Sens.* 2024. V. 9. № 3. P. 1555–1564. doi: 10.1021/acssensors.3c02789
90. Kim S., Choi B.H., Shin H., Kwon K., Lee S.Y., Yoon H.B., Kim H.K., Choi Y. // *ACS Sens.* 2023. V. 8. № 6. P. 2391–2400. doi: 10.1021/acssensors.3c00681
91. Yokoi A., Yoshida K., Koga H., Kitagawa M., Nagao Y., Iida M., Kawaguchi S., Zhang M., Nakayama J., Yamamoto Y., et al. // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. P. 6915. doi: 10.1038/s41467-023-42593-9